



Universidad Nacional del Comahue

Facultad de Ciencias Agrarias

“Efecto del 1-metilciclopropeno en el proceso de estrés oxidativo y en el desarrollo de escaldadura superficial asociado a condiciones de bajas temperaturas en frutos de pera”



Trabajo de Tesis para optar al Título de Magister en Ciencias Agrarias y Biotecnología

Ing. Agr. Mabel Beatriz Vullioud

Director: **Dra. Ing. Agr. Ana Paula Candan**

Codirectora: **MSc.Ing. Agr. Graciela Colavita**

2016

Con todo mi amor:

A mi Dios que es mi fortaleza y allana
constantemente mis caminos y a Philippe
mi esposo, que está siempre a mi lado.

Agradecimientos:

A Philippe, mi esposo por su infinita paciencia, apoyo, generosidad, por dejarme ser libre y confiar siempre en mí.

A mis hijos Nicolás y Juan Pablo, que siempre me animaron a continuar y Mariana, mi sol, que con su experiencia corrigió los formatos. Los amo.

A Ana Paula mi directora, que con su enorme experiencia me enseñó a concentrarme en lo importante.

A Graciela mi codirectora, que siempre me alentó a continuar y brindó su ayuda en todo momento.

A Vanesa que con alegría y generosidad me abrió la puerta de su laboratorio y compartió muchas horas de trabajo. Con mate en mano, me enseñó con paciencia las técnicas y me brindó su amistad. Sin su ayuda jamás habría podido terminar esta Tesis.

A Gabriela, Eduardo y Sonia por hacerme sentir bienvenida en cada viaje al laboratorio.

A Valentín Tassile, por su ayuda en las lides con las estadísticas.

A Adriana, Cristina, Cecilia, Laura y Elizabeth compañeras de ruta con quienes compartimos hermosas vivencias y nos alentamos a no claudicar.

Al INTA por darme un lugar y el apoyo económico para realizar mi Tesis y a todo el personal por la calidez de su trato.

A todos mis compañeros que me brindaron su amistad, haciendo de la Maestría uno de los momentos más entretenidos de mi vida.

A los docentes organizadores y en especial a Christian el Director, que siempre buscó allanar todas las dificultades, haciendo de la Maestría una hermosa experiencia.

De corazón, muchas gracias ¡!

RESUMEN

Argentina es un país productor y líder en exportación de peras y el Alto Valle de Río Negro tiene a esta actividad como soporte principal de su economía. Por logística de mercados, las frutas se conservan refrigeradas en cámara bajo diferentes modalidades de composición de gases, temperaturas y tiempo de almacenamiento, en función de la especie y variedad. Las peras sometidas a estrés oxidativo por efecto de las bajas temperaturas desarrollan daños visibles que producen pérdidas de su valor comercial en el mediano o largo plazo. La escaldadura superficial, es una importante alteración fisiológica de postcosecha que afecta gran parte de las variedades comercializadas y se caracteriza por el desarrollo de manchas oscuras en la piel después de tres o cuatro meses de puesta en frío y al exponerla a temperatura ambiente. La causa principal es la oxidación del α -farneseno, a compuestos altamente tóxicos (los trienos conjugados), que dañan las membranas de las células epidérmicas provocando su muerte y la ocurrencia de los síntomas, cuando los mecanismos antioxidantes han sido sobrepasados. El 1-metilciclopropeno (1-MCP), es un antagonista del etileno que podría reemplazar el uso de antiescaldantes químicos que han sido prohibidos en muchos países compradores de nuestra fruta, manteniendo además la calidad organoléptica al retrasar los procesos de senescencia. No se conocen mecanismos de acción directa del 1-MCP sobre el nivel de antioxidantes, pero diversos autores sugieren que actuaría protegiéndolo y/o disminuyendo las especies reactivas de oxígeno. En esta tesis se puso a prueba dicha hipótesis. Peras Beurré D'Anjou con fecha de cosecha óptima sin tratamiento (Control) o tratadas con 300 ppb de 1-MCP fueron almacenadas durante 8 meses a $-0,5^{\circ}\text{C}$ para estudiar la evolución de los α -farnesenos y trienos conjugados, la producción de etileno y parámetros de madurez, la capacidad antioxidante total (DPPH), los cambios en metabolitos antioxidantes (ácido ascórbico y polifenoles) y los daños oxidativos: peroxidación de lípidos (MDA) y pérdida de electrolitos (EL). Los resultados obtenidos demostraron que el 1-MCP controló completamente la escaldadura tanto a salida de cámara como luego de 7 días de vida en estante, evitando la producción de etileno y manteniendo muy bajos los niveles de α -farnesenos y trienos conjugados, durante toda la conservación. Además, este tratamiento ralentizó los procesos de maduración, manteniendo una mayor firmeza, color y acidez que el Control, pero impidió la maduración normal durante la vida en estante, aún después de los 240 días de almacenamiento. El sistema antioxidante total aumentó como respuesta al estrés por frío, tanto en la fruta Control como en la tratada con 1-MCP, sin que se observaran diferencias atribuibles al tratamiento. El contenido de ácido ascórbico y polifenoles disminuyó tanto en la fruta Control como en la tratada con 1-MCP. Durante los primeros meses, el contenido de polifenoles (30 días) y el contenido de ácido ascórbico (90 días) de los frutos tratados con 1-MCP fue mayor al de los frutos Control, lo cual podría sugerir que el tratamiento produce una acción protectora. El nivel de los daños oxidativos aumentó con la puesta en frío particularmente en los primeros meses. La peroxidación lipídica llegó a un pico a los 60 días coincidente con un aumento exponencial de los trienos conjugados en la pera Control y luego fluctuó hasta el final del almacenamiento, al igual que el valor de la pérdida de electrolitos sin que se registraran diferencias significativas entre la fruta Control y la tratada con 1-MCP que pudieran atribuirse a efectos del tratamiento. En conclusión, el 1-MCP aplicado en poscosecha a dosis comercial, permite controlar completamente la escaldadura superficial, pero no puede corroborarse que la atenuación del daño se deba al mantenimiento del sistema antioxidante de las peras Beurré D'Anjou en un largo almacenamiento, aunque sí se observó que no lo afecta de manera negativa a la par de disminuir las pérdidas de ascorbato en el almacenamiento a corto plazo.

"Effect of 1-methylcyclopropene in the process of oxidative stress and development of superficial scald associated with low temperatures conditions in pear fruits"

ABSTRACT

Argentina is a leading producing country in the export of pears, being this activity the main support of the Alto Valle economy of Rio Negro. By market logistics, fruits are preserved refrigerated in a chamber under different modalities of gas composition, temperatures and storage time depending on each specie and variety. Pears subjected to oxidative stress due to low temperatures develop visible damages that produce losses of their commercial value in the medium or long term. Superficial scald is an important post-harvest alteration that affects most of the varieties marketed in the world. It is characterized by the development of dark spots only on the fruit skin. They begin to manifest after three or four months of being in the cold and then expose them at room temperature. The main cause is the α -farnasene oxidation, a highly toxic compound (conjugated trienes), which cause damage to the skin cell membranes leading to cell death and the occurrence of the symptoms when the antioxidant mechanisms have been exceeded. 1-MCP, an ethylene antagonist, could replace the use of antiscalding chemicals banned in many countries that buy our fruit production keeping the organoleptic quality by delaying the senescence processes. 1-MCP direct action mechanisms on antioxidant levels are not known. But several authors suggest that it would act protecting it and/or decreasing the oxygen reactive species. This supposition is tested in this thesis. Beurré D'Anjou pears with optimum harvesting date without treatment (Control) or treated with 300ppb of 1-MCP were stored during 8 months at -0,5 to study the evolution of α -farnasenes and conjugated trienes, ethylene production and maturity parameters, the total antioxidant capacity (DPPH), the changes in antioxidant metabolites (ascorbic acid and polyphenols) and the oxidative damages: peroxidation of the lipids (MDA) and electrolytes leakage (EL). The obtained results showed that the 1-MCP controlled completely the scalding both at chamber exit as well as after 7 days of shelf-life avoiding ethylene production and keeping the α -farnasenes and conjugated trienes at very low levels during conservation times. Furthermore, this treatment slowed down the ripening processes keeping greater firmness, colour and acidity than Control but prevented from normal ripening during shelf-life even after the 240 days of storage. The total antioxidant system increased in response to stress by chilling, both, in Control fruit as in 1-MCP treated fruit without observable differences due to treatment. The ascorbic acid and polyphenols content decreased, both in fruit Control and in 1-MCP treated ones. During the first months, the content of polyphenols (30 days) and the content of ascorbic acid (90 days) of the 1-MCP treated fruits were greater than the Control fruits which could suggest that the treatment produces a protective action. The level of the oxidative damages increased with cold setting particularly in the first few months. The lipid peroxidation reached to a top at 60 days in coincidence with an exponential increase of the conjugated trienes in Control pear, then oscillated until the end of storage life. Similar behaviour occurred with the value of the electrolytes loss without significant differences being recorded between Control fruit and 1-MCP treated fruit attributable to treatment effects. In conclusion, the 1-MCP applied in post-harvest at commercial doses allows the control of superficial scalding completely. On the other hand, it cannot be confirmed that damage reduction may be due to the maintenance of the antioxidative system in Beurré D'Anjou pears at long storage time. However, it was observed that it was not affected negatively at short-term storage while reducing ascorbate losses.

"Effet de 1-méthylcyclopropène dans le processus du stress oxydatif et le développement de l'échaudure superficielle associée à des températures basses dans les fruits poires"

RÉSUMÉ

L'Argentine est un pays producteur et leader en exportation de poire, cette activité est le principal support économique de l'Alto Valle de Río Negro. Pour une question de logistique des marchés, les fruits se conservent en chambres froides sous différentes modalités de composition de gaz, températures et durées de stockages pour chaque espèce et variété. Les poires sont soumises au stress oxydant par l'effet des basses températures et développent des dommages visibles qui produisent des pertes au niveau des valeurs commerciales à moyen et à long terme. L'échaudure superficielle correspond à l'altération physiologique la plus importante, car elle affecte une grande partie des variétés commerciales dans le monde, incluant Elle se manifeste par le développement de taches foncées sur la peau et commence après 3 ou 4 mois de mise au froid ou plus précisément quand la poire est placée directement à température ambiante sur les marchés. La quantité et sévérité du problème sont directement proportionnelles à la durée de la conservation. La cause principale est due à l'oxydation du α -farnésène, aux composés hautement toxiques (les triènes conjugués), lesquels produisent des dégâts dans les lipides des membranes cellulaires de la peau qui entraînent la mort de la cellule mettant en évidence les symptômes. Cela arrive quand les mécanismes des systèmes antioxydants ont été surpassés. Le 1-MCP, un antagoniste du composé de l'éthylène, l'hormone principale impliquée dans le développement de l'échaudure, a réussi à remplacer avec succès plusieurs fruits à antioxydants externe actuellement interdit dans de nombreux pays acheter de nos fruits, en en plus de garder la qualité organoleptique en retardant processus de sénescence

Nous ne connaissons pas les mécanismes de l'action directe du 1-MCP sur le niveau des antioxydants, mais divers auteurs assurent qu'il agirait en protégeant et/ou en diminuant les espèces réactives. Cette thèse a proposé vérifier cette supposition. L'évolution des α -farnésènes et des triènes conjugués, la production d'éthylène et les paramètres de maturité, la capacité antioxydante total (DPHH), les changements en métabolites antioxydants (acide ascorbique et polyphénols), les dommages oxydants : peroxydation des lipides (MDA) et la perte d'électrolytes (EL), ont été mesurés pendant 8 mois en entrepôts frigorifiques en froid normal à $-0,5^{\circ}$. Nous avons travaillé avec des poires D'Anjou récoltées au meilleur moment dans l'Alto Valle et à 300 pp de 1-MCP.

Le 1-MCP a été capable de contrôler complètement l'échaudure autant à la sortie de chambre froide comme après sept jours de vie en étagère, maintenant très faible synthèse α -farnésènes et des triènes conjugués et en évitant la production d'éthylène endogène dans les poires. Il ralentit le processus de maturation, tout en conservant une plus grande fermeté, couleur et acidité que le contrôle, mais n'a pas permis une maturation normale pendant la durée de vie, même après 240 jours de vie stockage. Le système antioxydant total a augmenté dans les deux cas, mais sans qu'il y ait d'effets significatifs dans le traitement avec 1-MCP, il en est de même dans le maintien des métabolites antioxydants. Les fruits traités ont suivi la même dynamique que le contrôle. Tout autant, l'acide ascorbique comme les polyphénols ont diminué dans les premiers mois de stockage pour ensuite se stabiliser. On pourrait considérer qu'il y a eu une action protectrice sur l'acide ascorbique pendant les premiers 90 jours car ses valeurs se révèlent supérieures. Dans les deux cas les dommages par le stress oxydantif ont augmenté avec la mise au froid particulièrement dans les premiers mois. La peroxydation lipidique arrive à un sommet après 60 jours en coïncidence avec l'augmentation exponentielle des triènes conjugués

dans le cas de la poire témoin et ensuite fluctue jusqu'à la fin du stockage, un comportement similaire a eu lieu avec la perte d'électrolytes. En conclusion le 1-MCP appliqué dose commerciale après récolte, permet de contrôler complètement l'échaudure superficielle, mais ne peut être justifiée que l'atténuation des dommages sont dus à l'entretien des poires système antioxydant Beurre D Anjou en stockage de longue durée, même si observé il n'a pas d'incidence négative, de plus il aide à diminuer les pertes d'acide ascorbique dans le stockage des poires a court terme.

Abreviaturas

1-MCP: 1- metilciclopropeno

AA: ácido ascórbico

ABA: ácido abscísico

AC: Atmósfera controlada

ACC: 1- aminociclopropano-1- carboxílico

ACS: ACC sintasa

AF: alfa-farneseno

AFS: α -farneseno sintetasa

AG: ácido gálico

AM: atmósfera modificada

APX: ascorbato peroxidasa

Asc: ascorbato

ASG: glucósidos acilados

AT: acidez total

AVG: aminoetoxivinilglicina

CAT: catalasa

CSS: contenido de sólidos solubles

DHAsc: dihidroascorbato

DPA : difenilamina

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidracilo

EAG : equivalentes de ácido gálico

EIL1, EIL2, EIL3 y ERFs: **CTR1:** Factores de
de transcripción involucrados en la
señalización mediada por etileno

EL: pérdida de electrolitos

EROs: especies reactivas del oxígeno

ES: escaldadura superficial

ETR1, ETR2, ERS1, ERS2 y EIN4: Proteínas
receptoras de etileno

FC: frío convencional

FS: esteroides libres

GPXS: glutatión peroxidasa

GR: glutatión reductasa

GSTs: glutatión transferasas

HNE: 4- hidroxil- 2-nonenal

IES: índice de escaldadura superficial

MACC: malonil ACC

MDA: malondialdehído

MHO: 6-metil-5-hepten-2-ona

PF: peso fresco

PPO: polifenoloxidasa

PTF: polifenoles totales

SAM: S-adenosilmetionina

SE: esteril ésteres

SG: esteril glucósidos

SOD: superóxido dismutasa

TC: trienos conjugados

ULO: cámara de ultra bajo oxígeno

INDICE GENERAL

Agradecimientos.....	iii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
RÉSUMÉ	v
ABREVIATURAS	viii
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	
1.1. Generalidades sobre la pera.....	1
1.1.1. Origen. Características taxonómicas y botánicas.....	1
1.1.2. Características de la variedad Beurrè D' Anjou.....	2
1.1.3. Importancia de la producción y consumo de Peras en Fresco.	3
1.2 Maduración de frutos climatéricos.....	6
1.2.1. Cambios en la estructura y composición durante la maduración.....	6
1.2.2. Parámetros de madurez.....	8
1.2.2.1 Degradación de almidón.....	8
1.2.2.2 Contenido de sólidos solubles y acidez titulable	9
1.2.2.3 Firmeza de la pulpa	9
1.2.2.4 Cambios de color.....	10
1.3 El etileno.....	11
1.3.1. Su rol en la maduración de los frutos.	11
1.3.2. Biosíntesis y mecanismo de acción.....	13
1.3.3. Sistemas de Regulación de la biosíntesis y de su mecanismo de acción.....	16
1.4 El 1-MCP como inhibidor del etileno y su efecto sobre la fisiología en peras ...	18
1.4.1. Características físico – químicas y comerciales.	18
1.4.2. Mecanismo de acción del 1-MCP.....	18
1.4.3. Respuestas fisiológicas al tratamiento con 1-MCP.....	20
1.4.3.1 Producción de etileno y respiración.	21
1.4.3.2 Modulación de los efectos del 1-MCP.....	22

1.4.4. Efecto del 1- MCP sobre los parámetros de calidad.....	23
1.4.4.1 Evolución de la firmeza.....	23
1.4.4.2 Evolución del color	23
1.4.4.3 Producción de volátiles y calidad sensorial.....	24
1.4.4.4 Contenido de ácidos orgánicos y sólidos solubles.....	25
1.4.5. Factores que condicionan la aplicación de 1-MCP	25
1.5 Los sistemas antioxidantes	26
1.5.1. Especies reactivas al oxígeno.....	26
1.5.2. Metabolitos antioxidantes.....	28
1.5.2.1. Ácido ascórbico	29
1.5.2.2. Polifenoles.....	31
1.6. Los procesos de deterioro oxidativo.	34
1.6.1. Daño oxidativo por efecto de bajas temperaturas.	34
1.6.2. Escaldadura superficial (ES).....	35
1.6.3. Control de la escaldadura en peras. Rol del 1-MCP.....	38
2. HIPOTESIS DE TRABAJO:	40
3 .OBJETIVOS.....	40
3.1. General.....	40
3.2. Específicos.....	40
4. MATERIALES Y MÉTODOS:.....	40
4.1. Material Vegetal.....	40
4.2. Medición de índices de madurez en la pera.....	43
4.2.1. Degradación de almidón:	43
4.2.2. Firmeza de la pulpa:	43
4.2.3. Contenido de sólidos solubles (CSS):.....	43
4.2.4. Acidez titulable (AT):.....	44
4.2.5. Color de la epidermis:	44
4.3 Producción de etileno.	45

4.4 Medición del contenido de alfa-farnesenos (AF) y trienos conjugados (TC).	46
4.5. Medición de antioxidantes	47
4.5.1. Actividad antioxidante total (DPPH)	47
4.5.1. Metabolitos antioxidantes.....	49
4.5.2.1 Ácido ascórbico (AA):	49
4.5.2.2. Polifenoles:Totales	50
4.6 Medición de Daño Oxidativo.....	51
4.6.1. Nivel de Peróxidos lipídicos (MDA):	51
4.6.2. Pérdida de electrolitos (Electrolyte leakage)	53
4.7 Determinación de la Incidencia y Severidad de escaldadura.	53
4.8 Análisis estadísticos.	54
5. RESULTADOS	55
5.1 Parámetros de madurez.	55
5.1.2. Seguimiento de los parámetros de madurez que responden significativamente al tratamiento con 1-MCP.Temporada 2014.....	57
5.2 Producción de etileno.	59
5.3 Evolución de los α- farnesenos y los trienos conjugados.....	63
5.4 Escaldadura superficial en frutos tratados y sin tratar con 1-MCP. Incidencia y severidad de daños en las temporadas 2013 y 2014.....	67
5.5. Respuestas del sistema antioxidante de peras cv Beurrè D´Anjou, tratadas con 1-MCP durante su conservación en cámara de frío convencional.	70
5.5.1. Evolución de la capacidad antioxidante total (DPPH).....	70
5.5.2. Cambios en el contenido de Acido ascórbico (AA).....	72
5.5.3. Evolución de los valores de los polifenoles	73
5.6. Evolución del daño oxidativo por estrés por frío en frutos almacenados en cámara convencional.....	74
5.6.1. Cambios en el nivel de peroxidación de los lípidos de las membranas de la piel de peras cv Beurrè D Anjou.	75
5.6.2. Pérdida de electrolitos.....	75
6. DISCUSIÓN.....	77

6.1 Relación de la aplicación de 1-MCP con la producción de etileno y los parámetros de madurez de peras almacenadas en frío y durante su vida de comercial.....	77
6.2 Efecto del 1-MCP en relación a la presencia de α- farnesenos y trienos conjugados y su incidencia sobre la escaldadura superficial.....	80
6.3 Efectos de las dosis de aplicación 1-MCP sobre el control de la escaldadura superficial.....	83
6.4 Evolución del sistema antioxidante de las peras tratadas con 1-MCP y su relación con la escaldadura superficial.....	84
6.5 Cambios en el contenido de los metabolitos antioxidantes durante el almacenamiento	889
6.6 Efectos del 1-MCP sobre el desarrollo de daño oxidativo y su relación con la presencia de escaldadura superficial.....	93
7. CONCLUSIONES.....	96
8. BIBLIOGRAFIA.....	99

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. Generalidades sobre la pera.

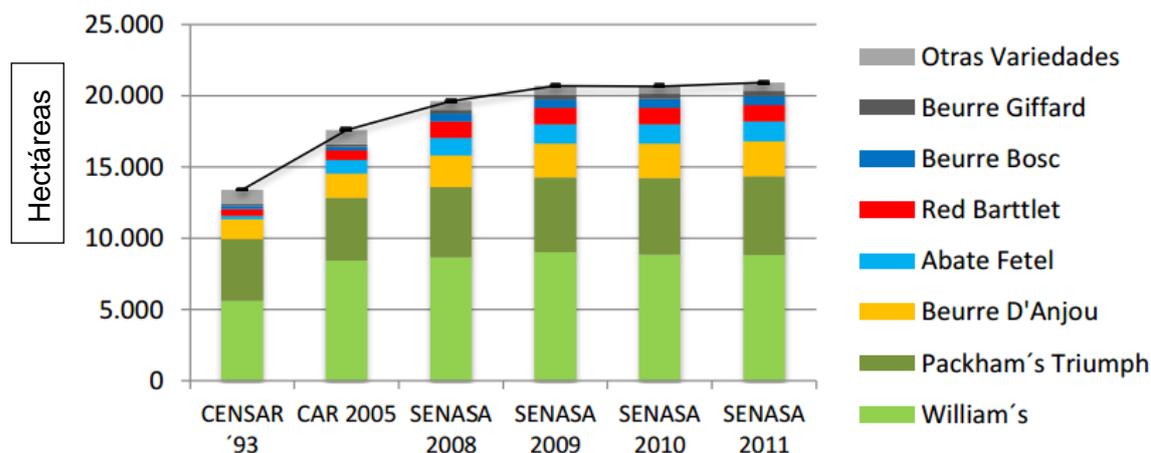
1.1.1. Origen. Características taxonómicas y botánicas.

El género *Pyrus* incluye 22 especies clasificadas en occidentales y orientales según su origen geográfico. Las más utilizadas en la actualidad son *P. betulifolia*, *P. calleryana*, *P. pyrifolia* y *P. ussuriensis* (orientales), y *P. communis*, *P. communis* var. *pyraster*, *P. amygdaliformis* y *P. salicifolia* (occidentales). Posteriormente se realizaron hibridaciones entre *P. ussuriensis* y *P. pyrifolia*. En Occidente, la casi totalidad de las variedades cultivadas pertenecen a la especie *Pyrus communis*. Desde el punto de vista taxonómico pertenece a la subdivisión Angiosperma; Clase Dicotiledonea de hoja caduca; subclase Rosidae, orden Rosales, familia Rosácea y género *Pyrus* (Sanchez, 2010).

Es un frutal exigente en suelo. Los óptimos para plantar perales son aquellos cuyo pH se encuentra entre 6,5 y 7,5, fértiles, con una profundidad mínima de 50 cm, y no salinos. Las distintas variedades difieren en los requerimientos de frío necesarios para alcanzar la floración, pero en términos generales los perales requieren cerca de 900 a 1000 horas de frío por debajo de los 7,2° C durante el invierno para salir de su reposo (Informe Agricultura, 2014). Por ello las zonas de cultivo en la Argentina se hallan ubicadas en las áreas de riego existentes al sur de los 30° de latitud, en las Provincias de Río Negro, Neuquén, Mendoza, Buenos Aires y Chubut. La región productora de peras a nivel de país más importante, se localiza en los valles irrigados de Río Negro y Neuquén, donde se concentra el 88% de la producción nacional.

La superficie total actual implantada con perales en las provincias de Río Negro y Neuquén es de 23.823 has, en una relación igualitaria con la superficie destinada a manzanas (CAFI, 2013) (Figura 1). Un dato importante es que el 52% de la superficie de perales tiene menos de 20 años, lo que asegura productividad de los montes (SFRN, 2011).

Es un factor común el hecho de que las variedades que se utilizan en el mundo tienen, en un 90%, más de 200 años en el mercado, y se cumple que en cada país, con tres variedades se cubre aproximadamente un 80% de la producción (Namensny, 2013). Nuestro país no es la excepción: tres son las variedades más cultivadas de esta especie, Williams o Bartlett con el 45%, Packham's Triumph con el 30%, y Beurré D'Anjou con el 15%. El porcentaje restante se distribuye entre variedades como la Red Bartlett, Abate Fetel y otras cuya superficie cultivada en conjunto es inferior al 7%: Beurré Bosc, Beurré Giffard, Clapps Favourite y Red D' Anjou (MAGyP Río Negro, 2013) (Figura 1).



Fuente: Secretaria de Fruticultura en base a Censos CENSAR 93 y CAR 2005. SENASA. Anuario Estadístico 2008, 2009, 2010 y 2011.

Figura 1. Superficie plantada de las diferentes variedades de peras cultivadas en Río Negro.

1.1.2 Características de la variedad Beurrè D' Anjou.

Conocida también en USA más comúnmente como D'Anjou, algunos autores la consideran originaria de Bélgica y otros de la región cercana a Angers, en el centro oeste de Francia, hacia mediados del siglo XIX.

En los valles de Río Negro y Neuquén, florece alrededor del 21 de septiembre. Es un árbol vigoroso con una entrada en producción lenta y si bien tiene buenas producciones (50-60 tn/ha) a veces pueden ser irregulares. Es autofértil, aunque es conveniente que sea polinizada por Packham's Triumph, Abate Fetel, Conference y otras Beurrè.

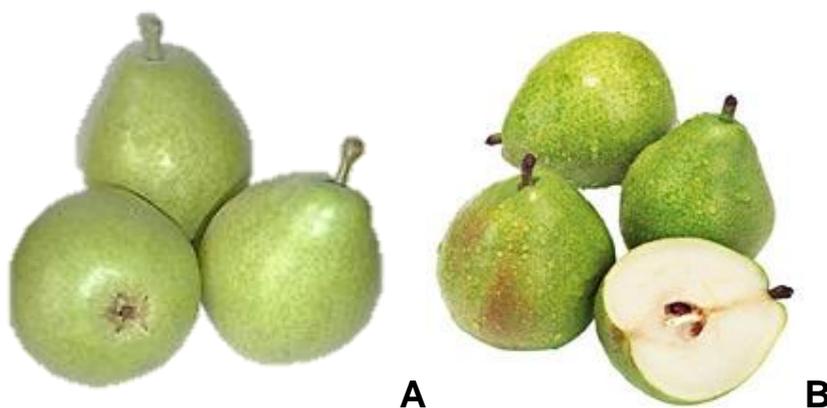


Foto 1. A. Peras Beurrè D' D' Anjou. **B** Corte y detalle de la pulpa.

El fruto es piriforme corto y globoso con base ancha, de calibre medio a grande, de 270 a 285 gramos de peso, de 85 mm de altura y 80 mm de calibre. El pedúnculo es corto, grueso y algo carnosos, hendido en el ápice; el cáliz es abierto, con los sépalos unidos por su

base (Foto 1 A). La epidermis es fina y delicada, de un color verde claro (que no cambia demasiado al amarillo con la madurez) y con numerosas lenticelas bien visibles. La pulpa es blanco cremoso (Foto 1 B), de textura mantecosa y ligeramente granulada (posee células pétreas en su parénquima), aromática, jugosa, dulce, ligeramente acidulada, calidad gustativa variable (Benítez, 2001).

Es una variedad de ciclo largo que se cosecha entre el 1 y 7 de febrero cuando los frutos alcanzan los 128 días desde plena floración. Sus índices de madurez promedio al momento de inicio de la cosecha son: 15,5-16,5 lb de firmeza, 10-11% de sólidos solubles totales, 3,5-4 g/L de acidez titulable y entre 20-25% de degradación de almidón (Benitez, 2001).

Presenta una incidencia de daño moderado por asoleado entre 20-25% en nuestra zona. Son sensibles a los roces y golpes. Experimenta fisiopatías relacionadas con bajos niveles de calcio como lo es el cáliz negro, el bitter pit y el corcho. Es una variedad con buena conservación post-cosecha extendiéndose hasta 5-7 meses en cámara de frío convencional, a una temperatura entre -0,5 y -1 °C y hasta 8-10 meses si se almacena en atmósfera controlada con 2% de O₂ y 1,5% de CO₂ (Benítez, 2001). Esta variedad es muy susceptible la escaldadura superficial, lo cual se constituye en la principal limitante del almacenamiento. En un almacenamiento prolongado en AC también puede desarrollar "pecas negras" (Black speck) que es una fisiopatía típica de esta variedad (Calvo y Candan, 2011). Beurrè D'Anjou es una pera de invierno, es decir que requiere una exposición de entre 4 y 8 semanas a temperaturas de entre 0 y -1°C para su correcta maduración (Kader *et al.*, 2002).

1.1.3 Importancia de la producción y consumo de peras en fresco.

Argentina es un país productor y exportador de frutas. Los principales productos, en cuanto al porcentaje del total de frutas exportadas, están representados por peras, limones y manzanas. Argentina es líder mundial en exportación de peras, con el 30% de la oferta, ocupa el cuarto lugar en producción a nivel mundial, con 28.188 Ha plantadas que producen unas 800.000 Tn y el primero en el hemisferio sur (CAFI, 2013). La exportación supera las 440.000 Tn y nuestro mercado interno consume aproximadamente entre 130.000 y 150.000 Tn. Tanto la producción como las importaciones mundiales de pera están concentradas en el Hemisferio Norte, mientras que los países del Hemisferio Sur tienen un mayor protagonismo en la oferta. Nuestros principales compradores son Brasil, Rusia, Holanda, EEUU e Italia. (Nelson, 2014). La producción mundial de pera se incrementó un 20% a nivel mundial en el período 1998-2007 y también lo hizo a nivel local con un 57,5% más de superficie implantada (7.708 Ha) durante los últimos 20 años (MAGyP Río Negro, 2013).

Del total de la producción de peras, aproximadamente el 60% se destina a la exportación, el 25% a la industria y el 15% al mercado interno. La variedad D' Anjou tiene poca participación en este mercado, apenas un 2,6%, siendo su principal destino la exportación, en especial hacia Brasil y EEUU.

Esta cadena de valor, social y económica que involucra a más de 2.500 productores, genera más de 60 mil empleos y se constituye en la principal actividad económica de Rio Negro (SENASA, 2014).

En relación a la importancia del consumo de frutas en general, es importante mencionar que según la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) la ingesta insuficiente de frutas y hortalizas causa, según las estimaciones, unos 2,7 millones de muertes cada año, y figura entre los 10 principales factores de riesgo contribuyentes a la carga de mortalidad que se enumeran en el Informe sobre la salud en el mundo 2002.

Las frutas frescas en general contienen un elevado contenido de agua, aportan principalmente fibras, vitaminas, minerales y baja cantidad de carbohidratos y proteínas. Existen pruebas cada vez más numerosas y contundentes de que un consumo adecuado de frutas y hortalizas contribuye a prevenir muchas enfermedades y favorece la buena salud, pero una parte considerable de la población mundial las consume en cantidades insuficientes. Nuestro país figura dentro de este grupo, con una ingesta de sólo 140-180 g por habitante y por día, muy alejado de la recomendación publicada de una consulta mixta FAO/OMS de expertos sobre la alimentación, la nutrición y la prevención de enfermedades crónicas, que recomienda un consumo mínimo de 400 g/hab/día de frutas y hortalizas (excluidos los tubérculos feculentos, como las papas) para prevenir enfermedades crónicas, en particular las cardiopatías, el cáncer, la diabetes de tipo 2 y la obesidad (Barda, 2011).

Según la Encuesta Nacional de Factores de Riesgo del Ministerio de Salud de la Nación, menos del 40% de la población consume frutas al menos 5 días a la semana. Entre las causas más importantes que justifican ese bajo porcentaje en relación a las frutas, se mencionan: la gran estacionalidad en la oferta, el rápido deterioro de la calidad organoléptica de muchas de ellas y la imposibilidad del consumo fresco en forma fraccionada para pequeñas porciones, como las consumidas por niños.

La pera tiene un bajo consumo per cápita: 2,5-3,0 kg por habitante y por año, comparado con 8 kg/hab/año en el caso de manzanas (Bruzzone, 2010).

El consumo de una pera Williams mediana (190 g) con cáscara aporta calorías (unas 120 kcal), carbohidratos (29 g) –constituidos especialmente por fructosa, sacarosa, glucosa y sorbitol-, fibra alimentaria (6,3 g), proteínas (0,7 g), cobre y vitamina C (3,8 mg), y no contiene grasas ni sodio. El valor de la fibra cubriría las necesidades de fibra insoluble en un

17% y soluble en 9.4% en relación a las necesidades dietarias diarias de un adulto normal (Barda, 2011). Es una fruta destacada en taninos, conocidos por sus propiedades astringentes y antiinflamatorias, que tienen la cualidad de secar y desinflamar la mucosa del tracto intestinal y, por ello, resultan muy eficaces en el tratamiento de diarrea y diversas clases de gastroenteritis.

En un estudio de la Universidad de Wageningen (Oude Griep *et al.*, 2011), se catalogó a los vegetales según el color de la parte comestible -en el caso de las frutas, de la pulpa - y se asoció el color con la capacidad antioxidante de estos alimentos. El estudio, que examinó asociaciones entre el consumo alimentario y la salud o la enfermedad en el transcurso de 10 años, determinó que un mayor consumo de frutas y verduras de pulpa blanca, entre las que se incluyen las peras y manzanas como principales, se relaciona de forma inversa con la incidencia de ictus o infarto cerebral. Puede ser recomendada a personas con patologías coronarias, en las cuales la ingesta de un aporte suplementario de fibras resulta beneficioso o con cuadros de hipertensión (no contiene sodio) y retención de líquidos que utilizan diuréticos que eliminan potasio, como forma natural de restitución de dicho nutriente, puesto que contiene una cantidad moderada del mismo (220-300 mg/100g) sobre un requerimiento diario de 3 g (una porción cubre un 15-20% de nuestras necesidades en dicho mineral). Es además una fruta ideal para dietas, ya que es refrescante y es muy bajo su aporte calórico. Quienes sufren disturbios en la regulación de la glucemia (diabetes) se beneficiarían con su consumo por el bajo contenido de glucosa (2 g/100g) y por el aporte de la fibra soluble.

Uno de los grandes problemas de la pera es que llega al consumidor o “muy verde” o bien “sobremadura”. Cuando se compra en la góndola, generalmente está verde y demora unos días en madurar. Es una fruta por lo tanto que se compra y no se come de inmediato lo cual atenta a su elección. Se presume que en general no se compra mucha pera fuera de estación porque saben mal ya que no están en buenas condiciones de conservación o bien el consumidor desconoce cómo debe acondicionarlas en su casa. Además, hay lugares en el país donde la pera casi no llega a los mercados y si lo hace es en muy mal estado, ya que es una fruta muy susceptible a los daños mecánicos que producen marcas muy visibles en la piel (Barda, 2011).

También las peras sufren a lo largo del almacenamiento daños debidos al estrés por frío, como la escaldadura superficial, un daño a nivel de la piel, fácilmente visible por el consumidor que provoca un descarte muy importante de fruta, que no obstante su aspecto externo, está en buenas condiciones para ser consumida, pues ni el sabor ni la textura resultan afectados. Controlar dicho deterioro es fundamental para aumentar la rentabilidad del productor y ofrecer una fruta de calidad fuera de temporada (Ver puntos 6.1-6.2).

1.2 Maduración de frutos climatéricos.

1.2.1 Cambios en la estructura y composición durante la maduración.

Las peculiaridades organolépticas finales de la fruta son el componente más importante que define la calidad desde el punto de vista del consumidor y dependen fuertemente de su proceso de maduración.

Las peras y manzanas son frutos climatéricos, en los cuales el ritmo respiratorio marca los estadios por los que va transitando el fruto desde el cuaje hasta la senescencia. La intensidad respiratoria es máxima durante la fase de multiplicación y va descendiendo paulatinamente a medida que los frutos aumentan de tamaño debido al desarrollo de las células formadas (sin que se produzcan nuevas divisiones celulares). Por último, y a diferencia de los frutos no climatéricos, se observa un incremento respiratorio muy importante (climaterio), que llega a un máximo, (coincidente con el desarrollo de la madurez organoléptica), para luego descender a medida que las reservas se consumen (McMurchie *et al.*, 1972; Wills *et al.* 1998; Guardia y Herrero, 1992). El climaterio respiratorio está acompañado también por un aumento en la producción de etileno, que está íntimamente asociado a los cambios que ocurren durante la maduración de los frutos (Figura 2).

El inicio de ese pico climatérico indica que se ha cumplido la maduración fisiológica (condición necesaria para que el fruto pueda madurar separado de la planta) y por ello marca la fecha inicial de cosecha (sello) de las diferentes variedades de peras y manzanas.

Por maduración se entiende el conjunto de cambios externos, de sabor y de textura que un fruto experimenta cuando completa su crecimiento y que permiten que un fruto con características no comestibles, se transforme en uno apetecible organolépticamente hablando (Azcón Bieto y Talón, 2000). La maduración marca el inicio de la senescencia y es un proceso muy complejo e irreversible que involucra una serie de fenómenos fisiológicos: fotosíntesis, respiración, transpiración y cambios importantes en los componentes químicos del fruto (Benítez *et al.*, 2005).

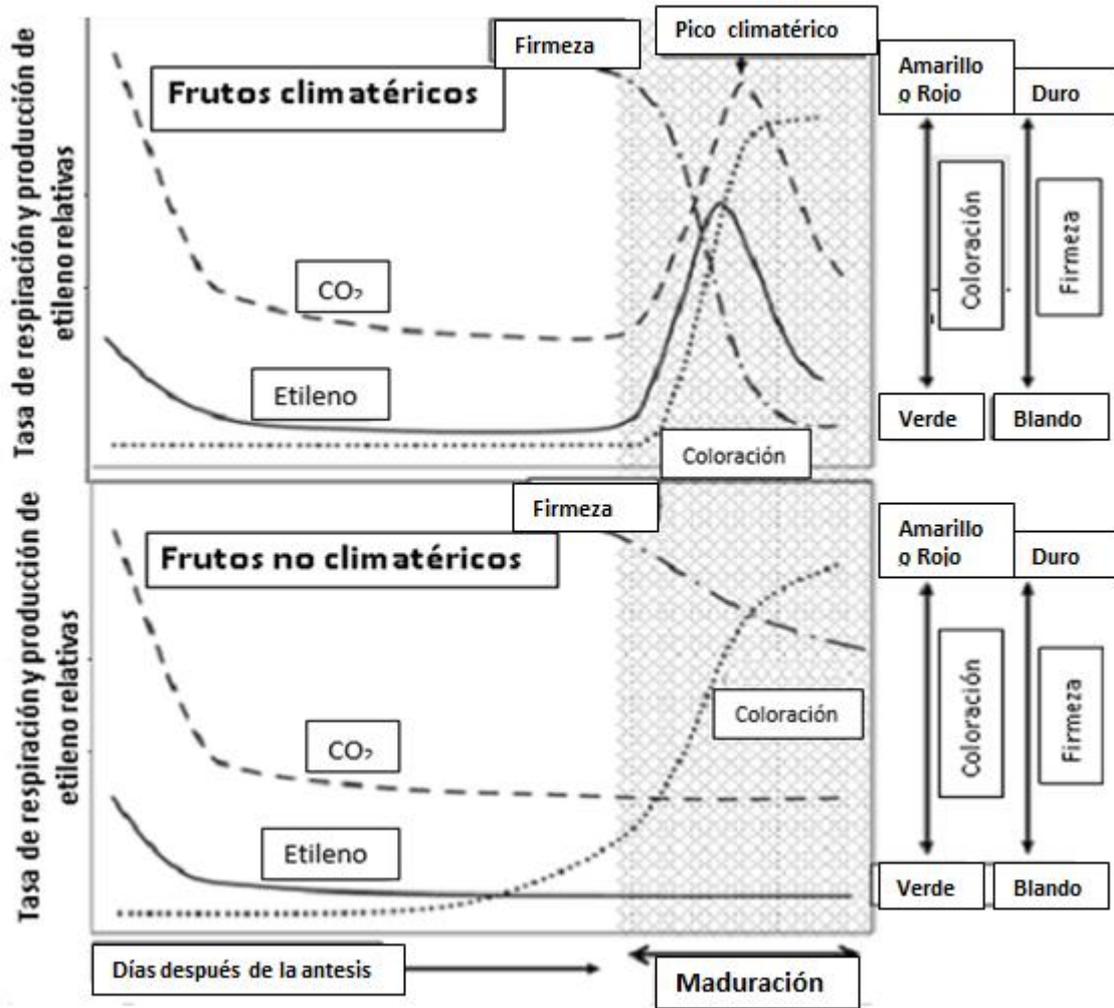


Figura 2. Pautas típicas de respiración, producción de etileno y cambios de color y firmeza en frutos climatéricos y no climatéricos (Wills *et al.*, 1998)

La respiración como proceso principal no sólo involucra la degradación de compuestos celulares más complejos: almidón, azúcares y ácidos orgánicos, hasta moléculas de CO_2 , y agua, sino que produce metabolitos intermediarios que permiten la formación de compuestos volátiles, pigmentos, componentes de la pared celular y síntesis de algunas hormonas involucradas en el proceso de maduración (Ojeda, 2006).

Numerosos son los factores externos e internos que inciden sobre la madurez, condicionando tanto la fecha óptima de cosecha, como la vida poscosecha del fruto, en especial la posibilidad de prolongar el almacenamiento manteniendo una calidad de consumo óptima.

Los frutos no climatéricos deben cosecharse cerca de la madurez organoléptica ya que si se realiza en forma prematura se obtienen productos de menor calidad organoléptica. En la mayor parte de los frutos climatéricos, existe un período de cosecha más amplio, que

depende del destino de la mercadería: comercialización rápida luego de unas pocas semanas y almacenamiento por periodos cortos o prolongados (Kader, 2002).

La mayor parte de las peras europeas muestran cierta resistencia a madurar al momento de la cosecha y desarrollan una mejor calidad si son cosechadas en estadios tempranos y maduran fuera del árbol. También algunas variedades de pera denominadas “peras de invierno” necesitan un período de bajas temperaturas (entre -1.0 y -0.5°C) luego de la cosecha, para alcanzar una madurez de consumo adecuada (Agar *et al.*, 2000; Villalobos-Acuña y Mitcham, 2008; Sugar y Einhornb, 2011; Sugar y Basile, 2013) En ese sentido se considera necesario para la variedad D’ Anjou unos 60 días entre -1 a 0°C como mínimo para su correcta maduración (Chen y Mellenthin, 1981; Chen, 2002; Kader, 2008).

1.2.2 Parámetros de madurez.

Los cambios fisiológicos, bioquímicos y estructurales que determinan la madurez “comercial”, habilitando la cosecha de las peras y manzanas, aun cuando éstas distan de su madurez de consumo, no ocurren al mismo tiempo ni de igual forma en todas las variedades. Todos estos cambios son medibles y constituyen parámetros reproducibles más o menos efectivos como criterios de calidad o índices de madurez (Tollner, 1993).

Las condiciones climáticas, en especial la temperatura, por su efecto sobre la tasa respiratoria, provoca cambios en los ritmos en que avanzan los procesos fisiológicos, obligando a efectuar un seguimiento por muestreo de éstos índices en cada temporada a fin de establecer el momento adecuado para cosechar cada especie y variedad (Gomila *et al.*, 2012).

Algunos índices de madurez, tales como la degradación de almidón, la acidez titulable y el contenido de sólidos solubles son usualmente utilizados para conocer el estado cualitativo de la fruta al momento de la cosecha, mientras que otros como el color de la epidermis y la firmeza de la pulpa permiten además establecer el potencial de almacenamiento de los frutos y realizar un seguimiento de los mismos durante el almacenamiento en frío, ya que correlacionan fuertemente con la posibilidad de que la fruta permanezca dentro de los valores aceptables para su comercialización.

