

**INFLUENCIA DE LA COMBINACIÓN DE FRIO NORMAL CON
ATMOSFERA CONTROLADA SOBRE LOS RESIDUOS DE DIFENILAMINA,
FOLPET E IMAZALIL EN MANZANAS ‘PINK LADY’[®]**

Aida Delhom, aidadelhom@hotmail.com

Àrea de Postcollita, UdL-IRTA, XaRTA, , Alcalde Rovira Roure 191, 25198 Lleida

INDICE

Resumen	1
1. Introducción	1
2. Material y métodos	2
2.1. Material vegetal	2
2.2. Tratamiento post-recolección y condiciones de almacenamiento	3
2.3. Extracción y cuantificación de difenilamina, folpet e imazalil	3
2.4. Análisis estadístico	4
3. Resultados	4
3.1. Evolución de la concentración de difenilamina en frigoconservación	4
3.2. Evolución de la concentración de folpet en frigoconservación	5
3.3. Evolución de la concentración de imazalil en frigoconservación	6
4. Conclusiones	7
5. Glosario de siglas	7
6. Agradecimientos	7
7. Bibliografía	8

Resumen

En el presente proyecto se analiza la influencia que la combinación de atmósfera controlada con frío normal ejerce sobre las concentraciones en difenilamina, folpet e imazalil, de manzanas ‘Pink Lady[®]’. El mismo día de su recolección, los frutos fueron tratados con los productos comerciales y almacenados durante 4 y 7 meses en frío normal (FN), así como en atmósfera controlada con bajo oxígeno (2 % O₂) y con ultra bajo oxígeno (1 % O₂) más un mes en frío normal. Las concentraciones del antioxidante y de los dos fungicidas se determinaron en piel y pulpa por cromatografía de gases, después del tratamiento post-cosecha y tras el almacenamiento frigorífico más 1 y 7 días a 20 °C, para simular el periodo de comercialización de los frutos. En ningún caso, las concentraciones en los productos aplicados en post-cosecha superaron los límites máximos de residuos establecidos por la legislación española y europea para frutos. La combinación de un mes en frío normal tras el almacenamiento en atmósfera controlada con bajo oxígeno más un día a 20 °C, reduce la concentración de difenilamina, folpet e imazalil en la piel y pulpa liofilizadas. El periodo de almacenamiento frigorífico disminuye la concentración de folpet en piel, pulpa liofilizadas y fruto fresco. En el caso de la difenilamina y del imazalil su disminución está en función de la atmósfera de almacenamiento y del período de estancia a 20 °C.

1. Introducción

La manzana ‘Pink Lady[®]’ es una nueva variedad bicolor de floración precoz y maduración tardía. Posee un color rosa brillante, una crujiente textura, un gusto dulce-ácido y un intenso aroma, estos atributos sensoriales han originado su creciente aceptación por parte de los consumidores (James et al., 2005).

Debido al carácter estacional y perecedero de la fruta, el almacenamiento frigorífico permite alargar su período de comercialización, limitando las pérdidas debidas a la senescencia. Lleida es la provincia con mayor producción en manzanas del estado español (550 t/año) y posee una capacidad de refrigeración de 2,2 millones de m³ de los cuáles el 70% corresponden a atmósfera controlada.

La conservación frigorífica en atmósfera controlada con bajos (2 %) o ultra bajos (1 %) contenidos en oxígeno, permite extender a 6 meses el periodo de comercialización de esta variedad, preservando su alta calidad sensorial (Brackmann et al., 2005; López et al., 2007).

Durante el almacenamiento frigorífico, las manzanas pueden ser afectadas por podredumbres causadas principalmente por *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea* y *Rhizopus stolonifer*. Además, diversos desórdenes fisiológicos pueden aparecer (descomposición interna, escaldado superficial, etc.). Todo ello ocasiona las mayores pérdidas durante la conservación frigorífica (Castro et al., 2005). La combinación de folpet e imazalil se ha mostrado muy efectiva para el control de estas podredumbres (Barkai-Golan, 2001) y por ello está muy extendida su aplicación mezclada en el tratamiento post-recolección en la fruta destinada a frigoconservación en España por periodos superiores a tres meses.

