



**ESTUDIO DE METABOLITOS FIJOS Y VOLÁTILES EN TRES  
MORFOTIPOS DE COCONA (*Solanum sessiliflorum* Dunal)  
PROCEDENTES DEL DEPARTAMENTO DEL GUAVIARE**

**JULIANA ERIKA CRISTINA CARDONA JARAMILLO**

Universidad Nacional de Colombia – Sede Bogotá

Facultad de Ciencias

Departamento de Química

Bogotá D.C., Colombia

2011



**ESTUDIO DE METABOLITOS FIJOS Y VOLÁTILES EN TRES MORFOTIPOS DE COCONA  
(*Solanum sessiliflorum* Dunal) PROCEDENTES DEL DEPARTAMENTO DEL GUAVIARE**

**JULIANA ERIKA CRISTINA CARDONA JARAMILLO**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:  
Master en Ciencias - Química.

Director:

PROFESOR LUIS ENRIQUE CUCA SUAREZ, Ph.D.

Laboratorio de Productos Naturales Vegetales

Universidad Nacional de Colombia – Sede Bogotá

Facultad de Ciencias

Departamento de Química

Bogotá D.C., Colombia

2011



A la luz de mi vida  
Federico y Nicolás



## Agradecimientos

A Dios, nuestro creador, quien en su infinita sabiduría nos ha dado la maravillosa oportunidad de sentir y pensar.

A mi hijo Federico y mi esposo Nicolás, porque el amor que me brindan, es la base de mi deseo de mejorar como persona cada día.

A mis Padres, Darío y Cecilia, a mi hermano Juan Pablo, y mi sobrino Juan José, quienes de una forma incondicional han creído en mis decisiones y aptitudes.

A mis tíos, Darío (QEPD), Celina, Nohemí y Cristina, quienes no solo han sido mi ejemplo de vida, sino un apoyo decisivo en cada momento

Al Doctor Luis Enrique Cuca Suarez, quien con su gran experiencia y sabiduría no solo me brindó la oportunidad de crecer como investigadora sino como persona.

A Marcela, Jaime y María Soledad, quienes creyeron en mí como profesional y en mi capacidad para emprender este reto.

A mis compañeros del Laboratorio de Productos Naturales Vegetales, Diana, Juan Manuel, Victor, Lorena, Jorge, Ericcson, Carlos Andrés, Andrea, Freddy, Jhon, Julieth, Mónica, Willman, Tatiana y a mis compañeros del Laboratorio del Instituto Sinchi, Andrés, Raquel, Marcela, Gladys, Carolina, Edmundo, Diego quienes en su heterogeneidad me han regalado un poco de su conocimiento y un poco de su ser.

A Jaime Barrera, Doris Gutiérrez, Oscar Patiño, Mónica Ávila, Willman Delgado y Ericcson Coy, quienes de manera desinteresada siempre tuvieron el consejo adecuado para hacer mejor esta propuesta de investigación.

Al Profesor Orlando Martínez por su oportuna y acertada asesoría en el análisis estadístico de los datos.

A Ángela García por toda su colaboración en el arduo trabajo de campo que implicó la realización de éste proyecto.

Al Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas Sinchi y al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de la República de Colombia, y la Universidad Nacional de Colombia por la financiación parcial del presente proyecto.

A la Universidad Nacional de Colombia, donde me he formado como un profesional integral.

Al personal de los laboratorios de Química de Aromas, Macromoléculas y Resonancia Magnética Nuclear de la Universidad Nacional de Colombia, por su asistencia técnica.



## RESUMEN

La cocona, *Solanum sessiliflorum* Dunal (Solanaceae), es una especie nativa del trapezocentro amazónico con potenciales aplicaciones en las industrias alimentaria, nutracéutica y cosmética. La variabilidad morfológica guarda correspondencia con la variabilidad en los cambios de hábitat y ecología así como del proceso de domesticación de la especie, sin embargo, poco se conoce sobre las implicaciones que ésta variabilidad morfológica tiene sobre su composición química. El presente estudio pretendió fundamentalmente diferenciar tres variedades de *Solanum sessiliflorum* Dunal cultivadas en el municipio de San José del Guaviare (Guaviare – Colombia), denominadas morfotipos ovalado (1), redondo pequeño (2) y redondo grande (3) mediante el estudio de sus metabolitos fijos y volátiles, inicialmente durante su etapa de desarrollo y maduración y posteriormente en su madurez fisiológica.

El estudio durante la etapa de desarrollo del fruto se llevó a cabo mediante la cuantificación de diversos factores químicos que han sido señalados como indicadores de madurez debido a sus variaciones cuantitativamente apreciables durante esta etapa. A partir de los resultados se logró ubicar el periodo de maduración del fruto entre los días 56 y 70 después de la apertura floral. Se encontró que los ácidos predominantes independientemente al morfotipo evaluado fueron los ácidos cítrico, málico y succínico, siendo el primero el mayoritario durante todo el tiempo de desarrollo y maduración; y los dos últimos, los que junto a los niveles de fructosa y glucosa marcan diferencias significativas entre morfotipos. El comportamiento descendente en la emisión de dióxido de carbono y los niveles no detectables de etileno, además del incremento del ácido mayoritario y la acumulación de azúcares durante la maduración de la fruta son indicativos de su naturaleza no climatérica. Adicionalmente el análisis multivariable de los datos obtenidos permitió establecer que los parámetros más discriminantes entre morfotipos son el contenido de glucosa y sacarosa, y durante el crecimiento y desarrollo del fruto el contenido de ácido cítrico y la variación del tono en el color (expresado como ángulo Hue).

Ya fijado el punto óptimo de recolección, la comparación fue realizada mediante el aislamiento, elucidación e identificación de algunos metabolitos fijos y volátiles presentes en la fruta, los cuales podrían ser considerados a futuro para darle un valor de uso a los productos derivados de ésta, por ser un indicador de la calidad organoléptica o

nutracéutica intrínseca a cada uno de los morfotipos. Entre sus metabolitos fijos se determinó la presencia de ésteres metílicos, etílicos, ácidos grasos, parafinas, además de compuestos fenólicos como el ácido *p*-cumárico y la naringenina. La determinación de los compuestos volátiles permitió establecer que están constituidos en su mayoría por ésteres y alcoholes (alifáticos y derivados del ácido benzóico), y que algunos de los constituyentes mayoritarios, como el salicilato de metilo, y los ésteres etílicos de los ácidos propiónico, octanóico y benzóico, son comunes a los tres morfotipos. La comparación realizada sobre los metabolitos secundarios determinados confirmó la heterogeneidad fitoquímica de los tres morfotipos, siendo el de mayor complejidad el morfotipo ovalado.

**Palabras clave:** *Solanum sessiliflorum*, crecimiento y desarrollo, madurez fisiológica, estudio fitoquímico.

## ABSTRACT

Cocona, *Solanum sessiliflorum* Dunal (Solanaceae) is a native species to Amazonian trapeze with potential applications in the food, nutraceutical and cosmetic industries. The morphological variability corresponds with the variability in habitat and ecology changes and the domestication process of the species, however, little is known about the implications this morphological variability has in chemical composition. The present study aimed mainly distinguish three varieties of *Solanum sessiliflorum* Dunal cultivated in San José del Guaviare (Guaviare - Colombia), known as oval (1), small round (2) and big round (3) morphotypes by studying their fixed and volatile metabolites, initially for their stage of development and maturation, and later for their physiological maturity.

The study during the fruit development stage was carried out by quantifying chemical factors have been identified as maturity indicators due to its significant quantitative variations during this stage. From the results achieved to place the fruit ripening period between days 56 and 70 after anthesis. We found that the predominant acids were citric, malic and succinic acids, the first being the majority at all times of development and maturation, and the last two, which together with the levels of fructose and glucose indicate differences significant differences between morphotypes. The emission of carbon dioxide downward trend and ethylene undetectable levels, as well the increase of highest acid and sugar accumulation during ripening of the fruit are indicative of non-climacteric nature. Additionally multivariate analysis of the data established that the most discriminant parameters between morphotypes are the content of glucose and sucrose, and during growth and development of the fruit citric acid content and variation in color tone (expressed as an angle Hue).

Since the optimal set of collection, the comparison was made by isolation, elucidation and identification of some fixed and volatile metabolites present in the fruit, which could be considered in future to give to the products derived from it a use value, because it is an indication of the intrinsic organoleptic or nutraceutical quality of each morphotypes. Among its fixed metabolites was determined the presence of methyl esters, ethyl alcohol,

fatty acids, waxes, as well as phenolic compounds *p*-coumaric acid and naringenin. The determination of volatile compounds established that consist mostly of esters and alcohols (aliphatic and benzoic acid derivatives), and that some of the major constituents, such as methyl salicylate, and ethyl esters of propionic acid, octanoic and benzoic, are common to the three morphotypes. The comparison of certain secondary metabolites confirmed the heterogeneity of the three morphotypes phytochemical, with the more complex the oval morphotype.

**Keywords:** *Solanum sessiliflorum*, growth and development, physiological maturity, phytochemical study.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>ESTADO ACTUAL DEL TEMA</b> .....	<b>7</b>
<b>2.1</b>	<b>Género <i>Solanum</i></b> .....	<b>7</b>
2.1.1	Generalidades .....	7
2.1.2	Características taxonómicas y morfológicas .....	8
2.1.3	Etnobotánica del género .....	8
2.1.4	Estudios fitoquímicos .....	9
<b>2.2</b>	<b><i>Solanum sessiliflorum</i> Dunal</b> .....	<b>11</b>
2.2.1	Generalidades .....	11
2.2.2	Características taxonómicas <sup>4a</sup> .....	12
2.2.3	Características morfológicas .....	13
2.2.4	Etnobotánica de la especie .....	15
2.2.5	Estudios previos .....	16
<b>2.3</b>	<b>Cambios físicos, químicos y fisiológicos durante el crecimiento y desarrollo del fruto</b> .....	<b>19</b>
2.3.1	Cambios de tamaño, peso e intensidad respiratoria .....	19
2.3.2	Cambios de color .....	20
2.3.3	Cambios químicos .....	22
<b>2.4</b>	<b>Metabolitos secundarios en frutas y vegetales</b> .....	<b>24</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>25</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivo general</b> .....	<b>25</b>
<b>3.2</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	<b>25</b>
<b>4</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>27</b>
<b>4.1</b>	<b>Instrumentos</b> .....	<b>27</b>
<b>4.2</b>	<b>Materiales</b> .....	<b>29</b>
4.2.1	Disolventes y reactivos .....	29
4.2.2	Cromatografía .....	30
<b>4.3</b>	<b>Material vegetal</b> .....	<b>30</b>
<b>4.4</b>	<b>Estudio a través del crecimiento y desarrollo del fruto</b> .....	<b>31</b>
4.4.1	Intensidad respiratoria y emisión de etileno .....	31
4.4.2	Acidez iónica (pH).....	32
4.4.3	Acidez total titulable .....	32
4.4.4	Sólidos solubles.....	32
4.4.5	Cuantificación de ácidos orgánicos y azúcares.....	32
4.4.6	Extracción de carotenoides.....	33
4.4.7	Cuantificación de carotenoides totales .....	33
4.4.8	Cuantificación de $\beta$ caroteno .....	34
4.4.9	Color.....	34
4.4.10	Análisis estadístico .....	35
<b>4.5</b>	<b>Estudio en el punto de madurez fisiológica del fruto</b> .....	<b>35</b>
4.5.1	Estudio de metabolitos fijos en la madurez fisiológica del fruto .....	35
4.5.1.1	Extracción de metabolitos fijos .....	35
4.5.1.2	Estudio cromatográfico preliminar de los extractos .....	36

4.5.1.3	Fraccionamiento inicial.....	36
4.5.1.4	Aislamiento, purificación y elucidación estructural de metabolitos fijos .....	37
4.5.2	Estudio de metabolitos volátiles en la madurez fisiológica del fruto .....	39
4.5.2.1	Destilación extracción simultánea (DES) .....	39
4.5.2.2	Microextracción en fase sólida (SPME) .....	39
4.5.2.3	Determinación de compuestos.....	40
4.5.3	Estudio comparativo de metabolitos fijos y volátiles en la madurez fisiológica del fruto .....	40
4.5.3.1	Metabolitos fijos .....	40
4.5.3.2	Metabolitos volátiles .....	40
<b>5</b>	<b><i>DISCUSIÓN Y RESULTADOS</i></b> .....	<b>43</b>
<b>5.1</b>	<b>Estudio a través del crecimiento y desarrollo del fruto .....</b>	<b>43</b>
5.1.1	Ácidos orgánicos y acidez.....	44
5.1.2	Azúcares .....	47
5.1.3	Intensidad respiratoria y emisión de etileno .....	49
5.1.4	Contenido de carotenoides y de $\beta$ caroteno .....	51
5.1.5	Cambios de color .....	54
5.1.6	Análisis multivariable de los resultados.....	58
<b>5.2</b>	<b>Estudio en la madurez fisiológica del fruto .....</b>	<b>63</b>
5.2.1	Estudio de metabolitos fijos en la madurez fisiológica del fruto .....	63
5.2.1.1	Fracción EdP.....	63
5.2.1.2	Fracción $\text{CHCl}_3$ .....	65
5.2.1.3	Fracción AcOEt.....	70
5.2.1.4	Fracción MeOH.....	75
5.2.1.5	Relevancia de la presencia en el fruto de los metabolitos fijos aislados y consideraciones biogénicas.....	76
5.2.2	Estudio de metabolitos volátiles en la madurez fisiológica del fruto.....	80
5.2.3	Estudio comparativo de los metabolitos fijos aislados y volátiles determinados .....	84
5.2.3.1	Metabolitos fijos .....	85
5.2.3.2	Metabolitos volátiles .....	87
<b>6</b>	<b><i>CONCLUSIONES</i></b> .....	<b>89</b>
<b>7</b>	<b><i>RECOMENDACIONES</i></b> .....	<b>93</b>
<b>8</b>	<b><i>BIBLIOGRAFÍA</i></b> .....	<b>101</b>

## LISTA DE ILUSTRACIONES

Ilustración 2-1. Hojas simples, opuestas, glabras, desiguales en tamaño, pecioladas de <i>Solanum nigrum</i> .....	7
Ilustración 2-2. Flores actinomorfas de 5 sépalos y 5 estambres con caliz y corola. A: <i>Solanum peruvianum</i> , B: <i>Solanum macbridei</i> . C: <i>Solanum minelegans</i> .....	7
Ilustración 2-3. . A: <i>Solanum mammosum</i> , B: <i>Solanum pseudocapsicum</i> . C: <i>Solanum scabrum</i> .....	8
Ilustración 2-4. Distribución de <i>Solanum sessiliflorum</i> . Fuente: Silva Filho, 1998 .....	12
Ilustración 2-5. Flor de cocona .....	14
Ilustración 2-6. Fruto de cocona .....	14
Ilustración 2-7. Planta de cocona .....	14
Ilustración 2-8. Morfotipos cultivados en San José del Guaviare. De izquierda a derecha morfotipos ovalado (1), redondo pequeño (2) y redondo grande (3) .....	15
Ilustración 4-1. Estrategia de purificación de las fracciones eluidas con cloroformo .....	37
Ilustración 4-2. Estrategia de purificación de las fracciones SS04 y SS05 eluidas con acetato de etilo .....	38
Ilustración 5-1. Acidez durante el desarrollo y maduración de los morfotipos ovalado (▲), pequeño redondo (■) y grande redondo (◆) expresada en cantidad de ácido cítrico, acidez total titulable (ATT) y acidez iónica (pH).....	45
Ilustración 5-2. Variación de los niveles de ácidos ascórbico, oxálico, succínico y málico durante el desarrollo y maduración de los morfotipos ovalado (▲), pequeño redondo (■) y grande redondo (◆). .....	46
Ilustración 5-3. Azúcares durante el desarrollo y maduración de los morfotipos ovalado (▲), pequeño redondo (■) y grande redondo (◆) expresado como sacarosa, glucosa, fructosa y sólidos solubles totales en la muestra. ....	48
Ilustración 5-4. Intensidad respiratoria durante crecimiento, desarrollo y maduración de los morfotipos ovoide (▲), redondo pequeño (■) y redondo grande (◆).....	50
Ilustración 5-5. Carotenoides totales durante el desarrollo y maduración de los morfotipos ovalado (▲), pequeño redondo (■) y grande redondo (◆).....	54
Ilustración 5-6. β caroteno durante el desarrollo y maduración de los morfotipos ovalado (▲), pequeño redondo (■) y grande redondo (◆) .....	54
Ilustración 5-7. Color en términos de luminosidad durante el desarrollo y maduración de los morfotipos ovalado (▲), pequeño redondo (■) y grande redondo (◆).....	56
Ilustración 5-8. Color en términos de Croma durante el desarrollo y maduración de los morfotipos ovalado (▲), pequeño redondo (■) y grande redondo (◆).....	57
Ilustración 5-9. Color en términos de ángulo Hue durante el desarrollo y maduración de los morfotipos ovalado (▲), pequeño redondo (■) y grande redondo (◆).....	57
Ilustración 5-10. Gráfico de componentes principales .....	60
Ilustración 5-11. Análisis canónico de discriminantes usando como variable de agrupación el morfotipo (Ovoide = 1; Redondo pequeño = 2 y Redondo grande = 3) .....	61
Ilustración 5-12. Análisis canónico de discriminantes, siendo la variable de agrupación el tiempo (días DAF).....	62
Continuación Ilustración 5-13. Espectros de masas de impacto electrónico para los compuestos mayoritarios de C2, en orden descendente: hexadecanoato de metilo, hexadecanoato de etilo y 9,12-octadienoato de etilo y oleato de etilo. ....	68
Ilustración 5-14. . Espectros de masas de impacto electrónico para los compuestos mayoritarios de C3, en orden descendente: ácido n-hexadecanóico, hexadecanoato de metilo, hexadecanoato de etilo y (Z)-11-hexadecenil acetato .....	69

Ilustración 5-15. Estructura propuesta para C4 - naringenina .....	72
Ilustración 5-16. Componentes de C5 (C5 <sub>a</sub> ácido <i>p</i> -cumárico; C5 <sub>b</sub> ácido <i>p</i> -dihidrocumárico) .....	73
Ilustración 5-17. Fragmentación propuesta para los compuestos presentes en C5 .....	75
Ilustración 5-18. Espectro de masas de impacto electrónico de C5 <sub>a</sub> (izq.) y C5 <sub>b</sub> (der.) .....	75
Ilustración 5-19. Ruta biogenética ácidos <i>p</i> -cumárico y dihidro- <i>p</i> -cumárico .....	78
Ilustración 5-20. Ruta biogenética de la naringenina .....	79
Ilustración 5-21. Perfiles cromatográficos obtenidos por HPLC-DAD ( $\lambda = 240$ nm), para los extractos etanólicos del epicarpio y el mesocarpio de los morfotipos (1) ovalado, (2) redondo pequeño y (3) redondo grande. Los cuadrados resaltan los tiempos de retención del ácido <i>p</i> -cumárico (TR = 33.8 min), ácido dihidro- <i>p</i> -cumárico (TR = 35.4 min) y naringenina (TR = 44.2 min) .....	86

## LISTA DE TABLAS

Tabla 2-1. Etnobotánica del género <i>Solanum</i> Fuente: Rodrick <i>et al.</i> , 1991.....	8
Tabla 2-2. Algunos estudios relevantes sobre <i>Solanum sessiliflorum</i> .....	18
Tabla 4-1. Fraccionamiento inicial del extracto etanólico del epicarpio del morfotipo ovalado .....	36
Tabla 5-1. Matriz de correlaciones entre los parámetros evaluados durante el desarrollo y maduración del fruto.....	59
Tabla 5-2. Hidrocarburos alifáticos determinados en la fracción SS01.....	64
Tabla 5-3. Compuestos determinados en C2.....	66
Tabla 5-4. Compuestos determinados en C3.....	69
Tabla 5-5. Datos espectroscópicos de RMN de la sustancia C4.....	71
Tabla 5-6. . Datos espectroscópicos de RMN de la sustancia C5.....	74
Tabla 5-7. Contenido de azúcares libres en las fracciones eluidas con MeOH.....	76
Tabla 5-8. Concentración relativa volátiles determinados en los morfotipos ovalado (1), redondo pequeño (2) y redondo grande (3), donde la X denota la presencia en cada morfotipo. KI (índice de Kovats) y KI* (índice de Kovats reportado en la literatura para columna DB-5 y equivalentes .....	82



## LISTA DE ABRAVIATURAS Y SÍMBOLOS

▲ <sub>o</sub> (1)	Valores correspondientes al Morfotipo Ovalado
■ <sub>o</sub> (2)	Valores correspondientes al Morfotipo Redondo Pequeño
◆ <sub>o</sub> (3)	Valores correspondientes al Morfotipo Redondo Grande
°C	Grados Centígrados
AC	Ácido carboxílico
ACD	Análisis canónico de discriminantes
AcOEt	Acetato de etilo
ACP	Análisis de componentes principales
AL	Alifático
AO	Aldehído
AR	Aromático
ASC	Contenido de ácido ascórbico
ATT	Acidez Total Titulable
BCAR	Contenido de β-caroteno
C*	Croma
CAR	Contenido de carotenoides totales
CC	Cromatografía en columna
CCD	Cromatografía de capa delgada
CCDP	Cromatografía de capa delgada preparativa
CD <sub>3</sub> OD	Metanol deuterado
CDCl <sub>3</sub>	Cloroformo deuterado
CG	Cromatografía de gases
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Diclorometano
CHCl <sub>3</sub>	Cloroformo
CIT	Contenido de ácido cítrico
CLV	Cromatografía líquida al vacío
CO	Cetona
COSY	Espectroscopía de correlación exclusiva
d	doblete
DAD	Detector de arreglo de diodos
DAF	Después de apertura floral
dd	doble doblete
DES	Destilación extracción simultánea con Solvente
E1	Extracto etanólico del epicarpio del morfotipo ovalado
E2	Extracto etanólico del epicarpio del morfotipo redondo pequeño
E3	Extracto etanólico del epicarpio del morfotipo redondo grande
EA	Éster alifático

EdP	Éter de petróleo
ee	exceso entantiomérico
EM	Espectro de masas
ER	Éster aromático
EtOH	Etanol
FN	Fenólico
FRU	Contenido de fructosa
g	gramo
GLU	Contenido de glucosa
h	horas
H*	Ángulo Hue
HMBC	Heteronuclear correlation through multiple bond coherence
HMQC	Heteronuclear multiple quantum correlation
HPLC	High performance liquid chromatography
Hz	Hertz
IK	Índice de Kovats
IPA	Isopropanol
IR	Infrarrojo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
L	litros
L*	Luminosidad
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
m	Multiplete
m/z	Relación masa carga
M1	Extracto etanólico del mesocarpio del morfotipo ovalado
M2	Extracto etanólico del mesocarpio del morfotipo redondo pequeño
M3	Extracto etanólico del mesocarpio del morfotipo redondo grande
MAL	Contenido de ácido málico
mbar	milíbar
Me <sub>2</sub> CO	Acetona
MeOH	Metanol
mg	miligramo
MHz	Megahertz
min	minutos
mL	mililitros
Nm	nanómetros
OH	Alcohol
OXA	Contenido de ácido oxálico
PG	Extracto etanólico del mesocarpio del morfotipo redondo grande
PO	Extracto etanólico del mesocarpio del morfotipo ovalado
PP	Extracto etanólico del mesocarpio del morfotipo redondo pequeño

ppm	partes por millón
PTFE	Politetrafluoroetileno (teflón)
q	cuartete
RID	Refraction Index Detector
RMN	Resonancia magnética nuclear
RMN <sup>13</sup> C	Resonancia magnética nuclear de Carbono 13
RMN <sup>1</sup> H	Resonancia magnética nuclear de Hidrógeno
RO	Rotación óptica
rpm	Revoluciones por minuto
s	segundos
SAC	Contenido de sacarosa
sn	singlete
SPME	Micro Extracción en Fase Sólida
SST	Sólidos Solubles Totales
SUC	Contenido de ácido succínico
T	Temperatura
t	Tripete
t <sub>R</sub>	Tiempo de retención
TMS	Tetrametilsilano
UV-Vis	Detector de ultravioleta – visible
δ	desplazamiento químico (PPM)







# 1 INTRODUCCIÓN

La familia Solanaceae comprende un gran número de especies herbáceas, arbóreas, arbustivas, epífitas y trepadoras, que se caracterizan por su estrecha relación con el flujo nutricional y farmacológico inherente al quehacer humano. Ésta familia es constituida por un estimado de 90 géneros que a su vez se subdividen en cerca de 4000 especies, entre las cuales se cuentan algunas comúnmente reconocidas como la papa (*Solanum tuberosum*), el tomate (*Solanum lycopersicum*), el ají (*Capsicum* spp.), el lulo (*Solanum quitoense*), el tabaco (*Nicotiana tabacum*) entre otras<sup>1</sup>.

Tal amplitud de géneros y especies, variabilidad genética y molecular, además de la gran diversidad biológica que la caracteriza, ha hecho que ésta familia de plantas sea objeto no solo de recurrentes investigaciones, sino también de una elevada importancia económica, que en la actualidad se expresa en diferentes aspectos como el alimenticio, el ornamental y el medicinal. De hecho, las especies pertenecientes a esta familia son ampliamente usadas en la industria farmacéutica debido a la complejidad de sus compuestos, principalmente constituidos por alcaloides, que pueden surtir diversos efectos en la salud humana<sup>2</sup>. No por nada es descrita como una familia de una increíble pluralidad biológica, química y ecológica, con gran importancia comercial por a su amplia distribución mundial<sup>1b</sup>.

El que sus especies se encuentren en todo el mundo exceptuando la región Antártica, no solo la ubica en todos los hábitats, desde el más húmedo hasta el más seco, sino que también explica su amplia diversidad morfológica representada por la gran variedad de caracteres en flores y frutos<sup>1b</sup>. Sin embargo, es esa misma amplitud la que ha impedido que sus especies hayan sido satisfactoriamente caracterizadas en todas las áreas del conocimiento, a pesar que estas tengan gran impacto económico para algunos sectores mundiales.

Un caso palpable de éste hecho es la situación observada en la región amazónica, la cual es reconocida mundialmente no solo por su amplia biodiversidad en flora y fauna, sino por su riqueza cultural y valioso conocimiento tradicional. Aunque la mayor densidad poblacional de la familia Solanaceae ha sido reportada en Suramérica, donde casi dos

terceras partes del género *Solanum* tiene representantes nativos y una tercera parte del género es considerada endémica, se encuentran casos como el de *Solanum sessiliflorum* Dunal, una especie nativa de la región amazónica, sobre la cual se desconocen diferentes aspectos como su riqueza fitoquímica, su comportamiento químico durante su crecimiento y desarrollo, y las implicaciones que sobre éstos tiene su pluralidad morfológica.

Algunos autores precisamente han sugerido que el conocimiento de la dinámica de crecimiento del fruto, el color y la química involucrada en la selección natural de las especies del género *Solanum* pueden convertirse en estrategias novedosas para su manipulación en un contexto comercial <sup>1b</sup>; dando soporte a las iniciativas de bioprospección, que tienen como fin último el uso sostenible y racional de la biodiversidad mundial, la cual particularmente en nuestro país cobra gran importancia debido a que se convierte en una alternativa para las iniciativas empresariales amazónicas.

La bioprospección de las especies vegetales ha sido delimitada como la “temática y trabajo colectivo orientados hacia la búsqueda, conocimiento y selección de organismos o productos derivados, con uso actual o potencial en salud, alimentación, industria y medio ambiente, entre otros y su aprovechamiento sostenible en procesos productivos a escala industrial o artesanal, con aplicación nacional o internacional de los productos o servicios generados”<sup>3</sup>. Particularmente este trabajo en búsqueda del conocimiento de una de las especies amazónicas involucra la búsqueda de metabolitos que permitan dar a éstas un uso potencial, dejando atrás el concepto extractivista y dándole una nueva perspectiva sostenible al uso de la biodiversidad<sup>3</sup>, la cual especialmente en la Amazonía colombiana se hace más que una idea atractiva, una inminente necesidad; esto, al hacer conciencia que la riqueza biológica amazónica contrasta de manera evidente con la creciente pobreza y destrucción ambiental que azota esta región; llevando inexcusablemente a reconocer que la biodiversidad no es exclusivamente un tema ambiental, sino principalmente social.

Dentro de éste contexto, en el departamento del Guaviare se han establecido entre los años 1999 y 2005 cerca de 150 Parcelas agroforestales, con especies maderables y de frutas amazónicas como arazá, copoazú, cocona y borjón, lo que aporta una base productiva importante para la “Asociación de Productores para el Cambio Económico del Guaviare ASOPROCEGUA” quien lidera el desarrollo frutícola en el departamento del Guaviare. Esta organización aglutina a 450 familias y actualmente cuenta con 145 socios activos que buscan aprovechar el potencial de los recursos biológicos en beneficio de la región.

A pesar de este potencial, los frutales amazónicos no han logrado consolidarse como una cadena de valor que permita a productores, transformadores y comercializadores, equitativamente, acceder a mercados, locales, nacionales e internacionales. Esto debido, entre otras razones, al escaso conocimiento de la oferta potencial productiva por localidad, la carencia de estudios tecnológicos de la dinámica del crecimiento y la productividad de las especies en los diferentes sistemas productivos establecidos que conduzcan a un buen manejo agronómico de las mismas, la inexistencia de registros de las pérdidas que se presentan tras la recolección que se ven incrementadas por la falta de adopción de tecnologías desarrolladas para la validación de métodos de cosecha, selección, clasificación y tratamiento poscosecha; todo además del hecho que la mayoría de organizaciones de productores y pequeña iniciativas empresariales presentan debilidades en aspectos como capacidad organizacional, gestión empresarial y estrategias de comercialización.

Entre los frutales amazónicos comúnmente cultivados en el Departamento del Guaviare se destaca el caso de *Solanum sessiliflorum* Dunal, comúnmente conocida como cocona, topiro o cubiu; ésta, aunque es una especie endémica, fue introducida por nativos y colonos en los arreglos agroforestales y chagras en sus sitios de asentamiento, lo cual la constituyó en un alimento tradicional de ésta zona, reconocido por su refrescante sabor, y por las propiedades que etnobotánicamente le son atribuidas, las cuales van desde su uso tópico para sanar quemaduras y eliminar algunos parásitos, hasta su ingestión para el control de los niveles de glucosa, colesterol y ácido úrico en la sangre<sup>1a, 4</sup>.

De ésta manera, la cocona, como buena parte de los frutales amazónicos ha sido considerada como especie promisoría, debido a sus atractivas características sensoriales, alto valor nutricional, potencial actividad biológica y la posibilidad de incluirla en diferentes procesos agroindustriales. No obstante, en nuestro territorio nacional los frutales amazónicos son poco conocidos debido a que tienen un comercio y una escala de producción reducidos, lo cual se deriva precisamente a las razones ya expuestas para los demás frutales amazónicos, que se enfatizan por su escasa difusión, problemas logísticos y los vacíos en investigación básica y tecnológica que permitirían dar respuesta a diversas cuestiones sobre la calidad y el rendimiento de la fruta.

En el caso de la cocona, éste vacío en la investigación no solo se encuentra en el desconocimiento de los apropiados tratamientos pre y poscosecha y la dinámica del crecimiento y la productividad de las especies en los diferentes sistemas productivos

establecidos, sino también al de las implicaciones que tiene su variabilidad en cuanto al tamaño de fruto, forma y sabor, aun a pesar que estas variaciones sean comúnmente reconocidas a escala local por los residentes de la alta Amazonía; ya que han sido resultado del proceso de selección y domesticación realizado por indígenas y colonos.

Este proceso de domesticación ha generado cambios metabólicos en la planta, lo cual podría pensarse conduce a variaciones en su contenido de metabolitos primarios, y más aun en los secundarios, ya que algunos de éstos son considerados caracteres específicos de las especies, además de respuestas químicas de defensa y adaptación al ambiente; por lo tanto su variabilidad puede ser tomada como una característica del mismo nivel que la morfología de la planta.

Los escasos estudios realizados sobre la especie han sido limitados a estudios puntuales que no diferencian las variaciones en la composición química entre las diferentes variedades de la fruta, y mucho menos el comportamiento de cada una durante su desarrollo; lo cual se convierte en un obstáculo para la adopción de decisiones técnicas en el cultivo, y aun más allá para el aprovechamiento de sus propiedades intrínsecas útiles para la generación de valor agregado y por tanto para el descubrimiento de nuevos usos en el sector agroindustrial.

Siendo las frutas más que una característica propia de las angiospermas los organelos destinados para la propagación de las semillas y por tanto la preservación de cada una de las especies, el estudio de su comportamiento químico (metabolitos fijos y volátiles, color, patrón de respiración, etcétera) durante las etapas de crecimiento y desarrollo, se convierten en una herramienta útil para un correcto tratamiento durante su pre y pos cosecha, con el fin de aumentar la calidad del producto, y de ésta manera convertirlo en una alternativa cultivable no solo a nivel de seguridad alimentaria, sino a un nivel comercial viable y sostenible.

En este sentido el Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas Sinchi y la Universidad Nacional de Colombia, mediante el proyecto “Interacción genotipo-ambiente en el rendimiento y la producción de derivados funcionales de frutos amazónicos con potencial para el departamento del Guaviare” el cual actualmente se ejecuta con la colaboración del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural; pretende a través de procesos de investigación participativa e innovación tecnológica, organizativa y empresarial con ASOPROCEGUA (asociación de pequeños productores) contribuir a la sostenibilidad de los sistemas productivos con potencial para el desarrollo y fortalecimiento de cadenas de valor que contribuyan a la generación de ingresos y al

mejoramiento de la calidad de vida de los pobladores de la región amazónica, esto dentro del marco del componente de Diversidad Biológica, Biotecnología y Biocomercio del Plan Estratégico Nacional 2004 – 2012, que contempla el desarrollo de estrategias que impulsen la inversión, producción y comercio de los productos y servicios derivados de la biodiversidad, con el fin de lograr un desarrollo sostenible de la región amazónica, tal y como fue planteado dentro de los objetivos del Convenio de Diversidad Biológica<sup>3</sup>.

Así las cosas, el presente proyecto de tesis pretendió esclarecer si las variaciones morfológicas de la especie pueden ser consideradas indicadores de cambios en la composición química de ésta, y aun más allá sus implicaciones sobre el momento adecuado de recolección del fruto, con el fin de maximizar la probabilidad de éxito durante las etapas posteriores que contemplan su transformación y comercialización. De ésta manera el presente trabajo se enmarcó en el contexto del conocimiento de la biodiversidad nacional y especialmente la agrodiversidad como uno de los soportes potenciales para el desarrollo del país y el mejoramiento de la seguridad alimentaria de las comunidades residentes en la Amazonía colombiana. En lo específico, se pretendió correlacionar tres de las variaciones morfológicas de *Solanum sessiliflorum* Dunal, comúnmente cultivadas en el departamento del Guaviare (ovalado (1), redondo pequeño (2), y redondo grande (3)), con la presencia de algunos metabolitos fijos y volátiles, y de ésta manera contribuir con el conocimiento de uno de los frutales amazónicos promisorios de éste departamento, que en un futuro puede verse traducido en un aumento de su difusión y consumo en el territorio nacional.

Bajo estas circunstancias, y para facilitar la lectura de los resultados del trabajo, este se dividió en siete partes fundamentales. La primera pretendió enmarcar el problema que durante el trabajo se decidió abordar y justificar la importancia que para la comunidad de la Amazonía colombiana tiene su solución. La segunda le permite al lector tener un conocimiento previo de la especie estudiada y los soportes bibliográficos utilizados para la disertación de los resultados. La tercera muestra los objetivos que se persiguieron durante la realización del presente proyecto. La cuarta muestra la metodología y el diseño experimental adoptado para lograr establecer las diferencias químicas entre tres morfotipos de cocona cultivados en el Departamento del Guaviare; el cual, con el fin de afrontar el problema de desconocimiento del fruto de un modo global fue abordado en primer lugar durante la etapa de desarrollo del fruto mediante la cuantificación de diversos factores químicos que diversos autores han señalado como indicadores de madurez debido a sus variaciones cuantitativamente apreciables durante esta etapa;

posteriormente, ya fijado el punto óptimo de recolección mediante el aislamiento, elucidación e identificación de otros metabolitos fijos y volátiles presentes en la fruta, los cuales podrían ser considerados a futuro para darle un valor de uso a los productos derivados de ésta. La quinta resume los resultados obtenidos dentro del proyecto, los cuales al haber sido analizados utilizando como herramienta el análisis multivariado permitieron encontrar los factores con mayor incidencia en la diferenciación química entre morfotipos. Finalmente la sexta y séptima recopilan las conclusiones y recomendaciones del proyecto desarrollado.

## 2 ESTADO ACTUAL DEL TEMA

### 2.1 Género *Solanum*

#### 2.1.1 Generalidades

*Solanum* es uno de los géneros más grandes del reino vegetal. Este incluye cerca de 1400 especies distribuidas a lo largo de todo el mundo, aunque la mayor parte se encuentra concentrada en la Amazonía tropical, de hecho se considera que allí cerca de las dos terceras partes del género *Solanum* tiene representantes nativos y una tercera parte del género total es endémica<sup>1a, 4c, 5</sup>.



Ilustración 2-1. Hojas simples, opuestas, glabras, desiguales en tamaño, pecioladas de *Solanum nigrum*

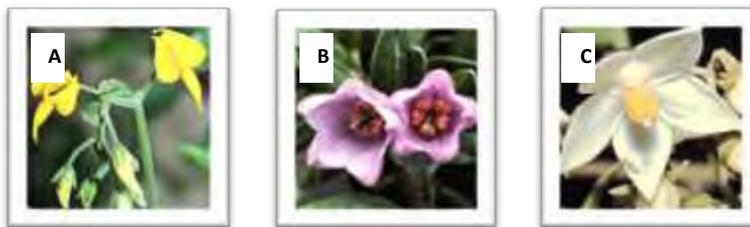


Ilustración 2-2. Flores actinomorfas de 5 sépalos y 5 estambres con caliz y corola. A: *Solanum peruvianum*, B: *Solanum macbridei*. C: *Solanum elegans*

Fuente: Natural History Museum. Solanaceae Source, disponible en <http://www.nhm.ac.uk/research-curation/research/projects/solanaceaesource/solanum/morphology.jsp>.

### 2.1.2 Características taxonómicas y morfológicas

Las especies del género *Solanum* abarcan una gran variedad de plantas, desde hierbas anuales hasta arbustos. Las hojas del género (Ilustración 2-1) pueden ser alternas, opuestas o geminadas; simples o compuestas; glabras o pubescentes, frecuentemente desiguales en tamaño, lobuladas o compuestas, pecioladas o sésiles, sin estípulas<sup>6</sup>.

Sus flores son generalmente actinomorfas, de 5 pétalos, cáliz, corola y 5 estambres; anteras dehiscentes, néctar ausente. Pueden ser unisexuadas o hermafroditas<sup>6</sup> (Ilustración 2-2).

Sus frutas son de morfología variable, pueden ser bayas suaves de colores brillantes, secas de colores brillantes, suaves verdosas, duras de color amarillo verdoso o secas encerradas por un cáliz (Ilustración 2-3). Se caracterizan por su sabor suavemente dulce y la presencia de glicoalcaloides<sup>6</sup>.

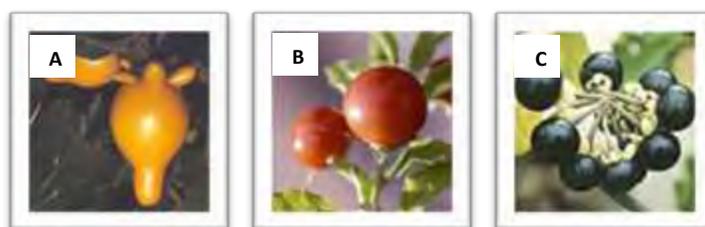


Ilustración 2-3. . A: *Solanum mammosum*, B: *Solanum pseudocapsicum*.C: *Solanum scabrum*  
Fuente: Natural History Museum. Solanaceae Source, disponible en <http://www.nhm.ac.uk/research-curation/research/projects/solanaceaesource/solanum/morphology.jsp>.

### 2.1.3 Etnobotánica del género

Al igual que las demás especies de la familia Solanaceae, al género *Solanum* le han sido atribuidas diferentes propiedades farmacológicas, que han sido reflejadas en diversos estudios de actividad biológica. En la Tabla 2-1 se resumen usos tradicionales que se le dan a algunas especies del género *Solanum* en la región amazónica<sup>1a</sup>

Tabla 2-1. Etnobotánica del género *Solanum* Fuente: Rodrick *et al.*, 1991

ESPECIE	USO
<i>Solanum</i> spp.	Se usa para curar eczemas, heridas, úlceras, enfermedades venéreas, reumatismo, fiebres, tumores, desordenes de la piel y afecciones intestinales. Es considerado diurético
<i>Solanum apaporanum</i>	Los indígenas de río Vaupés y Apaporis (Kubeos) secan y pulverizan el fruto y aplican el polvo en el cuerpo como repelente.
<i>Solanum appesum</i>	En Mocoa se consideran tóxicas. Las hojas se usan para lavar las prendas.

Continuación Tabla 2-1. Etnobotánica del género *Solanum* Fuente: Rodrick *et al.*, 1991

ESPECIE	USO
	Son irritantes.
<i>Solanum jamaicense</i>	En Leticia las frutas son hervidas y mezcladas con fariña para aliviar enfermedades estomacales. Los Ticunas la usan como purgante. Se consideran frutos tóxicos.
<i>Solanum liximitante</i>	Los Taiwanos usan su decocción para aliviar la tos persistente.
<i>Solanum mammosum</i>	Se usa como insecticida o repelente
<i>Solanum rugosum</i>	En la Pedrera se usan sus hojas para los dolores del hígado. Son irritantes. Se usan para lavar las prendas.
<i>Solanum stramonifolium</i>	En el Vaupés sus frutos son ingeridos. Se usa para la contención de hemorragias.

### 2.1.4 Estudios fitoquímicos

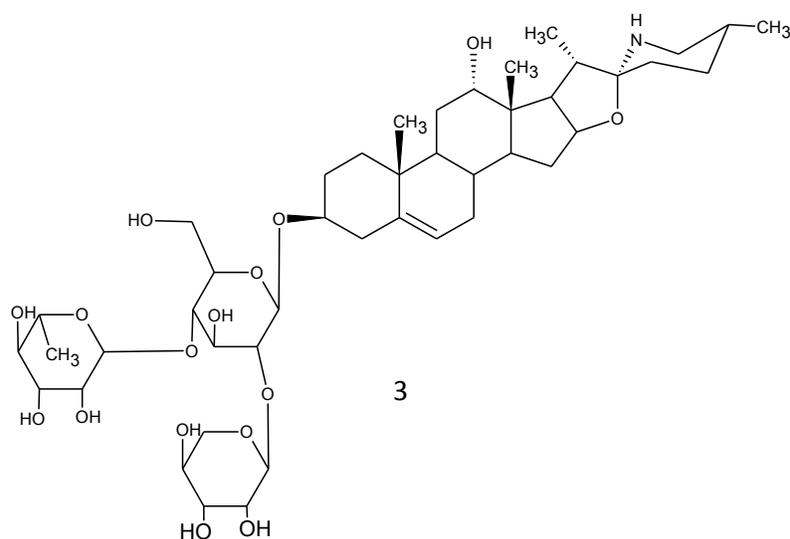
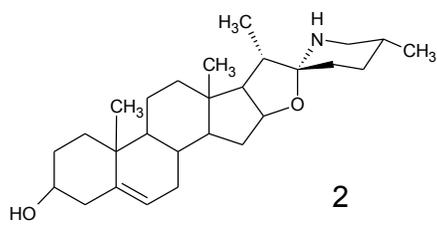
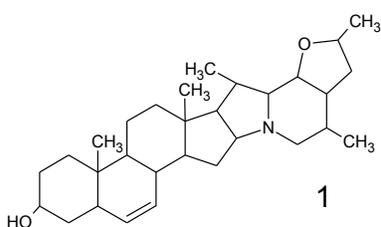
Los metabolitos secundarios tienen por objetivo actuar como defensa a ataques de herbívoros, microorganismos, virus y plantas competitivas; o bien, como compuestos señal para atraer procesos de polinización o dispersión de semillas; por tanto se consideran compuestos asociados a la supervivencia y la reproducción de las plantas que representan los caracteres adaptativos de la selección natural durante la evolución<sup>7</sup>.

Las especies del género *Solanum*, como miembros de la familia Solanaceae producen una gran variedad de metabolitos secundarios entre los cuales se encuentran tropano alcaloides, alcaloides esteroidales, withanolidos, ecdyesteroides, sesquiterpenos, diterpenos y algunas antraquinonas, saponinas esteroidales, sapogeninas, terpenos pentacíclicos, y los principios pungentes del género *Capsicum*<sup>1a, 7-8</sup>.