1.2.2.1 Degradación de almidón.

Las peras durante su fase de madurez comienzan a degradar a azúcares sencillos el almidón que reservaban en su parénquima como producto de la actividad fotosintética. Esta hidrólisis sigue un patrón determinado que se inicia en la zona de los haces vasculares y se extiende hacia la epidermis. Puede evidenciarse con una solución de yodo (Lugol). Su

evolución está ligada no solo a la especie sino a la variedad, es así, que se han desarrollado cartas de degradación propias para cada una, tanto en peras como en manzanas. Este índice sólo se usa al momento de la cosecha, ya que el almidón se degrada por completo luego de un corto periodo de almacenamiento (Benítez *et al*, 2005).

1.2.2.2 Contenido de sólidos solubles y acidez titulable.

Estrechamente relacionado al anterior, se encuentra el valor de sólidos solubles, denominado también Índice refractométrico y expresado en grados Brix, que se emplea para estimar el contenido de azúcares de la fruta y que en el caso de la pera se transforma, junto a la firmeza y la jugosidad (medida por análisis sensoriales) en uno de los parámetros más apreciados para definir la calidad organoléptica de éstos frutos. Dos azúcares son componentes mayoritarios: la sacarosa y la fructosa. Estos valores no varían demasiado durante el almacenamiento en cámara (Barda y Candan, 2011).

La acidez titulable es otro de los parámetros químicos que cambia drásticamente durante la maduración. Las frutas verdes son fuertemente ácidas y luego la acidez total va disminuyendo para cada variedad a medida que se avanza en la madurez y se retrasa la fecha de cosecha (Calvo *et al.*, 2015). El principal ácido orgánico que contienen las peras es el ácido málico. Es un índice que cobra mayor importancia en manzanas donde el consumidor aprecia una relación ácido-azúcar, que permite clasificarlas en diferentes grupos, como ácidas o dulces. En las peras la acidez no es un parámetro gustativo apreciado, aunque existen variedades ácidas no cultivadas en nuestro país.

1.2.2.3 Firmeza de la pulpa

La firmeza o dureza de la pulpa, es el índice que mejor representa los cambios fisiológicos que se producen en las peras (Calvo *et al.*, 2012a). Está ligada también a la calidad de consumo en los cultivares que se ablandan hasta una textura mantecosa-jugosa (Mitcham y Mitchell, 2007) y tiene connotaciones decisivas en la conservación por frío y la comercialización.

Se considera que una pera está en un punto óptimo de consumo cuando se encuentra por debajo de los 2 kg/cm², equivalente a 4 lb/pulg² (Guerra y Casquero, 2005) o 17,8 N/cm² de presión (Sugar y Einhon, 2011 ; Villalobos-Acuña *et al*, 2011). Como en la medición se utiliza un émbolo estandarizado de 8 mm, es común que solo se consigne como kg, lb o N.

En forma práctica, los valores de firmeza permiten establecer límites a la comercialización de cada lote de fruta, en relación a los mercados (ultramar, países

límites o interno) a los que se podrían destinar. Para la variedad D' Anjou la cosecha se inicia cuando se encuentra entre 15.5-16.5 lb, en tanto a los fines legales según Reglamento Mercosur Res.404/98 se considera que está sobremadura cuando su presión desciende de las 9 lb.

La textura de una fruta es una característica compleja. Desde lo estructural, la dureza disminuye al madurar los frutos como consecuencia de la solubilización y/o despolimerización gradual de las diferentes fracciones de las sustancias pécticas y los glicanos de entrecruzamiento, componentes de la laminilla media que cementan las paredes de las células del parénquima. A esto se suma la pérdida de azúcares neutros, principalmente galactosa y arabinosa (Raffo *et al.*, 2012). Esto se inicia por la acción de dos enzimas: la pectinmetilesterasa y la poligalacturonasa (esta última no está presente en los frutos inmaduros), pero depende fuertemente de la genética de cada variedad, ya que los procesos bioquímicos de la madurez están bajo un control genético estricto que varía entre los diferentes frutos (Azcón Bieto y Talón, 2000; Wills *et al.*, 1998).

En la percepción de la firmeza también interviene la turgencia de las células, ligada a la cantidad de agua presente en los tejidos. En el caso de la pera, éste último factor incide fuertemente en las características texturales a través de la presencia o no de jugo en el fruto (Benítez y Calvo, 2002).

La mayoría de las variedades de invierno (como D'Anjou) no maduran bien en la planta sino que requieren una inducción por frío y/o una aplicación de etileno para madurar correctamente. A bajas temperaturas se activa y completa el proceso de maduración, incluyendo el ablandamiento del tejido (Agar *et al.*, 2000; Murayama *et al.*, 1998, Sugar y Basile, 2013). Esa inducción es función de la temperatura de la cámara y de la fecha de cosecha (Villalobos-Acuña y Mitcham, 2008). Un estudio llevado por Sugar y Einhornb (2011) señala que para la variedad 'D'Anjou' se requieren más días a bajas temperaturas que para Comice y que existe una relación polinómica de segundo orden entre su fecha de cosecha y la duración del acondicionamiento a $-0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

1.2.2.4 Cambios de color

Uno de los cambios más llamativos que presentan las peras durante la madurez es el cambio de color de la epidermis que las hace atractivas a la vista del consumidor y se transforma en el criterio principal de selección y decisión.

La piel de las peras puede contener toda la gama de los principales grupos de pigmentos naturales: carotenoides, clorofilas y antocianinas. En la maduración las clorofilas a y b se degradan, desapareciendo así el color verde, tornándose la piel amarilla por la presencia de carotenos (Thao Xuang, 2007). En la degradación del color verde intervienen

cambios de pH, procesos oxidativos y la acción de diversas enzimas capaces de degradar la clorofila, pudiendo darse por uno de esos factores o varios secuencialmente.

En las variedades mutantes rojas como la Red Bartlett y Red D'Anjou el color se debe a la presencia de glucósidos de antocianinas. Hay variedades que presentan una coloración bronceada como la Beurrè Bosc y otras como la D'Anjou que nunca vira al amarillo sino que disminuye la intensidad del color verde, llegando a un verde claro con numerosas lenticelas bien visibles al momento de su madurez.

Las zonas del fruto que están expuestas al sol pueden desarrollar colores rojizos o bronceados de diferente intensidad debido al daño por asoleado. La variedad D'Anjou es sensible y presenta entre un 20-22% de daño promedio en nuestra región (Foto 2). Este se presenta cuando hay exposición repentina a alta radiación solar y temperaturas en la piel que exceden los 45°C aunque el valor varía con la radiación, la humedad relativa y la velocidad del viento (Calvo y Candan, 2011).

El desarrollo de color en el fruto es influenciado por varios factores ecológicos y también algunas prácticas culturales.

La percepción del color es sumamente compleja y varía según el observador, las características del iluminante y la superficie del objeto. Para obtener medidas comparables en frutas, se utilizan colorímetros, en especial los llamados tríestímulo (sistemas HunterLab y CIEL) para mediciones objetivas o tablas de color adaptadas a cada variedad, de uso más sencillo y práctico, ya que la lectura de los colorímetros, no es de sencilla interpretación.

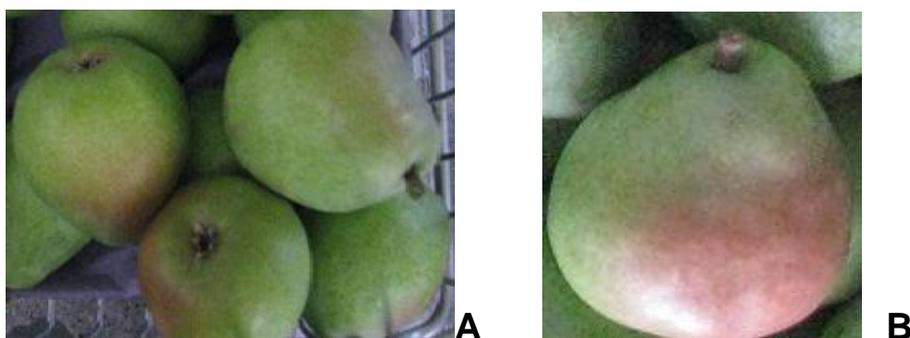


Foto 2.A. Frutos de D' Anjou con síntomas de asoleado y B. Fruto con fisiopatía muy marcada.

1.3 El etileno.

1.3.1 Su rol en la maduración de los frutos.

El etileno es una molécula orgánica, muy sencilla y de pequeño tamaño molecular, (C_2H_4), un hidrocarburo, sintetizado en todos los órganos vegetales y que es considerado una hormona natural. Presenta una gran actividad biológica a concentraciones muy bajas, y

aunque interviene en muchos otros procesos del ciclo biológico de las plantas, incluso como respuesta al estrés cualquiera sea su origen, está especialmente ligada a los procesos de madurez de los frutos (Wang *et al.*, 2002).

Una característica especial de ésta hormona es que es un gas en condiciones normales de presión y temperatura, este hecho le confiere la capacidad para difundir libremente a través de las membranas y espacios intercelulares y coordinar una respuesta rápida y uniforme en los tejidos de todo el fruto. En éste la estructura celular del parénquima permite una difusión 10 veces mayor que en otros tejidos vegetales, basada en la relación tamaño/superficie de sus células. Esta característica también permite que exista una regulación de la concentración interna que se efectúa por la difusión del gas hacia el exterior (Abeles *et al.*, 1992; Bleekler y Kende, 2000).

Los últimos estudios de la maduración controlada de tomates y el melón variedad Charentier, genéticamente modificados mediante la técnica antisentido, que no producen etileno endógeno y no maduran hasta ponerse en contacto con etileno exógeno, (al que responden madurando con normalidad), han provisto la evidencia definitiva de que el etileno es el principal responsable de la madurez de los frutos climatéricos (Klee y Giovannoni, 2011).

La clasificación de los frutos en climatéricos y no climatéricos se basa también en su respuesta diferencial al etileno exógeno y en la pauta que sigue la síntesis de este compuesto durante la madurez organoléptica (Wills *et al.*, 1998).

En los frutos climatéricos, el aumento exponencial de la tasa respiratoria durante el climaterio, va unida a la síntesis muy elevada de etileno endógeno, que en éstos frutos además es autocatalítica, en contraposición con lo que ocurre en los no climatéricos, donde la producción de etileno, además de estar en muy baja concentración en relación a los anteriores, se mantiene así durante la madurez. En los limones pasa de 0,11 a 0,17 $\mu\text{L/L}$ y en el ananá uno de los frutos en los que más aumenta lo hace de 0,16 a 0,40 $\mu\text{L/L}$ (Burg y Burg, 1962; Azcon Bieto y Talon, 2000).

Existe una gran diferencia en las cantidades de etileno producidas por los frutos en cada etapa fisiológica dentro del mismo grupo, e incluso entre variedades. Así, en peras variedad Packham's Triumph, se obtuvieron valores de concentración de etileno endógeno de 0,13 mg/kg en cosecha a 900 mg/kg en el pico climatérico (Moggia *et al.*, 2005). En mangos se obtuvieron valores de 3 $\mu\text{L/L}$ en el pico climatérico en tanto para pera Bartlett llegó a 500 $\mu\text{L/L}$ (Abeles *et al.*, 1992). Es importante mencionar que la sensibilidad al etileno aumenta a medida que el fruto se va desarrollando.

En 1972, McMurchie postuló que existían dos patrones en la síntesis del etileno, a los que llamó Sistema 1 y 2. El primero opera en ambos grupos y produce una síntesis

continúa a muy bajos niveles, aún en frutos inmaduros y es inhibida por la presencia de etileno exógeno. Actúa en la defensa al estrés cualquiera sea su origen. El sistema 2, privativo de los climatéricos, genera una biosíntesis autocatalítica que además es promovido por el sistema 1 o el uso de etileno exógeno (Alexander y Grierson, 2002).

El etileno no solo tiene un origen biológico sino que puede ser formado por la combustión incompleta de combustibles fósiles, fluorescentes, lámparas de querosén, diversos procesos industriales (Kader, 2002). Su presencia en el ambiente genera respuestas en los frutos. Se considera que si los frutos climatéricos se exponen durante un día a concentraciones muy bajas de 0,1 a 1,0 $\mu\text{L/L}$, pueden alcanzar la plena madurez. Esta respuesta ocurre por única vez y la magnitud del pico climatérico resulta relativamente independiente de la cantidad de etileno exógeno agregado. En los no climatéricos, el efecto principal es la aceleración de la respiración y el desverdizado de los frutos (el etileno destruye la clorofila), lo cual está en relación a la cantidad aplicada y ocurre tantas veces como se vean expuestos (Thompson, 2010).

Por otra parte, no todas las rutas bioquímicas que involucra la madurez de un fruto climatérico, están directamente relacionadas al etileno, hay procesos de la madurez que son etileno independientes, aunque es necesario que esté presente para que la maduración ocurra normalmente.

Un mismo proceso puede estar regulado de diferentes formas en función de la especie. El ablandamiento en las peras es totalmente dependiente del etileno pero no ocurre así en melones o papayas (Hiwasa-Tanase y Ezura, 2014). En este sentido, otras hormonas, tales como el ácido abscísico (ABA) participan de manera indispensable en la maduración de algunos frutos, en especial, en el cambio de color de los citrus y tomates, y en el ablandamiento de sus paredes celulares. Más aún, el ABA aumenta su concentración en ambos grupos antes o durante los procesos de maduración, lo que sugiere que tendría un rol compartido con el etileno en ese sentido y/o sería necesaria su presencia para la biosíntesis de éste (Buesa *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 2009; Barrera-Ortiz *et al.*, 2012).

1.3.2 Biosíntesis y mecanismo de acción.

El etileno se sintetiza en los tejidos a partir del aminoácido metionina, que en un primer paso se transforma en S-adenosilmetionina (SAM), mediante la acción catalizada por la enzima SAM sintasa y no es específica de la formación del etileno. La SAM es un precursor de otras rutas metabólicas, en las que se destaca la síntesis de poliaminas (ruta biosintética espermidina/espermina) y cesión del grupo metilo a lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Wang *et al.*, 2002). La primera etapa específica para la formación del etileno se da en la conversión del SAM en ácido 1- aminociclopropano-1- carboxílico (ACC) a través de

la ACC sintasa (ACS). En este paso también se forma metiltiodenosina (MTA) a partir de la cuál y con varios metabolitos intermediarios, se cumplirá el ciclo de la metionina o ciclo de Yang que regenera dicho aminoácido minoritario en vegetales. Esto demanda el gasto de un ATP y hace que se pueda conseguir una rápida y continua formación de etileno aunque exista una baja concentración de metionina, en tanto exista ATP disponible (Figura 3) (Bleeker y Kende, 2000). El paso final de la síntesis, consiste en la oxidación del ACC, mediante la acción de la ACC oxidasa (ACO) en presencia de O₂ y ascorbato (Asc), para formar CO₂, dihidroascorbato (DHAsc), ácido cianhídrico (HCN) y etileno (Yang y Hoffman, 1984; Wang *et al.*, 2002) (Figura 3).

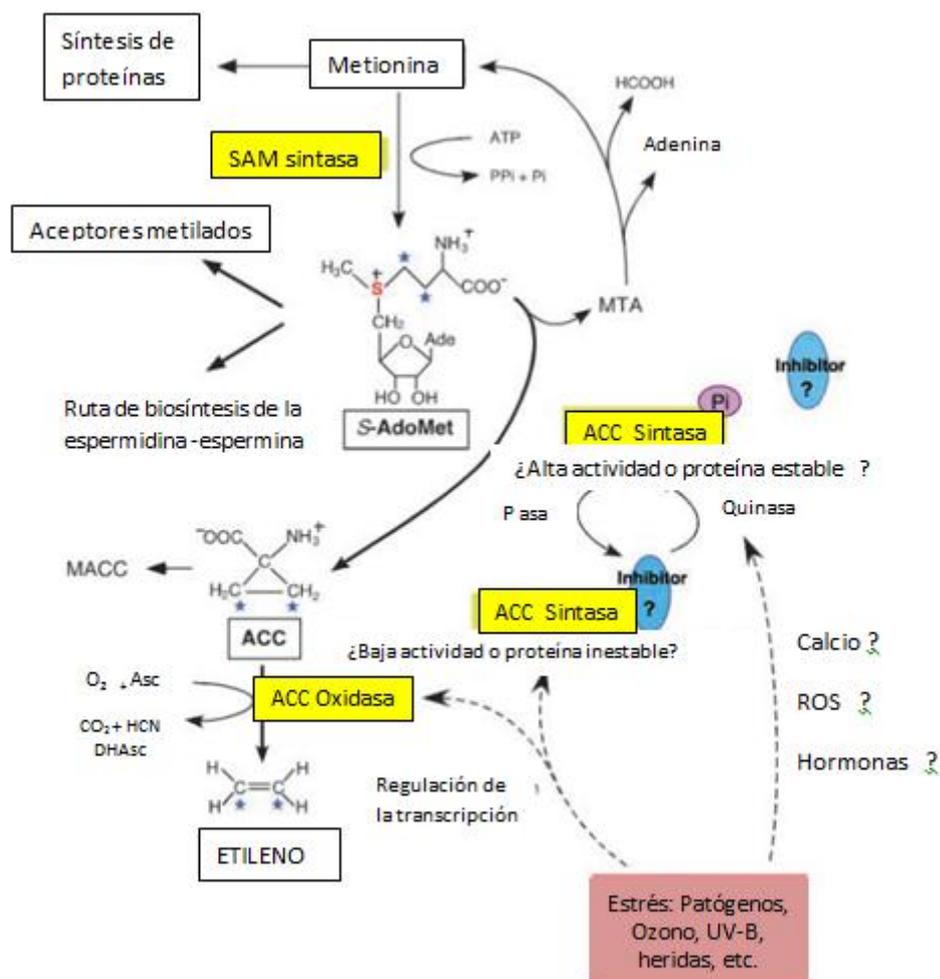


Figura 3. Biosíntesis y mecanismo de regulación de la producción de etileno. (Modificado de Wang *et al.*, 2002)

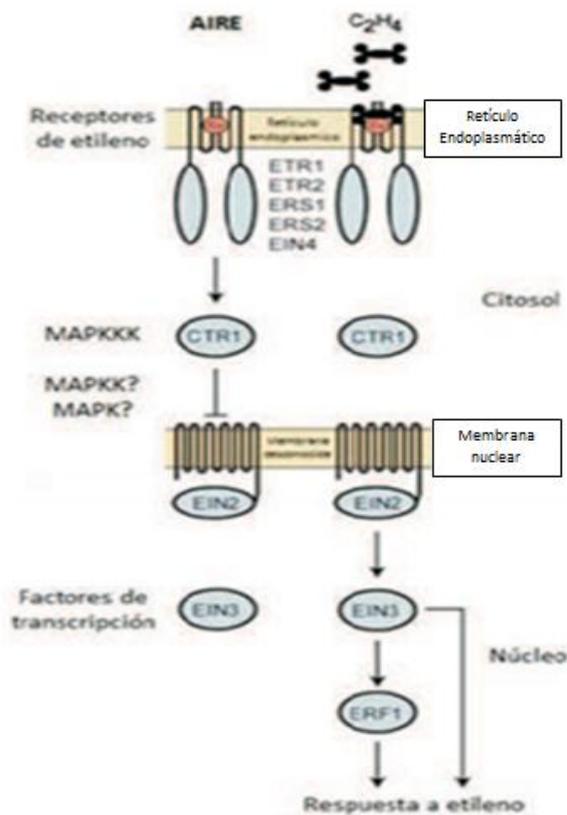
Si bien el HCN es muy tóxico para la célula existe una enzima β cianoalanina, cuya velocidad de reacción es muy superior a su síntesis, que permite mantener la concentración por debajo de niveles tóxicos celulares (Azcon Bieto y Talón, 2000).

Una etapa alternativa a la oxidación del ACC es la síntesis del compuesto conjugado malonil-ACC (MACC), mediante la ACC N-malonil transferasa. Como este proceso resulta irreversible en condiciones fisiológicas, se puede considerar esta vía como un sistema de control de la ACC disponible para la conversión a etileno y/o una auto inhibición, ya que altas concentraciones de etileno en los tejidos aumentan la producción de la transferasa (Abeles *et al.*, 1992; Bleecker y Kende, 2000). (Sección 1.3.3, Fig. N°5).

El mecanismo de acción del etileno se basa en un modelo negativo de regulación de la actividad de sus receptores, a los que se une de forma reversible. La cascada de señalización de etileno consta de cuatro componentes claves: el receptor ETR1, el regulador negativo de la ruta CTR1, el intermediario EIN2 y el factor de transcripción o transducción EIN3. (Figura 4). Existen otras proteínas que pueden realizar la misma función de receptores que ETR1 debido a su alta similitud con los componentes de la ruta de etileno; tal es el caso de ETR2, ERS1, ERS2 y EIN4 en tanto, EIL1, EIL2, EIL3 y ERFs, lo hacen como factores de transcripción (Wang *et al.*, 2002; Mac Lean *et al.*, 2007).

La ETR1, es una proteína constitutiva que tiene una actividad histidina quinasa y capacidad de activarse (autofosforilarse), cuando se une al etileno.

Estando activado inicia una cascada de señalizaciones hacia las proteínas efectoras



produciendo la activación del regulador negativo CTR1 (que inhibía la proteína EIN2). Como resultado EIN2 cobra actividad, lo que lleva a la activación de un factor de transcripción corriente abajo, el EIN 3. Este es en realidad, una familia de transcritores que se encuentran en el núcleo y que actúan a nivel genómico induciendo la expresión génica de proteínas. Los receptores de etileno en su estado libre no pueden afectar la actividad de CTR1 que en ese contexto oficia de inhibidor de la ruta de señalización. Contrariamente, cuando el etileno se une a los receptores en forma no covalente por interacción con iones Cu⁺⁺, se reprime la acción del inhibidor CTR1 por lo que la transducción de señal en la ruta es liberada (Chen *et al.*, 2005; Barrera-Ortiz *et al.*, 2012)

Figura 4. Modelo para la transducción de señales del etileno.

1.3.3 Sistemas de Regulación de la biosíntesis y de su mecanismo de acción.

Numerosas formas de regulación del etileno han sido estudiadas a los fines prácticos de poder controlar la maduración y la vida poscosecha de los frutos, ya sea efectuando modificaciones genéticas a nivel de las enzimas, los receptores y las proteínas transductoras o más sencillamente controlando las condiciones ambientales que permiten disminuir la producción de etileno o impedir su acción mediante la aplicación de inhibidores.

Desde el punto de vista bioquímico, la primera y más importante etapa limitante y reguladora la constituye la conversión de SAM en ACC por acción de la ACS. Esta enzima, que se localiza en el citosol, tiene muy baja concentración y es piridoxal dependiente, resulta fuertemente inhibida por el fosfato del ácido amino-oxalacético (AOA) y la aminoetoxivinilglicina (AVG)(Figura 5). La segunda la constituye la ACO, una enzima lábil, ligada a las membranas y muy sensible a la falta de O₂; una baja concentración, inhibe la producción de etileno (Azcon Bieto y Talón, 2000).

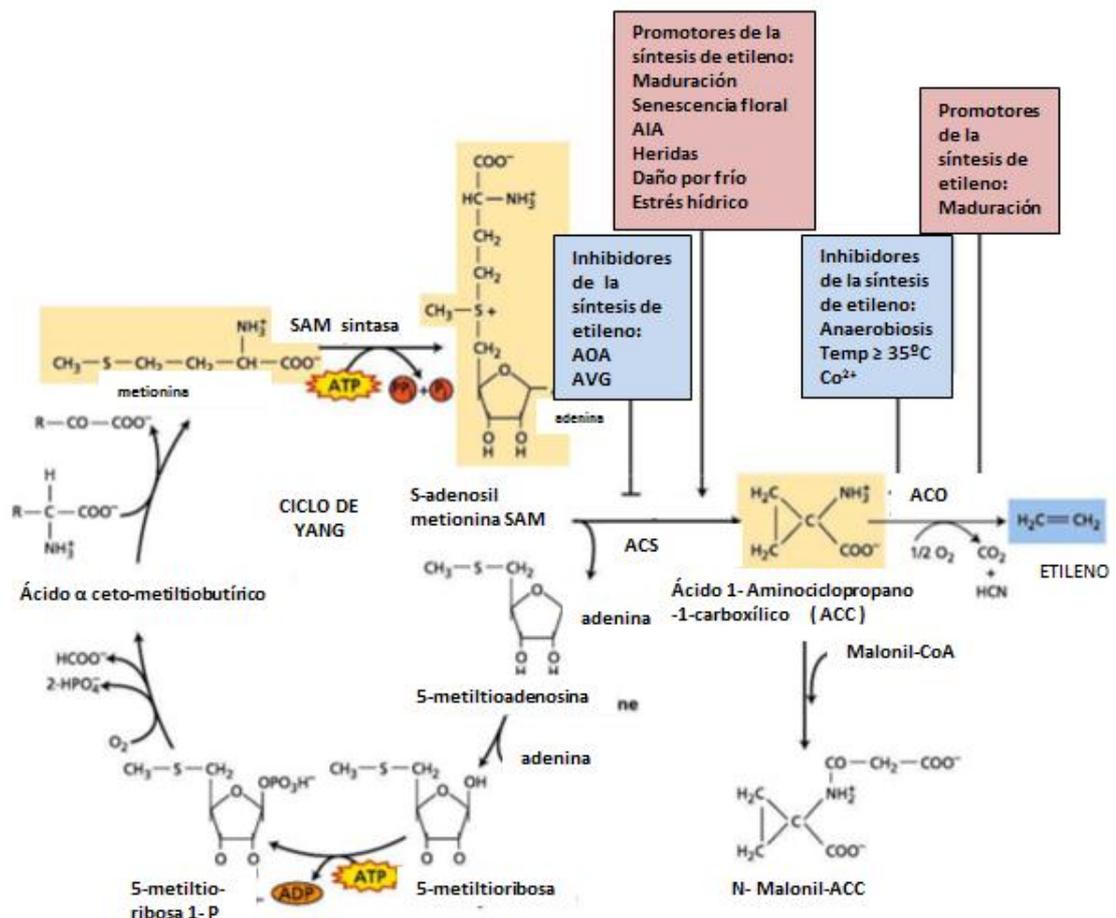


Figura 5. Ciclo de regeneración de la metionina y los factores promotores e inhibidores de la biosíntesis del etileno (Taiz y Zeiger, 1998. Modificado)

Las bajas temperaturas y las concentraciones elevadas de CO₂ (entre 5-20%) inhiben tanto la ACS como a la ACO, éstas concentraciones también disminuyen la afinidad de los receptores por el etileno. La ACO también es inactivada por temperaturas encima de los 35°C, la presencia de ión cobalto, el 2,4-dinitrofenol y algunos antioxidantes.

La conservación frigorífica en atmósferas modificadas ya sea controlada o no, basan su acción en dos factores que afectan directamente la biosíntesis: la baja temperatura y la baja concentración de O₂, (aunque ello solo consigue disminuir la producción de etileno endógeno) y un tercero: el CO₂, que compite a nivel de sus receptores, inhibiendo su acción (Salveit, 1999). Estas condiciones también ralentizan la actividad respiratoria y todas las acciones enzimáticas de la poscosecha, aunque de diferente manera ya que cada ruta metabólica en la madurez tiene sus propias variantes (Benitez *et al.*, 2005).

Para controlar el etileno exógeno se puede realizar una adecuada ventilación de las cámaras (Salveit, 1999) y también recurrir a técnicas de eliminación y/o uso de absorbentes, como el carbón activado, bentonita, sílica gel, vermiculita, perlita y celite. La destrucción del etileno se basa en diversas reacciones químicas, como la oxidación con permanganato de potasio, radiaciones UV, generadores de ozono (Guardia y Herrero, 1992).

Otro mecanismo de regulación es el que se basa en el empleo de sustancias competidoras o bloqueantes de la acción del etileno a nivel de los receptores, que interrumpen las respuestas fisiológicas, incluso la propia biosíntesis. El más antiguo que se conoce es el CO₂, que compite por los sitios de unión de los receptores (Burg y Burg, 1962; De Wild *et al.*, 1999). Otros compuestos muy efectivos son aquellos que contienen ión Ag⁺ como el tiosulfato de plata (STS) admitido con reservas solo en floricultura (Cubillos *et al.*, 2001). Compuestos derivados de olefinas, como el 2,5-norbornadieno, que si bien retarda la maduración en manzanas y varios frutos más como el kiwi, la palta y la banana, no está registrado para productos alimenticios, por su toxicidad y porque pueden conferir aromas extraños a los frutos. Los ciclopropanos, en particular el 1-metilciclopropano (1-MCP) ha mostrado ser el más eficaz de los bloqueadores utilizado actualmente en poscosecha de varias frutas, aunque con aspectos aún no abordados en su totalidad, en relación a las variables que modifican dicha eficiencia y algunos problemas de calidad generados por una incorrecta maduración posterior a su empleo (Fan *et al.*, 1999; Blankenship y Dole, 2003; Thompson, 2010).

1.4 El 1-MCP como inhibidor del etileno y su efecto sobre la fisiología en peras

1.4.1 . Características físico – químicas y comerciales.

El 1-metilciclopropeno (cuya abreviatura es 1-MCP) es un cicloalqueno con un peso molecular de 54 g/mol y su fórmula es C_4H_6 . Se trata de un compuesto gaseoso en condiciones estándar de temperatura y presión.

Es considerado muy seguro para la salud humana, animal y el medio ambiente ya que las pruebas de toxicidad aguda del 1-MCP no mostraron signos clínicos de toxicidad o la muerte (Montes de Oca *et al*, 2007). Se citan valores de toxicidad oral $LD_{50} > 5.000$ mg/kg y para la toxicidad dérmica $LD_{50} > 2.000$ mg/ kg. Es considerado un compuesto de categoría IV para peligros por ingestión e inhalación y III para irritación dérmica o a nivel de los ojos. La Organización Mundial del Comercio en 2008 apoyó la petición de la exención de la obligación de un valor de tolerancia de 1-MCP en la aplicación a las frutas en pre-cosecha, por considerarlo inocuo (Calvo, 2013). No obstante se reporta toxicidad moderada para algas, peces e invertebrados acuáticos (IUPAC,2015).

En la actualidad existen numerosas marcas comerciales, siendo SmartFresh® la primera en haberse registrado y utilizado comercialmente en la Argentina. El SmartFresh® es un polvo blanco, biodegradable, ya que el principio activo está incluido en ciclodextrinas, que se libera en forma gaseosa cuando se lo disuelve en agua tibia entre 35-40°C. No tiene olor, no deja residuos detectables en el fruto y es activo en concentraciones muy bajas del orden de ppb (Thompson, 2010).

Las frutas que han sido tratadas no necesitan mencionarlo en la etiqueta. Esta aprobado actualmente en más de 27 países y para más de 23 especies frutales (Sozzi y Beaudry, 2007; Calvo, 2010).

1.4.2 Mecanismo de acción del 1-MCP.

El 1-MCP es un antagonista del etileno que basa su acción en la ocupación de los lugares de unión de esta hormona de manera que retrasa la cascada de procesos que inician la maduración en los frutos climatéricos y las respuestas fisiológicas etileno-dependientes incluyendo el ablandamiento de la pulpa, la producción de volátiles y la pérdida de color verde (Fan *et al.*, 1999; Blankenship, 2001; Guillén, 2009).

La efectividad del 1-MCP en dosis tan bajas del orden de $\mu L/L$ (ppb), se explica porque la afinidad entre este compuesto y los receptores es aproximadamente 10 veces superior a la del propio etileno (Blankenship y Dole, 2003).

Se considera que el 1-MCP se une de forma permanente a los receptores, o tiene una disociación muy lenta de manera tal que la respuesta al etileno se produce, después de transcurrido cierto tiempo (variable para cada fruta) en la medida que puedan sintetizarse nuevos receptores (Figura 6) (Blankenship y Dole, 2003).

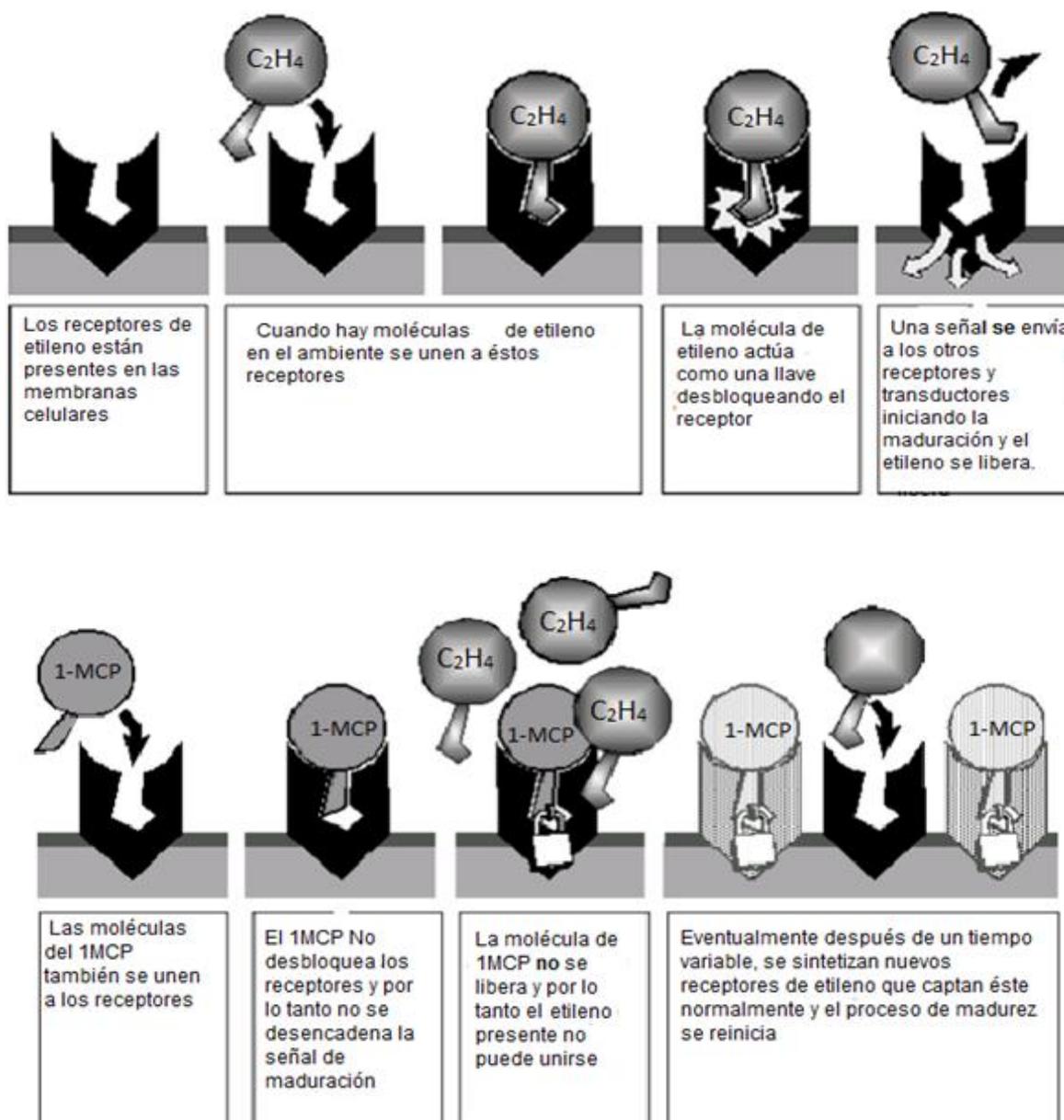


Figura 6. Mecanismo de acción del etileno y del 1-MCP (Adaptado de Blankenship 2001).

Por su parte Gang *et al.* (2009) informaron que el 1-MCP inhibe la producción de etileno en brócoli, a través de la inhibición de la actividad de la ACO, retraso en los picos en la actividad de la ACC sintasa (ACS), disminuyendo la concentración del ACC, además de la expresión génica de estas enzimas y la de los receptores ETR1 y ETR2. McLean *et al.* (2007), trabajando sobre Red D'Anjou, observaron una disminución de la expresión del

receptor ERS1, durante una semana a temperatura ambiente en la fruta tratada. La inhibición a nivel enzimático también se observó en otras frutas, incluidas las peras (De Wild *et al.*, 1999; Gamsrasni *et al.*, 2010; Villalobos *et al.*, 2011; Chiriboga *et al.*, 2012), considerándose por ello, el mecanismo más probable de disminución o inhibición de la producción de etileno en frutas (Mathooko *et al.*, 2001, Owino *et al.*, 2002). Es decir, el 1-MCP, no solo bloquea los receptores sino también la producción autocatalítica del etileno, durante la conservación en frío. Chiriboga *et al.* (2012) observaron en peras 'Conference' también una incapacidad para convertir ACC a MACC, en frutos tratados.

La efectividad del tratamiento para cada fruto va a depender de la rapidez con que el tejido vegetal re sintetice las nuevas proteínas receptoras. La mayoría de las respuestas son más duraderas cuando los frutos son almacenados en cámaras frigoríficas después del tratamiento, debido a que las bajas temperaturas afectan negativamente la velocidad de los procesos metabólicos, entre ellos la síntesis de dichas proteínas de membrana. Cuando los frutos permanecen a temperatura ambiente después de la frigo conservación (vida en estante), en general vuelven a mostrarse sensibles a la acción del etileno, completando normalmente los procesos de maduración. Esa respuesta está condicionada por múltiples factores, entre ellos la dosis de 1-MCP aplicada y la especie, existiendo variaciones importantes inclusive a nivel de variedades (Candan y Calvo, 2003).

1.4.3 Respuestas fisiológicas al tratamiento con 1-MCP

El 1-metilciclopropeno es una nueva herramienta que actualmente permite alargar la conservación y la vida útil de una gran variedad de frutas, manteniendo los estándares de calidad en poscosecha. Las investigaciones acerca de la aplicación de este producto en diferentes especies han sido muy numerosas en los años posteriores a su descubrimiento (Blankenship y Dole, 2003; Watkins, 2006; Sozzi y Beaudry, 2007).

A nivel de los frutos climatéricos, las respuestas fisiológicas producidas por el 1-MCP impactan de diferente manera sobre cada uno de los cambios producidos durante la madurez, afectando la calidad organoléptica pero también produciendo algunos efectos sobre la calidad nutricional de los frutos tratados (Guillén, 2009). Este último aspecto está siendo considerado actualmente en razón de los beneficios que el consumo de fruta fresca produce a la salud, en relación al aporte de antioxidantes y vitamina C. El tratamiento en manzanas y peras europeas, arroja en general un balance positivo a nivel de antioxidantes totales o al menos no afecta su contenido (Larrigaudiere *et al.*, 2004b; Vilaplana *et al.*, 2006; Fu *et al.*, 2007; Hoang *et al.*, 2011; Chiriboga *et al.*, 2013). Con la vitamina C, ocurre algo parecido en durazno, ananá y mango (Guillen, 2009) y, a diferencia de lo observado en peras y manzanas, donde disminuye sin que el 1-MCP haga diferencias (Larrigaudiere *et al.*,

2004; Fawbush *et al.*, 2009). Sin embargo, ha sido recientemente observado que el 1-MCP favorece el mantenimiento del contenido de Vitamina C en peras D' Anjou almacenadas a bajas temperaturas (Calvo *et al.*, 2016 b).

1.4.3.1 Producción de etileno y respiración.

La acción exitosa del 1-MCP se basa en la disminución de la producción de etileno, que conlleva a un retardo de la maduración de los frutos climatéricos pudiendo incluso bloquear totalmente este proceso en algunas especies lo cual limita su uso a nivel comercial (Sozzi y Beaudry, 2007).

La manzana es una de las frutas que mejor responde a los tratamientos con 1-MCP (Fan *et al.*, 1999; Watkins, 2006; Vilaplana *et al.*, 2006; Nocks y Watkins, 2013). En el Alto Valle, la mayoría de las empresas emplean esta tecnología, realizándose el 80% de los tratamientos en manzanas y el resto en peras, mayoritariamente la variedad Williams seguida de Beurrè D'Anjou, Packhams Triumph, Abate Fetel y Beurrè Bosch (Calvo, 2013). También se usa comercialmente en bananas, paltas, ciruelas, duraznos, nectarines.

La lógica comercial del tratamiento está direccionada hacia cuatro aspectos fundamentales como son: prolongar el periodo de cosecha, extender el período de conservación, evitar una maduración prematura durante transporte y distribución y controlar desórdenes fisiológicos (Calvo, 2013).

La necesidad de prolongar el período de cosecha, es un aspecto importante en el Alto Valle, ya que existe una gran influencia de la temperatura en el crecimiento y desarrollo de las peras (Rodríguez *et al.*, 2011) sucediendo con frecuencia que al momento del sello, la fruta aún no tiene el tamaño comercial, obligando a demorar su cosecha. Esto implica un avance en el grado de madurez y un menor potencial de conservación y margen de comercialización, aspecto fundamental en un lugar donde la producción de fruta se orienta a la exportación en mercados de ultramar. En peras es un problema importante en el cultivar 'Williams', que de por sí posee corta conservación. Por el contrario, 'Beurrè D'Anjou' y 'Packham's' Triumph tienen un gran potencial de conservación, pero son muy susceptibles a la escaldadura superficial, lo cual limita su tiempo de almacenamiento. Esa es la principal razón de la aplicación en estas variedades, ya que el 1-MCP reduce la incidencia de esta fisiopatía (Candan y Calvo, 2003).

El 1-MCP también actúa disminuyendo la tasa de respiración en casi todas las frutas incluidas peras y manzanas, aunque esta reducción no alcanza los niveles del preclimaterio. Se ha demostrado en D'Anjou, que el efecto no es proporcional a la dosis aplicada, ya que a partir de una dosis efectiva, la reducción de la respiración no es mayor, aunque se aumente la concentración (Argenta *et al.*, 2003).

La inhibición de los efectos del etileno sumado a la disminución de la tasa respiratoria, permite que las frutas conservadas en una cámara común se comporten como en una atmósfera controlada aunque con un menor tiempo de conservación que éstas (Candan y Calvo, 2003; Argenta *et al.*, 2003; Watkins, 2006).

1.4.3.2 Modulación de los efectos del 1-MCP

El tratamiento con 1-MCP en peras ha demostrado ser más complejo que en otros frutos, en parte por la alta sensibilidad del fruto al tratamiento y el efecto residual prolongado (Chiriboga *et al.*, 2008). Determinadas dosis pueden dar como resultado frutos excesivamente verdes y firmes, sin posibilidad de madurar (Candan y Calvo, 2003; Chiriboga *et al.*, 2012; 2014). Para optimizar el uso comercial del 1-MCP en peras se requiere la aplicación de una concentración suficientemente alta como para controlar la escaldadura superficial pero que permita una adecuada maduración de la fruta después del almacenamiento (Calvo y Candan, 2012a). Es fundamental que esto ocurra durante el período comercial normal, volviendo a sintetizar etileno y/o retomando la sensibilidad a la hormona. Chiriboga *et al.* (2012) trabajando en pera 'Conference' y Villalobos-Acuña *et al.* (2011) en 'Bartlett' encontraron que el proceso estaba relacionado a la acumulación de ACC, la intensidad de inhibición de la ACS y la actividad residual de esta enzima durante la vida en estante a 20°C.

Si bien existe una dosis comercial de 300 ppb para el caso de la marca SmartFresh, no todas las variedades responden satisfactoriamente. 'Williams' es la que mejor lo hace, pero en 'Packhams' y especialmente en 'Beurré D'Anjou', puede inhibirse completamente el ablandamiento de los frutos aún después de largos periodos de conservación (7-8 meses) y dentro en un plazo razonable de vida en estante. Es por ello que se requieren técnicas de modulación ya sea pre-almacenamiento, tales como la aplicación simultánea de 1-MCP con etileno o con CO₂, manejo de la fecha de cosecha en relación a la dosis aplicada y/o demora en la aplicación del tratamiento; o post almacenamiento, como el manejo de la temperatura a la salida de cámara, que tendría la ventaja de poder realizarse a medida que se necesita comercializar la fruta (Chiriboga *et al.*, 2008, 2014; Calvo, 2012a; Calvo y Candan, 2015). A igual dosis en 'Abate Fetel', Rizzolo *et al.* (2015) observaron inhibición casi total en AC (atmósfera controlada) y temperaturas de -0,5°C, pero no hubo inconveniente en frío convencional (FC) a 1°C después de 7 meses. El almacenamiento a 1°C también resultó exitoso en peras 'D' Anjou', después de 6 y 8 meses de almacenamiento, usando una dosis menor de 0,15 µL/L, pero sin un control total de la escaldadura superficial que llegó a casi un 20% (Xie *et al.*, 2014).