El folpet [N-(triclorometiltio) ptaimida] es un fungicida de contacto con poca penetración en bayas después del tratamiento post-cosecha (Cabras et al., 2000). La mayoría de los trabajos publicados en manzana, se centran en la metodología analítica y pocos han estudiado su persistencia durante la conservación frigorífica. Palazón et al. (1984) indicaron que el contenido en folpet disminuye de forma más marcada en condiciones de frío normal y de manera insignificante en atmósfera controlada, cuando

manzanas de la variedad ‘Golden Delicious’ fueron tratadas en pre-recolección con folpet y conservadas 6 meses en atmósferas de frío normal y controlada.

El imazalil [(±)-1-(β-aliloxi-2,4-diclorofenilet)imidazol] es un fungicida sistémico de amplio espectro con acción protectora y curativa sobre la acción de *Gloeosporium* spp. y *Penicillium expansum*. Si bien ha sido muy estudiado en cítricos (Schirra et al., 2005; D’Aquino et al., 2006; Ghosop et al., 2007); existen pocos trabajos publicados respecto al contenido en imazalil de manzanas en diferentes tecnologías de conservación frigorífica. Papadopoulou-Mourkidou (1991) indica que las concentraciones de imazalil son mayores cuando las manzanas ‘Golden Delicious’ son conservadas en atmósfera controlada con respecto a las procentes de condiciones en frío con atmósfera normal.

La difenilamina (DPA) es una diaril-amina antioxidante utilizada en gran variedad de aplicaciones, incluyendo el control del escaldado superficial (Rudell et al., 2005). También inhibe los daños inducidos por el CO₂ (Fernández-Trujillo et al., 2001) y contribuye a retener la firmeza de las manzanas durante su almacenamiento frigorífico (DeEll et al., 2005). La persistencia de la difenilamina en manzanas tratadas, y consecuentemente sus concentraciones en la fruta durante su frigoconservación y posterior comercialización, están influidas por el tipo de aplicación (aspersión o inmersión), formulación, dosis, variedad y las condiciones de almacenamiento (FAO, 1984). En manzanas ‘Pink Lady[®]’ tratadas con DPA por aspersión, se han obtenido mayores concentraciones en los frutos procedentes de atmósfera controlada con respecto a los conservados en frío normal (Villatoro et al., 2006).

Como consecuencia del tratamiento post-recolección, pequeñas cantidades de éstos compuestos son retenidas en el fruto. Para asegurar la seguridad sanitaria para los consumidores, tanto la legislación española (Real Decreto 280/1994) y comunitaria (Directiva 97/41/EC) han establecido el límite máximo de residuos (LMRs) en fruta entera (fresca o conservada). Estos LMRs son, 5 mg/kg para la difenilamina e imazalil, y 3 mg/kg para el folpet. Por ello, una nueva información relativa a la concentración de estos productos agroquímicos en las manzanas puede ser interesante tanto para productores del sector como para los consumidores.

En el presente trabajo se han cuantificado las concentraciones en difenilamina, folpet e imazalil presentes en piel y pulpa de manzanas ‘Pink Lady[®]’ durante su conservación frigorífica en frío normal y en dos atmósferas controladas combinadas con frío normal, con el objetivo de evaluar la posible eficacia de un periodo extra de un mes en frío en atmósfera normal sobre disminución de los dos fungicidas y del antioxidante.

2. Material y métodos

2.1. Material vegetal

Las manzanas (*Malus domestica* cv. ‘Pink Lady[®]’) fueron recolectadas a mano dentro del periodo de recolección comercial (27 de octubre, correspondiente a 214 días después de floración). Los frutales de 7 años, sobre patrón M-9 EMLA, están situados en una finca comercial de Lleida. Inmediatamente después de la cosecha, 14 cajas de manzanas (con 50 frutos/caja) fueron seleccionadas de acuerdo con los estándares de madurez que exige la Asociación Pink Lady Europa (APLE) para poder comercializar variedad como tal (diámetro >70 mm.; 50% de color rosa difuso o 30% de rosa intenso; color de fondo: virando de verde a amarillo; índice de almidón: 5-5,8 (en la escala de 1-10); firmeza de la pulpa > 80 N; y ausencia total de defectos).