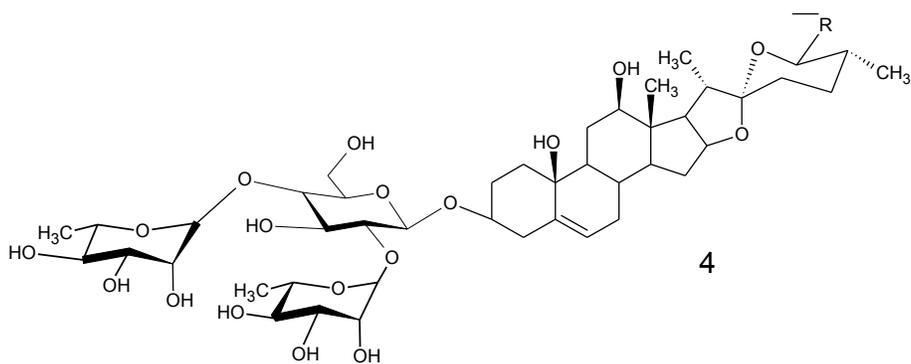
Específicamente, el género *Solanum* ha sido extensamente estudiado por sus alcaloides esteroidales, sus saponinas esteroidales y sus isoprenoides<sup>8</sup>. Los alcaloides del género *Solanum* exhiben un interesante rango de bioactividad, entre las cuales se encuentra la inhibición tumoral, antifúngica, antihepatotóxica, antiviral, teratogénica, embriotóxica<sup>2, 9</sup>. Los alcaloides esteroidales son dominantes en los géneros *Solanum* y *Lycopersium*, y en algunos pocos reportes se encuentran hallazgos en los géneros *Lycianthes*, *Cyphomandra* y *Cestrum parqui*<sup>7</sup>. Algunos ejemplos de alcaloides esteroidales son 2-(-metil-tetrahidrofurano)-solanidina (1) aislado de *Solanum cornifolium*<sup>10</sup> y solasodina (2) que se encuentra en diferentes especies del género *Solanum* como *S. torvum*<sup>11</sup>, y el robeneosido A (3) de *Solanum lycocarpum*<sup>12</sup>.

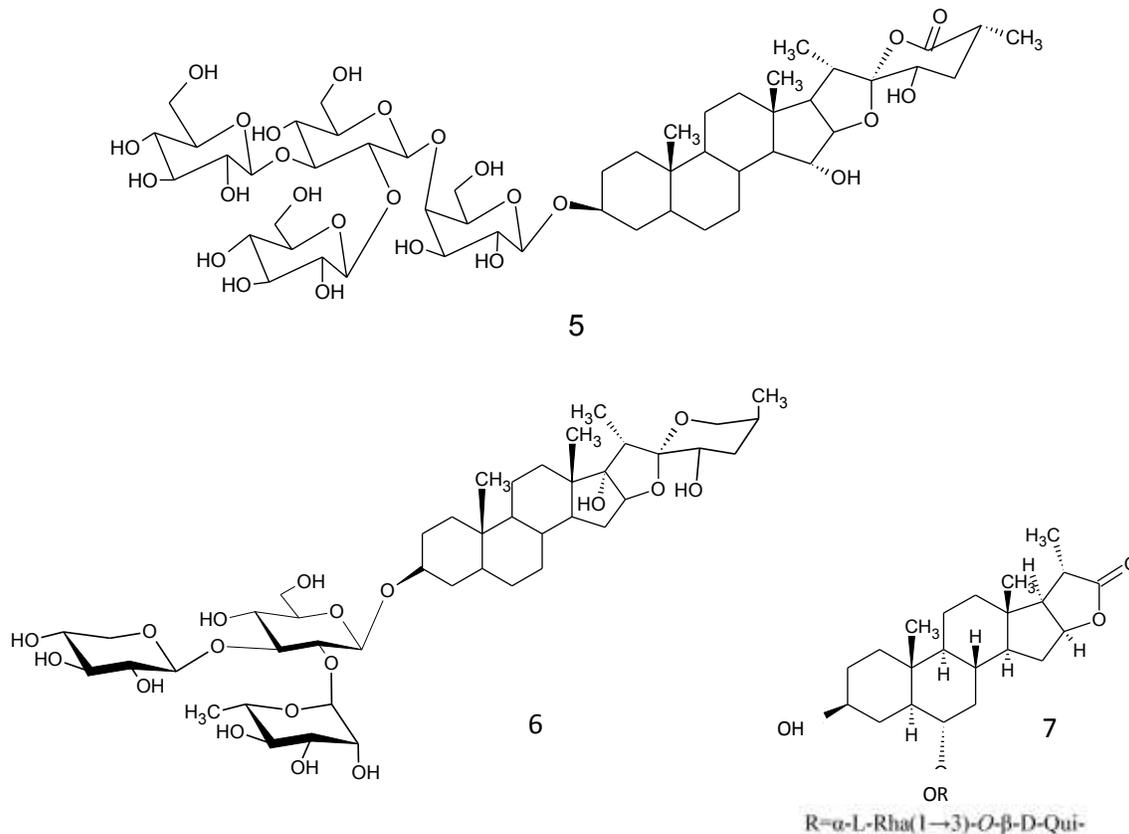
Se encuentran también diversos reportes de saponinas esteroidales aislados de diferentes especies del género *Solanum*. Entre ellos se encuentran los liconósidos a, b y c (4) de

*Solanum lycocarpum*<sup>13</sup>, solanigrósido C (5) de *Solanum nigrum*<sup>14</sup>, solakasosido (6) de *Solanum khasianum*<sup>15</sup>, solanolactósido A (7) de *Solanum torvum*<sup>16</sup>.



	R <sup>2</sup>
Liconosido 4a	OCH <sub>3</sub>
Liconosido 4b	OH
Liconosido 4c	H





## 2.2 *Solanum sessiliflorum* Dunal

### 2.2.1 Generalidades

La cocona o cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) es una especie nativa de la región Amazónica que fue domesticada por las tribus indígenas<sup>4a, 17</sup>. Es una planta que crece mejor a pleno sol que en sombra<sup>17</sup>. Pertenece a la sección Lasiocarpa de la familia de las solanáceas, lo que la relaciona filogenéticamente con la naranjilla o lulo (*Solanum quitoense*)<sup>4a, 4c</sup>.

Se encuentran reportes de que la cocona es un fruto con una cantidad considerable de hierro, vitaminas A y C, lo cual la hace una posibilidad importante para disminuir los problemas nutricionales de la región amazónica<sup>4a</sup>.

De acuerdo con los reportes encontrados la cocona es originaria del alto Orinoco. La especie se distribuye por toda la Amazonía del Brasil, Colombia, Perú, Ecuador y

Venezuela (Ilustración 2-4). en los Andes del Ecuador y Colombia hasta 1000 msnm, en los valles interandinos en Colombia y en el litoral Pacífico del Ecuador y Colombia<sup>4a, 17</sup>. Se encuentra en forma silvestre principalmente en las llamadas vegas de río y cultivado en las chagras por los habitantes de la región Amazónica, por lo cual es común encontrarla en los mercados del Oeste Amazónico<sup>17</sup>. En los municipios occidentales del estado del Amazonas del Brasil, la cocona se encuentra en forma espontánea en los campos y parcelas de los indios y mestizos<sup>4a</sup>.

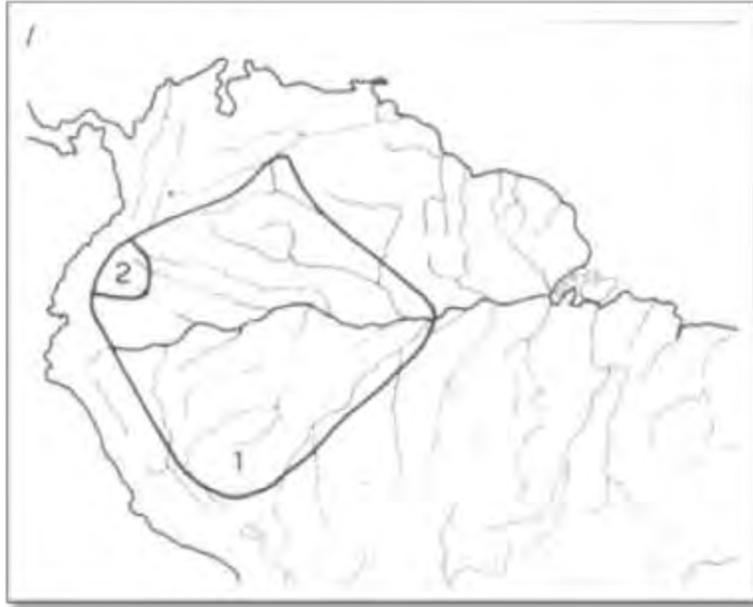


Ilustración 2-4. Distribución de *Solanum sessiliflorum*. Fuente: Silva Filho, 1998

Posiblemente su variabilidad morfológica se deba al proceso de selección indígena. Se encuentran diversos reportes, incluyendo el de Humbolt quien la encontró en la localidad de San Fernando de Atabapo y le dio el nombre de *Solanum topiro*<sup>4a</sup>.

### 2.2.2 Características taxonómicas<sup>4a</sup>

**División:** Spermathophytae

**Subdivisión:** Asteridae

**Tribu:** Solaneae

**Subfamilia:** *Solanoideae*

**Familia:** Solanaceae

**Sección:** Lasiocarpa

**Subgénero:** Leptostemonum

**Género:** *Solanum*

**Especie:** *sessiliflorum*

**Nombres comunes:** Cocona, Cubiu, Topiro, Orinoco Apple, Peach tomato

### 2.2.3 Características morfológicas

La planta de cocona es un arbusto herbáceo y fructífero, de una altura entre 1 y 2m, erecto y ramificado (Ilustración 2-7). En su madurez se torna semileñosa, de tallo cilíndrico y grueso, de abundante pubescencia, y ramifica cerca del suelo. Sus hojas son simples, alternas y con estípula en forma de espiral, en grupos de tres, ovoides, grandes, de ápice agudo, bordes sinuados, lóbulos acuminados, triangulares e irregulares con un lado de lámina más alto que el otro; sus dimensiones de encuentran entre los 30 y los 50cm longitudinalmente y 20 a 30cm transversalmente. Las hojas mayores tienen peciolo hasta de 14cm de largo. La cara anterior de la hoja tiene una pubescencia dura y blanuzca mientras que en la posterior esta es suave y estrellada<sup>4c, 18</sup>.

Sus condiciones óptimas de cultivo se encuentran entre los 18 y los 30°C, una altura entre los 2 y los 1200m, en zonas sin presencia de heladas, con precipitación pluviométrica de 1500 a 1400 mm/año y con una humedad relativa promedio de 85%<sup>4a</sup>. Dependiendo del material genético cultivado la producción varía entre las 40 y las 100 toneladas por hectárea, ofreciendo una posibilidad de programar la producción de modo tal que haya cosecha el año entero, asegurando un abastecimiento constate para la agroindustria<sup>4a</sup>.

La planta necesita solo una pequeña cantidad de fertilizante para tener una buena productividad, aun en suelos ácidos e infértiles<sup>19</sup>. Sin embargo es importante tener en cuenta que esta planta es especialmente sensible a la temperatura y la presencia de ciertos substratos<sup>4c, 18</sup>.

Es considerada resistente al ataque de hongos. Su ciclo vegetativo es calificado como corto<sup>17</sup>, ya que la producción empieza aproximadamente 7 meses después de la siembra, después de los cuales se encuentra una fructificación continua a lo largo de 1 o 2 años más. Su vida útil es de 3 años y la producción es de 14kg/año, lo que corresponde a cerca de 146 ton/ha. Dependiendo de las condiciones del suelo, el clima y el genotipo, las plantas alcanzan una altura que varía entre los 0,8 y los 2,0m<sup>19</sup>.

La inflorescencia es una cima situada en las ramas entre cada grupo de tres hojas y contiene entre cinco y ocho flores, de las cuales subsisten de uno a tres frutos. La cima está constituida por una rama de poco más de un centímetro, en la cual se ubican, en forma espirada, los pedúnculos florales, cada uno de los cuales tiene entre 2 a 5 mm de largo. La corola es de forma estrellada con 5 pétalos de color verde claro ligeramente amarillento. El cáliz está constituido por 5 sépalos de color verde. Las 5 anteras son amarillas, cada una de 3mm de largo y 1mm de ancho (Ilustración 2-5)<sup>4c</sup>.

Las flores, tanto las hermafroditas como las estaminadas, no poseen diferencias morfológicas externas importantes. Las flores estaminadas poseen estilete reducido y ovario rudimentario. Las flores hermafroditas poseen un estigma húmedo y estilete glabro, midiendo de 7 a 10cm, y su ovario es piloso y con forma de globo<sup>4a</sup>



Ilustración 2-6. Fruto de cocona



Ilustración 2-5. Flor de cocona



Ilustración 2-7. Planta de cocona

El fruto de la cocona se caracteriza por un color verde en su estado de inmadurez, que se torna amarillo – ocre en su punto de colecta (Ilustración 2-6). Su peso varía entre los 30 y los 400 g; su corteza es pubescente y coriácea. Su forma puede ser redonda, oblonga, achatada o alargada. La pulpa de la fruta constituye cerca del 75 % de la fruta y se caracteriza por tener un agradable sabor ácido<sup>4a, 17</sup>.

La cocona es muy variable en su tamaño de fruto, forma y sabor, y existe evidencia de que estas variaciones son comúnmente reconocidas a escala local por los residentes de la alta Amazonía donde la planta es cultivada por indígenas (Ilustración 2-8). Algunos consideran que las diferencias son lo suficientemente marcadas para considerarlas especies

separadas de *S. sessiliflorum*, y se han propuesto *S. alabile* y *S. georgicum* para nombrarlas, aunque otros autores ponen en tela de juicio este estatus<sup>4a, 4c, 18</sup>.



Ilustración 2-8. Morfotipos cultivados en San José del Guaviare. De izquierda a derecha morfotipos ovalado (1), redondo pequeño (2) y redondo grande (3)

La considerada por algunos *Solanum alabile*, es nativa del río Putumayo en el Amazonas Colombiano, se caracteriza por tener frutos de mayor tamaño, más dulces y menos ácidos que los otros morfotipos de *Solanum sessiliflorum*.

La *S. georgicum* es la posible progenitora de las etnovariedades agrupadas en *S. sessiliflorum* var. *sessiliflorum*. Se caracteriza por tener espinas y frutos pequeños de forma globosa. La desaparición de las espinas es posiblemente una consecuencia de la domesticación del fruto.

#### **2.2.4 Etnobotánica de la especie**

La pulpa el fruto es consumida directamente, en jugos, mermeladas, jaleas, dulces, compotas, ensaladas o combinada con bebidas alcohólicas y carnes<sup>4a, 17</sup>

En el aspecto etnobotánico, se dice que es buena para los riñones, el hígado y la piel. Como medicamento tradicional, las hojas maceradas sirven para cicatrizar heridas provocados por picaduras de arañas, para evitar la formación de ampollas en casos de quemaduras. El jugo es recomendado para el control de los elevados niveles de colesterol, el ácido úrico y de glucosa en la sangre, para curar la rasquiña en la epidermis externa y como acaricida. Como cosmético es usado para limpiar y dar brillo al cabello<sup>4a, 20</sup>.

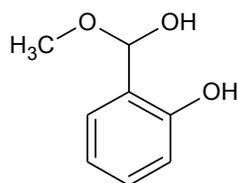
Las semillas del fruto son secadas y pulverizadas para uso medicinal. La tribu de los Taiwanos mezcla este polvo con el de la coca para aplicarlo sobre las membranas mucosas

y la lengua cuando están irritadas. Los Tukanos del río Apaporis toman una decocción fuerte y tibia que actúa como desparasitante. En La Pedrera la cocinan en agua y se la aplican en compresas en la frente para eliminar el dolor de cabeza. Se considera un excelente diurético y que actúa contra la gripa<sup>1a</sup>.

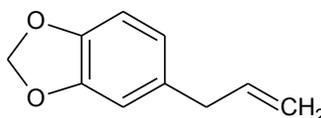
### 2.2.5 Estudios previos

Los estudios previos sobre *Solanum sessiliflorum* Dunal incluyen puntos de vista taxonómicos, botánicos, biológicos y agronómicos<sup>5, 18, 21</sup>; sin embargo son escasos los que se centran en el aspecto químico de la fruta o de la planta en general, y aun más escasos los que correlacionan este con las variaciones morfológicas de la fruta.

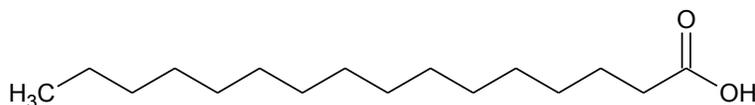
Marx *et al.*, 1998<sup>19</sup>, realizó una caracterización de la composición química general de la fruta en su madurez; que la describe como un fruto con un contenido de agua del 90,5 % y 32,1 % de carbohidratos libres; con contenidos importantes de ácido cítrico y málico (14,1 g y 0,36 g por cada 100 g de fruto), glucosa, fructosa y sacarosa (18,4 g; 7,0 g y 3,8 g/100 g de fruto respectivamente).



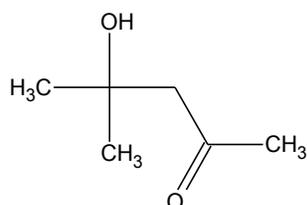
8



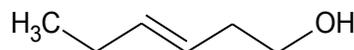
9



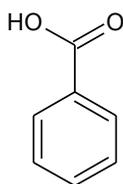
10



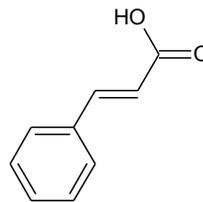
11



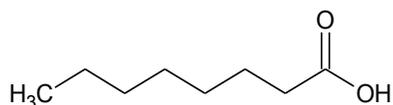
12



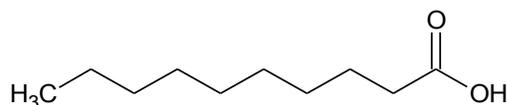
13



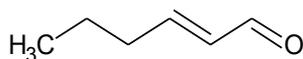
14



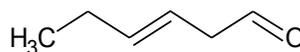
15



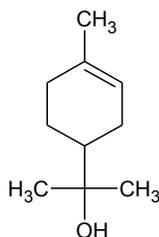
16



17



18



19

En cuanto a sus metabolitos volátiles se reporta la presencia de salicilato de metilo (8), safrol (9) y ácido palmítico (10) en el extracto obtenido por medio de arrastre por vapor<sup>19</sup> la de 4-hidroxi-4-metil-2-pentanona (11), salicilato de metilo (8), *E*-3-hexen-1-ol (12), ácidos benzoico (13), cinámico (14), octanóico (15) y decanóico (16), a partir de la hidrólisis enzimática del extracto glicosídico de la fruta<sup>22</sup> y de salicilato de metilo (8), *Z*-2-hexenal (17), *Z*-3-hexenal (18) y  $\alpha$ -terpineol (19) a partir del extracto obtenido por extracción líquido - líquido con pentano : diclorometano de la fruta homogenizada<sup>23</sup>.

A continuación se muestra un breve resumen de los aportes encontrados más relevantes en el estudio de la cocona (Tabla 2-2).

Tabla 2-2. Algunos estudios relevantes sobre *Solanum sessiliflorum*

AUTOR (AÑO)	RESUMEN
Boufleuher <i>et al.</i> (2008) <sup>18</sup>	El estudio estableció un protocolo para la micropropagación de cocona <i>in vitro</i> . Se investigaron diferentes medios de cultivo y diferentes micronutrientes con el fin de encontrar las mejores condiciones
Marx <i>et al.</i> (1998) <sup>19</sup>	Realizan un análisis químico general del fruto maduro de <i>Solanum sessiliflorum</i> que incluye macronutrientes, micronutrientes, ácidos orgánicos, carbohidratos individuales, ácidos grasos, aminoácidos libres, aminos biogénicas y compuestos volátiles. Resaltan la importancia de estudios posteriores sobre el cambio de nutrientes en cada morfotipo.
Pahlen, (1977) <sup>17</sup>	Describe el comportamiento agronómico y las variables de una colección de 35 accesiones de cocona, colectadas a lo largo de la Amazonía brasilera y peruana. Se encontró una gran variabilidad genética en cuanto a la forma y el tamaño del fruto.
Salick (1987) <sup>24</sup>	Estudio de la producción de cocona de 25 variedades distribuidas en la Amazonía Peruana
Silva Filho <i>et al.</i> (1999) <sup>4a</sup>	Describe correlaciones fenotípicas, genéticas y ambientales entre 13 descriptores morfológicos y químicos de 24 etnovariedades de cocona provenientes de la Amazonía Brasilera, peruana y colombiana
Silva Filho <i>et al.</i> (1997) <sup>25</sup>	29 accesiones naturales de cocona de la colección de mejoramiento genético de hortalizas del Instituto nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, fueron estudiados en diferentes características morfoagronómicas para descubrir los coeficientes de relación genotípica y la influencia de éstas sobre la producción de frutos.
Silva Filho <i>et al.</i> (1989) <sup>4b</sup>	Variación Fenotípica en frutos de doce introducciones de cubiu ( <i>Solanum sessiliflorum</i> Dunal) halladas en Manaus (Brazil), con el fin de determinar sus diferencias de producción, forma y dimensión del fruto, firmeza de la pulpa, volumen de jugo, y sólidos solubles totales.
Storti (1988) <sup>5</sup>	Estudio de la biología floral de <i>Solanum sessiliflorum</i> Dunal var. <i>sessiliflorum</i> de la región de Manaus en Brazil. Se evalúan diferentes especies de abejas polinizadoras.
Couturier (1988) <sup>21a</sup>	Se citan algunas especies de insectos potencialmente peligrosas para el cultivo de cocona.
Yuyama <i>et al.</i> (2007) <sup>4e</sup>	Cuantificación de los macro y los micronutrientes de algunas etnovariedades de cubiu ( <i>Solanum sessiliflorum</i> Dunal) con el fin de realizar un aporte a la tabla de composición química de los alimentos típicos de la Amazonía. Los resultados muestran a la fruta como un alimento hipocalórico, con considerable variabilidad en el contenido de minerales entre las diferentes etnovariedades.
Melgarejo <i>et al.</i> (2003) <sup>21b</sup>	Se aisló e inoculó un virus que causa deformaciones de las hojas y manchas necróticas en la planta de cocona. El virus fue

Continuación Tabla 2-2. Algunos estudios relevantes sobre *Solanum sessiliflorum*

AUTOR (AÑO)	RESUMEN
	biológicamente, serológicamente y moleculamente caracterizado.
Pardo (2004) <sup>20</sup>	Estudio sobre el efecto de un extracto de cocona sobre los niveles de colesterol y de glicemia en la sangre de pacientes. Se realizan mediciones antes y después de la toma.
Lizcano <i>et al</i> (2009) <sup>26</sup>	Se buscó el contenido total de compuestos fenólicos y tipo flavonoide de 19 plantas amazónicas entre las cuales se encuentra <i>Solanum sessiliflorum</i> . Adicionalmente se determinó su actividad antioxidante. Se encontraron valores de 0,96mg/g de compuestos fenólicos, 0,07mg/g de flavonoides.
Quijano y Pino (2006) <sup>23</sup>	Se realiza el estudio de volátiles de los frutos de cocona en tres estados de madurez a partir del extracto obtenido por extracción líquido - líquido con pentano : diclorometano de la fruta homogenizada
Fajardo (2004) <sup>22</sup>	Se realiza el estudio de volátiles del fruto de cocona a partir de la hidrólisis enzimática del extracto glicosídico de la fruta.

Como se puede observar, la gran distribución del género *Solanum*, principalmente en las zonas tropicales, ha permitido que éste se muestre como un género de gran diversidad, que ha sido utilizada por el hombre en diferentes aspectos, haciendo que éste juegue un rol bastante importante en el sector comercial. Sin embargo, los frutales amazónicos, y más específicamente *Solanum sessiliflorum* Dunal, ha sido objeto de pocos estudios que traten de esclarecer las diferencias químicas que pueden haber ocasionado los procesos de domesticación de la especie, los cuales, como ha sido estudiado por Silva Filho *et al*<sup>4a, 4c</sup> y Yuyama *et al*<sup>4e</sup> se han visto reflejadas en la aparición de diferentes morfotipos o etnovariedades a lo largo de la región amazónica.

## 2.3 Cambios físicos, químicos y fisiológicos durante el crecimiento y desarrollo del fruto

### 2.3.1 Cambios de tamaño, peso e intensidad respiratoria

El fruto cumple el propósito de proteger las semillas durante su desarrollo y servir de vehículos para la dispersión de semillas hacia los diferentes hábitats. Adicionalmente tienen gran importancia nutricional y económica para los humanos. Las familias mundialmente más conocidas por su variedad de frutos son la Solanaceae, Cucurbitaceae, Rosaceae, Rutaceae y Vitaceae<sup>27</sup>.

El desarrollo de frutos frescos es esencialmente dividido en cuatro etapas. La primera es el desarrollo floral, el cual es el periodo desde la iniciación floral hasta la antesis, donde la identidad, el número y la forma de los órganos se determinan. El segundo estado es la división celular, que empieza a partir de la fertilización; el tercero, es constituido por la ampliación celular que termina con el inicio de la maduración, a partir del cual se dan diferentes y rápidos cambios bioquímicos y estructurales que determinan el aroma, la textura, el color y el valor nutricional de la fruta<sup>27</sup>.

Los frutos pueden ser clasificados como climatéricos o no climatéricos de acuerdo a su patrón respiratorio durante el periodo de maduración<sup>28</sup>. Los frutos climatéricos por su parte experimentan un incremento en su tasa respiratoria y una concomitante producción de etileno que marca el inicio de la maduración, que se ve reflejada en el amarillamiento del pericarpio, el ablandamiento de los tejidos y los cambios en el aroma<sup>27</sup>.

Por el contrario las frutas no climatéricas no requieren de etileno para su proceso de desarrollo y maduración; por lo cual no lo producen en cantidades considerables. El mecanismo que regula la maduración en frutas no climatéricas no es muy claro, pero se piensa que debe estar asociado a las concentración de auxinas y de ácido abscísico<sup>27</sup>.

### **2.3.2 Cambios de color**

El color y su uniformidad parámetros que definen directamente la calidad de los vegetales; éste se considera un índice de frescura, palatabilidad y valor nutricional, además de un factor intrínseco a la aceptabilidad de un alimento, debido a que se considera que interfiere en el juicio de la dulzura, salinidad e intensidad del sabor<sup>29</sup>.

El color de los vegetales se debe principalmente a cuatro grupos principales de pigmentos naturales: clorofilas, carotenoides, flavonoides y betalainas, cada uno de los cuales confieren ciertos tonos característicos. Por lo tanto se considera que éstos pigmentos no solo juegan un papel particular en la absorción de energía lumínica necesaria para el proceso fotosintético; sino que también son necesarios para la atracción de polinizadores necesarios para la reproducción vegetal, la disminución de procesos fotooxidativos, entre otras funciones<sup>29-30</sup>.

Por su parte, las clorofilas están presentes en todas las partes de las plantas, (raíces, hojas, ramas, flores, frutos y semillas), al menos durante un periodo de su desarrollo;

aunque se encuentran con mayor concentración en hojas, frutas inmaduras e inflorescencias. Sus propiedades dependen de la naturaleza de su asociación con las lipoproteínas en los cloroplastos. Los mecanismos de degradación durante la maduración y senescencia de frutos es fundamental en el color de los frutos<sup>29</sup>.

Por otro lado los carotenoides son un grupo de compuestos liposolubles, presentes en los cromoplastos de plantas y otros organismos fotosintéticos, que están formados por ocho unidades de isopreno; los cuales pueden dividirse en dos grupos, los llamados carotenos que solo contienen átomos de carbono e hidrógeno y por tanto poseen menor polaridad, y las xantofilas, las cuales son sus derivados oxigenados, con al menos un grupo carboxilo, hidroxilo o epóxido, lo cual los convierte en compuestos de mayor polaridad<sup>29</sup>.

Los colores amarillo naranja o rojo de los carotenoides se deben al sistema conjugado de dobles enlaces. Al menos siete dobles enlaces en el sistema conjugado deben existir para que haya un impacto en el color. Esta capacidad de absorber luz es la base para su caracterización y cuantificación. La intensidad y el tono del color percibido depende del tipo, la concentración y el estado físico de los carotenoides presentes<sup>29-30</sup>.

La concentración y la composición de los carotenoides varían entre especies de vegetales. Diferentes solanáceas se reportan con buen contenido de carotenoides entre ellas el tomate (*Lycopersicon esculentum*) y el ají (*Capsicum annum*)<sup>29</sup>.

En alimentos los carotenoides son parámetros de calidad importantes debido a que éstos imparten atractivos colores como amarillo, naranja o rojo, en los humanos algunos carotenoides como el  $\beta$  caroteno actúan como provitamina A y muchos de ellos son potentes antioxidantes. Los carotenoides son considerados compuestos dietarios químicamente bioactivos ya que proveen protección para un grupo de condiciones degenerativas como las enfermedades cardiovasculares, cáncer, y degeneración de inmunidad; esto probablemente a su capacidad de atrapar oxígenos singletes y radicales peroxil, modular del metabolismo carcinogénico, inhibir la proliferación celular, permitir la diferenciación celular vía retinoides, simular de comunicación célula-célula, incrementar la respuesta inmune y actuar como filtro frente a la luz azul<sup>30</sup>.

Debido a su contenido de insaturaciones los carotenoides son susceptibles de ser oxidados o isomerizados. El calor, la luz, los ácidos y la adsorción sobre superficies activas promueven su isomerización a su configuración menos usual (*cis*), lo cual se traduce en la

pérdida de su actividad como pro vitamina A. La degradación oxidativa es la principal causa de la pérdida de carotenoides, depende de la disponibilidad de oxígeno, y es estimulada por la luz, las enzimas, los metales y la co - oxidación con hidroperóxidos lipídicos. En la degradación de carotenoides se forman inicialmente epóxidos y apocarotenoides, luego un fraccionamiento genera una serie de compuestos de bajo peso molecular similares a los producidos por la oxidación de ácidos grasos. Finalmente la degradación termina en la pérdida total de color y actividad biológica<sup>30</sup>.

Muchos factores influyen en el contenido de carotenoides en frutas y vegetales. El tipo de producto, el cultivar, la variedad, el clima el sitio geográfico de producción, el estado de madurez, la temperatura de maduración, la exposición a la luz solar, las tecnologías de pre y poscosecha<sup>30</sup>.

### **2.3.3 Cambios químicos**

La composición química de las frutas depende de diversos factores del cultivar (luz, temperatura, humedad, fertilidad del suelo, etcétera), de la planta, y hasta del mismo individuo, llegando a variar entre diferentes estados de madurez en el momento de la cosecha<sup>31</sup>. Esta composición puede ser vista como un grupo complejo de metabolitos que pueden ser clasificados en dos grandes grupos, a saber: primarios y secundarios. Los metabolitos primarios comprenden los ácidos orgánicos, ácidos grasos, nucleótidos y aminoácidos, y desempeñan un papel fundamental en el crecimiento y desarrollo de la planta, en los procesos de respiración, fotosíntesis y síntesis de hormonas y proteínas<sup>31</sup>. Por su parte, los metabolitos secundarios, incluyen los ácidos fenólicos, flavonoides, terpenoides, entre otros, estos son producidos como defensa química contra herbívoros, microorganismos, radiación UV, como atrayentes de otros animales que aseguran la polinización y la dispersión de semillas, como respuesta a condiciones de estrés, entre otras importantes funciones<sup>31</sup>.

Entre los metabolitos primarios se encuentran los carbohidratos, de los cuales es posible resaltar que son una de las partes más representativas de la composición de las frutas ya que constituyen cerca del 90% del peso seco de la fruta<sup>32</sup>. Se producen por el proceso fotosintético y su función puede ser tanto funcional como estructural<sup>31, 33</sup>. Se consideran reservas de energía, componentes importantes de los ácido nucleicos, de algunas vitaminas como la ribosa y la riboflavina y otros metabolitos secundarios. No son alimentos esenciales, proveen energía pero no nutrientes. Los azúcares predominantes en las frutas son básicamente sacarosa, fructosa y glucosa, además se encuentran

cantidades menores de maltosa, arabinosa, galactosa, sorbosa, octulosa y celobiosa, de otros mono y oligosacáridos como sustancias pécticas, celulosa, hemicelulosa y lignina. En las plantas los carbohidratos se encuentran en la pared celular e intracelularmente en plastidios, vacuolas y el citoplasma<sup>32</sup>.

Los cambios en el contenido de polisacáridos presentes en las paredes celulares durante el desarrollo y maduración de la fruta (pectinas, celulosa, hemicelulosa), debido a procesos de despolimerización y de solubilización, son causantes de cambios importantes como la pérdida de firmeza en el fruto.<sup>27</sup>

Por su parte los ácidos orgánicos son intermediarios en el ciclo del ácido tricarboxílico, una de las vías respiratorias presentes en toda la naturaleza. Éstos generalmente se acumulan en etapas tempranas del desarrollo del fruto y son usados como sustratos durante la maduración; sin embargo la concentración final de ácidos orgánicos está determinada por el balance entre la biosíntesis, la degradación y la acumulación de éstos en la célula<sup>34</sup>.

Se considera que un elevado contenido de ácidos eventualmente puede reducir la calidad de la fruta, pero un contenido moderado aumenta su palatabilidad y disminuye el riesgo de ataque microbiano. Se encuentra que los ácidos cumplen un papel fundamental en el aspecto nutricional y en el procesamiento, ya que de su concentración se derivan aspectos como el rango de pH encontrado en la fruta y en los productos derivados de ésta. Existen diferentes ácidos dependiendo de la clase de fruta analizada, entre los ácidos mayoritarios más comunes se encuentran el cítrico y el málico; sin embargo otros ácidos orgánicos comunes son los ácidos oxálico, láctico, succínico, pirúvico, glicérico, shikímico, málico e isocitríco<sup>32, 34b</sup>.

El contenido de azúcares y ácidos en frutas son factores importantes en el desarrollo de su sabor y por tanto en la demanda de los consumidores, por lo que se considera que el metabolismo de ácidos en el tejido de la fruta no solo es importante desde el punto de vista fisiológico sino desde el comercial; lo cual se deriva en un gran interés por su caracterización y cuantificación en diversos tipos de frutas<sup>34-35</sup>.

Las frutas y vegetales han sido recientemente reconocidas como fuente importante de metabolitos secundarios, lo cuales individualmente o en una acción sinérgica, pueden generar beneficios a la salud humana<sup>31</sup>, debido principalmente a su actividad

antioxidante. Los metabolitos secundarios presentes en frutas y vegetales son diversos, entre ellos se cuentan el ácido ascórbico, los carotenoides y los compuestos fenólicos<sup>36</sup>.

Los metabolitos secundarios presentes en plantas superiores se caracterizan por su gran diversidad y complejidad estructural; de hecho, el patrón de metabolitos secundarios de una planta dada, es realmente complejo, y en muchos casos este presenta diferencias dependiendo del organelo estudiado, las etapas de desarrollo, entre individuos y poblaciones; lo cual, es de esperarse ya que algunos autores plantean que éste tipo de compuestos es sintetizado por las plantas y otros organismos como defensa química contra el ataque de herbívoros, microorganismos, e incluso contra la competencia entre especies, o bien como atractores para el aseguramiento de los procesos de polinización y dispersión de semillas; por lo tanto son considerados caracteres adaptativos que se han ido diversificando durante la evolución y la selección natural<sup>31, 36</sup>.

## 2.4 Metabolitos secundarios en frutas y vegetales

Las plantas producen una gran cantidad de metabolitos secundarios, algunos de las cuales se considera que participan directamente en la mayoría de los procesos de crecimiento y desarrollo<sup>37</sup>. Los metabolitos secundarios más comúnmente encontrados en frutas y vegetales son terpenoides, alcaloides, compuestos fenólicos y compuestos azufrados, y a diferencia de los metabolitos primarios estos se distribuyen según los grupos taxonómicos en el reino vegetal.

Particularmente las frutas y vegetales han sido históricamente reconocidas por ser fuentes ricas en algunos micronutrientes esenciales y en fibra, sin embargo, recientemente se ha hecho conciencia de éstas como una importante fuente de productos naturales, algunos de los cuales individualmente o en combinación pueden ser benéficos para la salud<sup>36</sup>. Por ejemplo, algunos metabolitos secundarios son reconocidos por ser provitaminas, por ejemplo el  $\beta$ -caroteno<sup>37</sup>. Por su parte algunas vitaminas, polifenoles, carotenoides, flavonoides y betaínas han sido considerados por diversos autores como metabolitos con considerable actividad antioxidante *in vitro*, lo cual es un buen indicio de sus importantes aplicaciones en la salud humana<sup>36</sup>, debido a su capacidad de atrapar radicales libres, lo cual explica el hecho que un elevado consumo de frutas y vegetales aumenta la concentración de antioxidantes en la sangre y demás tejidos corporales, lo cual puede proteger contra el daño oxidativo a células y tejidos.

## 3 OBJETIVOS

### 3.1 Objetivo general

Determinar la relación química existente entre tres variedades del fruto de *Solanum sessiliflorum* Dunal cultivadas en cercanías de San José del Guaviare.

### 3.2 Objetivos específicos

Definir la naturaleza climatérica o no climatérica de cada una de las variedades de cocona objeto de estudio, además del momento apropiado de recolección mediante el análisis de parámetros fisicoquímicos cuyo valor esté directamente relacionado con el crecimiento, desarrollo y maduración del fruto.

Aislar y purificar algunos metabolitos secundarios a partir del extracto etanólico del fruto en su madurez fisiológica (epicarpio/mesocarpio) de uno de los morfotipos de *Solanum sessiliflorum* Dunal por medio de técnicas cromatográficas y elucidar sus estructuras usando métodos espectroscópicos.

Comparar la composición química de los tres morfotipos evaluados utilizando como patrón de comparación los metabolitos aislados y purificados en uno de los morfotipos de *Solanum sessiliflorum* Dunal por medio de técnicas cromatográficas, y determinar si éste parámetro tiene alguna relación con la morfología del fruto.

Establecer si existe relación química entre los tres morfotipos evaluados mediante la determinación de algunos de sus metabolitos volátiles.



## 4 MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Instrumentos

La medida de acidez iónica de los frutos se realizó usando un potenciómetro con electrodo de vidrio Schoot® N4 Å a 20°C. La medida de sólidos solubles totales se realizó en un refractómetro Atago® 103 bp a 20°C. La determinación del peso de las muestras se realizó en una balanza analítica Ohaus AR2140. La cuantificación de ácidos orgánicos, azúcares y  $\beta$  caroteno en la fruta se realizó en un equipo HPLC 1200 Series de Agilent Technologies® (USA) dispuesto en el laboratorio de la sede Bogotá del Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas Sinchi; acoplado en serie a un detector ultravioleta – visible (UV- Vis) y uno de índice de refracción (RID) 1200 Series de Agilent Technologies®, utilizando el software Chemstation para sistemas de cromatografía líquida (LC) de Agilent technologies® (USA) para el control y adquisición de datos. Los espectros de ultravioleta y la cuantificación de carotenoides totales fueron obtenidos en un espectrofotómetro Beckman® Coulter DU-640 situado en el laboratorio de la sede Bogotá del Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas Sinchi, utilizando una celda de cuarzo para 100 $\mu$ L de muestra. El color de los frutos fue determinado por el uso de un espectrocolorímetro portátil HunterLab® Miniscan XE plus, previamente calibrado mediante una trampa de color y un estándar blanco (Iluminante D65, Observador 2).

Los análisis de cromatografía de gases acoplada a detector de conductividad térmica (CG-TCD) y de ionización de llama (CG-FID) se llevaron a cabo en un equipo 4890D de Agilent Technologies® (USA) con un software de adquisición de datos Clarity Lite® de Data Apex® (UK); ubicado en el Laboratorio del Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas Sinchi, sede Bogotá. La separación de los gases de interés se realizó usando como gas de arrastre Helio (He 99,995%) en una columna capilar Carbonplot 115-3133 de J&W Scientific® (USA), con 30 m de longitud, 0,53  $\mu$ m de diámetro interno y una película de 3  $\mu$ m. Las temperaturas del detector y el inyector durante la corrida permanecieron a 250°C y 100 °C, respectivamente. La identificación de CO<sub>2</sub> se hizo en modo Split, a un flujo de 8,9mL \*min<sup>-1</sup>, mediante el uso del detector TCD, y una temperatura en el horno del CG de 30°C (1 min), seguido por un calentamiento de 30°C/min hasta 50°C (0 min). La determinación de etileno (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>) se hizo a un flujo de 12,5mL\*min<sup>-1</sup>, usando el detector FID, a una temperatura en el horno del CG de 50°C durante 3,5 min.

Los análisis de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas fueron realizados en un cromatógrafo de gases (HP 7890A) del departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá, el cual está equipado con un detector de masas selectivo (MSD HP 5975C), inyector split/splitless, sistema de adquisición de datos (HP® Chemstation 1.05) y librería de espectros de masas NIST® 0.8. Los espectros de masas (EI, 70eV) y los cromatogramas reconstruidos (a partir de la corriente iónica) fueron obtenidos por escaneo automático en el rango de masas  $m/z$  40 – 350 a 3.5 scans \*  $s^{-1}$ . La homogeneidad de los picos cromatográficos obtenidos fue verificada con la coincidencia de los cromatogramas de masas con los fragmentos de ion característicos. Para el caso de la determinación de metabolitos fijos aislados la separación fue llevada a cabo con una columna capilar DB-1MS de 60m x 250 $\mu$ m recubierta con 100% dimetilpolisiloxano (0,25 $\mu$ m de espesor de película), usando como gas de arrastre He (99,995%), con una cabeza de presión de 6,64psi una velocidad de flujo lineal de 0,7mL \*  $min^{-1}$ . La inyección se realizó en modo split, con una relación 1:30. La temperatura en el horno del cromatógrafo de gases fue 105°C durante 1 min. Las temperaturas de la cámara de ionización y la línea de transferencia fueron de 150 y 230 °C respectivamente. Por su parte la separación de los compuestos volátiles fue llevada a cabo con una columna capilar RTX-5MS de 60m x 250 $\mu$ m recubierta con 5% de fenil poli (metil siloxano) (0,25 $\mu$ m de espesor de película), usando como gas de arrastre He (99,995%), con una cabeza de presión de 6,88psi una velocidad de flujo lineal de 0,5 mL \*  $min^{-1}$ . La inyección se realizó en modo split, con una relación 1:30. La temperatura en el horno del cromatógrafo de gases para la separación de cada una de las extracciones de compuestos volátiles fue programada desde 50°C (1 min) hasta 220°C (0 min) a una velocidad de calentamiento de 4°C \*  $min^{-1}$ , seguido por un calentamiento hasta 280°C (4 min) a una velocidad e calentamiento de 8°C \*  $min^{-1}$ . Las temperaturas de la cámara de ionización y la línea de transferencia fueron de 150 y 230°C respectivamente.

Los espectros de resonancia magnética nuclear de Hidrógeno (RMN  $^1H$ ), Carbono trece (RMN  $^{13}C$ ) y bidimensionales (RMN 2D) fueron tomados en el espectrómetro Bruker® Avance 400 ubicado en el departamento de Física de la Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá, utilizando cloroformo deuterado (CDCl<sub>3</sub> 99.8%D) o metanol deuterado (CD<sub>3</sub>OD 99.8%D), según el caso y referenciando los desplazamientos químicos con tetrametil silano (TMS) como patrón interno ( $\delta$ 0) y las constantes de acoplamiento ( $J$ ) en Hz. La frecuencia utilizada fue de 400 MHz para los ensayos de RMN  $^1H$  y de 100MHz para los de RMN  $^{13}C$ .

Los espectros de Infrarrojo de las mezclas y compuestos aislados fueron tomados en película sobre una celda de KBr, usando un espectrómetro Shimadzu® Prestige 21, ubicado en el laboratorio de macromoléculas de la Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá, haciendo un barrido entre  $400\text{ cm}^{-1}$  y  $8000\text{ cm}^{-1}$ . Los espectros fueron analizados en el programa IR solution® de Shimadzu Corporation®. La comparación de los extractos etanólicos de cada morfotipo y la determinación de la presencia de los metabolitos fijos aislados en cada uno de ellos se realizó en un equipo de HPLC-UV-DAD Merck-Hitachi® D-7000, equipado con detector de arreglo de diodos L-4500, una bomba inteligente L-6200A y una interfase L-6000A, ubicado en el laboratorio de productos naturales vegetales del departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá. La rotación óptica específica fue determinada en el polarímetro ubicado en el laboratorio de productos naturales vegetales de la Universidad Nacional de Colombia.

## 4.2 Materiales

### 4.2.1 Disolventes y reactivos

Los disolventes acetato de etilo (AcOEt), éter de petróleo (EdP), n-hexano (Hex), cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ ), diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) (Merck KGaA® (Darmstadt, Alemania)), metanol (MeOH), acetona ( $\text{Me}_2\text{CO}$ ) (Panreac Quimica Sau® (España)) empleados en la separación cromatográfica preparativa de compuestos fueron grado analítico o bien grado comercial destilados previo a su utilización. Los disolventes MeOH, Hex e isopropanol (IPA) (Merck KGaA® (Darmstadt, Alemania)) usados en cromatografía instrumental fueron grado HPLC. Los solventes  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{D}_2\text{O}$  empleados para la disolución de la muestra para su toma de espectros RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$ , y RMN 2D fueron adquiridos de Merck KGaA® (Darmstadt, Alemania), Sigma-Aldrich® (Missouri- USA) y Panreac Quimica Sau® (España).

La solución 0,1mol / L de hidróxido de sodio (NaOH), el ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 95 – 97%, el ácido clorhídrico fumante 37% (HCl), el ácido fórmico 98% ( $\text{CHOOH}$ ) y el ácido acético glacial 100% ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) fueron adquiridos de Merck KGaA® (Darmstadt, Alemania). Los estándares de D-glucosa, L-fructosa, sacarosa, ácido málico, ácido succínico, ácido oxálico, ácido cítrico y ácido ascórbico de Sigma-Aldrich® (Missouri- USA); el estándar de

$\beta$ -caroteno de Fluka® – BioChemika con una pureza  $\geq 97\%$ . Los estándares gases con concentración conocida de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y etileno (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>) fueron adquiridos en AGA-Fano (Bogotá – Colombia)

#### **4.2.2 Cromatografía**

La cromatografía de capa delgada (CCD) fue llevada a cabo en cromatofolios Merck KGaA® (Darmstadt, Alemania) de gel de sílice 60F<sub>254</sub> y RP-18 de 0,3mm de espesor. La cromatografía líquida al vacío se realizó usando como soporte gel de sílice 60HF<sub>254</sub> para cromatografía de capa delgada de Merck KGaA® (Darmstadt, Alemania). Las separaciones cromatográficas en columna se realizaron empleando gel de sílice 60 Merck (70-230 Mesh), Sephadex® LH-20 de Sigma Aldrich® (Missouri- USA) y gel de sílice 60 Merck (230-400 Mesh) para cromatografía en columna flash de Merck KGaA® (Darmstadt, Alemania). El control de pureza se efectuó en CCD, empleando siempre luz UV, el revelador de vainillina en ácido fosfórico y vapores de yodo como reveladores<sup>38, 39</sup>.