Cuando la fruta tratada inicia el proceso de maduración, ablandamiento y producción de volátiles, lo hace de la misma manera que la fruta sin tratar pero demorada en el tiempo, un lapso variable, que obedece en especial a la dosis aplicada y al estado de madurez de los frutos al momento de cosecha (Villalobos-Acuña *et al.*, 2011, Chiriboga *et al.*, 2012; Calvo, 2004a). Aunque a la salida de la cámara se exponga al etileno exógeno, no responde en forma inmediata (Argenta *et al.*, 2003; Calvo, 2004b). Asimismo si la pera ha empezado a madurar, se muestra relativamente insensible a una nueva aplicación de 1-MCP (Ekman *et al.*, 2004).

1.4.4 Efecto del 1- MCP sobre los parámetros de calidad

1.4.4.1 Evolución de la firmeza.

La firmeza de la pera va disminuyendo durante los meses de conservación frigorífica. Minimizar el ablandamiento de la pulpa en esta etapa como en su posterior vida comercial es la clave para mantener una buena calidad comercial. El descenso está directamente relacionado a la variedad y el estado de madurez en cosecha.

Numerosos trabajos evidencian la eficacia del tratamiento con 1-MCP en peras, para mantener la firmeza, tanto después de largos períodos de conservación como después de unos días a temperatura ambiente (Chiriboga *et al.*, 2008; Calvo, 2004b). Un problema que se presenta en peras es que para que estén aptas para el consumo, su firmeza debe presentar valores de 2-4 libras (Ekman *et al.*, 2004) y muchas veces el 1-MCP impide alcanzar estos valores en algunas variedades como 'Beurrè D'Anjou' y 'Packhams' (mencionadas en el punto anterior) o lo hacen después de un período relativamente largo en cámara o vida en estante (Calvo 2004a; Calvo y Candan, 2012a, 2015).

El efecto del 1-MCP sobre el ablandamiento se asocia con el descenso de las actividades de las enzimas β galactosidasa, glicosidasa y poligalacturonasa que degradan las pectinas de la pared celular (Chiriboga, 2008; Li *et al.*, 2010).

En general se observa un efecto sinérgico entre el tratamiento y la conservación en atmósfera controlada, en el mantenimiento de la firmeza, aunque no en igual medida para cada variedad (Eccher-Zerbini *et al.*, 2005; Rizzolo *et al.*, 2005; Calvo, 2013).

1.4.4.2 Evolución del color

El 1-MCP retarda o evita la degradación de la clorofila y otros cambios de color en una amplia variedad de vegetales (Blankenship y Dole, 2003). Se comprobó que el 1-MCP en peras reduce las pérdidas de color verde tanto en cámara como en la posterior vida de

estante, en distintas variedades (Argenta *et al.*, 2003; Candan y Calvo, 2003; Trincherro *et al.*, 2004; Villalobos-Acuña *et al.*, 2011)

Estudios realizados en el Alto Valle, indican que las peras 'Williams' tratadas presentan un valor de tono (ángulo hue), mayor a 105°, hasta un período de 60 días de conservación más 7 de vida útil, con una cosecha al momento óptimo o menor si es más tardía. Con períodos de vida en estante más prolongados (14 días), el color evoluciona hacia un tono más amarillento (hue menor a 100°), independientemente de la fecha de cosecha. Este efecto fue dosis dependiente, de forma tal, que ese cambio se efectuó con concentraciones de 100 ppm en adelante y también depende del tiempo de almacenamiento (Calvo, 2004a). Rizzolo *et al.*(2005) comprobaron que la dosis de 50 ppb es más efectiva que 25 ppb en mantener el color verde de peras 'Conference' almacenadas en AC pero solo hasta las 22 semanas, luego ambas dosis no mostraban diferencias.

Aun cuando las dosis empleadas puedan causar un bloqueo de la madurez en términos de firmeza, eso no sucede nunca con el color, ya que el proceso no se detiene por completo (Trincherro *et al.*, 2004; Chiriboga *et al.*, 2011).

1.4.4.3 Producción de volátiles y calidad sensorial.

Al ser el etileno el regulador de la producción de volátiles que contribuye al aroma en los frutos climatéricos, el 1-MCP produce una disminución de estos compuestos aunque no en forma permanente (Guillen, 2009; Chiriboga *et al.*, 2008).

El acetato de hexilo con notas frutales parece ser el principal contribuyente al aroma de las peras, seguido de acetato de butilo y acetato de pentilo, mientras que los alcoholes tienen una contribución pobre, salvo el butanol (Moya-León *et al.*, 2006; Rizzolo *et al.*,2005).

En peras D'Anjou se demostró que la aplicación retrasa y reduce la producción de ésteres totales hasta los 8 meses de almacenamiento y disminuye la producción de alcoholes y aldehídos, aunque a la salida del frío responden al tratamiento con etileno exógeno de igual forma que el control (Argenta *et al.*, 2003; Moya-León *et al.*, 2006) encontraron que las peras 'Packham's' con 200 ppb, recuperaron a los 6 meses su capacidad de producir volátiles y eso unido a la capacidad de desarrollar una dulzura superior y una buena firmeza, las convirtió en las más aceptadas por encima de aquellas conservadas en AC. Recientemente pudo comprobarse por medio de análisis sensoriales en 'Williams' que el 1-MCP es capaz de desarrollar rasgos sensoriales deseables una vez que el fruto ha madurado, incluyendo el aroma, jugosidad y dulzor, además de minimizar rasgos sensoriales indeseables tales como aroma fermentado, la textura arenosa y/o sabor agrio (Escribano *et al.*, 2016). Efectos similares se habían obtenido en otras variedades como

'Conference' (Rizzolo *et al.*, 2005) y 'Spadina' (Gamrasni *et al.*, 2010). La fecha de cosecha tiene mucha influencia: cuanto más tardía, mejor es la calidad sensorial.

1.4.4.4 Contenido de Ácidos orgánicos y Sólidos solubles.

Está ampliamente demostrado que el 1-MCP mantiene mayores valores de acidez en los frutos. Argenta *et al.* (2003) comprobaron valores superiores en frutos de la variedad 'D' Anjou' y lo mismo Lafer (2005) en 'Williams', 'Bosc' y 'Packham's Triumph'. En 'Williams', 'Packhams' y 'Beurrè D'Anjou' en el Valle los ensayos arrojan resultados positivos sobre la retención de la acidez (Candan y Calvo, 2003; Sanchez, 2010; Calvo y Candan, 2012a).

En cambio, el efecto del 1-MCP sobre el contenido de sólidos solubles es variable, pudiendo aumentar, disminuir o no tener efecto, según la variedad y las condiciones de conservación (Watkins, 2006). Aunque en general, no se presentan variaciones de importancia (Calvo, 2004b; Guillén, 2009).

1.4.5 Factores que condicionan la aplicación de 1-MCP

Según Sozzi y Beaudry (2007), los factores pre y pos cosecha que afectan la respuesta al tratamiento de 1-MCP son numerosos. Se incluyen factores como el genotipo (especie y variedad), las condiciones ambientales, las prácticas culturales en el campo, la fecha de cosecha (estado fisiológico del fruto), las condiciones de aplicación (tiempo transcurrido desde la cosecha, duración y cantidad aplicada), la susceptibilidad de la fruta a las alteraciones y las condiciones del manejo en poscosecha. Además de estas variables, hay que agregar diferencias importantes en el material de los bins utilizados y su humedad, los sistemas de frío empleados (frío común (FC), atmósfera modificada (AM), atmósfera controlada (AC))(Calvo y Sozzi, 2009) y en particular la duración del almacenamiento (Calvo, 2013).

En relación a los factores de precosecha, estudios realizados por Raffo *et al.* (2008), sobre pera 'Williams' en el Alto Valle, demostraron que las exposiciones a la luz y/o la temperatura antes de la cosecha explican parte de la variabilidad que existe en los tratamientos con 1-MCP, siendo la fruta más expuesta la que mayor firmeza retuvo en el tratamiento, pero con un ángulo hue menor (menos verde).

En relación a la temperatura de aplicación y la concentración, cuando más bajas sean éstas, es necesario que el tiempo de exposición se prolongue. Así, aplicaciones comerciales en cámaras entre - 0,5°C y 2°C, tendrían un tratamiento de 24 horas, en lugar de 12 horas (Chiriboga *et al.*, 2014).

En relación a la fecha de cosecha, los mejores resultados se obtienen cuando los frutos se cosecharon antes del inicio del pico climatérico o al principio de éste, es decir al momento de la llamada “primera fecha de cosecha”. A medida que se avanza en la madurez, la efectividad del 1-MCP decrece, aunque igualmente los frutos presentan una calidad mayor que la fruta testigo. A medida que se aleja de la cosecha óptima es necesario aplicar mayores dosis si se quiere una larga conservación de los frutos (Hiwasa *et al.*, 2003; Calvo y Sozzi, 2004; Lafer, 2005), aunque puede ocurrir un efecto no deseado en cosechas muy tempranas como el hecho de que los frutos después de la conservación, no lleguen a una firmeza de consumo (Gamrasni *et al.*, 2010; Chiriboga *et al.*, 2013).

En relación al impacto de la naturaleza del envase en la aplicación de 1-MCP, se ha demostrado que el material de los bins incide en las respuestas a la maduración posterior al almacenamiento. Los bins de madera, más aún si están húmedos (lo cual ocurre cuando la fruta se enfría por sistema de hidrocóoling), absorben gran parte del compuesto, llegando incluso a perder totalmente la efectividad del tratamiento con dosis comerciales en pera Williams (Calvo y Sozzi, 2009). Al parecer la alta concentración de lignina y materia seca (que también contienen los envases de cartón), pueden proporcionar mayor concentración de sitios activos de absorción de 1-MCP que la propia fruta (Ambaw *et al.*, 2011).

1.5 Los sistemas antioxidantes

1.5.1 Especies reactivas del oxígeno.

Se puede definir al estrés oxidativo como la situación en la que las células están expuestas a un ambiente oxidante y los mecanismos defensivos antioxidantes son sobrepasados de forma que se llega a afectar el estado redox celular.

Las llamadas especies reactivas del O₂ (EROs), (también conocidas por sus siglas en inglés ROS), son metabolitos de mucha importancia porque participan en el crecimiento y desarrollo de las células aerobias, guardando una adecuada homeostasis (Gapper y Dolan, 2006).

El término EROs agrupa a un número importante de sustancias, clasificadas como radicales libres y no radicales, que actúan como agentes oxidantes y/ o pueden convertirse fácilmente en radicales. Estas moléculas en su estructura atómica presentan un electrón desapareado en el orbital externo, dándole una configuración que genera una alta inestabilidad y puede producir reacciones en cadena (Apel y Hirt, 2004). De hecho, Halliwell, (2006) define a los radicales libres como cualquier especie capaz de una existencia independiente (de ahí el término libre) que contiene uno o más electrones no apareados.

En los sistemas biológicos, las EROs son intermediarios tóxicos que en su mayoría provienen de las sucesivas reducciones parciales del O₂ atmosférico. Como resultado de la excitación del O₂ se forma un singlete (O₂¹) y se pueden transferir uno, dos o tres electrones para formar respectivamente: un radical superóxido (O₂^{•-}), peróxido de hidrógeno (H₂O₂) o un radical hidroxilo (OH^{•-}) (Mittler, 2002, Blockhina *et al*, 2003; Halliwell, 2006) (Figura 7).

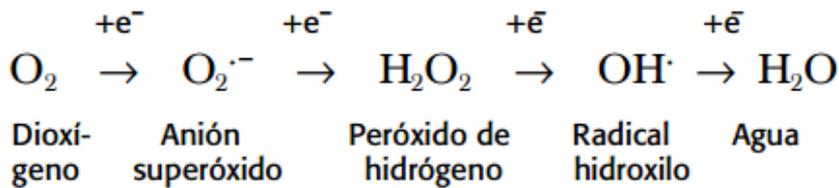


Figura 7. Formación de especies reactivas al O₂

Las EROs son continuamente sintetizadas como bioproductos en varias rutas metabólicas, localizadas en diversos compartimentos celulares, en especial donde hay transferencia de electrones como cloroplastos, mitocondrias, peroxisomas y también retículo endoplasmático, membrana plasmática, la pared celular y el apoplasto (Amirsadeghi *et al.*, 2007; Gill y Tuteja, 2010). En los tejidos no verdes o en la oscuridad la respiración en las mitocondrias parece ser la principal productora de EROs (Moller *et al*, 2007).

Presentan una dualidad muy marcada en sus funciones, por un lado participan en el metabolismo normal de procesos como fotosíntesis y respiración y en fenómenos de señalización de niveles de estrés, ya sea de origen biótico o abiótico, desencadenando reacciones de defensa contra patógenos y siendo activadores de los sistemas antioxidantes (Dat *et al.*, 2000; Davey *et al.*, 2000; Noctor y Foyer, 2005; Halliwell, 2006, Bussato *et al.*, 2014). La producción y la señalización de EROs están integrados con la acción de diversas hormonas y reguladores de crecimiento, en las respuestas adaptativas de las plantas al estrés, identificándose múltiples puntos de control recíprocos entre unos y otros (Krishnamurthy y Rathinasabapathi, 2013; Xia *et al.*, 2015). Por otro lado, son moléculas que resultan tóxicas para las células y su aumento puede provocar daños irreparables a la misma, incluyendo su ADN. Normalmente están en muy bajas concentraciones intracelulares y es necesario el mantenimiento constante de su equilibrio (Toivonen, 2004).

En relación a la reactividad, no todas estas moléculas se comportan por igual, así el superóxido (•O₂⁻) es poco reactivo pero muy agresivo para los sistemas biológicos y es rápidamente transformado por la SOD (superóxido dismutasa) en H₂O₂ que es una molécula relativamente estable. El OH^{•-} es el más destructivo, pues este fuerte oxidante ataca a todas las moléculas de su entorno (proteínas, lípidos y ADN) y su reacción es

prácticamente instantánea, ya que debido a su semejanza físico-química con el agua y a su pequeñez, penetra fácilmente las membranas celulares. Tiene una vida media muy corta menor a 1 μ s y normalmente se encuentra en muy bajas concentraciones. A su vez, a diferencia de los aniones superóxido y el peróxido de hidrógeno, escapa a la regulación enzimática como mecanismo de control (Davey *et al.*, 2000; Halliwell, 2006; Moller *et al.*, 2007).

Otro aspecto importante se relaciona a la movilidad de éstas moléculas: el superóxido puede difundir a través de las membranas lentamente, el peróxido lo hace en forma muy rápida, alcanzando lugares remotos desde su sitio de producción, en tanto el radical hidroxilo no presenta casi movilidad, desplazándose no más de 3-5 radios moleculares (Fridovich, 1998; Moller *et al.*, 2007).

Existen al menos dos mecanismos diferentes para regularlos: uno capaz de una fina modulación de niveles bajos, para señalización, y otro para detoxificarlos en caso de un desequilibrio o aumento por estrés. Los mecanismos de control no enzimático se basan en la actividad de metabolitos antioxidantes de bajo peso molecular, tales como las vitaminas C y E, el glutatión, los compuestos fenólicos, que incluyen a los flavonoides, carotenoides, ligninas, etc, (Davey *et al.*, 2000; Blokhina *et al.*, 2003). Mientras que los mecanismos enzimáticos se basan en la acción de ciertas enzimas como la catalasa (CAT), la superóxido dismutasa (SOD), la ascorbato peroxidasa (APX) y la glutatión reductasa (GR) que actúan sobre las principales rutas de control de radicales libres (Noctor y Foyer, 1998; Pert-Treves y Perl, 2002; Polle, 2001; Halliwell, 2006) (Ver punto 1.5.2.1. Figura 8).

1.5.2. Metabolitos antioxidantes.

Son compuestos que permiten la vida celular en un ambiente oxidante, cuya presencia es ubicua en los organismos aerobios. Actúan en estrecha relación con los sistemas enzimáticos, constituyéndose en agentes reductores, enlazando ciclos de eliminación de las EROs y por lo general tienen bajo peso molecular (Blockhina *et al.*, 2003; Halliwell, 2006). Cuando se habla de actividad antioxidante total en una fruta u hortaliza, se busca cuantificar la “capacidad que tendrían todos los compuestos antioxidantes presentes en éstas”, actuando simultáneamente. Existen tres grupos principales de moléculas que actúan como antioxidantes: las vitaminas antioxidantes lipo (E y A) e hidrosolubles (C), los carotenoides y los polifenoles, como grupo principal que incluye los compuestos flavonoides (Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverri, 2006; Portal Antioxidantes, 2016).

La clase de antioxidantes predominante es función de la especie, así el ácido ascórbico, el glutatión y los compuestos fenólicos son los antioxidantes, no enzimáticos más importantes en peras. En relación al contenido total (evaluado a través de la medición de

DPPH), presentan valores menores que las manzanas y además se incrementan muy poco al atrasar la cosecha, a diferencia de lo que ocurre en éstas, donde la capacidad antioxidante de los frutos puede aumentar de 30 a 80% entre una cosecha temprana y una tardía (Calvo *et al.*, 2016a).

Los antioxidantes se encuentran en pequeñas cantidades (μg o mg/kg) y no poseen valor nutritivo (en cuanto a la producción energética) pero su función está ligada a la remoción de los metales pro oxidantes, a la neutralización de los radicales libres y a potenciar la acción de los antioxidantes endógenos del ser humano (Barda, 2011). Su ingesta se ha asociado a la disminución y/o prevención de varias patologías, entre ellas cáncer, enfermedades cardiovasculares y degenerativas, además de evitar el envejecimiento celular, por ello son consideradas hoy en día un criterio cada vez más valorado de calidad (Coronado *et al.*, 2015; Ostek, 2016a).

1.5.2.1. Ascorbato

El ácido ascórbico, ascorbato o vitamina C (AA), es esencial en muchos procesos fisiológicos de las plantas, como el crecimiento y la diferenciación celular (Davey *et al.*, 2000) pero el rol más importante es su acción como reductor de las EROs, minimizando el daño oxidativo ante diversas situaciones de estrés, en especial ambientales, incluyendo ozono, altas temperaturas, exceso de luz y radiación y ataque de patógenos (Davey *et al.*, 2000; Chen y Gallie, 2005; Pavet *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2008). Es uno de los antioxidantes más abundantes en las plantas, sintetizado en mitocondrias, pero presente en todos los compartimientos celulares y es cofactor para varias enzimas (Noctor y Foyer, 1998).

Desde el punto de vista químico es un compuesto sencillo, cuya fórmula empírica es $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$. Es una lactona, que presenta un anillo lactona de cinco carbonos y un grupo enediol que es esencial para su actividad biológica (Figura 8). Si se deshidrata perdiendo una molécula de agua se convierte en ácido dicetogulónico por una reacción irreversible y deja de tener actividad como vitamina. Es casi insoluble en grasas y aceites y su estabilidad está seriamente afectada por diversos factores como el pH, luz, diversas enzimas, catalizadores metálicos como Ca^{+2} y Fe^{+3} y altas temperaturas.

Aunque es capaz de eliminar directamente los radicales superóxido, hidroxilo y oxígeno singlete, sin mediar acción enzimática, su efecto antioxidante principal, es través del ciclo del ascorbato-glutati6n o ciclo de Halliwell Asada. Utiliza cuatro enzimas, siendo la principal catalizadora la ascorbato peroxidasa (APX), que transforma el H_2O_2 en agua, pasando primero por monodehidroascórbico (al perder un electr6n) que cambiará rápidamente a dehidroascórbico (por acci6n de un NADPH) y luego a ascórbico. Este

mecanismo opera en los cloroplastos, mitocondrias y en citoplasma y es muy efectivo para eliminar altos niveles de peróxido (Figura 8).

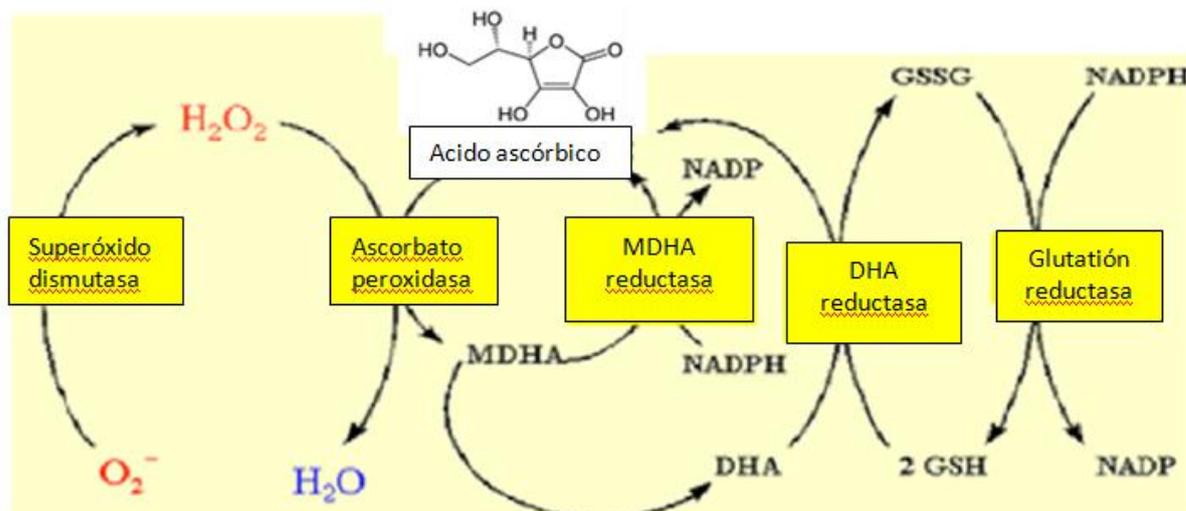


Figura 8. Ciclo del ascorbato-glutatión y reacciones asociadas. MDHA: monodehidroascórbico; DHA: dehidroascórbico; GSH: glutatión reducido; GSSG: glutatión oxidado

La vitamina C es un factor de calidad nutricional muy valioso en frutas y hortalizas y se utiliza frecuentemente como un suplemento dietético, ya que los humanos no lo sintetizamos y necesitamos incorporarlo con la dieta. Además no se bioacumula, por lo cual es necesario consumirlo en forma continua (Li y Schellhorn, 2007). Eberhardt *et al.* (2000), demostraron que 100 g de manzanas frescas tiene una actividad equivalente antioxidante a 1.500 mg de vitamina C, y que los extractos de todas las variedades de manzana podían inhibir el crecimiento de células de cáncer de colon e hígado in vitro, de una manera dependiente de la dosis, demostrando que los antioxidantes naturales a partir de fruta fresca podrían ser más eficaces que un suplemento dietético.

El contenido de vitamina C en frutas y verduras puede ser influenciado por varios factores tales como: i) especie y variedad, ii) condiciones climáticas antes de la cosecha (aumenta cuando es mayor la intensidad de la luz durante la estación de crecimiento); iii) prácticas culturales (riegos menos frecuentes, lo aumentan pero las fertilizaciones a tasas elevadas lo disminuyen), iv) fecha cosecha y manejo de post-cosecha. Las temperaturas elevadas aceleran las pérdidas al igual que los almacenamientos prolongados (Lee y Kader, 2000).

Hay estudios que indican que su presencia es muy importante para evitar fisiopatías de tipo oxidativo en la fruta almacenada Veltman *et al.* (2000), hallaron una correlación entre el contenido de ácido ascórbico en peras Conference y Rocha y el desarrollo de

pardeamiento interno en cámaras de atmósfera controlada, que se producía al disminuir un umbral límite que variaba entre 2 y 6 mg/100g, en función del cultivar y la fecha de cosecha y que representaba una pérdida mayor al 50% de los valores iniciales.

Aunque el almacenamiento refrigerado de frutas y hortalizas es lo indicado para retener ácido ascórbico, su cantidad disminuye a medida que transcurre el tiempo de permanencia en cámara. En manzanas, peras y berries las pérdidas son mayores cuando la fruta se almacena en AC, ya que el CO₂ afecta su estabilidad, siendo crítico el tiempo en que se establece la atmósfera (Agar *et al.*, 1997, Martínez *et al.*, 2013).

En relación al efecto del 1-MCP sobre la vitamina C, los estudios indican en muchas frutas y hortalizas (manzanas, ananás, duraznos, mango, tomates y membrillo), que es capaz de mantener o mejorar los valores iniciales (Guillén, 2009), pero un estudio realizado sobre pera Blanquilla indica que disminuye el contenido, en relación a la fruta sin tratar (Larragaudiere *et al.*, 2004b).

1.5.2.2. Polifenoles.

Los compuestos fenólicos son el grupo más extenso de sustancias no energéticas presentes en los alimentos de origen vegetal. Comprenden cerca de 5.000 compuestos, biosintetizados por las plantas (frutos, hojas, tallos, raíces y semillas), que exhiben todas propiedades antioxidantes fuertes, siendo responsables de la mayor parte de la actividad antioxidante que tienen frutas, verduras, ciertas infusiones y bebidas naturales habitualmente consumidas (té, vino, cacao), (Quiñones *et.al.*, 2012; Portal Antioxidantes, 2016).

Desde el punto de vista químico, todos poseen como estructura común al menos un fenol (un anillo aromático que lleva al menos un sustituyente hidroxilo) (Figura 9). Existen varias clases y subclases de polifenoles que se definen en función del número de anillos fenólicos que poseen y de los elementos estructurales que presentan estos anillos.

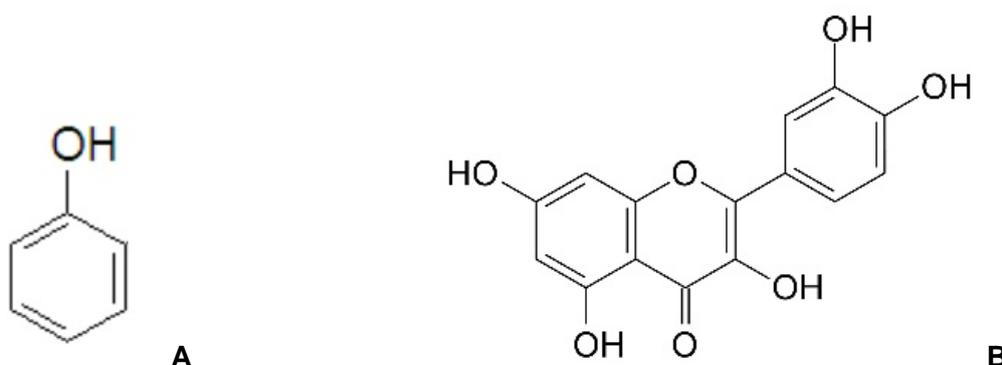


Figura 9. Estructuras químicas básicas de los polifenoles. **A:** Fenol **B:** Flavonoide.

Los flavonoides (el grupo más extenso de colorantes vegetales hidrosolubles) son los polifenoles que poseen al menos 2 subunidades fenólicas; y los taninos, aquellos que tienen 4 o más subunidades fenólicas (Robbins, 2003; Halliwell, 2006, Ostek, 2016b) (Figura 9).

La biosíntesis de los polifenoles como producto del metabolismo secundario de las plantas tiene lugar a través de dos importantes rutas primarias: la ruta del ácido siquímico (dependiente de la luz) y la ruta de los poliacetatos (Figura 10).

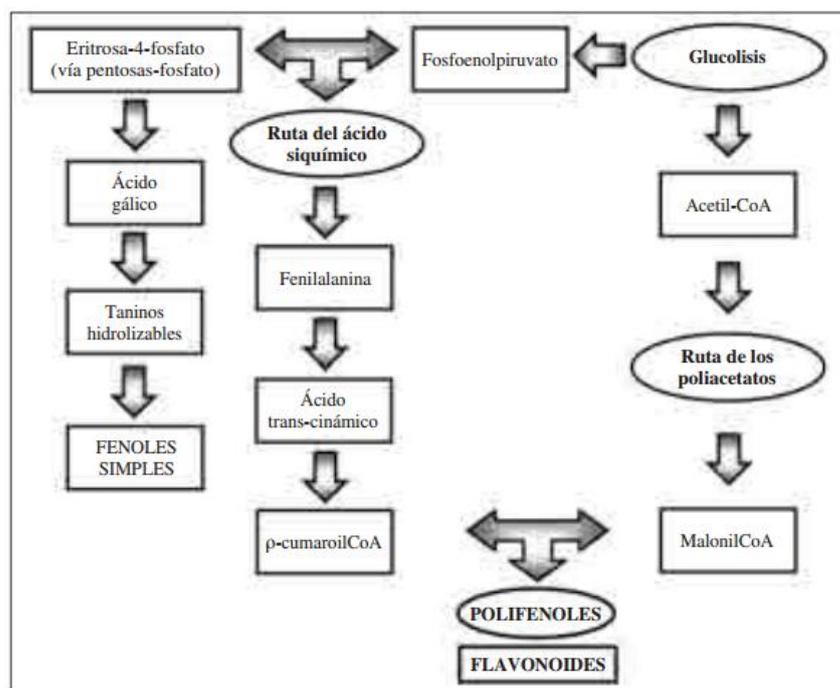


Figura 10. Esquema de las rutas biosintéticas de polifenoles en las plantas. CoA= Coenzima A.

Su contenido presenta grandes variaciones en relación al cultivar y la parte de la fruta analizada, siendo en todos los casos estudiados, la piel la que presenta por lejos la mayor concentración de fenoles, existiendo de todos modos, grandes diferencias entre los valores máximos y mínimos observados en las experiencias (Colaric *et al.*, 2006; Lata, 2007; Drogoudi *et al.*, 2008; Kunradi Vieira *et al.*, 2009; Salta *et al.*, 2010). Su acumulación en el tejido dérmico de las plantas está en relación a ciertas funciones que pueden desempeñar los polifenoles: protección contra la radiación ultravioleta, atrayentes para la dispersión de las frutas (flavonoides) y productos químicos de defensa contra patógenos y plagas (taninos) (Blockhina *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2005).

En 2003, Galvis Sanchez *et al.*, reportaron valores de polifenoles totales (PFT) de 123,5 a 200,5 mg/100g en cáscara y del 28 a 81 mg/kg en pulpa, trabajando con seis variedades de peras europeas, incluidas la D'Anjou y Red D'Anjou. El INTA (Portal Antioxidantes, 2016), realizó un estudio sobre la cantidad de polifenoles en peras

Packham's, con y sin cáscara, obteniendo un valor de 178 y 130 mg/100g de peso fresco respectivamente. Según Barda (2010), el cultivar Williams en nuestro país presenta un contenido total de fenoles de 30 mg/100g en pulpa, valor bastante más bajo que los reportados en Europa y en Chile en otras variedades.

En manzana, Drogoudi *et al.* (2008) señalaron también como fuentes de variación importantes del contenido de polifenoles, el estado de madurez de la fruta y las condiciones medioambientales, en especial la exposición a la luz. Observaron también diferencias en la composición química, así la cáscara contenía además de todos los polifenoles hallados en la pulpa, dos diferentes: quercitina y antocianinas. No obstante, en ambas partes, los más importantes flavonoles fueron la catequina, epicatequina, procianidina B1 y B2.

En peras Williams el principal compuesto encontrado fue el ácido clorogénico, seguido por el ácido siríngico y las catequinas, al igual que en la var. Rocha, donde se reportan como mayoritarios, además los ácidos cumáricos y felúricos (Colaric *et al.*, 2006). Ello coincide con Barda (2011) en Williams y Galvis *et al.* (2003), en D'Anjou, que agregan como compuesto importante en piel la presencia de la p-arbutina, aunque los contenidos difieren mucho y en el Alto Valle siempre resultaron menores a 2 mg/100g de peso fresco. En otros cultivares europeos como Abate Fetel y G. Lecler el ácido cafeico fue el principal componente fenólico (12,9 y 8,5 mg/100g respectivamente), todos considerados como peso en fresco (Salta *et al.*, 2010).

Se ha demostrado que además del componente genético, las condiciones del cultivo que tienden a producir estrés, tales como enfermedades, plagas o falta de nutrientes lleva a un aumento en la cantidad de polifenoles (Petkovsek *et al.*, 2007). En la cara expuesta de las manzanas que presentan asoleado, se sintetizan más compuestos fenólicos (antocianinas), como respuesta al exceso de radiación solar que en aquellas que no presentan daño aparente, ello se reflejó también en la pulpa, así las manzanas con daño por sol, presentaron mayores valores de polifenoles totales (Motomura *et al.*, 2008).

En relación al comportamiento en cámara, Martínez *et al.* (2013) trabajando en menta observaron al principio un leve aumento de la síntesis de polifenoles como inducción a la defensa del estrés por frío, pero que no se mantuvo en el tiempo sino que disminuyó en la medida que se prolongó el almacenamiento.

Numerosos trabajos en peras y manzanas indican que existe una correlación significativa entre la concentración de los compuestos fenólicos y la actividad antioxidante total, así como la aparición de diversos desórdenes fisiológicos de pardeamiento interno de la pulpa. En este sentido, la pérdida de la integridad de las membranas, se hace visible a través de la oxidación enzimática de los compuestos fenólicos, por acción de la PPO (polifenoloxidasas), que los convierte en polímeros amarronados (Franck *et al.*, 2007).

Los compuestos fenólicos en las frutas maduras contribuyen fuertemente a la calidad organoléptica, en atributos tales como color, astringencia, amargor y aromas (Dergal, 2005).

1.6. Los procesos de deterioro oxidativo.

1.6.1 Daño oxidativo por efecto de bajas temperaturas.

La fruta almacenada en una cámara, por efectos de la continua exposición a bajas temperaturas, presenta normalmente un incremento en la cantidad de especies reactivas al oxígeno tales como O_2^- y H_2O_2 . La acumulación de estas EROs provoca un estrés oxidativo que contribuye al envejecimiento celular y que puede desembocar en graves desórdenes a nivel de las membranas celulares. Este estrés oxidativo se produce porque existe una continua exposición a agentes oxidantes y/o la capacidad antioxidante va disminuyendo en el tiempo (Lurie y Watkins, 2012; Bussato *et al.*, 2014).

Los daños principales son la peroxidación de los lípidos, desnaturalización y/o destrucción de las proteínas integrales de membrana, que pueden determinar incluso la muerte celular, por desorganización de los compartimientos celulares y de la propia membrana plasmática (Mittler, 2002; Del Río *et al.*, 2005; Chiriboga *et al.*, 2013).

El daño observado en la escaldadura superficial es en última instancia visible por la muerte de las células epidérmicas del fruto (Shaham *et al.*, 2003; Chiriboga *et al.*, 2008; Lu *et al.*, 2011). La acumulación de EROs, se correlacionaría fuertemente (unido a la producción de etileno y α -farnesenos), con el nivel de severidad de la escaldadura superficial (Yazdani *et al.*, 2011; Mditshwa *et al.*, 2016).

Las atmósferas de bajo (LO) o ultra bajo oxígeno (ULO), donde el daño oxidativo puede reducirse o ser controlado, marcarían una excepción a la acumulación de EROs, constituyéndose entonces en una alternativa para disminuir la escaldadura superficial (Toivonen, 2004).

Otro mecanismo que contribuye a la formación de especies reactivas al oxígeno en frutas expuestas al frío es la disrupción en la cadena de electrones en la mitocondria que puede llevar a la generación de radicales superóxido (Purvis, 1997; Halliwell, 2006).

1.6.2. Escaldadura superficial (ES).

Esta fisiopatía es la principal causa de pérdida de valor comercial de algunas variedades de peras y manzanas que son susceptibles en la conservación a mediano y largo plazo (Anet, 1972; Du y Bramlage, 1994; Shaham *et al.*, 2003; Pechous *et al.*, 2005; Whitaker *et al.*, 2009; Rudell *et al.*, 2009; Lurie y Watkins, 2012; Bussato *et al.*, 2014).

Beurrè D' Anjou' tolera muy bien el almacenamiento refrigerado pero es la variedad de pera más afectada (Chen y Spotts, 2005, Gapper *et al.*, 2006; Whitaker, 2007, Calvo *et al.*, 2015) seguida de 'Packhams Triumph', por ser aquellas de más larga conservación (Calvo y Candan, 2011).

Aún no están completamente develados los mecanismos bioquímicos de su formación, ya que diversos factores interactúan combinados de manera compleja, en esta alteración de origen oxidativo. En general, se asocia un mayor contenido de antioxidantes, como α -tocoferol, el ácido ascórbico, compuestos fenólicos y los carotenoides con la resistencia a su desarrollo (Anet, 1974; Toivonen, 2004; Vilaplana *et al.*, 2006; Lurie y Watkins, 2012).

El daño se evidencia como manchas oscuras en la piel, con bordes irregulares, sin comprometer la pulpa. Los síntomas se producen en las primeras capas de células (Foto 3). Ocurre luego de un lapso mínimo de 3-4 meses de conservación a bajas temperaturas y aparece generalmente luego de exponer la fruta a temperatura ambiente, durante la llamada vida en estante (Calvo y Candan, 2011). La clasificación del nivel de daño (severidad) se establece en base el porcentaje de piel comprometida (ver Foto 12). Si se prolonga el tiempo de almacenamiento, se oscurece el color, aumenta tanto la superficie de las manchas como la cantidad de fruta afectada hasta que la totalidad de los frutos terminan escaldados. En las etapas finales, la superficie de la fruta se torna rugosa y puede afectar células corticales (Zhao *et al.*, 2016).



Foto 3. A. Síntomas externos de escaldadura en peras Beurrè D'Anjou. **B.** Síntomas de escaldadura en pera Packhams Triumph, con detalle de pulpa.

Otro daño en peras similar, lo constituye la escaldadura por senescencia que puede comprometer la pulpa del fruto y se manifiesta en peras almacenadas por más de 6-7 meses en frío común.

La causa de la ES es la oxidación de un componente natural de la piel de los frutos: el α -farneseno que resulta proporcional a la severidad del síntoma (Lurie y Watkins, 2012; Calvo, 2012b). Este desorden ocurre en dos etapas consecutivas (Lurie y Watkins, 2012). El proceso comienza en precosecha con la síntesis de precursores que se convertirán en cámara en el α -farneseno en presencia de etileno (Du y Bramlage, 1994), posteriormente se oxidará a compuestos altamente tóxicos, denominados trienos conjugados (TC) los cuales dañan las células provocando su muerte. La ocurrencia de este proceso requiere de la disponibilidad de oxígeno (Isidoro y Almeida, 2006) (Figura 11).

El α -farneseno (3,7,11-trimetil-1,3,6,10-dodecatetraeno), es un sesquiterpeno, cuya síntesis es inducida por frío, posiblemente mediante una activación de los genes respectivos y se acumula en la cutícula cerosa (Gapper *et al.*, 2006).

Los cultivares de peras y manzanas susceptibles a escaldadura exhiben una alta tasa de síntesis, dependiente de etileno, unas semanas después de iniciar el almacenamiento a bajas temperaturas (Sharam *et al.*, 2003; Whitaker, 2007). Las temperaturas, cercanas a la de congelación del fruto también debilitan los mecanismos antioxidantes de los tejidos de las plantas (Chiriboga *et al.*, 2013) y cuando la actividad antioxidante de la cutícula decrece, permite la oxidación del α -farneseno a trienos conjugados. Estos permanecen en la cutícula dado que son no-volátiles, y luego se oxidan liberando uno o más volátiles tóxicos para la planta (Gapper *et al.*, 2006, Whitaker, 2007, Whitaker *et al.*, 2009; Yasdani *et al.*, 2011; Bussato *et al.*, 2014).

Los trienos conjugados son moléculas complejas isómeros del 2,6,10-trimetyldodeca-2,7,9,11-tetraen-6-ol, que oxidados producen nuevos compuestos más volátiles que el α -farneseno, como el 6-metil-5-hepten-2-one (MHO), molécula muy tóxica, a cuya producción algunos investigadores atribuyen el rápido desarrollo de los síntomas de escaldadura cuando la fruta se retira del frío (Lurie y Watkins, 2012).

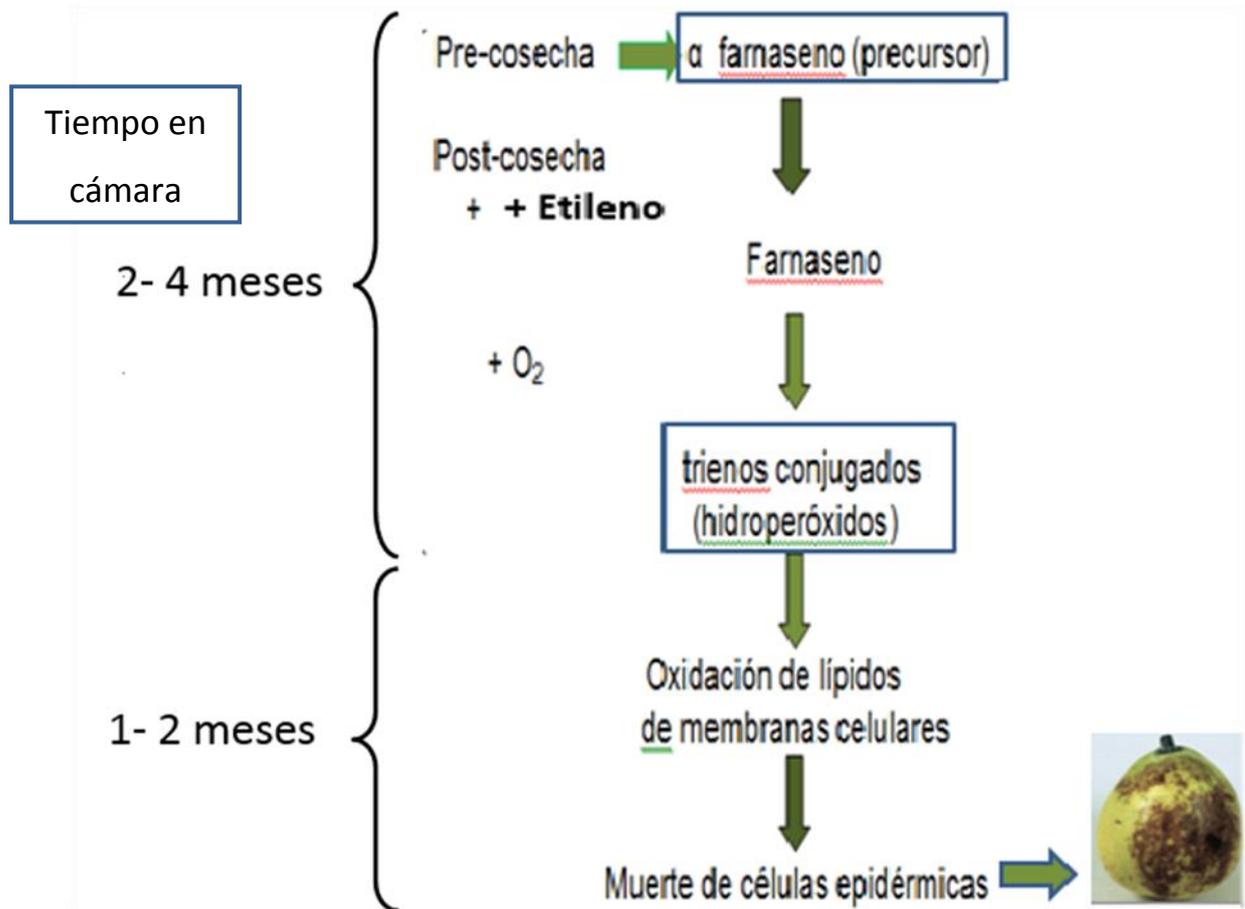


Figura 11. Esquema de desarrollo de la escaldadura superficial.

Numerosos factores influyen en la expresión de la fisiopatía: (i) características fisiológicas: el cultivar, la concentración de antioxidantes tanto en piel como fruto entero (Anet, 1974; Frank et al, 2007) y el estado de madurez (Villalobos *et al.*, 2011; Calvo *et al.*, 2015) son los más relevantes aunque también se mencionan el tamaño y coloración de la epidermis, donde frutos de coloración verde son más sensibles (Xie *et al.*, 2014); (ii) características ecológicas y ambientales: región y/o temporada; la sumatoria de temperaturas superiores a 10°C el mes previo a cosecha, climas cálidos y secos y/o temperaturas elevadas, aumentan la incidencia (Villalobos *et al.*, 2009); (iii) características de manejo: temperatura de almacenamiento, acumulación de etileno, modificación de la atmósfera (controlada tradicional o dinámica, ACD) (Xie *et al.*, 2014); humedad relativa (cuanto más elevada, mayor incidencia); ventilación y movimiento de aire en el almacenamiento (mayor ventilación, evapora los α -farnesenos y disminuye oxidación) y tiempo de almacenamiento (cuanto más se extiende, mayor incidencia y severidad) (Calvo, 2012).

1.6.3. Control de la escaldadura en peras. Rol del 1-MCP .

Las cámaras de atmósfera controlada (ULO y ACD) que ayudan a la eliminación del etileno y al mantenimiento de concentraciones bajas de O₂, son alternativas eficientes para disminuir o aplazar en tiempo la incidencia de la escaldadura (Lurie y Watkins, 2012).