2.2. Tratamiento post-recolección y condiciones de almacenamiento

La toma de muestras se ha realizado según la legislación vigente española (R.D 290/2003) y europea (Directiva 2002/63/EC). Un total de 700 frutos fueron recolectados y separados en: un control de 50 frutos no tratados, 50 frutos tratados con los fungicidas y el antioxidante, para ser analizados tras permanecer 24 horas a 20 °C y 600 frutos repartidos en tres grupos (cuatro cajas por atmósfera, 50 frutos por caja) para su análisis después de la conservación frigorífica. El tratamiento post-recolección se ha realizado por inmersión durante 90 segundos en una solución acuosa de difenilamina, folpet e imazalil preparada a partir de los productos comerciales (Productos Citrosol, S.A., Makhteshim Agan España, S.A. y Janssen-Cilag, S.A., respectivamente). Las composiciones de la emulsión, fueron de 1 g/L en difenilamina (31 % w/v), 5 g/L en folpet (80 % w/v) y 1 g/L en imazalil (7.5 % w/v), respectivamente. Este tratamiento con los productos agroquímicos ha sido realizado en las instalaciones de la central hortofrutícola Fruilar (Lleida). Todos los frutos conservados por frío, se han mantenido a 1 °C y 92-93% de humedad relativa en tres cámaras frigoríficas semicomerciales del centro UdL-IRTA de Lleida. Las atmósferas de conservación fueron frío en aire normal (FN: 21 % O₂ : 0.03 % CO₂) y dos atmósferas controladas (CA) con bajo (LO: 2 % O₂ : 2 % CO₂) y ultra bajo (ULO: 1 % O₂ : 1 % CO₂) contenido en oxígeno.

La conservación frigorífica comenzó a las 30 h de la recolección, y las atmósferas controladas se alcanzaron tras 48 h de haberse cerrado las cámaras frigoríficas. Las concentraciones de O₂ y CO₂ fueron monitorizadas continuamente y corregidas automáticamente a partir de un tanque de nitrógeno, eliminado el exceso CO₂ mediante barrido con carbón activo.

Las muestras permanecieron 3 y 6 meses en conservación frigorífica seguidas de un periodo extra de 1 mes en frío con aire normal (FN). Después los frutos fueron trasladados a una cámara climatizada a 20 °C donde permanecieron 1 y 7 días, tras los cuáles se analizaron simultáneamente las concentraciones en difenilamina, folpet e imazalil de las muestras de manzanas.

2.3. Extracción y cuantificación de difenilamina, folpet e imazalil

Se ha seguido la metodología de extracción puesta a punto por López y Riba (1999). Muestras de 15 manzanas por tratamiento (atmósfera de conservación x periodo de almacenamiento x estancia a 20 °C) fueron peladas manualmente. La piel y la pulpa de cada fruto, han sido pesadas para obtener el porcentaje de piel y pulpa respecto al fruto entero. Toda la piel y 20 g de pulpa fueron congeladas con nitrógeno líquido, liofilizadas, trituradas y conservadas a -80°C, separando en 5 repeticiones de piel y 5 de pulpa por tratamiento. Cada una de las réplicas, previa adición de 3-nitroanilina como patrón interno, ha sido sometida a una triple extracción con metanol, evaporación al vacío (15 mbar, 30 °C), lavado con agua ultra pura (miliQ), extracción con éter dietílico, separación por decantación, purificación, filtración y evaporación a vacío. El residuo se recupera con tolueno, para proceder a su análisis por cromatografía de gases.