### **4.3 Material vegetal**

El estudio se llevó a cabo sobre frutos provenientes de cultivos ubicados en la vega del río Guaviare, dentro del municipio de San José del Guaviare (Colombia). El área se caracteriza por una altitud de 214 m sobre el nivel del mar, una temperatura promedio anual de 26,0°C, una temperatura mínima de 19,5°C y una máxima de 33,4°C. La humedad relativa del sitio oscila entre 60% y 98% de acuerdo a la época del año, debido a la cercanía del sitio de cultivo al río. La pluviosidad promedio anual es de 2600 a 3100 mm por año. Es importante destacar que la fertilidad de las zonas denominadas vegas de río de la región amazónica y por tanto la cantidad de minerales disponibles en su suelo, se ven claramente afectadas por el transporte de sedimentos debido a los cambios en el caudal del río.

Se sometieron a evaluación frutos de tres morfotipos (ovalado (1), redondo pequeño (2) y redondo grande (3) ver Ilustración 2-8), durante su desarrollo y maduración, enmarcados entre los días 35 y 70 después de la apertura del botón floral.

Para tal efecto fueron marcados 200 frutos cuajados (a los siete días después de la apertura floral (DAF)) de cada uno de los morfotipos, y se evaluaron semanalmente

propiedades físicas y químicas hasta el día 70 (10 semanas entre Octubre y Diciembre de 2009).

Debido a la disminución de la tasa de crecimiento en peso (peso fresco y peso seco) y tamaño (diámetros longitudinal y transversal) a partir del día 35 se ubicó el punto en el cual se da fin de la etapa de multiplicación celular y se da inicio a la de elongación celular. A partir de éste momento se procedió con la medida de los parámetros químicos, para lo cual cinco frutos (cinco réplicas) a partir de la semana 4 (día 35 DAF) fueron congelados y almacenados enteros a una temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  y condiciones de oscuridad hasta el momento del procesamiento.

Fijado el momento óptimo para la recolección del fruto fueron colectados aproximadamente 4 kg de cada morfotipo en su madurez fisiológica, los cuales fueron utilizados dentro de la etapa de determinación y comparación de metabolitos fijos y volátiles.

## **4.4 Estudio a través del crecimiento y desarrollo del fruto**

### ***4.4.1 Intensidad respiratoria y emisión de etileno***

La intensidad respiratoria y la emisión de etileno de los frutos fue medida mediante una modificación del método de atmósfera confinada propuesto por Tadesse et al (2002)<sup>40</sup> y Hernández et al (2007)<sup>33</sup>, la cual consiste en la introducción de cada uno de los frutos previamente pesados en cámaras herméticas durante un periodo de una hora, después del cual se procedió a tomar una muestra de 10 mL de gases e inyectarla en un vial previamente dispuesto al vacío (4 mbar). Tal medición se llevó a cabo inmediatamente después de ser desprendidos de la planta<sup>41</sup> (ubicada en cada cultivo del municipio de San José del Guaviare), con el fin obtener el valor real previo a los cambios en la intensidad respiratoria causados por el estrés del desprendimiento fruta – planta.

A partir de los gases almacenados en los viales se evaluó la emisión de  $\text{CO}_2$  y  $\text{C}_2\text{H}_4$  de los frutos por medio de CG-TCD y CG-FID, respectivamente<sup>33, 42</sup>. La cuantificación de cada uno de los gases de interés se realizó por comparación de áreas y tiempos de retención con la curva de calibración obtenida con estándares legítimos de concentración conocida, a saber 1036 ppm, 501 ppm y 10 ppm para  $\text{C}_2\text{H}_4$  y 9,7%, 0,9% para el caso de  $\text{CO}_2$ <sup>33</sup>. Cabe

destacar que la intensidad respiratoria de los frutos se reporta como dióxido de carbono producido por unidad de de volumen y tiempo del sistema internacional (mL CO<sub>2</sub>/kg/h)<sup>43</sup>.

#### **4.4.2 Acidez iónica (pH)**

Fue determinada usando un potenciómetro con electrodo de vidrio Schoot N4 Å a 20°C en la pulpa de la fruta. Los resultados fueron expresados en unidades de pH<sup>33</sup>.

#### **4.4.3 Acidez total titulable**

Se realizó por titulación de 2 gramos de la fruta previamente homogenizada, y diluida a 50 mL con agua destilada. El punto final de titulación se determinó por el viraje a color rosa del indicador fenolftaleína, previamente adicionado en solución etanólica al 1% a la fruta homogenizada y diluida. La titulación se realizó con NaOH 0,1N. La acidez titulable se calculó como peso en gramos del ácido predominante por cada 100 g de fruta, mediante la ecuación:

$$A = \frac{100 V_{NaOH} N_{NaOH} P_{eq}}{w}$$

Siendo  $V_{NaOH}$  y  $N_{NaOH}$  el volumen (mL) y la normalidad (0,01 meq/mL) de NaOH utilizado respectivamente,  $P_{eq/g}$  el peso equivalente del ácido mayoritario en la fruta (0,064 para el ácido cítrico) y  $w$  el peso en gramos de la muestra titulada<sup>33,44</sup>.

#### **4.4.4 Sólidos solubles**

Se realizó mediante lectura refractométrica directa del jugo de la fruta a 20°C, en un refractómetro portátil con escala de 0 – 32 °Brix. Cuando la lectura se llevó a cabo a una temperatura diferente a 20°C se aplicó el factor de corrección correspondiente<sup>33</sup>.

#### **4.4.5 Cuantificación de ácidos orgánicos y azúcares**

Se cuantificó la concentración de sacarosa, fructosa, glucosa, ácido málico, succínico, cítrico, oxálico y ascórbico como indicadores de los cambios químicos durante la maduración de las muestras evaluadas. Ésta se realizó por comparación de áreas y

tiempos de retención con la curva de calibración obtenida por estándares certificados (Ver Anexos A1.1 y A1.3) <sup>45</sup>.

Para el análisis de cada réplica se empleó una solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mM como fase móvil a un flujo de 0,5 mL/min; la separación se realizó por medio de una columna Aminex<sup>®</sup> HPX-87H (Bio-Rad Laboratories<sup>®</sup>, California – USA) de intercambio iónico a una temperatura de 45°C<sup>33, 45</sup>. El equipo se encuentra acoplado en serie a un detector UV – Vis y a uno de Índice de Refracción (RI) que permitieron la detección simultánea de los ácidos málico, succínico, cítrico y oxálico a 214 nm y por variaciones en el índice de refracción de la fructosa, glucosa y sacarosa en la muestra<sup>45-46</sup>. La detección del ácido ascórbico se realizó posteriormente a una longitud de onda de 247 nm (Ver Anexos A1.1, A1.2 y A1.3).

La cuantificación se llevó a cabo en cinco réplicas de cada muestreo, cada una de las cuales fue congelada a -20°C, y posteriormente despulpada. 1 g de la pulpa congelada fue llevada a extracción con 3 mL de solución ácida de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mM durante 10 minutos en un equipo vortex. Acto seguido se llevó a centrifugación a 10000 rpm durante 50 min a 4°C. Finalmente el sobrenadante se filtró con membranas PTFE de 0,45 µm previo a la inyección en el equipo HPLC. Se prefirió la extracción con solución ácida debido a que niveles de pH bajos aseguran la estabilidad del extracto por la disminución de la velocidad de reacciones de oxidación para los ácidos cuantificados, especialmente el ascórbico<sup>47</sup>.

#### **4.4.6 Extracción de carotenoides**

Se tomó una alícuota de la pulpa de cada una de las cinco réplicas tomadas en cada muestreo, a cada una de las cuales se les realizó una extracción en 9 mL de una mezcla de hexano: acetona: etanol<sup>48</sup> en relación 1:1:1, en vortex durante 30 min. Acto seguido se llevó a centrifugación durante 50 min a 10000 rpm y una temperatura de 4°C. Durante toda la etapa de extracción se mantuvieron cuidadosamente mínimas condiciones de luz y temperatura para evitar la degradación de los compuestos de interés.

#### **4.4.7 Cuantificación de carotenoides totales**

Se extrajo el sobrenadante de la fase hexano, rica en carotenoides, y se determinó su absorbancia a 450nm. El cálculo de los carotenoides totales se realizó mediante la ecuación:

$$\frac{A * V_1}{A^{1\%}} * C^{1\%}$$

Siendo  $A$  la absorbancia medida en la muestra diluida,  $V_1$  el factor de dilución (volumen de la fase de hexano),  $A^{1\%}$  la absorbancia de una solución al 1% del caroteno (2500) y  $C^{1\%}$  la concentración de una solución al 1% (10 mg/mL). Ésta relación se debajo la suposición del cumplimiento de la ley de Bouguer – Lambert – Beer<sup>49</sup> comprobada por curva de calibración con  $\beta$  caroteno<sup>50</sup>.

#### **4.4.8 Cuantificación de $\beta$ caroteno**

Se cuantificó la concentración  $\beta$  caroteno, no solo como indicador de los cambios químicos durante la maduración de las muestras evaluadas, sino de su potencial como alimento funcional. La elución de las muestras se realizó mediante la modificación del método propuesto por Mestre – Patres, 2006<sup>51</sup>. La fase móvil fue una mezcla de Hex, MeOH e IPA en relación 75:20:5 como fase móvil a un flujo de 1,0 mL/min; la separación se realizó por medio de una columna Zorbax Eclipse® XDB-C18 de 4,6 x 150 mm y 5  $\mu$ m de diámetro de partícula, a una temperatura de 40°C. La detección se realizó a 450 nm con un detector UV – Vis. Ésta se realizó por comparación de áreas y tiempos de retención con la curva de calibración obtenida con un estándar certificado (Fluka® – BioChemika con una pureza  $\geq 97\%$ ) entre 10 y 0,1 ppm. La linealidad del método fue evaluada en base a al menos 6 réplicas de cada uno de los 5 puntos de la curva de calibración, construida por el método de mínimos cuadrados, con un coeficiente de determinación  $R^2$  de 0,999. Los límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) se estimaron para una relación señal a ruido (S/N) de 3 a 10 respectivamente. La precisión fue estimada por la evaluación de la repetitibilidad del método en un mismo día y en dos días consecutivos y se expresó como la desviación estándar relativa del área del pico y el tiempo de retención en el cromatograma; es de destacar que todos los valores de repetitibilidad se encuentran dentro de los límites recomendados por la AOAC (15% para 0,1 ppm, 8% para 1 ppm y 6% para 10 ppm)<sup>52</sup> (ver Anexo A1.4).

#### **4.4.9 Color**

El color de los frutos fue determinado midiéndolo en términos de luminosidad, croma y ángulo Hue ( $L^*$ ,  $C^*$  y  $H^*$  respectivamente) sobre dos puntos opuestos de la franja

ecuatorial de cada réplica. El resultado reportado para cada réplica fue el promedio del valor encontrado para los dos puntos<sup>33, 40</sup>.

#### **4.4.10 Análisis estadístico**

El análisis estadístico descriptivo de los resultados obtenidos se realizó teniendo como variables dependientes los parámetros de acidez iónica y titulable, sólidos solubles totales, ácidos ascórbico, oxálico, cítrico, málico y succínico, sacarosa, fructosa y glucosa, carotenoides totales,  $\beta$  caroteno, luminosidad (L\*), cromía (C\*) y ángulo Hue (H\*). Las variables independientes fueron el morfotipo evaluado y el tiempo después de apertura floral. El análisis de varianza para cada una de las variables analizadas fue obtenido bajo un modelo lineal general multivariable, y la comparación entre muestreos mediante un test de Tukey para la identificación de grupos homogéneos. Para tal fin se utilizó el software IBM SPSS Statistics 19.0<sup>®</sup> de IBM (Chicago-USA).

El análisis de componentes principales para cada una de las variables analizadas fue obtenido sin rotación y permitió la comparación entre muestreos mediante un análisis canónico de discriminantes (ACD) después de la determinación de las variables con varianza más representativa durante el desarrollo y maduración del fruto. Para tal fin se utilizó el software SPSS<sup>®</sup> versión 19 de IBM<sup>®</sup> (Chicago-USA).

### **4.5 Estudio en el punto de madurez fisiológica del fruto**

#### **4.5.1 Estudio de metabolitos fijos en la madurez fisiológica del fruto**

##### **4.5.1.1 Extracción de metabolitos fijos**

El material vegetal fue previamente pre - procesado separando el epicarpio del fruto, con el fin de lograr identificar el organelo en el cual es mayor la concentración de los metabolitos aislados. Aproximadamente 1 kg de cada una de las partes ((E) epicarpio y (M) mesocarpio y semillas) fue liofilizado, molido, pesado y finalmente sometido a extracción sólido – líquido usando como solvente etanol al 95%. La extracción se realizó

por la técnica de maceración a temperatura ambiente por un periodo total de tres meses, durante el cual cada segundo o tercer día el solvente enriquecido en extracto fue filtrado y llevado a concentración mediante la destilación del solvente a presión reducida en un equipo de rotoevaporación para la obtención de cada uno de los extractos etanólicos: epicarpio del morfotipo ovalado (E1 = 30 g), redondo pequeño (E2 = 4g) y redondo grande (E3 = 26g), pulpa y semillas del morfotipo ovalado (M1 = 24g), redondo pequeño (M2 = 10g) y redondo grande (M3 = 22g).

#### 4.5.1.2 Estudio cromatográfico preliminar de los extractos

El perfil cromatográfico en capa delgada de cada uno de los extractos etanólicos (E1, E2, E3, M1, M2 y M3) obtenidos fue evaluado mediante su elución sobre cromatofolios de gel de sílice 60F<sub>254</sub><sup>53</sup>, utilizando como sistemas de elución: (1) CHCl<sub>3</sub>, (2) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, (3) MeOH, (4) Me<sub>2</sub>CO, (5) CHCl<sub>3</sub>:MeOH, (6) CHCl<sub>3</sub>:Me<sub>2</sub>CO, (7) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH, (8) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:Me<sub>2</sub>CO, (9)Hex:Me<sub>2</sub>CO. Usando el perfil cromatográfico en capa fina y el peso de extracto como criterios de selección se precisó EO como el extracto a partir del cual se realizaría la purificación de metabolitos fijos.

#### 4.5.1.3 Fraccionamiento inicial

15 g de extracto etanólico del epicarpio del morfotipo ovalado (E1) fueron sometidos a fraccionamiento grueso mediante la técnica de cromatografía líquida al vacío (CLV), en una columna de 5 cm de diámetro y 5 cm de longitud, usando como fase estacionaria gel de sílice 60 para CCD. La muestra fue eluída con solventes de grado comercial en orden creciente de polaridad: EdP, CHCl<sub>3</sub>, AcOEt y MeOH. Se obtuvieron 21 fracciones de las cuales se reunieron 12 fracciones finales, discriminadas en la Tabla 4-1. El rendimiento del proceso fue del 89%.

Tabla 4-1. Fraccionamiento inicial del extracto etanólico del epicarpio del morfotipo ovalado

Sistema de Elución	Fracción	Peso (mg)	Sistema de Elución	Fracción	Peso (mg)
EdP	SS01	6,4	MeOH	SS06	3,78 * 10 <sup>3</sup>
CHCl <sub>3</sub>	SS02	5,1 * 10		SS07	3,28 * 10 <sup>3</sup>
	SS03	1,34 * 10 <sup>2</sup>		SS08	2,61 * 10 <sup>3</sup>
AcOEt	SS04	4,20 * 10 <sup>2</sup>		SS09	1,65 * 10 <sup>3</sup>
	SS05	2,45 * 10 <sup>2</sup>		SS10	6,48 * 10 <sup>2</sup>
				SS11	3,21 * 10 <sup>2</sup>
				SS12	1,82 * 10 <sup>2</sup>

#### 4.5.1.4 Aislamiento, purificación y elucidación estructural de metabolitos fijos

##### 4.5.1.4.1 Fracción eluída en EdP

Debido al escaso peso de la fracción SS01 (6,4 mg) se eligió como estrategia de análisis de ésta mezcla (**C1**) la cromatografía de gases acoplada a la espectroscopia de masas (CG-EM) con el fin de determinar sus compuestos por medio de la comparación de su índice de Kovats y su espectro de masas, usando como recurso de comparación bases de datos especializadas como NIST 08<sup>®</sup> y <http://www.pherobase.com>.

##### 4.5.1.4.2 Fracciones eluídas en CHCl<sub>3</sub>

El peso de las dos fracciones obtenidas (SS02 y SS03, ver Tabla 4-1) y su perfil en CCD las mostraron como promisorias para el aislamiento de compuestos usando como estrategia la cromatografía de columna flash. La metodología utilizada para cada una de ellas se muestra en la Ilustración 4-1. Se lograron aislar las mezclas **C2** y **C3**; los cuales fueron analizados por técnicas espectroscópicas: RMN<sup>1</sup>H, CG-EM, IR.

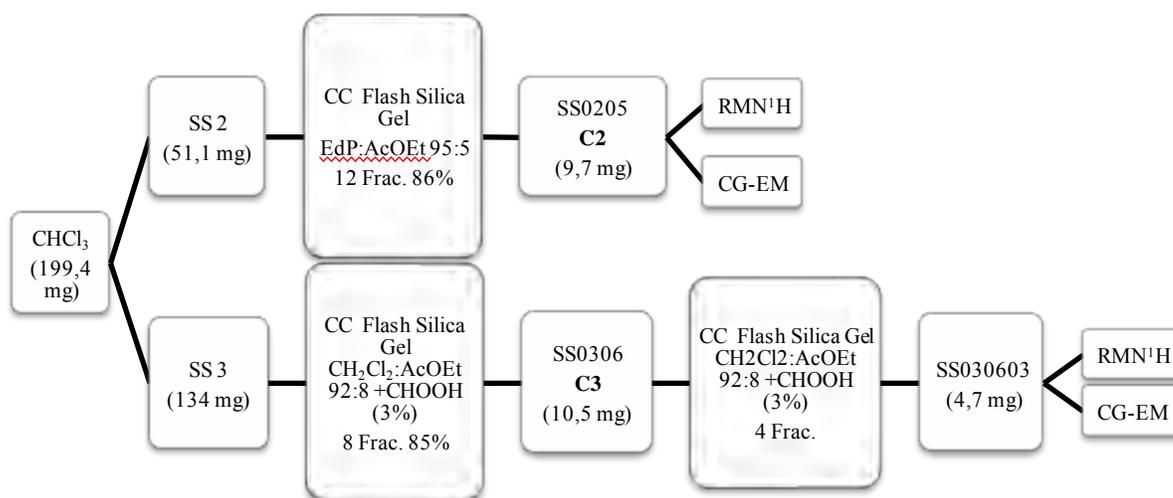


Ilustración 4-1. Estrategia de purificación de las fracciones eluídas con cloroformo

#### 4.5.1.4.3 Fracciones eluidas en AcOEt

Según lo observado en el perfil de CCD de la fracción SS04 se decidió realizar un fraccionamiento de ésta mediante cromatografía de columna flash, usando un sistema de elución de polaridad creciente, iniciando con una mezcla  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{CHOOH}$  en relación 9:1:0,03; obteniendo 20 fracciones, de las cuales se eligieron como promisorias las fracciones SS0406 y SS0409, tomando como criterio el perfil cromatográfico en capa delgada y el peso de cada una de ellas.

Se usó cromatografía de columna a gravedad usando como fase estacionaria gel de sílice 60 (0.04 -0.062 mm) como estrategia de purificación. La metodología utilizada para cada una de ellas se muestra en la Ilustración 4-2, a partir de la cual se lograron aislar la mezcla **C4** y el metabolito **C5**; los cuales fue posible elucidar mediante el uso de técnicas espectroscópicas  $\text{RMN}^1\text{H}$ ,  $\text{RMN}^{13}\text{C}$ ,  $\text{RMN}2\text{D}$ , CG-EM, IR, UV-Vis.

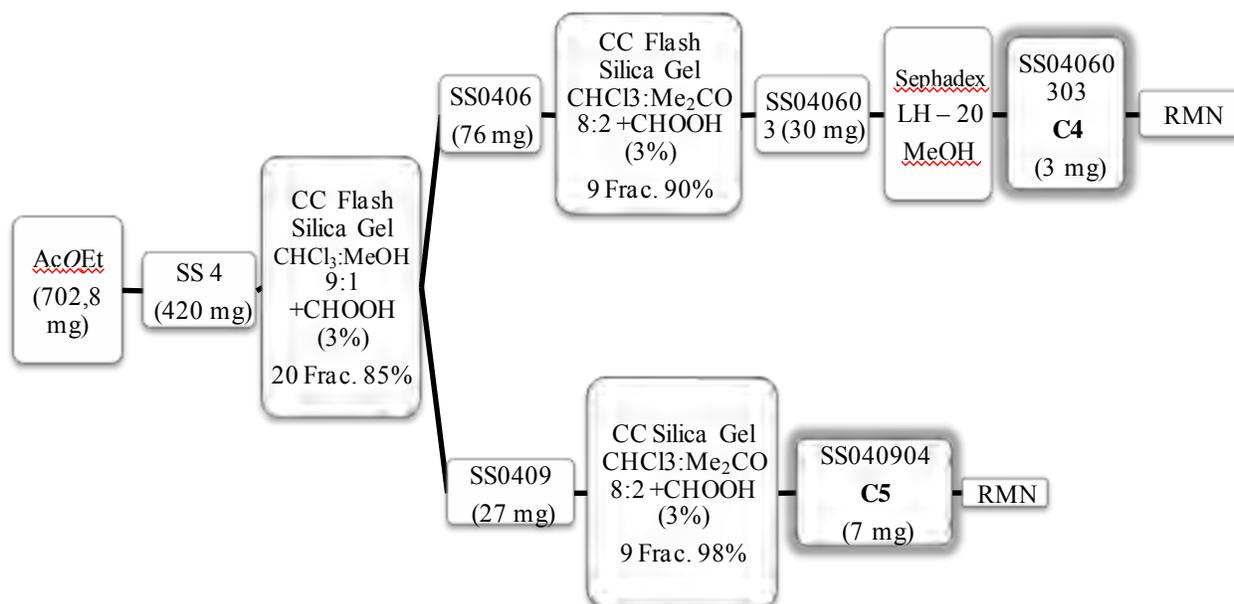


Ilustración 4-2. Estrategia de purificación de las fracciones SS04 y SS05 eluidas con acetato de etilo

#### 4.5.1.4.4 Fracciones eluidas en MeOH

Debido a la elevada polaridad de estas fracciones se decidió analizar su perfil cromatográfico en el equipo HPLC – RID.

### **4.5.2 Estudio de metabolitos volátiles en la madurez fisiológica del fruto**

#### **4.5.2.1 Destilación extracción simultánea (DES)**

La extracción de volátiles de 2 kg del fruto en punto de recolección previamente homogenizado, se llevó a cabo por el método de destilación extracción con solvente simultánea, en un equipo tipo Lickens – Nickerson diseñado para solventes de alta densidad, ubicado en el laboratorio de Productos Naturales Vegetales de la Universidad Nacional de Colombia – Sede Bogotá. Para tal fin a la fruta homogenizada se le adicionó 1 L de agua destilada y como solvente de extracción fue usando diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) grado analítico (J.T. Baker, New Orleans, USA). El extracto obtenido fue concentrado a 1 mL por destilación, usando una columna Vigreux a  $40^\circ\text{C}^{23}$ . El extracto concentrado se llevó a almacenamiento a  $4^\circ\text{C}$  para su posterior análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

#### **4.5.2.2 Microextracción en fase sólida (SPME)**

La retención de compuestos de mayor volatilidad se logró por la utilización de la técnica de microextracción en fase sólida en modo *headspace* propuesta para cocona por Fajardo-Oliveros *et al*, 2009<sup>22, 54</sup>, usando una microfibra de 50 / 30  $\mu\text{m}$  con recubrimiento de divinil benceno / carbowax / polimetilsiloxano. 30 g de cada uno de los morfotipos fue troceado y llevado al equilibrio a  $40^\circ\text{C}$  durante 1 h, periodo después del cual la microfibra fue expuesta por 50 min. Inmediatamente la fibra fue llevada a desorción en el puerto de inyección de un equipo de Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM).

#### **4.5.2.3 Determinación de compuestos**

La determinación de compuestos extraídos por DES y adsorbidos por la técnica de SPME se basó en la comparación de los índices de retención de Kovats (IK) calculados con los reportados en la literatura para columnas recubiertas con 100% dimetilpolisiloxano, y la comparación de los espectros de masas (EI, 70eV), obtenidos mediante la técnica de CG – EM. La comparación de los espectros de masas obtenidos para cada compuesto se hizo a partir de bases de datos especializadas como NIST<sup>®</sup> 08 y <http://www.pherobase.com>.

### **4.5.3 Estudio comparativo de metabolitos fijos y volátiles en la madurez fisiológica del fruto**

#### **4.5.3.1 Metabolitos fijos**

Aproximadamente 5 mg de cada una de los extractos fueron disueltos en 1 mL de MeOH y filtrados a través de una membrana PTFE de 0,45 µm de diámetro de poro, antes de su análisis en el equipo HPLC –DAD. La separación se llevó a cabo en una columna RPX-318 (4,5 x 250 mm, 5 µm) mediante una modificación del método propuesto por Gomez – Romero *et al.*<sup>31</sup>; para lo cual se usó como sistema de elución una mezcla de MeOH (A) y una solución de CH<sub>3</sub>COOH al 1% (B) en agua MilliQ, con un gradiente de elución de (B) desde 100% hasta 60% (0 min – 70 min) a un flujo de 1 mL/min. La detección se realizó dentro del rango comprendido entre 210 y 700 nm. Adicionalmente 1mg de C4 y C5 fueron analizados bajo las mismas condiciones cromatográficas con el fin de determinar su tiempo de retención, y de ésta manera lograr establecer su presencia en cada uno de los extractos evaluados.

#### **4.5.3.2 Metabolitos volátiles**

La comparación entre los metabolitos volátiles determinados en cada uno de los tres morfotipos estudiados se llevó a cabo mediante la determinación de su presencia o ausencia dentro del perfil cromatográfico obtenido como corriente iónica reconstruida, en el análisis de las muestras realizado por CG-EM.

El análisis estadístico de los resultados obtenidos se realizó teniendo como variables dependientes cada uno de los metabolitos determinados. Como variables

independientes fueron establecidos el morfotipo evaluado y el tipo de extracción utilizado. Para tal fin se utilizó el software SPSS® versión 19 de IBM® (Chicago-USA).



## 5 DISCUSIÓN Y RESULTADOS

### 5.1 Estudio a través del crecimiento y desarrollo del fruto

Las frutas tienen una doble función en la estrategia de reproducción de las plantas. Durante su crecimiento e inmadurez, éstas protegen el desarrollo de las semillas, involucrando diversas barreras químicas con el fin de evitar la interrupción de éste proceso por la acción de predadores. Sin embargo, al iniciar su maduración, la fruta se convierte en un atractivo y nutritivo alimento para estos mismos organismos, quienes en esta segunda etapa aseguran la dispersión de las semillas y por tanto la reproducción y supervivencia de la especie vegetal. Ésta transformación durante el proceso de maduración involucra una serie de cambios químicos entre los cuales se encuentra la biogénesis de pigmentos brillantes, de compuestos de volátiles, y la conversión de carbohidratos complejos en azúcares simples, el descenso de la acidez y la astringencia<sup>55</sup>. Es de resaltar que estos cambios se encuentran estrechamente ligados al metabolismo propio de la fruta, y por ende a su naturaleza climática o no climática.

Cientos de trabajos se han desarrollado con el fin de encontrar las variaciones químicas durante la maduración de diferentes frutas, y debido a la gran amplitud y la importancia económica de la familia Solanaceae, sus frutos no han sido la excepción; ejemplos típicos de esto son el tomate (*Solanum lycopersicum*), el ají (*Capsicum spp.*)<sup>42</sup>, el tomate de árbol (*Cyphomandra betacea*)<sup>56</sup>, el lulo (*Solanum quitoense*) y la berenjena (*Solanum melongena*).

*Solanum sessiliflorum* Dunal, comúnmente conocida como cocona, topiro o cubiu, es una especie endémica de la región amazónica, que fue introducida por nativos y colonos en los arreglos agroforestales y chagras en sus sitios de asentamiento<sup>4a, b</sup>; convirtiéndose en un alimento tradicional de ésta zona. Sin embargo, tal cambio en la ecología de la especie condujo a una serie de adaptaciones que a simple vista han acarreado variaciones morfológicas<sup>4a</sup>, lo cual ha dificultado la correcta manipulación de ésta fruta para fines comerciales, debido a la escasa información que existe sobre el desarrollo, maduración y senescencia de cada uno de los morfotipos cultivados.

En éste contexto el presente trabajo tuvo por objeto, mediante la comparación de parámetros químicos durante las etapas de maduración y desarrollo, determinar las diferencias entre morfotipos de cocona comúnmente cultivados en la región amazónica colombiana. Para tal efecto se realizó el análisis de las variaciones químicas durante la maduración de tres de los morfotipos cultivados en el municipio de San José del Guaviare (Guaviare), los cuales presentan dinámicas de crecimiento y formas individuales. Las variaciones químicas analizadas fueron estudiadas mediante la determinación de la concentración de algunos metabolitos que se caracterizan por presentar variaciones durante la fase de maduración de las frutas.

### **5.1.1 Ácidos orgánicos y acidez**

El análisis realizado por HPLC-UV-Vis, estableció que los ácidos predominantes independientemente al morfotipo evaluado fueron los ácidos cítrico, málico y succínico; mientras que los ácidos oxálico y ascórbico se detectaron en menores concentraciones como se detalla en la Ilustración 5-2. Éste comportamiento es similar al de otras frutas de diversas familias de angiospermas<sup>34a, 35</sup>, y es determinado por factores como el balance en la biogénesis de éstos compuestos, su degradación y el almacenamiento vacuolar<sup>34a</sup>, la especie, la edad y el tipo de tejido evaluado<sup>57</sup>. La razón es que el metabolismo de ácidos orgánicos es fundamentalmente importante en diferentes procesos como la producción de energía, la formación de precursores de otros compuestos como los aminoácidos y algunos metabolitos secundarios, y por tanto tienen directa relación con los procesos de adaptación de la planta<sup>35</sup>.

Es de notar que el ácido cítrico fue el ácido mayoritario durante todo el desarrollo y maduración de la cocona, lo cual es consistente con lo reportado previamente por Marx *et al* en frutos de cocona maduros<sup>19</sup>. Éste ácido, a diferencia de los demás cuantificados, mostró una tendencia creciente hasta el final del desarrollo del fruto, desde un valor medio de 676,81 mg de ácido cítrico por cada 100g de fruto en el día 35 hasta 2012,19 mg ácido cítrico por cada 100g de fruto en el día 70 (Ilustración 5-1, anexo A2.1).

Sus patrones de acumulación en el fruto durante el periodo de evaluación, es consistente al encontrado para la acidez total titulable (ATT) de cada morfotipo (0,646g de ácido por cada 100 g de fruto en el día 35 y 1,56 g de ácido por cada 100 g de fruto fresco en el día 70), y coherentes con el comportamiento descendente de la acidez iónica (pH) determinada. De ésta manera, se encontró un aumento en la acidez de la fruta durante

las etapas de desarrollo y maduración (Ilustración 5-1, anexo A2.1), comportamiento que es igualmente reportado en otras frutas, como el ají<sup>42</sup> (*Capsicum annum*), domino<sup>40</sup> (Solanaceae), piña<sup>58</sup> (*Ananas comosus* L.); melón<sup>34b</sup> (*Cucumis melo* L.), arazá<sup>33</sup> (*Eugenia spitiata* McVaugh), entre otras. Es importante destacar que éste comportamiento no solo hace parte del desarrollo del sabor de la fruta sino que también tiene un efecto directo sobre su valor comercial, dada su influencia directa sobre la palatabilidad<sup>34a, 35, 59</sup>.

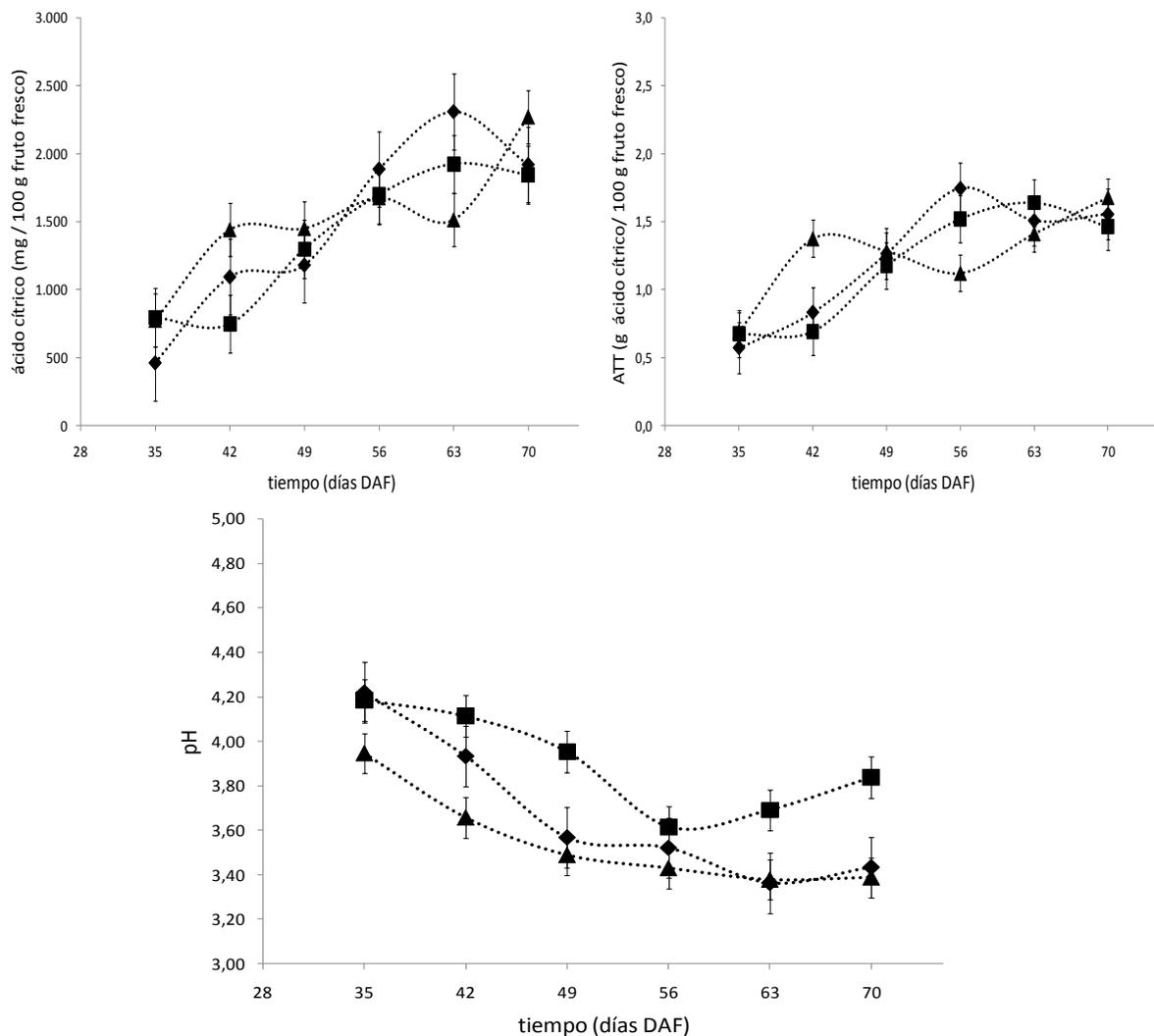


Ilustración 5-1. Acidez durante el desarrollo y maduración de los morfotipos ovalado (▲), pequeño redondo (■) y grande redondo (◆) expresada en cantidad de ácido cítrico, acidez total titulable (ATT) y acidez iónica (pH)

Los ácidos málico y succínico registraron un comportamiento decreciente en el tiempo y durante la maduración del fruto (Ilustración 5-2), esto como consecuencia de su incorporación en los procesos oxidativos que involucran su consumo como compuestos de reserva, ya que las células del fruto se encuentran en capacidad de usarlos como sustrato en los ciclos involucrados en los procesos de respiración y fotosíntesis<sup>60</sup>, lo cual, se traduce en un constante flujo de éstos entre los tejidos vegetales. Los ácidos orgánicos además juegan un papel fundamental en la formación del sabor, textura y color de la fruta<sup>35</sup>, y están involucrados en otros procesos como el incremento de resistencia a la toxicidad de los metales pesados, y la apertura de estomas<sup>60</sup>, la modificación de la acción de algunas hormonas de la planta y en el control de los cambios ontogénicos<sup>57</sup>.

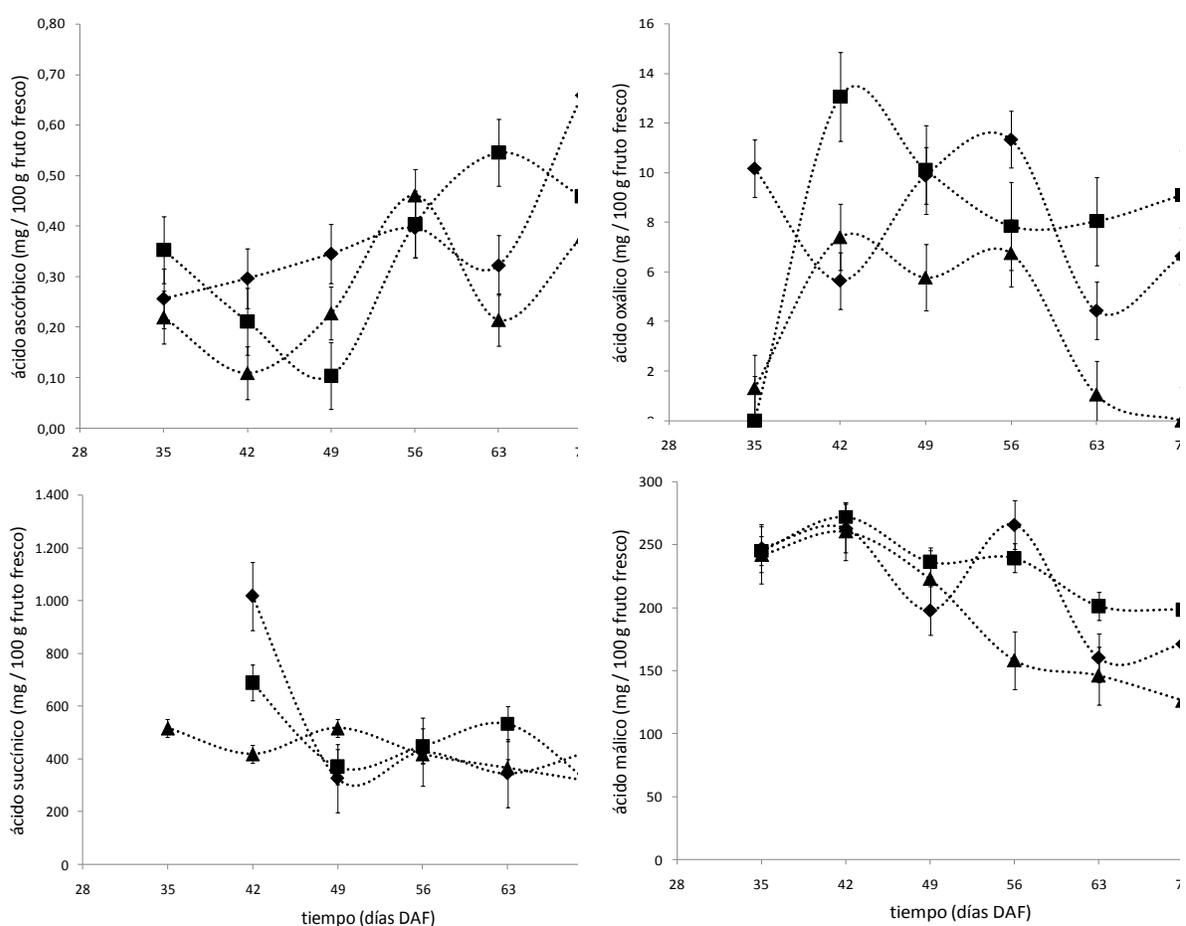


Ilustración 5-2. Variación de los niveles de ácidos ascórbico, oxálico, succínico y málico durante el desarrollo y maduración de los morfotipos ovalado (▲), pequeño redondo (■) y grande redondo (◆).

El análisis de varianza realizado (Ver Anexo A2.1) muestra diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre morfotipos para los ácidos málico y ascórbico y altamente significativas ( $p < 0,001$ ) para los ácidos oxálico y succínico. Los parámetros de acumulación de los ácidos orgánicos como el ácido málico difieren entre especies, e incluso entre cultivares<sup>60-61</sup>.

Estudios previos ya habían reportado diferencias significativas aun en los ácidos mayoritarios entre variedades de una misma especie<sup>34, 58</sup>

Se hallaron valores medios de ácido ascórbico de 0,268 mg; 0,346 mg y 0,379mg por cada 100 g de cocona de los morfotipos ovalado, redondo pequeño y redondo grande, respectivamente; niveles, que a diferencia de lo reportado para otras Solanáceas como el ají<sup>42</sup>, son bajos con respecto al valor diario de consumo de vitamina C recomendado según la resolución 288 de 2008 del Ministerio de Protección Social de 60 mg de ácido ascórbico al día (constituyen el 0,4%). Estos niveles de vitamina C, son coherentes con los reportados por Barreto *et al*<sup>50</sup> (0,4 mg por cada 100 g de fruto) para cocona cultivada en el noreste del Brasil; quienes al compararla con otros frutos del Brasil encontraron que su capacidad antioxidante es mayor al nivel de otras frutas de la familia Solanaceae como *Physalis angulata*.

### 5.1.2 Azúcares

Los azúcares, los ácidos y los compuestos aromáticos son reconocidos como los mayores componentes de la calidad de las frutas<sup>62</sup>. A través de la maduración se dan reacciones de hidrólisis sobre las macromoléculas presentes en los frutos verdes, generando moléculas de menor peso molecular, que cumplen un importante rol en la constitución del sabor y la textura de la fruta; por lo tanto, se espera que, durante la etapa de desarrollo y maduración, los sólidos solubles totales presenten un incremento constante, acompañado de la pérdida de firmeza<sup>63</sup>.

Se encontró la presencia de fructosa, sacarosa y glucosa como azúcares mayoritarios, siendo éste último el de cantidad más representativa. Los resultados, son comparables con los reportados para cocona madura (Brasil) por Marx *et al*, 1998<sup>19</sup>; quien propuso estos mismos azúcares como distintivos en la fruta. Sin embargo, los niveles de sacarosa reportados en este estudio fueron mucho menores que los de fructosa en el punto de recolección<sup>19</sup>, lo cual difiere a lo encontrado en la presente investigación para los tres morfotipos cultivados en el departamento del Guaviare. Este resultado demuestra que los compuestos involucrados en el metabolismo de la planta, al estar estrechamente ligados a procesos de adaptación la misma, son característicos no solo de la variedad evaluada, sino probablemente del ambiente en el cual ésta ha sido cultivada<sup>60-61</sup>.

Los valores medios de sólidos solubles totales para la cocona ovalada fueron de  $5,07 \pm 0,08$  °Brix, para el morfotipo redondo pequeño de  $5,34 \pm 0,08$  °Brix y para el redondo grande de  $5,61 \pm 0,08$  °Brix. Tales valores fueron ascendentes a través del tiempo de desarrollo y maduración de la fruta, y registraron una diferencia significativa entre los morfotipos evaluados ( $p < 0,05$ ), especialmente entre los morfotipos ovalado y redondo grande ( $p < 0,001$ ) tal y como lo indica la comparación de grupos homogéneos realizado (test de Tuckey, ver anexo A2.1).