En las peras 'D'Anjou', la ES se controló con éstas tecnologías aunque el tratamiento se asoció con el desarrollo de pecas, aparición de corazón pardo e insuficiente reblandecimiento después de almacenamiento prolongado (8 meses) (Mattheis y Rudell, 2011). Las pecas negras (black speck), son puntos marrones que se desarrollan al azar sobre la piel de los frutos. Esta variedad es particularmente sensible a la fisiopatía, en un almacenamiento prolongado en AC, siéndolo aún más cuando las atmósferas tienen menos de 1,5% de O₂ (Calvo y Candan, 2011).

La utilización de ACD en peras en el Alto Valle, redujo significativamente la incidencia de ES y mantuvo el color verde, sin interferir en el normal proceso de maduración durante la vida en estante. Sin embargo, el desarrollo de cavernas en el cultivar Beurré D'Anjou hace que esta tecnología sea insegura si no pueden garantizarse niveles muy bajos de CO₂ (Calvo, 2012a).

Otra estrategia muy eficiente para controlar la ES, consiste en la aplicación en poscosecha de antioxidantes como la DPA (difenilamina) y la etoxiquina (6-etoxi-2,2,4-trimetil-1,2- dihidroquinolina), que han sido usados por décadas en peras y manzanas. La exigencia de productos libres de residuos químicos en muchos países incluida la Unión Europea limita y/o prohíbe, la utilización de DPA desde el año 2012. La etoxiquina se emplea específicamente en peras y también tiene uso restringido en varios países. La aplicación de otros antioxidantes alternativos como la vitamina E (α tocoferol) y C, butil-hidroxitolueno (BHT) y aceite mineral, en formas líquidas o impregnados en papeles son mucho menos efectivas (Calvo y Candan, 2011).

Una tecnología alternativa aceptada con éxito es el uso del 1-MCP, que bloquea los receptores y la producción autocatalítica del etileno durante la conservación en frío (Chiriboga *et al.*, 2012), exhibiendo un efecto muy beneficioso para atenuar o evitar la aparición de ES. Ha demostrado ser efectivo en su control en diferentes variedades de peras (Argenta *et al.*, 2003; Gapper *et al.*, 2006; Isidoro y Almeida, 2006; Gamrasni *et al.*, 2010; Calvo y Candan, 2012a; Calvo, 2012a; 2013; Chiriboga *et al.*, 2014; Xie *et al.*, 2014; Vanoli *et al.*, 2016) y en manzanas sensibles (Red Delicious y sus clones y Granny Smith), siendo una tecnología mucho más usada en éstas frutas (Lafer, 2005; Rizzolo *et al.*, 2005; Isidoro y Almeida, 2006; Guillén, 2009; Chiriboga *et al.*, 2008; 2013; Candan y Calvo, 2014; Calvo *et al.*, 2015).

En peras, el control de la escaldadura es muy dependiente de la dosis aplicada y de la variedad y puede resultar completo o parcial e incluso menor al que se obtendría en una AC. Se postula que es más efectivo en las variedades con tasas de producción de etileno más bajas. (Chiriboga *et al.*, 2013; Xie *et al.*, 2014). Las variedades D'Anjou, Packams Triumph, Bartlett, Rocha y Conference han sido las más estudiadas (Chiriboga *et al.*, 2014).

Un dilema que plantea el uso de dosis iguales o superiores a 300 nL/L para controlar totalmente la ES en peras, es la incapacidad que tienen los frutos tratados de alcanzar la madurez de consumo dentro de un tiempo razonable de vida en estante. El alto efecto residual del tratamiento no se disipa fácilmente y los frutos mantienen una firmeza y color característicos del estado inmaduro (Ekman *et al.*, 2004; Calvo, 2012 a,b) siendo ello muy variable en función de las variedades. Así, dosis desde 400 nL/L hasta 600 nL/L en Williams, requirieron de 20 días a temperatura ambiente luego de un período de 90 días en cámara; mientras que la maduración se inhibió completamente en D'Anjou y Packham's dentro de los 90 a 150 días. D'Anjou necesitó 15 días para madurar después de 7 meses u 11 días después de 9 meses de almacenamiento, en tanto Packham's no logró madurar en ese tiempo (Calvo, 2004a).

Ello hace necesario poner a punto estrategias de reversión de madurez, como la aplicación simultánea de etileno, aplicación de dosis bajas combinadas con AC o cambios en la temperatura de la cámara. Trincherro *et al.* (2004) y Xie *et al.* (2014), trabajando con D'Anjou, encontraron que los frutos almacenados a 1,1 °C en lugar de los -1,1 °C convencionales, tratados con 150 ppb de 1-MCP maduraban normalmente después de 6-8 meses de cámara. Previamente Sugar y Einhorn (2011), habían comprobado que esta variedad recuperaba la madurez más rápido cuando se almacenaba a 5 o 10° C durante 30 días, pero aún no se han encontrado a nivel comercial respuestas satisfactorias a ese problema (Calvo *et al.*, 2016a).

Se especula que el control de la ES está relacionado con el mantenimiento del sistema antioxidante de los frutos (Rudell *et al.*, 2009; Lurie y Watkins, 2012), pero ello no ha sido demostrado aún. En el caso del 1-MCP, no se sabe si parte de su mecanismo de control de la ES podría explicarse por una acción protectora sobre los mecanismos y/o metabolitos antioxidantes.

2. HIPOTESIS DE TRABAJO:

El 1-MCP aplicado en poscosecha contribuye a atenuar el daño por escaldadura superficial en peras 'Beurrè D'Anjou' sometidas a estrés por bajas temperaturas, debido a que mantiene el sistema antioxidante.

3. OBJETIVOS

3.1 General.

Determinar el efecto del 1 MCP sobre la capacidad antioxidante de peras Beurrè D'Anjou almacenadas a bajas temperaturas y su relación con el desarrollo de la escaldadura superficial.

3.2 Específicos.

1. Estudiar el impacto del 1-MCP sobre la producción de etileno, la maduración y el desarrollo de escaldadura superficial en peras Beurrè D'Anjou.
2. Estudiar el efecto de las bajas temperaturas y del tratamiento con 1-MCP sobre la dinámica de los α -farnesenos y de los trienos conjugados, como metabolitos primordiales del daño oxidativo asociado a la escaldadura superficial de peras Beurrè D'Anjou.
3. Evaluar la capacidad antioxidante de peras Beurrè D' Anjou almacenadas a bajas temperaturas y el efecto que tiene sobre ellas el tratamiento con 1-MCP.
4. Determinar la relación entre la capacidad antioxidante del fruto y el desarrollo de síntomas de escaldadura superficial en peras Beurrè D' Anjou con o sin tratamiento de 1-MCP.

4. MATERIALES Y MÉTODOS:

4.1 Material Vegetal.

Para la investigación, se emplearon peras de la variedad 'Beurrè D' Anjou', provenientes de una chacra comercial localizada en el Alto Valle, localidad de General Roca, provincia de Río Negro (39° 01' 00" S; 67° 40' 00" W; altitud 242 m.s.n.m.) (Figura 12).

Las plantas de las cuáles se obtuvo la fruta de los ensayos, pertenecen a un monte de más de 10 años de antigüedad, plantadas a 4 x 2 metros sobre pie franco, con conducción en espaldera y sometidas a los tratamientos convencionales y recomendados como oportunos para la variedad en la zona.

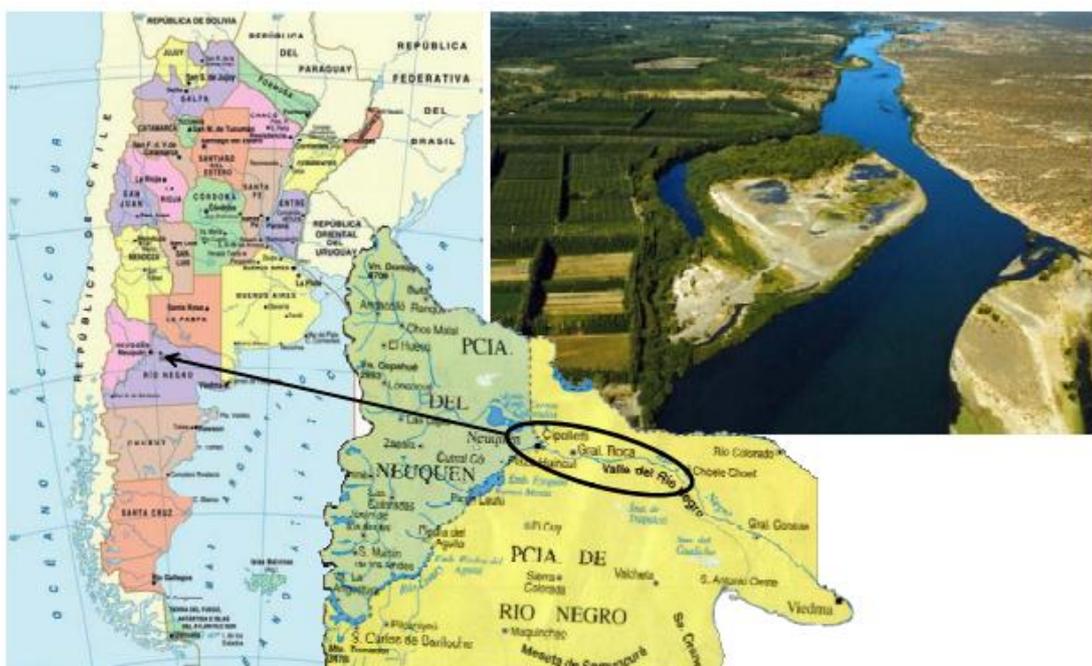


Figura 12. Región del Alto Valle de Río Negro y Neuquén, y ubicación de la localidad de General Roca.

Las experiencias se realizaron en las temporadas 2013 y 2014, con fruta con un grado óptimo de madurez para la variedad, referido principalmente a la firmeza de pulpa que corresponde a 6-6.5 kg/cm². Bajo esta premisa, la cosecha se realizó el 07 de febrero para la primera temporada del ensayo (Foto 4) y el 10 de febrero para la segunda.

La fruta se cosechó en bines que fueron tratados en un drencher con fungicidas de post cosecha aplicando: Captan (Captan 50, Bayer) en una concentración de 180 g/100L de agua e Iprodione (Rovral 50PH, Bayer) en una concentración de 100 g/100L de agua. Luego, y siguiendo criterios de calidad externa, se efectuó una selección manual de los frutos para homogeneizar tamaños y eliminar aquellos que presentaban defectos hasta obtener dos lotes homogéneos: uno que no recibió tratamiento (“Control”) y otro que se trató con 1-MCP (1-metilciclopropeno), marca comercial SmartFresh® (AgroFresh de Rohm & Haas, USA).

El tratamiento se aplicó en el día de la cosecha. Para efectuarlo se utilizó un contenedor de acero inoxidable de 0,86 m³, donde se colocó un frasco con 0,14 g de SmartFresh® (0,14% de ingrediente activo) en polvo, a fin de liberar una dosis de 1-MCP equivalente a 300 ppb al añadir 40 mL de agua caliente a 40°C. La dosis utilizada es la recomendada a nivel comercial

en esta especie. El contenedor fue sellado herméticamente y ventiladores dentro del mismo aseguraron una adecuada distribución del gas. El tratamiento de los frutos se realizó durante 24 horas a una temperatura de 0°C (Foto 5).

Tanto los controles como la fruta tratada se embalaron en medias cajas de cartón con 2 bandejas de pulpa moldeada de 20 frutas cada una y se colocaron bolsas de polietileno de baja densidad (PEBD) micro perforadas de 25 µm de espesor. Los frutos se almacenaron luego en una cámara de frío convencional del área Postcosecha del INTA Alto Valle a -0,5°C y 95% HR durante 240 días.



Foto 4. Fruta sin seleccionar. Cosecha 07/02/13



A



B

Foto 5. **A.** Contenedor de tratamiento. **B** Detalle con la fruta

4.2 Medición de índices de madurez en la pera.

Los índices de madurez se tomaron al momento de la cosecha (día 0) y después de 30, 60, 90, 120, 180, 210 y 240 días tanto a salida de cámara como después de 7 días de vida en estante a 20°C.

4.2.1 Degradación de almidón: Según prueba del índice de yodo. Se realizó al momento de la cosecha, sobre 5 repeticiones de 20 frutos cada una, tomando una rodaja de 1-1,5 mm de espesor de la zona ecuatorial de cada fruto e introduciéndola en una solución de Lugol (formulada con 10 g de iodo metálico + 40 g de ioduro de potasio/litro de solución). Luego se determinó el porcentaje de degradación de almidón en forma cualitativa por comparación visual con cartas varietales desarrolladas por INTA Alto Valle (2010).

4.2.2 Firmeza de la pulpa: Se determinó sobre 5 repeticiones de 20 frutos cada una con un presiómetro electrónico (FTA-GS14, Güss, Sudáfrica), dotado de un émbolo de 8 mm de diámetro que penetra 9 mm (Foto 6). Se obtuvieron dos medidas por fruto tomadas en dos puntos opuestos del plano ecuatorial luego de remover la piel. Se tomó como valor el promedio de esas dos mediciones. Se expresó en libras (lb).



Foto 6. Presiómetro electrónico. Laboratorio de poscosecha. INTA Alto Valle

4.2.3 Contenido de sólidos solubles (CSS): Se determinó sobre 5 repeticiones de 20 frutos cada una. Para su determinación se obtuvo el jugo de la zona ecuatorial de todos los frutos de cada repetición mediante una juguera. El porcentaje de sólidos solubles (%) se obtuvo mediante el análisis del jugo en un refractómetro electrónico autocompensado (PAL-1, Atago, Japón) (Foto 7).

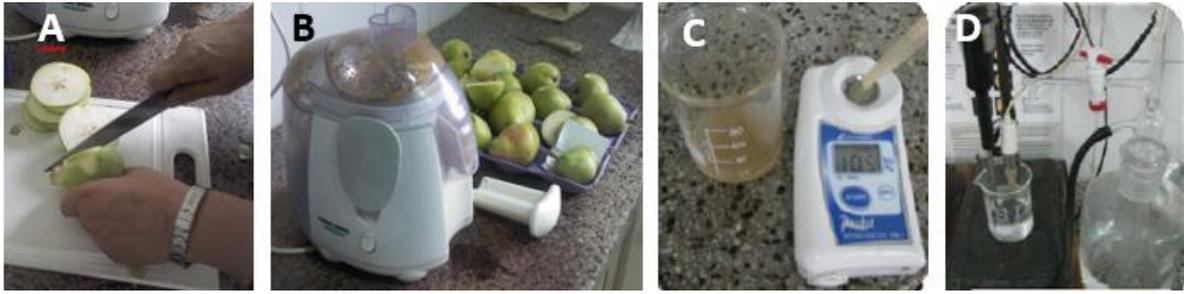


Foto 7. A y B. Obtención del jugo de los frutos para la determinación del contenido de sólidos solubles y acidez titulable. **C.** Determinación de los sólidos solubles con un refractómetro digital PAL. **D.** Determinación de la acidez mediante la titulación del jugo de los frutos con NaOH 0,1N. Laboratorio de poscosecha. INTA, Alto Valle.

4.2.4 Acidez titulable (AT): Se determinó sobre 5 repeticiones de 20 frutos cada una. Para su determinación se obtuvo el jugo de la zona ecuatorial de todos los frutos de cada repetición mediante una juguera. La acidez titulable se obtuvo mediante la titulación de 10 mL de jugo con NaOH 0,1N hasta pH 8,2. La cantidad de mililitros de NaOH utilizados en la titulación se multiplica por un factor de 0,067 para obtener el contenido de g/L de ácido málico (Foto 7, D).

4.2.5 Color de la epidermis: Se realizó una lectura promedio de los 20 frutos de cada repetición, sobre un total de 5 repeticiones. La medición se efectuó en la zona ecuatorial sobre la piel limpia con un paño, para eliminar la capa de pruina, donde no se presentaba “asoleado”. Se determinó con un colorímetro triestímulo portátil (CR-400, Minolta, Japón) (Foto 8).

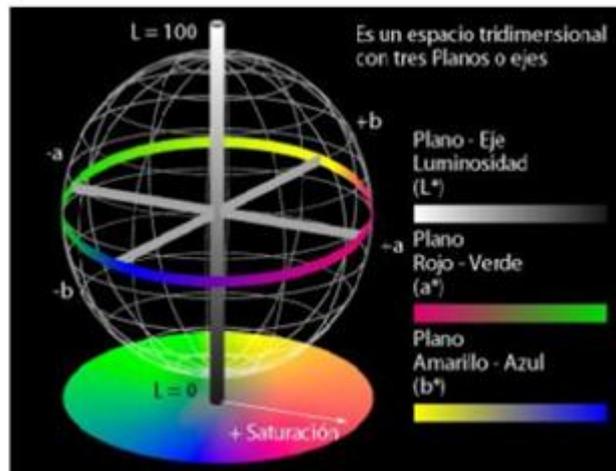


Foto 8. Medición del color de los frutos con colorímetro. **Figura 13.** Espacio de color CIELAB

La cromaticidad se obtuvo en las coordenadas espaciales del color CIELAB (L^* , a^* , b^*), donde L^* mide el valor o brillo de la muestra en una escala del 1 al 100 (0 es negro y 100, blanco), a^* los valores del verde al rojo (en escala -60 a +60), b^* los valores del azul al amarillo (en escala -60 a +60). Los tres valores combinados permiten englobar la percepción total del observador para lo cual se calcula el ángulo de tono o matiz "hue" (H°), [arctangente (b^*/a^*)] (HunterLab e Izasa, 2001), $H^\circ > 105$: verde; $H^\circ = 95-105$ amarillo verdoso; $H^\circ < 95$ amarillo (Figura 13).

4.3 Producción de etileno.

El etileno se determinó sobre 5 repeticiones de 1 fruto cada una luego de 0, 15, 30, 60, 90, 120, 180, 210 y 240 días de conservación a $-0,5^\circ\text{C}$, el día de la salida de cámara (día 0) y durante 30 días de vida en estante de los frutos a 20°C . Cada fruto se colocó en un frasco de 1,5 L de capacidad el cual se cerró herméticamente. Después de 30 minutos de encierro se tomó una muestra de 1 mL de aire obtenido del espacio de cabeza.

La concentración de etileno se determinó mediante la inyección de la muestra de 1 mL en un cromatógrafo de gases (GC14-A, Shimadzu, Japón) equipado con un detector FID (240°C) y con una columna de alúmina activada (40°C). Se utilizó helio como gas transportador (Foto 9).

Se calculó la producción de etileno y se construyeron las curvas de producción de etileno a 20°C , sobre las cuales se estableció el periodo de demora (tiempo hasta lograr valores de producción superiores a 1 nL/g/h) y la ocurrencia y magnitud del pico climatérico (máximo valor alcanzado).

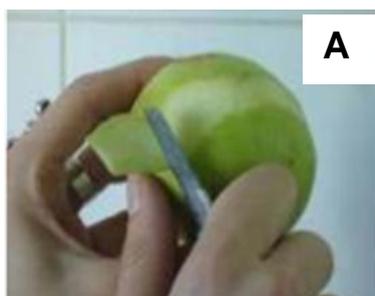


Foto 9. Medición de etileno. Cromatógrafo de gases. Frutas dentro de los frascos con cierre hermético

4.4 Medición del contenido de alfa-farnesenos (AF) y trienos conjugados (TC).

Se utilizó para caracterizarlos, la metodología por espectrofotometría descrita por Shaham *et al.* (2003) con modificaciones.

Las determinaciones se realizaron a 5 repeticiones de 10 frutos cada una, luego de 0, 15, 30, 60, 90, 120, 180, 210 y 240 días a $-0,5^{\circ}\text{C}$. Se sacó una tira de piel de la zona ecuatorial de 2 mm de espesor y se extrajeron 5 discos de esa tira, utilizando un sacabocado de 10 mm de diámetro. Luego los discos fueron sumergidos en 10 mL de hexano de grado cromatográfico durante 10 minutos, con agitación a 245 rpm. Se diluyó 1 mL de la solución del extracto en 4 mL de hexano puro y dichas diluciones se midieron en un UV-Espectrofotómetro Lambda 25, Perkin Elmer, utilizando como blanco la lectura del hexano puro, que no debe ser mayor a 0,1 de absorbancia (Foto 10).



Se sacó una tira de piel de la zona ecuatorial del fruto



Se cortaron 5 discos de 10mm de diámetro



Los discos se sumergieron en vasos de precipitados con hexano por 10 minutos, con agitación



Se retiró 1mL de muestra concentrada de cada uno de los vasos de precipitados



La muestra concentrada se diluyó en un tubo de ensayo con 4 mL de hexano puro



Se realizó la lectura del blanco (hexano puro) y de la muestra diluida sobre un volumen de 5 mL en cubeta de cuarzo

Foto 10. A- F. Pasos para la extracción y cuantificación de α -farnesenos y trienos conjugados.

Se leyó a 5 longitudes de onda: 232, 258, 269, 281 y 290. Según el protocolo de descrito por Anet (1972), los AF se cuantificaron a 232 nm (DO_{232}), utilizándose un

coeficiente de extinción de $E_{232} = 27.700$ y los trienos conjugados (TC) fueron registrados como $TC_{258} = DO_{258-290}$; $TC_{269} = DO_{269-290}$ y $TC_{281} = DO_{281-290}$. El coeficiente de extinción promedio para los TC fue de $E = 25.000$. Ambos se expresaron como $nmol/cm^2$ de superficie de fruto.

4.5. Medición de antioxidantes

4.5.1 Actividad antioxidante total (DPPH)

La técnica del DPPH es una de las más utilizadas para determinar la capacidad antioxidante total en alimentos. Se basa en la transformación del 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH), una sustancia de color azul-violeta con un electrón desapareado, en la 2,2-difenil-1-picril hidrazina de color amarillo pálido, por reacción con compuestos antioxidantes, que contengan grupos $-OH$. Esto es medido y por diferencia de absorbancia se determina el porcentaje de capacidad antioxidante de dicho radical libre (Kondo *et al.*, 2002; Gonzalez *et al.*, 2007). (Figura 12).

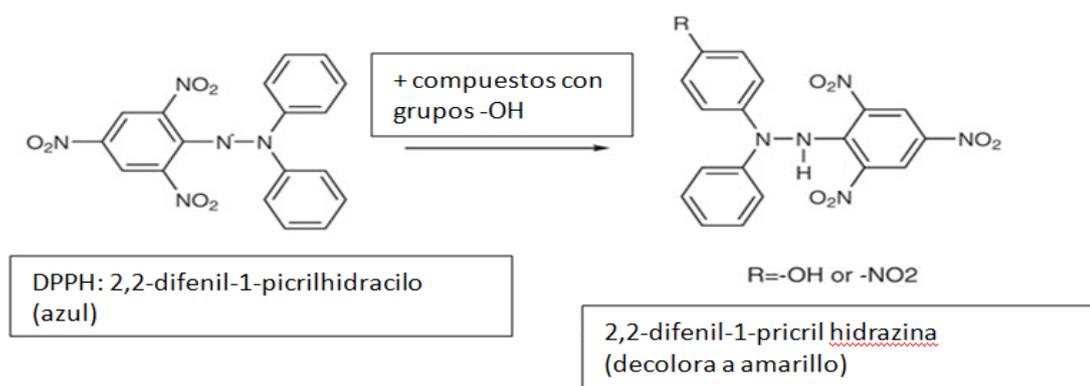


Figura 12. Reacción colorimétrica de determinación del DPPH.

Se determinó sobre 15 frutos, 5 repeticiones de 3 frutos cada una, luego de 0, 30, 60, 90, 120, 180, 210 y 240 días a $-0,5^{\circ}C$. Se extrajeron tiras de toda la piel del fruto que fueron congeladas con nitrógeno líquido, posteriormente liofilizadas (Liofilizador L-T-16, Rificor, Argentina), trituradas y homogeneizadas hasta obtener un polvo fino, mediante un molinillo eléctrico. Para la extracción de la muestra, se pesaron 0.1 g del polvo liofilizado y se lo colocó en un eppendorf de 2.5 mL al que se le añadió 1,7 mL de la solución extractante (795 mL de metanol puro y 5 mL de HCl al 32%). Se cubrieron con papel aluminio y se los llevó a un agitador mecánico durante 2 h a 250 rpm. Luego se centrifugaron a 24.000 g durante 20 min (Equipo 5415D, Eppendorf) a $20^{\circ}C$ y se extrajo el sobrenadante en un eppendorf de 1,5 mL. Se realizó después una dilución de los mismos 1:4, tomando 40 μL del extracto en 120 μL de agua bidestilada. Para la medición en el espectrofotómetro se procedió a realizar un

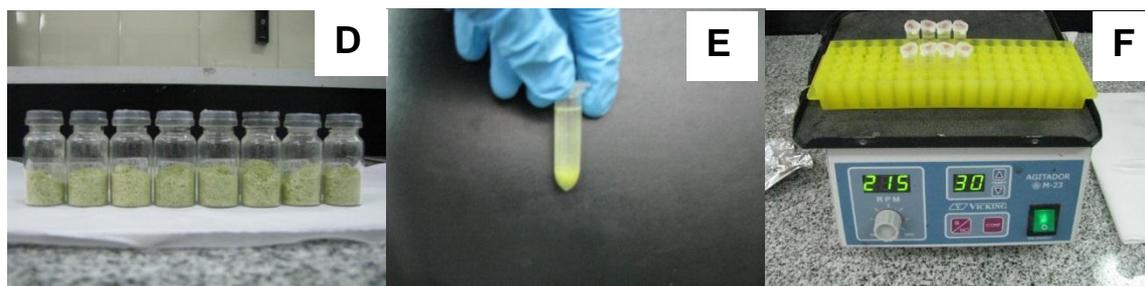
blanco con agua bidestilada. Para determinar la absorbancia inicial (A_i), se colocaron 780 μL de solución de DPPH (Sigma-Aldrich, Germany, con una concentración 100 mM disueltos en metanol) dentro de la cubeta semimicro más 20 μL de agua bidestilada y para obtener la absorbancia final (A_f) se toman 780 μL de solución DPPH más 20 μL de la dilución de muestra previamente realizada. El tiempo es un parámetro crítico en la lectura, por ello las cubetas se mantuvieron durante 30 minutos en oscuridad a 4 °C aproximadamente. La lectura se hizo a los 516 nm empleando un Espectrofotómetro UV Milton Roy 1001-Plus.USA (Foto 11).



Quitar la piel del fruto.

Realizar el procedimiento de liofilización.

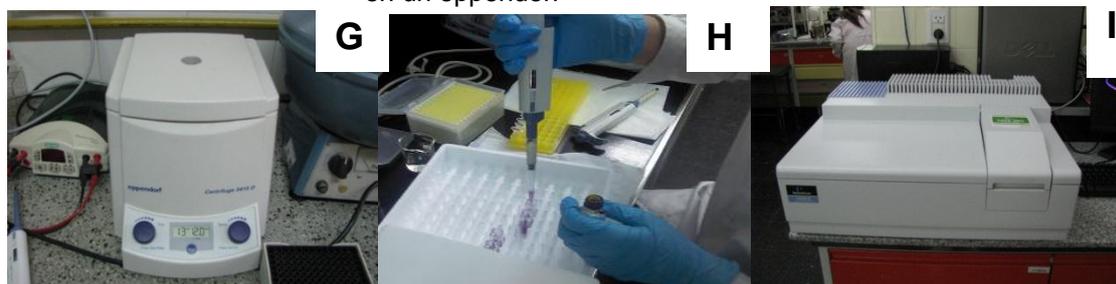
Congelarla con N_2 líquido



Reducir a polvo la muestra.

Pesar 0,1 g de polvo y agregar 1,7 mL de solución extractante en un eppendorf

Agitar 2 horas a 250 rpm



Centrifugar 20 min. a 24.000 g
Separar el sobrenadante

Diluir de 40 μL de extracto en 120 μL de agua bidestilada.
Tomar 20 μL de la dilución + 780 μL de solución DPPH en cubetas de cuarzo

Incubar en heladera a 4°C durante 30 min.
Leer en espectrofotómetro a 516 nm

Foto 11. Secuencia (A-I) de procedimientos para la determinación de actividad antioxidante total (DPPH).

El cálculo de la actividad antioxidante se expresó como % de inhibición del radical y corresponde a la siguiente expresión:

$$\% \text{ inhibición} = (A_i - A_f) / A_i * 100$$

Siendo (Ai) y (Af), la absorbancia inicial y final respectivamente.

Bajo estas condiciones un aumento en el porcentaje de inhibición de la oxidación del DPPH se corresponde con un aumento de la actividad antioxidante total (Calvo *et al.*, 2015).

4.5.1. Metabolitos antioxidantes.

4.5.2.1 Acido ascórbico (AA)

Es la técnica más ampliamente usada para su cuantificación, se basa en la reacción de reducción producida por el ácido ascórbico presente en la muestra sobre el colorante 2,6-diclorofenolindofenol (DIP), usada por Loeffler y Ponting (1942) con modificaciones (Figura 13).

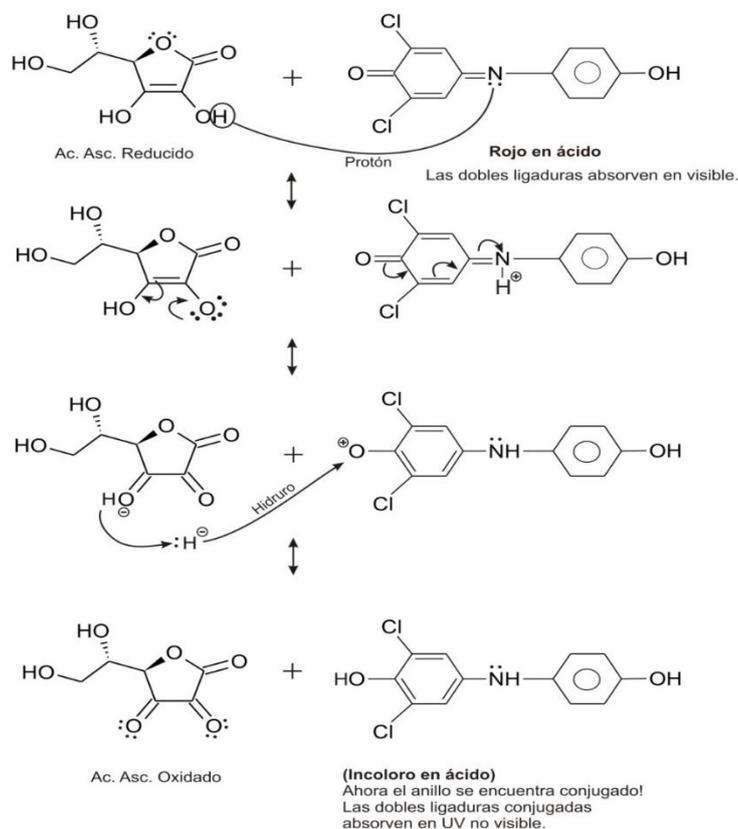


Figura 13. Esquema de la reacción del ácido L-ascórbico con el DIP

Cuando todo el ácido ascórbico se ha oxidado a ácido dehidroascórbico, el DIP en exceso y en medio ácido, colorea la solución de rosa. Mediante una lectura espectrofotométrica a una longitud de onda de 520 nm, se cuantifica el colorante que no reaccionó y a través de una curva de calibrado es posible cuantificar la cantidad de ácido ascórbico presente en la muestra.

Para la determinación de vitamina C se utilizó una solución de DIP 23 mg/L, que se estandarizó preparando 3 tubos de 10mL con 1 mL de ácido ortofosfórico H_3PO_4 , al que se le agregan 9 mL de agua al que se toma como blanco (100% de transmitancia) y 9 mL de DIP a los dos restantes, que usamos para medir la transmitancia a 520nm (debe ser aproximadamente 30%).

La medición se hizo sobre tejido proveniente de la piel de los frutos, tomados de la parte no expuesta de los mismos. Se limpiaron los frutos con papel. La determinación se hizo sobre 15 frutas divididas en 3 repeticiones de 5 frutas cada una. Se midió a cosecha (0 día), 30, 60, 90, 120 y 240 días. Para la preparación de la muestra se procedió a extraer piel de las frutas con un pelapapas y se las pesó (aproximadamente se tomaron 5 g iniciales), luego se introdujeron en 40 mL de una solución de H_3PO_4 al 1% (esta solución protegió al ácido ascórbico de la degradación). Se trituraron con un mixer y se separó el sobrenadante realizando un filtrado. Posteriormente se tomó una relación 1: 9 mL de filtrado/ agua (para el blanco) y la misma relación con DIP para la lectura de la transmitancia.

Para realizar la curva de calibración se tomaron alícuotas de 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 y 1 mL de una solución madre (50 mg de Ac Ascórbico en 10 mL de H_3PO_4 al 1%), en matraces de 100 mL que se llevaron a volumen con la solución de H_3PO_4 al 1%, a fin de obtener estándares de concentración de 1 a 5 mg Ac Ascórbico/100mL.

Para la medición se usó 1mL de cada estándar en 9 mL de DIP y se leyeron las transmitancias a un λ : 520 nm.

Para cada determinación del AA en el muestreo, se preparó una curva de calibrado.

4.5.2.2. Polifenoles Totales (PTF)

Para determinar el contenido de polifenoles totales se realizó la técnica de Folin-Ciocalteau (Singleton y Rossi, 1965) con algunas modificaciones (Carbonaro *et al.*, 2002; Rusell *et al.*, 2009) que es ampliamente usada en productos vegetales, incluidas las frutas. El método se basa en que los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteau, a pH básico, dando lugar a una coloración azul susceptible de ser determinada espectrofotométricamente a 765 nm. El reactivo que es el ácido fosfomolibdotúngstico (formado por la mezcla de dos sales: wolframato sódico y molibdato sódico en el medio ácido) es de color amarillo. Este compuesto al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar

a un complejo de color azul intenso, que es directamente proporcional al contenido de polifenoles de la muestra (Figura14).

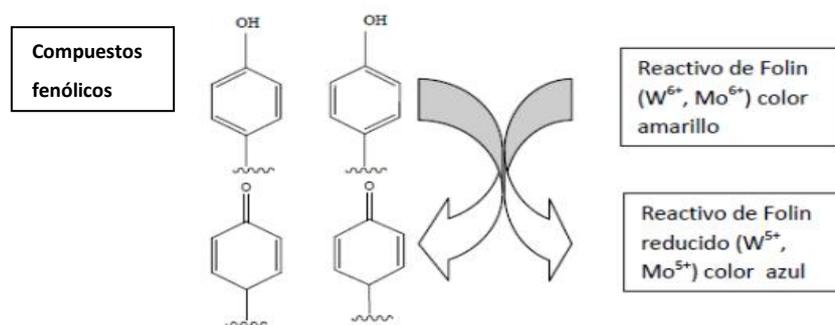


Figura 14 .Mecanismo de acción del reactivo de Folin-Ciocalteu.

Se midió a cosecha (0 día), 30, 60, 90, 120, 210 y 240 días. Se usaron 0.07 g de piel liofilizada triturada (misma técnica de liofilización que en pto 5.1) a la que se agregaron 1.2 mL de solución extractante (metanol acidificado) y se agitaron 2 horas. Luego fueron centrifugados a 11.000 g por 15 minutos, extrayendo el sobrenadante.

En una cubeta de 4.5 mL, se colocaron 1,58 mL de agua destilada, se agregaron 20 µL de la muestra de piel y 100 µL de la solución de Folin-Ciocalteu. Se incubaron durante 8 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Luego se agregaron 300 µL de carbonato de sodio (al 20% p/v). Volvieron a incubarse 2 horas a temperatura ambiente y en oscuridad. La cuantificación se hace por medio de una curva patrón de ácido gálico, graficando concentración de Ac.gálico (mg/L), vs absorbancia. El gálico es un ácido fenólico natural, que presenta una gran solubilidad en agua, por ello es utilizado como estándar.

Los resultados finales se expresaron como miligramos equivalentes de Ácido gálico por 100g (mg AG/100g) de peso en fresco de piel.

4.6 Medición de Daño Oxidativo.

4.6.1 Nivel de Peróxidos lipídicos (MDA):

Para medir la oxidación a nivel de membranas, se determinó el contenido de un metabolito indicador: el malonaldehído (MDA). Se analizó en base a la técnica de Heath y Packer (1968) y Asakawa y Matsushita (1980) incluyendo las correcciones de Du y Bramlage (1992) y Hodges *et al.*(1999) para evitar las interferencias debidas a azúcares y antocianinas respectivamente. La presencia de MDA en las células marca una tendencia del estado en el cual se encuentran las mismas tras sufrir diferentes situaciones de estrés.

Las determinaciones se realizaron sobre 5 repeticiones de una muestra compuesta por tres frutos cada una. Se midió a cosecha (0 día), 30, 60, 90, 150, 210 y 240 días. A cada

fruto se le extrajeron tiras de piel, que fueron congeladas con nitrógeno líquido, liofilizadas y posteriormente molidas con molinillo hasta obtener un polvo homogéneo. Se pesaron 0,12 g del pulverizado en un eppendorf y se disolvieron en 1,4 mL de una solución de Acido Tricloroacético (TCA) al 0,1%. Se centrifugaron a 11.000 g durante 15 min. Del sobrenadante del extracto se tomaron dos alícuotas de 300 µL que se colocaron en sendos eppendorf, uno conteniendo 1,2 mL de TCA al 20% y TBA (Acido TioBarbitúrico) al 0,1% (tubo muestra, A+) y el otro 1,2 ml de TCA al 20% (tubo “blanco”, A-). Los eppendorf fueron tapados con parafilm y colocados en un baño térmico a 95°C por 30 min. Se enfriaron rápidamente con hielo triturado y se centrifugaron nuevamente a 11.000 g durante 10 min. La concentración de MDA se determinó por espectrofotometría (Milton Roy Spectronic 1001 Plus). La absorción de la muestra, se midió en las tres longitudes de onda: 532 nm (corresponde al pico de absorción del producto MDA + TBA), 400 nm (pico de absorción del producto azúcares + TBA) y 600 nm (turbidez no específica) .Por su parte la absorción de la solución del tubo “blanco” se hizo a dos longitudes de onda: 532 nm (pico de absorbancia de las antocianinas) y 600 nm (turbidez).

La concentración de MDA (nmol/mL) se calcula = $[(A - C) - B] / 157.000^a] * 10^6$

$A = A_{+532} - A_{+600}$ para una estimación bruta del MDA

$B = (A_{+400} - A_{+600}) * 0,0571^b$ mide la interferencia por azúcares (sacarosa)

$C = A_{-532} - A_{-600}$ mide la interferencia por antocianinas

Siendo:

A+ absorción de la muestra con TBA y A- de la solución “blanco” sin TBA.

^a: coeficiente de extinción molar del MCA a 532 nm = 157 mM⁻¹cm⁻¹ (Heath yPacker, 1968)

^b: el valor surge de la relación matemática entre los coeficientes de absorción molar de azúcares a dos longitudes de onda diferentes:

Absorción Molar de azúcares a 532 nm = 8,4 (Du y Bramlage, 1992)

Absorción Molar de azúcares a 400 nm = 147

Para expresarlo en base al peso de la muestra:

$MDA (nmol/g) = \frac{MDA (nmol/mL) * volumen de extracción (mL) * dilución}{Peso fresco de la muestra}$

En la técnica empleada:

- volumen de extracción: 1,4 mL (TCA al 0,1%)
- Dilución:5 (1,5 mL de solución final / 0,3 mL de muestra)
- Peso de la muestra 0,12 g liofilizado, equivalente a 0,175 g de piel fresca

4.6.2 Pérdida de electrolitos (Electrolyte leakage-EL)

Se determinó obteniendo la conductividad eléctrica (CE) de una solución acuosa en la que se sumergieron 5 discos de piel, extraídos con un sacabocados de 10 mm de diámetro y un espesor aproximado de 2 mm, por cada fruto, tomados de la parte expuesta y no expuesta de cada uno (Murray *et al.*,1989). La técnica consiste en sumergir los discos en 35 mL de agua destilada utilizando un Foulcot y someterlos a agitación leve por espacio de 1 hora. Allí luego de 5 inversiones manuales se efectúa la primera lectura (CEi), posteriormente se freezan las muestras a -20°C al menos por 24 h, luego se procede a descongelarlas hasta alcanzar la temperatura ambiente (20°C) y realizar una segunda lectura (CEf). Se busca con ello la ruptura absoluta de la membrana y la liberación de todos los electrolitos.

Se hicieron mediciones a los 0,15, 30, 45, 60, 90, 120,180 y 240 días a salida de cámara, sobre 5 frutos para cada tratamiento.

La conductividad relativa (CEr), que se expresa como porcentaje, se determina por medio de la fórmula:

$$CEr = CEi / CEf * 100$$

Donde CEi = conductividad inicial CEf = conductividad final.

4.7 Determinación de la Incidencia y Severidad de escaldadura.

Se realizó sobre 5 repeticiones de 10 frutos cada una luego de 3, 4, 6, 7 y 8 meses a -0,5°C, inmediatamente después de su salida de cámara (0 días) y luego de una maduración de 7 días a 20°C (vida de estante) Las determinaciones se hicieron en forma visual. Se midió la incidencia expresada como el porcentaje de fruta que resulta afectada y la severidad que se clasifica según los siguientes grados: (Foto 12).

- Grado 1 (muy leve): menos de 25% de la superficie total del fruto con manchas.
- Grado 2 (leve): más del 25% y menos del 50% de la superficie total del fruto con manchas.

- Grado 3 (moderada): más del 50% y menos del 75% de la superficie total del fruto con manchas.
- Grado 4 (severa): más del 75% de la superficie total del fruto con manchas.



Foto 12 . Severidad de escaldado superficial en frutos de peras 'Beurrè D'Anjou.

$$\frac{\sum \text{grado de severidad) * (cantidad de frutos por grado)}}{\text{Nº total de frutos}}$$

Se determinó el índice de escaldado superficial (IES) considerando la severidad (Pesis *et al.*, 2009).

4.8 Análisis estadísticos.

Para todas las variables se ejecutó un Análisis de Varianza (ANOVA) teniendo en cuenta los dos tratamientos, para ver interacciones principales utilizando el programa INFOSTAT Professional versión 2006. Las diferencias entre medias se analizaron por medio de los Test de Tukey y de DGC (Prueba de Di Rienzo, Guzmán y Casanoves), cuando no había clara separación de grupos por parte del primero. Ambos con un nivel de significación del 5%, $p < 0.05$.

La escaldadura superficial por ser una variable no continua se analizó a través de un Modelo Lineal Generalizado (MLG) con distribución binomial y función de enlace logit con $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Parámetros de madurez.

5.1.1 Índices de madurez - Temporada 2013

La evolución de estos parámetros se hizo en la temporada 2013 en relación al momento a partir del cual existe la probabilidad de que se manifiesten daños por escaldadura superficial en los frutos, lo cual ocurre a partir de un mínimo de 90 días de almacenamiento.

La cosecha se realizó el día 07 de febrero, cuando a través del Programa de Madurez (INTA), se consideró que estaban dadas las condiciones para una fecha óptima en razón de los índices aplicados para la variedad.

Tabla 1. Índices de madurez de peras Beurrè D'Anjou al momento de la cosecha (7 de febrero de 2013).

INDICES	Valor	+/- DE
Firmeza (lb)	14,19	0,48
Contenido de Sólidos solubles (%)	11,04	0,29
Acidez titulable (g/L)	3,44 ^b	0,27
Color (hue)	118,16	0,43
Índice de almidón (%)	35,6 ^b	4,04
Peso (g)	176,91	21,86

Los valores representan el promedio de 5 repeticiones de 20 frutos cada una \pm desviación estándar (DE) .Las letras representan valores diferentes entre temporadas, según indica el valor del test de Tukey ($p < 0,05$).

Tabla 2. Valores de firmeza, contenido de sólidos solubles (CSS), acidez titulable (AT) y color de la epidermis de peras Beurré D'Anjou al momento de salida de cámara y después de 7 días de vida en estante. Tratadas (1- MCP) y sin tratar (Control).