Las identificaciones y cuantificaciones de difenilamina, folpet e imazalil se han realizado en un cromatógrafo de gases (HP 5890 series II, Hewlett-Packard Co., Barcelona) equipado con un detector de nitrógeno-fósforo (CG-DNP) y una columna capilar con 5 % fenil-metil polysiloxano (HP-5MS, 30 m x 0.25 mm (d.i) x 0.25 µm). Se ha usado nitrógeno como gas portador (34 cm/s) y una relación de “split” de 40:1. El inyector y detector se han mantenido a 250 °C y 300 °C, respectivamente. Los análisis se han realizado con la siguiente programación de temperaturas: 80 °C (1 min); 80-180

°C (30 °C/min); 180-200 °C (5 °C/min); 200-280 °C (10 °C/min); y 280 °C (14 min). Los compuestos han sido identificados por comparación con los tiempos de retención de patrones analíticos y por enriquecimiento de los extractos con muestras auténticas. La cuantificación se ha realizado por el método del patrón interno (3-nitroanilina, de pureza >98%, Fluka).

Un cromatógrafo de gases con detector de espectrometría de masas (GC-MS) (Agilent 6890N, Agilent Technologies, S.L., Madrid) ha sido usado para la confirmación de los compuestos, utilizando la misma columna capilar y gradiente de temperaturas que para la realización de los análisis con CG-DNP. Los espectros de masas se han obtenido por ionización de impacto electrónico de 70 eV. La técnica de monitorización del ión simple (SIM) ha sido utilizada, por el detector de masas, para la identificación de los tres compuestos seleccionando para cada uno de ellos las siguientes masas: m/z 167, 168, 170 (difenilamina), m/z 76, 104, 147 (folpet) y m/z 173, 215, 249 (imazalil). Se ha empleado helio como gas portador (34 cm/s).

Todos los reactivos utilizados han sido con un grado de pureza de cromatografía de gases (Merck, Alemania). Las materias activas han sido, difenilamina (>99% de ingrediente activo(i.a)) procedente de Merck-Schuchardt (Alemania), folpet (99.8% i.a.) e imazalil (99.8% i.a.) suministrados por Riedel-de Haën[®] (Alemania).

Para evaluar si las concentraciones de difenilamina, folpet e imazalil en manzana se encuentran dentro de los límites máximos de residuos (LMRs) establecidos por la legislación se han referido sus concentraciones a nivel de fruto fresco entero. Para ello, a partir de las medias de las muestras de piel y pulpa liofilizadas, extraídas directamente del análisis cromatográfico, se han aplicado los correspondientes coeficientes de reducción de peso y las proporciones de piel (7.46%) y de pulpa (92,54%) calculados en la preparación de las muestras.

2.4. Análisis estadístico

Un diseño multifactorial, utilizando la atmósfera de conservación, el periodo de almacenamiento frigorífico, el periodo de estancia a 20 °C post-almacenamiento y la repetición como factores, ha sido utilizado en el análisis estadístico de los resultados cromatográficos. Para poder analizar los efectos de los factores sobre los resultados obtenidos, se han sometido éstos al análisis de varianza (GLM-ANOVA) según el procedimiento estándar SAS-STAT (1988). Las concentraciones medias se han separado según el test de la mínima diferencia significativa (MDS, $P \leq 0.05$).

3. Resultados

3.1. Evolución de la concentración de difenilamina en frigoconservación

Las menores concentraciones en piel se obtienen en los frutos procedentes de conservación en frío con aire normal (tabla 1). Después de 4 meses de frigoconservación y 1 día a 20 °C (tabla 1), la piel de las manzanas conservadas en frío con aire normal (FN) y atmósfera controlada con bajo contenido en oxígeno combinada con frío normal (LO+FN) retienen menores concentraciones de DPA respecto a las muestras almacenadas en atmósfera con ultrabajo oxígeno combinada con frío normal (ULO+FN). Extendiendo la conservación frigorífica hasta 7 meses y 1 día a 20 °C, la piel de las manzanas conservadas en FN retienen menores contenidos de DPA con respecto a las muestras almacenadas en ULO+FN, pero sin diferencias significativas con respecto a los frutos conservados en LO+ULO.