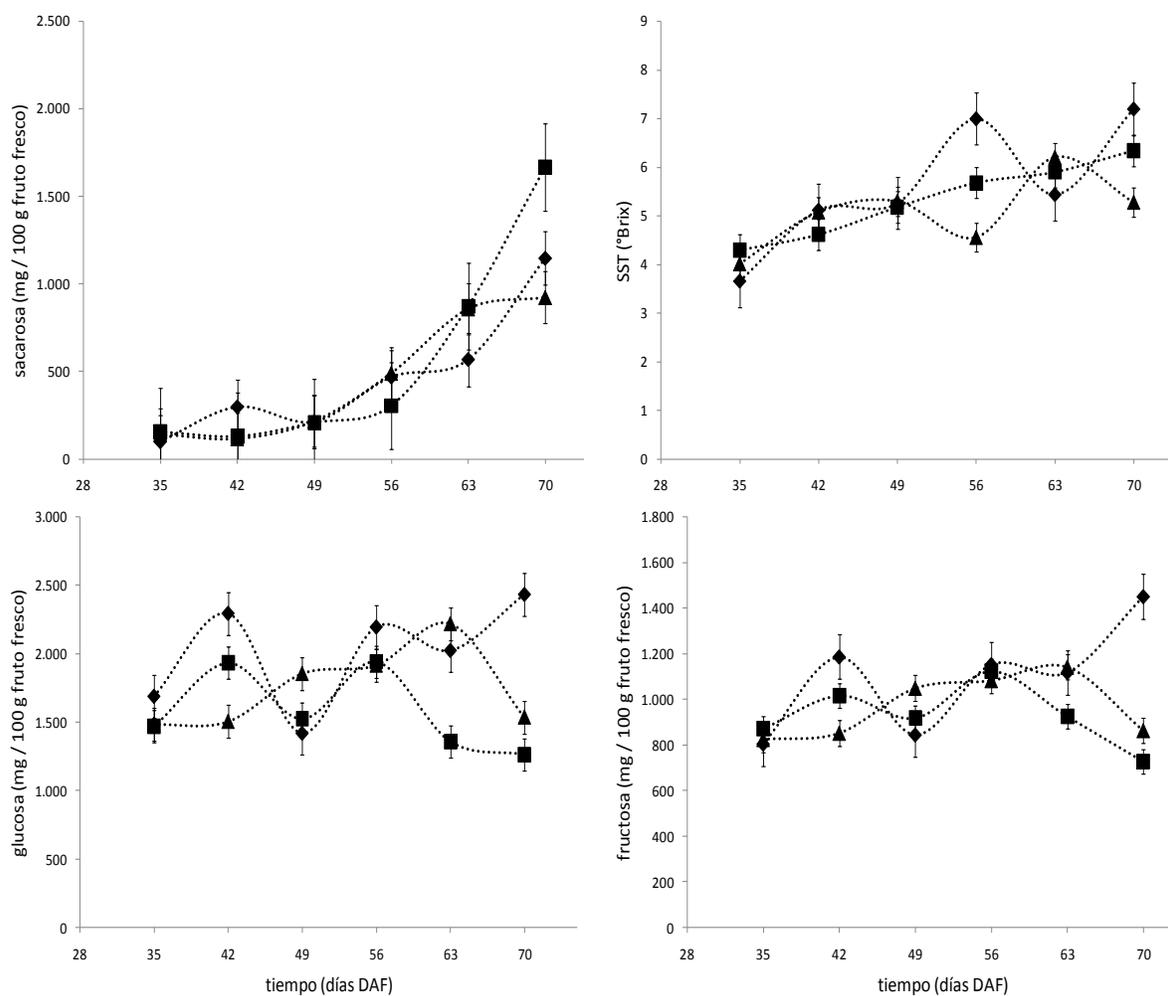


Ilustración 5-3. Azúcares durante el desarrollo y maduración de los morfotipos ovalado (▲), pequeño redondo (■) y grande redondo (◆) expresado como sacarosa, glucosa, fructosa y sólidos solubles totales en la muestra.

El nivel de sacarosa fue ascendente durante todo el periodo de desarrollo y maduración independientemente del morfotipo evaluado ( $p > 0,05$ ), partiendo de un valor medio de 131,53 mg de sacarosa por cada 100 g de fruto fresco en el día 35 DAF, hasta un valor medio de 1245,98 mg de sacarosa por cada 100 g de fruto fresco en el día 70 DAF. Por el contrario, los niveles de glucosa y fructosa si exhiben diferencias significativas entre morfotipos, más específicamente entre el redondo pequeño y el redondo grande ( $p <$

0,05); siendo éste último el de mayor nivel de fructosa y glucosa, lo cual ejerce un efecto directo sobre la diferenciación del grado de dulzor, el balance dulce – ácido y por ende en el sabor característico de cada uno de los morfotipos.

Diferentes estudios se han llevado en especies de frutas con una reconocida diferencia entre el sabor de sus variedades, debido a que como se ha mencionado a lo largo del trabajo, el metabolismo de azúcares y ácidos orgánicos no solo es un punto interesante a nivel fisiológico, sino también comercial<sup>34a</sup>. Se encuentran reportes sobre los cambios a lo largo del desarrollo y maduración de diferentes frutas climatéricas y no climatéricas como níspero (*Mespilus germanica*)<sup>35</sup>, piña (*Ananas comosus* (L.) Merrill)<sup>58</sup>, arazá (*Eugenia spittitata* Mc Vaugh)<sup>33</sup>, ají (*Capsicum annum*)<sup>42</sup>, entre otros, y a partir de ellos es posible inferir que éstos son característicos de cada especie y están ligados a los mecanismos de biogénesis e hidrólisis de carbohidratos de reserva como el almidón<sup>63</sup>.

### **5.1.3 Intensidad respiratoria y emisión de etileno**

La intensidad respiratoria es un indicador cuantitativo sobre los cambios en las rutas metabólicas y el inicio de los sistemas de decarboxilasa – oxigenasa; esta se define como la relación entre el volumen de CO<sub>2</sub> (O<sub>2</sub>) emitido (consumido) y el peso del organismo, durante un periodo de tiempo dado. La intensidad respiratoria de una fruta climatérica muestra un pico característico durante su climaterio de la fruta, sugiriendo el incremento y posterior descenso de los procesos de descarboxilación; por el contrario, las frutas no climatéricas muestran una intensidad respiratoria descendente durante todo su periodo de crecimiento y desarrollo, aunque tal descenso no es muy pronunciado, de hecho se considera que su patrón respiratorio antes y después de la cosecha no tiene cambios considerables<sup>43</sup>. Sin embargo, es importante hacer notar que cada especie exhibe una intensidad respiratoria característica, aun de cada estado de madurez<sup>43</sup>.

Según se observa en la Ilustración 5-4, todos los morfotipos muestran un comportamiento típicamente no climatérico durante su etapa de crecimiento y desarrollo, comprendida por un descenso considerable de la tasa de respiración del fruto durante la etapa de multiplicación celular; seguido por un periodo de disminución menos drástica durante el periodo de elongación celular desde el día 35 hasta el día 56; y que finalmente a partir del día 56 se estabiliza hasta el final de su desarrollo en el día 70, en el cual alcanza niveles de CO<sub>2</sub> de 25,5 mL\*Kg<sup>-1</sup>\*h<sup>-1</sup>; 15,6 mL\*Kg<sup>-1</sup>\*h<sup>-1</sup> y 26,3 mL\*Kg<sup>-1</sup>\*h<sup>-1</sup> para el morfotipo ovalado (1), redondo pequeño (2) y redondo grande (3), respectivamente.

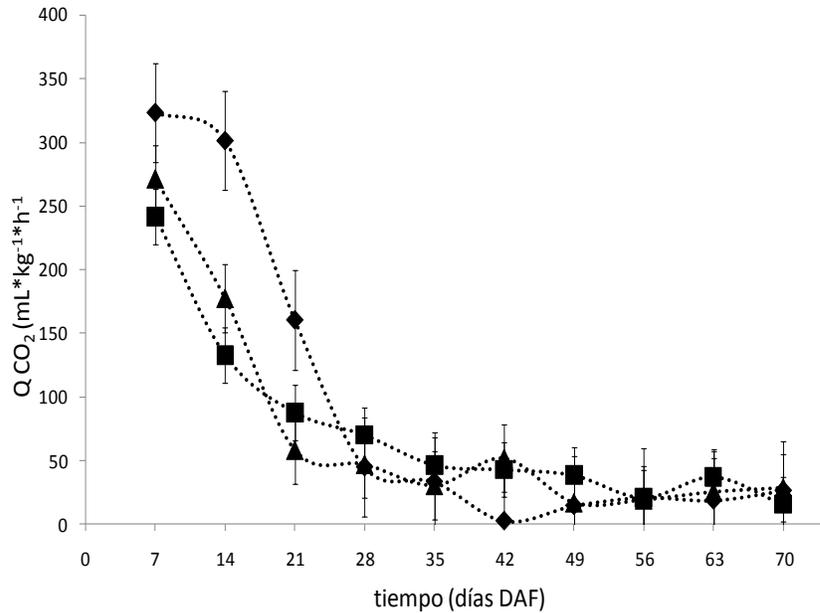


Ilustración 5-4. Intensidad respiratoria durante crecimiento, desarrollo y maduración de los morfotipos ovoide (▲), redondo pequeño (■) y redondo grande (◆).

Tal comportamiento descendente muestra que la cocona presenta la naturaleza de un fruto no climatérico en su periodo de maduración, en los casos en los que ésta etapa se desarrolla en la planta. Ésta conclusión se confirma por la ausencia de niveles detectables de etileno durante los periodos de muestreo. Algunos estudios muestran que la producción de etileno en algunas frutas de la familia Solanaceae ha sido reportada como dependiente del momento del análisis (antes o después de la cosecha)<sup>43</sup>. Sin embargo, Stefanello *et al*<sup>4d</sup>, también determinaron el comportamiento no climatérico de frutos de cocona analizados durante su periodo pos – cosecha, lo cual es consistente con lo descrito en el presente trabajo de investigación.

El etileno en las frutas climatéricas cumple un importante papel en la regulación de procesos fisiológicos, ya que el incremento en su producción desencadena las reacciones implicadas en el cambio del color, aroma, textura y sabor, entre otras<sup>64</sup>. En las frutas no climatéricas, éste proceso de maduración se cumple gradualmente y no es dependiente del incremento en la producción de etileno, lo que permite que ésta clase de frutos se puedan almacenar durante un periodo más prolongado<sup>27</sup>. Sin embargo, estudios recientes confirman que el etileno puede generar cambios químicos importantes sobre frutas no climatéricas, entre ellas, el cambio de color, la estimulación de la acumulación de pigmentos auxiliares, entre otros<sup>55</sup>.

#### **5.1.4 Contenido de carotenoides y de $\beta$ caroteno**

Los carotenoides son compuestos isoprenoides, liposolubles, sintetizados por plantas y microorganismos, que pueden ser clasificados en dos grandes grupos: carotenos, compuestos por una cadena hidrocarbonada y xantofilas, los cuales son derivados oxigenados del primer grupo, por lo que contienen al menos una función hidroxilo, ceto, epoxi, metoxi o carboxilo. Se considera que más de 600 carotenoides han sido aislados de fuentes naturales<sup>48</sup>.

Se caracterizan por una estructura formada por un sistema de dobles enlaces conjugados, lo cual determina sus características químicas, bioquímicas y físicas<sup>48</sup>.

En la planta estos compuestos participan en la absorción de luz, en la protección del exceso de energía lumínica, en la formación de complejos pigmento – proteína, son precursores del ácido abscísico y atrapan radicales libres<sup>65</sup>. Por lo tanto, su abundancia y contenido en frutas y vegetales es común en todos los tejidos donde tienen lugar el proceso fotosintético<sup>65</sup>, y depende de muchos factores intrínsecos a la planta como la variedad, el estado de madurez, las condiciones lumínicas y del suelo en el cual es cultivada, y además para el fruto del tipo almacenamiento, y demás procesos en poscosecha<sup>48</sup>.

Estos han sido considerados por muchos autores como compuestos con gran actividad biológica como antioxidantes<sup>65</sup> y activadores de la respuesta inmune<sup>48</sup>. Además se ha demostrado que algunos de ellos están involucrados en los procesos de comunicación celular, y les han calificado como responsables de la disminución del riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares, algunos tipos de cáncer y otras enfermedades degenerativas<sup>48</sup>.

El incremento en el consumo de vegetales está generalmente asociado a la reducción de enfermedades cardiovasculares y cáncer. Esta asociación está basada en la presencia de diferentes metabolitos secundarios en vegetales como carotenoides y compuestos fenólicos, y su potencial efecto benéfico sobre la salud humana<sup>66</sup>. El procesamiento, especialmente el que involucra procesos térmicos, puede llevar a reacciones que varíen el contenido de éstos compuestos<sup>66</sup>.

Se cuantificó el contenido de carotenoides totales y entre ellos el de  $\beta$  caroteno, con el objeto de evaluar la importancia como alimento funcional de los frutos de cocona. Adicionalmente se realizó durante sus etapas de desarrollo y maduración con el fin de establecer el momento de mayor acumulación de carotenoides en el fruto y relacionarlo como criterio en la elección del momento óptimo de colecta de la fruta. La acumulación de pigmentos coloreados en las frutas es uno de los eventos más relevantes durante la maduración, ya que es una señal clave para la fauna responsable de la dispersión de semillas sobre la madurez y la palatabilidad de la fruta <sup>55</sup>. Las frutas carnosas predominantemente acumulan carotenoides y flavonoides y la síntesis *de novo* de éstos compuestos al inicio de la maduración es precedida o ocurre concomitantemente con la degradación de la clorofila<sup>55</sup>.

La biosíntesis de carotenoides y de los terpenoides asociados ocurre en muchos de los tejidos vegetales comestibles, a través de la vía de los compuestos derivados del isopreno e involucra la formación de ácido mevalónico a partir del mevalonil Co-A. Su biosíntesis y catabolismo tienen lugar aun en partes separadas de la planta, y están influenciadas por las condiciones externas (como la concentración de oxígeno, la luz y la temperatura) e internas (como la concentración de etileno y de ácido abscísico)<sup>30</sup>.

La determinación de carotenoides totales no solo se reconoce como un indicador de la calidad visual de la fruta, sino también de la calidad nutricional de las muestras, debido a su actividad como pro- vitamina A y su potencial actividad antioxidante<sup>30</sup>. Éstos son considerados compuestos dietarios químicamente bioactivos, por lo que diversos autores los han reportado como activos sobre un grupo de condiciones degenerativas entre las cuales se encuentran algunas enfermedades cardiovasculares, el cáncer y la degeneración del sistema inmune; esto probablemente debido a su capacidad de atrapar radicales libres como oxígenos singletes y radicales peroxilo, modular el metabolismo carcinogénico, inhibir la proliferación celular, permitir la diferenciación celular vía retinoides, simular la comunicación célula – célula, incrementar la respuesta inmune y actuar como filtro frente a la luz azul<sup>30</sup>. Es importante hacer notar que el  $\beta$  caroteno es el más potente precursor de la vitamina A, y su deficiencia genera la aparición de diversas enfermedades y que la deficiencia de vitamina A ha sido reportada como uno de los problemas dietarios más comunes y de mayor incidencia dentro de la población infantil<sup>65</sup>.

La cuantificación de carotenoides totales permitió encontrar valores medios durante el periodo de desarrollo del fruto de  $27,30 \pm 2,73$  mg por cada 100 g del fruto del morfotipo ovalado; los cuales se muestran comparativamente menores a los valores medios para los morfotipos redondo pequeño y redondo grande, cuyos valores medios son de  $42,82 \pm$

2,73mg y  $42,01 \pm 2,73$  mg por cada 100 g de fruto ( $p < 0.05$ ). Este comportamiento confirma el hecho que la concentración y la composición de los carotenoides es susceptible a diferentes factores intrínsecos y extrínsecos a la fruta<sup>29</sup>.

Los valores medios para  $\beta$  - caroteno fueron de 2,089; 4,049 y 3,596 mg por cada 100 g de fruto para los morfotipos ovalado, redondo pequeño y redondo grande respectivamente. La cantidad de  $\beta$  - caroteno respecto a la cantidad de carotenoides totales representa el 7% para el morfotipo ovalado y el 9% para los morfotipos redondo pequeño y redondo grande; por tal motivo, se considera importante la determinación no solo de los demás carotenos, sino de xantofilas (carotenoides oxigenados y ésteres de ácidos grasos, sintetizados por la planta para facilitar su acumulación en los pastoglóbulos)<sup>29</sup>. La diversidad de carotenos y xantofilas han sido reportados para diversas especies como el tomate de arbol<sup>67</sup>.

Se encontraron diferencias significativas a lo largo del desarrollo y maduración de los tres morfotipos en cuanto a la cantidad de carotenoides totales y por lo tanto de  $\beta$  caroteno. Ésta variación se debe a los cambios de cloroplastos a cromoplastos reportados previamente por Artés et al (2000)<sup>68</sup>, especialmente en aquellos frutos denominados carotenogénicos, caracterizados por la síntesis de carotenoides durante la maduración de la fruta, usualmente acompañado por el cambio en el perfil de carotenoides. Es de resaltar que algunos de los frutos de la familia Solanaceae (como el tomate) han sido catalogados como carotenogénicos<sup>29</sup>.

El análisis de varianza mostró que el nivel de  $\beta$  - caroteno y el color es indiferente al morfotipo. Se encuentran diferencias en el tiempo después de la apertura floral para los tres casos evaluados. Las ilustraciones muestran que la curva descrita por los valores de carotenoides totales y  $\beta$  - caroteno a través del tiempo de cada morfotipo es característica y que el nivel de carotenoides es máximo en el momento de recolección en los morfotipos redondo pequeño y redondo grande a diferencia del comportamiento encontrado para el morfotipo ovalado. Este hábito es coherente con el esperado, debido a los cambios metabólicos traducidos en la degradación de las clorofilas y la manifestación de pigmentos auxiliares como los carotenoides durante la maduración del fruto, como preparación de éste para atraer animales y asegurar la dispersión de sus semillas hacia otros hábitats<sup>55, 68</sup>.

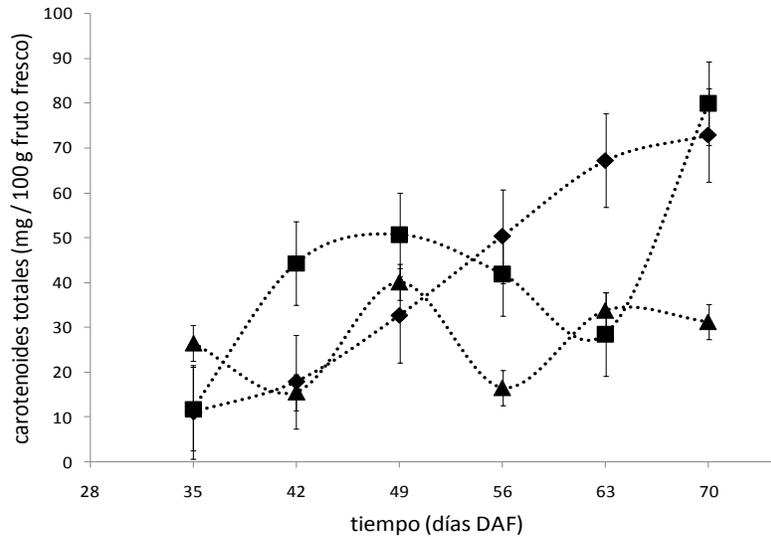


Ilustración 5-5. Carotenoides totales durante el desarrollo y maduración de los morfotipos ovalado (▲), pequeño redondo (■) y grande redondo (◆)

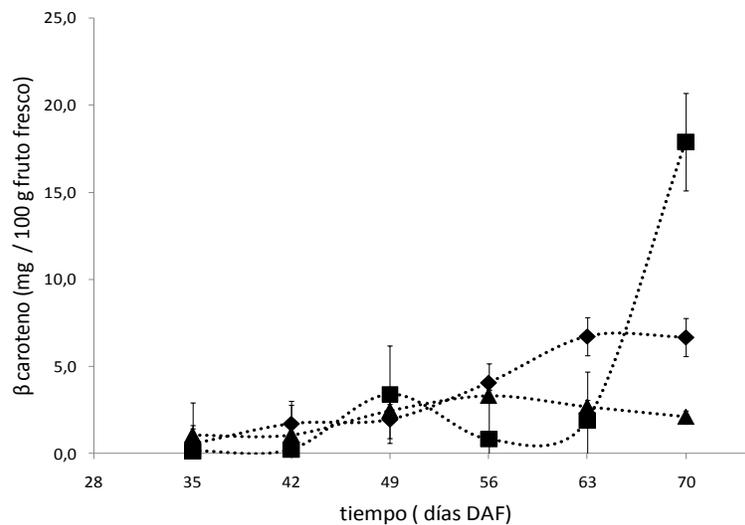


Ilustración 5-6. β caroteno durante el desarrollo y maduración de los morfotipos ovalado (▲), pequeño redondo (■) y grande redondo (◆)

### 5.1.5 Cambios de color

La sensación de color es un fenómeno psico-físico, en la cual la información captada por la percepción visual es interpretada en el cerebro; este puede ser descrito como atributo de un objeto dado ya sea en términos subjetivos u objetivos. En términos subjetivos el color puede ser descrito por su brillo, luminosidad, tono, saturación e intensidad, sin embargo la descripción dependerá no solo del iluminante y del entorno sino también del

observador. En términos objetivos el color es descrito según la transmitancia o reflectancia de un objeto y la respuesta de un observador estándar; lo cual entre otros términos puede ser expresado en términos de luminosidad (\*L, equivalente al brillo), croma (\*C, equivalente a la saturación) y ángulo Hue (\*H, equivalente al tono). El sistema CIE para la medición del color transforma el espectro de reflexión o de absorción en un objeto dentro de un espacio de color tridimensional, usando el poder de la distribución espectral del iluminante y las funciones correspondientes de color del observador estándar<sup>69</sup>.

Los cambios en el perfil de color, descrito en el espacio CIELAB en términos de \*L, \*C y \*H es representativo de las variaciones reportadas ya por otros autores para el periodo de desarrollo y maduración de otras frutas<sup>68</sup>. Se debe tener en cuenta que la apariencia externa de las frutas, particularmente su color, es considerada un atributo prioritario en la definición de la calidad de éstas.

El análisis del color de la fruta durante sus etapas de desarrollo y maduración permitió delimitar una primera etapa de desarrollo hasta el día 49, durante la cual permanece el fruto en una tonalidad verde propia de la biogénesis de clorofilas, se encuentra que no se dan cambios significativos en ninguno de los parámetros que describen el color del fruto, y que específicamente \*H tiene un valor medio de 114,39, que en el espacio CIELAB describe la tonalidad verde. Al igual que lo reportado por otros autores para frutos de solanáceas como el tomate, el \*C de los frutos no tiene cambios significativos durante las primeras etapas de desarrollo del fruto; sin embargo se debe tener en cuenta que el croma no es un indicativo de madurez óptimo, ya que en su esencia misma este parámetro representa la pureza o saturación del color.<sup>70</sup>

A partir del día 49 se observaron cambios significativos para \*L y \*C en los tres morfotipos propios de la maduración, ya que éstos cambios son un indicio claro del inicio del degradación de las clorofilas, evidenciada por una disminución en el valor de \*H desde  $114,39 \pm 1,36$  característica de una tonalidad verde hasta  $55,33 \pm 1,36$  particular de una tonalidad naranja (Ilustración 5-7 a Ilustración 5-9).

El característico color verde de los frutos inmaduros se debe a la presencia de clorofilas y carotenoides, luego al inicio de la maduración se da lugar a una serie de cambios químicos, que incluyen variaciones de la composición de los pigmentos y por ende del color de la fruta, debidos a procesos tanto biogénéticos como catabólicos.<sup>68</sup> De ésta manera la biosíntesis de pigmentos en los cloroplastos se observa durante el desarrollo

del fruto, y se detiene al inicio de la maduración, punto en el cual se inicia el catabolismo de las clorofilas y la biogénesis *de novo* de carotenoides<sup>68</sup>.

Es importante resaltar que la etapa de maduración del fruto tiene en durante los días 56 a 70 después de la apertura floral (DAF) lo cual ya se había mencionado anteriormente mediante el análisis de los cambios en la intensidad respiratoria, así como del contenido de sacarosa y la estabilización del pH en la fruta.

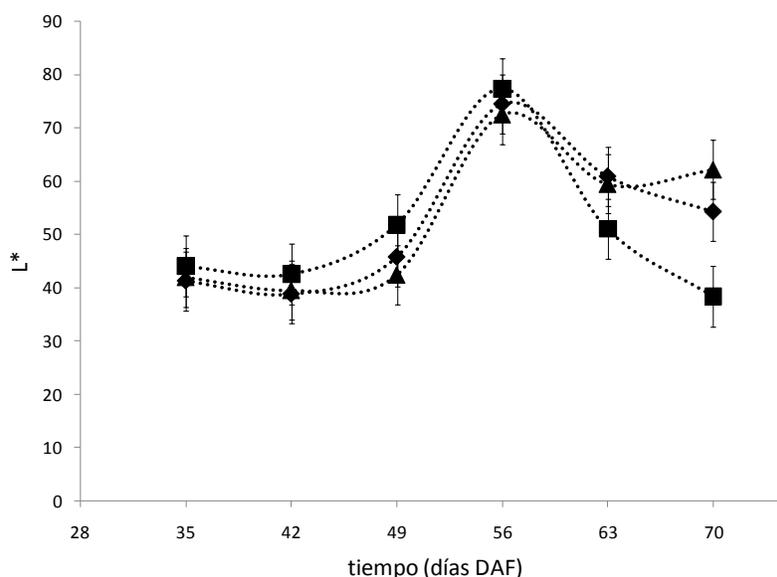


Ilustración 5-7. Color en términos de luminosidad durante el desarrollo y maduración de los morfotipos ovalado (▲), pequeño redondo (■) y grande redondo (◆)

Por otro lado, al comparar las curvas descritas en el tiempo para los niveles de  $\beta$  – caroteno en la fruta y su parámetro \*H se encuentra que la biogénesis de carotenoides en la fruta al igual que su manifestación en el color de ésta tiene un comportamiento gradual durante el desarrollo y maduración de la fruta; es evidente que el color puede ser considerado un parámetro satisfactorio para la determinación del estado de madurez de la fruta, debido a que tanto su tonalidad (\*H) como la saturación del color (\*C) son claramente diferentes para cada uno de los puntos evaluados a través del tiempo, aun a partir del día 42 ( $p < 0.01$ ). El nivel de carotenoides totales,  $\beta$  – caroteno solo se encuentran significativamente diferentes hasta el día 70 (respecto a los demás puntos evaluados en el tiempo), el cual ha sido fijado como momento óptimo de recolección (Ilustración 5-6 e Ilustración 5-9).

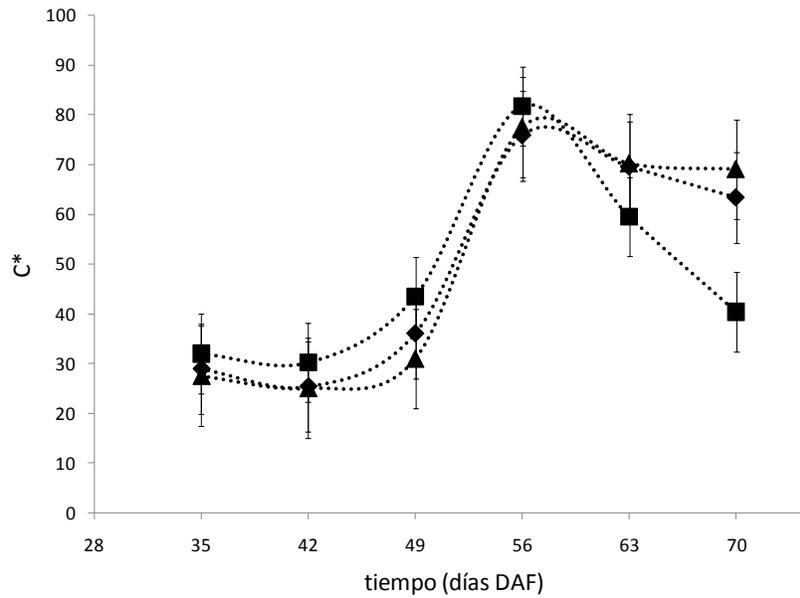


Ilustración 5-8. Color en términos de Croma durante el desarrollo y maduración de los morfotipos ovalado (▲), pequeño redondo (■) y grande redondo (◆)

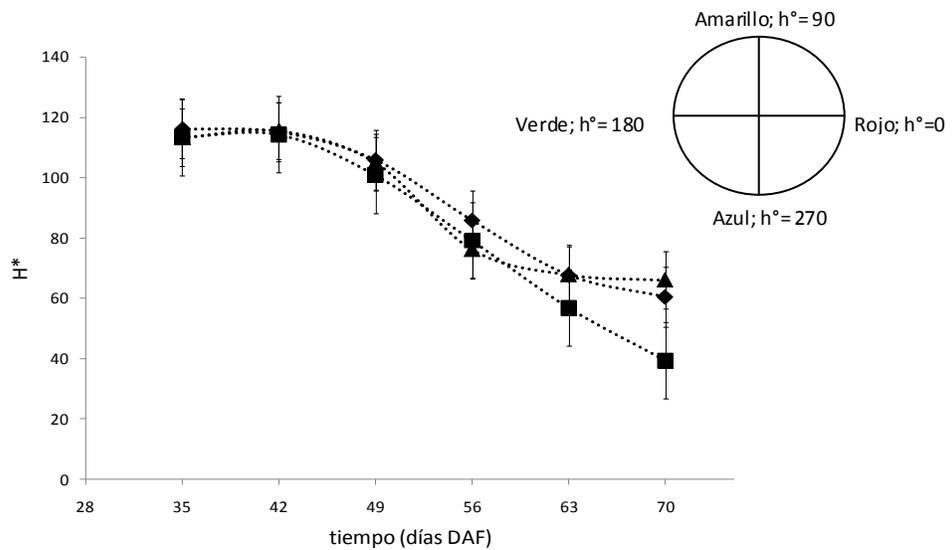


Ilustración 5-9. Color en términos de ángulo Hue durante el desarrollo y maduración de los morfotipos ovalado (▲), pequeño redondo (■) y grande redondo (◆)

### **5.1.6 Análisis multivariable de los resultados**

Por medio del análisis de componentes principales (Ver anexo A2.2) se logró la identificación de cinco vectores característicos, de los cuales los dos primeros logran explicar el 35,8% y el 16,5% de la varianza total del experimento (52,3% acumulado). Como se muestra en la Ilustración 5-10 el contenido de ácido cítrico, glucosa y fructosa, así como la acidez total titulable (ATT), C\* y H\* son las variables con mayor incidencia en los dos primeros componentes, lo cual las señala como las variables de mayor varianza durante el proceso de maduración de la fruta, y por tanto, como las variables indicadas para el establecimiento del estado de madurez de la fruta. Es de notar que entre estas variables seleccionadas por este método de reducción de dimensiones, solo el contenido de glucosa y fructosa y el ángulo H\* son las variables que según el análisis de varianza tienen incidencia sobre la diferenciación fisicoquímica entre morfotipos.

Por su parte la matriz de correlaciones (Tabla 5-1) muestra que existen relaciones significativas (\*) para  $p < 0,050$  y (\*\*) para  $p < 0.001$  para todas las variables evaluadas con al menos otras dos de ellas, lo cual demuestra que el análisis de componentes principales, puede ser usado como una herramienta válida para la reducción de las dimensiones del diseño del experimento.

Entre las relaciones más relevantes encontradas se encuentra la que se da entre el valor de H\* y del contenido de fructosa, glucosa, y ácido cítrico con la concentración de carotenoides y de  $\beta$  caroteno, lo cual es un indicio de la biogénesis de carotenoides como estrategia en la maduración de la fruta. Adicionalmente se observa una relación directa y significativa entre la cantidad de  $\beta$  caroteno y la de carotenoides totales.

La evaluación de conglomerados obtenido por análisis canónico de discriminantes había sido previamente usado por diversos autores tanto para la discriminación de variedades, como para la identificación de las variables más representativas de la maduración en frutas tropicales como la gulupa<sup>71</sup> y el ají<sup>42</sup>.

Tabla 5-1. Matriz de correlaciones entre los parámetros evaluados durante el desarrollo y maduración del fruto

	OXA	CIT	MAL	SUC	CAR	SAC	FRU	GLU	BCAR	L	C	H	SST	ATT	pH
<b>ASC</b>	-0,02	0,34 *	-0,27 *	-0,03	0,24 *	0,48 **	0,21 *	0,12	0,18	0,29 *	0,42 **	-0,53 **	0,40 **	0,30 *	-0,26 *
<b>OXA</b>		-0,11	0,54 **	0,14	0,23 *	-0,14	0,02	-0,02	-0,17	-0,04	-0,12	0,16	0,12	0,01	0,29 *
<b>CIT</b>			-0,19 *	-0,34 *	0,28 *	0,50 **	0,29 *	0,23 *	0,31 *	0,40 **	0,55 **	-0,60 **	0,44 **	0,69 **	-0,60 **
<b>MAL</b>				0,54 **	-0,04	-0,39 **	0,27 *	0,28 *	-0,24 *	-0,25 *	-0,40 **	0,52 **	-0,13	-0,27 *	0,42 **
<b>SUC</b>					-0,21 *	-0,28 *	0,34 *	0,40 **	-0,16	-0,30 *	-0,38 **	0,43 **	-0,23 *	-0,47 **	0,41 **
<b>CAR</b>						0,49 **	0,12	0,07	0,21 *	0,05	0,17	-0,43 **	0,46 **	0,29 *	0,03
<b>SAC</b>							0,11	0,04	0,14	0,05	0,33 *	-0,83 **	0,54 **	0,47 **	-0,23 *
<b>FRU</b>								0,93 **	0,39 **	0,25 *	0,29 *	-0,06	0,32 *	0,08	-0,18
<b>GLU</b>									0,38 **	0,23 *	0,23 *	0,02	0,27 *	-0,02	-0,16
<b>BCAR</b>										0,22 *	0,28 *	-0,19 *	0,29 *	0,22 *	-0,46 **
<b>L</b>											0,93 **	-0,38 **	0,24 *	0,41 **	-0,48 **
<b>C</b>												-0,65 **	0,39 **	0,55 **	-0,55 **
<b>H</b>													-0,55 **	-0,60 **	0,40 **
<b>SST</b>														0,65 **	-0,30 *
<b>ATT</b>															-0,54 **

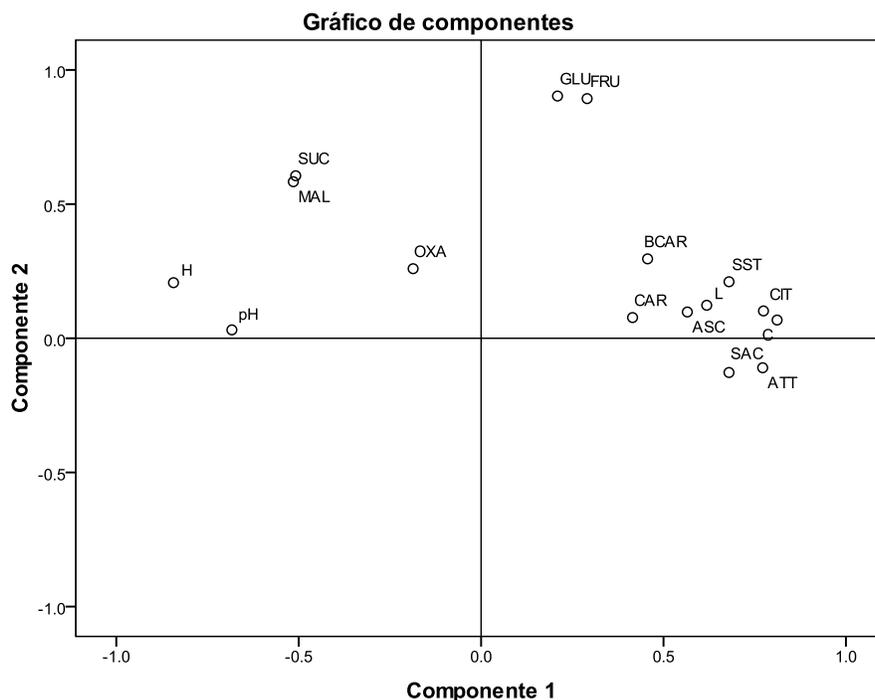


Ilustración 5-10. Gráfico de componentes principales

Este análisis de discriminación sobre las variables seleccionadas en el análisis de componentes principales (ver Anexo A2.3) permite establecer diferencias entre los tres morfotipos evaluados, ya que aunque los centroides de cada grupo ((1) ovalado, (2) redondo pequeño y (3) redondo grande) se situaron cerca del origen de la gráfica, cada uno de ellos se ubicó en cuadrantes diferentes; lo anterior teniendo basado en el valor de significancia calculado por la prueba de  $\lambda$  de Wilks (ver Anexo A2.3). A pesar de existir reportes en los cuales esta técnica ha sido de utilidad para la discriminación de accesiones de ají amazónico<sup>42</sup>, híbridos cítricos<sup>62</sup>, entre otros, no se encuentran reportes previos sobre la discriminación de frutos que exhiben diferencias causadas por selección natural. Al haber evaluado frutos cultivados bajo las mismas condiciones y durante un mismo periodo de tiempo, se confirma lo planteado por Bramley<sup>65</sup>, quien usando tomate como modelo hace referencia a que la biogénesis de carotenoides por ejemplo, está intrínsecamente relacionado con factores como la luz y su intensidad, además de la expresión de genes específicos.

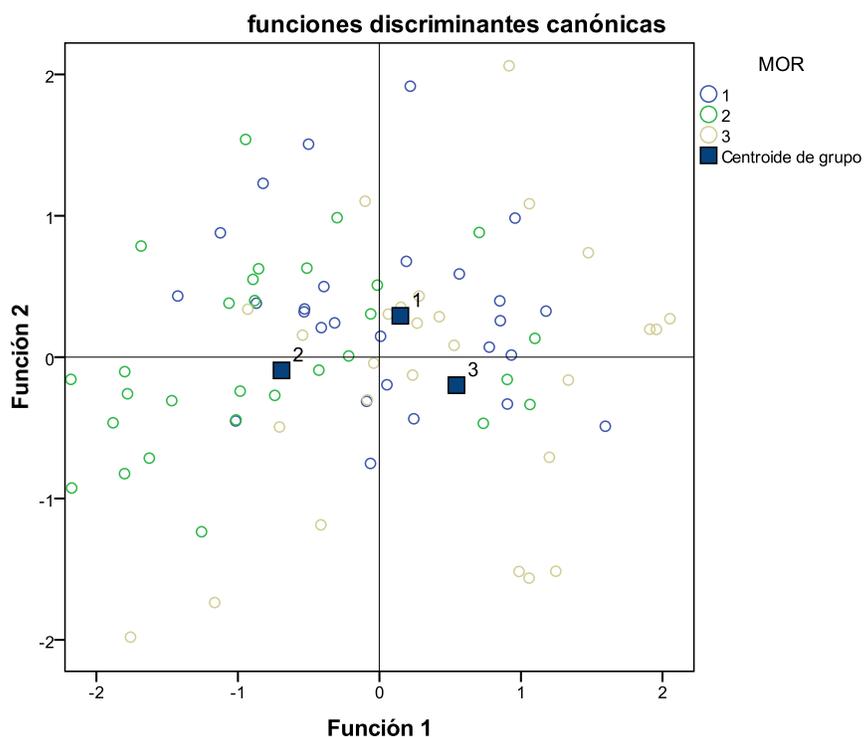


Ilustración 5-11. Análisis canónico de discriminantes usando como variable de agrupación el morfotipo (Ovoide = 1; Redondo pequeño = 2 y Redondo grande = 3)

En cuanto al proceso de maduración, el análisis discriminante hace más clara la diferenciación de dos conglomerados entre las etapas de desarrollo y maduración del fruto (ver anexo A2.3). El primero de los conglomerados fue conformado por el periodo comprendido entre los días 35 y 49 DAF, los que, de acuerdo con el comportamiento de la intensidad respiratoria del fruto pertenece al periodo en el cual el fruto aun experimenta crecimiento y multiplicación celular. El segundo conglomerado demarcó el periodo comprendido entre los días 56 y 70 donde se dan cambios significativos en la composición química de la fruta, entre los cuales se destacaron las variaciones en el contenido de ácido cítrico, sacarosa, glucosa y fructosa, como componentes mayoritarios de la fruta (que fueron también identificados en el análisis de componentes principales). Esto es debido a los cambios propios de la maduración, durante la cual aumenta la palatabilidad de la fruta como estrategia de la planta para la dispersión de sus semillas<sup>71</sup>.

Se logra entonces en primer lugar demarcar el día 56 DAF como aquel en el cual se da lugar a una etapa de transición en la fruta, inicia el catabolismo de las clorofilas y la manifestación de los pigmentos amarillos. Esto permite que se pueda considerar el día 56

DAF como el periodo durante el cual se dan mayores cambios en el color de la fruta, ya que no solo se encontró la transición de tonalidad verde a amarilla, sino que también se observaron los máximos de saturación y brillo del color (\*C y \*L, respectivamente).

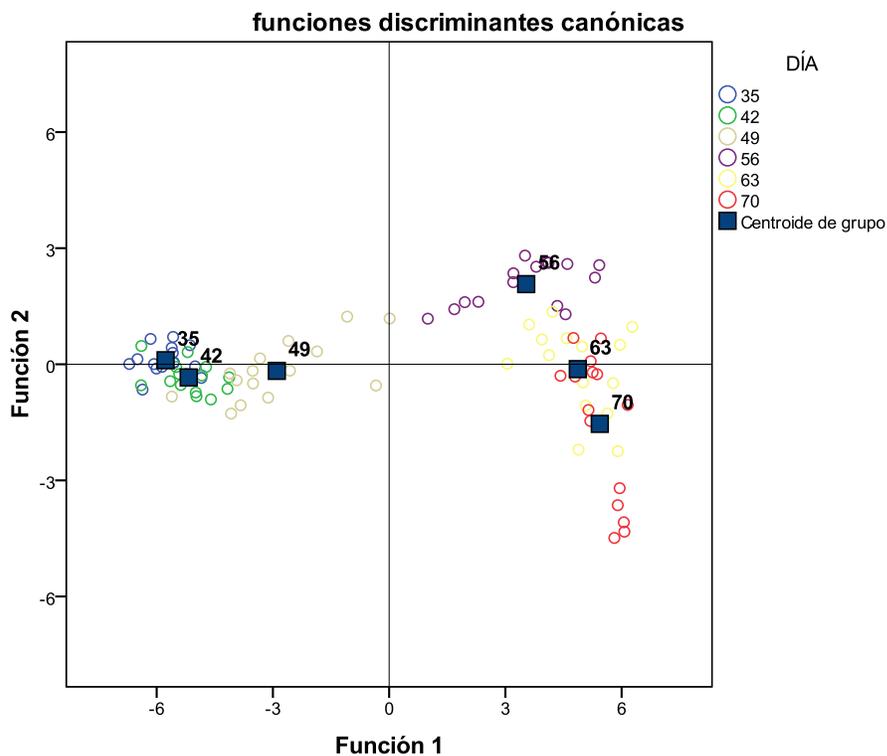


Ilustración 5-12. Análisis canónico de discriminantes, siendo la variable de agrupación el tiempo (días DAF)

En segundo lugar se consiguió identificar el último día de evaluación (día 70 DAF) como aquel en el cual se alcanza la madurez fisiológica y sensorial del fruto, y por ende su punto óptimo de recolección, encontrando diferencias con lo planteado previamente por Hernandez<sup>72</sup> y Fajardo<sup>54</sup>, quienes para el morfotipo ovalado cultivado en condiciones propias del municipio de Florencia (Caquetá), plantearon un tiempo total de crecimiento, desarrollo y maduración de 60 días, dentro del cual el inicio de la maduración se da a partir del día 35. Tal comportamiento demuestra la incidencia que los factores ambientales tienen sobre el desarrollo del fruto, lo cual diversos autores han relacionado con factores como la acumulación de metabolitos<sup>59</sup>, y la textura<sup>63</sup>.

## 5.2 Estudio en la madurez fisiológica del fruto

Las frutas y vegetales son la fuente más importante en la dieta humana de sustancias bioactivas como vitaminas, fibra dietaria, antioxidantes entre otros. Aunque muchos de estos reportes se basan en la etnobotánica de cada especie, actualmente, mediante el uso de técnicas cromatográficas como la cromatografía líquida de alta eficiencia y la de gases, además del uso de técnicas espectroscópicas como la espectrofotometría UV, la espectrometría de masas, la espectroscopía infrarrojo, y la resonancia magnética nuclear han permitido la valoración cuantitativa y cualitativa de un gran número de metabolitos en las plantas; los cuales, no son solo esenciales para su crecimiento, desarrollo, procesos adaptativos a condiciones ambientales y de estrés (defensa), son los que determinan sus propiedades en cuanto a calidad nutricional, color, sabor, aroma, además de su actividad antiinflamatoria, antioxidante, anticancerígena, antihipertensiva, antimicrobiana o inmunoestimulante entre otras<sup>73</sup>.

Ya habiendo logrado establecer el día 70 DAF como el momento adecuado de recolección de la fruta en el ambiente de estudio, se pretendió en primer lugar aislar y elucidar algunos de los metabolitos de cocona, a partir del extracto etanólico de uno de los morfotipos y posteriormente establecer su presencia o ausencia en los otros dos morfotipos objeto de estudio. Adicionalmente, ésta comparación se realizó diferenciando el epicarpio del fruto del resto de éste, con el fin de establecer si los metabolitos aislados están incluidos o no en la dieta del consumidor. En segundo lugar se determinó la presencia de algunos de los metabolitos volátiles de los tres morfotipos, con el fin de establecer características químicas que pudieran ser consideradas un indicador de la calidad organoléptica intrínseca de cada uno de ellos y por ende de sus productos derivados.

### 5.2.1 Estudio de metabolitos fijos en la madurez fisiológica del fruto

#### 5.2.1.1 Fracción EdP

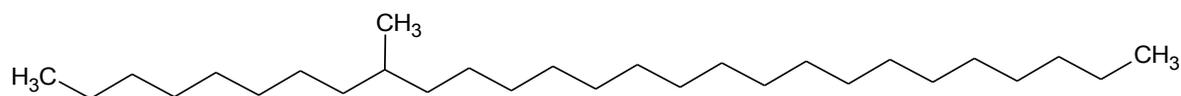
La determinación de compuestos presentes en la fracción de EdP (C1) se realizó utilizando como criterio no solo la comparación entre el IK calculado y el reportado en la literatura especializada para compuestos en una columna DB-1 (NIST 08<sup>®</sup> y

<http://www.pherobase.com>), sino también el análisis de los espectros de masas obtenidos para cada uno de éstos.