Días a 0°C	Tratamiento	Firmeza (lb)		CSS (%)		AT(g/L)		Color (hue)	
		0	7	0	7	0	7	0	7
90	Control	13,29 ^a	8,92 ^b	11,77	11,80	3,10	2,46	116,81	115,57 ^b
	1-MCP	12,95 ^b	13,81 ^a	11,40	11,60	2,72	2,81	117,68	118,29 ^a
	Valor de P	0,0157	0,0094	0,4213	0,5844	0,1772	0,0777	0,1712	0,0080
120	Control	12,75	7,06 ^b	11,74	12,00	2,43 ^b	2,93	115,85 ^b	114,16 ^b
	1-MCP	12,63	12,95 ^a	11,70	11,70	2,77 ^a	2,83	118,27 ^a	117,52 ^a
	Valor de P	0,7151	<0,0001	0,8089	0,2248	0,0028	0,4985	0,0013	0,0020
180	Control	11,75 ^b	2,52 ^b	11,54	12,14 ^a	2,13	2,04 ^b	114,18 ^b	107,94 ^b
	1-MCP	13,19 ^a	13,11 ^a	11,48	11,72 ^b	2,20	2,59 ^a	116,94 ^a	116,20 ^a
	Valor de P	0,0005	<0,0001	0,7532	0,0442	0,5137	0,0017	0,0101	<0,0001
210	Control	11,16 ^b	4,64 ^b	11,18	11,52	2,01 ^b	1,59 ^b	112,11 ^b	106,86 ^b
	1-MCP	12,80 ^a	12,58 ^a	11,38	11,90	2,28 ^a	2,22 ^a	116,16 ^a	115,73 ^a
	Valor de P	0,0009	<0,0001	0,4964	0,1090	0,0005	0,0001	0,0015	<0,0001
240	Control	9,89 ^b	3,02 ^b	11,18 ^b	11,70	2,76	1,68 ^b	109,60 ^b	104,37 ^b
	1-MCP	13,40 ^a	12,72 ^a	11,76 ^a	11,84	2,79	2,48 ^a	115,06 ^a	115,00 ^a
	Valor de P	<0,0001	<0,0001	0,0332	0,5510	0,6862	<0,0001	<0,0001	<0,0001

Los valores medios que tienen letras presentan diferencias significativas entre tratamientos según test de Tukey ($p < 0,05$).

Los frutos perdieron firmeza durante el almacenamiento y la vida en estante. Sin embargo, el ablandamiento fue significativamente mayor en los frutos Control que en los frutos tratados con 1-MCP. Considerando que las peras alcanzan una madurez de consumo adecuada cuando su firmeza llega a las 4 lb/pulg² (Guerra y Casquero, 2005) vemos que los frutos Control alcanzaron dichos valores luego de 180 días de frío más 7 de vida en estante. A su vez los 240 días marcan un límite a la vida comercial en relación a la presión en una cámara común ya que se acerca a las 9 lb/pulg², que el Reglamento Mercosur Res.404/98 considera como sobremadura, habiendo perdido un 30% de la firmeza a cosecha. En cambio, la fruta con 1-MCP, si bien disminuyó un poco su firmeza en relación a la cosecha (solo 5%), no llegó a ablandarse durante el periodo evaluado, ni a salida de frío ni durante los 7 días de vida en estante (Tabla 2).

El contenido de sólidos solubles se mantuvo estable en función del tiempo de almacenamiento y no presentó diferencias entre los tratamientos evaluados. En cambio, la acidez titulable disminuyó a medida que se prolongó el almacenamiento y fue

significativamente mayor en los frutos tratados con 1-MCP, principalmente durante la vida en estante a partir de los 180 días de almacenamiento. Al finalizar el ensayo, los frutos Control perdieron un 51% de la acidez de cosecha durante la vida en estante, mientras que los frutos tratados con 1-MCP solo perdieron un 28% (Tabla 2).

Los valores de hue disminuyen respecto de la cosecha indicando que la fruta va perdiendo la intensidad de su color verde, producto de una degradación de las clorofilas de la piel del fruto. Esta disminución fue significativamente menor en aquellos frutos tratados con 1-MCP en casi todas las evaluaciones realizadas tanto a salida de cámara como en la vida en estante. Se observó que el color de los frutos Control en la evaluación de 90 días +7 fue similar al de los tratados en 240 días +7 (Tabla 2).

5.1.2. Seguimiento de los parámetros de madurez que responden significativamente al tratamiento con 1-MCP. Temporada 2014.

En la segunda temporada (2014) se estudió la evolución de los parámetros que resultaron más afectados por la aplicación del tratamiento: firmeza y color. Estos índices son también fundamentales en relación a la comercialización de la pera, ya que su valor fija límites en relación al destino de venta e inciden de manera importante en la apreciación de esta fruta por parte del consumidor (Tabla 4).

Tabla 3. Índices de madurez de peras Beurrè D'Anjou al momento de la cosecha (10 de febrero de 2014).

INDICES	Valor	+/- DE
Firmeza (lb)	14,53	0,40
Contenido de Sólidos solubles (%)	11,46	0,83
Acidez titulable (g/L)	4,42 ^a	0,26
Color (hue)	118,38	0,37
Índice de almidón (%)	47,1 ^a	0,9
Peso (g)	177,06	5,89

Los valores representan el promedio de 5 repeticiones de 20 frutos cada una ± desviación estándar (DE). Las letras representan valores significativamente diferentes entre temporadas, según indica el valor del test de Tukey con (p < 0,05).

La cosecha se realizó el día 10 de febrero, y la fruta presentó valores más altos de acidez y un porcentaje mayor de degradación de almidón en relación al año 2013, no existiendo diferencias en los otros índices (Tablas 1 y 3).

Tabla 4. Firmeza y color de peras Beurrè D'Anjou sin tratamiento (Control) o tratadas con 300 ppb de 1-MCP después de 60, 90, 120, 180 y 240 días de almacenamiento a 0°C al momento de salida de cámara y después de 7 días de vida en estante. Temporada 2014

Días a 0°C	Tratamiento	Firmeza (lb)		Color (hue)	
		0	7	0	7
60	Control	13,39 ± 0,43	11,69 ± 0,42 ^b	118,26 ± 0,48 ^a	118,42 ± 0,53 ^a
	1-MCP	13,51 ± 0,37	13,41 ± 0,27 ^a	116,87 ± 0,30 ^b	117,69 ± 0,33 ^b
	Valor de P	0,6470	0,0001	0,0003	0,0301
90	Control	13,72 ± 0,15 ^b	7,61 ± 1,56 ^b	117,44 ± 0,32	114,84 ± 1,31 ^b
	1-MCP	15,57 ± 0,60 ^a	14,04 ± 0,20 ^a	117,56 ± 0,37	117,45 ± 0,32 ^a
	Valor de P	0,0002	<0,0001	0,6115	0,0028
120	Control	12,92 ± 0,48	4,12 ± 0,70 ^b	116,37 ± 0,93 ^b	112,27 ± 1,58 ^b
	1-MCP	12,83 ± 0,61	13,01 ± 0,47 ^a	118,26 ± 0,50 ^a	117,28 ± 0,76 ^a
	Valor de P	0,7919	<0,0001	0,0085	0,0007
180	Control	11,01 ± 0,42 ^b	2,74 ± 0,34 ^b	115,98 ± 0,54 ^b	109,58 ± 1,95 ^b
	1-MCP	13,67 ± 0,89 ^a	13,14 ± 0,21 ^a	117,24 ± 0,95 ^a	115,93 ± 0,42 ^a
	Valor de P	0,0097	<0,0001	0,1201	0,0053
240	Control	10,71 ± 0,70 ^b	3,41 ± 0,28 ^b	112,63 ± 0,77	105,91 ± 2,08 ^b
	1-MCP	12,94 ± 0,67 ^a	12,84 ± 0,38 ^a	114,19 ± 2,32	113,20 ± 2,01 ^a
	Valor de P	0,0044	<0,0001	0,2012	0,0029

Los valores seguidos por letras distintas presentan diferencias significativas entre tratamientos según test de Tukey ($p < 0.05$).

Al igual que lo observado en la temporada anterior, los frutos tratados con 1-MCP mantuvieron mayores valores de firmeza y de hue que los frutos Control (Tabla 4). La fruta control alcanzó los valores de madurez de consumo a los 120 días +7 días de vida en estante (4,12 lb), 60 días antes que la temporada anterior mientras que los valores de firmeza al final del almacenamiento (240 días) fueron similares entre ambas cosechas a salida de cámara ($p < 0,055$) Por su parte, la fruta tratada con 1-MCP no alcanzó la madurez

de consumo en ninguna de las fechas, ni a la salida de la cámara, ni a los 7 días de vida en estante.

El color de la piel disminuyó a medida que se prolongó el almacenamiento y durante el periodo de vida en estante. Estos cambios fueron más importantes para los frutos control a salida de cámara a los 120 días y 180 días que para los tratados con 1-MCP; los cuales conservaron valores mayores de hue (fruta con color verde más intenso), aunque no hubo diferencias al final del ensayo. La fruta con 1-MCP además, fue más homogénea en color a partir de los 90 días (datos no presentados), y conservaron siempre un verde más intenso en relación a las control cuando fueron colocadas a temperatura ambiente durante la vida en estante ($p < 0,05$) (Tabla 4).

5.2 Producción de etileno.

Temporada 2013

La producción de etileno fue indetectable a cosecha y después de 15, 30 e incluso 60 días en cámara tanto a la salida de frío como después de un mes de vida en estante (jamás superó el valor de 1nL /g.h que es el límite establecido para ser considerada una producción sostenible). Se necesitaron 90 días de frío para empezar una producción sostenible de etileno, después de 12 días a temperatura ambiente, alcanzando el pico climatérico (máximo valor) a los 22 días (Tabla 5). A partir de esa fecha, se registra una relación inversa entre el tiempo de permanencia en cámara y el requerido para inducir la síntesis de etileno, a mayor período de conservación, menor es el tiempo necesario para inducir la síntesis, y ya a partir de los 180 días de almacenamiento, los frutos empezaron a emitir etileno apenas fueron removidos de la cámara (Figura 15). Estos resultados se explican dado que la exposición a las bajas temperaturas (-1 a 0°C), es normalmente un requisito en las peras de invierno para que se promueva la síntesis de etileno endógeno (Kader *et al.*, 2002). Si bien la fruta tardó más tiempo en alcanzar el climaterio, a los 120 días el etileno emitido fue similar al que produjeron las peras después de 180 días: 37 nL/g.h. El pico de mayor producción como es esperable, lo tuvo la fruta en el límite de su conservación a los 240 días, con 43 nL/g.h (Tabla 5).

Los frutos tratados con 1-MCP no tuvieron niveles detectables de producción de etileno a salida cámara, aún transcurridos los 240 días de almacenamiento ni después de 15 días a temperatura ambiente, para todos los períodos estudiados (Figura 15).

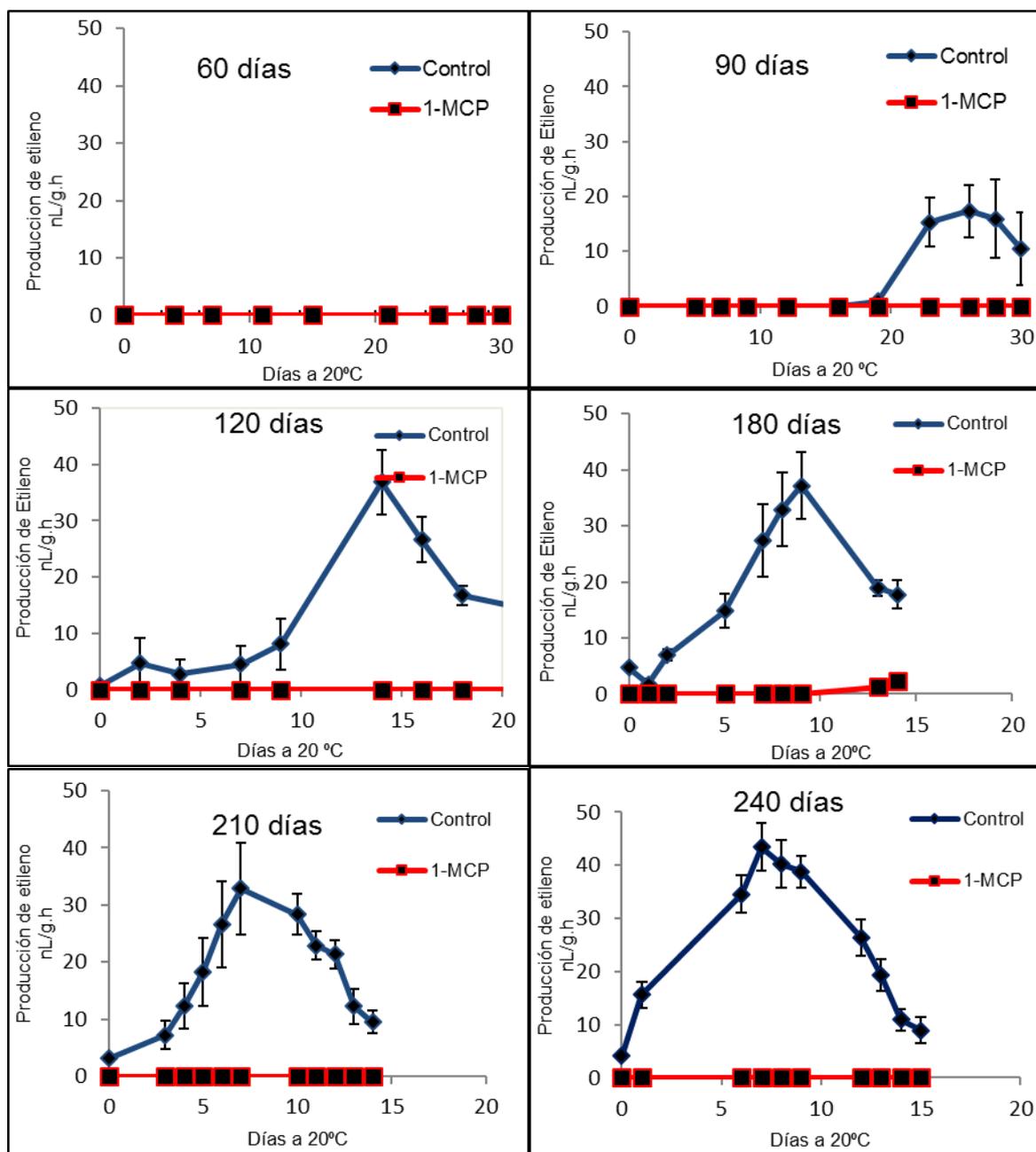


Figura 15. Producción de etileno en peras Control y tratadas con 1-MCP, a salida de cámara y puestas a temperatura ambiente a 20°C, a partir de los 60 días de almacenamiento. *Los puntos representan las medias con n=5 y las barras indican \pm desvío estándar.*

Tabla 5. Tiempo requerido para el inicio de la producción de etileno, días para alcanzar el pico climatérico y cantidad máxima de etileno producida, por la fruta control a partir de los 3 meses de almacenamiento.

Etileno	Tiempo de almacenamiento a -0,5°C				
	90	120	180	210	240
Inicio (días)	13 ± 2	2 ± 4	0	0	0
Pico climatérico (días)	22 ± 5	14 ± 0	9 ± 0	8 ± 1	7 ± 0
Pico climatérico (nL /g.h)	15 ± 4,5	36,8 ± 11	37,2 ± 11	35 ± 12	43,5 ± 9

Temporada 2014

La producción de etileno fue mucho más dispar en la fruta Control que el año anterior, pero el efecto del tratamiento con 1-MCP resultó altamente significativo y con un efecto equivalente al del año 2013.

La producción de etileno fue indetectable a cosecha y después de 15 y 30 días en cámara tanto a la salida de frío como después de un mes de vida en estante, pero a los 60 días en cámara, 60% de los frutos comenzaron una emisión sostenida, a partir de los 16 días con un pico a los 20, aunque variable en relación a cada fruto testeado (desde 30 a 1 nL /g.h). Contrariamente a lo esperado después de 90 y 120 días en cámara. la producción fue inferior y no se detectó un pico de producción (Tabla 6; Figura 16). A partir de los 120 días, los frutos produjeron pequeñas cantidades de etileno apenas fueron removidos de la cámara y los días requeridos de inducción se fueron acortando. La fruta necesitó más tiempo en frío (150 días) en relación a la temporada anterior para alcanzar el pico climatérico, demorándose más de una semana en hacerlo (Figura 16).

Los frutos tratados con 1-MCP se comportaron de igual manera que la temporada anterior y no hubo niveles detectables de producción de etileno ambiente, en ninguna de las evaluaciones realizadas (Figura 16).

Tabla 6. Tiempo requerido para el inicio de la producción de etileno, días para alcanzar el pico climatérico y cantidad máxima de etileno producida, por la fruta control a partir de los 60 días de almacenamiento.

Etileno	Tiempo de almacenamiento a -0,5°C						
	60	90	120	150	180	210	240
Inicio (días)	18 ± 9	22 ± 5	0	0	0	0	0
Pico climatérico (días)	20 ± 11	28 ± 11	nd	12 ± 3	11 ± 2	10 ± 2	9 ± 3
Pico climatérico (nL /g.h)	13,9 ± 13	3,86 ± 7	nd	33,8 ± 22	33,7 ± 17	33 ± 16,2	38 ± 8,6

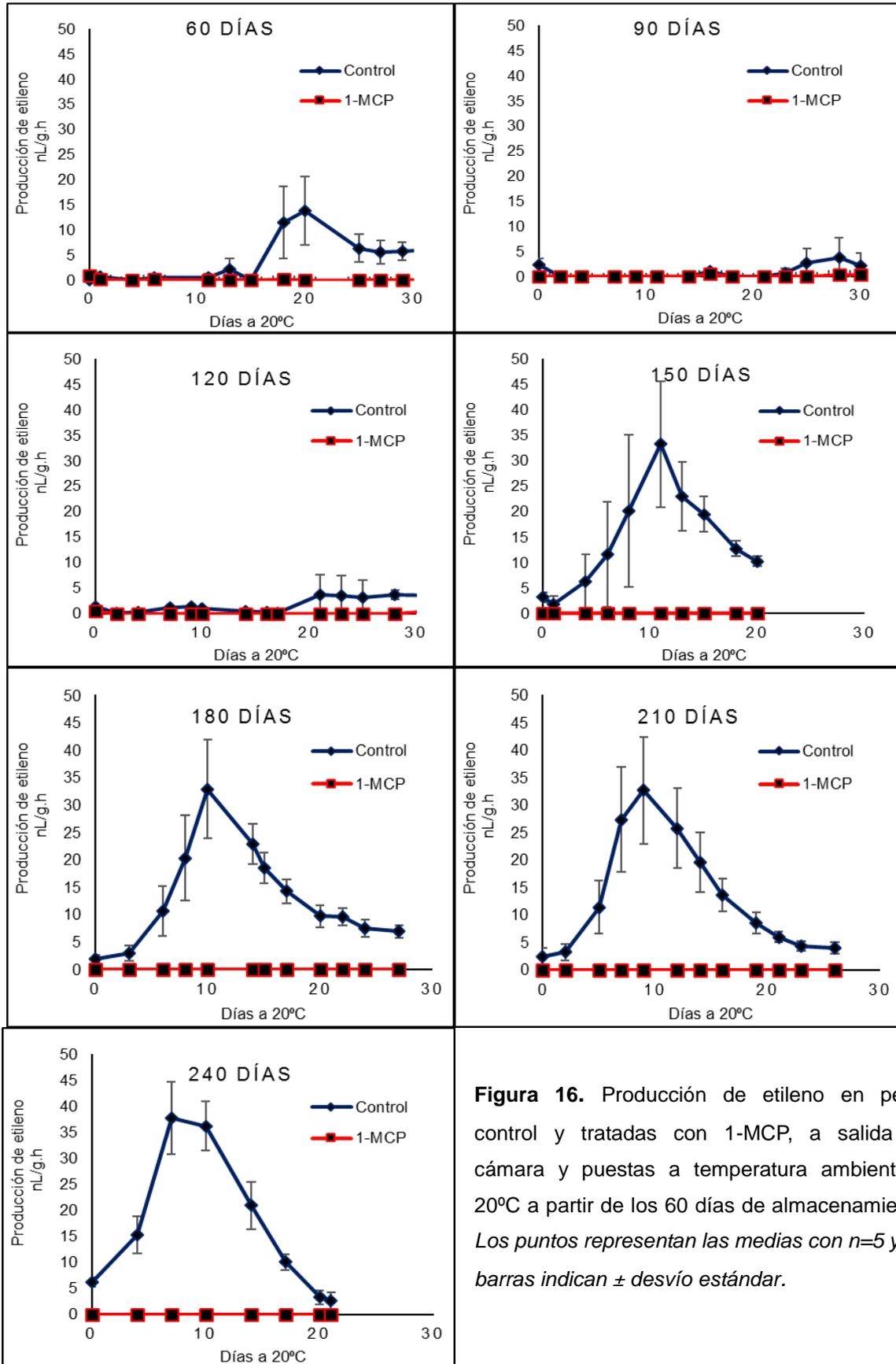


Figura 16. Producción de etileno en peras control y tratadas con 1-MCP, a salida de cámara y puestas a temperatura ambiente a 20°C a partir de los 60 días de almacenamiento. *Los puntos representan las medias con n=5 y las barras indican \pm desvío estándar.*

5.3 Evolución de los α - farnesenos y los trienos conjugados

Temporada 2013

Se observaron diferencias significativas en la cantidad de AF y TC entre la fruta Control y la tratada con 1-MCP, para todos los períodos de almacenamiento ($p < 0,05$), registrándose siempre en la fruta Control los mayores valores para ambos parámetros (Figuras 17 y 18).

Los AF (α -farnesenos) se detectaron en la piel de los frutos en pequeñas cantidades ($2,2 \text{ nmol/cm}^2$) desde el momento de la cosecha y se fueron acumulando en los frutos Control desde su puesta en frío, hasta llegar a un máximo entre los 60 y 90 días en cámara, donde alcanzan los $60,5 \text{ nmol/cm}^2$ promedio. A partir de ese tiempo, empiezan a decrecer y a los 120 días alcanzan un valor que se mantiene (con una pequeña disminución a los 210 días), hasta los 240 días en cámara, con un valor promedio de 37 nmol/cm^2 (Figura 17, Tabla 7).

Los frutos tratados con 1-MCP, por su parte presentaron niveles más bajos (6 nmol/cm^2 en promedio) y estables entre los 15 a los 60 días en cámara, luego duplican ese valor entre los 90 a 180 días, aunque el mismo solo representa un 20% de lo cuantificado en las peras control (Figura 17, Tabla 7).

Los TC (trienos conjugados), producidos por la oxidación de los AF, son prácticamente indetectables hasta los 30 días en frío, en ambos tratamientos. A partir de los 60 días comienzan a acumularse en los frutos Control hasta llegar a los 90 días con un valor de 20 nmol/cm^2 , que se mantiene sin variaciones, hasta los 240 días en cámara. En la fruta con 1-MCP, los valores de TC son extremadamente bajos y solo superan levemente 1 nmol/cm^2 después de los 180 días (Figura 18; Tabla 7). Esto explica por qué la fruta tratada con 1-MCP, no presenta síntomas de escaldadura, ya que se atribuye este daño a una oxidación de los lípidos de membranas, llevada a cabo por estas moléculas reactivas..

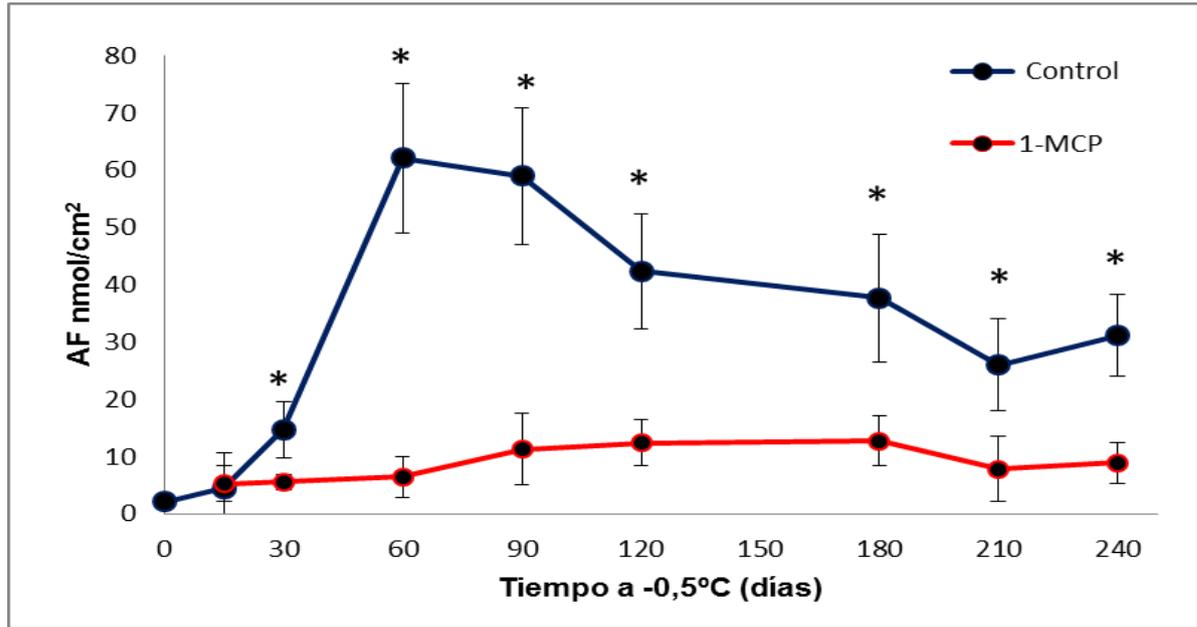


Figura 17. Contenido de α -farneseno de la piel de peras Beurré D' Anjou cosechadas en la temporada 2013 y evaluadas después de diferentes tiempos de almacenamiento a $-0,5^{\circ}\text{C}$. Los valores representan la media de 5 repeticiones (10 frutas cada una) y las barras indican \pm desvío estándar. Asteriscos indican diferencias significativas entre tratamientos

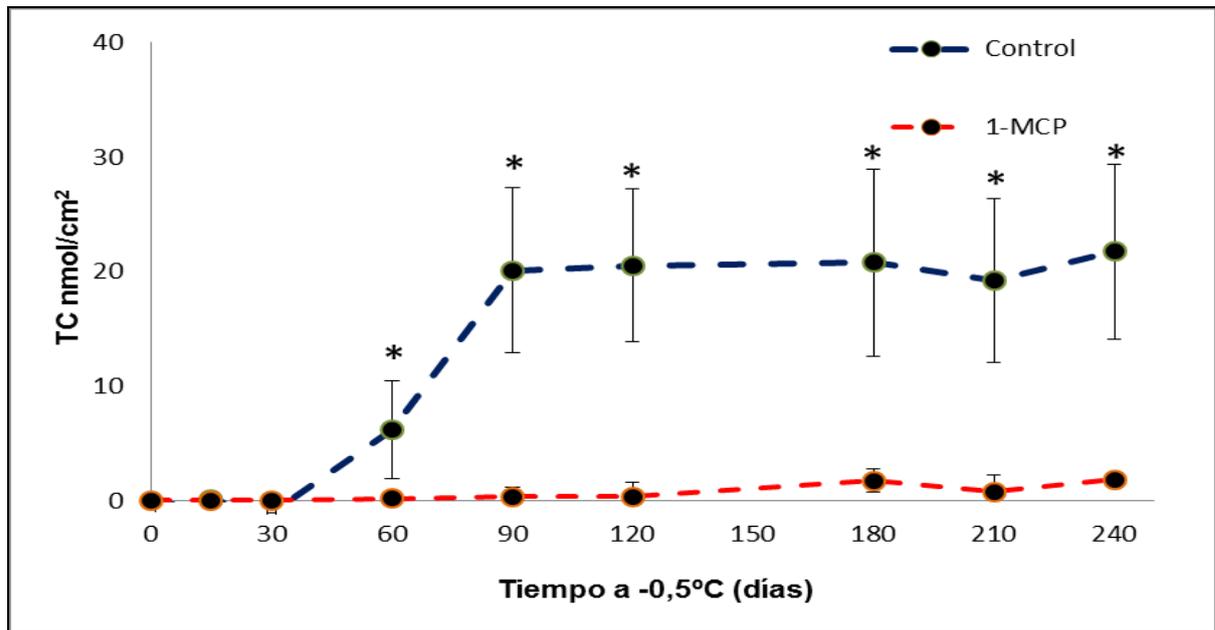


Figura 18. Contenido de trienos conjugados de la piel de peras Beurré D' Anjou cosechadas en la temporada 2013 y evaluadas después de diferentes tiempos de almacenamiento a $-0,5^{\circ}\text{C}$. Los valores representan la media de 5 repeticiones (10 frutas cada una) y las barras indican \pm desvío estándar. Asteriscos indican diferencias significativas entre tratamientos.

Temporada 2014

Al igual que en el año 2013, se observaron diferencias significativas en la cantidad de AF y TC entre la fruta Control y la tratada, para todos los períodos de almacenamiento ($p < 0,05$). En ambos parámetros, la fruta Control siempre registró los valores más altos (Tabla 7). En la cosecha de esta temporada se observaron valores de AF en piel que duplicaban los del año anterior, con $4,55 \text{ nmol/cm}^2$.

El comportamiento de los AF en relación a su formación en el almacenamiento (aumentan a medida que la fruta permanece en la cámara) en ambas temporadas fue similar, pero en 2014 la producción en la fruta Control se presentó más regular y llegó a un pico de acumulación bien marcado a los 90 días de frío en cámara, con un valor de 67 nmol/cm^2 , mayor que el acumulado en el año 2013 en esa evaluación (Figura 19).

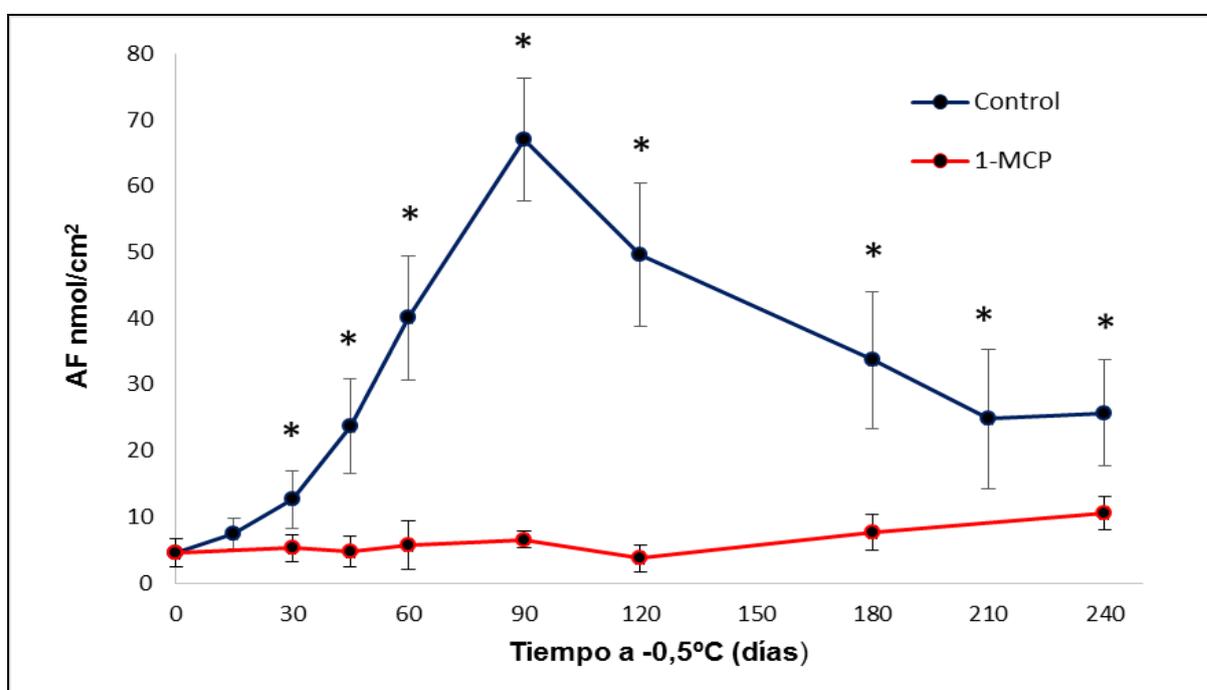


Figura 19. Contenido de α -farneseno de la piel de peras Beurré D' Anjou cosechadas en la temporada 2014 y evaluadas después de diferentes tiempos de almacenamiento a $-0,5^{\circ}\text{C}$. Los valores representan la media de 5 repeticiones (10 frutas cada una) y las barras indican \pm desvío estándar. Asteriscos indican diferencias significativas entre tratamientos

Por su parte, no existen diferencias significativas entre los valores de TC del año 2014 y los del 2013 de la fruta control a partir de los 90 días en cámara (Tabla 7).

Los TC en el año 2014, tuvieron un valor muy bajo hasta los 60 días en cámara, momento en que triplicaron su valor. A partir de allí, se acumularon rápidamente y a los 90 días se alcanzaron los niveles más altos ($21,36 \text{ nmol/cm}^2$), que se mantuvieron sin variantes hasta el final de la conservación (Figura 20).

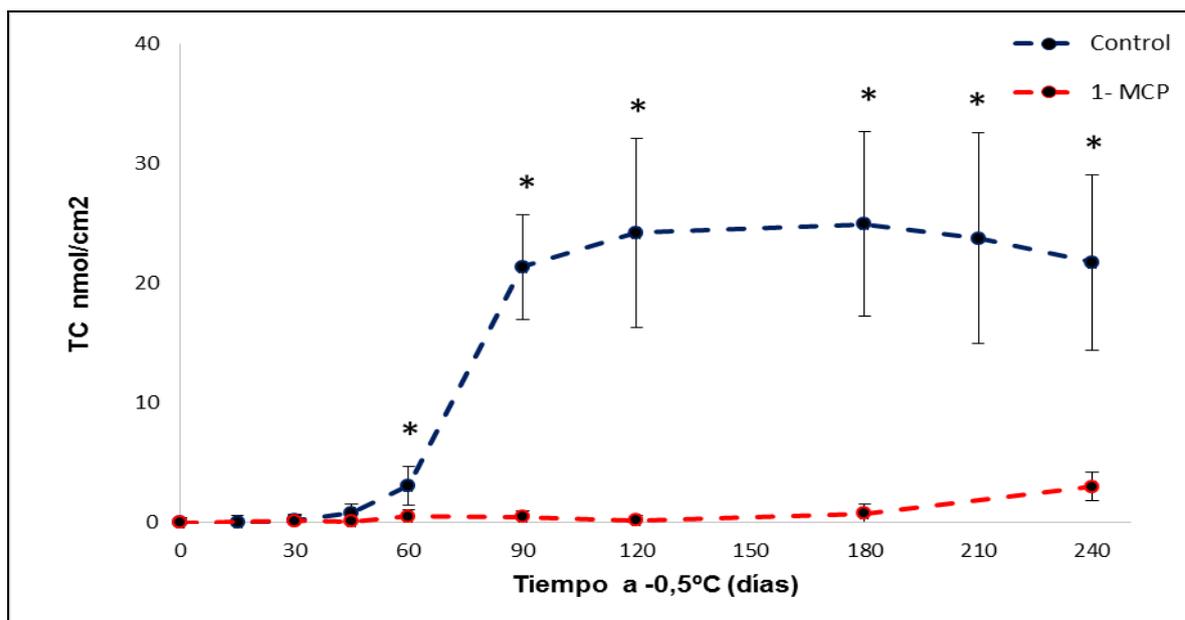


Figura 20. Contenido de trienos conjugados de la piel de peras Beurré D' Anjou cosechadas en la temporada 2014 y evaluadas después de diferentes tiempos de almacenamiento a $-0,5^{\circ}\text{C}$. Los valores representan la media de 5 repeticiones (10 frutas cada una) y las barras indican \pm desvío estándar. Asteriscos indican diferencias significativas entre tratamientos.

La producción de AF en la fruta tratada con 1-MCP, se mantuvo en valores más bajos y estables, que la temporada anterior. Los AF y TC conservaron los niveles hallados a cosecha y solo se observó un aumento de ambos hacia el final de la conservación en cámara, a los 240 días. Los valores de TC solo superaron los 1 nmol/cm^2 a los 240 días (Tabla 7), teniendo una producción final mayor que el año precedente.

Tabla 7. Contenido de α -farneseno y trienos conjugados de la piel de peras Beurré D' Anjou después de diferentes tiempos de almacenamiento a $-0,5^{\circ}\text{C}$, en las temporadas 2013-2014.

2013				
Días 0°C	AF		TC	
	Control	1-MCP	Control	1-MCP
0	2,1 b E	2,1 bC	0,0	0,0
15	4,4 b E	5,3 C	0,1 a C	0,0 C
30	14,7 a D	5,6 aC	0,0 b C	0,0 b D
60	62,1 a A	6,5 aC	6,2 a B	0,2 a B
90	59,0 b A	11,3 aA	20,1 a A	0,3 a B
120	42,3 a B	12,4 aA	20,5 a A	0,4 a B
180	37,7 a B	12,8 aA	20,8 a A	1,8 a A
210	26,1 a C	7,8 B	19,2 a A	0,8 B
240	31,2 a C	8,9 aB	21,7 a A	1,8 b A

2014					
Días 0°C	AF			TC	
	Control	1-MCP	Control	1-MCP	
0	4,6 a F	4,6 a B	0,0	0,0	
15	7,4 a F		0,0		
30	12,6 a F	5,2 a B	0,2 a B	0,2 a B	
60	40,1 b C	5,7 a B	3,1 b B	0,5 a B	
90	67,1 a A	6,6 b B	21,4 a A	0,5 a B	
120	49,7 a B	3,7 b B	24,2 a A	0,2 a B	
180	33,7 a D	7,6 b B	24,9 a A	0,8 b B	
210	24,8 a E		23,8 a A		
240	25,7 b E	10,5 a A	21,7 a A	3,0 a A	

Los valores representan la media de 5 repeticiones (10m frutas cada una). Letras diferentes presentan diferencias significativas para cada variable según Test de DGC ($p < 0,05$), entre las dos temporadas (a-b) y entre el periodo de almacenamiento dentro de cada tratamiento (A-E) en cada año en particular.

5.4 Escaldadura superficial en frutos tratados y sin tratar con 1-MCP. Incidencia y severidad de daños en las temporadas 2013 y 2014.

En ambas temporadas se observaron diferencias muy significativas en el desarrollo de la escaldadura superficial entre la fruta Control y la tratada con 1-MCP.

El tratamiento con 1-MCP a la dosis aplicada (300 ppb) permitió controlar totalmente la escaldadura superficial de las peras Beurrè D' Anjou hasta el final de la conservación, tanto a salida de cámara como durante la vida en estante, en ambas temporadas (Figura 21)(Foto 13).

En las frutas Control tampoco se observaron síntomas al momento de la salida de cámara, independientemente del tiempo de conservación. Los primeros daños se observaron a partir de los 120 días en cámara, luego de los 7 días de vida en estante, en ambos años, existiendo diferencias significativas entre ellos en esta fecha, pues la escaldadura afectó un 70% de los frutos en el 2013, en tanto la temporada siguiente hubo casi un 15% menos de incidencia ($p = 0,021$) (Figura 21).

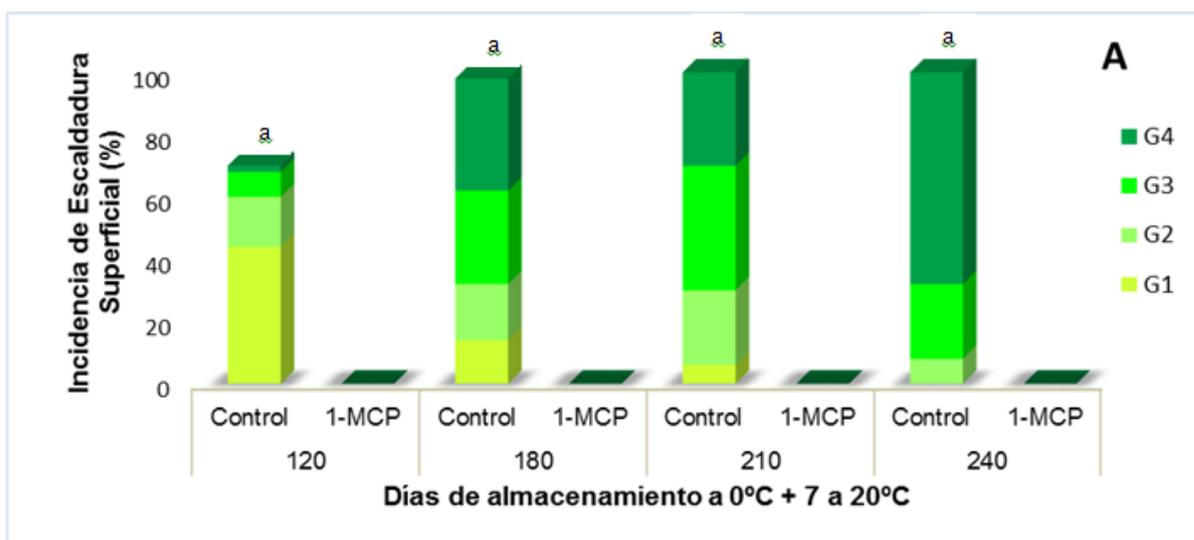
A partir de los 180 días la cantidad de fruta Control dañada durante su vida en estante en ambas temporadas supera los 95%, hasta llegar a un 100% a los 210 días, sin que existan diferencias significativas entre ambas (Figura 21).

Tabla 8. Índice de escaldado superficial (IES) de la fruta Control a diferentes tiempos de almacenamiento a -0,5°C + 7 días a 20°C (desde la fecha en que aparecen los primeros daños) en las temporadas 2013 y 2014.

Año	Tiempo de almacenamiento a - 0,5°C				P value
	120	180	210	240	
2013	1,08 ^C	2,84 ^B	2,94 ^{AB}	3,6 ^A	< 0,001
2014	0,90 ^B	3,02 ^A	2,86 ^A	3,24 ^A	< 0,001

Los valores representan el índice calculado con 5 repeticiones (20 frutas cada una). Letras diferentes presentan diferencias significativas del IES dentro de cada año, según test de Tukey ($p < 0,05$),

En la severidad del daño en la piel de los frutos Control, medidos a través del índice de escaldado superficial (Tabla 8, Figura 21) se observaron diferencias significativas a medida que se prolongó el tiempo de permanencia en cámara. En 2013 el IES aumentó desde los 120 días hasta el final del almacenamiento, en tanto en el 2014, se acrecentó hasta los 180 días y luego permaneció estable hasta el fin del ensayo. Cabe mencionar que el valor de IES más alto que puede conseguirse es de 4, por lo cual la severidad de escaldadura fue alta a partir de los 180 días en ambas temporadas.



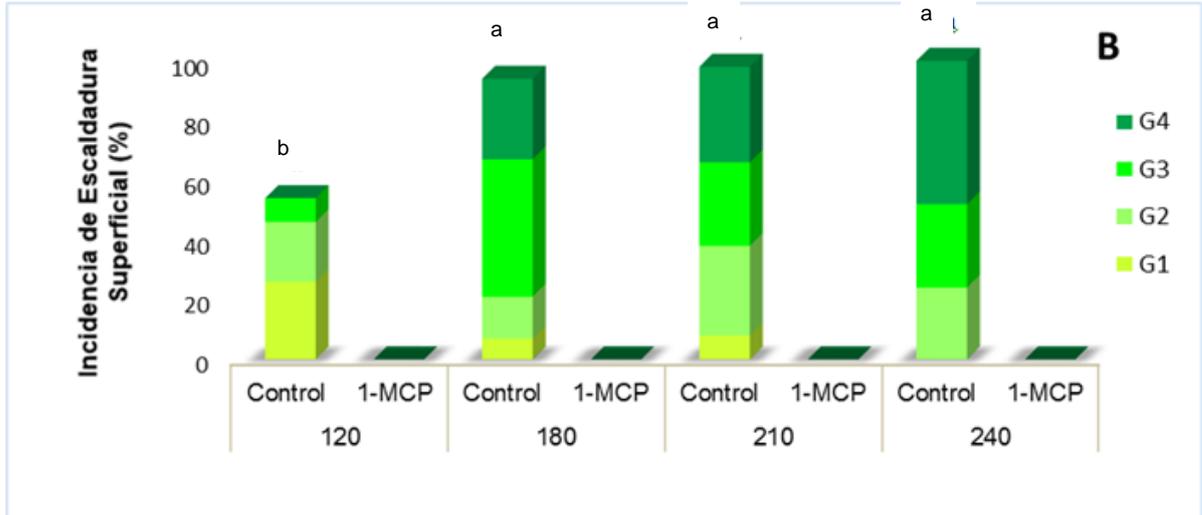


Figura 21. Incidencia (% de fruta afectada) y severidad (G1, G2, G3 y G4) de la escaldadura superficial en la piel de las peras Beurré D'Anjou Control y Tratadas con 1-MCP después de diferentes tiempos de almacenamiento a $-0,5^{\circ}\text{C}$, en las temporadas 2013 (A) y 2014 (B). Los porcentajes representan la media de 5 repeticiones de 20 frutos cada una. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los años en cada salida, según test MLG ($p < 0,05$)



Foto 13. Daños por escaldadura en peras Beurré D' Anjou después de 240 días a 0°C + 7 días de vida en estante. Control (A) y Tratada con 1-MCP (B).