Así pues, un periodo extra de un mes en aire (a 1 °C) resulta favorable en la reducción del contenido en difenilamina de la piel de las manzanas conservadas en atmósfera controlada con bajo oxígeno (2%), y sus concentraciones medias no difieren de las obtenidas bajo condiciones de frío normal.

Después de 4 meses de almacenamiento, tanto los frutos conservados en frío normal como en atmósfera controlada con bajo oxígeno (2% O₂) combinada con frío normal; se obtienen porcentajes de reducción de difenilamina en piel superiores al 70 % (tabla 1). Mientras que transcurridos 7 meses, los porcentajes de disminución oscilan entre el 71 y el 89%. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por Whitaker (2000) en su estudio con manzanas 'Empire' conservadas en frío normal y en atmósfera controlada (1,5% O₂), en el que se mostraba una disminución muy rápida de difenilamina durante los tres primeros meses de almacenamiento y después su reducción era más lenta hasta 6 meses de conservación frigorífica.

La piel retiene la mayor proporción del contenido en difenilamina, en la pulpa las concentraciones son muy bajas (tabla 1). En un estudio realizado en variedad 'Red Delicious' conservada en frío normal (a 0±2 °C) durante 9 meses, la mayor parte del residuo se encontraba localizado en la piel del fruto y estaba formado por DPA no metabolizado. En cambio, los residuos localizados en la pulpa estaban formados además, por metabolitos de la difenilamina de los que el 4-hidroxi-difenilamina era el mayoritario (Kim-Kang et al., 1998).

Los frutos que se han conservado en atmósfera controlada combinada con frío normal (LO+FN y ULO+FN), presentan concentraciones de difenilamina en pulpa similares o inferiores a las presentes en los frutos procedentes de frío normal (FN).

Las manzanas que se han conservado 4 meses en condiciones de ULO combinado FN muestran una disminución significativa en la concentración de DPA con los días de estancia a 20 °C, tanto en piel como en fruto entero (tabla 1 y figura 1).

Después del tratamiento post-recolección con difenilamina y tras un día de estancia a 20 °C, su concentración media obtenida referida a fruto entero fresco ha sido de 0,38 mg/kg. Las manzanas procedentes de 4 meses almacenamiento en frío normal (FN) o en atmósfera controlada con bajo oxígeno (2%) combinada con frío normal (LO+FN), muestran los menores contenidos en DPA en fruto entero, sin diferencias entre ambos tratamientos (figura 1). Después de 7 meses en conservación frigorífica, se obtiene el mismo resultado pero cuando los frutos han permanecido 7 días a 20 °C. En ningún caso se superan los límites máximos de residuos fijados por la legislación actual (5 mg/kg) para fruto entero.

3.2. Evolución de la concentración de folpet en frigoconservación

Tras 4 meses de conservación en atmósfera controlada con bajo oxígeno (2%) y frío normal (LO+FN), la concentración de folpet en la piel de las manzanas 'Pink Lady'[®] es inferior a la inicial y a la obtenida en los frutos procedentes de atmósfera controlada con ultrabajo oxígeno (1%) combinada con frío normal (tabla 2). Comparando las tecnologías estudiadas, la atmósfera de frío normal sigue siendo la que proporciona los frutos con mayores porcentajes de reducción en el contenido de folpet en piel después de 4 meses de conservación. Las concentraciones en folpet de muestras de piel para frutos almacenados 4 meses en atmósferas de ULO+FN no difiere significativamente respecto a la presente tras el tratamiento post-recolección. Esta estabilidad del folpet en condiciones de atmósfera controlada también ha sido mostrada por Palazón et al., (1984) en manzana 'Golden Delicious'. Pero sí bien, en éste trabajo la disminución del contenido en folpet era insignificante bajo condiciones de atmósfera controlada tras 6

meses de almacenamiento; en el presente estudio con manzanas ‘Pink Lady[®]’ se obtienen reducciones del 65% (en piel) y del 57% (en pulpa) después de 3 meses de almacenamiento en atmósfera controlada con bajo oxígeno (2%) más un mes en condiciones de frío normal (LO+FN) tras 7 días de permanencia a 20 °C (tabla 2).