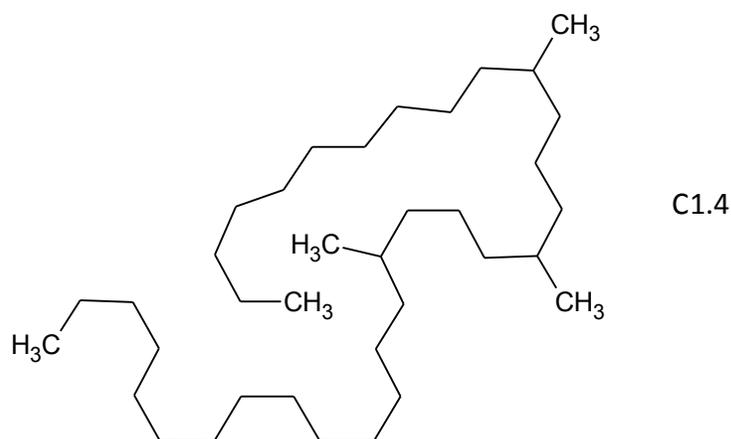
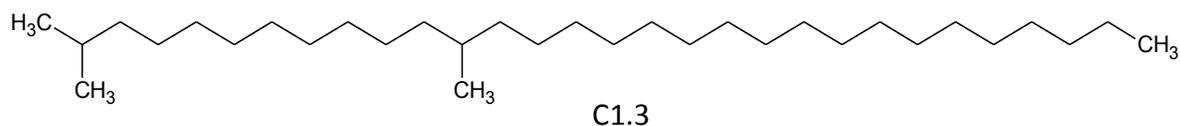
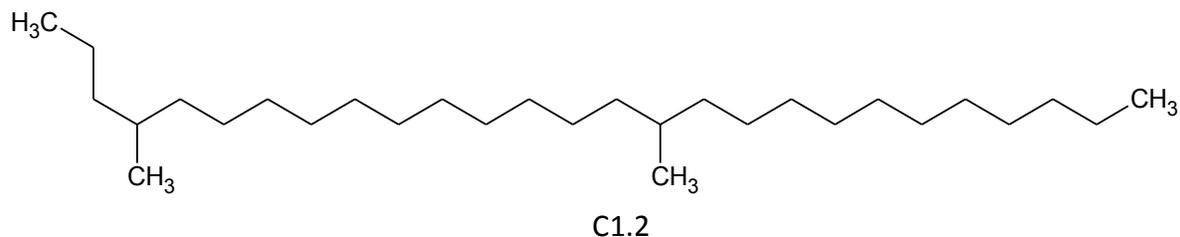
Cada uno de los espectros de masas fue catalogado como característico de hidrocarburos alifáticos saturados. La Tabla 5-2 muestra las asignaciones probables para los compuestos presentes en esta fracción sin embargo, es de notar, que debido a su similitud, y a que compuestos de la misma naturaleza química con alguna variación en el patrón de sustitución podrían exhibir IK similares, la plena determinación de estos compuestos requiere de la corrida cromatográfica de esta misma fracción en una columna de naturaleza polar, que permita reducir el rango de otras posibles asignaciones<sup>74</sup>. Se proponen como compuestos mayoritarios: 9-metilheptacosano (C1.1); 4,16-dimetilheptacosano (C1.2); 2,12-dimetiltriacontano (C1.3) y 11,15,19-trimetiltriacontano (C1.4).

Tabla 5-2. Hidrocarburos alifáticos determinados en la fracción SS01

$t_R$	IK	IK REPORTADO DB-1	% ÁREA	POSIBLE
25,553	2111	2100	1,0	Eneicosano
26,999	2219		0,8	NI
28,304	2328		0,8	NI
29,499	2435	2435	1,8	11 - metil tetracosano
30,613	2543	2544	1,5	7 - metil pentacosano
31,662	2625	2635	5,3	13-metil hexacosano
32,653	2675	2670	1,8	9,13-dimetil hexacosano
33,591	2738	2735	11,5	9 - metil heptacosano
34,494	2814	2811	2,7	3,7 - dimetil heptacosano
35,415	2894	2893	13,3	4, 16 - dimetil octacosano
36,435	2985	2976	3,4	3 - metil nonacosano
37,607	3093	3095	29,9	2,12 - dimetil triacontano
38,936	3222	3229	3,9	3,11 - dimetil hentracontano
39,909	3318	3320	1,6	4,8,16 - trimetil dotriacontano
40,515	3380	3380	18,3	11,15,19 - trimetil tritriacontano



C1.1



### 5.2.1.2 Fracción CHCl<sub>3</sub>

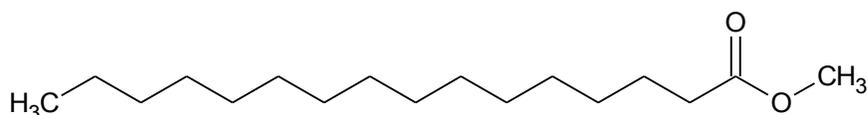
#### 5.2.1.2.1 Determinación estructural de C2

La mezcla C2 fue aislada como un líquido amarillo, cuyo espectro de IR (ver Anexo A4.1) muestra bandas características de la vibración de tensión de grupos carboxilo (1735 cm<sup>-1</sup> para C=O y 3456 cm<sup>-1</sup> para O-H), la vibración de tensión de grupos metilo o metileno (2854 cm<sup>-1</sup>) y la vibración de flexión de grupos metilo terminales en cadenas alifáticas<sup>75</sup>.

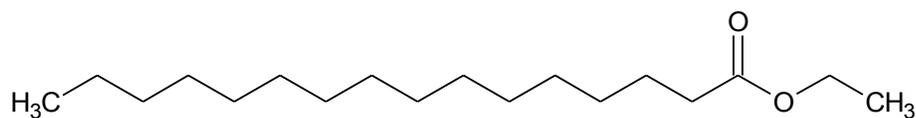
El espectro RMN  $^1\text{H}$  (ver anexo A4.2) permitió reiterar la naturaleza alifática de la mezcla C2, mostrando señales características de hidrógenos vinílicos vecinales a un grupo carbonilo ( $\delta$  5,23; *m*), metino unido a oxígeno ( $\delta$  4,01; *q*; *J* 7,13Hz), metino de éster metílico ( $\delta$  3,55; *sn*), metileno entre dos carbonos  $\text{sp}^2$  en olefinas ( $\delta$  2,67; *dd*; *J* 6,36Hz 14,18Hz), metileno unido a carbonilo ( $\delta$  2,18; *dd*; *J* 7,35Hz 14,77Hz); ( $\delta$  2,06; *sn*); ( $\delta$  1,91; *m*; 8H); ( $\delta$  1,51; *dd*; *J* 7,98Hz 14,70Hz), metilo unido a carbonos  $\text{sp}^2$  en olefinas ( $\delta$  1,14; *m*) y metino en grupo alquilo ( $\delta$  0,76; *m*) <sup>75</sup>. La integración de cada una de las señales del espectro demostró que se trata de una mezcla compleja de hidrocarburos y sus derivados oxigenados, por lo cual, se decidió realizar su análisis usando una técnica acoplada como CG-EM (ver anexos A4.3 y A4.4); análisis a partir del cual se logró establecer que ésta mezcla está constituida principalmente por hexadecanoato de metilo (C2.1), hexadecanoato de etilo (C2.2), 9,12-octadecadienoato de etilo (C2.3) y oleato de etilo (C2.4). Su determinación se basó en la comparación de los índices de retención de Kovats (IK) calculados con los reportados en publicaciones especializadas (NIST 08 <sup>®</sup> y <http://www.pherobase.com>; para columna DB-1), además de la de los espectros de masas obtenidos para cada uno de los compuestos (Tabla 5-3).

Tabla 5-3. Compuestos determinados en C2

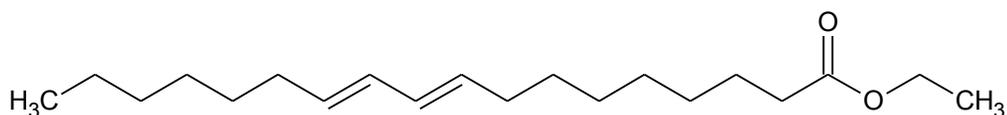
TR	KI	KI REPORTADO DB-1	% ÁREA	POSIBLE
19,596	1778	1777	0,37	Tetradecanoato de etilo
21,625	1877	1877	0,27	Pentadecanoato de etilo
22,254	1909	1904	11,42	Hexadecanoato de metilo
23,047	1954	1955	0,46	E-9-hexadecenoato de etilo
23,525	1981	1978	29,71	Hecadecanoato de etilo
25,011	2075	2081	2,14	(Z,Z,Z)-9,12,15-octadecatrienoato de metilo
25,180	2086	2087	0,52	9-octadecenoato de metilo
25,530	2109	2107	1,23	Octadecanoato de metilo
25,961	2141	2141	14,29	9,12-octadecadienoato de etilo
26,008	2145	2145	6,49	9,12,15-octadecatrienoato de etilo
26,084	2151		15,32	Oleato de etilo
26,148	2155	2155	1,75	(E)-9-octadecenoato de etilo



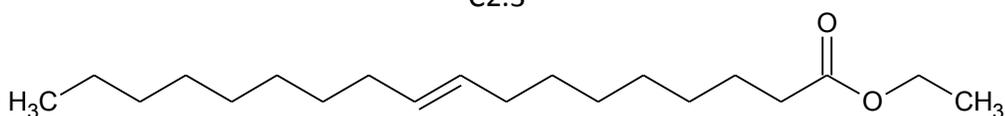
C2.1



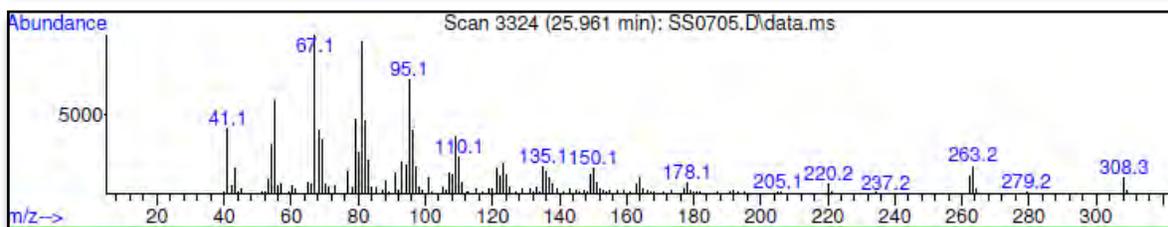
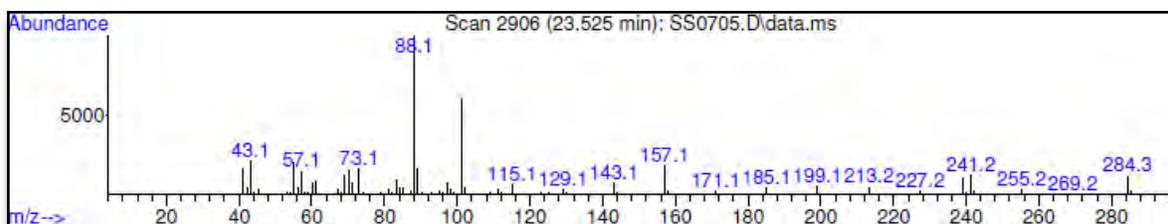
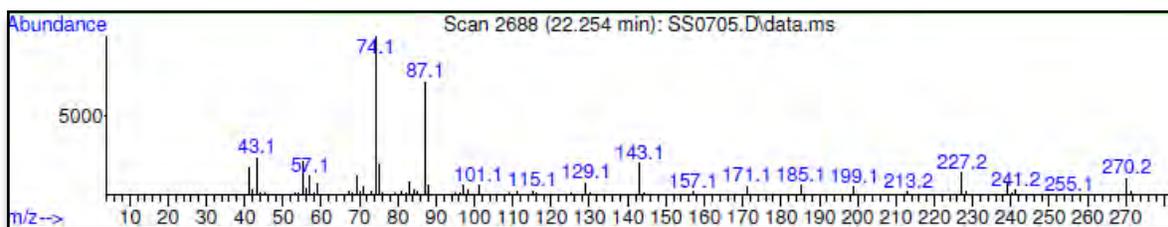
C2.2



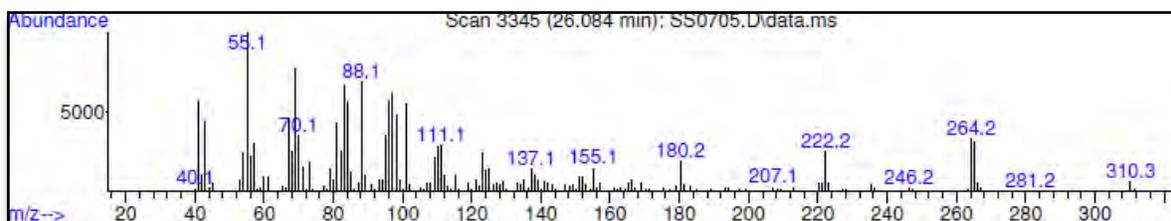
C2.3



C2.4



Continuación Ilustración 5-13. Espectros de masas de impacto electrónico para los compuestos mayoritarios de C2, en orden descendente: hexadecanoato de metilo, hexadecanoato de etilo y 9,12-octadienoato de etilo y oleato de etilo.



Continuación Ilustración 5-13. Espectros de masas de impacto electrónico para los compuestos mayoritarios de C2, en orden descendente: hexadecanoato de metilo, hexadecanoato de etilo y 9,12-octadienoato de etilo y oleato de etilo.

#### 5.2.1.2.2 Determinación estructural de C3

La sustancia C3 fue aislada como un aceite amarillo, cuyo espectro de IR (ver anexo A5.1) mostró una banda ancha hacia  $3418\text{ cm}^{-1}$  y una hacia  $1728\text{ cm}^{-1}$  características de la vibración de tensión de grupo carboxilo (O-H y C=O respectivamente), dos bandas en  $1088$  y  $1026\text{ cm}^{-1}$  propias de la vibración de flexión del enlace carbono – oxígeno en un grupo COOR. El ensayo de RMN  $^1\text{H}$  (ver anexo A5.2) mostró un espectro típico de hidrocarburo alifático, con señales que integran para 75,8 hidrógenos de metileno en fragmento alquilo ( $\delta$  1.23), 32,6 hidrógenos de metilo en fragmento alquilo ( $\delta$  0.84), 3,5 hidrógenos de metileno unido a un grupo carbonilo ( $\delta$  2.15) y finalmente 3 hidrógenos de metilo en un fragmento de éster metílico ( $\delta$  3.47). Cada una de las asignaciones se realizó por comparación de los desplazamientos químicos experimentales, con los propuestos en tablas espectroscópicas<sup>75</sup>. La integración del espectro RMN  $^1\text{H}$  y el análisis de la muestra mediante CG acoplada a EM, permitió que C3 fuera determinada como una mezcla constituida en su mayoría (más del 60%) por ácido n-hexadecanóico (C3.1), hexadecanoato de metilo (C2.1), hexadecanoato de etilo (C2.2) y acetato de (Z)-11-hexadecenilo (C3.2), cada uno de los cuales fue determinado no solo por comparación de su EM, sino también por el de su IK (ver anexo A5.3).

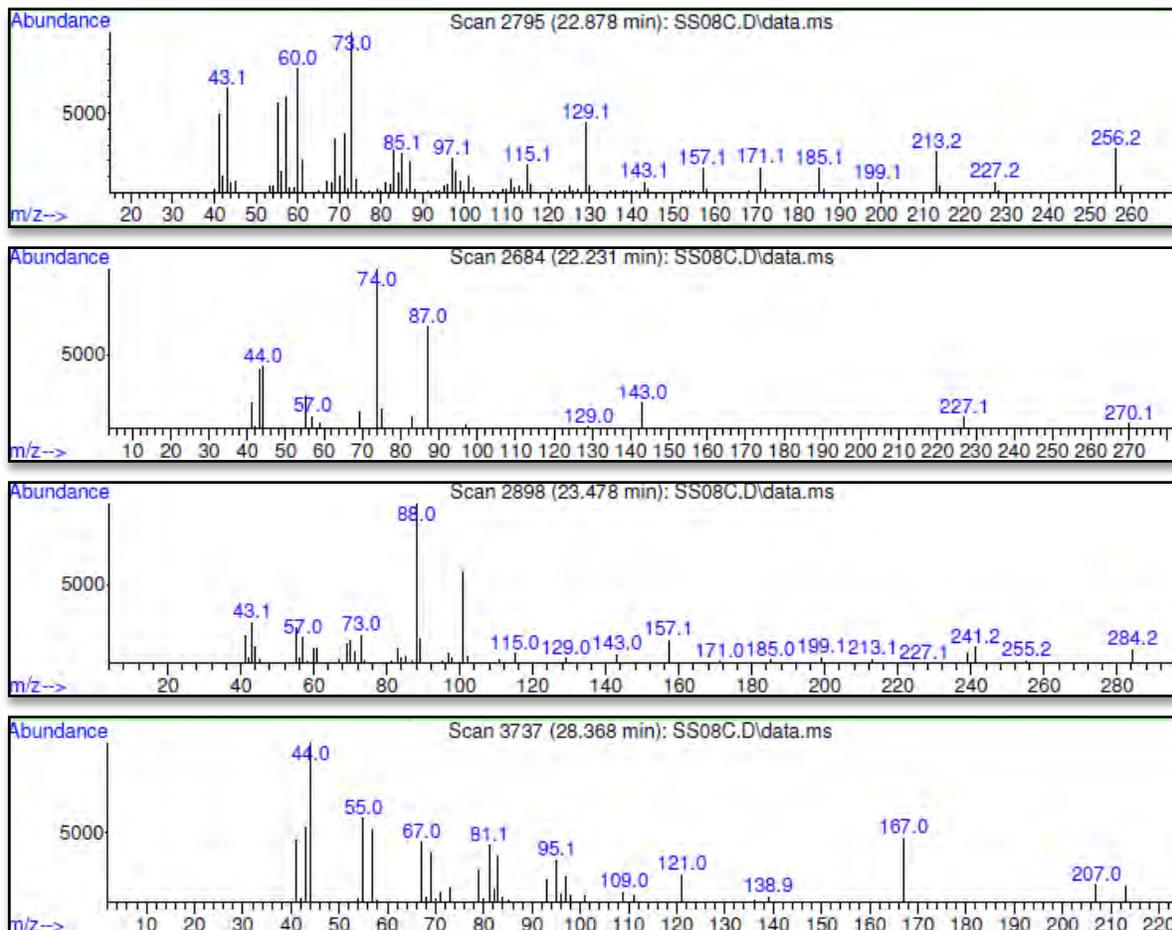
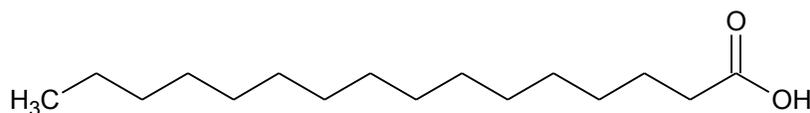


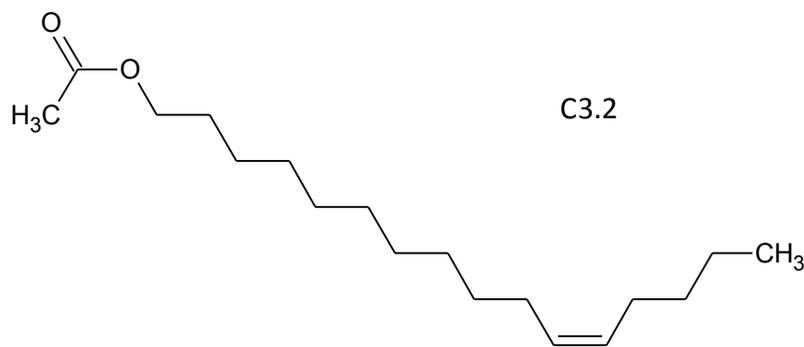
Ilustración 5-14. . Espectros de masas de impacto electrónico para los compuestos mayoritarios de C3, en orden descendente: ácido n-hexadecanoico, hexadecanoato de metilo, hexadecanoato de etilo y (Z)-11-hexadecenil acetato

Tabla 5-4. Compuestos determinados en C3

TR	KI	KI DB1 LIT	% ÁREA	POSIBLE
22,231	1908	1904	1,49	Hexadecanoato de metilo
22,878	1945	1950	61,18	Ácido n-Hexadecanoico
23,478	1978	1978	6,45	Hexadecanoato de etilo
28,368	2333	2339	1,28	Acetato de (Z)-11-Hexadecenil



C3.1



### 5.2.1.3 Fracción AcOEt

#### 5.2.1.3.1 Determinación estructural de C4

La sustancia C4 fue aislada como un sólido amarillo cuyo espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Anexo A6.2) permitió encontrar: dos señales, cada una de ellas correspondiente a dos hidrógenos equivalentes que según indica su desplazamiento químico se encuentran sobre un sistema aromático *p* – sustituido ( $\delta$  7,32; *d*; *J* 8,5 Hz y  $\delta$  6,82; *d*; *J* 8,5 Hz; ver Tabla 5-5); dos señales cada una de las cuales corresponde a un protón aislado sobre un sistema aromático ( $\delta$  5,87; *d*; *J* 2,0 Hz y  $\delta$  5,89; *d*; *J* 2,0 Hz); una señal característica de un metino olefínico ( $\delta$  5,34; *dd*; *J* 2,8 Hz 12,8 Hz); dos señales que por su constante de acoplamiento geminal (ver Tabla 5-5) se pueden ubicar sobre un mismo metileno alifático ( $\delta$  3,12 ; *dd*; *J* 12,8 Hz 17,1 Hz y  $\delta$  2,70; *dd*; *J* 2,9 Hz 17,1 Hz), lo cual indica la presencia de un centro quiral en la señal en  $\delta$  5.34, con la cual muestran acoplamiento. Los espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  y DEPT 135 (Anexo A6.3) permitieron asignar la presencia de un grupo carbonilo (197.8 ppm), seis carbonos cuaternarios aromáticos (164.9 ppm; 168.4 ppm; 165.6 ppm; 159.1 ppm; 131.4 ppm y 103.3 ppm), de los cuales los cuatro primeros son oxigenados, seis metinos aromáticos (96.2 ppm; 97.1 ppm; 116.4 ppm x 2; 129.1 ppm x 2); un metino alifático (79.5 ppm) y un metileno alifático (44.1 ppm). Las señales encontradas son típicas de un núcleo tipo flavanona, al igual que los máximos de absorbancia encontrados en el espectro de UV-Vis (228nm, 289nm y 326nm; ver Anexo A6.1)<sup>76</sup>. Estas señales han sido reportadas previamente para la 4',5,7-trihidroflavanona, comúnmente conocida como naringenina, la cual, ha sido aislada de diversas especies de angiospermas, y particularmente del epicarpio de diversas frutas entre las cuales se encuentran el tomate (Solanaceae)<sup>77</sup> y el tamarindo (Fabaceae)<sup>78</sup>.

Tabla 5-5. Datos espectroscópicos de RMN de la sustancia C4

C	<sup>13</sup> C (δ(ppm))	DEPT 135	<sup>1</sup> H(δ(ppm))	HMBC
2	79,5	CH	5,34 (dd J 2,8 Hz 12,8 Hz)	7,32; 3,12
3	44,1	CH <sub>2</sub>	Ha 3,12 (dd J 12,8 Hz 17,1 Hz) Hb 2,70 (dd J 2,9 Hz 17,1 Hz)	
4	197	C		2,69; 3,12
5	165,3	C		
6	97,1	CH	5,89 (d J 2,0 Hz)	
7	168,4	C		
8	96,2	CH	5,87 (d J 2,0 Hz)	
9	164,9	C		
10	103,3	C		5,89; 5,87
1'	131,4	C		6,82
2' y 6'	129,1	CH	7,32 (d 2H J 8,5 Hz)	5,34
3' y 5'	116,4	CH	6,82 (d 2H J 8,5 Hz)	
4'	159,1	C		7,32; 6,82

La estructura propuesta (Ilustración 5-15) es confirmada por RMN 2D, experimentos COSY (Anexo A6.4), HMBC (Anexo A6.5) y HMQC (Anexo A6.6), cuyas correlaciones se especifican en la Tabla 5-5. El experimento COSY permitió observar la correlación espacial entre los hidrógenos sobre el anillo B en δ 7,32 y 6,82; entre los protones en δ 5,34 y 3,12, lo que hace pensar que el hidrógeno en δ 2,69 se encuentra bajo la influencia del anillo B, generando un desplazamiento de la señal hacia campo alto. Por su parte la conectividad hidrógeno – carbono dentro del compuesto fue determinada mediante el experimento HMQC, del cual, es importante destacar las señales que permitieron determinar la ubicación del protón en δ 5,34 sobre el carbono en 79,5 ppm, los hidrógenos aromáticos en δ 5,87 y 5,89 sobre los carbonos aromáticos en 96,2 ppm y 97,1 ppm respectivamente, correspondientes al anillo A del núcleo flavanona; y la de los hidrógenos aromáticos en δ 6,82 y 7,32 sobre los carbonos en 116,4 ppm y 129,1 ppm respectivamente, que permitió asignar el sistema aromático simétrico *p* – sustituido correspondiente al anillo B del núcleo flavanona.

Finalmente, la asignación de cada señal en la estructura propuesta fue determinada por el ensayo HMBC, que permitió encontrar la correlación (residual) a dos *J* del hidrógeno a δ 3,12 con el carbono a 79,5 ppm y el carbonilo a 197 ppm, confirmando la disposición de la cadena C3 del núcleo flavanona; a tres *J* de los protones en δ 5,87 y δ 5,89 con el carbono

a 103,3 ppm, confirmando la sustitución propuesta en el anillo A; a tres *J* del hidrógeno a  $\delta$  5,34 con el carbono a 129,1 ppm y del hidrógeno a  $\delta$  7,32 con el carbono oxigenado a 159,1 ppm ratificando la estructura propuesta para el anillo B.

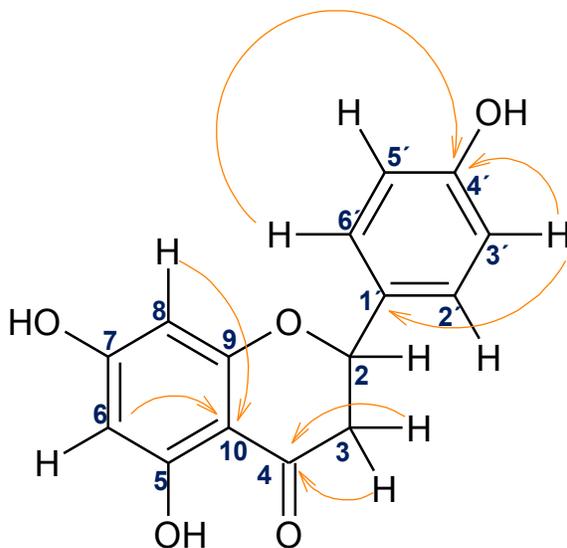


Ilustración 5-15. Estructura propuesta para C4 - naringenina

Todas las señales encontradas fueron comparadas con aquellas reportadas para la naringenina en la literatura, lo cual permitió la confirmación de la asignación propuesta para la sustancia C4<sup>79</sup>.

#### 5.2.1.3.2 Determinación estructural de C5

La mezcla C5 fue asilada como un sólido amarillo, cuyo espectro de UV-Vis (ver anexo A7.1) mostró máximos de absorción a 229nm, 290nm y 310nm. Su espectro de IR (ver anexo A7.2) mostró las bandas en  $3441\text{cm}^{-1}$ ;  $2538\text{cm}^{-1}$ ;  $1635\text{cm}^{-1}$  y  $1458\text{cm}^{-1}$ , las cuales sirvieron como indicador de la presencia de grupos hidroxilo, anillos aromáticos, y la de un grupo carbonilo en un sistema conjugado respectivamente. El espectro de RMN  $^1\text{H}$  (ver anexo A7.3) permitió encontrar señales propias de hidrógenos en un doble enlace *trans* ( $\delta$  7,44; *d*; *J* 15,8 Hz y  $\delta$  6,38; *d*; *J* 15,7 Hz), ocho hidrógenos en dos sistemas aromáticos simétricos ( $\delta$  7,40;  $\delta$  7,05;  $\delta$  6,77;  $\delta$  6,38) y dos metilenos ( $\delta$  3,45 y  $\delta$  2,75). Por su parte los espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  y DEPT 135 (Anexo A7.4) permitieron asignar cuatro señales propias de metilenos  $\text{sp}^2$  (116,2 ppm; 116,8 ppm; 130,6 ppm y 130,8 ppm), dos carbonos carboxílicos (169,2 ppm y 170,1 ppm), dos carbonos cuaternarios unidos a un grupo hidroxilo (160,3 ppm y 157,0 ppm).

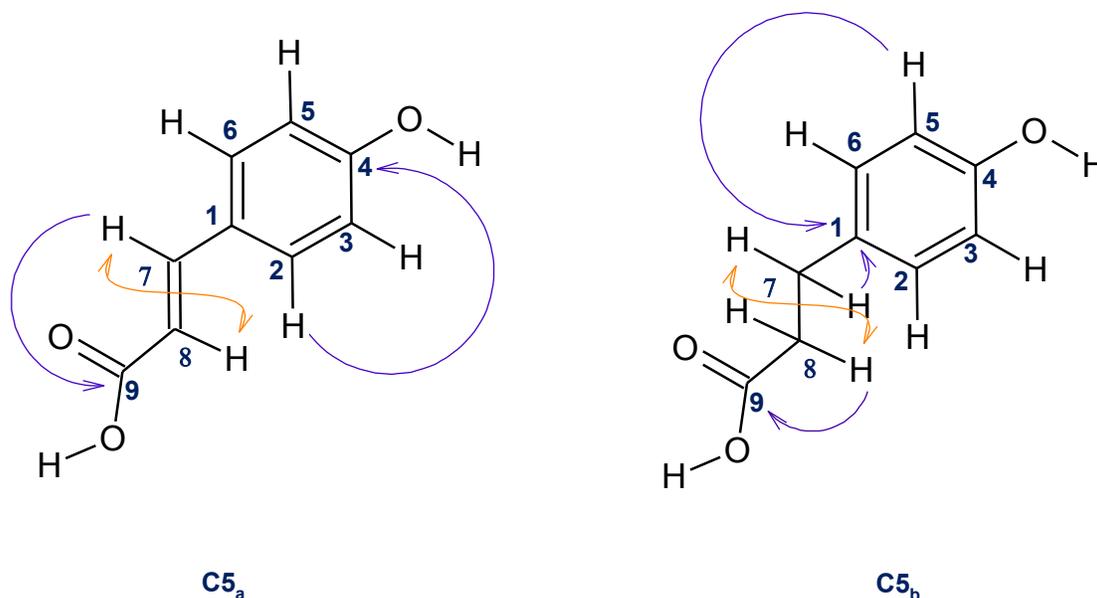


Ilustración 5-16. Componentes de C5 (C5<sub>a</sub> ácido *p*-cumárico; C5<sub>b</sub> ácido *p*-dihidrocumárico)

Las constantes de acoplamiento ( $J$  15,8 Hz) de las señales en  $\delta$  7,44 y  $\delta$  6,38 indicaron la presencia de un doble enlace *trans*, mientras que la presencia de dos tripletes a  $\delta$  3,45 y  $\delta$  2,75 respectivamente indicaron la presencia de dos grupos metileno vecinos. Por lo tanto se concluyó que C5 está constituido por una mezcla que, según lo que se logró establecer por medio de los espectros RMN 2D, está conformada principalmente por dos ácidos orgánicos provenientes de la ruta metabólica del ácido shikímico, a saber el ácido *p*-cumárico (C5<sub>a</sub>) y el ácido *p*-dihidrocumárico (C5<sub>b</sub>) (Ilustración 5-16), en una relación 48:52 respectivamente (calculado como la relación entre la integración de las señales  $\delta$  7,40 y  $\delta$  7,05).

Entre las señales más representativas encontradas en el espectro COSY (anexo A7.5), se resaltan aquellas correspondientes a la correlación espacial entre los protones de cada uno de los sistemas aromáticos *para* sustituidos, que como se muestra en la Tabla 5-6 una corresponde al par de hidrógenos en  $\delta$  7,40 y  $\delta$  6,77, y la otra al par en  $\delta$  7,05 y  $\delta$  6,72; adicionalmente a partir de este espectro se logró establecer por una parte la correlación entre los protones en el doble enlace *trans* y por la otra la existente entre los hidrógenos en la cadena alifática de C5<sub>b</sub>. La interpretación de los espectros HMQC (Anexo A7.6) y

HMBC (Anexo A7.7) permitió establecer la conectividad y correlación espacial hidrógeno – carbono en las estructuras propuestas, logrando así la elucidación estructural propuesta en la Ilustración 5-16. Las señales más representativas corresponden a la correlación a tres enlaces del hidrógeno en posición *orto* con el carbono aromático hidroxilado y la correlación del hidrógeno en posición *meta* con el carbono cuaternario del sistema aromático. Adicionalmente es posible encontrar la correlación espacial entre los hidrógenos del sistema olefínico y el grupo carboxilo en 169,2 ppm y la de los hidrógenos sobre metilos alifáticos con el grupo carboxilo en 170,1 ppm.

Tabla 5-6. . Datos espectroscópicos de RMN de la sustancia C5

Compuesto	C	<sup>13</sup> C (δ(ppm))	DEPT 135	<sup>1</sup> H(δ(ppm))	HMBC	
<b>C5(a)</b>	1	127,4	C		6,77; 6,38	
	2 y 6	130,6	CH	7,40 (d, 2H, J=8,5)	7,44	
	3 y 5	116,8	CH	6,77 (d, 2H, J=8.5)	6,77	
	4	160,3	C		7,40	
	7	141,8	CH	7,44 (d, 1H, J=15.8)	7,40	
	8	118,4	CH	6,38(d, 1H, J=15.7)		
	9	169,2	C		6,38; 7,44	
	<b>C5(b)</b>	1	131,2	C		7,05; 6,72; 3,45
		2 y 6	130,8	CH	7,05 (d, 2H, J=8,4)	2,75; 3,45
3 y 5		116,2	CH	6,72 (d, 2H, J=8,4)	6,72; 7,05	
4		157,0	C		7,05	
7		31,2	CH <sub>2</sub>	3,45 (t, 2H, J=7,4)		
8		35,9	CH <sub>2</sub>	2,75 (t, 2H, J=7,4)		
9		170,1	C		3,45	

Ambos compuestos han sido reportados para diferentes especies vegetales, y los datos espectroscópicos experimentales fueron comparados con datos espectroscópicos reportados para los ácidos *p*-cumárico y el ácido dihidro-*p*-cumárico<sup>80</sup>, lo cual, confirma satisfactoriamente las asignaciones propuestas para los componentes de C5.

Adicionalmente, el espectro de masas de impacto electrónico obtenido mediante el análisis de la mezcla por CG – EM (ver anexo A7.8), permitió confirmar la estructura propuesta para los dos componentes de C5, ya que se logró establecer no solo su peso molecular, sino la diferencia en dos unidades de masa atómica que existe entre ellos (164 uma para el ácido *p*-cumárico y 166 uma para el ácido dihidro-*p*-cumárico) (Ilustración 5-17).

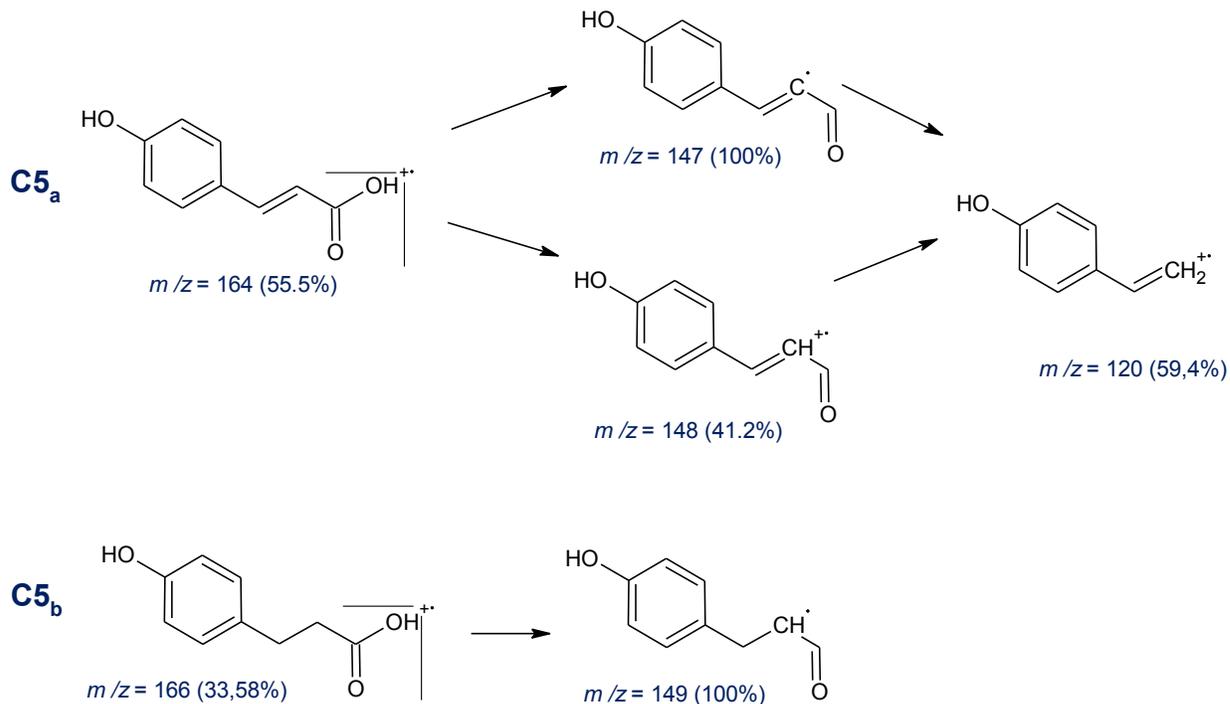


Ilustración 5-17. Fragmentación propuesta para los compuestos presentes en C5

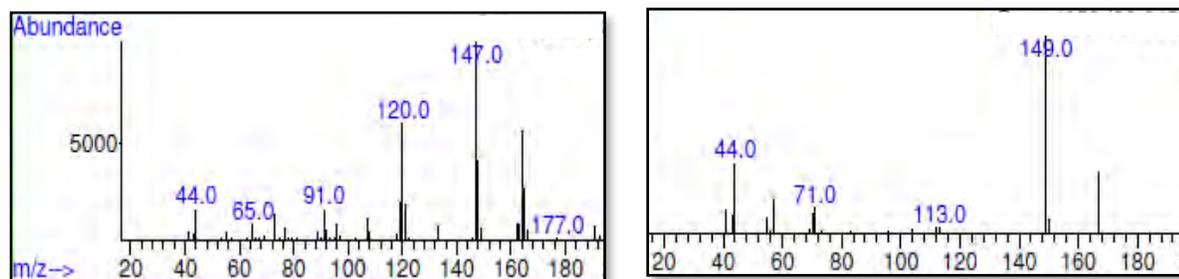


Ilustración 5-18. Espectro de masas de impacto electrónico de C5<sub>a</sub> (izq.) y C5<sub>b</sub> (der.)

### 5.2.1.4 Fracción MeOH

Las fracciones eluidas en metanol (SS06 a SS012), fueron catalogadas como muestras complejas, de polaridad elevada, que por técnicas cromatográficas convencionales no fue posible separar satisfactoriamente. Éstas fueron comparadas en términos de su contenido de azúcares, encontrando no solo que éstas tienen un elevado contenido de éstos en el extracto evaluado, sino que la mayor parte de los azúcares libres en la muestra están constituidos por glucosa, fructosa y sacarosa (como ya se había encontrado para el

fruto durante su desarrollo y maduración), siendo este primero el monosacárido mayoritario en todas las fracciones eluidas en metanol, tal y como puede observarse en la Tabla 5-7.

Tabla 5-7. Contenido de azúcares libres en las fracciones eluidas con MeOH

<b>FRACCIÓN</b>	<b>SACAROSA (%)</b>	<b>GLUCOSA (%)</b>	<b>FRUCTOSA (%)</b>	<b>AZÚCARES LIBRES (%)</b>
SS06	1,7%	11,7%	8,5%	21,9%
SS07	2,2%	14,4%	7,2%	23,7%
SS08	3,2%	20,1%	10,4%	33,6%
SS09	0,7%	3,7%	2,7%	7,1%
SS10	2,2%	14,6%	7,1%	23,9%
SS11	3,6%	25,2%	11,5%	40,2%
SS12	1,5%	10,5%	4,9%	16,9%

#### 5.2.1.5 *Relevancia de la presencia en el fruto de los metabolitos fijos aislados y consideraciones biogénicas*

Se logró determinar que la composición de C1, C2 y C3 está constituida principalmente por alcoholes, ésteres, alcanos y alcanos ramificados. Todas las partes aéreas de las plantas superiores están cubiertas de ceras cuticulares, las cuales están constituidas por hidrocarburos alifáticos de cadena larga y sus derivados oxigenados incluyendo ácidos grasos, ésteres, alcanos, alcoholes, aldehídos, cetonas y compuestos cíclicos como terpenos, cuya composición está directamente afectada por factores como la especie, el órgano y el ambiente<sup>81</sup>. Éstas son producidas por la planta, no solo con el fin de prevenir la pérdida de agua, sino que tienen un importante papel en las interacciones planta – herbívoro y/o planta insecto<sup>81a</sup>. Adicionalmente, otros estudios han sugerido que la presencia de cutina es un factor importante para la vida útil durante el almacenamiento de frutos como el tomate, ya que tienen un efecto directo sobre la velocidad de su deshidratación y el riesgo de ataque microbiano<sup>82</sup>.

Kosma y colaboradores<sup>82</sup> reportaron que la cutina en un fruto como el tomate (*Solanum lycopersicum*), está principalmente constituido por un mezcla de alcanos, triterpenoides, esteroides y alcanos ramificados. Szafrank y Synak<sup>81a</sup> reportan la presencia de *n*-alcanos, además de 2 o 3 metil alcanos, conformados principalmente por cadenas de 23 a 34 átomos de carbono en las hojas de papa (*Solanum tuberosum*), siendo los más abundantes entre los *n*-alcanos el *n*-hentriacontano, 2-metiltriacontano, *n*-nonacosano y el *n*-

heptacosano; adicionalmente se reporta la presencia de alcoholes, cetonas y aldehídos, ácidos grasos y ésteres. Se confirma entonces la posibilidad de la existencia de éste tipo de compuestos en los tres morfotipos de cocona, esto teniendo en cuenta que fueron aislados a partir del epicarpio de uno de los morfotipos.

Por otro lado se logró aislar compuestos de origen fenólico. Los metabolitos fenólicos están constituidos por un diverso grupo de compuestos, entre los cuales es posible destacar los fenoles simples, los ácidos fenólicos, las acetofenonas, los ácidos cinámicos y sus derivados, cumarinas, flavonoides, quinonas, lignanos, taninos, entre otros<sup>83</sup>.

Por su parte, los compuestos determinados en C4 son ácidos cinámicos, pertenecientes al grupo de los fenilpropanoides<sup>84</sup>, los cuales al igual que los aminoácidos aromáticos y los ácidos benzóicos provienen de la ruta metabólica del ácido shikímico; siendo sus precursores la L-fenilalanina y la L-tirosina, los que, dentro del material vegetal sufren la eliminación de amoníaco de la cadena lateral, produciendo el ácido cinámico y ácido *p*-cumárico respectivamente<sup>85</sup> (Ilustración 5-19). Los ácidos *p*-cumárico y *p*-dihidrocumárico han sido previamente aislados a partir de diversas especies vegetales, no solo en forma libre, sino también esterificados con otros ácidos o azúcares (glicosidados)<sup>84-85</sup>.

Su presencia se ha reportado en todas las partes de frutas y vegetales; sin embargo su concentración es mayor en la periferia de las frutas maduras, y disminuye con el proceso de maduración y senescencia<sup>84</sup>. El periodo de almacenamiento induce la hidrólisis de derivados hidroxicinámicos en ácidos libres, y éstos posteriormente pueden generar vinilfenoles, cuyo aroma es característico de la senescencia avanzada de frutas como la naranja (*Citrus spp.*)<sup>84</sup>.