5.5. Respuestas del sistema antioxidante de la pera tratada con 1-MCP durante su conservación en frío.

Se estudió la capacidad antioxidante total en la piel de los frutos durante las temporadas 2013 y 2014. En la última cosecha se profundizó el estudio con la determinación del contenido de Ácido ascórbico (AA) y de Polifenoles totales (PFT) con el fin de hallar una relación entre el nivel de estos antioxidantes y el desarrollo de la escaldadura como consecuencia de un daño en el metabolismo oxidativo por efecto del frío.

5.5.1 Evolución de la capacidad antioxidante total (DPPH).

Temporada 2013

Tanto la fruta Control como la tratada con 1-MCP, experimentaron un comportamiento similar, presentando un aumento en la actividad antioxidante total durante el almacenamiento como respuesta al estrés por frío.

La variación de la capacidad antioxidante total pasó de ser 18% al momento de la cosecha a alcanzar un 35% (promedio) al finalizar el ensayo después de 240 días. La fruta Control exhibió valores significativamente más altos que la tratada desde los 60 (teniendo un pico los 120 días ($p=0,0001$) hasta los 180 días, donde llegan a un valor similar ($p=0,2990$). Si bien hay una diferencia a favor del tratamiento con 1-MCP a los 210 días ($p<0,0001$), los niveles de DPPH de estas frutas y las Control vuelven a alcanzar valores similares al final de la conservación ($p=0,3144$). Esto muestra que la actividad antioxidante está más influenciada por el tiempo de conservación de las frutas que por el tratamiento con 1-MCP (Figura 22).

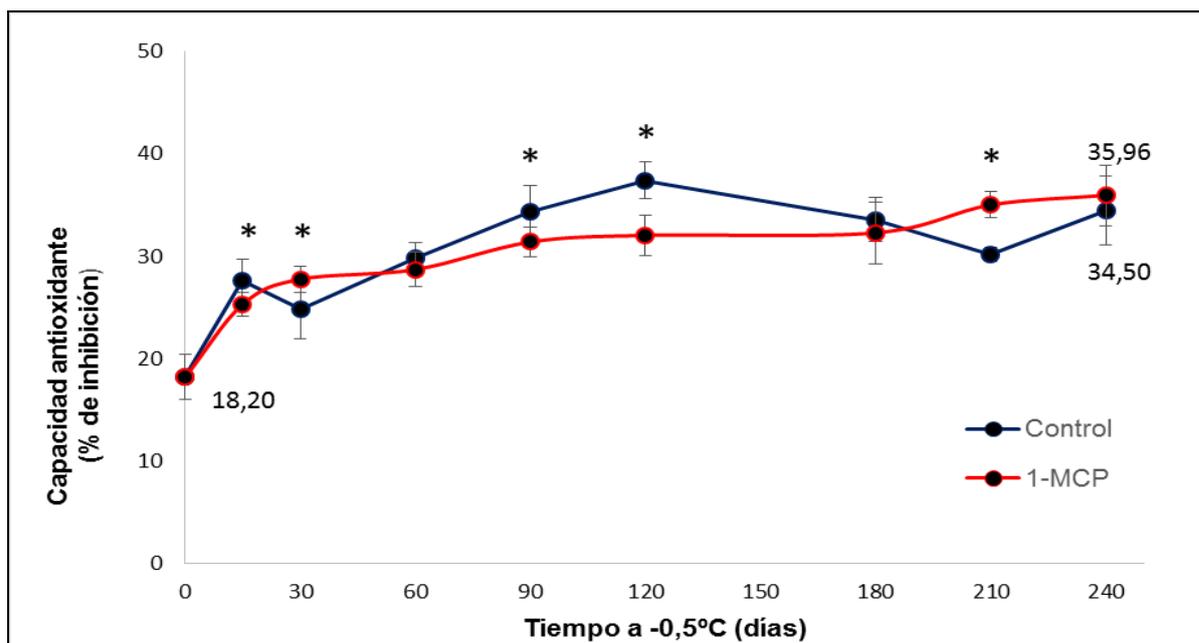


Figura 22. Cambios en la capacidad antioxidante (% de inhibición) de la piel de peras Beurré D'Anjou cosechadas en la temporada 2013 tratadas y sin tratar con 1-MCP después de diferentes períodos de almacenamiento a - 0,5 °C. Los valores representan la media de 5 repeticiones (3 frutas cada una). Las barras indican \pm desvío estándar. Asteriscos indican diferencias significativas entre tratamientos.

Temporada 2014

La capacidad antioxidante total en la piel de los frutos de ambos tratamientos también fue aumentando a medida que transcurría la conservación en frío, pero sin diferencias destacables atribuibles al tratamiento (Figura 23). A los 30 días se observaron diferencias significativas entre la fruta Control y la tratada con 1-MCP, conservando mayor capacidad antioxidante total la fruta Control ($p= 0,0361$). Sin embargo, a medida que se prolongó el almacenamiento no se volvieron a registrar diferencias significativas entre tratamientos hasta el final del ensayo.

La fruta con 1-MCP alcanzó el mayor valor de DPPH a los 30 días de almacenamiento, momento a partir del cual se mantuvo sin diferencias significativas hasta la finalización del ensayo (Figura 23).

Comparando la capacidad antioxidante total en las dos temporadas, se observa que el DPPH a cosecha resultó ser significativamente mayor en la temporada 2014 (23%) que en la temporada 2013 (18%) ($p < 0,0001$). Sin embargo, se observa que la cosecha 2013, aunque partió con una actividad antioxidante menor, luego de 240 días en frío, la fruta Control registró mayores valores de actividad antioxidante en comparación con la temporada 2014 ($p < 0,0001$). Es importante destacar que entre los 60 y los 90 días, en ambos años, se registra un porcentaje de inhibición de igual magnitud e incluso a los 60 días no se aprecian

diferencias significativas entre tratamientos dentro de cada año ($p= 0,1685$ (2013); $0,2602$ (2014)). En la fruta tratada con 1-MCP, tampoco fue una ventaja comenzar con valores más altos de antioxidantes en piel a cosecha, ya que solo se mantuvo esa diferencia hasta los 90 días, luego se invirtió la diferencia (menor valor en 2014), para terminar a los 240 días en porcentajes similares ($p 0,2083$) en ambas temporadas, con valores promedio de 33% (Figuras 22 y 23).

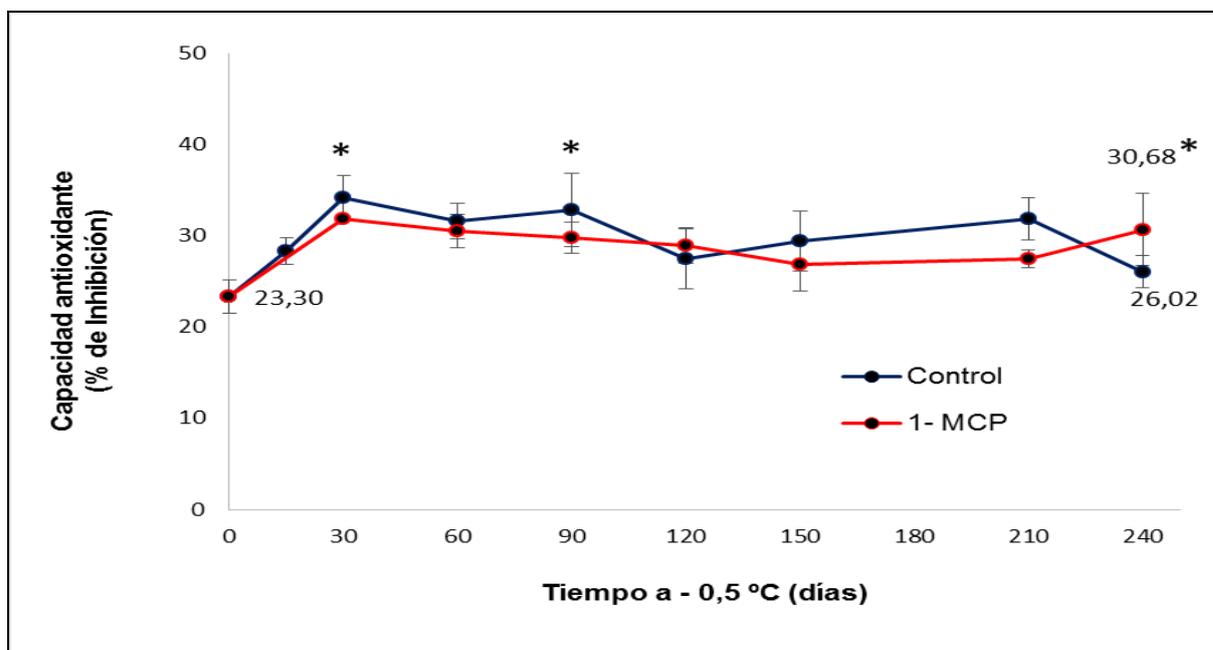


Figura 23. Cambios en la capacidad antioxidante (% de inhibición) de la piel de peras Beurré D'Anjou tratadas y sin tratar con 1-MCP después de diferentes períodos de almacenamiento a $-0,5$ °C. Cosecha 2014. Los valores representan la media de 5 repeticiones (3 frutas cada una). Las barras indican \pm desvío estándar. Asteriscos indican diferencias significativas entre tratamientos.

5.5.2. Cambios en el contenido de Ácido ascórbico.

Ambos tratamientos experimentaron una disminución muy significativa (del orden del 60%) del contenido de vitamina C durante todo el periodo de almacenamiento, en relación a los valores obtenidos al momento de cosecha, pero se observaron diferencias significativas entre los tratamientos.

La puesta en frío promovió la síntesis de AA que aumentó significativamente, durante el primer mes, tanto para el Control como para la fruta tratada con 1-MCP, aunque el valor fue mayor en este último caso en un 22% (Figura 24). Al compararse con la fruta Control, la fruta tratada con 1-MCP mantuvo un mayor nivel de ascorbato en la piel de las peras durante los primeros 90 días de almacenamiento, aunque ambas frutas sufrieron un marcado descenso en el valor de AA, en relación a lo acumulado en los primeros 30 días.

Sin embargo, este efecto del tratamiento se diluyó con la continuación de la fruta en frío y al final del ensayo, alcanzaron valores similares (Figura 24).

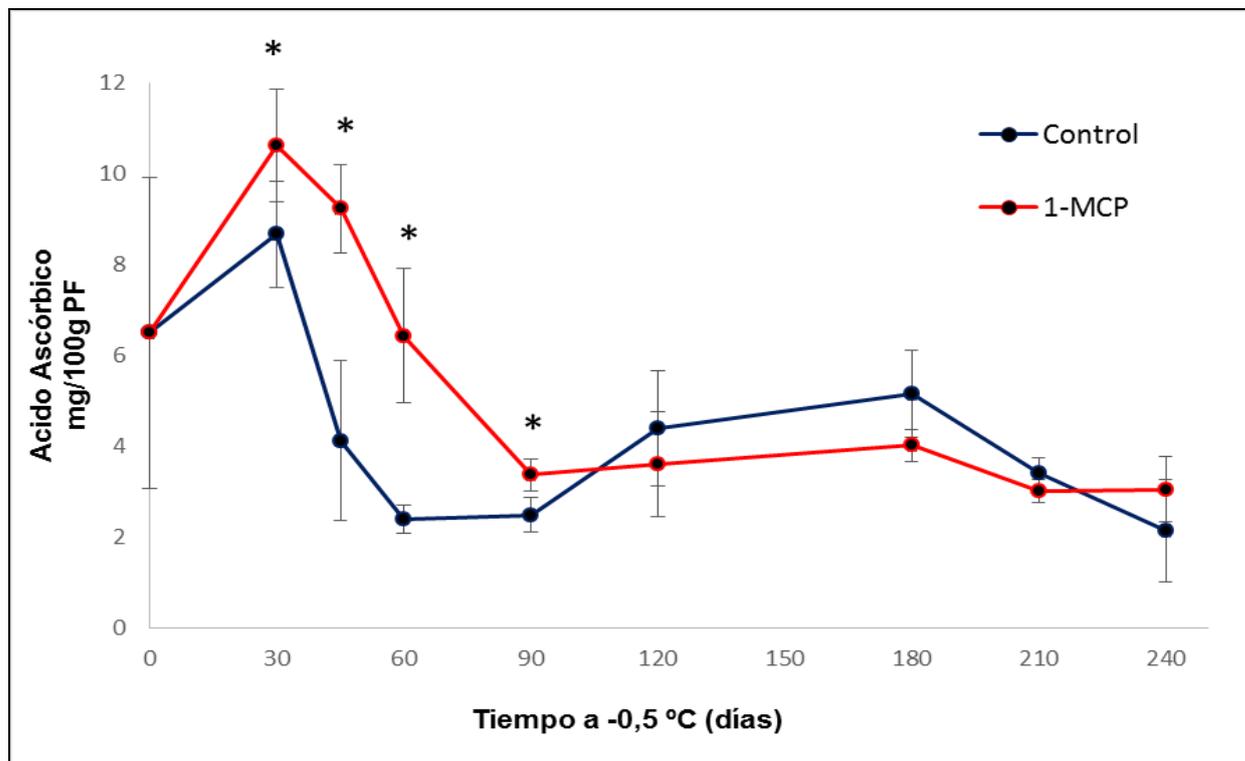


Figura 24. Variación del contenido de Ácido ascórbico de la piel de peras Beurré D' Anjou, tratadas y sin tratar con 1-MCP después de diferentes períodos de almacenamiento a -0,5°C. Los valores representan la media de 5 repeticiones (3 frutas cada una). Las barras indican \pm desvío estándar. Asteriscos indican diferencias significativas entre tratamientos.

5.5.3 Evolución de los valores de los polifenoles (PFT)

La dinámica del contenido de polifenoles en la fruta Control y la tratada con 1-MCP siguió patrones bastante similares. El contenido de PFT disminuyó en el almacenamiento. Esta baja ocurrió en los primeros 30 días en cámara, donde se observó en las peras Control, una disminución mucho más pronunciada (24%) que en fruta tratada con 1-MCP (11%), en relación a los valores en cosecha. En los meses siguientes los PFT en piel, se mantuvieron constantes en la fruta Control, sin que se registren tampoco diferencias significativas entre tratamientos a los 60, 90, 120 y 210 días ($p=0,2523$; $0,4587$; $0,0850$ y $0,1123$) respectivamente. Entre los 30 a 60 días, la fruta tratada con 1-MCP registró sus menores valores y el contenido de polifenoles fue más fluctuante.

Por último, la fruta tratada con 1-MCP presentó un incremento significativo de PFT a los 240 días, llegando prácticamente a recuperar los contenidos iniciales en tanto la fruta Control manifestó un marcado descenso (Figura 25).

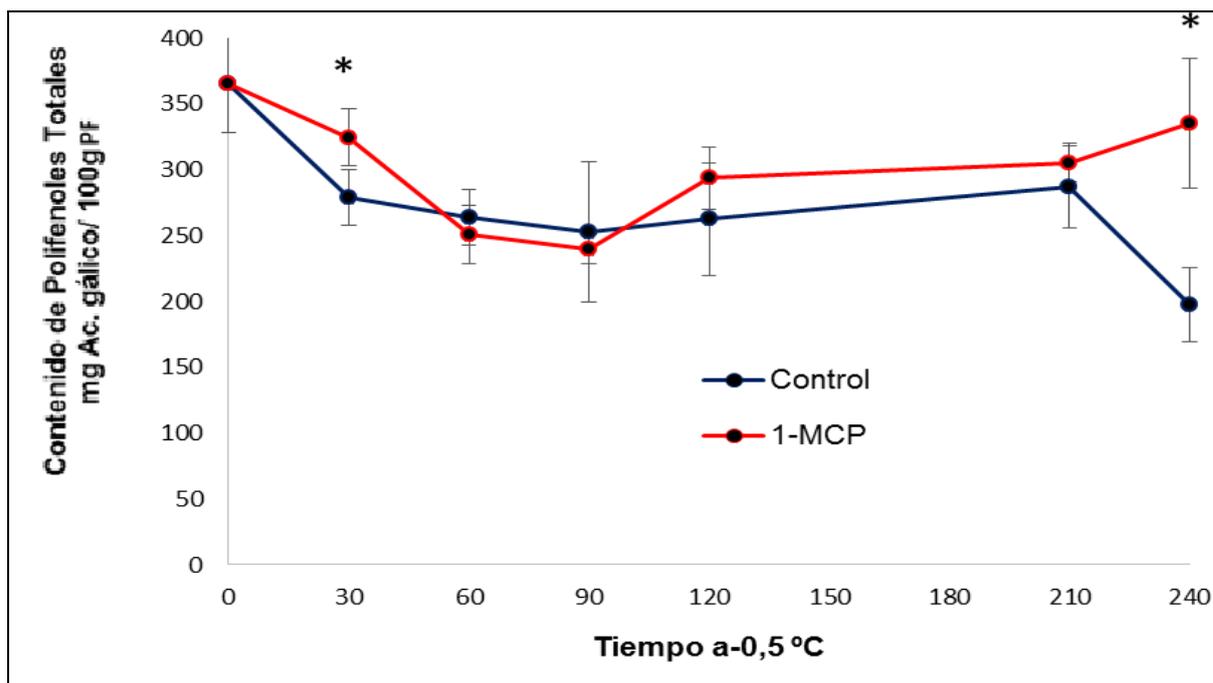


Figura 25. Cambios en el contenido de polifenoles totales de la piel de peras Beurré D' Anjou, tratadas y sin tratar con 1-MCP después de diferentes períodos de almacenamiento a -0,5°C. Los valores representan la media de 5 repeticiones (2 frutas cada una). Las barras indican \pm desvío estándar. Asteriscos indican diferencias significativas entre tratamientos.

5.6 Evolución del daño oxidativo por estrés por frío en frutos almacenados en cámara convencional.

En la temporada 2014 a medida que se estudiaba la evolución del sistema antioxidante, se evaluaron dos parámetros indicadores del nivel de daño oxidativo sufrido por las células, con el fin de determinar si era factible detectar cambios que se relacionaran con la aparición de la escaldadura superficial.

El MDA (malondialdehído) es el principal y más estudiado de los productos secundarios de peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas (Del Río *et al.*, 2005) y la pérdida de electrolitos (EL) es un indicador de la pérdida de integridad de las membranas, ya que aumenta a medida que las membranas pierden su permeabilidad selectiva (Whitlow *et al.*, 1992).

5.6.1 Cambios en el nivel de peroxidación de los lípidos de las membranas de la piel de peras cv Beurrè D' Anjou.

El contenido de MDA sigue un patrón errático con aumentos y disminuciones a lo largo del almacenamiento de la fruta en la cámara, aunque el balance final para ambos tratamientos indica un aumento importante en relación al inicio de la puesta en frío. Los valores se incrementaron rápidamente a partir de la puesta en cámara, alcanzando un valor máximo a los 60 días (con una producción promedio de 158 nmol MDA/g PF), sin que existan diferencias significativas entre tratamientos (Figura 26). Las fluctuaciones en la fruta Control se realizan dentro de una franja, ya que tanto los picos máximos a los 120 y 210 días como los mínimos a los 90, 150 y 240 no presentan diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Estas diferencias entre los valores de cosecha y los obtenidos tras 240 días de almacenamiento sugieren la existencia de daños oxidativos como una consecuencia del estrés causado a los frutos por las bajas temperaturas. Comparando con la fruta tratada, el incremento fue mucho más sostenido en el tiempo en la fruta Control, ya que los frutos tratados con 1-MCP presentaron valores menores entre los 90 y los 210 días, lo cual podría asociarse a un efecto protector de las membranas, que no se mantuvo permanentemente pues el MDA volvió a aumentar significativamente hacia el final del almacenamiento, pero sin que ello se relacionara con la aparición de escaldadura.

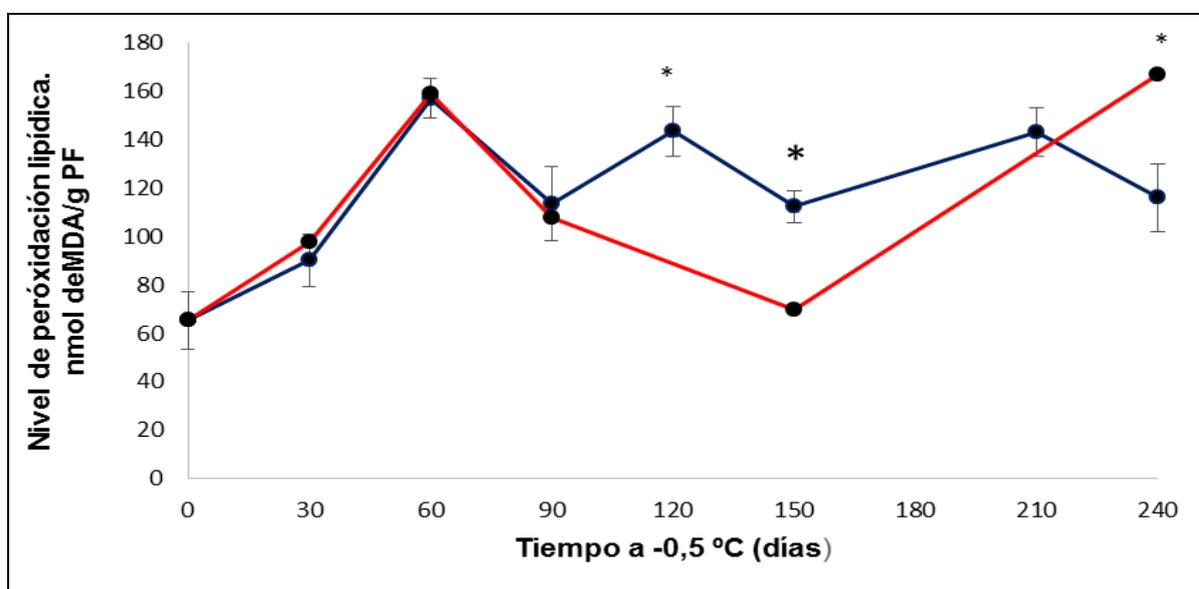


Figura 26. Cambios en el nivel de peroxidación de los lípidos (MDA) de las membranas de la piel de peras Beurrè D'Anjou, tratadas y sin tratar con 1-MCP después de diferentes períodos de almacenamiento a -0,5°C. Los valores representan la media de 5 repeticiones (3 frutas cada una). Las barras indican \pm desvío estándar. Asteriscos indican diferencias significativas entre tratamientos

5.6.2 Pérdida de electrolitos.

La pérdida de electrolitos presentó variaciones durante todo el periodo evaluado y para ambos tratamientos. Si bien se observaron diferencias significativas entre los tratamientos a los 15, 120 y 240 días, las mismas son erráticas y no ayudan a explicar las diferencias de escaldadura entre la fruta tratada y la fruta control (Figura 27).

Entre los 0 y los 45 días se observó un incremento en la pérdida de electrolitos. Luego se inicia una etapa de descenso hasta los 120 días, donde se manifiestan los menores valores (49 y 55%), con diferencias significativas entre tratamientos a favor de la fruta Control ($p:0,0296$) que parece conservar más la integridad de sus membranas (Figura 27).

A partir de esta fecha y a medida que se extiende la permanencia de la pera en la cámara, el nivel de daño comienza a aumentar de nuevo, para ambas. La fruta Control, lo manifiesta en forma continua hasta que llega a los 240 días con un nivel de daño similar al que tenía a los 45 días. La fruta con 1-MCP llega con un porcentaje de pérdida de electrolitos menor y con un valor equivalente al que tenía a los 90 y 120 días, lo que evidencia que ha permanecido más estable y puede ofrecer algún tipo de protección a las membranas en una larga conservación.

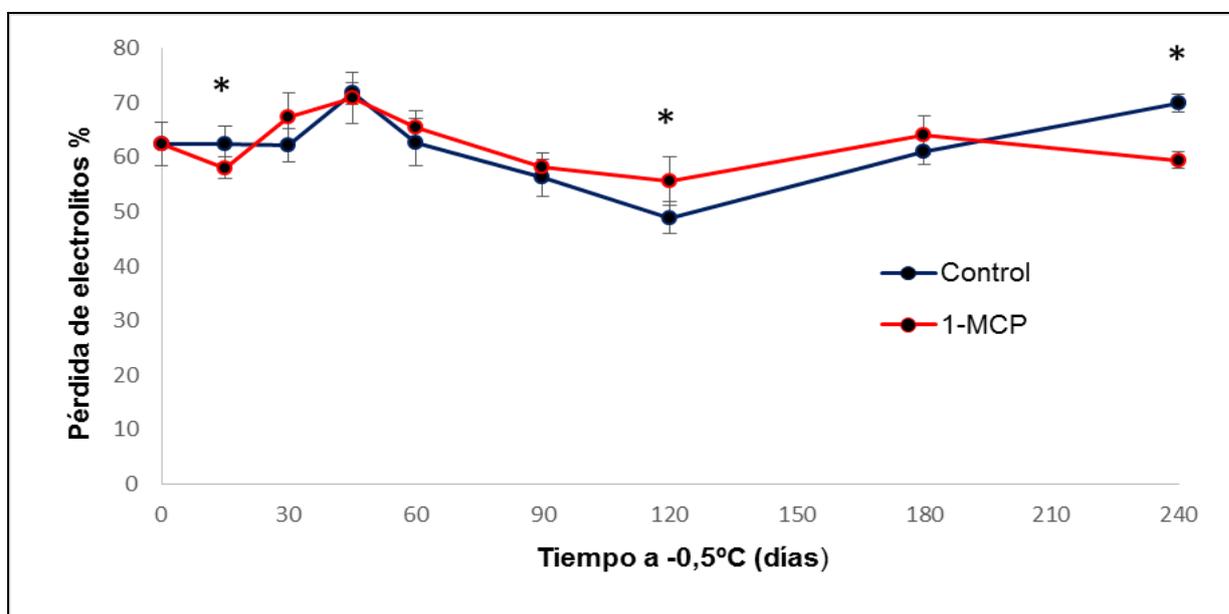


Figura 27. Evolución de la pérdida de electrolitos de la piel de peras Beurré D' Anjou, tratadas y sin tratar con 1-MCP, expresadas en porcentaje después de diferentes períodos de almacenamiento a -0,5 °C. Los valores representan la media de 5 repeticiones. Las barras indican \pm desvío estándar. Asteriscos indican diferencias significativas entre tratamientos.

6. DISCUSION

6.1 Relación de la aplicación de 1-MCP con la producción de etileno y los parámetros de madurez de pera almacenada en frío y durante su vida de comercial.

La producción de etileno en los frutos climatéricos, regula la velocidad de los procesos de madurez, condiciona la conservación de las frutas y actúa como partícipe indirecto del desarrollo de varias fisiopatías, entre ellas la escaldadura superficial, cuya incidencia y severidad depende entre otras cosas, de la concentración y tiempo de exposición al mismo (Candan y Calvo,2005).

Se ha observado que la pera D'Anjou necesita mayor tiempo de inducción por frío que otras variedades de invierno como Bartlett, Packhams, Comice y Beurrè Bosc (Agar *et al.*, 2000; Villalobos y Mitcham, 2008; Sugar y Basile, 2009; 2014). En esta variedad, la temperatura juega un rol determinante para el inicio de la producción de etileno endógeno que permita alcanzar una correcta maduración organoléptica. Típicamente se considera que son necesarios unos 60 días a -1 a 0 °C como mínimo (Chen y Mellenthin, 1981; Chen, 2002; Kader, 2002, Sugar y Einhorn, 2011), para alcanzar una concentración de etileno endógeno de 1,5-2 µL/L que es el valor requerido en esta variedad para una maduración normal (Chen y Mellenthin, 1981).

La fruta Control que no fue almacenada en cámara después de la cosecha, no logró producir etileno en cantidad suficiente para inducir una correcta maduración, pues la producción resultó siempre inferior a 1µL/L., durante 45 días colocada a temperatura ambiente. Ello indicaría también que los frutos fueron cosechados en un estado preclimatérico.

Si bien la combinación de tiempo-temperatura mencionada está ampliamente aceptada, un estudio puso en tela de juicio este dato, ya que se observó que en algunas temporadas se requieren más de 60 días a -0,5°C para lograr una madurez adecuada tras 7 días de vida en estante (Sugar y Basile, 2013). Similar resultado se observó en la mutación 'Gerhard Red D' Anjou', lo que da cuenta de que existen otras variables más allá de la temperatura de conservación y los parámetros de cosecha (Sugar y Basile, 2014). Coincidentemente con estos trabajos, en ninguna de las dos temporadas, la fruta Control, pudo alcanzar su madurez de consumo con menos de 120 días de almacenamiento a -0,5°C, lo que demostraría que los parámetros aceptados normalmente para D' Anjou, en el hemisferio norte, no tienen validez en nuestra región. Similar resultado observó Calvo (2011) donde se necesitaron 90 días de almacenamiento, para lograr una madurez normal en los

frutos cosechados en una fecha óptima, dentro de los 7 días de vida de estante, pero solo 30 días si se tomaban frutos de una cosecha tardía, concluyendo que esto podría ser una indicación para nuestra zona de un período mínimo de guarda en frío para una correcta madurez de esta variedad. Los resultados obtenidos por este ensayo para igual fecha óptima, demuestra lo errático del comportamiento de esta variedad en el Alto Valle, ya que fue necesario en las dos temporadas superar los 120 días de cámara para lograr una madurez dentro de los 7 días de vida en estante.

En relación al comportamiento de la fruta tratada con 1- MCP y en particular en esta variedad, la temperatura de almacenamiento parece jugar un rol preponderante en la posibilidad de maduración, según lo postulado por Xie *et al* (2014), ya que hallaron que pequeñas variaciones del orden de +/- 2 °C (-1,1 °C a + 1,1°C), marcaron la diferencia entre una pera que llego a madurar y otra que no. A la temperatura de almacenamiento del ensayo (-0,5°C) y a la dosis comercial recomendada (300 nL/L), no se registraron emisiones de etileno en ninguna de las dos temporadas y por ello la fruta, no presentó cambios significativos en firmeza y no se ablandó por debajo de las 4 lb en ningún momento a salida de cámara ni durante los 7 días de vida en estante. Esto coincide con lo observado por Bai *et al.* (2006; 2009) y Calvo y Candan (2012), en esta variedad con igual dosis de tratamiento. No obstante, en los ensayos de Bai *et al.*, la fruta no alcanzó una firmeza de consumo dentro de los 20 días a 20 °C, pero en el Alto Valle, la pera logró madurar en unos 14 días, después de 210 días de conservación, incluso con una dosis mayor de 400 nL/L, aunque no logran madurar si se conservan por menos tiempo. En una experiencia posterior realizada en la temporada 2015, con dosis similares (300nL/L), se observó que la fruta pudo iniciar una producción de etileno a la semana de la vida en estante, después de 240 días en frío (Calvo *et al*, 2016b). Lo observado por éstos investigadores y por Xie *et al.* (2014), indicaría que esta variedad presenta una sensibilidad especial al 1-MCP y que necesitaría menores dosis y/o el empleo de estrategias de reversión, para poder madurar correctamente dentro de una vida de estante normal, en una mediana conservación.

Entre las estrategias post conservación, la aplicación de temperaturas mayores a 10°C durante 15-20 días, dieron resultados positivos en peras Bartlett pero no en D' Anjou (Bai *et al*, 2006) aun cuando existen estudios (Gerasopoulos y Richardson, 1999; Sugar y Einhorn, 2011), que coincidieron en que es la mejor temperatura de inducción a la madurez de peras D' Anjou sin aplicación de 1-MCP. Tampoco se logró una maduración normal con la aplicación de etileno exógeno a salida de cámara (100 µL/L durante 24-48 h), que es una práctica estándar comercial para acondicionar las peras europeas a fin de mejorar su capacidad de maduración (Chen, 2002; Argenta *et al*, 2003; Villalobos Acuña y Mitcham, 2008).

Xie *et al.* (2016) han demostrado que existe una marcada diferencia de comportamiento entre los varietales de D' Anjou, teniendo la variedad más común de piel verde una sensibilidad a la concentración de 1-MCP mucho mayor que la Red D' Anjou. Con dosis de 150 ppb y después una conservación en atmósfera convencional de 6-7 meses la variedad roja fue capaz de madurar con la aplicación comercial de etileno, no así la verde. La explicación parece estar relacionada a la expresión de genes ligados a la síntesis de etileno endógeno (PcACO1, PcACS1, PcACS2, PcACS4 y PcACS5) que después de 6 meses en frío, aumentaron en la variedad Red D' Anjou, pero no sufrieron cambios en la D' Anjou común. El 1-MCP también tuvo un marcado efecto sobre los genes ligados a la cascada de señalización (PcETR1, PcETR2, PcETR5 y PcCTR1) que se mantuvieron estables en un nivel extremadamente bajo en las peras tratadas, independientemente de la variedad (ya observado por Xie *et al.* (2014) sobre D' Anjou verde). PcACO1 y PcETR2 aumentaron su expresión después de la aplicación de etileno exógeno en la Red D' Anjou, que logró madurar, indicando que estos genes juegan un rol muy importante en el desencadenamiento de los procesos de maduración después de la conservación en frío. Esto coincide con los estudios previos de El-Sharkawy *et al.* (2003; 2004), que encontraron que en el desarrollo y la maduración de las peras intervienen al menos cuatro genes que codifican para ACS, un gen de ACO y cuatro receptores de etileno y que el 1-MCP bloquea la síntesis de etileno interno porque inhibe la expresión de éstos genes, además de interferir en las actividades de las ACO y ACS en peras europeas (Gamrasni *et al.* 2010; Villalobos-Acuña *et al.*, 2011; Chiriboga *et al.* 2013; Xie *et al.* 2014).

Los modelos actuales sugieren la existencia de una vía de señalización de etileno muy compleja compuesta de varias cascadas de fosforilación y redes transcripcionales de proteínas reguladas por retroalimentación; y se postula que es posible que en D' Anjou, el 1-MCP intervenga regulando este mecanismo bloqueando también así la síntesis y/o la señalización del etileno (Stepanova y Alonso, 2009).

Una técnica de reversión poco conocida pero de buenos resultados preliminares en D' Anjou, fue la combinación de una dosis comercial de 1-MCP (300 ppb) como la empleada en el ensayo, con hexanal (944 µL/L), en la búsqueda de mantener la firmeza de la fruta y controlar al mismo tiempo patologías, como moho gris (*Botrytis cinerea*) y pudrición de ojo de buey (*Neofabraea sp.*), además de inhibir completamente la escaldadura superficial. La combinación de ambos logró, al final de una conservación de 240 días, que la fruta disminuya su firmeza, sin afectar su control sobre mohos y escaldadura (Spotts *et al.*, 2007).

El color de la piel es el segundo parámetro de madurez que resulta más afectado por el tratamiento con 1-MCP, pues al retrasar la degradación de la clorofila (Trincherro *et al.*, 2004; Chiriboga *et al.*, 2008), se logra mantener un color verde más intenso (mayor valor

hue) en comparación a las frutas Control en cada salida durante su almacenamiento, lo cual es un atributo deseable en esta variedad. La dosis aplicada si bien no tiene un efecto de bloqueo cómo puede suceder con la firmeza, puede afectar la velocidad del proceso y ralentizarlo de manera negativa (Chiriboga *et al*, 2014), lo que no ocurrió a la dosis del ensayo pues el color fue disminuyendo paulatinamente desde el momento de la cosecha.

En relación a la acidez titulable y el contenido de sólidos solubles, su comportamiento siguió los patrones observados en ensayos anteriores en el Valle para esta y otras variedades de invierno (Williams y Packhams), teniendo una acción positiva de retención de acidez pero sin afectar de manera significativa el contenido de sólidos solubles (Candan y Calvo, 2003, 2014; Calvo 2004b; Sanchez 2010; Calvo y Candan, 2012a). Sin embargo, otros autores han encontrado que éstos pueden aumentar en los frutos tratados, sobre todo los primeros meses (Chiriboga *et al*, 2014), ello no ocurrió en este ensayo pues solo fue significativa la diferencia a favor de la pera tratada a los 240 días de almacenamiento.

Un aspecto muy importante en relación a la madurez, es la correlación que existe entre las fechas de cosecha y la incidencia de escaldadura superficial en peras Beurrè de D' Anjou. Estudios locales de Calvo *et al* (2015), efectuados coincidentemente con la primera temporada de este ensayo (2013), dieron como resultado que las peras a diferencia de lo observado en manzanas (Anet, 1972), presentaban menores daños por escaldadura cuando la cosecha era temprana en relación a una cosecha tardía. Ello coincide con lo observado por Whitaker *et al.*, (2009) en peras Bartlett y Gamrasni *et al* (2010) en peras Spadona, donde mayor firmeza se relacionó con mayor incidencia de daño por ES. Este comportamiento fue observable solo durante la semana de vida en estante a 20°C, ya que coincidentemente con este ensayo, en ninguna de las fechas se presentó daño por escaldadura en peras al momento de la salida de la cámara. En el ensayo de Calvo (2015), la fruta de cosecha tardía tuvo un nivel de daño alto, con un IES de 2.84 a los 90 días de almacenamiento mientras que en la misma evaluación, los frutos de la cosecha temprana no tuvieron daños. No obstante, a partir de los 210 días, dejó de haber diferencias significativas en el nivel de daño por ES.

6.2 Efecto del 1-MCP en relación a la presencia de α - farnesenos y trienos conjugados y su incidencia sobre la escaldadura superficial.

Los α -farnesenos (AF) se forman durante el almacenamiento en frío (por transformación de sustancias precursoras de la piel de frutos de peras y manzanas en

precosecha) y a causa de las bajas temperaturas, aun siendo relativamente volátiles, se acumulan en la cutícula y ceras epicuticulares. Son luego oxidados a trienos conjugados (TC), que son compuestos tóxicos que permanecen en la cutícula, reaccionan con las proteínas y oxidan los lípidos de las membranas celulares. Ese daño, facilita el contacto entre las enzimas oxidativas y sus sustratos, causando el pardeamiento característico e incluso la muerte celular propio de la escaldadura superficial (Anet, 1972; Argenta *et al.*, 2003; Gapper *et al.*, 2006, Isidoro y Almeida, 2006; Whitaker *et al.*, 2009) (Figura 11).

A pesar de décadas de investigación, la manera por la cual la síntesis de α -farnesenos es controlada a nivel molecular no se ha aclarado completamente, pero se acepta que la cantidad de AF producidos y en especial la detección temprana de sus productos de oxidación (TC) pueden actuar como muy buenos indicadores de la marcha de esta fisiopatía en cámara (Whitaker, 2007; Whitaker *et al.*, 2009; Calvo, 2012 a,b)

Las curvas de acumulación de AF obtenidas en este trabajo siguen un comportamiento similar al observado en los trabajos de Xie *et al.* (2014) y Zhao *et al.* (2016). La síntesis de α -farnesenos en D'Anjou parece seguir un patrón varietal propio, lo cual se observa tanto en la fruta Control como en la tratada con 1-MCP.

En relación a los TC, Xie *et al.*, (2014) observaron en fruta Control que seguían aumentando hasta el final del almacenamiento, pero en nuestro ensayo se comportaron como en los de Zhao *et al.*, (2016) después de aumentar hasta los 90 días, se mantuvieron estables. Curvas similares hallaron Whitaker (2007) e Isidoro y Almeida (2006) en peras Rocha.

Dado que la síntesis de α -farnesenos es inducida por el frío y se considera etileno dependiente (Fig. 11), una disminución de la cantidad de esta hormona en la cámara o la inhibición de su acción y síntesis por parte del 1-MCP, constituyen herramientas muy efectivas para frenar la aparición de la escaldadura superficial (Argenta *et al.*, 2003; Gapper *et al.*, 2006; Isidoro y Almeida, 2006; Gamrasni *et al.*, 2010, Calvo, 2011), aunque es importante notar, que en las dos temporadas de este trabajo, el incremento máximo de α -farnesenos en fruta Control entre los 60 y 90 días, ocurrió antes de que la pera fuera capaz de producir cantidades detectables de etileno a salida de cámara. Otro tanto ocurrió en la fruta tratada, en la que no se registraron emisiones de etileno detectables ni a salida de cámara ni en vida en estante y aún así presentó un cierto nivel de α -farnesenos (Figuras 15 y 16, 17 y 19, Tabla 7), dando a entender que pueden existir otros mecanismos de síntesis del AF etileno- independientes.

En esta variedad y en manzanas Law Rome e Idared (Pechouse *et al.*, 2005), se comprobó que el 1-MCP interviene en la inhibición de la transcripción de PcAFS1, gen que codifica la enzima α -farneseno sintetasa (AFS), última enzima de la ruta de formación del α -

farneseno (convierte el farnesil difosfato en α -farneseno). Ello retrasaría o evitaría el desarrollo del escaldado.No obstante, existe un desfase importante entre la transcripción inicial de la enzima y la acumulación de α -farneseno, lo que sugiere que su síntesis es muy lenta o existe una limitación a nivel de sustrato (Gapper *et al*, 2006;Lurie y Watkins, 2012).La enzima es inducida por etileno, de ahí la acción inhibitoria del 1-MCP , aunque se detectaron pequeños niveles de transcripción en peras tratadas que no mostraban producción de detectable de etileno, lo cual puede demostrar que hay otros elementos capaces de regular la producción de AF.

En relación a los TC, todavía no han sido elucidadas completamente las vías metabólicas que desencadenan su generación en la piel de peras y manzanas,aunque se sugiere que la conversión de los productos de autooxidación de α -farneseno estaría mediada por enzimas, en especial la glutatión peroxidasa (GPXS) y glutatión transferasas (GSTs), capaces de reducir hidroperóxidos de alquilo a los alcoholes correspondientes como parte de la defensa del sistema antioxidante. Asimismo, aunque la autooxidación de ambos genera una importante cantidad de MHO, asociada a la inducción de la escaldadura, algunos autores sugieren que no es más que un subproducto de las reacciones de radicales libres que causan daño celular (Anet, 1972 ;Whitaker, 2007). Reafirmando la intervención de los TC en la producción de la ES, Pechous *et al*, (2005) hallaron que la aplicación de TC y sus hidroperóxidos en manzanas antes de su puesta en cámara, generó una escaldadura indistinguible de la que ocurre durante el almacenamiento en frío.

En las dos temporadas de ensayo, los TC en la fruta Control tuvieron un comportamiento similar tanto en el tiempo en que llegaron a su máxima expresión (90 días) como la cantidad máxima alcanzada (20 nmol/cm² promedio). Dos meses más tarde el daño por escaldadura era superior al 95%. Este desfase ha sido documentado previamente (Gapper *et al.*, 2006). La única diferencia consistió en una menor incidencia de escaldadura a los 120 días (2014) acorde a un tiempo más corto de acumulación de TC en los meses anteriores. En la temporada 2013 se acumularon desde los 30 días en tanto que en la temporada 2014 recién lo hicieron a partir de los 60 días. Ello no tuvo correlato con la cantidad inicial de α -farnesenos ya que en la temporada 2014 el valor a cosecha duplicó el de la temporada 2013, pero no por ello se produjo un acortamiento del tiempo de producción de los TC ni tampoco se correlacionó con una cantidad mayor. La explicación a este comportamiento hallaría respuesta en la actividad del sistema antioxidante de la piel de las peras (23% en 2014 y 18 % en 2013).

Du y Bramlage (1993) y Zoffoli *et al.*, (1998) se centraron en la relación entre los valores de los diferentes TC, más que en la cantidad de TC₂₈₁, que es la usada rutinariamente para el cálculo de los TC totales (Anet,1972), como predictores de daño. Esta

relación resultó inversa, ya que una elevada proporción de TC₂₅₈ en relación a TC₂₈₁ produjo una menor incidencia de escaldadura tanto en manzanas como en peras D'Anjou y Packham's Triumph, una vez retiradas las frutas de la cámara. Relaciones inferiores a 1, mostraban mayor daño y superior a 2, menor o incluso inexistente. Ello coincide con lo observado en nuestro ensayo, pues en la fruta Control después de 90 días esta relación se mantuvo siempre por debajo de 1, en tanto en las tratadas con 1-MCP superaba los 2 (datos no publicados).

Se comprobó también que los diferentes compuestos trienos conjugados evolucionan de forma distinta. Estudios de Chiriboga *et al.* (2008), encontraron que la concentración de los compuestos TC₂₅₈ durante las primeras semanas de conservación fue más elevada en los frutos de pera tratados y luego disminuye de manera que al final de la conservación, la concentración resulta mayor en los frutos Control. Los valores de los compuestos TC₂₈₁ en los frutos tratados se mantuvieron siempre por debajo de los TC₂₅₈. En nuestro ensayo observamos el mismo tipo de comportamiento (datos no publicados). No obstante es importante ver que los valores de todos los TC de la fruta tratada siempre se mantuvieron en niveles muy bajos en relación al Control (Figuras 18 y 20).