Las concentraciones en folpet tanto en piel como en pulpa disminuyen con el periodo de almacenamiento frigorífico, no llegando a detectarse después de 7 meses en ninguna de las tecnologías estudiadas. La permanencia a 20 °C reduce el contenido en folpet de la piel de los frutos almacenados durante 3 meses en atmósfera controlada más un mes en frío normal (tabla 2).

Después del tratamiento post-cosecha, los frutos enteros frescos presentan una concentración media de 0,07 mg/kg en folpet. En la figura 2 se muestran los resultados referidos a fruto fresco entero, en ningún caso se superan los límites máximos de residuos fijados por la legislación actual (3 mg/kg). La concentración en folpet disminuye con el periodo de almacenamiento frigorífico en todas las tecnologías estudiadas. Aunque se observa una tendencia a disminuir el contenido en folpet, conforme aumenta la proporción de oxígeno en la atmósfera, las diferencias no llegan a ser significativas.

3.3. Evolución de la concentración de imazalil en frigoconservación

El imazalil es un fungicida más persistente que el folpet durante la frigoconservación de las manzanas ‘Pink Lady[®]’ (tablas 2 y 3). Las manzanas conservadas en atmósfera controlada más un mes en frío normal, muestran concentraciones de imazalil en la piel de los frutos similares a los correspondientes en conservación bajo atmósfera en frío normal (tabla 3). La reducción del contenido en imazalil en piel, cuando las manzanas se han almacenado en condiciones de atmósfera controlada con bajo oxígeno (2%) combinada con frío normal se produce antes que cuando lo ha sido en atmósfera controlada con ultra bajo oxígeno (1%). Así, los primeros frutos que presentan contenidos en imazalil inferiores a los presentes tras el tratamiento post-recolección, son los conservados 3 meses en atmósfera controlada con bajo oxígeno más 1 mes en frío normal (LO+FN). Cuando los frutos han sido conservados en atmósfera controlada con ultra bajo contenido en oxígeno más frío normal (ULO+FN), son necesarios 7 meses para reducir su contenido respecto al presente tras el tratamiento post-cosecha.

Dentro de una misma atmósfera de conservación no hay diferencias en la concentración de imazalil presente en la piel en función del periodo de almacenamiento, ni del periodo de permanencia a 20 °C después del almacenamiento frigorífico.

El imazalil es por tanto, un compuesto muy persistente en la piel y disminuye lentamente durante la conservación frigorífica, lo que garantiza su eficacia. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por López y Riba (1999) en peras ‘Blanquilla’ conservadas en frío normal y en atmósfera controlada con bajo oxígeno hasta ocho meses.

Después de 4 meses de conservación frigorífica se reduce la concentración del imazalil presente en la pulpa de las muestras, con respecto al contenido presente en las manzanas tras el tratamiento post-recolección excepto para las manzanas procedentes de atmósfera controlada con ultra bajo oxígeno combinada con frío normal y 7 días de estancia a 20 °C. Para los frutos conservados en condiciones de frío normal y de atmósfera controlada con ultra bajo oxígeno más frío normal, la concentración en imazalil de la pulpa disminuye con el periodo de frigoconservación tras 7 días a 20 °C.

La concentración de imazalil en pulpa disminuye con el período de permanencia a 20 °C para las manzanas conservadas 7 meses en frío normal (FN).

La concentración media de imazalil referida a fruto entero fresco tras el tratamiento post-recolección y después de un día a 20 °C ha sido de 1,61 mg/kg. En la figura 3 se muestra que las concentraciones de imazalil disminuyen después de 4 meses en todas las atmósferas excepto en atmósfera controlada con muy bajo contenido en oxígeno combinada con frío normal (ULO+FN). El periodo de almacenamiento frigorífico reduce el contenido en imazalil de los frutos conservados en ULO+FN más 7 días a 20 °C. En ningún caso se superan los límites máximos de residuos fijados por la legislación actual (5 mg/kg).