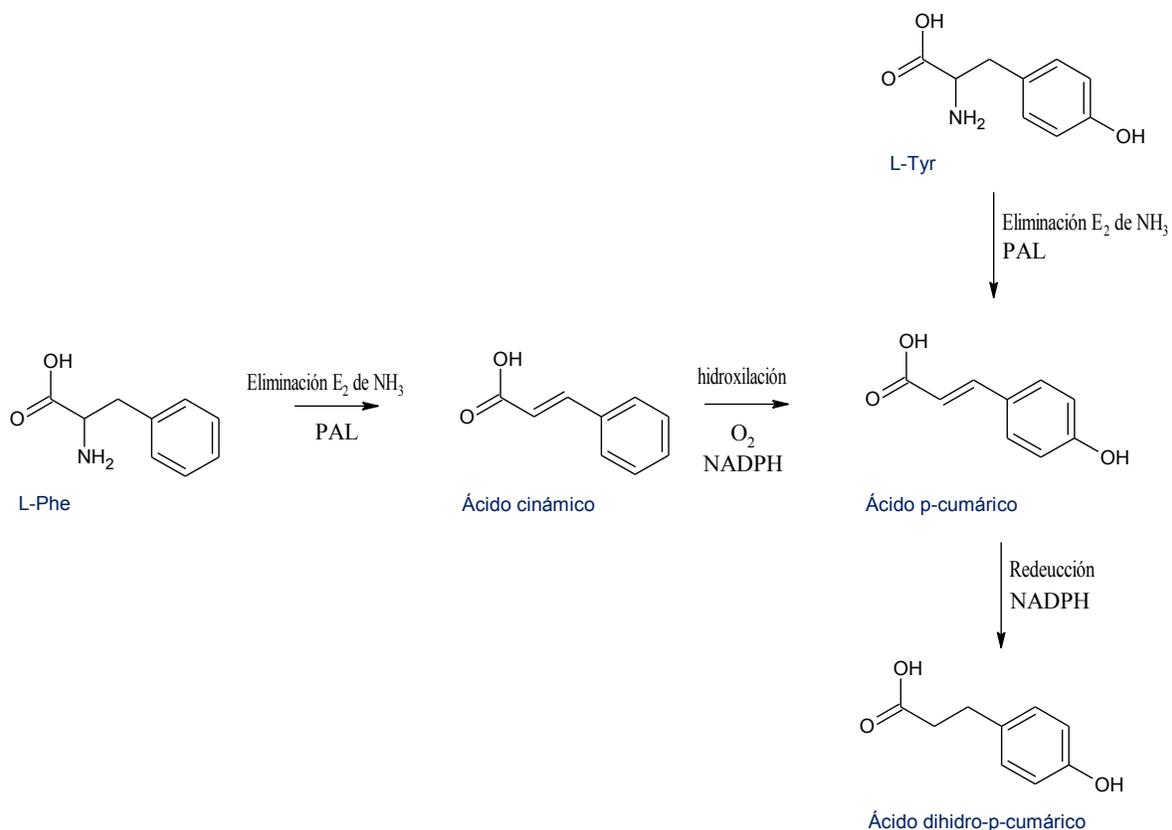


Ilustración 5-19. Ruta biogénica ácidos p-cumárico y dihidro-p-cumárico

El compuesto C5 (naringenina), se clasifica dentro del grupo de los flavonoides, específicamente del tipo flavanona debido a la presencia del anillo C y el patrón de oxigenación del anillo B<sup>84</sup>. Su biogénesis ha sido considerada mixta debido a que el anillo A proviene de la ruta del ácido acético, mientras que el anillo B proviene de la ruta del ácido shikímico, lo cual explica satisfactoriamente su patrón de oxigenación<sup>79a</sup>.

Específicamente, la naringenina, al igual que otros compuestos de tipo flavonoide, se ha considerado producto de una unidad iniciadora de cinnamoil-CoA, que posteriormente sufre una extensión de cadena con tres unidades de Malonil-CoA, generando un policétido, que, según la naturaleza de la enzima responsable puede ser objeto o de un rearrreglo aldólico o tipo Claisen<sup>85</sup>. Específicamente el rearrreglo de Claisen da lugar a la formación de chalconas, las cuales, se consideran precursores de buena parte de los flavonoides presentes en el reino vegetal; por ejemplo de la naringenina, formada debido a un ataque nucleofílico tipo Michael del grupo fenol a la cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada (Ilustración 5-20)<sup>85</sup>. Posteriormente las flavanonas, pueden sufrir diversas variaciones en

su esqueleto básico, dando lugar a la formación de flavonas, flavonoles, antocianidinas y catequinas<sup>85</sup>.

Diversos autores han considerado a los flavonoides como el mayor ingrediente nutracéutico en las plantas<sup>84</sup>, no solo por el impresionante número de estructuras reportadas dentro de éste grupo, sino que debido a su carácter fenólico estos pueden actuar como potentes antioxidantes y quelates de metales, adicionalmente algunos de ellos han sido reportados efectivos en la prevención de algunos tipos de cáncer y las enfermedades cardiovasculares<sup>85-86</sup>. Es importante aclarar que el término nutracéutico se refiere a aquel alimento, o parte del alimento que proporciona beneficios a la salud del consumidor, incluyendo la prevención y el tratamiento de alguna enfermedad, por lo cual el interés sobre este tipo de alimentos se ha venido incrementando exponencialmente durante los últimos años<sup>86</sup>.

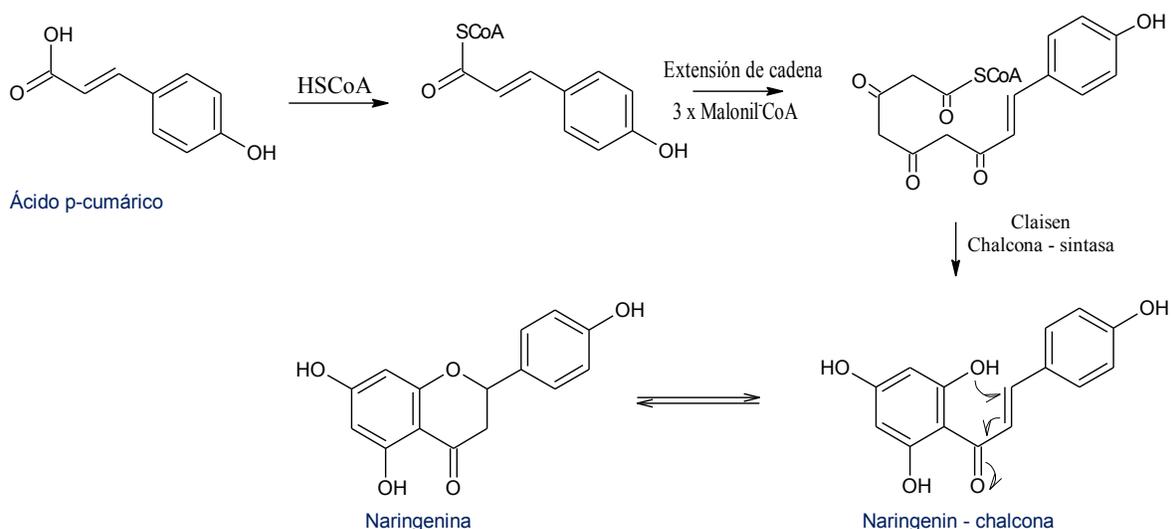


Ilustración 5-20. Ruta biogénica de la naringenina

No por nada se encuentra que los flavonoides son cualitativa y cuantitativamente uno de los grupos de productos naturales más ampliamente estudiados. Se caracterizan adicionalmente, no solo por ser pigmentos, sino también por sus particulares propiedades electrónicas, que aparentemente no solo están relacionadas con la captura y transferencia de energía, sino también con procesos de bioselectividad<sup>87</sup>.

Particularmente, las frutas cítricas y sus derivados han sido consideradas entre las principales fuentes de flavanonas; otras fuentes de menor relevancia se encuentran almendras, achiotes y tomates, lo cual demuestra que estas se encuentran distribuidas en diferentes familias de angiospermas, incluyendo la Solanaceae. Específicamente la naringenina se ha identificado en frutas como naranja, uva y tomate<sup>84</sup>, y se ha sugerido como potencial antioxidante, anti – inflamatorio y regulador del metabolismo de grasas<sup>77a</sup>.

### ***5.2.2 Estudio de metabolitos volátiles en la madurez fisiológica del fruto***

El aroma de las frutas en su punto de madurez es propio de cada una de ellas, y probablemente representa el aspecto más complejo y específico para cada especie en el proceso de maduración, junto a los cambios de color, ya que ambos son determinantes en la atracción de frugívoros que aseguran la dispersión de semillas en su estado óptimo para la reproducción de la especie. Cada una de ellas, y aun más específicamente cada variedad, es caracterizada por un perfil de aroma único, constituido por cientos de compuestos volátiles, que se distribuyen en diferentes grupos funcionales como alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, terpenos, furanos, fenólicos y azufrados. Las vías metabólicas por las cuales se da ésta formación de compuestos volátiles es diversa, y aun no muy bien comprendida, a pesar del increíble progreso de la ciencia durante los últimos años que ha permitido la identificación no solo de éstos compuestos, sino aun más allá de los genes y enzimas involucrados en la biogénesis de éstos<sup>55</sup>.

Los compuestos volátiles presentes en matrices vegetales son resultado de diferentes reacciones dadas ya sea por actividad enzimática, el rompimiento celular durante la preparación de la muestra o bien formarse durante el calentamiento de sus precursores no volátiles<sup>88</sup>. Su obtención a partir de matrices vegetales puede llevarse a cabo bajo diferentes métodos, entre los cuales se encuentran técnicas de extracción en matrices adsorbentes como la extracción en fase sólida y la microextracción en fase sólida, la extracción con fluido súper crítico, la extracción líquido – líquido, así como la procedimientos basados en la destilación analítica como el “headspace” dinámico y estático<sup>89</sup>.

Uno de los métodos más ampliamente utilizados es el de arrastre por vapor, el cual permite la obtención del aceite esencial del material vegetal. El aceite esencial es definido como un producto de composición compleja que comprende los principios volátiles de la planta y otros modificados durante el proceso de extracción<sup>74</sup>. El principio básico del proceso se fundamenta en una destilación entre dos líquidos heterogéneos, el agua y el

aceite esencial, que se da gracias a que el aumento en la presión de vapor permite la disminución del punto de ebullición normal del aceite esencial. El vapor es generado en un calderín a parte del recipiente que contiene una cama del material vegetal; a través de ésta, el vapor es forzado a pasar, llegando a un intercambiador de calor que condensa los dos líquidos inmiscibles, que son fácilmente separables debido a la formación de fases cuando se colectan al final de la línea sobre un tubo en U<sup>89-90</sup>.

Otra de las técnicas usadas en matrices vegetales es la llamada destilación – extracción simultánea con solvente (DES), conocido también como el método de Lickens - Nickerson<sup>89</sup>; en el cual la muestra es calentada en un balón con agua destilada, mientras el solvente es calentado en otro balón, permitiendo que los vapores de agua y solvente orgánico se encuentren en el cuerpo del equipo de extracción. Los analitos volátiles son removidos de la matriz por el vapor de agua, y transferidos a la fase orgánica en el momento que los dos líquidos condensan en el intercambiador de calor. Ambos, agua y solvente son colectados en el cuerpo del aparato de extracción posterior a su condensación, el cual permite después de la separación de fases, que cada uno de ellos regrese a su respectivo contenedor, lo cual, genera un reflujo constante.

Sin embargo, la búsqueda por métodos más simples y eficientes llevó al descubrimiento de la microextracción en fase sólida (SPME), que solo requiere de la exposición de una fibra al espacio de cabeza de la muestra por un periodo de tiempo dado, seguido por la inmediata desorción térmica de los analitos en el puerto de inyección en el CG. Ésta técnica es considerada por diversos autores como la mejor alternativa para el análisis de fragancias y aromas, y especialmente útil para el análisis de muestras en las cuales la concentración de metabolitos volátiles es baja<sup>89</sup>.

Los cromatogramas obtenidos como corriente iónica reconstruida de las extracciones mediante DES y SPME de metabolitos volátiles de los tres morfotipos evaluados se muestran en el Anexo A8. A partir del análisis de éstas fue posible establecer que el morfotipo ovalado presenta como metabolitos volátiles mayoritarios n-1-nonadecanol, salicilato de metilo y elácido n-hexadecanóico, el morfotipo redondo pequeño eicosano y tolueno y el morfotipo redondo grande butanoato de etilo, salicilato de metilo, ácido n-hexadecanóico y octanoato de etilo. Los metabolitos volátiles determinados en cada uno de los morfotipos se muestra en la Tabla 5-8. Es de resaltar que la mayoría de éstos han sido reportados previamente para cocona<sup>19, 22-23, 54</sup> y otros frutos de solanáceas como el tomate<sup>91</sup> y el lulo<sup>92</sup>. Adicionalmente fue posible precisar que el morfotipo ovalado,

independientemente del método de extracción se caracteriza por mostrar la mayor cantidad de compuestos volátiles.

Tabla 5-8. Concentración relativa volátiles determinados en los morfotipos ovalado (1), redondo pequeño (2) y redondo grande (3), donde la X denota la presencia en cada morfotipo. KI (índice de Kovats) y KI\* (índice de Kovats reportado en la literatura para columna DB-5 y equivalentes)

KI	KI *	ASIGNACIÓN PROBLABLE	DES			MEFS		
			1	2	3	1	2	3
717	714	propionato de etilo	0.72	3.37				1.8
719	720	acetato de n-propilo		0.53	4.65			
729	726	metil-ciclohexano			7.19			
730	730	1,1-dietoxi-etano	4.19	10.51				
732	729	2,4-dimetil-hexano			0.29			
736	733	etil-cidopentano			0.65			
739	743	3-metil-1-hepteno			0.32			
755	760	2-metil-heptano			0.47			
761	762	tolueno	0.99	1.11	72.93	1	1.55	2.11
910	906	heptanal	0.35					
913	911	(Z)-2-noneno	0.29					
1019	1026	1-metil-4-(1-metiletil)-benceno				1.2		3.85
1024	1026	5-isopropenil-1-metil-1-ciclohexeno				0.68		1.8
1029	1030	1,3,3-trimetil-2-oxabicyclo[2.2.2]octano					1.15	
1042	1043	2-fenilacetaldehido	0.56					
1053	1056	5-etildihidro-2(3H)-furanona		0.28				
1058	1059	1-metil-4-(1-metiletil)1,4-ciclohexadieno				0.45		
1073	1074	<i>cis</i> -2-(tetrahydro-5-metil-5-vinilfuran-2-il)-propan-2-ol	0.44	0.32				
1089	1088	<i>trans</i> -2-(tetrahydro-5-metil-5-vinilfuran-2-il)-propan-2-ol	0.35					
1095	1100	propionato (Z)-3-hexenilo				0.44		1.12
1098	1098	2,6-dimetil-2,7-octadien-6-ol	3.18	1.24			1.18	
1103	1101	(E)-2,6-dimetil-1,3,7-octatrien-6-ol	0.88	0.65				
1173	1171	Ácido benzoico		0.28				
1178	1079	Ácido octanoico	0.78					
1183	1174	benzoato de etilo	2.35	2.7		0.42	5.17	0.98
1191	1193	(E)-2-hexenil butirato				1.54	3.91	2.42
1196	1194	butirato de hexilo				1.83	8.17	1.94
1201	1202	octanoato de etilo	2.81	1.3		0.99	10.87	1.69
1206	1207	2-(4-metilciclohex-3-enil)-propan-2-ol	1.32	0.34				
1212	1206	salicilato de metilo	2.03	1.77		11.9	36.33	6.91
1277	1266	5-butildihidro-2(3H)-furanona	2.99	2.6				
1291	1291	tridecano				3.26		
1374	1380	Ácido n-decanoico	0.83					
1403	1397	decanoato de etilo	4.72	0.69		1.17	3.24	
1418	1420	(Z)-3,4-Dimetoxi-1-propenilbenzeno		0.29				

KI	KI *	ASIGNACIÓN PROBLEBLE	DES			MEFS		
			1	2	3	1	2	3
1421	1420	4-hidroxi-3-metoxibenzaldehido		0.32				
1462	1462	3-metil tetradecano				0.68		
1467	1463	2-metoxi-4-((E)-1-propenil)-fenol	3.18					
1469	1467	2-metil tetradecano				0.38		
1499	1500	penta decano				0.36		
1505	1500	(E)-3,4-dimetoxi-1-propenilbenzeno		0.61				
1552	1557	4-metil-penta decano				0.36		
1564	1564	(E)-3,7,11-trimetil-1,6,10-dodecatrien-3-ol			0.33			
1576	1583	benzoato (E)-2-hexenilo	0.46					
1580	1576	benzoato de hexilo	0.28					
1584	1593	dodecanoato de etilo	2.11	0.61		0.13		
1673	1973	3-metil hexadecano				2.13		
1674	1683	6-metil-2-(3-metil-3-ciclohexen-1-il)-5-hepten-2-ol		1.33	2.71			
1681	1679	8-heptadecano				0.59		
1692	1681	6-heptiltetrahidro-2H-piran-2-ona		0.27				
1710	1708	(E)-2-heptadeceno				2.17		
1717	1721	(Z)-2-heptadeceno				0.41		
1721	1720	Ácido tetradecanoico	1.14	1.05				
1743	1739	benzoato de bencilo	0.94	0.76				
1746	1745	7-metil heptadecano				4.43		
1750	1747	6-metil heptadecano				0.94		
1824	1821	bencil-2-hidroxibenzoato	0.25	0.27				
1827	1829	3,17-dimetil hepta decano				0.17		
1842	1846	isopentil ododecanoato				1.72		
1847	1851	3,4-dimetil heptadecano				0.21		
1869	1864	2-metilocatdecano				1.99		
1873	1878	Ácido penta decanoico	27.05	24.06		0.46		
1878	1873	3-metil octa decano				0.54		
1961	1964	4-metilnona decano				0.84		
1964	1966	2-metilnoandecano				0.25		
1973	1977	9-hexadecenoato de etilo		0.18				
1994	2000	eicosano				0.23		
2067	2064	2-metil eicosano		0.78		4.69		
2070	2065	3-metil eicosano				0.37		

Continuación Tabla 5-8. Concentración relativa volátiles determinados en los morfotipos ovalado (1), redondo pequeño (2) y redondo grande (3), donde la X denota la presencia en cada morfotipo. KI (índice de Kovats) y KI\* (índice de Kovats reportado en la literatura para columna DB-5 y equivalentes)

Se encontró que el propionato de etilo, tolueno, benzoato de etilo, butirato de 2-hexenilo, butirato de hexilo, octanoato de etilo y salicilato de metilo, son compuestos mayoritarios y comunes a los tres morfotipos, sin embargo su concentración relativa dentro de cada extracción no supera el 5%, excepto en el caso del salicilato de metilo, el cual se caracterizó como compuesto mayoritario en los tres morfotipos al usar como método de extracción SPME (12% para el morfotipo ovalado, 33% para el redondo grande y 7% para el redondo pequeño).

Por otro lado la extracción DES, permitió la determinación de ácido pentadecanóico en los morfotipos ovalado y redondo grande en una concentración relativa del 27% y el 24%, respectivamente, sin embargo, éste no fue detectado entre los compuestos volátiles del morfotipo redondo pequeño, aun al usar SPME como método de extracción. Este comportamiento probablemente se deba al efecto de la temperatura de la muestra durante la extracción de volátiles libres<sup>54</sup>.

El análisis de volátiles extraídos por arrastre de vapor realizado por Marx y colaboradores<sup>19</sup> sobre un morfotipo de cocona no especificado procedente del Brasil, mostró la presencia de safrol, ácido palmítico, salicilato de metilo y 1-dodecanol; por su parte Morales y Duque<sup>54</sup>, reportan la presencia de salicilato de metilo como el compuesto más abundante en el extracto glicosídico del morfotipo redondo pequeño; mientras que Quijano y Pino<sup>23</sup> destacan la presencia de linalool, (Z)-3-Hexenol y  $\alpha$ -terpineol, los cuales son compuestos comúnmente reportados en frutos del género *Solanum*, y la de lactonas y compuestos fenólicos como el ácido benzoico, cuya concentración varía dependiendo del estado de madurez del fruto. Como se observa, todos estos reportes concuerdan con el tipo de metabolitos volátiles extraídos de cocona en el presente trabajo, sin embargo, ninguno de éstos lo había usado como estrategia de diferenciación química entre morfotipos cultivados.

### **5.2.3 Estudio comparativo de los metabolitos fijos aislados y volátiles determinados**

La metabolómica considerada como el estudio de la mayor cantidad de metabolitos posible en un sistema dado, ha emergido como una importante herramienta para diferentes disciplinas como el descubrimiento de nuevos fármacos, la fisiología vegetal, la medicina y la nutrición. En la ciencia de los alimentos, ésta ha sido considerada como una herramienta para el control de la calidad, el procesamiento y la inocuidad de materias primas y productos. Los estudios metabolómicos pueden ser clasificados como

discriminantes, informativos o predictivos. Los discriminantes se basan en el análisis multivariable de los datos, con el fin de lograr la clasificación entre poblaciones de muestras; los informativos se centran en la determinación de metabolitos, en el desarrollo de base de datos; los predictivos se basan en modelos estadísticos que permiten la predicción en el perfil y la abundancia metabólica que por otros medios sería difícil de cuantificar<sup>93</sup>.

### 5.2.3.1 Metabolitos fijos

El estudio fitoquímico comparativo llevado a cabo mediante HPLC-DAD (Anexo A8), realizado con el fin de establecer la presencia o ausencia de los metabolitos asilados en el epicarpio y el mesocarpio de cada uno de los morfotipos evaluados. El perfil obtenido para C4 (ver anexo A7.9), reveló la presencia de dos picos mayoritarios ( $t_R = 33.8$  min y  $35.4$  min), entre los cuales el primero mostró una mayor altura de pico que el segundo, lo cual permite determinarlo como el correspondiente al ácido *p*-cumárico, ya que éste a diferencia del dihidro-*p*-cumárico posee un mayor número de cromóforos y un sistema conjugado de dobles enlaces que le hace susceptible a mayores cambios en los valores de absorbancia. El perfil obtenido para C5, muestra un solo pico, lo cual se considera un indicio de la presencia de un solo enantiómero ( $t_R = 44.2$  min) (ver anexo A6.7); sin embargo tal afirmación podría hacerse únicamente al realizar la separación en una fase estacionaria que asegure la separación de los dos enantiómeros (HPLC quiral).

Se logró establecer la presencia de ácido *p*-cumárico, dihidro-*p*-cumárico y naringenina en el epicarpio de los tres morfotipos evaluados, mientras que ninguno de los metabolitos asilados se encuentra en los extractos obtenidos a partir del mesocarpio de cada uno de los tres morfotipos objeto de estudio (Ilustración 5-21). Es de resaltar que diversos estudios han coincidido con que la cantidad de compuestos fenólicos y entre éstos los de tipo flavonoide se encuentran en mayores concentraciones en el epicarpio de la fruta.

Por otra parte, la presencia de los compuestos fenólicos asilados únicamente en el epicarpio de los tres morfotipos objeto de estudio, hace pensar en la necesidad de diseñar procesos de producción de subproductos de alto valor agregado a partir de los residuos de procesamiento de cocona. Como antecedente es posible citar el trabajo de Benakmoum y colaboradores<sup>77b</sup>, quienes basado en el hecho que el contenido de carotenoides como el licopeno y el de flavonoides es más relevante en el epicarpio del tomate que en su pulpa, plantean el desarrollo de tecnologías para el tratamiento de residuos del procesamiento

de tomate, con el fin de lograr la producción de aditivos alimentarios naturales; esto teniendo en cuenta que a este fruto se le han sido atribuidos durante los últimos años la prevención de ciertos tipos de cáncer, propiedad causada probablemente por su elevado contenido de antioxidantes, entre los cuales se cuentan compuestos fenólicos y carotenoides.

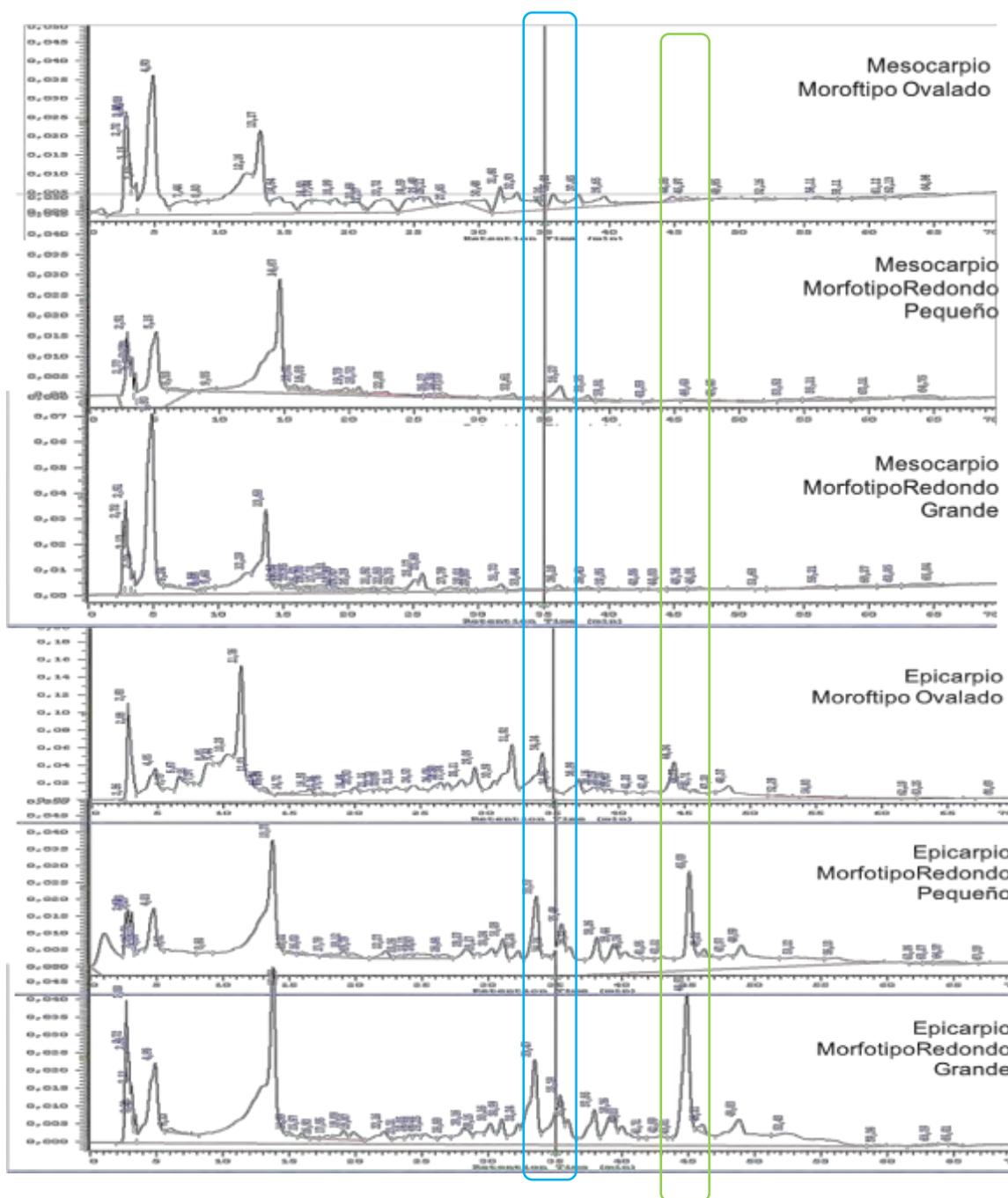


Ilustración 5-21. Perfiles cromatográficos obtenidos por HPLC-DAD ( $\lambda = 240 \text{ nm}$ ), para los extractos etanólicos del epicarpio y el mesocarpio de los morfotipos (1) ovalado, (2) redondo pequeño y (3) redondo grande. Los cuadrados resaltan los tiempos de retención del ácido *p*-cumárico (TR = 33.8 min), ácido dihidro-*p*-cumárico (TR = 35.4 min) y naringenina (TR = 44.2 min)

### 5.2.3.2 *Metabolitos volátiles*

Por medio del análisis de componentes principales, realizado sobre las áreas obtenidas de cada compuesto determinado para los tres morfotipos objeto de estudio (ver anexo A10.1), se logró la identificación de cinco vectores característicos, de los cuales los dos primeros logran explicar el 27,0% y el 24,2% de la varianza total del experimento (63,3% acumulado). Las variables con mayor peso dentro del primer componente (ver anexo A10.1) son el 1-metil-4-(1-metil etil)-1,4-ciclohexadieno (IK = 1058), tridecano (IK = 1291), 3-metil tetradecano (IK = 1462), 2-metil tetradecano (IK = 1469), pentadecano (IK = 1499), dodecanoato de etilo (IK = 1584), 3-metil hexadecano (IK = 1673), 8-heptadecano (IK = 1681), 7-metil heptadecano (IK = 1746), 6 – metil heptadecano (IK = 1750), 3,17-dimetil heptadecano (IK = 1827), octadecanoato de isopentil (IK = 1842), 3,4-dimetil heptadecano (IK = 1847), 2-metil octadecano (IK = 1869), 3-metil octadecano (IK = 1878), 4-metil nonadecano (IK = 1961), 2 metil nonadecano (IK = 1964), eicosano (IK = 1994), 2-metil eicosano (IK = 2067) y 3 –metil eicosano (IK = 2070), mientras que para el segundo componente las variables de mayor peso son el 2-(4-metilciclohex-3-enil)-propan-2-ol (IK = 1206) y dodecanoato de etilo (IK = 1584).

Como puede observarse, los componentes principales del ensayo están constituidos en su mayoría por compuestos alifáticos saturados, insaturados, ésteres y alcoholes alifáticos, que como se había mencionado anteriormente están presentes en la parte más externa de la planta formando la denominada cutina, y cumplen funciones como la inhibición de la pérdida de agua y la prevención de ataque por parte de insectos o microorganismos<sup>82</sup>; los cuales, aunque no son los compuestos mayoritarios encontrados, y de hecho la mayorías de ellos se encuentra solo en el morfotipo ovalado, son los de mayor varianza al comparar los tres morfotipos.

Por otro lado el análisis canónico de discriminantes, realizado teniendo en cuenta las variables seleccionadas en el análisis de componentes principales, permitió observar que no existen diferencias significativas entre los morfotipos ovalado (1), redondo pequeño (2) y redondo grande (3), ya que, el valor calculado para el contraste de las funciones discriminantes 1 y 2, excede el nivel de significancia del ensayo ( $p > 0.05$ ). En el gráfico de grupos combinados (ver anexo A10.2) se observa que el centroide correspondiente a los datos del morfotipo ovalado (1) es el más alejado del origen, y se encuentra en un cuadrante diferente (mostrando relación inversa) que los centroides de grupo de los

morfotipos redondo pequeño y redondo grande; esto posiblemente debido a la mayor cantidad de metabolitos determinados en el morfotipo ovalado (Tabla 5-8).

Adicionalmente, al comparar la presencia / ausencia de los metabolitos volátiles determinados, utilizando la distancia euclidiana al cuadrado con el fin de lograr una comparación de aglomerados jerárquicos (ver Anexo A10.3), no fue posible establecer diferencias bien definidas entre los tres morfotipos. Esto debido a que las distancias entre grupos se ven directamente influenciadas por el método de extracción. El dendograma obtenido muestra que los volátiles extraídos por la técnica de SPME de los morfotipos redondo pequeño y redondo grande, son los que exhiben mayor similaridad, mientras que los del morfotipo ovalado muestran la mayor diferencia con respecto a los demás grupos. Adicionalmente se observó que la extracción realizada sobre el morfotipo redondo pequeño, no exhibió diferencias tan marcadas entre los resultados obtenidos, en comparación a la disimilaridad encontrada para los morfotipos redondo grande y ovalado.

Finalmente, al categorizar cada uno de los metabolitos volátiles determinados según su carácter químico como alifático, aromático, fenólico, éster alifático, éster aromático, aldehído, cetona, ácido carboxílico o alcohol, y hacer una comparación entre los morfotipos bajo una prueba  $\chi^2$  (Anexo A10.4), usando como magnitud la cantidad de metabolitos presentes en cada una de las categorías, nuevamente se encontró que no existen diferencias significativas entre los tres morfotipos ( $p > 0,05$ ); lo cual permitió inferir que los metabolitos volátiles de los morfotipos cultivados de cocona en el Guaviare, no pueden ser considerados un criterio de heterogeneidad.

Entonces, dado que no se encuentran diferencias en los metabolitos volátiles de éstos tres morfotipos, éstos no podrían ser considerados como indicador de la variabilidad organoléptica que puede percibir el consumidor de cocona fresca o de sus subproductos. Sin embargo solo una valoración sensorial de cada uno de los morfotipos podría determinar si la mezcla indiscriminada de éstos en los procesos de transformación agroindustrial es un factor que incida directamente el aroma y sabor del producto, y por tanto en su calidad.

## 6 CONCLUSIONES

Al evaluar el fruto durante su desarrollo y maduración se encontró que los ácidos predominantes independientemente al morfotipo evaluado fueron: cítrico, málico y succínico; el ácido oxálico y el ascórbico se determinaron en menor concentración. El ácido cítrico fue el ácido mayoritario durante todo el desarrollo y maduración de la cocona, y a diferencia de los demás ácidos no es un parámetro que contribuya a la diferenciación química entre morfotipos.

El análisis estadístico permitió observar diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre morfotipos para los ácidos málico y ascórbico y altamente significativas ( $p < 0,001$ ) para los ácidos oxálico y succínico, confirmando el reporte de diversos autores sobre las variaciones en los parámetros de acumulación de los ácidos orgánicos entre especies, variedades e incluso entre cultivares.

Se encontró la presencia de fructosa, sacarosa y glucosa como azúcares mayoritarios, siendo éste último el de cantidad más representativa. El nivel de sacarosa se mostró ascendente durante todo el periodo de desarrollo y maduración, sus niveles son independientes al morfotipo evaluado. Por el contrario los valores de los monosacáridos cuantificados exhiben diferencias significativas entre morfotipos, más específicamente entre el redondo pequeño y el redondo grande; lo cual definitivamente debe tener un efecto directo en el sabor característico de cada uno de los morfotipos.

Se infiere que la fruta tiene un comportamiento no climatérico durante su maduración, cuando ésta se da mientras la fruta está adherida a la planta, debido al comportamiento descendente en la emisión de dióxido de carbono, ascendentes para los niveles del ácido mayoritario y los de azúcares, además de los niveles no detectables de etileno.

La cuantificación de carotenoides totales permitió encontrar valores medios durante el periodo de desarrollo del fruto del morfotipo ovalado comparativamente menores a los valores medios para los morfotipos redondo pequeño y redondo grande; confirmando el hecho que la concentración y la composición de los carotenoides es susceptible a diferentes factores intrínsecos y extrínsecos a la fruta.

Aunque el análisis de varianza mostró que el nivel de  $\beta$  - caroteno, carotenoides totales y el color es indiferente al morfotipo, se encuentran diferencias en el tiempo después de la

apertura floral para los tres casos evaluados. Se logró establecer que el comportamiento descrito por los niveles de carotenoides totales y  $\beta$  - caroteno a través del tiempo de cada morfotipo es característica y que el nivel de carotenoides es máximo en el momento de recolección en los morfotipos redondo pequeño y redondo grande, a diferencia del comportamiento encontrado para el morfotipo ovalado.

Al comparar los niveles de  $\beta$  - caroteno en la fruta y su color en términos de \*H se encuentra que la biogénesis de carotenoides en la fruta al igual que su manifestación en el color de ésta tiene un comportamiento gradual durante el desarrollo y maduración de la fruta. Se observó una relación significativa ( $p < 0.001$ ) e indirecta entre el ángulo Hue y las demás variables evaluadas.

El análisis de componentes principales y las comparaciones múltiples entre muestreos según la prueba de Tukey, permitió determinar que los niveles de glucosa, fructosa y ácido oxálico en la muestra son las variables como mayor incidencia en la diferenciación entre morfotipos.

Se diferenciaron tres etapas de desarrollo y maduración del fruto: la primera entre el día 35 y el 49 DAF, durante la cual el fruto se encuentra en desarrollo, contiene un elevado nivel de clorofilas relacionado con su elevada actividad fotosintética; la segunda, en la cual se da el inicio de la maduración (alrededor del día 56) donde se encuentran los cambios más significativos en el color de la fruta; la tercera entre los días 63 y 70, durante la cual se ubica la madurez fisiológica y sensorial del fruto, y por ende su punto óptimo de recolección.

Establecido el punto adecuado de recolección, a partir del extracto etanólico del epicarpio del morfotipo ovalado de cocona se logró aislar y determinar un compuesto de tipo flavonona y otros compuestos fenólicos (ácidos hidroxicinámicos) haciendo uso de técnicas cromatográficas y espectroscópicas. Posteriormente haciendo uso de técnicas cromatográficas instrumentales se logró reconocer la presencia de los dos ácidos cinámicos y la flavanona determinada en el epicarpio de los tres morfotipos evaluados, además de la ausencia de este en los extractos de pulpa.

Se encontraron diferencias en los metabolitos volátiles mayoritarios obtenidos por diferentes técnicas de extracción. El salicilato de metilo fue determinado como el metabolito volátil más abundante y presente en los tres morfotipos al realizar el análisis a partir del extracto obtenido por SPME. El metabolito más abundante al analizar el extracto de la DES es el ácido pentadecanóico, aunque este no es detectado en el

morfotipo redondo pequeño. Sin embargo, el análisis multivariable de los resultados obtenidos en la determinación de metabolitos volátiles indicó que éste parámetro no puede ser considerado como determinante en la diferenciación de los tres morfotipos evaluados.

A partir de los perfiles cromatográficos de metabolitos fijos y volátiles de cada uno de los morfotipos obtenidos por diferentes técnicas de extracción muestra la heterogeneidad de la composición entre muestras. El extracto de volátiles del morfotipo ovalado exhibe un mayor número de componentes en comparación de los morfotipos pequeño y grande, lo cual, visto junto a los perfiles cromatográficos, hace de éste el de mayor complejidad química en cuanto a metabolitos fijos y volátiles se refiere.



## 7 RECOMENDACIONES

Al encontrar que la concentración de ácido cítrico, glucosa, fructosa, además del ángulo Hue son las variables más representativas como descriptores de los cambios de la fruta durante su desarrollo y maduración, y teniendo en cuenta que en campo las variables químicas son difícilmente cuantificables, se hace evidente la necesidad de generar una tabla de color para el agricultor, con el fin que este logre diferenciar el estado de desarrollo de la fruta, comparando únicamente este parámetro. De esta manera se minimizan las pérdidas de fruto por recolección en un periodo inadecuado, y ya dentro de la planta de transformación de productos agroindustriales, se lograra un producto de mayor calidad debido a la estandarización del proceso de recepción de materia prima.

Al ser los carotenoides compuestos auxiliares en el proceso de fotosíntesis de la planta, se propone para investigaciones posteriores tener aun más rigor en la toma de muestras, teniendo en cuenta no solo la edad del fruto, como se planteó en el presente trabajo de investigación, sino aun más allá, la hora de toma de muestra, esto con el fin de lograr encontrar correlaciones más claras entre morfotipos.

La presencia de metabolitos fenólicos en el epicarpio de los tres morfotipos, podría considerarse un indicador del potencial de la cocona como alimento funcional; sin embargo, precisamente el epicarpio es considerado un material de desecho en la agroindustria, y en el mejor de los casos estos se usan para alimentación animal o como combustible. Se propone entonces evaluar la posibilidad de extraer los compuestos fenólicos presentes en esta parte de la fruta, con el fin de lograr la formulación de un subproducto de tipo suplemento nutracéutico, al cual se le deberá evaluar su potencial antioxidante, y el beneficio a la salud que este le pueda generar al consumidor.

Se considera necesario evaluar la concentración de compuestos fenólicos durante las etapas de crecimiento y desarrollo; esto con el fin de confirmar si el momento de recolección planteado por el presente trabajo coincide con aquel en el cual la concentración de compuestos fenólicos alcanza la máxima concentración. Adicionalmente se hace notar la importancia de evaluar la cantidad de polifenoles totales y la capacidad antioxidante de cada uno de los morfotipos con el fin de hacer un análisis más profundo en cuanto a la posibilidad de extracción de compuestos de éste tipo o la elaboración de complementos nutracéuticos.



## 8 BIBLIOGRAFÍA

1. (a) Roddick, J. G., The importance of the Solanaceae in medicine and drug therapy. In *Solanaceae III. Taxonomy, Chemistry, Evolution*, Hawkes, G. J.; Lester, R. N.; Nee, M.; Estrada, N., Eds. Royal Botanic Gardens Kew and Linnean Society of London: London, 1991; pp 7-23; (b) Knapp, S., Tobacco to tomatoes: a phylogenetic perspective on fruit diversity in the Solanaceae. *Journal of Experimental Botany* **2002**, *53*, 2001-2022.
2. Kim, Y. C.; Che, Q. M.; Gunatilaka, A. L.; Kingston, D. G. I., Bioactive steroidal alkaloids from *Solanum umbelliferum*. *Journal of Natural Products* **1996**, *59*, 283-285.
3. Melgarejo, L. M.; Sánchez, J.; Chaparro, A.; Newmark, F.; Santos-Acevedo, M.; Burbano, C.; Reyes, C., *Aproximación al Estado Actual de la Bioprospección en Colombia*. Cargraphics: Bogotá, 2002; p 334.
4. (a) Silva Filho, D. F.; Andrade, J. S.; Clement, C. R.; Machado, F. M.; Hiroshi, N., Correlações fenotípicas, genéticas e ambientais entre descritores morfológicos e químicos em frutos de cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) da amazônia. *Acta Amazônica* **1999**, *29* (4), 503-511; (b) Silva Filho, D. F.; Clement, C. R.; Noda, H., Variação Fenotípica Em Frutos De Doze Introduções De Cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) Avaliadas Em Manaus, Am, Brazil. *Acta Amazônica* **1989**, *19* (Unico), 9-18; (c) Silva Filho, D. F.; Yuyama, L. K. O.; Aguiar, J. P. L.; Oliveira, M. C.; Martins, L. H. P., Caracterização e avaliação do potencial agrônomico e nutricional de etnovarietades de cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) da Amazônia. *Acta Amazônica* **2005**, *35* (4), 399-406; (d) Stefanello, S.; Schuelter, A. R.; Scapim, C. A.; Finger, F. L.; Pereira, G. M.; Bonato, C. M.; Rocha, A. C. d. S.; Silva, J. M., Amadurecimento de frutos de cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) tratados com Etefôn. *Acta Amazônica* **2010**, *40*, 424-434; (e) Yuyama, L. K. O.; M., M. S. H.; Aguiar, J. P. L.; Filho, D. S.; Yuyama, K.; Fávaro, D. I. T.; Vasconcellos, M. B. A., Quantificação De Macro E Micro Nutrientes Em Algumas Etnovarietades De Cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal). *Acta Amazonica* **2007**, *37* (3), 425-430.
5. Storti, F., Biología Floral De *Solanum sessiliflorum* Dunal. *Acta Amazônica* **1988**, *18* (3-4), 55-65.
6. Natural-History-Museum Solanaceae Source Project. <http://www.nhm.ac.uk/Research-Curation/Research/Projects/Solanaceasource/> (accessed 17 de Noviembre de 2009).
7. Wink, M., Evolution Of Secondary Metabolites From An Ecological And Molecular Phylogenetic Perspective. *Phytochemistry* **2003**, *64*, 3-19.
8. Eich, E., *Solanaceae and Convolvulaceae: secondary metabolites. Biosynthesis, chemotaxonomy, biological and economic significance (a handbook)*. Springer: Berlin, 2008; p 644.
9. El Sayed, K. A.; Hamann, M. T.; Abd El-Rahman, H. A.; Zaghloul, A. M., New Pyrrole Alkaloids from *Solanum sodomaeum*. *Journal of Natural Products* **1998**, *61* (6), 848-850.
10. Cuca, L. E.; Coy, C. A.; Orozco, C. I., Aislamiento y elucidación estructural de algunos metabolitos mayoritarios del extracto etanólico de *Solanum cornifolium*. Sección Geminata. *Revista Colombiana de Química* **2004**, *33* (1), 7-12.

11. Smith, S. W.; Giesbrecht, E.; Thompson, M.; Nelson, L. S.; Hoffman, R. S., Solanaceous Steroidal Glycoalkaloids And Poisoning By *Solanum torvum*, The Normally Edible Susumber Berry. *Toxicon* **2008**, *52*, 667 - 676.
12. Yoshikawa, M.; Nekamura, S.; Osaki, K.; Kumahara, A.; Morikawa, T.; Matsuda, H., Structures Of Steroidal Alkaloid Oligoglycosides, Robeneosides A And B, And Antidiabetogenic Constituents From Brazilian Medicinal Plant *Solanum lycocarpum*. *Journal Of Natural Products* **2007**, *70*, 210-214.
13. Nakamura, S.; Hongo, M.; Sugimoto, S.; Matsuda, H.; Yoshikawa, M., Steroidal saponins and pseudoalkaloid oligoglycoside from Brazilian natural medicine, "fruta do lobo" (fruit of *Solanum lycocarpum*). *Phytochemistry* **2008**, *69* (7), 1565-1572.
14. Zhou, X.; He, X.; Wang, G.; Gao, H.; Zhou, G.; Ye, W.; Yao, X., Steroidal Saponins From *Solanum nigrum*. *Journal Of Natural Products* **2006**, *69* (8), 1158-1163.
15. Putalun, W.; Tanaka, H.; Shoyama, Y., Rapid separation of solasodine glycosides by an immunoaffinity column using anti-solamargine monoclonal antibody. *Cytotechnology* **1999**, *31* (1), 153-158.
16. Lu, Y.; Luo, J.; Huang, X.; Kong, L., Four new steroidal glycosides from *Solanum torvum* and their cytotoxic activities. *Steroids* **2009**, *74* (1), 95-101.
17. Pahlen, A. V. D., Cubiu (*Solanum topiro* Humbl. & Bonpl.), Uma Fruteira Da Amazõnia. *Acta Amazonica* **1977**, *7*, 301-307.
18. Boufleuher, L. M.; Shuelter, A. R.; Luz, C. L.; C.L., D. L.; V.A., A.; Stefanello, S.; A.P., C.; Otoni, W. C., In vitro propagation on *Solanum sessiliflorum* as affected by auxin and cytokinin combinations and concentrations. *Asian Journal of Plant Sciences* **2008**, *7* (7), 639-646.
19. Marx, F.; Andrade, E. H. A.; Guilherme Maia, J., Chemical composition of the fruit of *Solanum sessiliflorum*. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A* **1998**, *206* (5), 364-366.
20. Pardo, M. A., Efecto de *Solanum sessiliflorum* Dunal Sobre el Metabolismo Lipídico y de la Glucosa. *Ciencia e Investigación vii* **2004**, *2*, 43-48.
21. (a) Couturier, G., Algunos insetos do cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal Var. *sessiliflorum*, Solanaceae) na regio de Manaus - AM. *Acta Amazonica*, **1988**, *18* (3-4), 93-103; (b) Melgarejo, T. A.; Fribourg, C. E.; Russo, M., Properties Of A Tombusvirus That Infects Cocona (*Solanum sessiliflorum*) In The Peruvian Jungle. *Journal Of Plant Pathology* **2003**, *85* (2), 105-110.
22. Fajardo-Oliveros, A. L.; Morales, C.; Duque, C., Flavor studies on some Amazonian fruits. 1. Free and bound volatiles of cocona (*Solanum sessiliflorum*) pulp fruit. In *11th International Flavour Conference*, Samos, Greece., 2004.
23. Quijano, C. E.; Pino, J. A., Changes in volatile constituents during the ripening of cocona (*Solanum sessiliflorum* Dunal) fruit. *Revista CENIC Ciencias Químicas* **2006**, *37* (3), 133-136.
24. Salick, J., Cocona (*Solanum sessiliflorum*) production and breeding potential of the peach-tmato. In *New crops for food and industry*, Wickens, N. H.; Day, P., Eds. Chapman and Hall: 1987; pp 258-264.
25. Silva Filho, D. F.; Anunciação Filho, C. J.; Noda, H.; Reis, O. V., Seleção de caracteres correlacionados em cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) empregando análise de trilha. *Acta Amazonica* **1997**, *27* (4), 229-240.