Whitaker (2007) sugiere que las especies TC₂₈₁ podrían desencadenar o intensificar las reacciones de los radicales libres que conducen al desarrollo de la ES. En coincidencia con este autor, la diferencia fue significativa a los 90 días en el 2013 y a los 120 días en la temporada 2014 y se correlacionó directamente con una mayor incidencia y severidad (mayor IES) observada en los 30 días posteriores (Tabla 8 y Figura 21).

Calvo *et al.* (2015) encontraron que es necesario superar una concentración determinada de TC en piel para que se manifiesten los síntomas de ES. En peras 'Beurre D' Anjou', no se desarrolla escaldadura cuando el contenido de TC es menor a 20 nmoles/cm². Ello explica por qué no habría daño en las peras tratadas con 1-MCP, ya que en ningún momento los TC superaron los niveles críticos. Por otra parte, en la fruta Control ese valor se alcanza a partir de los 90 días, un mes antes de observarse los síntomas.

6.3 Efectos de las dosis de aplicación 1-MCP sobre el control de la escaldadura superficial

Existe una sensibilidad varietal muy importante en las respuestas al tratamiento con 1-MCP, en lo referente a lograr una madurez normal de la fruta a salida de frío y el control de la escaldadura, aún en un mismo lugar de producción. Por ello, los investigadores han propuesto dosis y estrategias diferentes en función del tiempo de conservación de la fruta y el porcentaje de ES que se pretende aceptar en cada una de ellas (Candan y Calvo, 2003;

Calvo, 2004b; Chen y Spotts, 2005; Gapper *et al.*, 2006; Bai *et al.*, 2006; 2009, Calvo y Candan, 2015).

No se ha establecido una cantidad de 1-MCP válida a nivel mundial que permita lograr un control total de escaldadura en peras D'Anjou. Chen y Spotts (2005) y Bai *et al.* (2009) observaron que el escaldado superficial en dichas peras no se controlaba con dosis inferiores a 25 nL/L (250ppb) en un largo plazo. Acorde a esta premisa, las 300 ppb aplicadas en el ensayo como dosis comercial recomendada, permitieron controlar completamente el daño por escaldadura tanto a salida de cámara como en 7 días de vida en estante, durante los 240 días que duró el ensayo. En contradicción con estas observaciones, Xie *et al* (2014) lograron un control total de la escaldadura en esta variedad con una dosis de 150 ppm, después de 240 días de almacenamiento en cámara común a -1,1°C (aunque no lograron maduración adecuada durante 7 días a 20°C). En ensayos realizados en el Alto Valle (Calvo, 2012a) se obtuvieron resultados similares, ya que la aplicación de dosis de 100 a 200 ppb resultaron totalmente efectivas para controlar escaldadura dentro de los 7 días (no así a 14), teniendo una madurez normal después de 8 días de vida en estante, en un almacenamiento a largo plazo. No obstante esta respuesta no se repitió en otros años, aún en este mismo lugar de producción (Calvo, 2014; Calvo *et al.*, 2016a), mostrando la variabilidad de las respuestas en esta variedad.

Con la aplicación de la dosis comercial recomendada (300ppb), en ninguna de las temporadas del ensayo se observó ablandamiento de los frutos tratados dentro de la semana de vida en estante manteniéndose niveles de firmeza muy elevados, que posiblemente no hubieran disminuido en unos pocos días más de vida en estante. Esto permite pensar que los resultados un tanto inconsistentes con respecto a la capacidad de maduración de peras y control de daños en D'Anjou tratadas con 1-MCP reportados en la literatura (Cheny Spotts, 2005; Bai *et al*, 2006; 2009, Xie *et al*, 2014) se deben tanto a diferentes lugares y forma de producción de la fruta (Gapper *et al*, 2006), como a una extrema sensibilidad varietal (Calvo, 2004; 2012a; 2014). Es por ello que resulta indispensable realizar ensayos locales continuados durante varios años, para poder ajustar con mayor precisión las variables que interactúan en las respuestas a esta tecnología.

6.4. Evolución del sistema antioxidante de las peras tratadas con 1-MCP y su relación con la escaldadura superficial.

El estrés en plantas, incluido el estrés por frío, conduce a la alteración del balance producción/eliminación de especies reactivas del oxígeno provocando condiciones de estrés oxidativo en la célula y produciendo diversas respuestas al mismo (Blokhina *et al.* 2003;

Mittler *et al.*, 2004; Apel y Hirt, 2004). El proceso oxidativo asociado con la escaldadura superficial, desencadenado por los TC, probablemente implica la actividad de varias EROs que conducen a una irrecuperable disrupción de las membranas y alteración de otros componentes celulares (Isidoro y Almeida, 2006; Whitaker, 2007; Whitaker *et al.*, 2009, Lurie y Watkins, 2012, Lu *et al.*, 2014).

El almacenamiento de los frutos en la cámara supone un estrés abiótico continuo y por ello los frutos responden modificando su capacidad antioxidante total, que puede ser medida a través del nivel de DPPH. Se sabe que el mantenimiento de un adecuado balance entre las EROs generadas y el contenido de antioxidantes formados como mecanismo respuesta, están asociados con una mayor resistencia al desarrollo de la escaldadura (Toivonen, 2004; Lurie y Watkins, 2012), de allí la importancia de estudiar la evolución de la capacidad antioxidante total de las células de la piel de la pera durante la conservación por frío.

El DPPH es un radical libre estable que tiene un electrón de valencia desapareado en un puente de un átomo de nitrógeno y puede reaccionar con diversos compuestos antioxidantes que contengan grupos OH. Es el método más popular por ser económico y sencillo de realizar y numerosos trabajos científicos lo utilizan para comparar el poder antioxidante total en frutas y hortalizas. Lamentablemente, dado que existen varios protocolos aceptados en su metodología no totalmente estandarizados, muchas comparaciones no resultan del todo válidas, ya que existen diferencias importantes entre los resultados hallados (Sharma y Bhat, 2009). Ello puede explicar en parte las diferencias de valores citados para peras y manzanas de una misma variedad en la bibliografía.

Es conocido que la capacidad antioxidante de las peras está influenciada por numerosos factores entre los que se destacan la variedad (Galvis-Sánchez *et al.*, 2003; Salta *et al.*, 2010), características de cultivo y medio ambientales, la fecha de cosecha (Calvo *et al.*, 2015) y la duración y condiciones de almacenamiento. También incide fuertemente la parte del fruto considerada, mencionada con anterioridad (ver punto 5.2; Ostek, 2016a).

Es ampliamente aceptado que frenar los mecanismos de oxidación del α -farneseno tanto para peras como para manzanas, manteniendo un alto nivel de metabolitos antioxidantes, permitiría retrasar la aparición de ES o al menos mitigar la severidad (Gapper *et al.*, 2006; Whitaker *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2010) y que los mecanismos bioquímicos de desarrollo de la ES, tendrían un mismo patrón en las dos frutas (Isidoro y Almeida, 2006; Whitaker, 2007; Whitaker *et al.*, 2009; Lurie y Watkins, 2012). No obstante, existen en realidad algunos contrastes en relación a la inducción a la síntesis del etileno interno y el nivel de antioxidantes, que podrían plantear diferencias entre la sensibilidad de las peras y las manzanas a la escaldadura. Así, aunque la mayoría de las manzanas producen etileno

después de la cosecha, las peras de invierno, incluida la D' Anjou, necesita del frío para iniciar la síntesis autocatalítica de etileno (Calvo, 2014).

A su vez la cantidad de antioxidantes en peras suele ser menor que los hallados en manzanas (Calvo, 2014). Si se comparan ambas frutas, las peras poseen menor capacidad antioxidante total y concentración de fenoles (Silva *et al.*, 2010). Estudios realizados en el Alto Valle en peras D' Anjou, indican que entre una cosecha temprana y una tardía, el valor de DPPH puede oscilar entre 18 a 30%, en tanto en los cultivares de manzanas los promedios rondarían 40% en la variedad Cripps Pink, 50% en la Red Delicious y 80-90% en Granny Smith que es la de mayor capacidad antioxidante (Calvo, 2014, Calvo *et al.*, 2015).

Normalmente la capacidad antioxidante se asocia fuertemente a la fecha de cosecha. En variedades de manzanas susceptibles a ES, las cosechas tempranas, por tener menor contenido de metabolitos antioxidantes y a su vez una mayor velocidad de síntesis de α -farneseno suelen tener mayor incidencia de daños por ES (Anet, 1972 ; Calvo 2012b). En el caso de las peras, no hay coincidencia entre diversos trabajos en relación a este tema. Así, mientras Zoffoli *et al.*(1998), en Beurré D' Anjou y en Packham's Triumph e Isidoro y Almeida (2006) en Rocha, observan igual comportamiento que las manzanas; Gamrasni *et al.* (2010) en Spadona, Zoffoli *et al.* (1998), Whitaker *et al.* (2009) en Bartlett y Calvo *et al.*(2015) en Beurré D' Anjou en nuestra zona, concluyeron lo opuesto. En este último estudio, los investigadores observaron que la capacidad antioxidante de las peras aumentó a medida que se retrasó la fecha de cosecha, pero ello no se sostuvo en el tiempo y a medida que se prolongó el almacenamiento en cámara, se observó un efecto opuesto (240 días) .La capacidad antirradicalaria aumentó hasta llegar a un máximo a los 120 días y luego empezó a descender, haciéndolo en forma mucho más pronunciada en las cosechas tardías, lo que se tradujo en mayores daños por escaldadura en dichos frutos. Es decir, las cosechas tardías en esta variedad presentarían mayor incidencia de ES. En el caso de nuestro ensayo también se observó un comportamiento bastante similar, pero verificado en diferentes años. En el 2014 la fruta ingresó en frío con prácticamente un 20% más de capacidad antioxidante que el año precedente y sin embargo al concluir los 240 días de almacenamiento ambas llegaron a valores similares, que rondaron el 33%, perdiendo valor la diferencia inicial. Se verificó, no obstante, un correlato con el nivel de daño por escaldadura, que después de los 120 días (2014) resultó menor tanto en cantidad como en severidad (70% vs 55%; IES 1,08 vs 0,90) (Tabla N°8, Figura 21). Silva *et al.*, (2010) en Rocha observaron un efecto similar a D' Anjou, en fruta cosechada más tardíamente y lo correlacionaron con una menor incidencia de ES, aunque la que mejor comportamiento tuvo al respecto fue la cosechada en su momento óptimo. Es decir que no solo tiene incidencia la variedad sino nuevamente las condiciones y el lugar de cultivo.

Dado que el DPPH cuantifica una gran cantidad de compuestos antioxidantes, brinda una idea general del funcionamiento del sistema, pero se sabe actualmente que no todos los metabolitos tienen la misma importancia en la contribución a esa capacidad total, y que varían en función principalmente de la especie. Anet (1974) reportó que la ES no ocurría si la cantidad de antioxidantes hidrofóbicos permanecía alta durante el almacenaje. Se identificaron 11 antioxidantes naturales de la cutícula de las manzanas entre ellos el α -tocoferol (vit. E). En Italia, Gallerani *et al.* (1990), encontraron tres veces más α -tocoferol en el tejido sano de manzanas 'Granny Smith' que en el sector escaldado. Zoffoli (1994), trabajando con peras Packhams Triumph y 'Beurrè D' Anjou', encontró mayor cantidad del compuesto en frutos cosechados con mayor madurez que en fruta más inmadura y el doble en el sector sano comparado con el dañado (Calvo 2012b).

Carbonaro *et al.* (2002) encontraron que el sistema de cultivo podría afectar la cantidad y el tipo de metabolitos antioxidantes hallados en la fruta. Observaron que duraznos (cv. Regina Bianca) y peras (cv. Williams) provenientes de montes orgánicos, tuvieron mayores niveles de polifenoles totales, existiendo además mayores contenidos de ácido ascórbico y cítrico en duraznos y más α -tocoferol en peras, en relación a los montes tradicionales, postulando que hay un mejoramiento del sistema antioxidante en plantas cultivadas bajo prácticas orgánicas.

En relación al efecto de la aplicación del 1-MCP, no se pudo establecer una diferencia clara atribuible al tratamiento entre la fruta Control y la tratada en la conservación de la actividad antirradicalaria a medida que transcurrió el almacenamiento. En ambas frutas el DPPH fue aumentando como un patrón común en ambas temporadas, pero en 2013, varios meses la capacidad antioxidante de la fruta Control fue mayor que la tratada, en tanto en 2014 se estabilizó después de 30 días y se mantuvieron sin diferencias hasta el final, (240 días) donde el porcentaje por el contrario se inclinó a favor de las tratadas (Figuras 22 y 23). Ello coincide con lo hallado por Calvo *et al.*(2016b) también en D' Anjou, aunque destacan un descenso muy marcado del valor a los 60 días en la fruta Control, que solo se observó levemente en la temporada 2014 (Figura 23). También concuerda con lo hallado por Silva *et al.*, (2010), en pera Rocha tratada con 500 ppb de 1-MCP, donde existió un completo control de ES, pero a nivel antirradicalariono no hubo efecto alguno del tratamiento en los 240 días que duró el ensayo. Lo propio había sido documentado en manzana Golden Smoothie por Vilaplana *et al.*,(2006) y en Red Delicious, Fuji y Granny Smith por Wrolstad y Balz-Frei (2003), agregando que el tratamiento tampoco afectó el contenido de polifenoles totales, con una dosis del orden de 1000ppb..

Estudios recientes sobre los cambios metabolómicos asociados a la producción de la ES en manzanas, demostraron que otros componentes químicos, además de los ya

conocidos (TC y metabolitos antioxidantes), tendrían injerencia en la aparición de esta fisiopatía (Rudell *et al.*, 2011). Tanto la teoría del daño por TC, provenientes de la oxidación de α -farneseno ampliamente aceptada (Du y Bramlage, 1994; Ekman *et al.*, 2004; Isidoro y Almeida, 2006; Gapper *et al.*, 2006; Whitaker, 2007; Lurie y Watkins, 2012) como la del desbalance entre las EROs y los niveles de antioxidantes (Larrigaudière *et al.*, 2008 ;Calvo *et al.*, 2015), no podrían explicar completamente la susceptibilidad de todas las variedades de peras y manzanas. Entre los nuevos metabolitos, que se suman a los cambios metabolómicos anteriores, aparecen diversas clases de triterpenoides. Los triterpenos son una extensa familia de compuestos que abarcan los fitoesteroles y que son componentes naturales de la membrana plasmática que ejercen un papel importante tanto en el mantenimiento de la fluidez y permeabilidad como en la unión de las proteínas intrínsecas de la misma (Moreau *et al.*, 2002). En particular el b-sitosterol y campesterol y los metabolitos asociados a sus cambios (esterificaciones), incluyendo glucósidos acilados (ASG), esteril glucósidos (SG) , esteril ésteres (SE), así como esteroles libres (FS), experimentan cambios importantes durante el período de almacenamiento en frío y en especial la puesta de la fruta a temperatura ambiente (Rudell *et al.*, 2009). Rudell *et al.*,(2009) comprobaron que durante los dos primeros meses de puesta en frío de la fruta, ocurrían cambios metabólicos que diferían según se tratase de frutos susceptibles o no a la ES. Rudell *et al.* (2011), trabajando con manzanas 'Granny Smith' tratadas con 1-MCP o con DPA, observaron que existían diferencias importantes en el comportamiento de los metabolitos en la cámara. Mientras que los niveles de ASG aumentaban abruptamente a partir de los 30 días, los FS y SG se mantenían estables y los SE disminuían en la fruta control durante el almacenamiento. En la fruta tratada con 1-MCP o DPA, solo se observó un lento aumento de los SE, mientras los demás compuestos se mantuvieron estables los 180 días que duró el ensayo. Esta fruta no evidenció daño alguno por ES, como sí sucedía con el control, a partir de los 90 días. A su vez, fuera del frío, en la fruta Control los ASG y SE cambiaban rápidamente de insaturados a formas saturadas, a la vez que aumentaban los niveles de SG, lo cual no ocurría con las que tenían DPA o 1-MCP, que conservaban un nivel bajo de ASG. Esto indicaría que el metabolismo de los fitoesteroles puede ser regulado por etileno o está ligado a otros procesos de madurez y por otra parte, una mayor conjugación de los fitoesteroles sería el resultado de una reacción al estrés oxidativo generado por las condiciones de almacenamiento.

La acumulación de EROs también puede deberse a un incremento en la generación de H₂O₂ o a una disminución en su degradación (Calvo, 2011) y es un indicador de estrés oxidativo durante la maduración. Lu *et al.*, (2014) encontraron una asociación importante entre el nivel de este metabolito y la incidencia y severidad de daño por ES en manzanas

Fuji almacenadas a 0°C durante 28 semanas y en especial al aumentar la temperatura durante la vida en estante. El 1-MCP logró inhibir la acumulación de H₂O₂ en peras Suli puestas a temperatura ambiente durante 24 días, protegiendo la membrana celular y retrasando la senescencia de la fruta (Chiriboga *et al*, 2014). Un efecto similar comprobó Larrigaudière *et al.*,(2004) en peras Blanquilla, tratadas con 100 ppb de 1-MCP, almacenadas a – 0,5° C , comprobando además que tenían un 20% menos de EROs que la fruta control después de 5 meses. Ello se correlacionó con una mayor actividad de las enzimas antioxidantes, en especial ascorbato peroxidasa y catalasa. Esta elevada capacidad enzimática antioxidante fue registrada también por Fu *et al.*, (2007) en peras Yali tratadas con 200 ppb de 1-MCP y por Li *et al.*(2016), a una dosis de 1000 ppb, hallando nuevamente una disminución muy importante de la cantidad de H₂O₂ como efecto de la aplicación del 1-MCP. Algunos investigadores observaron no obstante,el efecto contrario. Yazdani *et al.*, (2011) comprobaron que la actividad de las enzimas CAT y POX (peroxidasa) fue menor en las peras asiáticas tratadas con 2000 ppb almacenadas a 1°C por 180 días y la SOD permaneció sin cambios. Shaham *et al.*, (2003), por otra parte, trabajando en Granny Smith tratada con 1000 ppb y almacenada a 0 °C, vieron que la actividad de cinco enzimas antioxidantes (CAT, POX, SOD, APX y GR) fue menor en la fruta tratada y postularon que quizás el efecto inhibitor del 1-MCP sobre la acumulación de α farnesenos y TC podría obviar la necesidad del tejido epidérmico de activar algunos mecanismos antioxidantes y por ello no se observaría una capacidad antiradicalaria total aumentada, aunque el tratamiento tenga un control completo sobre la ES.

De todas formas, la acción del 1-MCP sobre las enzimas sigue siendo inconsistente y parece estar estrechamente relacionada a cada fruta y variedad en particular (Lurie y Watkins, 2012), pero se acepta que existe algún tipo de efecto protector con mecanismos aún no bien dilucidados.

6.5 Cambios en el contenido de los metabolitos antioxidantes durante el almacenamiento.

Los metabolitos antioxidantes están representados por un número considerable de moléculas de bajo peso molecular entre las que se destacan al ácido ascórbico, el glutatión y los tocoferoles. Numerosos compuestos fenólicos además del α tocoferol (flavonoides, taninos y ligninas) participan también activamente (Blokhina *et al*, 2003).

Los antioxidantes actúan como una red cooperativa, empleando una serie de reacciones redox. Anet (1972) postuló que la resistencia a sufrir ES en parte se podría deber al correcto funcionamiento del sistema antioxidante de la piel de las frutas, donde el

ascorbato y las enzimas juegan un rol muy importante.No obstante, experimentos de sobreexpresión de la producción de antioxidantes no dieron siempre como resultado una mejora de las defensas antioxidantes. Un aumento en la capacidad antioxidante no se correlacionó positivamente en todos los casos con un grado de protección mayor, sino que son varios los factores que intervienen en conjunto para producir un resultado eficaz. Aspectos tales como la compartimentación de EROs, la formación y localización del agente antioxidante, su síntesis y transporte, la capacidad de inducir la defensa y la cooperación (y / o compensación) entre diferentes sistemas antioxidantes son los determinantes de la competencia del sistema en su conjunto (Blokhina *et al.*, 2003).

Aunque en manzanas el contenido de antocianinas correlaciona negativamente con la ES y el contenido de α tocoferoles disminuye en cámara conforme aumenta la severidad de la escaldadura (Anet, 1974; Shaham *et al.*, 2003; Rudell *et al.*, 2009), ningún antioxidante en particular ha sido asociado con la ES en peras (Calvo *et al.*, 2016b).

El AA o vitamina C, es una sustancia ácida muy reductora que se encuentra ampliamente distribuida en los tejidos vegetales y en los frutos pomos se concentra en la piel (Blokhina *et al.*, 2003). Esta pequeña y sencilla molécula es señalada por varios investigadores como un factor clave en la detoxificación de EROs, en especial del H_2O_2 en las frutas donde se concentra (Noctor y Foyer, 1998.; Davey *et al.*, 2000; Blokhina *et al.*, 2003; Chen y Gallie, 2005;) y su concentración se correlaciona con la protección contra desordenes internos, como pardeamientos en peras Conference y Rocha (Veltman *et al.*, 2000; Franck *et al.*, 2007).

Pavet *et al.*,(2005), trabajando sobre procesos de senescencia y muerte celular programada en mutantes de Arabidopsis que producían bajas cantidades de ascorbato, demostraron que la abundancia de ácido ascórbico modificaba el umbral para la activación de las respuestas de defensa innatos de plantas a través de mecanismos redox que son independientes del programa de senescencia natural.

El AA no se encuentra en gran cantidad en peras. Barda (2011) reporta en Williams en el Alto Valle valores promedio de 2,2 mg/100g en fruta entera, en tanto Davey *et al.* (2000) cita valores promedios de 3-4 mg/100g a cosecha. Al igual que los fenoles, su contenido se concentra en la piel. En la experimental de la tesis se hallaron en D' Anjou, valores promedio de 6,5 mg/100 g en piel, al momento de la puesta en frío. Calvo *et al.* (2016b), encontraron valores un poco más altos de 8 mg/100 g en la misma variedad, lo cual es atribuible a la variación entre temporadas. Galvis Sanchez *et al.*, (2003), para D'Anjou en Chile reportan 4 mg/100g, aunque es importante mencionar que este valor más bajo, también coincide con un valor de polifenoles en piel menor que lo obtenido en esta tesis.

El AA es muy lábil y aunque la mejor manera de conservarlo en frutas es poniéndolas en frío, su contenido disminuye a medida que transcurre el almacenamiento. Si bien el ensayo presentó un aumento significativo en ambos tratamientos el primer mes como inducción de su síntesis por frío, experimentó luego una abrupta disminución llegando entre los 60 a 90 días en cámara a sus valores más bajos (2,4 mg/g promedio, en la fruta Control). Existió un pequeño pico de producción a los 120 días, pero al finalizar el ensayo se mantenían estos valores. Coincidentemente, Chiriboga *et al.* (2013) encontraron en peras Conference que el AA se estabilizaba en sus valores más bajos entre los 60 a 100 días, siendo también cuantitativamente iguales (2 mg/100 g). También Franck *et al.* (2003) y Calvo *et al.* (2016b), observaron una disminución en el contenido de AA desde la puesta en frío, pero más pronunciada hacia los 60 días en la fruta Control, que continuaba bajando gradualmente hasta el final del almacenamiento. Esa caída abrupta de ascorbato precedió en dos meses la aparición de la ES en la fruta Control y coincide con el momento en que empiezan a acumularse en forma exponencial los TC (Figura 20, Tabla 7), productos de la oxidación de α -farneseno de la fruta Control sintetizado desde la puesta en frío (con un pico alrededor de los 90 días (Figura 19, Tabla 7), a la vez que se estabiliza la cantidad de PFT en ambos tratamientos con un valor 30% menor que al momento de su entrada a cámara. Ello indica que alrededor de los 60 días de puesta la fruta en cámara, parece haber un punto de inflexión y los metabolitos antioxidantes parecen ser insuficientes para detener los procesos oxidativos. Calvo *et al.* (2016b), observaron esos efectos en la temporada siguiente a éstos ensayos, trabajando con la misma variedad, lo que refuerza estas premisas.

En relación al tratamiento con 1-MCP en peras, existe escasa bibliografía sobre el comportamiento del ácido ascórbico en este fruto, siendo además las investigaciones muy recientes.

En el ensayo la fruta tratada con 1MCP disminuyó su contenido de AA en función del tiempo, siguiendo la cinética de las peras Control, pero conservando siempre valores superiores durante los primeros 90 días. Yazdani *et al.* (2014) trabajando con dos variedades de peras Europeas 'Shahmiveh y Sebri', tratadas con 300 y 600 ppm, obtuvieron resultados similares. Comprobaron que el 1-MCP no lograba mantener el nivel de AA inicial pero ejercía un importante efecto protector, ya que a los 120 días la fruta Control había perdido un 60% del AA, pero las tratadas solo un 20% y 14% con la menor y mayor dosis de 1-MCP respectivamente. Esto se relacionaba con un menor pardeamiento interno en las frutas. Así mismo, este efecto del mantenimiento del ascorbato por parte del 1-MCP también fue encontrado en peras Conference (Chiriboga *et al.*, 2013) y en D'Anjou (Calvo *et al.*, 2016b). Estos autores sostienen que peras con altos contenidos de AA a cosecha tienen

menor propensión a la escaldadura superficial. Ello permitiría suponer que el tratamiento con 1-MCP, al contribuir al mantenimiento de contenidos más elevados de ácido ascórbico en peras en los primeros meses, ayudaría a controlar procesos oxidativos como el escaldado superficial y los pardeamientos internos.

Otros autores no observaron efectos o resultaron opuestos: Silva *et al.*, (2010) no encontraron diferencias atribuibles al tratamiento en la disminución de los contenidos de AA en pera Rocha, con 500 ppm de 1-MCP, almacenada en frío normal a - 0.5°C, durante 8 meses; tampoco Vilaplana *et al.* (2006), en manzanas Golden Smoothie tratadas con 650 ppm. En tanto, Larrigaudière *et al.*, (2004), observaron en peras Blanquilla que la fruta tratada (300 ppm) mantuvo siempre niveles más bajos de ascorbato que la fruta control.

En relación a los polifenoles totales (PFT), su actividad biológica está relacionada a su habilidad para quelar metales, inhibir la actividad de la enzima lipooxigenasa y actuar como atrapadores de radicales libres, en especial el H₂O₂ (Blokhina *et al.*,2003). Así mismo, su oxidación por acción de la polifenoloxidasas (PPO) como consecuencia de la pérdida de compartimentación celular, es el último paso que lleva directamente a la aparición de síntomas de la ES (Lurie y Watkins, 2012; Lu *et al.*, 2014). Dado que los polifenoles son compuestos sumamente reactivos y que van cambiando con la madurez la toma y preparación de la muestra y el método de análisis son puntos críticos que deben tenerse en cuenta a la hora de realizar comparaciones con datos provenientes de la literatura (Barda, 2011). Esto explica, además de la variabilidad propia de la variedad, la madurez, cuidados culturales y zona geográfica (Silva *et al.*, 2010) la amplia disparidad existente entre los contenidos de PFT de peras reportados en bibliografía.

En nuestro ensayo encontramos una concentración de PFT en piel de 365 mg/100 g a cosecha, valor muy similar a los reportados por Zhao *et al.*,(2016) con 400 mg/100 g. Galvis Sanchez *et al.*, (2003) en Chile, encontraron valores mucho más bajos, de 123 mg/100 g, en tanto Ostek (2016a) en pera Radana encuentra en piel valores de 917 mg/100 g en base seca y Wrolstad y Frei (2003) en manzanas reportan para Red Delicious valores de 700 mg/100 g a cosecha, siendo para ellos la manzana que más PTF contiene. Zhao *et al.*,(2016) encontraron cantidades mayores en la piel de D'Anjou asoleadas (0.8 mg/g). La evolución seguida por los PFT siguió un patrón bastante similar al DPPH, excepto en el primer mes donde los polifenoles bajaron un 24 % en la fruta Control (Figura 25), mientras que el DPPH aumentó un 45% (Figura 23). Esta diferencia puede explicarse en parte por el aumento observado en el ascorbato para el mismo mes (34%) (Figura 24). Ese mismo efecto de aumento de DPPH en el primer mes (tanto de frutas con y sin tratamiento) fue observado por Vilaplana *et al.*, (2006) en manzanas, aunque ellos justificaron ese valor en el aumento de polifenoles en detrimento del AA que disminuyó en el mismo lapso. Ello podría

reforzar la idea de una presencia más importante de ascorbato como antioxidante en peras y que la puesta en frío desencadena rápidamente importantes respuestas en el sistema antioxidante. El DPPH aumentó progresivamente, en tanto los PFT se mantuvieron casi invariables entre los 60 a 210 días para disminuir abruptamente el último mes del ensayo (Figura 25), donde casi la mitad de la fruta escaldada (48%) presentó el máximo grado de severidad de daño(G4).

Diversos investigadores encontraron que los PFT en manzanas no manifiestan grandes variaciones durante el almacenamiento. Van der Sluis *et al.*(2001), trabajando sobre cuatro variedades de manzanas europeas, documentaron que el contenido de diversos compuestos fenólicos era muy poco afectado por el tiempo de permanencia en cámara, lo mismo observaron Vilaplana *et al.* en 2006.

Tampoco el rol de los PFT en relación a la prevención de la ES parece relevante. Shaham *et al.* (2003) y Wrolstad y Frei, (2003) no encontraron ninguna correlación entre el contenido de PFT en piel de las manzanas Granny Smith, Red Delicious o Fuji y el desarrollo o la prevención de la aparición de la escaldadura superficial.

En relación a la aplicación del 1-MCP, en el ensayo no se pudo verificar un efecto favorable atribuible al tratamiento en relación a estos antioxidantes, ya que solo en los primeros 30 días y al finalizar el ensayo hay una diferencia importante a favor del tratamiento, mientras que en los meses intermedios no hay diferencias significativas. Esto coincide con Shaham *et al.* (2003) en Granny Smith y Calvo *et al.*, (2016b) en D' Anjou. Estos últimos investigadores observaron que los valores fluctuaban continuamente y sugirieron que estos compuestos podrían ser o bien oxidados y/o re sintetizados durante el almacenamiento.

Se puede afirmar que aunque los PFT están implicados en la detoxificación de las EROs, su acción parece tener poco o nulo efecto en la aparición de ES en peras D' Anjou, ni presentar interacción alguna con los mecanismos de acción del 1-MCP.

6.6 Efectos del 1-MCP sobre el desarrollo de daño oxidativo y su relación con la presencia de escaldadura superficial.

Los síntomas de daño oxidativo no son fáciles de medir: incluyen peroxidación de lípidos, particularmente de membranas celulares, desnaturalización de proteínas (cadenas laterales de aminoácidos aromáticos) y daños a ácidos nucleicos (bases purínicas y pirimidínicas) (Blokhina *et al.*, 2003 ; Barda, 2011).

La peroxidación es considerada como el daño principal y por ello es la que se mide más frecuentemente. Las frutas sometidas a estrés por bajas temperaturas desarrollan

daños de tipo oxidativo a nivel de membranas que pueden llegar a producir la muerte de las células epidérmicas y permitir la aparición de la escaldadura superficial (Del Río *et al.*, 2005; Chiriboga *et al.*, 2013; Bussato *et al.*, 2014).

Entre los ácidos grasos, los poliinsaturados son los más susceptibles a la peroxidación. En las membranas, los principales ácidos poliinsaturados son el linoleico (18:2) y el ácido linolénico (18:3) (Moller *et al.*, 2007). Su peroxidación hace que disminuya la fluidez y por ende la selectividad de las membranas. Los principales productos formados por esta oxidación son aldehídos y entre ellos los más abundantes son el HNE (4-hidroxy-2-nonenal) que proviene de la peroxidación del ácido linoleico y el MDA (malondialdehído) proveniente del ácido linolénico (Moller *et al.*, 2007).

El MDA es el principal producto final de bajo peso molecular y es el indicador más usado desde los años 60 para estimar la peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados de membranas en una amplia variedad de vegetales, incluidas las peras. Este aldehído *per se*, es altamente tóxico para las células por su interacción con proteínas y el ADN, que lo señalan como agente mutagénico y aterogénico (Del Río *et al.*, 2005; Rodríguez y Chaverri, 2006). Sin embargo, la complejidad de compuestos y sustancias que interactúan en los organismos vivos hace que el uso del MDA como indicador sea principalmente de carácter cualitativo, y no cuantitativo, ya que los métodos más comunes de detección resultan insuficientemente sensibles o son perturbados por la interferencia procedente de especies relacionadas o sobrestimados por condiciones de estrés en el análisis (Del Río *et al.*, 2005).

En el presente estudio se observó un rápido aumento del MDA en ambos tratamientos una vez que la pera fue puesta en frío, alcanzando a los 60 días un nivel dos veces superior al inicial. Esto indica que muchos procesos oxidativos tuvieron lugar en esos dos meses que resultan críticos, lo cual tiene estrecha relación con la disminución de los metabolitos antioxidantes que hemos medido en ese período. Los niveles de MDA descienden hacia los 90 días y vuelven a aumentar a los 120 días, momento en que se visualizan los primeros daños por ES en D'Anjou, durante la vida en estante (Figura 21). Esto coincide con los trabajos de Lu *et al.*, (2014) en manzana Fuji y Mditshwa *et al.*, (2016), en Granny Smith, quienes observaron una correlación entre el aumento de la concentración de MDA en piel y la incidencia y severidad de daños por escaldadura superficial, siendo el incremento muy importante en las primeras semanas. A diferencia de ellos, en este ensayo no se registró una tendencia creciente permanente en el daño oxidativo de las membranas después de los 60 días. Ello podría deberse a las diferencias entre los sistemas enzimáticos y antioxidantes propios de cada fruta (Chiriboga *et al.*, 2013). Lu *et al.*, (2014) advirtieron, por otra parte, que las manzanas retiradas de la cámara a las 12 semanas (frío normal, 0°C) no presentaban ES durante 12 días de vida en estante (20°C) y su valor de MDA permanecía

relativamente bajo y sin cambios, pero a las 30 semanas en frío el valor de MDA era mayor y aumentaba rápidamente durante la vida en estante, en tanto el daño por ES llegaba al 80% promedio y su severidad aumentaba con el correr de los días. Mditshwa *et al.*(2016) comprobaron que el valor de MDA no cambiaba cuando la fruta no presentaba daños por ES o tenía un grado 1, lo cual evidencia que no sería un índice muy sensible, pues un mismo contenido no permitiría estimar si la fruta presenta o no ES.

En el presente estudio, los niveles de MDA en fruta tratada con 1-MCP siguen el mismo comportamiento que se verifica en la fruta Control hasta los 90 días, de almacenamiento en frío. Luego, el tratamiento con 1-MCP parece tener un efecto protector hasta los 210 días de almacenamiento. Esta situación sería producto de la ausencia de oxidación de las membranas por la baja producción de TC en la fruta tratada (Figura 20, Tabla 7), consecuencia también de una muy baja producción de α farnesenos (Figura 19) y no una acción directa de protección sobre los lípidos de las membranas. El aumento de daño oxidativo hacia el final del almacenamiento en la fruta tratada coincide con el momento en que empiezan a detectarse niveles más altos de TC en éstas peras. El mayor valor de MDA observado a los 240 días concuerda con los valores más altos de TC (Figura 20, Tabla 7). No obstante, Vilaplana *et al.* (2006) y señalan un efecto protector del 1- MCP durante el almacenamiento de manzanas Golden Smoothie y también Larrigaudière *et al.*(2004b) y Chiriboga *et al.*(2013) en peras, como consecuencia de una menor acumulación de EROs en las frutas tratadas, atribuida a la protección del sistema enzimático y en especial a un aumento en la actividad de las peroxidasas.

Estudios recientes, señalan que existiría una relación directa entre ES y el aumento de ciertas EROs, (Mditshwa *et al.* 2016) en particular el aumento del contenido de H_2O_2 que también involucra procesos de senescencia en peras (Larrigaudière *et al.*,2004; Lu *et al.*, 2014). Larrigaudière *et al.*(2004) observaron en peras Blanquilla tratadas con 1-MCP, incrementos en la actividad enzimática de POX pero también de APX y CAT, que contribuyeron a mantener bajos los niveles de H_2O_2 , esto permitiría explicar en parte el efecto protector del 1-MCP.

Otra técnica que permite cuantificar indirectamente el nivel de daño que ha sufrido la membrana es la medición de la pérdida de electrolitos (EL). En realidad es una consecuencia de la peroxidación de los lípidos que afecta directamente la fluidez de la membrana, permitiendo el paso de sustancias que normalmente no la traspasan o solo lo hacen por canales específicos (Halliwell, 2006).Es esperable que aumente el flujo de iones al medio acuoso a medida que el daño se incrementa (Whitlow *et al.*, 1992).

La pérdida de electrolitos aumenta para los dos tratamientos hasta los 45 días sin que tengan diferencias significativas, a excepción de los primeros 15 días, donde la fruta con

1-MCP tiene menores valores, luego disminuyen sin diferencias hasta los 90 días. Esta tendencia coincide con Larrigaudiere *et al.* (2004) en Blanquilla quienes no observaron efectos del tratamiento (300 ppb) los primeros 60 días pero luego, el Control presenta más daños que la tratada hasta los 150 días. En el presente estudio, esta situación ocurre después de los 180 días de almacenamiento y hasta la finalización del ensayo. Chiriboga *et al.* (2013), encontraron que a los 105 días de almacenamiento no había diferencias entre peras tratadas o no, con un EL del 50%, similar a los valores del ensayo a esa fecha, pero la gran diferencia surgía en la vida de estante, donde el índice se disparaba a más del 80% en las Control mientras las tratadas no tenían cambios. Esto también refuerza la idea de protección del 1-MCP a través del mantenimiento de bajos niveles de H₂O₂, ya que se comprobó que aumenta su producción durante la vida en estante (Lu *et al.* 2014). No es, a vista de los resultados, un índice demasiado importante para medir el daño oxidativo, por ser muchas las causas que interactúan y pueden alterarlo. En la bibliografía, existen diferentes metodologías, principalmente en lo relativo a infligir el mayor daño posible en la membrana: por calentamiento (Larrigaudiere *et al.*, 2004), o freezado (Chiriboga *et al.*, 2013). Todas estas modificaciones dificultan la comparación de resultados. No obstante, la facilidad de medición y su escaso costo, lo convierten en un índice que podría seguir estudiándose con el fin de establecer si existe un nivel mínimo a superar para observar los primeros síntomas de daños, tal como se encontró para los TC.

7 CONCLUSIONES

El 1-MCP impidió la producción de etileno endógeno en durante toda la conservación, tanto dentro de la cámara como en la vida en estante, en los dos años del ensayo. Los procesos de madurez se ralentizaron, manteniendo una mejor calidad organoléptica en el tiempo. Las peras tratadas presentaron mayor firmeza, color y acidez que las Control, aunque no hubo efectos sobre el contenido de sólidos solubles.

La dosis comercial recomendada en peras impidió la maduración normal de los frutos durante el período de vida en estante aún después de largo almacenamiento, aunque logró un control absoluto de la escaldadura superficial. Por el contrario, esta fisiopatía limitó el almacenamiento de los frutos Control a partir de los 120 días en cámara.

A través del estudio de la dinámica de los α -farnesenos y de sus productos de oxidación - metabolitos primordiales del daño oxidativo por bajas temperaturas en pera, se ha podido correlacionar este proceso oxidativo con la aparición de escaldadura en Beurrè D' Anjou.

Aunque se hallaron pequeñas cantidades de α -farnesenos al momento de cosecha, su síntesis aumentó en la fruta Control en forma exponencial a partir del segundo mes, simultáneamente con sus productos de oxidación: los trienos conjugados. Un mes después de alcanzado el pico de producción y superando los TC el umbral de daño, se evidenciaron los síntomas de escaldadura superficial. La pera tratada con 1-MCP mantuvo siempre baja la síntesis de los α -farnesenos y muy por debajo del umbral de daño a los trienos conjugados durante toda la conservación, lo que explica la ausencia de escaldadura superficial y demuestra que son estos metabolitos los principales responsables de esta fisiopatía.

Se acepta que la síntesis del α -farneseno es etileno dependiente, pero el hecho de encontrar bajas cantidades de éste compuesto tanto en la fruta Control como en la tratada antes que la pera pudiera producir cantidades detectables de etileno, sugiere que puede haber un mecanismo etileno-independiente que regule su síntesis en esta fruta.

En relación al efecto del frío y la aplicación del 1-MCP sobre la capacidad antioxidante, se puede concluir que la puesta en cámara de la pera desencadena un aumento de la actividad del sistema, como respuesta al estrés por frío. No se hallaron diferencias que puedan atribuirse al tratamiento, más bien podría afirmarse que la capacidad antioxidante está más influenciada por el tiempo de conservación de las peras que por el efecto del 1-MCP. Así mismo, las diferencias en la capacidad antioxidante a cosecha no influyen en el comportamiento a largo plazo.

Considerando la hipótesis que establece que el mantenimiento de una cantidad adecuada de antioxidantes en piel, es clave para controlar los daños oxidativos, se debería concluir que la producción de antioxidantes endógenos en la pera Beurrè D'Anjou no fue suficiente para evitarlos.

Entre los metabolitos antioxidantes estudiados, el ácido ascórbico parece tener un rol más preponderante que los polifenoles en esta fruta. Solo se observó un mayor contenido de ácido ascórbico en los frutos tratados con 1-MCP durante los primeros 90 días, pero esa fue la única diferencia hallada en el comportamiento pues ambos metabolitos disminuyeron

desde cosecha siguiendo una dinámica similar. Su descenso más abrupto coincidió con el pico de formación de los productos de oxidación del α -farneseno, lo cual soporta la hipótesis de la superación de las barreras antioxidantes.

Esta tesis aportó datos inéditos sobre contenido de antioxidantes en la variedad Beurrè D'Anjou, lo que constituye un aporte a un aspecto de la calidad que va siendo cada vez más considerado como lo es el factor nutricional.

La fruta tratada no tuvo diferencias significativas con el Control en relación a los daños oxidativos tanto en la dinámica del malonaldehído, que aumentó tal como era esperable, como en la pérdida de electrolitos de las membranas, donde se observó un comportamiento errático.

Si bien la hipótesis propuesta de que el 1-MCP contribuye a atenuar el daño por escaldadura manteniendo el sistema antioxidante no se ha podido corroborar fehacientemente en este ensayo, sí se ha comprobado que no afecta de manera negativa su funcionamiento a la par de ralentizar la pérdida de vitamina C en el almacenamiento a corto plazo.

Consideraciones finales:

Dada la importancia de conocer los mecanismos oxidativos implicados en el desarrollo de la escaldadura superficial y considerando que dicho desorden es el resultado de un proceso complejo, resulta de interés continuar con el estudio de los agentes oxidantes y antioxidantes involucrados, incorporando nuevos metabolitos que podrían tener un rol primordial tales como la dinámica del H_2O_2 , la actividad de algunas enzimas antioxidantes y los triterpenoides.

8 BIBLIOGRAFIA

- Abeles F., Morgan P., Saltveit M. 1992. Ethylene in Plant Biology. Academic Press. 413 pp
- Agar I.T., Biasi, W.V., Mitcham, E.J. 2000. Cold storage duration influences ethylene biosynthesis and ripening of 'Bartlett' pears. *HortScience* 35, 687-690.
- Agar, I.T., Streif, J., Bangerth, F. 1997. Effect of high CO₂ and controlled atmosphere (CA) on the ascorbic and dehydroascorbic acid content of some berry fruits. *Postharvest Biology Technology* 11, 47-55.
- Alexander, L., Grierson, D. 2002. Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climacteric fruit ripening. *Journal of Experimental Botany* 53, N° 377, 2039-2055.
- Ambaw, A., Beaudry, R., Bulens, I. 2011. Modeling the diffusion-adsorption kinetics of 1-methylcyclopropene (1-MCP) in apple fruit and non-target materials in storage rooms. *Journal of Food Engineering* 102, 257-265.
- Amirsadeghi, S., Robson, C.; Vanderberghe, G. 2007. The role of the mitochondrion in plant responses to biotic stress. *Physiological Plantarum* 129, 253-266
- Anet, E. 1972. Superficial scald, a functional disorder of stored apples. VIII. Volatile Products from the Autoxidation of α -Farnesene *Journal Science Food Agriculture* 23, 605-608
- Anet, E. 1974. Superficial scald, a functional disorder of stored apples. XI. Apple antioxidants. *Journal Science Food Agriculture* 25, 299-304.
- Apel, K., Hirt, H. 2004. Reactive oxygen species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55, 373-399.
- Argenta, L.C., Fan, X., Mattheis, J.P. 2003. Influence of 1-methylcyclopropene on ripening, storage life, and volatile production by D' Anjou cv. pear fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 3858-3864.
- Asakawa, T., Matsushita, S. 1980. Coloring conditions of thiobarbituric acid test for detecting lipid hydroperoxides. *Lipids* 15. Issue 3, 137-140.
- Azcón-Bieto, J., Talón, M. 2000. *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Ed. Mc Graw-Hill. Interamericana. 514 pg.
- Bai, J., Mattheis, J., Reed, N. .2006. Re-initiating softening ability of 1-methylcyclopropene-treated 'Bartlett' and 'D' Anjou' pears after regular air or controlled atmosphere storage, *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 81, N° 6, 959-964.
- Bai, J., Yin, X., Whitaker, B.D., Deschuytter, K., Chen, P.M. 2009. Combination of 1-methylcyclopropene and ethoxyquin to control superficial scald of "Beurré d'Anjou" pears. *Horticultural Technology* 19, 521-525.