4. Conclusiones

La combinación de un mes en frío normal tras el almacenamiento en atmósfera controlada con bajo oxígeno (2%) más un día a 20 °C, reduce la concentración de difenilamina, folpet e imazalil en la piel y pulpa liofilizadas, éste mismo efecto se obtiene en los frutos mantenidos seis meses en atmósfera controlada con ultra bajo oxígeno (1%).

El periodo de almacenamiento frigorífico disminuye la concentración de folpet en piel, pulpa liofilizadas y fruto fresco. En el caso de la difenilamina y del imazalil la disminución está en función de la atmósfera de almacenamiento y del período de estancia a 20 °C.

La permanencia a 20 °C después del almacenamiento frigorífico, reduce el contenido en difenilamina y folpet de la piel de las manzanas después de 4 meses de conservación en atmósfera controlada combinada con frío normal y del imazalil en la pulpa para los frutos almacenados 7 meses en frío normal.

6. Glosario de siglas

AC, atmósfera controlada; APLE, Asociación Pink Lady Europa; CG-DNP, cromatógrafo de gases-detector de nitrógeno-fósforo; FN, frío en aire normal con 21% O₂ + 0,03 % CO₂; GC-MS, cromatógrafo de gases-espectrómetro de masas; LMRs, límite máximo de residuos; LO, atmósfera controlada con bajo contenido en oxígeno (2% O₂ + 2) % CO₂; LO+FN, atmósfera controlada con bajo oxígeno más un mes en frío en aire normal; MDS, mínima diferencia significativa; ULO, atmósfera controlada con muy bajo contenido en oxígeno (1% O₂ + 1 % CO₂); ULO+FN, atmósfera controlada con muy bajo oxígeno más un mes en frío en aire normal.

5. Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología (proyecto AGL2003-021), por la Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca y por el Centre de Referència en Tecnologia d'Aliments de la Generalitat de Catalunya (CeRTA). Las autoras desean agradecer a Josep M^a Jové Capdevila (fruticultor) y Marco A. Yagüe Escarona (central hortofrutícola, Fruilar) por el suministro y tratamiento post-recolección de las muestras de manzanas