26. Lizcano, L.; Bakkali, F.; Ruiz, B.; Ruiz, J., Antioxidant activity and polyphenol content of aqueous extracts from Colombian Amazonian plants with medicinal use. *Food Chemistry* **2009**, 1566-1570.
27. Chong Pua, E.; David, M. R., Fruit development. In *Plant developmental biology - biotechnological perspectives*, Chong Pua, E.; David, M. R., Eds. Springer: New York, 2010; Vol. 1, pp 301-314.
28. White, P. J., Recent advances in fruit development and ripening: an overview. *Journal of Experimental Botany* **2002**, 53 (377), 1995-2000.
29. Kidmose, U.; Edelenbos, M.; Nørbæk, R.; Christensen, L. P., Colour stability in vegetables. In *Colour in food Improving quality*, MacDougall, D. B., Ed. CRC Press LLC: Boca Raton, 2000; pp 179-218.
30. Yahia, E. M.; Ornelas-Paz, J. d. J., Chemistry, Stability, and Biological Actions of Carotenoids. In *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry, Nutritional Value and Stability*, De la Rosa, L. A.; Alvarez-Parrilla, E.; Gonzalez-Aguilar, G. A., Eds. Wiley-Blackwell: Ames Iowa, 2010; pp 177 - 223.
31. Gómez-Romero, M.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A., Metabolite profiling and quantification of phenolic compounds in methanol extracts of tomato fruit. *Phytochemistry* **2010**, 71 (16), 1848-1864.
32. Lozano, J. E., *Fruit Manufacturing*. Springer Science And Business Media: New York, 2006; p 230.
33. Hernández, M. S.; Martínez, O.; Fernández-Trujillo, J. P., Behavior of arazá (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh) fruit quality traits during growth, development and ripening. *Scientia Horticulturae* **2007**, 111 (3), 220-227.
34. (a) Chen, F.-X.; Liu, X.-H.; Chen, L.-S., Developmental changes in pulp organic acid concentration and activities of acid-metabolising enzymes during the fruit development of two loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) cultivars differing in fruit acidity. *Food Chemistry* **2009**, 114 (2), 657-664; (b) Tang, M.; Bie, Z.-l.; Wu, M.-z.; Yi, H.-p.; Feng, J.-x., Changes in organic acids and acid metabolism enzymes in melon fruit during development. *Scientia Horticulturae* **2010**, 123 (3), 360-365.
35. Glew, R. H.; Ayaz, F. A.; Sanz, C.; VanderJagt, D. J.; Huang, H. S.; Chuang, L. T.; Strnad, M., Changes in sugars, organic acids and amino acids in medlar (*Mespilus germanica* L.) during fruit development and maturation. *Food Chemistry* **2003**, 83 (3), 363-369.
36. Yahia, E. M., The Contribution of Fruit and Vegetable Consumption to Human Health. In *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry, Nutritional Value and Stability*, De la Rosa, L. A.; Alvarez-Parrilla, e.; Gonzalez-Aguilar, g. a., Eds. Wiley-Blackwell: Ames Iowa, 2010; pp 3 - 5.
37. Poiroux-Gonord, F.; Bidet, L. P. R.; Fanciullino, A.-L.; Gutire, H.; Lauri-Lopez, F.; Urban, L., Health benefits of vitamins and secondary metabolites of fruits and vegetables and prospects to increase their concentrations by agronomic approaches. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2010**, 58, 12065 - 12082.
38. Wagner, H.; Bladt, S., *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas*. Second ed.; Springer: 2009; p 384.
39. Spangenberg, B., Derivatization, Detection (Quantification), and Identification of Compounds Online. In *Thin Layer Chromatography in Phytochemistry*, Waksmundzka-

- Hajnos, M.; Sherma, J.; Kowalska, T., Eds. CRC Press Taylor & Francis Group: Boca Raton, 2008; pp 175-192.
40. Tadesse, T.; Hewett, E. W.; Nichols, M. A.; Fisher, K. J., Changes in physicochemical attributes of sweet pepper cv. Domino during fruit growth and development. *Scientia Horticulturae* **2002**, *93* (2), 91-103.
  41. Fadda, A.; Mulas, M., Chemical changes during myrtle (*Myrtus communis* L.) fruit development and ripening. *Scientia Horticulturae* **2010**, *125* (3), 477-485.
  42. Barrera, J. A.; Hernandez, M. S.; Melgarejo, L. M.; Martinez, O.; Fernandez, J. P., Physiological behavior and quality traits during fruit growth and ripening of four Amazonic hot pepper accessions. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2008**, *88*, 847 - 857.
  43. Villavicencio, L. E.; Blankenship, S. M.; Sanders, D. C.; Swallow, W. H., Ethylene and carbon dioxide concentrations in attached fruits of pepper cultivars during ripening. *Scientia Horticulturae* **2001**, *91* (1-2), 17-24.
  44. Mercado-Silva, E.; Benito-Bautista, P.; de los Angeles García-Velasco, M., Fruit development, harvest index and ripening changes of guavas produced in central Mexico. *Postharvest Biology and Technology* **1998**, *13* (2), 143-150.
  45. Chinnici, F.; Spinabelli, U.; Amati, A., Simultaneous determination of organic acids, sugars, and alcohols in musts and wines by an improved ion-exclusion HPLC method. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **2002**, *25* (16), 2551 - 2560.
  46. Usenik, V.; Fabčić, J.; Stampar, F., Sugars, organic acids, phenolic composition and antioxidant activity of sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Food Chemistry* **2008**, *107* (1), 185-192.
  47. Yuan, J.-P.; Chen, F., Degradation of Ascorbic Acid in Aqueous Solution. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1998**, *46* (12), 5078-5082.
  48. Rodríguez-Bernaldo de Quirós, A.; Costa, H. S., Analysis of carotenoids in vegetable and plasma samples: A review. *Journal of Food Composition and Analysis* **2006**, *19* (2-3), 97-111.
  49. Wrolstad, R. E.; Acree, T. E.; Decker, E. A.; Penner, M. H.; Reid, D. S.; Schwartz, S. J.; Shoemaker, C. F.; Smith, D.; Sporns, P., Carotenoids. In *Handbook of food analytical chemistry*, Wrolstad, R. E.; Acree, T. E.; Decker, E. A.; Penner, M. H.; Reid, D. S.; Schwartz, S. J.; Shoemaker, C. F.; Smith, D.; Sporns, P., Eds. Wiley Interscience: Hoboken, New Jersey, 2004; Vol. 2, pp 71-120.
  50. Barreto, G. P. M.; Benassi, M. T.; Mercadante, A. Z., Bioactive compounds from several tropical fruits and correlation by multivariable analysis to free radical scavenger activity. *Journal of Brazilian Chemical Society* **2009**, *20* (10), 1856 - 1861.
  51. Mestre Prates, J. A.; Gonçalves Quaresma, M. A.; Branquinho Bessa, R. J.; Andrade Fontes, C. M. G.; Mateus Alfaia, C. M. P., Simultaneous HPLC quantification of total cholesterol, tocopherols and [beta]-carotene in Barrosã-PDO veal. *Food Chemistry* **2006**, *94* (3), 469-477.
  52. AOAC, AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals. 2002; pp 1-38.
  53. Cseke, L. J.; Setzer, W. N.; Vogler, B.; Kirakosyan, A.; Kaufman, P. B., Traditional, Analytical, and Preparative Separations of Natural Products. In *Natural Products from Plants*, Second edition ed.; Cseke, L. J.; Kirakosyan, A.; Kaufman, P. B.; Warber, S. L.; Duke, J. A.; Brielmann, H. L., Eds. Taylor & Francis: Boca Raton, 2006; pp 263-317.

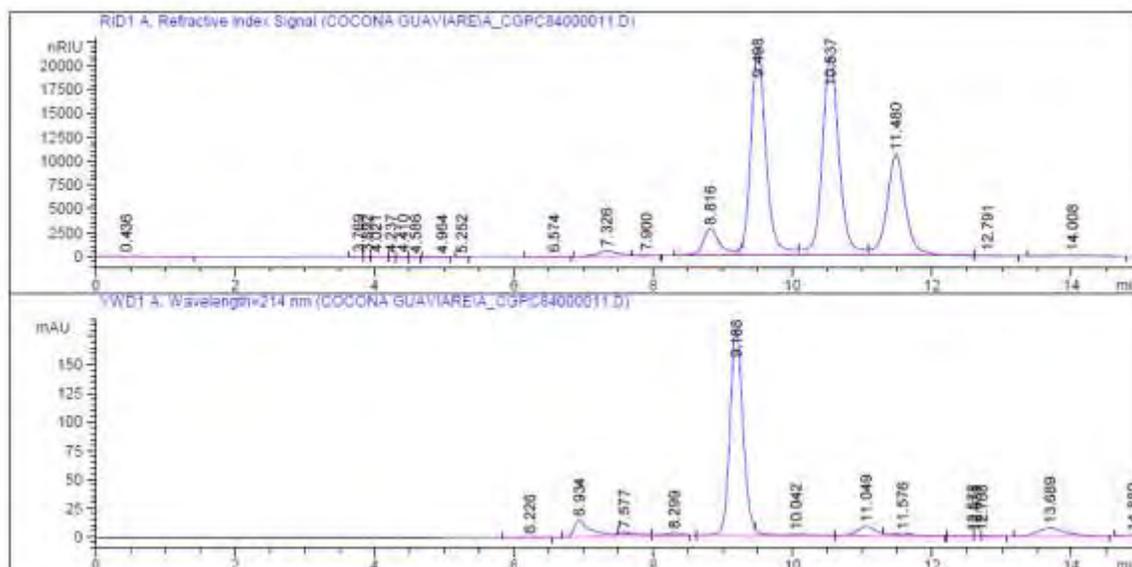
54. Fajardo-Oliveros, A. Estudio de componentes volátiles libres y enlazados de los precursores no volátiles de arazá (*Eugenia spitiata*) y cocona (*Solanum sessiliflorum*). Tesis de grado para obtener el título de Doctor en Ciencias - Química. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 2009; pp 126-153.
55. Barry, C. S., Factors Influencing the Ripening and Quality of Fleshy Fruits. In *Annual Plant Reviews Volume 38: Fruit Development and Seed Dispersal*, Østergaard, L., Ed. Wiley-Blackwell: 2009; Vol. 38, pp 296-325.
56. Portela, S., Fisiología y manejo de postcosecha del tamarillo (*Cyphomandra betacea*). *Avances en Horticultura* **1999**, 4 (1), 33-43.
57. López-Bucio, J.; Nieto-Jacobo, M. F.; Ramirez-Rodríguez, V.; Herrera-Estrella, L., Organic acid metabolism in plants: from adaptive physiology to transgenic varieties for cultivation in extreme soils. *Plant Science* **2000**, 160 (1), 1-13.
58. Saradhuldhat, P.; Paull, R. E., Pineapple organic acid metabolism and accumulation during fruit development. *Scientia Horticulturae* **2007**, 112 (3), 297-303.
59. Mattheis, J. P.; Fellman, J. K., Preharvest factors influencing flavor of fresh fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology* **1999**, 15 (3), 227-232.
60. Sweetman, C.; Deluc, L. G.; Cramer, G. R.; Ford, C. M.; Soole, K. L., Regulation of malate metabolism in grape berry and other developing fruits. *Phytochemistry* **2009**, 70 (11-12), 1329-1344.
61. Fernie, A. R.; Martinoia, E., Malate. Jack of all trades or master of a few? *Phytochemistry* **2009**, 70 (7), 828-832.
62. Bassene, J.-B.; Berti, L.; Costantino, G.; Carcouet, E.; Kamiri, M.; Tomi, F.; Dambier, D.; Ollitrault, P.; Froelicher, Y., Inheritance of Characters Involved in Fruit Quality in a Citrus Interspecific Allotetraploid Somatic Hybrid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2009**, 57 (11), 5065-5070.
63. Sams, C. E., Preharvest factors affecting postharvest texture. *Postharvest Biology and Technology* **1999**, 15 (3), 249-254.
64. Bapat, V. A.; Trivedi, P. K.; Ghosh, A.; Sane, V. A.; Ganapathi, T. R.; Nath, P., Ripening of fleshy fruit: Molecular insight and the role of ethylene. *Biotechnology Advances* **2010**, 28 (1), 94-107.
65. Bramley, P. M., Regulation of carotenoid formation during tomato fruit ripening and development *Journal of Experimental Botany* **2002**, 53 (377), 2107-2113.
66. Bunea, A.; Andjelkovic, M.; Socaciu, C.; Bobis, O.; Neacsu, M.; Verhé, R.; Camp, J. V., Total and individual carotenoids and phenolic acids content in fresh, refrigerated and processed spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Food Chemistry* **2008**, 108 (2), 649-656.
67. Mertz, C.; Gancel, A.-L.; Gunata, Z.; Alter, P.; Dhuique-Mayer, C.; Vaillant, F.; Perez, A. M.; Ruales, J.; Brat, P., Phenolic compounds, carotenoids and antioxidant activity of three tropical fruits. *Journal of Food Composition and Analysis* **2009**, 22 (5), 381-387.
68. Artés, F.; Mínguez, M. I.; Hornero, D., Analysing changes in fruit pigments. In *Colour in food improving quality*, MacDougall, D. B., Ed. CRC Press LLC: Boca Raton, 2000; pp 248-275.
69. MacDougall, D. B., Colour measurement of food. In *Colour in food Improving quality*, MacDougall, D. B., Ed. CRC Press LLC: Boca Raton, 2000; pp 33-60.
70. Lopez-Camelo, A.; Gomez, P. A., Comparison of color indexes for tomato ripening. *Horticultura Brasileira* **2004**, 22 (3), 534-537.

71. Jiménez, A. M.; Sierra, C. A.; Rodríguez-Pulido, F. J.; González-Miret, M. L.; Heredia, F. J.; Osorio, C., Physicochemical characterisation of gulupa (*Passiflora edulis* Sims. fo *edulis*) fruit from Colombia during the ripening. *Food Research International* **2010**, *In Press, Corrected Proof*.
72. Hernández G., M. S.; Barrera G., J. A.; Páez B., D.; Oviedo A., E.; Romero R., H., Aspectos biológicos y conservación poscosecha de la cocona (*Solanum sessiliflorum*) en la Amazonia Occidental Colombiana. In *Aspectos biológicos y conservación de frutas promisorias de la amazonia colombiana*, González, D. V., Ed. Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas, SINCHI. Universidad de la Amazonia: Bogotá, Colombia, 2004; pp 127-150.
73. Hounsome, N.; Hounsome, B.; Tomos, D.; Edwards-Jones, G., Plant Metabolites and Nutritional Quality of Vegetables. *Journal of Food Science* **2008**, *73* (4), R48-R65.
74. Lahlou, M., Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research* **2004**, *18* (6), 435-448.
75. Pérez, A. L.; Del-Olmo, E., *Manual de Determinación Estructural de Compuestos Naturales*. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología CYTED Organización del Convenio Andres Bello: Bogotá, 2007; p 573-590.
76. Loch, O., Compuestos fenólicos. In *Investigación fitoquímica. Métodos de estudio de productos naturales*, Loch, O., Ed. Pontificia Universidad Católica del Perú: Lima (Perú), 1988; pp 98-104.
77. (a) Navarro-González, I.; García-Valverde, V.; García-Alonso, J.; Periago, M. J., Chemical profile and functional and antioxidant properties of tomato dietary fiber. *Food Research International* **2011**, *In Press, Accepted Manuscript*; (b) Benakmoum, A.; Abbeddou, S.; Ammouche, A.; Kefalas, P.; Gerasopoulos, D., Valorisation of low quality edible oil with tomato peel waste. *Food Chemistry* **2008**, *110* (3), 684-690.
78. Sudjaroen, Y.; Haubner, R.; Würtele, G.; Hull, W. E.; Erben, G.; Spiegelhalder, B.; Changbumrung, S.; Bartsch, H.; Owen, R. W., Isolation and structure elucidation of phenolic antioxidants from Tamarind (*Tamarindus indica* L.) seeds and pericarp. *Food and Chemical Toxicology* **2005**, *43* (11), 1673-1682.
79. (a) Angulo-Ortiz, A. A. Estudio fitoquímico de *Zantoxylum setulosum* (Rutaceae). Tesis de grado para obtener el título de Magister en Ciencias Química. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 2001; pp 32-39; (b) Jäger, A. K.; Almqvist, J. P.; Vangsøe, S. A. K.; Stafford, G. I.; Adersen, A.; Van Staden, J., Compounds from *Mentha aquatica* with affinity to the GABA-benzodiazepine receptor. *South African Journal of Botany* **2007**, *73* (4), 518-521.
80. Owen, R. W.; Haubner, R.; Mier, W.; Giacosa, A.; Hull, W. E.; Spiegelhalder, B.; Bartsch, H., Isolation, structure elucidation and antioxidant potential of the major phenolic and flavonoid compounds in brined olive drupes. *Food and Chemical Toxicology* **2003**, *41* (5), 703-717.
81. (a) Szafrank, B. M.; Synak, E. E., Cuticular waxes from potato (*Solanum tuberosum*) leaves. *Phytochemistry* **2006**, *67* (1), 80-90; (b) Peschel, S.; Franke, R.; Schreiber, L.; Knoche, M., Composition of the cuticle of developing sweet cherry fruit. *Phytochemistry* **2007**, *68* (7), 1017-1025.
82. Kosma, D. K.; Parsons, E. P.; Isaacson, T.; Lü, S.; Rose, J. K. C.; Jenks, M. A., Fruit cuticle lipid composition during development in tomato ripening mutants. *Physiologia Plantarum* **2010**, *139* (1), 107-117.
83. Vermerris, W.; Nicholson, R., *Phenolic Compound Biochemistry*. Springer: 2006.

84. Andrés-Lacueva, C.; Medina-Remon, A.; Llorach, R.; Urpi-Sarda, M.; Khan, N.; Chiva-Blanch, G.; Zamora-Ros, R.; Rotches-Ribalta, M.; Lamuela-Raventós, R. M., Phenolic Compounds: Chemistry and Occurrence in Fruits and Vegetables. In *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry, Nutritional Value and Stability*, De la Rosa, L. A.; Alvarez-Parrilla, E.; Gonzalez-Aguilar, G. A., Eds. Wiley-Blackwell: Iowa, 2010; pp 53-80.
85. Dewick, P. M., *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*. Second edition ed.; John Wiley & Sons, Ltd: Singapore, 2001; p 486.
86. Lin, J.-K.; Weng, M.-S., Flavonoids as nutraceuticals. In *The Science of Flavonoids*, Grotebold, E., Ed. Springer: New York, 2006; pp 213-229.
87. Havsteen, B. H., The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics* **2002**, 96 (2-3), 67-202.
88. Self, R., *Extraction of Organic Analytes from Foods*. Royal Society of Chemistry: Cambridge, 2005; p 387.
89. Augusto, F.; Leite e Lopes, A.; Zini, C. A., Sampling and sample preparation for analysis of aromas and fragrances. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2003**, 22 (3), 160-169.
90. Wright, J., Essential Oils. In *Food Flavorings*, Third Edition ed.; Ashurst, P. R., Ed. Aspen Publishers: Kingstone, 1999; pp 1-3.
91. (a) Birti, S.; Ginies, C.; Causse, M.; Renard, C. M. G. C.; Page, D., Changes in Volatiles and Glycosides during Fruit Maturation of Two Contrasted Tomato (*Solanum lycopersicum*) Lines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2009**, 57 (2), 591-598; (b) Farag, M. A.; Paré, P. W., C6-Green leaf volatiles trigger local and systemic VOC emissions in tomato. *Phytochemistry* **2002**, 61, 545-554; (c) Ortiz-Serrano, P.; Gil, J. V., Quantitative Comparison of Free and Bound Volatiles of Two Commercial Tomato Cultivars (*Solanum lycopersicum* L.) during Ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2009**, 58 (2), 1106-1114; (d) Tikunov, Y.; Lommen, A.; de Vos, C. H. R.; Verhoeven, H. A.; Bino, R. J.; Hall, R. D.; Bovy, A. G., A Novel Approach for Nontargeted Data Analysis for Metabolomics. Large-Scale Profiling of Tomato Fruit Volatiles. *Plant Physiol.* **2005**, 139 (3), 1125-1137.
92. (a) Suarez, M.; Duque, C., Change in volatile compounds during lulo (*Solanum vestissimum* D.) fruit maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1992**, 40 (4), 647-649; (b) Suarez, M.; Duque, C., Volatile constituents of lulo (*Solanum vestissimum* D.) fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1991**, 39 (8), 1498-1500.
93. Cevallos-Cevallos, J. M.; Reyes-De-Corcuera, J. I.; Etxeberria, E.; Danyluk, M. D.; Rodrick, G. E., Metabolomic analysis in food science: a review. *Trends in Food Science & Technology* **2009**, 20 (11-12), 557-566.

**ANEXO A1. CUANTIFICACIÓN DE METABOLITOS FIJOS DURANTE DESARROLLO Y MADURACIÓN. EJEMPLO Y CURVAS DE CALIBRACIÓN**

**A1.1 EJEMPLO DE CUANTIFICACIÓN DE LOS ÁCIDOS OXÁLICO, CÍTRICO, MÁLICO Y SUCCÍNICO. CURVAS DE CALIBRACIÓN.**



=====  
 External Standard Report  
 =====

Sorted By : Signal  
 Calib. Data Modified : Wednesday, May 04, 2011 5:00:47 PM  
 Multiplier : 1.0000  
 Dilution : 1.0000  
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

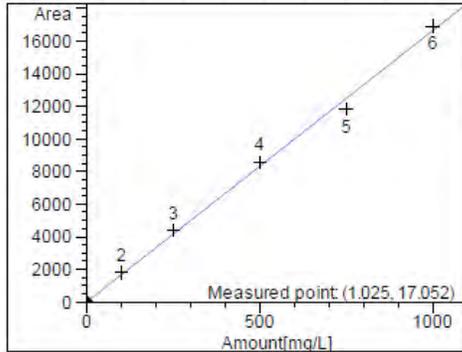
Signal 2: VWD1 A, Wavelength=214 nm

RetTime [min]	Type	Area mAU*s	Amt/Area	Amount [mg/L]	Grp	Name
7.577	VV	17.05249	6.00826e-2	1.02456	A.	Oxálico
9.188	BV R	2336.87378	4.01757e-1	938.85424	A.	Cítrico
11.049	VV R	156.83745	5.24187e-1	82.21214	A.	Málico
13.689	BB	191.44594	8.34684e-1	159.79682	A.	Succínico

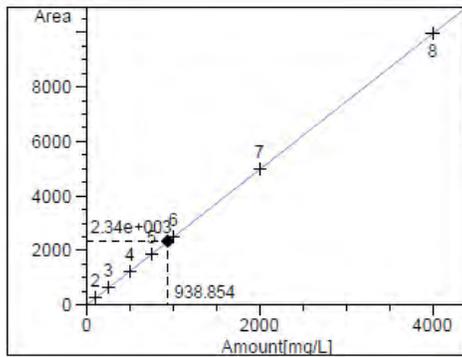
Totals : 1181.88775

=====

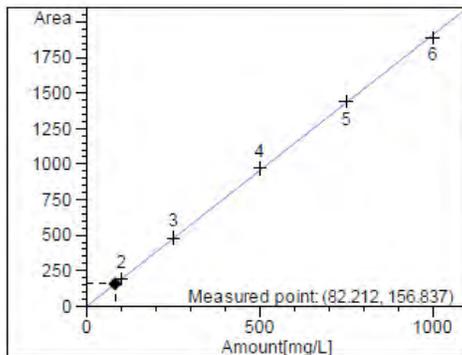
=====  
 Calibration Curves  
 =====



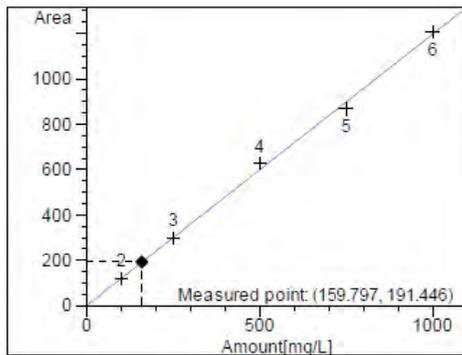
A. Oxálico at exp. RT: 7.441  
 VWD1 A, Wavelength=214 nm  
 Correlation: 0.99939  
 Residual Std. Dev.: 397.74389  
 Formula:  $y = mx$   
 m: 16.64376  
 x: Amount  
 y: Height



A. Citrico at exp. RT: 9.210  
 VWD1 A, Wavelength=214 nm  
 Correlation: 1.00000  
 Residual Std. Dev.: 8.34546  
 Formula:  $y = mx$   
 m: 2.48907  
 x: Amount  
 y: Height

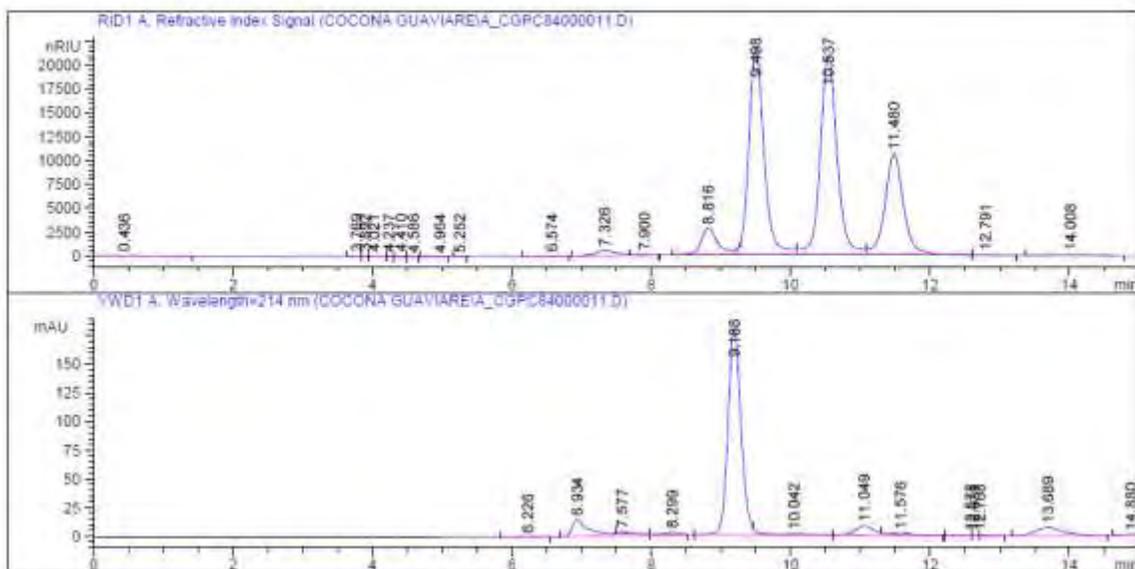


A. Málico at exp. RT: 11.029  
 VWD1 A, Wavelength=214 nm  
 Correlation: 0.99995  
 Residual Std. Dev.: 12.80758  
 Formula:  $y = mx$   
 m: 1.90772  
 x: Amount  
 y: Height



A. Succínico at exp. RT: 13.765  
 VWD1 A, Wavelength=214 nm  
 Correlation: 0.99966  
 Residual Std. Dev.: 21.53535  
 Formula:  $y = mx$   
 m: 1.19806  
 x: Amount  
 y: Height

## A1.2 EJEMPLO DE CUANTIFICACIÓN DE SACAROSA, FRUCTOSA Y GLUCOSA. CURVA DE CALIBRACIÓN



### External Standard Report

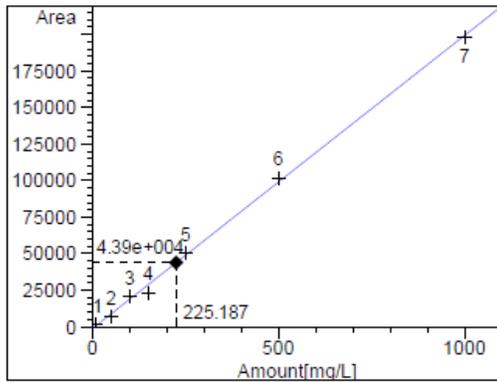
Sorted By : Signal  
 Calib. Data Modified : Wednesday, May 04, 2011 5:03:43 PM  
 Multiplier : 1.0000  
 Dilution : 1.0000  
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: RID1 A, Refractive Index Signal

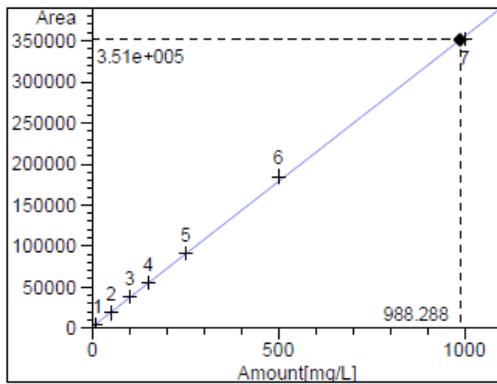
RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [mg/L]	Grp	Name
8.816	BV	4.39394e4	5.12494e-3	225.18652		Sacarosa
10.537	VV	3.51427e5	2.81221e-3	988.28758		Glucosa
11.480	VB	1.96749e5	2.73857e-3	538.81190		Fructosa

Totals : 1752.28600

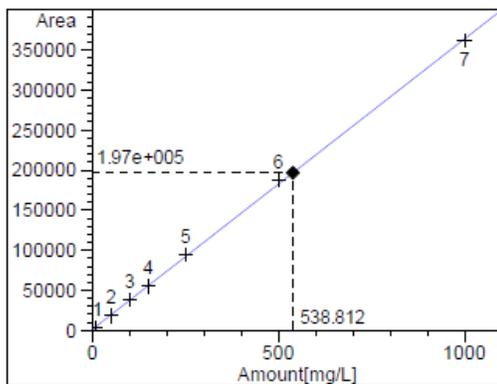
=====  
Calibration Curves  
=====



Sacarosa at exp. RT: 8.829  
RID1 A, Refractive Index Signal  
Correlation: 0.99923  
Residual Std. Dev.: 2899.58942  
Formula:  $y = mx + b$   
m: 200.68636  
b: -1252.50318  
x: Amount  
y: Height



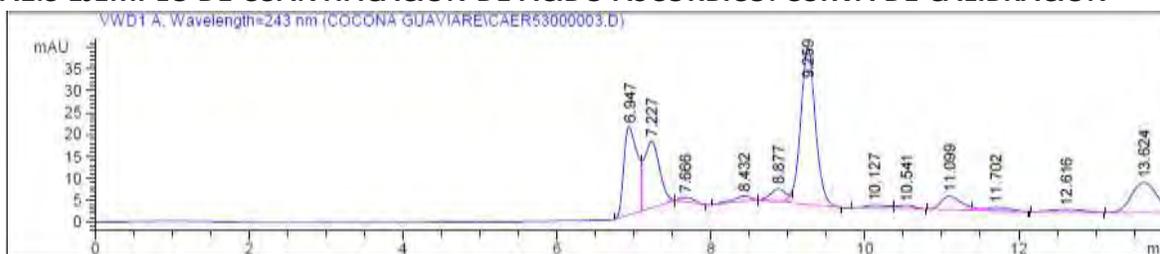
Glucosa at exp. RT: 10.527  
RID1 A, Refractive Index Signal  
Correlation: 0.99972  
Residual Std. Dev.: 3074.16612  
Formula:  $y = mx + b$   
m: 353.54675  
b: 2021.04723  
x: Amount  
y: Height



Fructosa at exp. RT: 11.463  
RID1 A, Refractive Index Signal  
Correlation: 0.99978  
Residual Std. Dev.: 2776.31264  
Formula:  $y = mx + b$   
m: 362.23854  
b: 1570.59309  
x: Amount  
y: Height

=====  
\*\*\* End of Report \*\*\*  
=====

### A1.3 EJEMPLO DE CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO ASCÓRBICO. CURVA DE CALIBRACIÓN

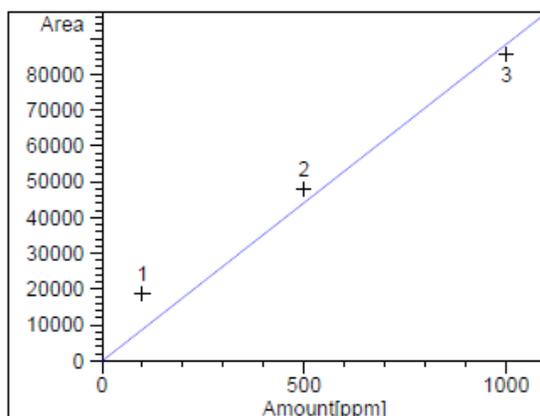


=====  
 External Standard Report  
 =====

Sorted By : Signal  
 Calib. Data Modified : 10/22/2008 10:34:09 AM  
 Multiplier : 1.0000  
 Dilution : 1.0000  
 Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 2: VWD1 A, Wavelength=243 nm

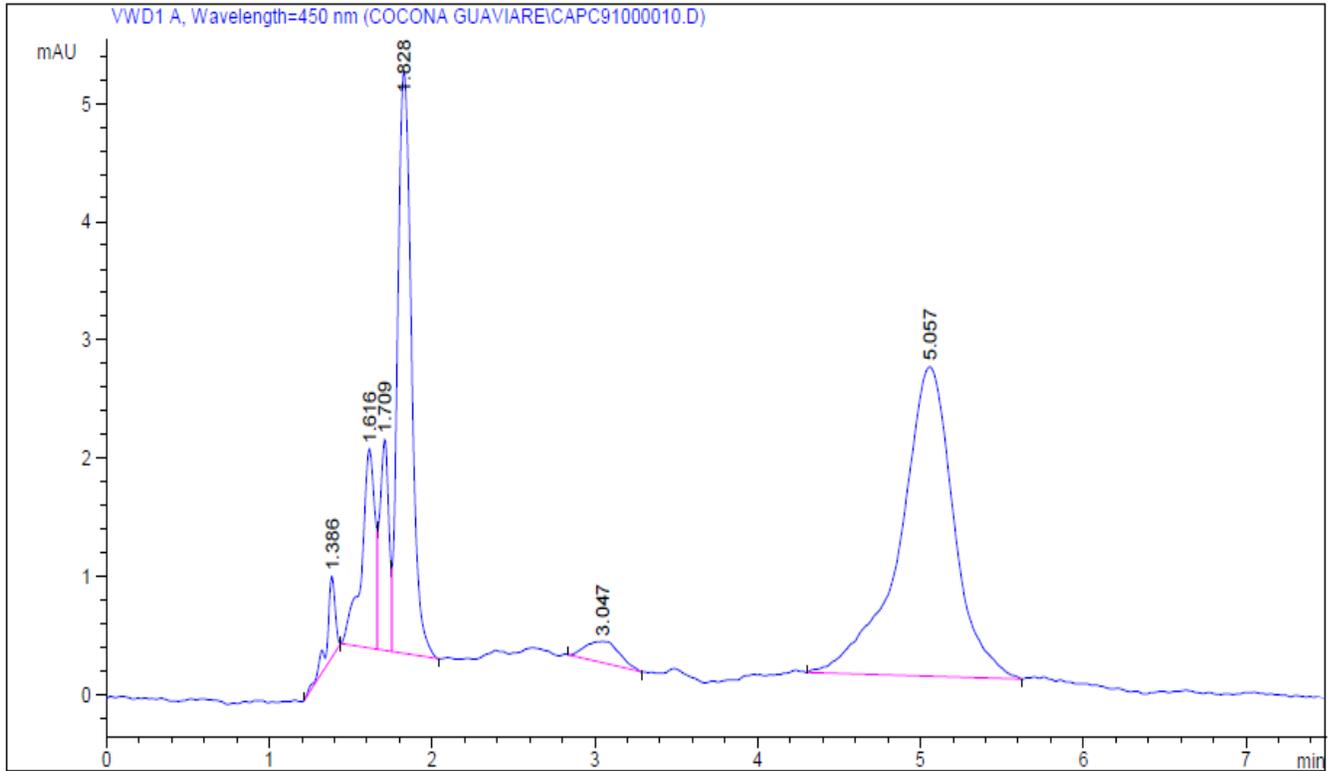
RetTime [min]	Type	Area mAU *s	Amt/Area	Amount [ppm]	Grp	Name
11.406	-	-	-	-	-	Vitamina C-2
Totals :				0.00000		



Vitamina C-2 at exp. RT: 11.406  
 VWD1 A, Wavelength=243 nm  
 Correlation: 0.99387  
 Residual Std. Dev.: 7808.16363  
 Formula:  $y = mx$   
 m: 88.42291  
 x: Amount  
 y: Height

=====  
 \*\*\* End of Report \*\*\*  
 =====

### A1.4 EJEMPLO DE CUANTIFICACIÓN DE $\beta$ CAROTENO. CURVA DE CALIBRACIÓN



=====  
 External Standard Report  
 =====

Sorted By : Signal  
 Calib. Data Modified : Wednesday, November 18, 2009 4:06:21 PM  
 Multiplier : 1.0000  
 Dilution : 1.0000  
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

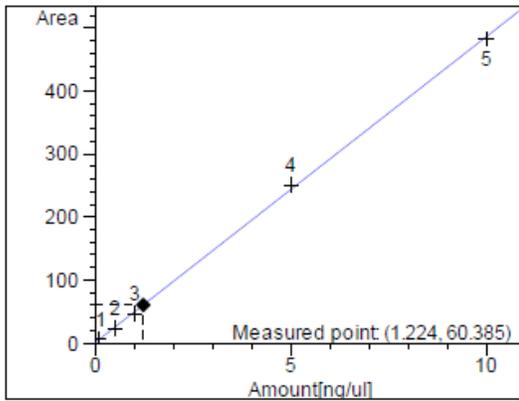
Signal 1: VWD1 A, Wavelength=450 nm

RetTime [min]	Type	Area mAU *s	Amt/Area	Amount [ng/ul]	Grp	Name
5.057	BB	60.38504	2.02634e-2	1.22360		Beta Caroteno

Totals : 1.22360

=====

=====  
Calibration Curves  
=====



Beta Caroteno at exp. RT: 5.061  
VWD1 A, Wavelength=450 nm  
Correlation: 0.99980  
Residual Std. Dev.: 4.34319  
Formula:  $y = mx + b$   
m: 48.52620  
b: 1.00821  
x: Amount  
y: Height

=====  
\*\*\* End of Report \*\*\*  
=====

## ANEXO A2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LAS VARIABLES CUANTIFICADAS DURANTE DESARROLLO Y MADURACIÓN DEL FRUTO

### A2.1 ANÁLISIS DE VARIANZA DE LOS DATOS OBTENIDOS DURANTE DESARROLLO Y MADURACIÓN DE LOS TRES MORFOTIPOS

Tabla A2.1.1 Contrastes Multivariados<sup>c</sup>

Efecto		Valor	F	Gl de la hipótesis	Gl del error	Sig.
Intersección	Traza de Pillai	1,00	6700,214 <sup>a</sup>	16,00	49,00	0,00
	Lambda de Wilks	0,00	6700,214 <sup>a</sup>	16,00	49,00	0,00
	Traza de Hotelling	2187,83	6700,214 <sup>a</sup>	16,00	49,00	0,00
	Raíz mayor de Roy	2187,83	6700,214 <sup>a</sup>	16,00	49,00	0,00
MOR	Traza de Pillai	1,49	9,19	32,00	100,00	0,00
	Lambda de Wilks	0,05	11,058 <sup>a</sup>	32,00	98,00	0,00
	Traza de Hotelling	8,79	13,18	32,00	96,00	0,00
	Raíz mayor de Roy	7,20	22,486 <sup>d</sup>	16,00	50,00	0,00
DÍA	Traza de Pillai	3,53	7,92	80,00	265,00	0,00
	Lambda de Wilks	0,00	14,91	80,00	240,21	0,00
	Traza de Hotelling	53,89	31,93	80,00	237,00	0,00
	Raíz mayor de Roy	39,64	131,308 <sup>d</sup>	16,00	53,00	0,00
MOR * DÍA	Traza de Pillai	4,32	4,12	128,00	448,00	0,00
	Lambda de Wilks	0,00	5,35	128,00	366,06	0,00
	Traza de Hotelling	17,43	6,43	128,00	378,00	0,00
	Raíz mayor de Roy	7,62	26,671 <sup>d</sup>	16,00	56,00	0,00

a. Estadístico exacto

b. El estadístico es un límite superior para la F el cual ofrece un límite inferior para el nivel de significación.

c. Diseño: Intersección + MOR + DÍA + MOR \* DÍA

**Tabla A2.1.2.Pruebas de los efectos inter-sujetos**

Origen	Variable dependiente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	ASC	1,763 <sup>a</sup>	15	0,12	7,19	0
	OXA	1031,334 <sup>d</sup>	15	68,76	7,162	0
	CIT	16437885,844 <sup>c</sup>	15	1095859,06	7,532	0
	MAL	166371,346 <sup>d</sup>	15	11091,42	4,925	0
	SUC	2372507,596 <sup>e</sup>	15	158167,17	10,779	0
	CAR	28894,687 <sup>i</sup>	15	1926,31	7,692	0
	SAC	14762112,733 <sup>g</sup>	15	984140,85	26,183	0
	FRU	2491728,288 <sup>n</sup>	15	166115,22	3,321	0
	GLU	10187038,502 <sup>i</sup>	15	679135,9	3,964	0
	BCAR	362,376 <sup>j</sup>	15	24,16	5,35	0
	L	13126,431 <sup>k</sup>	15	875,1	44,171	0
	C	33114,559 <sup>i</sup>	15	2207,64	45,921	0
	H	45721,900 <sup>m</sup>	15	3048,13	100,419	0
	SST	54,736 <sup>n</sup>	15	3,65	20,733	0
	ATT	8,326 <sup>v</sup>	15	0,56	13,487	0
pH	4,413 <sup>p</sup>	15	0,29	14,078	0	
Intersección	ASC	8,44	1	8,44	515,959	0
	OXA	3448,1	1	3448,1	359,175	0
	CIT	173800000	1	173800000	1194,434	0
	MAL	3456725,12	1	3456725,12	1534,786	0
	SUC	16900389,8	1	16900389,8	1151,78	0
	CAR	128000,58	1	128000,58	511,128	0
	SAC	20529868,7	1	20529868,7	546,188	0
	FRU	76956752	1	76956752	1538,534	0
	GLU	241900000	1	241900000	1412,238	0
	BCAR	311,08	1	311,08	68,891	0
	L	209086,13	1	209086,13	10553,842	0
	C	190257,58	1	190257,58	3957,57	0
	H	569560,69	1	569560,69	18763,798	0
	SST	2250,75	1	2250,75	12788,344	0
	ATT	122,69	1	122,69	2980,992	0
pH	1018,68	1	1018,68	48740,005	0	

Origen	Variable dependiente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
MOR	ASC	0,2	2	0,1	6,068	0,004
	OXA	377,71	2	188,85	19,672	0
	CIT	494941,16	2	247470,58	1,701	0,191
	MAL	27986,86	2	13993,43	6,213	0,003
	SUC	135256,48	2	67628,24	4,609	0,013
	CAR	7470,92	2	3735,46	14,916	0
	SAC	191388,12	2	95694,06	2,546	0,086
	FRU	580762,57	2	290381,29	5,805	0,005
	GLU	2757730,73	2	1378865,37	8,049	0,001
	BCAR	222,45	2	111,23	24,631	0
	L	131,1	2	65,55	3,309	0,043
	C	176,61	2	88,31	1,837	0,168
	H	1209,29	2	604,65	19,92	0
	SST	6,65	2	3,32	18,883	0
	ATT	0,11	2	0,05	1,306	0,278
pH	1,89	2	0,94	45,147	0	
DIA	ASC	0,97	5	0,19	11,81	0
	OXA	294,98	5	59	6,145	0
	CIT	12826724,9	5	2565344,97	17,633	0
	MAL	118207,54	5	23641,51	10,497	0
	SUC	1249108,39	5	249821,68	17,026	0
	CAR	10047,01	5	2009,4	8,024	0
	SAC	12561032,2	5	2512206,45	66,836	0
	FRU	397314,47	5	79462,89	1,589	0,176
	GLU	1984597,52	5	396919,5	2,317	0,054
	BCAR	61,79	5	12,36	2,737	0,027
	L	11092,8	5	2218,56	111,984	0
	C	29825,94	5	5965,19	124,083	0
	H	41998,38	5	8399,68	276,722	0
	SST	23,09	5	4,62	26,24	0
	ATT	5,65	5	1,13	27,435	0
pH	2,69	5	0,54	25,764	0	
MOR * DIA	ASC	0,54	8	0,07	4,152	0
	OXA	233,89	8	29,24	3,045	0,006
	CIT	3133196,48	8	391649,56	2,692	0,013
	MAL	29376,7	8	3672,09	1,63	0,134
	SUC	1024821,24	8	128102,66	8,73	0