- Barda, N. 2011. Respuesta a las limitantes tecnológicas que amenazan la competitividad de la pera Williams Argentina: aspectos nutricionales y sensoriales. Informe Final Proyecto COFECIT.INTA Alto Valle. 70 pp.
- Barrera-Ortiz, S.,Ortiz-Castro, R.,López-Bucio, J., Beltrán-Peña, E. 2012. Bases moleculares de la señalización del ácido abscísico y el etileno en plantas. Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas. UMSNH.Ciencia Nicolaita 56, 20-34 .
- Benítez, C. 1998. Almacenamiento refrigerado de frutas frescas: Reorientación de manejo del frío y sus coadyuvantes. INTA. EEA Alto Valle.
- Benítez, C. 2001. Cosecha y Poscosecha de Peras y Manzanas en los Valles irrigados de la Patagonia.Ed. INTA.L&M.Argentina.128 pp
- Benítez, C.; Calvo, G. 2002. Fisiopatías y Pérdidas de Calidad en Manzanas y Peras, 1ª Edición. Ed. INTA. Buenos Aires, Argentina. 92 pp.
- Benítez, C; Castro H.; Ricca A., Vaudagna S. 2005. Peras y Manzanas: Factores que afectan la calidad de los frutos. Ed INTA. Argentina. 94 pp.
- Blankenship, S. 2001. Ethylene Effects and the Benefits of 1-MCP. Perishables Handling Quarterly. Issue 108, 2-4.
- Blankenship,S., Dole J.M. 2003. 1-Methylcyclopropene:a review.Postharvest Biology and Technology 28 (1),1-25
- Bleecker, A., Kende, H. 2000. Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. Anual Review of Cell and Developmental Biology 16,1-18.
- Blokhina, O., Virolainen, E., Fagerstedt, K.2003. Antioxidants, oxidative damage and the oxygen deprivation stress: a reviewAnnals of Botany 91,179-194.
- Bruzzone, I. 2010. Manzana y Pera. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos - www.alimentosargentinos.gov.ar
- Buesa, C., Dominguez, M., Vendrell, M. 1994. Abscisic acid effects on ethylene production and respiration rate in detached apple fruits at different stages of development. Revista Española De Ciencia Y Tecnologia De Alimentos 34(5), 495-506
- Burg, S.P.y Burg E.1962. The rol of ethylene in fruit ripening.Plant Physiology 37 N° 2, 179-189.
- Busatto B.,Tadiello A., Vrhovsek U., Cappellin, L., Biasioli F., Velasco, R., Costa, G., Costa F. 2014 Target metabolite and gene transcription profiling during the development of superficial scald in apple (Malus x domestica Borkh). BMC Plant Biology 14:193.
- CAFI. 2013. CAFI Institucional. VI Congreso Mundial de Pera. 5-7 de junio. Alto Valle. Río Negro. Argentina

- Calvo, G. 2004a. Effect of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on pear maturity and quality. *Acta Horticulturae* 628, 203-211.
- Calvo, G. 2004b. Efecto del 1-metilciclopropeno (1-MCP) en peras cv. Williams cosechadas con dos estados de madurez. *INTA RIA* 33 (2), 3-26.
- Calvo, G. 2010. Situación actual de antiescaldantes y alternativas de control de escaldadura superficial en manzanas y peras. INTA.
- Calvo, G. 2011. Caracterización del desarrollo de escaldadura en función de condiciones climáticas de precosecha y de la madurez de la fruta. *Boletín INTA*.
- Calvo, G. 2012a. Control de escaldadura superficial en peras: situación actual y perspectivas. Charla-Presentación. INTA. <http://inta.gob.ar/documentos/control-de-escaldadura-superficial-en-peras-situacion-actual-y-perspectivas>
- Calvo, G. 2012b. Escaldadura Superficial Fisiología y Control. *Revista Pomáceas. Boletín Técnico* 12, Nº 6.
- Calvo, G. 2013. Estado actual de las tecnologías de poscosecha en la región de los valles del Río Negro. Articulación Sector Público y Privado. Presentación. VI Congreso Mundial de Pera. 5-7 de junio. Alto Valle. Río Negro. Argentina
- Calvo, G. 2014. Tendencias en la conservación de frutas de Pepita en el Alto Valle de Río Negro, Argentina. Presentación. Seminario de frutales de pepita -INIA Las Brujas – Uruguay. 1-2 octubre.
- Calvo, G., Colodner, A., Candan, A. P. 2012. Pautas tecnológicas: cosecha y poscosecha de frutos de pepita. INTA. EEA. Alto Valle. 39 pp
- Calvo, G., Candan, A. P., Gomila, T. 2012. Tecnologías de conservación en Pera. Informe Técnico. <http://inta.gob.ar/documentos/tecnologias-de-conservacion-en-pera>
- Calvo, G. y Candan P. 2011. Guía para la identificación de fisiopatías en manzanas y peras. MAGyP-INTA Alto Valle.
- Calvo, G., Candan, A.P. 2012a .Tendencias para la conservación de frutas de pepita. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha* 13, Nº2, 153-159.
- Calvo, G., Candan, A.P. 2012b. Is delay in application a factor that reduces efficacy of 1-methyl-cyclopropene response in pears? *Acta Horticulture* 945, 345-349
- Calvo, G., Candan P. 2015. Estrategias para modular los efectos de 1-MCP en peras Packham's Triumph: aplicación simultánea con etileno o con CO₂ y tratamientos con calor. *Revista RIA* 41, Nº 1, 102-110.
- Calvo, G., Candan, A. P., Civello, M., Giné-Bordonaba, J.; Larrigaudière, C. 2015. An insight into the role of fruit maturity at harvest on superficial scald development in 'Beurré D' Anjou' pear. *Scientia Horticulture*. 192:173-179

- Calvo, G., Candan, A., Aragón, J. 2016a. Control de escaldadura: un compromiso técnico y comercial. Boletín de Madurez N° 8. Área de Poscosecha de la EEA Alto Valle <http://inta.gob.ar/documentos/control-de-escaldadura-un-compromiso-tecnico-ycomercial>
- Calvo, G., Candan, A., Larrigaudière, C.2016b.The role of endogenous antioxidants in scald development of 'Beurrè D'Anjou' pears under different storage systems. Book of Abstracts of VIII International Postharvest Symposium.Spain.VI.II.S2.1.OP9, 261.
- Calvo, G., Sozzi, G.O. 2004. Improvement of postharvest storage quality of "Red Clapp's" pears by treatment with 1-methylcyclopropene at low temperature. Journal of Horticultural Science and Biotechnology 79: 930-934.
- Calvo, G., Sozzi, G.O.2009. Effectiveness of 1-MCP treatments on "Bartlett" pears as influenced by the cooling method and the bin material. Postharvest Biology and Technology 51, 49-55.
- Calvo, P. 2013.La manzana y la pera en el Alto Valle. Revista Fruticultura & Diversificación N° 72 – INTA.
- Candan, A., Calvo, G. 2003. Uso de 1-MCP en frutas argentinas:manzanas,perasy ciruelas. INTA. EEA AltoValle, Argentina. <http://www.cnph.embrapa.br/novidade/eventos/semipos/texto3.pdf>
- Candan, A. ,Calvo, G. 2014. Jornada de Actualización Técnica. Tecnología de Poscosecha. http://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta_fisiologia-y-evaluacion-de-tecnologias.pdf.
- Carbonaro, M., Mattera, M. , Nocoli, S., Bergamo, P., Cappelloni, M. 2002. Modulation of Antioxidant Compounds in organic vs. conventional fruit (peach, *Prunus persica L.* and Pear *Pyrus communis L.*). Journal of Agricultural and Food Chemistry. 50 (19):5458-5462
- Cárdenas-Rodríguez, N. Y Pedraza-Chaverri, J. 2006. Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes:aspectos básicos.Profesores al día. Biomedicina.Educación Química 164-173
- Chen, P.M. 2002. Pre-conditioning D' Anjou' pears in transit during early marketing season. Washington State University Tree Fruit Research and Extension Center, Postharvest Information Network.
- Chen, L.S., Li, P. y Cheng, L. 2008. Effects of high temperature coupled with high light on the balance between photooxidation and photoprotection in the sun- exposed peel of apple. Planta, 288, 745-756.
- Chen, Z., Gallie, D. 2005. Increasing tolerance to ozone by elevating foliar ascorbic acid confers greater protection against ozone than does increasing avoidance. Plant Physiology 138, 1673-1689.
- Chen, P.M., Mellenthin, W.M. 1981. Effects of harvest date on ripening capacity and postharvest life of D'Anjou pears. Journal of American Society Horticulture Science 106, 38-42.

- Chen, P. M., Spotts, R. 2005. Changes in ripening behaviors of 1-MCP treated D'Anjou pears after storage. *International Journal of Fruit Science* 5, 3-18.
- Chen, Y.F., Etheridge, N. , Schaller, E. 2005. Ethylene signal transduction. *Annals of Botany* 95:901-915.
- Chiriboga, M., Larrigaudière, S. , Recasens I. 2008. Aplicación poscosecha de 1-metilciclopropeno en peras. ITEA. Información técnica Económica Agraria, Vol 104 N° 1,12-30.
- Chiriboga, M.A. , Schotsmans, W.C, Larrigaudiere, C., Dupille, E., Recasens, I. 2011. How to prevent ripening blockage in 1-MCP-treated "Conference" pears. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 91, 1781-1788.
- Chiriboga, M.A., Recasens, I., Schotsmans, W.C., Dupille, E., Larrigaudiere, C. 2012. Cold-induced changes in ACC metabolism determine softening recovery in 1-MCP treated Conference pears. *Postharvest Biology and Technology* 68, 78-85.
- Chiriboga, M., Bordonaba, J., Schotsmans, W., Larrigaudière, S., Recasens, I. 2013. Antioxidant potential of 'Conference' pears during cold storage and shelf life in response to 1-methylcyclopropene. *Food Science and Technology* 51, 170-176.
- Chiriboga, M.A., Schotsmans, W., Larrigaudière, C. , Recasens, E. 2014. Últimos avances en la aplicación del 1-metilciclopropeno (1-MCP) en peras.Review.Información Técnica Económica Agraria 110 (1), 34-48
- Colaric, M., Stampar, F., Solar, A., Hudina, M. 2006. Influence of branch bending on sugar, organic acid and phenolic content in fruits of "Williams" pears (*Pyrus communis L.*). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86, 2463- 2467
- Coronado, M. , Vega y León, S., Rey Gutiérrez, T., Vazquez, M.; Radilla, C. 2015. Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana.Revista Chilena de Nutricion 42, N° 2, 206-212
- Cubillos, E. , Molina V., Flórez, V., Fischer, G. 2001. Efecto de inhibidores de etileno en la longevidad floral del clavel (*Dianthus caryophyllus L.*) como probables sustitutos del tiosulfato de plata (STS). *Agronomía Colombiana* 18 (1-2), 7-13.
- Dat, J., Vandenabeele, S., Vranová, E., Van Montagu, M., Inzé, D., Van Breusegem, F. 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and molecular life sciences*. Vol 57 ,779–795.
- Davey, M., Van Montagu, M., Inze, D., Sanmartin, M., Kanallis, A., Smirnoff, N., Iris J., Benzie,I., Strain, J., Favell, D., Fletcher, J. 2000. Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal Science Food Agriculture* 80, 825-860.
- Del Rio, D., Stewart, A., Pellegrini, N. 2005. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutritional Metabolism Cardiovascular Diseases*.15 N° 4, 316-328.

- Dergal , E., Badui, S. Química de los Alimentos. 1999. Ed. Pearson Educación.
- De Wild, H.P., Woltering, E.J., Peppelenbos, H. 1999. Carbon dioxide and 1-MCP inhibit ethylene production and respiration of pear fruit by different mechanisms. *Journal of Experimental Botany* 50,Nº 335 , 837–844.
- Drogoudi, P.D., Michailidis, Z., Pantelidis, G. 2008. Peel and flesh antioxidant content and harvest quality characteristics of seven apple cultivars. *Scientia Horticulturae* 115,149-53.
- Du, Z, Bramlage, W.J. 1992. Modified thiobarbituric acid assay for measuring lipid oxidation in sugar-rich plant tissue extracts. *Journal Agriculture Food Chemistry* 40, Nº9,1566–1570
- Du, Z.; Bramlage, W.J. 1993. A modified hypothesis on the role of conjugated trienes in superficial scald development on stored apples. *Journal American Society Horticulture. Science* 118, 807-813.
- Du, Z.Y., Bramlage, W.J. 1994. Roles of ethylene in the development of superficial scald in Cortland apples. *Journal of American Society Horticulture Science* 119, 516–523.
- Eccher-Zerbini, P., Cambiaghi, P., Grassi, M., Rizzolo, A. 2005. The effect of 1-MCP on the quality of 'Conference' and 'Abate Fetel' pears. *Acta Horticulturae*. 671, 397-403.
- Eberhardt, M., Lee, C., Liu, R.H. 2000. Antioxidant activity of fresh apples. *Nature* 405, 903–904.
- Ekman, J.H., Clayton, M., Biasi, W.V. Mitcham, E.J. 2004. Interactions between 1-MCP concentration, treatment interval and storage time for 'Bartlett' pears. *Postharvest Biology and Technology* 31, 127-136
- El-Sharkawy, I., Jones, B., Li, Z.G., Lelièvre, J.M., Pech, J.C., Latché, A. 2003. Isolation and characterization of four ethylene perception elements and their expression during ripening in pears (*Pyrus communis* L.) with/without cold requirement. *Journal. Experimental Botany* 54 ,1615–1625.
- El-Sharkawy, I., Jones, B., Gentzittel, L., Lelievre, J.M., Pech, J.C., Latché, A. 2004. Differential regulation of ACC synthase genes in cold-dependent and independent ripening in pear fruit. *Plant Cell Environment* 27, 1197–1210.
- Escribano, S., Lopez, A., Sivertsen, H., Biasi, W.V., Macnish, A.J., Mitcham, E.J. 2015. Impact of 1-methylcyclopropene treatment on the sensory quality of 'Bartlett' pear fruit. *Postharvest Biology and Technology* 11 , 305–313.
- Fan, X., Blankenship, S. , Mattheis, J. 1999. 1-Methylcyclopropene Inhibits Apple Ripening. *Journal American Society Horticulture Science* 124 (6), 690–695.
- Fawbush, F., Nocks, J. , Watkins, C. 2009. Antioxidant contents and activity of (1-MCP) 1-methylcyclopropene treated 'Empire' apples in air and controlled atmosphere storage. *Postharvest Biology and Technology*.Vol. 52, (1),30-37.

- Franck, C. , Baetens, M. , Lammertyn, J., Verboven, P., Davey, M., Nicolai, B. 2003. Ascorbic Acid Concentration in Cv. Conference Pears during Fruit Development and Postharvest Storage. *Journal Agriculture Food Chemistry*. 51, 4757–4763.
- Franck, C., Lammertyn, J., Ho, Q.T., Verboven, P., Verlinden, P. Nicolai, B. 2007. Browning disorders in pear fruit. *Postharvest Biology and Technology* 43, 1–13.
- Fridovich, I. 1998. Oxygen toxicity: a radical explanation. *Journal of Experimental Biology* 1203-1209.
- Fu, L., Cao, J., Li, Q., Lin, L., Jiang, W. 2007. Effect of 1-methylcyclopropene on fruit quality and physiological disorders in Yali pear (*Pyrus bretschneideri* Rehd.) during storage. *Food Science and Technology International* 13, 49-54.
- Gallerani, G., Pratella, G.C., Budini, R. 1990. The distribution and role of natural antioxidant substances in apple fruit affected by superficial scald. *Advances in Horticulture Science*, 4, 144-146.
- Galvis Sanchez, A., Gil Izquierdo, A., Gil, M. 2003. Comparative study of six pear cultivars in terms of their phenolic and vitamin C contents and antioxidant capacity. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 83, 995–1003.
- Gamrasni, D., Ben-Arie, R., Goldway, M. 2010. 1-Methylcyclopropene (1-MCP) application to Spadona pears at different stages of ripening to maximize fruit quality after storage. *Postharvest Biology and Technology* 58,104-112.
- Gang M., Wang, R., Wang, C.R., Kato M., Yamawaki, K., Qin, F.; Xu, L. 2009. Effect of 1-methylcyclopropene on expression of genes for ethylene biosynthesis enzymes and ethylene receptors in post-harvest broccoli. *Plant Growth Regulation* 57, 223–232.
- Gapper, N.E., Bai, JH., Whitaker, B.D. 2006. Inhibition of ethylene-induced α -farnesene synthase gene PcAFS1 expression in “D’ Anjou” pears with 1-MCP reduces synthesis and oxidation of α -farnesene and delays development of superficial scald. *Postharvest Biology and Technology* 41, 225-233.
- Gapper, C., Dolan, L. 2006. Control of plant development by reactive oxygen species. *Plant Physiology* 141, 341-345.
- Gerasopoulos, D., Richardson, D.G., 1997. Ethylene production by D’ Anjou’ pears during storage at chilling and nonchilling temperature. *HortScience* 32 ,1092–1094.
- Gomila T., Calvo, P.,Candan, A., 2012. Programa Regional de Madurez. INTA.<http://inta.gob.ar/documentos/programa-regional-de-madurez>
- González, M., Soto, M. Kite, G.,Martínez, M. 2007. Actividad antioxidante de flavonoides del tallo de orégano mexicano (*Lippia graveolens* HBK var, Berlandieri Schauer). *Review Fitotecnology* 30 (1),43-49.
- Guardia, J., Herrero, A. 1992. Conservación de Frutos. Manual Técnico. Ed Mundi-Prensa 410 pp

- Guerra, M., Casquero, P. 2005. Evolución de la Madurez de Variedades de Manzana y Pera en Almacenamiento Frigorífico Conjunto con Absorbedor de Etileno Información Tecnológica. Vol. 16 N°4, 11-16.
- Gill, S.S., Tuteja, N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology Biochemistry* 48, 909-30.
- Guillén, F. 2009. El 1-MCP como estrategia de conservación. *Revista Horticultura Internacional*. 69, 18-24.
- Halliwell, B. 2006. Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. *Plant Physiology* 141, 312–322.
- Heath, R.L., Packer, L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 125, N° 1, 189-198.
- Hiwasa, K., Kinugasa, Y., Amano, S., Hashimoto, A., Nakano, R., Inaba A., Kubo, Y. 2003. Ethylene is required for both the initiation and progression of softening in pear (*Pyrus communis* L.) fruit. *Journal of Experimental Botany* 54, 771-779.
- Hiwasa-Tanase, K., Ezura, H. Climacteric and Non-Climacteric Ripening. 2014. In *Fruit ripening: Physiology, signalling and genomics*. Cab. International. Ed. Nath, P., Bouzayen, M., Mattoo, A., Pech, J.C. 321p. pp 1-14
- Hoang, N., Golding, J., Wilkes, M. 2011. The effect of postharvest 1-MCP treatment and storage atmosphere on 'Cripps Pink' apple phenolics and antioxidant activity. *Food Chemistry* 127 (3), 1249–1256.
- Hodges, D., DeLong, J., Forney, C., Prange, R. 1999. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* 207 (4), 604-611.
- HunterLab e Izasa. 2001. Principios básicos de Medida y Percepción del Color. Manual. Version 1.2. <http://es.slideshare.net/jagabaldon/color-s>
- Informe Agricultura. Prensa Argentina, 2014. Preferencia mundial por la pera argentina <http://prensa.argentina.ar/2014/05/10/49826-preferencia-mundial-por-la-pera-argentina.php>
- Isidoro, N., Almeida, D. 2006. Alpha-farnesene, conjugated trienols, and superficial scald in "Rocha" pear as affected by 1-methylcyclopropene and diphenylamine. *Postharvest Biology and Technology* 42, 49-56.
- IUPAC. International Union of Pure and Applied Chemistry. 2015. PPDB. Pesticide Properties Database. <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/Reports/2.htm>
- Kader, A. 2002. Postharvest technology of horticultural crops. Agricultural and Natural resources. University of California.. Richmond. ISBN, 13:978-60107- 743-1. 519 pp.

- Klee, H. , Giovannoni. J. 2011. Genetics and Control of Tomato Fruit Ripening and Quality Attributes. Annual Review Genetics 45, 41-59.
- Kondo, S., Tsuda, K., Muto, N, Ueda, J.2002. Antioxidative activity of apple skin or flesh extracts associated with fruit development on selected apple cultivars. Science Horticulture 96,177–185.
- Krishnamurthy, A., Rathinasabapathi, B. 2013. Oxidative stress tolerance in plants. Novel interplay between auxin and reactive oxygen species signaling. Plant Signaling & Behavior 8 (10) , 25761-5.
- Kunradi Vieira, F., da Silva Campelo Borges, G., Copetti, C., Valdemiro Gonzaga, L., da Costa Nunes, E., Fett, R. 2009. Activity and contents of polyphenolic antioxidants in the wholefruit, flesh and peel of three apple cultivars. Archivos Latinoamericanos de Nutrición 59 N° 1,101-106.
- Larrigaudière, C., Ubach, D. , Chiriboga, M.A., Cascia, G., Soria, Y., Recasens, I. 2008. Biochemical changes in 1-MCP treated skin tissue during cold storage and their relationship with physiological disorders.
- Larrigaudière, C., Vilaplana, R., Soria, Y., Recasens, I. 2004. Oxidative behaviour of “Blanquilla” pears treated with 1-methylcyclopropene during cold storage. Journal of the Science of Food and Agriculture 84, 1871-1877.
- Lee, S., Kader, A. 2000. Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. Postharvest Biology and Technology 20 , 207–220.
- Lafer, G., 2005. Effects of 1-MCP treatments on fruit quality and storability of different pear varieties. Acta Horticulturae 682 (2) ,1227-1231.
- Lata, B. 2007. Relationship between Apple Peel and the Whole Fruit Antioxidant Content: Year and Cultivar Variation. Journal Agriculture Food Chemistry. Vol 55, 663–671.
- Lelièvre, M., Latché, A., Brian, J., Bouzayen, M., Pech J.C.1997. Ethylene and fruit ripening. Physiology Plantarum 101,727-739.
- Li, Y., Schellhorn, H. 2007. New developments and novel therapeutic perspectives for Vitamin C. Journal of Nutrition 137, 2170-2184.
- Li, Z.Q., Qiao, Y.S., Tong, Z.G., Zhou, J., Zhang, Z. 2010. Effect of ethylene and 1-MCP on post-harvest physiology and on expression of the ethylene receptor genes PpETR3 and PpERS2 in pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai “Kikusui”) fruit. Journal of Horticultural Science & Biotechnology 85, 71-77.
- Li, J., Yan, J., Ritenour, M., Wang, J., Cao, J., Jiang, W. 2016. Effects of 1-MCP on the physiological response of Yali pear to bruise damage. Scientia Horticulture 200,137-142.
- Liu, R., Liu, J., Chen, B. 2005. Apples prevent mammary tumors in rats. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52 (6) , 2341-2343.

- Loeffler, H.J., Ponting, J. 1942. Ascorbic Acid.Rapid determination in fresh, frozen or dehydrated fruits and vegetables.Industrial and Engineering chemistry 14. Nº11, 846-848.
- Lu, X.G., Liu, X.H., Li, S.F., Wang, X.J., Zhang, L.H., 2011. Possible mechanisms of warming effects for amelioration of superficial scald development on 'Fuji' apples. Postharvest Biology Technology 62, 43-49.
- Lu, X., Ma, Y., Liu, X. 2014. Effects of hydrogen peroxide accumulation,lipid peroxidation, and polyphenol oxidation during superficial scald development in 'Fuji' apples. Horticulture Environment Biotechnology 55, 299-307.
- Lurie, S., Watkins, C. Superficial scald, its etiology and control. 2012. Postharvest Biology Technology 65, 44-60.
- Martínez, D.M. , Álvarez, O., León, M., Pérez, J., Ramírez, S.P. 2013. Actividad enzimática y capacidad antioxidante en menta (*Mentha piperita L.*) almacenada bajo refrigeración. Agronomía mesoamericana 24(1):57-69.
- Mac Lean, D, Murr, D.P., DeELL, J., Mackay, A., Kupferman, E. 2007. Inhibition of PAL, CHS and ERS1 in 'Red D' Anjou' Pear (*Pyrus communis L.*) by 1-MCP. Postharvest Biology Technology45, (1), 46-55.
- MAGyP Río Negro, 2013. Secretaría de Fruticultura. Propuestas para una Fruticultura Sustentable.<http://riocoloradonoticias.com.ar/wpcontent/uploads/2013/03/Documento-FRUTICULTURA-4.02.13-Consolidado.pdf>
- Mattheis, J.P., Rudell, D. 2011. Responses of 'D' Anjou' pear (*Pyrus communis L.*) fruit to storage at low oxygen set points determined by monitoring fruit chlorophyll fluorescence. Postharvest Biology Technology 60,125–129.
- Mathooko, F., Tsunashima, Y., Owino, W., Kubo, Y., Inaba A. 2001. Regulation of genes encoding ethylene biosynthetic enzymes in peach (*Prunus persica L.*) fruit by carbon dioxide and 1-methylcyclopropene. Postharvest Biology and Technology 21,(3), 265-281.
- McMurchie, E., McGlasson, W., Eaks, I. 1972. Treatment of fruit with propylene gives information about the biogenesis of ethylene. Nature 237, 235-236.
- Mditshwa, A., Fawole, O.A., Vries, F., Van Der Merwe, K., Crouch, E., Opara, U.L. 2016. Classification of 'Granny Smith' apples with different levels of superficial scald severity based on targeted metabolites and discriminant analysis. Journal of Applied Botany and Food Quality 89,49-55.
- Ministerio de Salud. Encuesta sobre Factores de Riesgo para Enfermedades no Transmisibles <http://www.msal.gob.ar/images/stories/publicaciones/pdf/11.09.2014-tercer-encuentro-nacional-factores-riesgo.pdf>
- Mitcham, E., Mitchell, F. 2007. Conditioning and ripening of Bartlett pears. Pear Production of Handling Manual. Univ. of California Div. Agr. Natural Resources (Chapter 26).

- Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *TRENDS in Plant Science* 7, (9), 405-410.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., Van Breusegem, F. 2009. Reactive oxygen gene network of plants. *TRENDS in Plant Science* 9, (10), 490-497.
- Moggia, C., Pereira M., Yuri, J.A., Moya, M. 2005. Evolución de Madurez en Pre y Postcosecha y Potencialidad de Almacenaje de Peras Packham's Triumph Agricultura Técnica 65(3), 246-257.
- Møller, I.M., Jensen, P.E., Hansson, A. 2007. Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annual Review of Plant Biology* 58, 459–481
- Montes de Oca, M., Osuna-García, J.A., Hernández-Estrada, A.; Ochoa-Villarreal, M., Tovar-Gómez, B. 2007. Efecto del 1-metilciclopropeno (1-MCP) sobre la fisiología y calidad de frutos de jaca (*Artocarpus heterophyllus Lam.*). *Revista Chapingo Serie Horticultura* 13(2), 165-170.
- Moreau, R., Whitaker, B., Hicks, K. 2002. Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and healthpromoting uses. *Progress in Lipid Research* 41, 457–500.
- Motomura, Y., Neira, A., Yuri, J. 2008. Daño por sol: ¿Un regalo del sol? Pomáceas. *Boletín Técnico. Universidad de Talca. Vol 8, N°1 ,1-3.*
- Moya-León, M.A., Vergara, M., Bravo, C., Montes, M.E., Moggia, C. 2006. 1-MCP treatment preserves aroma quality of "Packham's Triumph" pears during long-term storage. *Postharvest Biology and Technology* 42, 185-197.
- Murayama H., Takahashi T., Honda R., Fukushima T. 1998. Cell wall changes in pear fruit softening on and off the tree. *Postharvest Biology and Technology* 14, 143–149.
- Murray, M.B., Cape J.N., Fowler, D. 1989. Quantification of frost damage in plant tissues by rates of electrolyte leakage. *New Phytology* 113, 307-311.
- Namensny, A. 2013. La poscosecha de la pera aborda nuevas estrategias. XII Jornada técnica de Poscosecha. www.poscosecha.com/es/publicaciones/
- Nelson, G.E. 2014. Informe Especial N°1 sobre la producción de Peras y Manzanas por provincias, con datos de cierre de campaña 2013 y perspectivas 2014. Consultora Economía y Regiones. <http://es.slideshare.net/EduardoNelsonGerman/informe-especial-n1-sobre-la-produccion-de-peras-y-manzanas-por-provincias-con-datos-de-cierre-de-campa-2013->
- Nocks, J., Watkins, C. 2013. Repeated treatment of apple fruit with 1-methylcyclopropene (1-MCP) prior to controlled atmosphere storage. *Postharvest Biology and Technology* 79, 73-79.
- Noctor, G., Foyer, C. 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review. Plant Physiology. Plant Molecular Biology* 49, 249–279.

- Noctor, G., Foyer, C. 2005. Oxidant and antioxidant signaling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant cell Environmental* 28,1056-1071.
- Ojeda, M. 2006. Fisiología poscosecha en frutos. Jornada sobre Manejo Postcosecha de Frutas. UCLA. SOVREFRU. Venezuela. <http://www.ucla.edu.ve/dagronom/sovefru/>
- Oude Griep, L., Verschuren, D., Kromhout, M., Ocké, C.; Geleijnse, J.M. 2011. Raw and processed fruit and vegetable consumption and 10-year stroke incidence in a population-based cohort study in the Netherlands *European Journal of Clinical Nutrition* 65, 791-799.
- Ostek, J. 2016a. Chemical composition and antioxidant capacity of different anatomical parts of pear (*Pyrus communis* L.). *Food Chemistry* 203, 491–497.
- Ostek, J. 2016 b. Content of bioactive compounds and antioxidant capacity in skin tissues of pear. *Journal of Functional Foods* 23, 40-51.
- Owino, W.O., Nakano, R., Kubo, Y., Inaba, A. 2002. Differential regulation of genes encoding ethylene biosynthesis enzymes and ethylene response sensor ortholog during ripening and in response to wounding in avocado. *J. American Society Horticulture Science* 127, 520-527.
- Pavet, V., Olmos, E., Kiddel, G., Mowla, S. Kumar, S., Antony, J., Alvarez, M.E., Foyer, C.H. 2005. Ascorbic acid deficiency activates cell death and disease resistant responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 139 (3),1291-303
- Pechous, S.W., Watkins, C.B., Whitaker, B.D. 2005. Expression of α -farnesene synthase gene AFS1 in relation to levels of α -farnesene and conjugated trienols in peel tissue of scald-susceptible 'Law Rome' and scald-resistant 'Idared' apple fruit. *Postharvest Biology Technology* 35, 125-132.
- Perl-Treves, R., Perl, A. 2002. Oxidative stress: an introduction. In: *Oxidative stress in plants*. Inze- Van Montagu. Ed Taylor Francis. Pp 1-40.
- Pesis, E., Ibanez, A.M., Phu, M.L., Mitcham, E.J., Ebeler, S.E., Dandekar, A.M. 2009. Superficial scald and bitter pit development in cold-stored transgenic apples suppressed for ethylene biosynthesis. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 57, 2786-2792.
- Petkovsek, M.M., Stampar, F., Veberic, R. 2007. Parameters of inner quality of the apple scab resistant and susceptible apple cultivars (*Malus domestica* Borkh). *Scientia Horticulturae* 114, 37-44.
- Polle, A. 2001. Dissecting the superoxide dismutase–ascorbate peroxidase–glutathione pathway in chloroplasts by metabolic modeling. Computer simulations as a step towards flux analysis. *Plant Physiology* Vol. 126 ,445–462.
- Portal de antioxidantes. 2016. Universidad de Chile. Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos. <http://www.portalantioxidantes.com/antioxidantes-en-alimentos>

- Purvis, A.1997. Role of the alternative oxidase in limiting superoxide production by plant mitochondria. *Physiology Plantarum* 100,165-170.
- Quiñones, M., Miguel, M., Aleixandre, A. 2012. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria* 27, 76-89.
- Raffo, M.D., Sánchez, E.E., Sozzi, G.O. 2008. Exposure to direct sunlight during the growing season delays postharvest softening of 'Williams' pears and improves their response to 1-methylcyclopropene. *Acta Horticulture* 800, 1035-1040.
- Raffo, D.; Ponce, N., Sozzi G., Stortz, C., Vicente, A. 2012. Changes on the cell wall composition of tree-ripened "Bartlett" pears (*Pyrus communis* L.). *Postharvest Biology and Technology* 73, 72–79.
- Resolución Mercosur. 404/98. Comercialización de peras. Disponible on line: <http://www.infoleg.gov.ar/infolegInternet/anexos/50000-54999/51789/norma.htm>
- Rizzolo, A., Cambiaghi, P., Grassi, M., Eccher Zerbini, P. 2005. Influence of 1-methylcyclopropene and storage atmosphere on changes in volatile compounds and fruit quality of Conference pears. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 9781–9789.
- Rizzolo, A., Grassi, M., Vanoli, M. 2015. Influence of storage (time, temperature, atmosphere) on ripening, ethylene production and texture of 1-MCP treated 'Abbé Fétel' pears. *Postharvest Biology and Technology* 109, 20–29.
- Robbins, R. 2003. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *Journal of Agriculture. Food Chemistry* 51, 2866-2887.
- Rodríguez, A., Sánchez, E., de la Casa, A. 2011. Contributions of early season temperatures to *Pyrus communis* 'Bartlett' fruit growth. *Acta Horticulture* 909, 657-664.
- Rudell, D., Mattheis, J.P., Hertog, M. 2009. Metabolomic change precedes apple superficial scald symptoms. *Journal Agriculture Food Chemistry*. 57, 8459–8466.
- Rudell, D., Buchanan, D.A. , Leisso, R. , Whitaker, B., Mattheis, J., Zhu, Y., Varanasi, V. 2011. Ripening, storage temperature, ethylene action, and oxidative stress alter apple phytosterol metabolism. *Phytochemistry* 72,1328–1340.
- Rusell, W. , Labat, A., Scobbie, L., Duncan, G., Duthi, G. 2009. Phenolic acid content of fruits commonly consumed and locally produced in Scotland. *Food Chemistry* 115, 100-104. peel phytosterol metabolism. *Phytochemistry* 72 ,1328–1340
- Salta, J., Martinsa, A., Santosa, R., Nenga, N.R., Nogueira, J.M, Justino, J., Rautera, A. 2010. Phenolic composition and antioxidant activity of Rocha pear and other pear cultivars – A comparative study. *Journal of Functional Foods* 2 ,153 –157.
- Salveit, M.E. 1999. Effect of ethylene on quality of fresh fruits and vegetables. *Postharvest Biology Technology* 15, 279-292.

- Sanchez, E. 2010. Manual de Pera Williams. Manual para el productor y el empacador. INTA. EEA. 168 pp.
- SENASA (2014). Anuario estadístico. Disponible en: www.senasa.gov.ar
- SFRN, 2011. BALANCE FRUTICOLA. Temporada 2009-2010 Complejo Manzanas – Peras. Río Negro y Neuquén. Convenio Secretaría de Fruticultura Río Negro. FACA. UNCo. INTA. <http://www.cpymeadeneu.com.ar/Documentos/Balanc>
- Shaham Z., Lers, A., Lurie, S. 2003. Effect of Heat or 1-Methylcyclopropene on Antioxidative Enzyme Activities and Antioxidants in Apples in Relation to Superficial Scald Development. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 128, 761-766.
- Sharma, O.; Bhat, T. 2009. DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry* 113:4, 1202-1205.
- Silva, F.J.P., Gomes, M.H., Fidalgo, F., Rodrigues, J.A., Almeida, D.P. 2010. Antioxidant properties and fruit quality during long-term storage of 'Rocha' pear: effects of maturity and storage conditions. *Journal of Food Quality* 33, 1–20
- Singleton, V., Rossi, J. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16, 144 - 158.
- Sozzi, G., Beaudry, R. 2007. Current perspectives on the use of 1-methylcyclopropene in tree fruit crops: an international survey. *Stewart Postharvest Review* 2: 8, 1-16.
- Spotts, R.A., Sholberg, P.L., Randall, C.B., Serdani, M., Chen, P.M. 2007. Effects of 1-MCP and hexanal on decay of D' Anjou pear fruit in long-term cold storage. *Postharvest Biology and Technology* 44 ,101-106.
- Stepanova, A., Alonso, J. 2009. Ethylene signaling and response: where different regulatory modules meet. *Current Opinion Plant Biology* 12, 548–555.
- Sugar, D., Basile, S.R. 2009. Low-temperature induction of ripening capacity in 'Comice' and 'Bosc' pears as influenced by fruit maturity. *Postharvest Biology Technology* 51, 278–280.
- Sugar D., Basile, S. 2013. Integrated ethylene and temperature conditioning for induction of ripening capacity in 'D' Anjou' and 'Comice' pears. *Postharvest Biology and Technology* 83, 9–16.
- Sugar, D., Basile, S. 2014. Induction of ripening capacity in 'Packham's Triumph' and 'Gebhard Red D'Anjou' Pears by temperature and ethylene conditioning. *Postharvest Biology and Technology* 91, 84 – 89.
- Sugar, D., Einhorn, T. 2011. Conditioning temperature and harvest maturity influence induction of ripening capacity in D' Anjou' pear fruit. *Postharvest Biology and Technology* 60, 121–124.

- Taiz, L. , Zeiger, E. 1998. Plant physiology, 2nd ed. Sinauer Associates, Sunderland.
- Thao Xuang, N. 2007. Understanding the Principles and Procedures to Retain Green and Red Pigments in Thermally processed peels on Pears. Tesis doctoral.
- Thompson, K. 2010. Controlled Atmosphere Storage of Fruits and Vegetables. www.cabi.org. ISBN 978-1-84593-646-4. 289 pp
- Toivonen, P.M. 2004. Postharvest storage procedures and oxidative stress. HortScience 39, 938–942.
- Tollner, E. W. 1993. X-ray technology for detecting physical quality attributes in agricultural produce. Postharvest News and Information 4, 149 N-155N
- Trincherro, G., Sozzi, G., Covatta, F., Frascina, A. 2004. Inhibition of ethylene action by 1-methylcyclopropene extends postharvest life of "Bartlett" pears. Postharvest Biology and Technology 32,193–204.
- Van der Sluis, A., Dekker, M., de Jager, A., Jongen, W.M. 2001. Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple: effect of cultivar, harvest year, and storage conditions. Journal Agriculture of Food Chemistry 49, 3606-3613.
- Vanoli, M., Grassi, M., Rizzolo, A. 2016. Ripening behavior and physiological disorders of 'Abate Fetel' pears treated at harvest with 1-MCP and stored at different temperatures and atmospheres. Postharvest Biology and Technology 111, 274–285.
- Veltman, R., Kho, R.M., van Schaik, A.C., Sanders, M.G. , Oosterhaven, J. 2000. Ascorbic acid and tissue browning in pears (*Pyrus communis* L. cvs Rocha and Conference) under controlled atmosphere conditions. Postharvest Biology and Technology 19 ,129–137.
- Vilaplana, R., Valentines, M.C., Toivonen, P., Larrigaudière, C. 2006. Antioxidant Potential and Peroxidative State of 'Golden Smoothee' Apples Treated with Methylcyclopropene. Journal of the American Society for Horticultural Science 131, 104-109.
- Villalobos-Acuña, M., Biasi, W., Flores, S., Jiang, C., Reid, M., Willits, N., Mitcham, E. 2011. Effect of maturity and cold storage on ethylene biosynthesis and ripening in "Bartlett" pears treated after harvest with 1-MCP. Postharvest Biology and Technology 59: 1-9.
- Villalobos-Acuña, M.; Mitcham, E. 2008. Ripening of European pears: The chilling dilemma. Postharvest Biology and Technology 49, 187–200.
- Wang, K., LI, H., Ecker, J.R. 2002. Ethylene biosynthesis and signalling networks. Plant Cell, 14:131-151. http://www.plantcell.org/content/14/suppl_1/S131.full.pdf+html
- Watkins, C. 2006. The use of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on fruits and vegetables. Biotechnology Advances 24, 389–409.

- Whitaker, B.D. 2007. Oxidation products of α -farnesene associated with superficial scald development in D' Anjou pear fruits are conjugated trienols. *Journal Agriculture Food Chemistry* 55, 3708–3712.
- Whitaker, B.D., Villalobos-Acuña, M., Mitcham, E.J., Mattheis, J.P. 2009. Superficial scald susceptibility and α -farnesene metabolism in 'Bartlett' pears grown in California and Washington. *Postharvest Biology Technology* 53, 43–50.
- Whitlow, T., Bassuk, N., Ranney, T., Reichert D. 1992. An Improved Method for Using Electrolyte Leakage to Assess Membrane Competence in Plant Tissues. *Plant Physiology* 98, 198-205
- Wills, R., McGlasson, B., Graham, D., Joyce, D. 1998. Introducción a la fisiología y manipulación poscosecha de frutas, hortalizas y plantas ornamentales. Ed Acribia. 240 pp
- Wrolstad R., Balz Frei, B. 2003. Health Benefits of Apples – Final Report WTFRC # PH-01-126-2000.
<http://jenny.tfrec.wsu.edu/wtfr/PDFfinalReports/2003FinalReports/ApplePostHarvest/Wrolstad.pdf>
- Xia, J., Zhou, Y.H., Shi, K., Zhou, J., Foyer, C., Yu, J. 2015. Interplay between reactive oxygen species and hormones in the control of plant development and stress tolerance. *Journal of Experimental Botany*. March 1-18
- Xie, X., Jiankun; S, Wang, Y. Sugar, D. 2014. Ethylene synthesis, ripening capacity, and superficial scald inhibition in 1-MCP treated 'D' Anjou' pears are affected by storage temperature. *Postharvest Biology and Technology* 97 :1-10.
- Xie, X., Zhao, J., Wang, Y. 2016. Initiation of ripening capacity in 1-MCP treated green and red 'D'Anjou' pears and associated expression of genes related to ethylene biosynthesis and perception following cold storage and post-storage ethylene conditioning. *Postharvest Biology and Technology* 111, 140–149.
- Yang, S.F., Hoffman, N.E. 1984. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annual Review Plant Physiology* 35, 155-189
- Yazdani, N., Arzani, K., Mostofi, Y., Shekarchi, M. 2014. Antioxidative enzyme activity and internal browning of 1-methylcyclopropene- treated European pear fruits (cv. 'Shahmiveh' and 'Sebri'). *International Journal of Food Science and Technology* 49, 2514–2520
- Yazdani, N., Arzani, K., Mostofi, Y., Shekarchi, M. 2011. α -Farnesene and antioxidative enzyme systems in Asian pear (*Pyrus serotina* Rehd.) fruit. *Postharvest Biology and Technology* 59 , 227–231.
- Zhang, M. , Yuan, B. , Leng P. 2009. The role of ABA in triggering ethylene biosynthesis and ripening of tomato fruit. *Journal of Experimental Botany* 60, No. 6, 1579–1588.

Zhao J., Xie, X., Shen, X., Wang, Y. 2016. Effect of sunlight-exposure on antioxidants and antioxidant enzyme activities in D'Anjou'pear in relation to superficial scald development. *Food Chemistry* 210, 18–25.

Zoffoli, J.P., Richardson, D., Chen, P. Sugar, D.1998. Spectrophotometric characterization of superficial and senescent scald in pear fruits relative to different stages of maturity. *ISHS Acta Horticulturae* 475: 543-558. VII International Symposium on Pear Growing

La Dra **Ana Paula Candan**

Certifica que:

La Maestrando **Mabel Beatriz Vullioud** ha realizado bajo mi dirección la Tesis cuyo título es: “Efecto del 1-metilciclopropeno en el proceso de estrés oxidativo y en el desarrollo de escaldadura superficial asociado a condiciones de bajas temperaturas en frutos de peras”, la cual se encuentra finalizada y en condiciones de ser presentada.

Y para que así conste a todos los efectos del interesado se expide el presente certificado en Cinco Saltos, a los 19 días del mes de diciembre del año 2016.