7. Bibliografía

- Barkai-Golan, R. 2001. Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables. Development and Control. Elsevier Science B.V. Amsterdam, The Netherlands.
- Brackmann, A., Guarienti, A.J.W., Saquet A. A., Giehl, R. F. H. y Sestari, I. 2005. Condições de atmosfera controlada para maçã 'Pink Lady'. *Ciência Rural* 35, 504-509.
- Cabras, P., Angioni, A., Caboni, P., Garau, V., Melis, M., Pirisi, F. y Cabitza, F. 2000. Distribution of folpet on the grape surface after treatment. *J Agric. Food Chem.* 48, 915-916.
- Castro, E., Biasi, V. y Mitcham, E. 2005. Controlled atmosphere-induced internal browning in Pink Lady® apples. *Acta Hort.* 687, 63-69.
- D'Aquino, S., Schirra, M., Palma, A., Angioni, A., Cabras, P. y Migheli, Q. 2006. Residue levels and effectiveness of pyrimethanil vs imazalil when using heated postharvest dip treatments for control of *Penicillium* decay on citrus fruit. *J Agric. Food Chem.* 54, 4721-4726.
- DeEll, J.R., Murr, D.P., Mueller, R., Wiley, L. y Porteous, M.D. 2005. Influence of 1-methylcyclopropene (1-MCP), diphenylamine (DPA), and CO₂ concentration during storage on 'Empire' apple quality. *Postharvest Biol. Technol.* 38, 1-8.
- Directiva 97/41/EC de 21 junio 1997 que establece los límites máximos de residuos de pesticidas en fruta, verduras, cereales y productos alimenticios de origen vegetal y animal. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*, L184, 33-49, Luxemburgo.
- Directiva 2002/63/CE de 11 julio 2002 que establece los métodos comunitarios de muestreo para el control oficial de residuos de plaguicidas en los productos de origen vegetal y animal y se deroga la Directiva 79/700/CEE. L 187/30-43. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas* 16.7.2002. Bruselas, Bélgica.
- FAO. 1984. Pesticide Residues in Food: Evaluations 67, 355-373.
- Fernández-Trujillo, J.P., Nock, J.F. y Watkins, C.B. 2001. Superficial scald, carbon dioxide injury, and changes of fermentation products and organics in 'Cortland' and 'Law Rome' apples after high carbon dioxide stress treatment. *J Am. Soc. Hort. Sci.* 126, 235-241.
- Ghosoph, J.M., Schmidt, L.S., Margosan, D.A. y Smilanick, J.L. 2007. *Postharvest Biol. Technol.* 44, 9-18.
- James, H., Brown, G., Mitcham, E., Tanner, D., Tustin, S., Wilkinson, I., Zanella, A. y Jobling, J. 2005. Flesh browning in 'Pink Lady®' apples: maturity at harvest is critical but how accurately can it be measured?. *Acta Hort.* 694, 399-403.
- Kim-Kang, H., Robinson, R.A. y Jinn Wu. 1998. Fate of [¹⁴C] diphenylamine in stored apples. *J Agric. Food Chem.* 46, 707-717.
- López, M.L. y Riba M., 1999. Residue level of etoxyquin, imazalil and iprodione in pears under cold-storage conditions. *J Agric. Food Chem.* 47, 3228-3236.
- López, M.L., Villatoro, C., Fuentes, T., Graell, J., Lara, I. y Echeverría, G. 2007. Volatile compounds, quality parameters and consumer acceptance of 'Pink Lady®' apples stored in different conditions. *Postharvest Biol. Technol.* 43, 55-66.
- Palazón, I., Palazón, C., Robert, P., Escudero, I., Muñoz, M. y Palazón, M. 1984. La lucha contra las pérdidas durante la conservación frigorífica de peras y manzanas. En: Estudio de los problemas patológicos de la conservación de peras y manzanas en Zaragoza. Edit. Diputación Provincial, Institución "Fernando el Católico" Publicación N° 990, 83-105.
- Papadopoulou-Mourkidou, E. 1991. Postharvest-applied agrochemicals and their residues in fresh fruits and vegetables. *J Assoc. Off. Anal. Chem.* 74 (5), 744-465.

- Real Decreto 280/1994 de 18 febrero por el que se fijan los límites máximos y control de residuos de plaguicidas y su control. B.O.E de 9 marzo 1994, 58, 7723–7733. Madrid.
- Real Decreto 290/2003 de 7 de marzo por el que se establecen los métodos de muestreo para la determinación de residuos de pesticidas. B.O.E. de 8 marzo 2003, 58, 9299-9308. Madrid.
- Rudell, D., Mattheis, J. y Fellman, J. 2005. Relationship of superficial scald development and α -farnesene oxidation to reactions of diphenylamine and diphenylamine derivates in Cv. Granny Smith apple peel. *J Agric. Food Chem.* 53, 8382-8389.
- SAS., 1988. Statistical Analysis System. User' Guide: Statistics (PC-DOS 6.04), SAS. Institute Inc, Cary, NC, USA.
- Schirra, M., D'Aquino, S., Palma, A., Marceddu, S., Angioni, A., Cabras, P., Scherm, B. y Migheli, Q. 2005. Residue level, persistence, and storage performance of citrus fruit treated with fludioxonil. *J Agric. Food Chem.* 53, 6718-6724.
- Villatoro, C., Echeverría, G. y López, M.L. 2006. Determinación simultánea de residuos procedentes de tratamientos post-cosecha con Difenilamina, Folpet e Imazalil en manzanas 'Pink Lady[®]' frigoconservadas. En: *Innovaciones Fisiológicas y Tecnológicas de la Maduración y Post-Recolección de Frutas y Hortalizas*. Edit. CEE Limencop, S.L. Eds: Valero, D. y Serrano, M. 209-212.
- Whitaker, B.D. 2000. DPA treatment alters α -farnesene metabolism in peel of 'Empire' apples stored in air or 1.5% O₂ atmosphere. *Postharvest Biol. Technol.* 18, 91-97.