Origen	Variable dependiente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
	CAR	10316,53	8	1289,57	5,149	0
	SAC	1767327,62	8	220915,95	5,877	0
	FRU	1440721,99	8	180090,25	3,6	0,002
	GLU	5323017,31	8	665377,16	3,884	0,001
	BCAR	78,76	8	9,85	2,18	0,041
	L	1942,81	8	242,85	12,258	0
	C	3060,15	8	382,52	7,957	0
	H	1497,91	8	187,24	6,168	0
	SST	19,8	8	2,47	14,059	0
	ATT	2,48	8	0,31	7,53	0
	pH	0,3	8	0,04	1,804	0,093
Error	ASC	1,05	64	0,02		
	OXA	614,4	64	9,6		
	CIT	9311047,74	64	145485,12		
	MAL	144144,18	64	2252,25		
	SUC	939089,64	64	14673,28		
	CAR	16027,38	64	250,43		
	SAC	2405605,32	64	37587,58		
	FRU	3201249,08	64	50019,52		
	GLU	10963543,8	64	171305,37		
	BCAR	289	64	4,52		
	L	1267,93	64	19,81		
	C	3076,76	64	48,07		
	H	1942,67	64	30,35		
	SST	11,26	64	0,18		
	ATT	2,63	64	0,04		
	pH	1,34	64	0,02		
Total	ASC	11,76	80			
	OXA	5318,73	80			
	CIT	22160000	80			
	MAL	3839845,07	80			
	SUC	20643218,5	80			
	CAR	176959,47	80			
	SAC	40375190,2	80			
	FRU	88491762,7	80			
	GLU	28210000	80			

Origen	Variable dependiente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
	BCAR	1004,08	80			
	L	242172,19	80			
	C	249408,76	80			
	H	634603,47	80			
	SST	2495,91	80			
	ATT	148,32	80			
	pH	1068,36	80			
Total corregida	ASC	2,81	79			
	OXA	1645,74	79			
	CIT	25748933,6	79			
	MAL	310515,52	79			
	SUC	3311597,24	79			
	CAR	44922,06	79			
	SAC	17167718,1	79			
	FRU	5692977,37	79			
	GLU	21150582,3	79			
	BCAR	651,38	79			
	L	14394,36	79			
	C	36191,32	79			
	H	47664,57	79			
	SST	66	79			
	ATT	10,96	79			
	pH	5,75	79			

- a. R cuadrado = ,628 (R cuadrado corregida = ,540)
- b. R cuadrado = ,627 (R cuadrado corregida = ,539)
- c. R cuadrado = ,638 (R cuadrado corregida = ,554)
- d. R cuadrado = ,536 (R cuadrado corregida = ,427)
- e. R cuadrado = ,716 (R cuadrado corregida = ,650)
- f. R cuadrado = ,643 (R cuadrado corregida = ,560)
- g. R cuadrado = ,860 (R cuadrado corregida = ,827)
- h. R cuadrado = ,438 (R cuadrado corregida = ,306)
- i. R cuadrado = ,482 (R cuadrado corregida = ,360)
- j. R cuadrado = ,556 (R cuadrado corregida = ,452)
- k. R cuadrado = ,912 (R cuadrado corregida = ,891)
- l. R cuadrado = ,915 (R cuadrado corregida = ,895)
- m. R cuadrado = ,959 (R cuadrado corregida = ,950)

n. R cuadrado = ,829 (R cuadrado corregida = ,789)

o. R cuadrado = ,760 (R cuadrado corregida = ,703)

p. R cuadrado = ,767 (R cuadrado corregida = ,713)

**Tabla A2.1.3 Comparaciones múltiples / DHS de Tukey por Morfotipo**

Variable dependiente	(I)MOR	(J)MOR	Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig.	Intervalo de confianza 95%	
						Límite inferior	Límite superior
ASC	1,00	2,00	-0,08	0,03	0,08	-0,16	0,01
		3,00	-,13573	0,03	0,00	-0,22	-0,05
	2,00	1,00	0,08	0,03	0,08	-0,01	0,16
		3,00	-0,06	0,04	0,24	-0,15	0,03
	3,00	1,00	,13573	0,03	0,00	0,05	0,22
		2,00	0,06	0,04	0,24	-0,03	0,15
OXA	1,00	2,00	-5,92318	0,84	0,00	-7,94	-3,91
		3,00	-3,87509	0,84	0,00	-5,89	-1,86
	2,00	1,00	5,92318	0,84	0,00	3,91	7,94
		3,00	2,05	0,88	0,06	-0,05	4,15
	3,00	1,00	3,87509	0,84	0,00	1,86	5,89
		2,00	-2,05	0,88	0,06	-4,15	0,05
CIT	1,00	2,00	18,88	103,29	0,98	-228,96	266,71
		3,00	-157,33	103,29	0,29	-405,17	90,51
	2,00	1,00	-18,88	103,29	0,98	-266,71	228,96
		3,00	-176,21	107,88	0,24	-435,06	82,65
	3,00	1,00	157,33	103,29	0,29	-90,51	405,17
		2,00	176,21	107,88	0,24	-82,65	435,06
MAL	1,00	2,00	-37,03462	12,85	0,02	-67,87	-6,20
		3,00	-19,04	12,85	0,31	-49,88	11,79
	2,00	1,00	37,03462	12,85	0,02	6,20	67,87
		3,00	17,99	13,42	0,38	-14,22	50,20
	3,00	1,00	19,04	12,85	0,31	-11,79	49,88
		2,00	-17,99	13,42	0,38	-50,20	14,22
SUC	1,00	2,00	-44,47	32,80	0,37	-123,18	34,24
		3,00	-84,76187	32,80	0,03	-163,47	-6,05
	2,00	1,00	44,47	32,80	0,37	-34,24	123,18
		3,00	-40,29	34,26	0,47	-122,50	41,91
	3,00	1,00	84,76187	32,80	0,03	6,05	163,47
		2,00	40,29	34,26	0,47	-41,91	122,50
CAR	1,00	2,00	-21,73028	4,29	0,00	-32,01	-11,45

Variable dependiente	(I)MOR	(J)MOR	Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig.	Intervalo de confianza 95%	
						Límite inferior	Límite superior
		3,00	-20,90987	4,29	0,00	-31,19	-10,63
	2,00	1,00	21,73028	4,29	0,00	11,45	32,01
		3,00	0,82	4,48	0,98	-9,92	11,56
	3,00	1,00	20,90987	4,29	0,00	10,63	31,19
		2,00	-0,82	4,48	0,98	-11,56	9,92
SAC	1,00	2,00	-178,34863	52,50	0,00	-304,32	-52,37
		3,00	-81,56	52,50	0,27	-207,54	44,41
	2,00	1,00	178,34863	52,50	0,00	52,37	304,32
		3,00	96,78	54,84	0,19	-34,79	228,36
	3,00	1,00	81,56	52,50	0,27	-44,41	207,54
		2,00	-96,78	54,84	0,19	-228,36	34,79
FRU	1,00	2,00	26,93	60,56	0,90	-118,39	172,25
		3,00	-181,29847	60,56	0,01	-326,62	-35,98
	2,00	1,00	-26,93	60,56	0,90	-172,25	118,39
		3,00	-208,22894	63,26	0,01	-360,01	-56,45
	3,00	1,00	181,29847	60,56	0,01	35,98	326,62
		2,00	208,22894	63,26	0,01	56,45	360,01
GLU	1,00	2,00	147,89	112,08	0,39	-121,04	416,82
		3,00	-320,30616	112,08	0,02	-589,24	-51,37
	2,00	1,00	-147,89	112,08	0,39	-416,82	121,04
		3,00	-468,19430	117,07	0,00	-749,09	-187,30
	3,00	1,00	320,30616	112,08	0,02	51,37	589,24
		2,00	468,19430	117,07	0,00	187,30	749,09
BCAR	1,00	2,00	2,0887	0,58	0,00	0,71	3,47
		3,00	-2,1237	0,58	0,00	-3,51	-0,74
	2,00	1,00	-2,0887	0,58	0,00	-3,47	-0,71
		3,00	-4,2125	0,60	0,00	-5,66	-2,77
	3,00	1,00	2,1237	0,58	0,00	0,74	3,51
		2,00	4,2125	0,60	0,00	2,77	5,66
L	1,00	2,00	0,75	1,21	0,81	-2,14	3,65
		3,00	-1,86	1,21	0,28	-4,75	1,04
	2,00	1,00	-0,75	1,21	0,81	-3,65	2,14
		3,00	-2,61	1,26	0,10	-5,63	0,41
	3,00	1,00	1,86	1,21	0,28	-1,04	4,75
		2,00	2,61	1,26	0,10	-0,41	5,63
C	1,00	2,00	-1,03	1,88	0,85	-5,53	3,48
		3,00	-4,00	1,88	0,09	-8,50	0,51

Variable dependiente	(I)MOR	(J)MOR	Diferencia de medias (I-J)	Error t <sub>p</sub> .	Sig.	Intervalo de confianza 95%	
						Límite inferior	Límite superior
	2,00	1,00	1,03	1,88	0,85	-3,48	5,53
		3,00	-2,97	1,96	0,29	-7,68	1,74
	3,00	1,00	4,00	1,88	0,09	-0,51	8,50
		2,00	2,97	1,96	0,29	-1,74	7,68
H	1,00	2,00	12,5592	1,49	0,00	8,98	16,14
		3,00	3,6240	1,49	0,05	0,04	7,20
	2,00	1,00	-12,5592	1,49	0,00	-16,14	-8,98
		3,00	-8,9352	1,56	0,00	-12,67	-5,20
	3,00	1,00	-3,6240	1,49	0,05	-7,20	-0,04
		2,00	8,9352	1,56	0,00	5,20	12,67
SST	1,00	2,00	-,471	0,11	0,00	-0,74	-0,20
		3,00	-,931	0,11	0,00	-1,20	-0,66
	2,00	1,00	,471	0,11	0,00	0,20	0,74
		3,00	-,460	0,12	0,00	-0,75	-0,18
	3,00	1,00	,931	0,11	0,00	0,66	1,20
		2,00	-,460	0,12	0,00	0,18	0,75
ATT	1,00	2,00	-0,04	0,05	0,78	-0,17	0,10
		3,00	-0,12	0,05	0,08	-0,25	0,01
	2,00	1,00	0,04	0,05	0,78	-0,10	0,17
		3,00	-0,08	0,06	0,32	-0,22	0,05
	3,00	1,00	0,12	0,05	0,08	-0,01	0,25
		2,00	0,08	0,06	0,32	-0,05	0,22
pH	1,00	2,00	-,29441	0,04	0,00	-0,39	-0,20
		3,00	-0,02	0,04	0,91	-0,11	0,08
	2,00	1,00	,29441	0,04	0,00	0,20	0,39
		3,00	,27812	0,04	0,00	0,18	0,38
	3,00	1,00	0,02	0,04	0,91	-0,08	0,11
		2,00	-,27812	0,04	0,00	-0,38	-0,18

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = ,021.

**Tabla A2.1.3 Comparaciones múltiples / DHS de Tukey por tiempo (días DAF)**

Variable dependiente	(I)DÍA	(J)DÍA	Diferencia de medias (I-J)	Error t <sub>p</sub> .	Sig.	Intervalo de confianza 95%	
						Límite inferior	Límite superior
ASC	35,00	42,00	0,01	0,07	1,00	-0,18	0,21

Variable dependiente	(I)DÍA	(J)DÍA	Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig.	Intervalo de confianza 95%	
						Límite inferior	Límite superior
		49,00	-0,01	0,07	1,00	-0,20	0,19
		56,00	-,20136	0,07	0,04	-0,40	-0,01
		63,00	-0,14	0,07	0,28	-0,34	0,05
		70,00	-,27977	0,07	0,00	-0,47	-0,09
	42,00	35,00	-0,01	0,07	1,00	-0,21	0,18
		49,00	-0,02	0,05	1,00	-0,16	0,12
		56,00	-,21507	0,05	0,00	-0,35	-0,08
		63,00	-,15515	0,05	0,02	-0,29	-0,02
		70,00	-,29349	0,05	0,00	-0,43	-0,16
	49,00	35,00	0,01	0,07	1,00	-0,19	0,20
		42,00	0,02	0,05	1,00	-0,12	0,16
		56,00	-,19517	0,05	0,00	-0,33	-0,06
		63,00	-0,14	0,05	0,06	-0,27	0,00
		70,00	-,27359	0,05	0,00	-0,41	-0,14
	56,00	35,00	,20136	0,07	0,04	0,01	0,40
		42,00	,21507	0,05	0,00	0,08	0,35
		49,00	,19517	0,05	0,00	0,06	0,33
		63,00	0,06	0,05	0,79	-0,08	0,20
		70,00	-0,08	0,05	0,55	-0,22	0,06
	63,00	35,00	0,14	0,07	0,28	-0,05	0,34
		42,00	,15515	0,05	0,02	0,02	0,29
		49,00	0,14	0,05	0,06	0,00	0,27
		56,00	-0,06	0,05	0,79	-0,20	0,08
		70,00	-,13834	0,05	0,05	-0,28	0,00
	70,00	35,00	,27977	0,07	0,00	0,09	0,47
		42,00	,29349	0,05	0,00	0,16	0,43
		49,00	,27359	0,05	0,00	0,14	0,41
		56,00	0,08	0,05	0,55	-0,06	0,22
		63,00	,13834	0,05	0,05	0,00	0,28
OXA	35,00	42,00	-7,39934	1,60	0,00	-12,10	-2,70
		49,00	-7,28580	1,60	0,00	-11,99	-2,59
		56,00	-7,34172	1,60	0,00	-12,04	-2,64
		63,00	-3,20	1,60	0,35	-7,90	1,50
		70,00	-3,94	1,60	0,15	-8,64	0,76
	42,00	35,00	7,39934	1,60	0,00	2,70	12,10
		49,00	0,11	1,13	1,00	-3,21	3,44

Variable dependiente	(I)DÍA	(J)DÍA	Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig.	Intervalo de confianza 95%	
						Límite inferior	Límite superior
		56,00	0,06	1,13	1,00	-3,27	3,38
		63,00	4,19639	1,13	0,01	0,87	7,52
		70,00	3,46113	1,13	0,04	0,14	6,78
	49,00	35,00	7,28580	1,60	0,00	2,59	11,99
		42,00	-0,11	1,13	1,00	-3,44	3,21
		56,00	-0,06	1,13	1,00	-3,38	3,27
		63,00	4,08284	1,13	0,01	0,76	7,41
		70,00	3,34758	1,13	0,05	0,02	6,67
	56,00	35,00	7,34172	1,60	0,00	2,64	12,04
		42,00	-0,06	1,13	1,00	-3,38	3,27
		49,00	0,06	1,13	1,00	-3,27	3,38
		63,00	4,13877	1,13	0,01	0,82	7,46
		70,00	3,40351	1,13	0,04	0,08	6,73
	63,00	35,00	3,20	1,60	0,35	-1,50	7,90
		42,00	-4,19639	1,13	0,01	-7,52	-0,87
		49,00	-4,08284	1,13	0,01	-7,41	-0,76
		56,00	-4,13877	1,13	0,01	-7,46	-0,82
		70,00	-0,74	1,13	0,99	-4,06	2,59
	70,00	35,00	3,94	1,60	0,15	-0,76	8,64
		42,00	-3,46113	1,13	0,04	-6,78	-0,14
		49,00	-3,34758	1,13	0,05	-6,67	-0,02
		56,00	-3,40351	1,13	0,04	-6,73	-0,08
		63,00	0,74	1,13	0,99	-2,59	4,06
CIT	35,00	42,00	-318,87	196,97	0,59	-897,53	259,78
		49,00	-535,41	196,97	0,09	-1114,07	43,24
		56,00	-978,76972	196,97	0,00	-1557,42	-400,12
		63,00	-1141,51807	196,97	0,00	-1720,17	-562,87
		70,00	-1237,18851	196,97	0,00	-1815,84	-658,54
	42,00	35,00	318,87	196,97	0,59	-259,78	897,53
		49,00	-216,54	139,28	0,63	-625,71	192,63
		56,00	-659,89582	139,28	0,00	-1069,06	-250,73
		63,00	-822,64417	139,28	0,00	-1231,81	-413,48
		70,00	-918,31460	139,28	0,00	-1327,48	-509,15
	49,00	35,00	535,41	196,97	0,09	-43,24	1114,07
		42,00	216,54	139,28	0,63	-192,63	625,71
		56,00	-443,35570	139,28	0,03	-852,52	-34,19
		63,00	-606,10405	139,28	0,00	-1015,27	-196,94

Variable dependiente	(I)DÍA	(J)DÍA	Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig.	Intervalo de confianza 95%	
						Límite inferior	Límite superior
		70,00	-701,77449	139,28	0,00	-1110,94	-292,61
	56,00	35,00	978,76972	196,97	0,00	400,12	1557,42
		42,00	659,89582	139,28	0,00	250,73	1069,06
		49,00	443,35570	139,28	0,03	34,19	852,52
		63,00	-162,75	139,28	0,85	-571,92	246,42
		70,00	-258,42	139,28	0,44	-667,59	150,75
	63,00	35,00	1141,51807	196,97	0,00	562,87	1720,17
		42,00	822,64417	139,28	0,00	413,48	1231,81
		49,00	606,10405	139,28	0,00	196,94	1015,27
		56,00	162,75	139,28	0,85	-246,42	571,92
		70,00	-95,67	139,28	0,98	-504,84	313,50
	70,00	35,00	1237,18851	196,97	0,00	658,54	1815,84
		42,00	918,31460	139,28	0,00	509,15	1327,48
		49,00	701,77449	139,28	0,00	292,61	1110,94
		56,00	258,42	139,28	0,44	-150,75	667,59
		63,00	95,67	139,28	0,98	-313,50	504,84
MAL	35,00	42,00	-23,36	24,51	0,93	-95,36	48,64
		49,00	22,85	24,51	0,94	-49,15	94,84
		56,00	20,68	24,51	0,96	-51,31	92,68
		63,00	72,67723	24,51	0,05	0,68	144,67
		70,00	76,66149	24,51	0,03	4,66	148,66
	42,00	35,00	23,36	24,51	0,93	-48,64	95,36
		49,00	46,21	17,33	0,10	-4,70	97,12
		56,00	44,04	17,33	0,13	-6,87	94,95
		63,00	96,03906	17,33	0,00	45,13	146,95
		70,00	100,02332	17,33	0,00	49,11	150,93
	49,00	35,00	-22,85	24,51	0,94	-94,84	49,15
		42,00	-46,21	17,33	0,10	-97,12	4,70
		56,00	-2,16	17,33	1,00	-53,07	48,75
		63,00	49,83	17,33	0,06	-1,08	100,74
		70,00	53,81640	17,33	0,03	2,91	104,73
	56,00	35,00	-20,68	24,51	0,96	-92,68	51,31
		42,00	-44,04	17,33	0,13	-94,95	6,87
		49,00	2,16	17,33	1,00	-48,75	53,07
		63,00	51,99426	17,33	0,04	1,08	102,90
		70,00	55,97852	17,33	0,02	5,07	106,89
	63,00	35,00	-72,67723	24,51	0,05	-144,67	-0,68

Variable dependiente	(I)DÍA	(J)DÍA	Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig.	Intervalo de confianza 95%	
						Límite inferior	Límite superior
		42,00	-96,03906	17,33	0,00	-146,95	-45,13
		49,00	-49,83	17,33	0,06	-100,74	1,08
		56,00	-51,99426	17,33	0,04	-102,90	-1,08
		70,00	3,98	17,33	1,00	-46,93	54,89
	70,00	35,00	-76,66149	24,51	0,03	-148,66	-4,66
		42,00	-100,02332	17,33	0,00	-150,93	-49,11
		49,00	-53,81640	17,33	0,03	-104,73	-2,91
		56,00	-55,97852	17,33	0,02	-106,89	-5,07
		63,00	-3,98	17,33	1,00	-54,89	46,93
SUC	35,00	42,00	-191,55722	62,55	0,04	-375,33	-7,79
		49,00	112,39	62,55	0,48	-71,38	296,16
		56,00	85,82	62,55	0,74	-97,95	269,59
		63,00	102,40	62,55	0,58	-81,37	286,17
		70,00	167,22	62,55	0,10	-16,55	350,99
	42,00	35,00	191,55722	62,55	0,04	7,79	375,33
		49,00	303,95067	44,23	0,00	174,01	433,89
		56,00	277,37950	44,23	0,00	147,44	407,32
		63,00	293,95603	44,23	0,00	164,01	423,90
		70,00	358,77900	44,23	0,00	228,83	488,72
	49,00	35,00	-112,39	62,55	0,48	-296,16	71,38
		42,00	-303,95067	44,23	0,00	-433,89	-174,01
		56,00	-26,57	44,23	0,99	-156,52	103,37
		63,00	-9,99	44,23	1,00	-139,94	119,95
		70,00	54,83	44,23	0,82	-75,12	184,77
	56,00	35,00	-85,82	62,55	0,74	-269,59	97,95
		42,00	-277,37950	44,23	0,00	-407,32	-147,44
		49,00	26,57	44,23	0,99	-103,37	156,52
		63,00	16,58	44,23	1,00	-113,37	146,52
		70,00	81,40	44,23	0,45	-48,54	211,34
	63,00	35,00	-102,40	62,55	0,58	-286,17	81,37
		42,00	-293,95603	44,23	0,00	-423,90	-164,01
		49,00	9,99	44,23	1,00	-119,95	139,94
		56,00	-16,58	44,23	1,00	-146,52	113,37
		70,00	64,82	44,23	0,69	-65,12	194,77
	70,00	35,00	-167,22	62,55	0,10	-350,99	16,55
		42,00	-358,77900	44,23	0,00	-488,72	-228,83
		49,00	-54,83	44,23	0,82	-184,77	75,12

Variable dependiente	(I)DÍA	(J)DÍA	Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig.	Intervalo de confianza 95%	
						Límite inferior	Límite superior
		56,00	-81,40	44,23	0,45	-211,34	48,54
		63,00	-64,82	44,23	0,69	-194,77	65,12
CAR	35,00	42,00	0,61	8,17	1,00	-23,39	24,62
		49,00	-14,65	8,17	0,48	-38,66	9,35
		56,00	-9,74	8,17	0,84	-33,74	14,27
		63,00	-16,68	8,17	0,33	-40,69	7,33
		70,00	-34,87783	8,17	0,00	-58,89	-10,87
	42,00	35,00	-0,61	8,17	1,00	-24,62	23,39
		49,00	-15,27	5,78	0,10	-32,24	1,71
		56,00	-10,35	5,78	0,48	-27,33	6,63
		63,00	-17,29181	5,78	0,04	-34,27	-0,32
		70,00	-35,49162	5,78	0,00	-52,47	-18,52
	49,00	35,00	14,65	8,17	0,48	-9,35	38,66
		42,00	15,27	5,78	0,10	-1,71	32,24
		56,00	4,92	5,78	0,96	-12,06	21,90
		63,00	-2,02	5,78	1,00	-19,00	14,95
		70,00	-20,22287	5,78	0,01	-37,20	-3,25
	56,00	35,00	9,74	8,17	0,84	-14,27	33,74
		42,00	10,35	5,78	0,48	-6,63	27,33
		49,00	-4,92	5,78	0,96	-21,90	12,06
		63,00	-6,94	5,78	0,84	-23,92	10,03
		70,00	-25,14221	5,78	0,00	-42,12	-8,17
63,00	35,00	16,68	8,17	0,33	-7,33	40,69	
	42,00	17,29181	5,78	0,04	0,32	34,27	
	49,00	2,02	5,78	1,00	-14,95	19,00	
	56,00	6,94	5,78	0,84	-10,03	23,92	
	70,00	-18,19981	5,78	0,03	-35,18	-1,22	
70,00	35,00	34,87783	8,17	0,00	10,87	58,89	
	42,00	35,49162	5,78	0,00	18,52	52,47	
	49,00	20,22287	5,78	0,01	3,25	37,20	
	56,00	25,14221	5,78	0,00	8,17	42,12	
	63,00	18,19981	5,78	0,03	1,22	35,18	
SAC	35,00	42,00	-39,34	100,12	1,00	-333,46	254,79
		49,00	-70,37	100,12	0,98	-364,49	223,75
		56,00	-279,15	100,12	0,07	-573,28	14,97
		63,00	-624,82711	100,12	0,00	-918,95	-330,70
		70,00	-1104,54592	100,12	0,00	-1398,67	-810,42

Variable dependiente	(I)DÍA	(J)DÍA	Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig.	Intervalo de confianza 95%	
						Límite inferior	Límite superior
	42,00	35,00	39,34	100,12	1,00	-254,79	333,46
		49,00	-31,03	70,79	1,00	-239,01	176,94
		56,00	-239,81682	70,79	0,02	-447,79	-31,84
		63,00	-585,48960	70,79	0,00	-793,47	-377,51
		70,00	-1065,20840	70,79	0,00	-1273,19	-857,23
	49,00	35,00	70,37	100,12	0,98	-223,75	364,49
		42,00	31,03	70,79	1,00	-176,94	239,01
		56,00	-208,78432	70,79	0,05	-416,76	-0,81
		63,00	-554,45710	70,79	0,00	-762,43	-346,48
		70,00	-1034,17590	70,79	0,00	-1242,15	-826,20
	56,00	35,00	279,15	100,12	0,07	-14,97	573,28
		42,00	239,81682	70,79	0,02	31,84	447,79
		49,00	208,78432	70,79	0,05	0,81	416,76
		63,00	-345,67278	70,79	0,00	-553,65	-137,70
		70,00	-825,39158	70,79	0,00	-1033,37	-617,41
	63,00	35,00	624,82711	100,12	0,00	330,70	918,95
		42,00	585,48960	70,79	0,00	377,51	793,47
		49,00	554,45710	70,79	0,00	346,48	762,43
		56,00	345,67278	70,79	0,00	137,70	553,65
		70,00	-479,71880	70,79	0,00	-687,70	-271,74
70,00	35,00	1104,54592	100,12	0,00	810,42	1398,67	
	42,00	1065,20840	70,79	0,00	857,23	1273,19	
	49,00	1034,17590	70,79	0,00	826,20	1242,15	
	56,00	825,39158	70,79	0,00	617,41	1033,37	
	63,00	479,71880	70,79	0,00	271,74	687,70	
FRU	35,00	42,00	-193,87	115,49	0,55	-533,16	145,43
		49,00	-112,78	115,49	0,92	-452,07	226,52
		56,00	-295,49	115,49	0,12	-634,78	43,81
		63,00	-237,52	115,49	0,32	-576,82	101,77
		70,00	-189,69	115,49	0,57	-528,99	149,60
	42,00	35,00	193,87	115,49	0,55	-145,43	533,16
		49,00	81,09	81,67	0,92	-158,83	321,01
		56,00	-101,62	81,67	0,81	-341,54	138,30
		63,00	-43,65	81,67	1,00	-283,57	196,26
		70,00	4,18	81,67	1,00	-235,74	244,09
49,00	35,00	112,78	115,49	0,92	-226,52	452,07	
	42,00	-81,09	81,67	0,92	-321,01	158,83	

Variable dependiente	(I)DÍA	(J)DÍA	Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig.	Intervalo de confianza 95%		
						Límite inferior	Límite superior	
	56,00	56,00	-182,71	81,67	0,24	-422,63	57,21	
		63,00	-124,74	81,67	0,65	-364,66	115,17	
		70,00	-76,91	81,67	0,93	-316,83	163,00	
	56,00	35,00	295,49	115,49	0,12	-43,81	634,78	
		42,00	101,62	81,67	0,81	-138,30	341,54	
		49,00	182,71	81,67	0,24	-57,21	422,63	
		63,00	57,97	81,67	0,98	-181,95	297,88	
		70,00	105,80	81,67	0,79	-134,12	345,71	
	63,00	35,00	237,52	115,49	0,32	-101,77	576,82	
		42,00	43,65	81,67	1,00	-196,26	283,57	
		49,00	124,74	81,67	0,65	-115,17	364,66	
		56,00	-57,97	81,67	0,98	-297,88	181,95	
		70,00	47,83	81,67	0,99	-192,09	287,75	
	70,00	35,00	189,69	115,49	0,57	-149,60	528,99	
		42,00	-4,18	81,67	1,00	-244,09	235,74	
		49,00	76,91	81,67	0,93	-163,00	316,83	
		56,00	-105,80	81,67	0,79	-345,71	134,12	
		63,00	-47,83	81,67	0,99	-287,75	192,09	
	GLU	35,00	42,00	-426,61	213,73	0,36	-1054,51	201,30
			49,00	-115,31	213,73	0,99	-743,21	512,60
56,00			-533,37	213,73	0,14	-1161,27	94,53	
63,00			-382,82	213,73	0,48	-1010,72	245,09	
70,00			-260,21	213,73	0,83	-888,11	367,70	
42,00		35,00	426,61	213,73	0,36	-201,30	1054,51	
		49,00	311,30	151,13	0,32	-132,70	755,29	
		56,00	-106,76	151,13	0,98	-550,76	337,23	
		63,00	43,79	151,13	1,00	-400,21	487,79	
		70,00	166,40	151,13	0,88	-277,60	610,40	
49,00		35,00	115,31	213,73	0,99	-512,60	743,21	
		42,00	-311,30	151,13	0,32	-755,29	132,70	
		56,00	-418,06	151,13	0,08	-862,06	25,93	
		63,00	-267,51	151,13	0,49	-711,50	176,49	
		70,00	-144,90	151,13	0,93	-588,89	299,10	
56,00		35,00	533,37	213,73	0,14	-94,53	1161,27	
		42,00	106,76	151,13	0,98	-337,23	550,76	
		49,00	418,06	151,13	0,08	-25,93	862,06	
		63,00	150,55	151,13	0,92	-293,44	594,55	

Variable dependiente	(I)DÍA	(J)DÍA	Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig.	Intervalo de confianza 95%	
						Límite inferior	Límite superior
		70,00	273,16	151,13	0,47	-170,83	717,16
	63,00	35,00	382,82	213,73	0,48	-245,09	1010,72
		42,00	-43,79	151,13	1,00	-487,79	400,21
		49,00	267,51	151,13	0,49	-176,49	711,50
		56,00	-150,55	151,13	0,92	-594,55	293,44
		70,00	122,61	151,13	0,96	-321,39	566,60
	70,00	35,00	260,21	213,73	0,83	-367,70	888,11
		42,00	-166,40	151,13	0,88	-610,40	277,60
		49,00	144,90	151,13	0,93	-299,10	588,89
		56,00	-273,16	151,13	0,47	-717,16	170,83
		63,00	-122,61	151,13	0,96	-566,60	321,39
BCAR	35,00	42,00	0,12	1,10	1,00	-3,10	3,35
		49,00	-0,42	1,10	1,00	-3,65	2,80
		56,00	-1,42	1,10	0,79	-4,64	1,81
		63,00	-2,10	1,10	0,40	-5,32	1,12
		70,00	-1,89	1,10	0,52	-5,12	1,33
	42,00	35,00	-0,12	1,10	1,00	-3,35	3,10
		49,00	-0,55	0,78	0,98	-2,83	1,73
		56,00	-1,54	0,78	0,36	-3,82	0,74
		63,00	-2,22	0,78	0,06	-4,50	0,06
		70,00	-2,01	0,78	0,11	-4,29	0,27
	49,00	35,00	0,42	1,10	1,00	-2,80	3,65
		42,00	0,55	0,78	0,98	-1,73	2,83
		56,00	-0,99	0,78	0,79	-3,27	1,29
		63,00	-1,68	0,78	0,27	-3,96	0,60
		70,00	-1,47	0,78	0,42	-3,75	0,81
	56,00	35,00	1,42	1,10	0,79	-1,81	4,64
		42,00	1,54	0,78	0,36	-0,74	3,82
		49,00	0,99	0,78	0,79	-1,29	3,27
		63,00	-0,68	0,78	0,95	-2,96	1,60
		70,00	-0,47	0,78	0,99	-2,75	1,81
	63,00	35,00	2,10	1,10	0,40	-1,12	5,32
		42,00	2,22	0,78	0,06	-0,06	4,50
		49,00	1,68	0,78	0,27	-0,60	3,96
		56,00	0,68	0,78	0,95	-1,60	2,96
		70,00	0,21	0,78	1,00	-2,07	2,49
	70,00	35,00	1,89	1,10	0,52	-1,33	5,12

Variable dependiente	(I)DÍA	(J)DÍA	Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig.	Intervalo de confianza 95%	
						Límite inferior	Límite superior
		42,00	2,01	0,78	0,11	-0,27	4,29
		49,00	1,47	0,78	0,42	-0,81	3,75
		56,00	0,47	0,78	0,99	-1,81	2,75
		63,00	-0,21	0,78	1,00	-2,49	2,07
L	35,00	42,00	1,65	2,30	0,98	-5,11	8,40
		49,00	-4,71	2,30	0,33	-11,46	2,04
		56,00	-32,8733	2,30	0,00	-39,63	-26,12
		63,00	-15,2033	2,30	0,00	-21,96	-8,45
		70,00	-9,6780	2,30	0,00	-16,43	-2,93
	42,00	35,00	-1,65	2,30	0,98	-8,40	5,11
		49,00	-6,3580	1,63	0,00	-11,13	-1,58
		56,00	-34,5207	1,63	0,00	-39,30	-29,75
		63,00	-16,8507	1,63	0,00	-21,63	-12,08
		70,00	-11,3253	1,63	0,00	-16,10	-6,55
	49,00	35,00	4,71	2,30	0,33	-2,04	11,46
		42,00	6,3580	1,63	0,00	1,58	11,13
		56,00	-28,1627	1,63	0,00	-32,94	-23,39
		63,00	-10,4927	1,63	0,00	-15,27	-5,72
		70,00	-4,9673	1,63	0,04	-9,74	-0,19
	56,00	35,00	32,8733	2,30	0,00	26,12	39,63
		42,00	34,5207	1,63	0,00	29,75	39,30
		49,00	28,1627	1,63	0,00	23,39	32,94
		63,00	17,6700	1,63	0,00	12,90	22,44
		70,00	23,1953	1,63	0,00	18,42	27,97
63,00	35,00	15,2033	2,30	0,00	8,45	21,96	
	42,00	16,8507	1,63	0,00	12,08	21,63	
	49,00	10,4927	1,63	0,00	5,72	15,27	
	56,00	-17,6700	1,63	0,00	-22,44	-12,90	
	70,00	5,5253	1,63	0,01	0,75	10,30	
70,00	35,00	9,6780	2,30	0,00	2,93	16,43	
	42,00	11,3253	1,63	0,00	6,55	16,10	
	49,00	4,9673	1,63	0,04	0,19	9,74	
	56,00	-23,1953	1,63	0,00	-27,97	-18,42	
	63,00	-5,5253	1,63	0,01	-10,30	-0,75	
C	35,00	42,00	0,61	3,58	1,00	-9,91	11,13
		49,00	-9,32	3,58	0,11	-19,84	1,20
		56,00	-50,8220	3,58	0,00	-61,34	-40,30

Variable dependiente	(I)DÍA	(J)DÍA	Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig.	Intervalo de confianza 95%	
						Límite inferior	Límite superior
		63,00	-38,9100	3,58	0,00	-49,43	-28,39
		70,00	-30,0720	3,58	0,00	-40,59	-19,55
	42,00	35,00	-0,61	3,58	1,00	-11,13	9,91
		49,00	-9,9320	2,53	0,00	-17,37	-2,49
		56,00	-51,4347	2,53	0,00	-58,87	-44,00
		63,00	-39,5227	2,53	0,00	-46,96	-32,08
		70,00	-30,6847	2,53	0,00	-38,12	-23,25
	49,00	35,00	9,32	3,58	0,11	-1,20	19,84
		42,00	9,9320	2,53	0,00	2,49	17,37
		56,00	-41,5027	2,53	0,00	-48,94	-34,06
		63,00	-29,5907	2,53	0,00	-37,03	-22,15
		70,00	-20,7527	2,53	0,00	-28,19	-13,31
	56,00	35,00	50,8220	3,58	0,00	40,30	61,34
		42,00	51,4347	2,53	0,00	44,00	58,87
		49,00	41,5027	2,53	0,00	34,06	48,94
		63,00	11,9120	2,53	0,00	4,47	19,35
		70,00	20,7500	2,53	0,00	13,31	28,19
	63,00	35,00	38,9100	3,58	0,00	28,39	49,43
		42,00	39,5227	2,53	0,00	32,08	46,96
		49,00	29,5907	2,53	0,00	22,15	37,03
		56,00	-11,9120	2,53	0,00	-19,35	-4,47
		70,00	8,8380	2,53	0,01	1,40	16,28
	70,00	35,00	30,0720	3,58	0,00	19,55	40,59
		42,00	30,6847	2,53	0,00	23,25	38,12
		49,00	20,7527	2,53	0,00	13,31	28,19
		56,00	-20,7500	2,53	0,00	-28,19	-13,31
		63,00	-8,8380	2,53	0,01	-16,28	-1,40
H	35,00	42,00	-1,72	2,85	0,99	-10,08	6,63
		49,00	9,3633	2,85	0,02	1,01	17,72
		56,00	32,9133	2,85	0,00	24,56	41,27
		63,00	49,2060	2,85	0,00	40,85	57,56
		70,00	58,0347	2,85	0,00	49,68	66,39
	42,00	35,00	1,72	2,85	0,99	-6,63	10,08
		49,00	11,0873	2,01	0,00	5,18	17,00
		56,00	34,6373	2,01	0,00	28,73	40,55
		63,00	50,9300	2,01	0,00	45,02	56,84
		70,00	59,7587	2,01	0,00	53,85	65,67

Variable dependiente	(I)DÍA	(J)DÍA	Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig.	Intervalo de confianza 95%	
						Límite inferior	Límite superior
	49,00	35,00	-9,3633	2,85	0,02	-17,72	-1,01
		42,00	-11,0873	2,01	0,00	-17,00	-5,18
		56,00	23,5500	2,01	0,00	17,64	29,46
		63,00	39,8427	2,01	0,00	33,93	45,75
		70,00	48,6713	2,01	0,00	42,76	54,58
	56,00	35,00	-32,9133	2,85	0,00	-41,27	-24,56
		42,00	-34,6373	2,01	0,00	-40,55	-28,73
		49,00	-23,5500	2,01	0,00	-29,46	-17,64
		63,00	16,2927	2,01	0,00	10,38	22,20
		70,00	25,1213	2,01	0,00	19,21	31,03
	63,00	35,00	-49,2060	2,85	0,00	-57,56	-40,85
		42,00	-50,9300	2,01	0,00	-56,84	-45,02
		49,00	-39,8427	2,01	0,00	-45,75	-33,93
		56,00	-16,2927	2,01	0,00	-22,20	-10,38
		70,00	8,8287	2,01	0,00	2,92	14,74
70,00	35,00	-58,0347	2,85	0,00	-66,39	-49,68	
	42,00	-59,7587	2,01	0,00	-65,67	-53,85	
	49,00	-48,6713	2,01	0,00	-54,58	-42,76	
	56,00	-25,1213	2,01	0,00	-31,03	-19,21	
	63,00	-8,8287	2,01	0,00	-14,74	-2,92	
SST	35,00	42,00	-,920	0,22	0,00	-1,56	-0,28
		49,00	-1,227	0,22	0,00	-1,86	-0,59
		56,00	-1,727	0,22	0,00	-2,36	-1,09
		63,00	-1,827	0,22	0,00	-2,46	-1,19
		70,00	-2,253	0,22	0,00	-2,89	-1,62
	42,00	35,00	,920	0,22	0,00	0,28	1,56
		49,00	-0,31	0,15	0,35	-0,76	0,14
		56,00	-,807	0,15	0,00	-1,26	-0,36
		63,00	-,907	0,15	0,00	-1,36	-0,46
		70,00	-1,333	0,15	0,00	-1,78	-0,88
	49,00	35,00	1,227	0,22	0,00	0,59	1,86
		42,00	0,31	0,15	0,35	-0,14	0,76
		56,00	-,500	0,15	0,02	-0,95	-0,05
		63,00	-,600	0,15	0,00	-1,05	-0,15
		70,00	-1,027	0,15	0,00	-1,48	-0,58
56,00	35,00	1,727	0,22	0,00	1,09	2,36	
	42,00	,807	0,15	0,00	0,36	1,26	

Variable dependiente	(I)DÍA	(J)DÍA	Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig.	Intervalo de confianza 95%	
						Límite inferior	Límite superior
		49,00	,500	0,15	0,02	0,05	0,95
		63,00	-0,10	0,15	0,99	-0,55	0,35
		70,00	-,527	0,15	0,01	-0,98	-0,08
	63,00	35,00	1,827	0,22	0,00	1,19	2,46
		42,00	,907	0,15	0,00	0,46	1,36
		49,00	,600	0,15	0,00	0,15	1,05
		56,00	0,10	0,15	0,99	-0,35	0,55
		70,00	-0,43	0,15	0,07	-0,88	0,02
	70,00	35,00	2,253	0,22	0,00	1,62	2,89
		42,00	1,333	0,15	0,00	0,88	1,78
		49,00	1,027	0,15	0,00	0,58	1,48
		56,00	,527	0,15	0,01	0,08	0,98
		63,00	0,43	0,15	0,07	-0,02	0,88
ATT	35,00	42,00	-0,27	0,10	0,11	-0,58	0,03
		49,00	-,549	0,10	0,00	-0,86	-0,24
		56,00	-,770	0,10	0,00	-1,08	-0,46
		63,00	-,827	0,10	0,00	-1,14	-0,52
		70,00	-,873	0,10	0,00	-1,18	-0,57
	42,00	35,00	0,27	0,10	0,11	-0,03	0,58
		49,00	-,275	0,07	0,01	-0,49	-0,06
		56,00	-,496	0,07	0,00	-0,71	-0,28
		63,00	-,554	0,07	0,00	-0,77	-0,34
		70,00	-,599	0,07	0,00	-0,82	-0,38
	49,00	35,00	,549	0,10	0,00	0,24	0,86
		42,00	,275	0,07	0,01	0,06	0,49
		56,00	-,221	0,07	0,04	-0,44	0,00
		63,00	-,278	0,07	0,01	-0,50	-0,06
		70,00	-,324	0,07	0,00	-0,54	-0,11
	56,00	35,00	,770	0,10	0,00	0,46	1,08
		42,00	,496	0,07	0,00	0,28	0,71
		49,00	,221	0,07	0,04	0,00	0,44
		63,00	-0,06	0,07	0,97	-0,28	0,16
		70,00	-0,10	0,07	0,73	-0,32	0,12
	63,00	35,00	,827	0,10	0,00	0,52	1,14
		42,00	,554	0,07	0,00	0,34	0,77
		49,00	,278	0,07	0,01	0,06	0,50
		56,00	0,06	0,07	0,97	-0,16	0,28

Variable dependiente	(I)DÍA	(J)DÍA	Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig.	Intervalo de confianza 95%		
						Límite inferior	Límite superior	
		70,00	-0,05	0,07	0,99	-0,26	0,17	
	70,00	35,00	,873	0,10	0,00	0,57	1,18	
		42,00	,599	0,07	0,00	0,38	0,82	
		49,00	,324	0,07	0,00	0,11	0,54	
		56,00	0,10	0,07	0,73	-0,12	0,32	
		63,00	0,05	0,07	0,99	-0,17	0,26	
pH	35,00	42,00	0,04	0,07	0,99	-0,17	0,26	
		49,00	,27593	0,07	0,01	0,06	0,50	
		56,00	,42400	0,07	0,00	0,20	0,64	
		63,00	,46853	0,07	0,00	0,25	0,69	
		70,00	,39287	0,07	0,00	0,17	0,61	
		42,00	35,00	-0,04	0,07	0,99	-0,26	0,17
		49,00	,23153	0,05	0,00	0,08	0,39	
		56,00	,37960	0,05	0,00	0,22	0,53	
		63,00	,42413	0,05	0,00	0,27	0,58	
		70,00	,34847	0,05	0,00	0,19	0,50	
		49,00	35,00	-,27593	0,07	0,01	-0,50	-0,06
		42,00	-,23153	0,05	0,00	-0,39	-0,08	
		56,00	0,15	0,05	0,07	-0,01	0,30	
		63,00	,19260	0,05	0,01	0,04	0,35	
		70,00	0,12	0,05	0,25	-0,04	0,27	
		56,00	35,00	-,42400	0,07	0,00	-0,64	-0,20
		42,00	-,37960	0,05	0,00	-0,53	-0,22	
		49,00	-0,15	0,05	0,07	-0,30	0,01	
		63,00	0,04	0,05	0,96	-0,11	0,20	
		70,00	-0,03	0,05	0,99	-0,19	0,12	
	63,00	35,00	-,46853	0,07	0,00	-0,69	-0,25	
	42,00	-,42413	0,05	0,00	-0,58	-0,27		
	49,00	-,19260	0,05	0,01	-0,35	-0,04		
	56,00	-0,04	0,05	0,96	-0,20	0,11		
	70,00	-0,08	0,05	0,71	-0,23	0,08		
	70,00	35,00	-,39287	0,07	0,00	-0,61	-0,17	
	42,00	-,34847	0,05	0,00	-0,50	-0,19		
	49,00	-0,12	0,05	0,25	-0,27	0,04		
	56,00	0,03	0,05	0,99	-0,12	0,19		
	63,00	0,08	0,05	0,71	-0,08	0,23		

Variable dependiente	(I)DÍA	(J)DÍA	Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig.	Intervalo de confianza 95%	
						Límite inferior	Límite superior

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = ,021.

\*. La diferencia de medias es significativa al nivel ,05.

## A2.2 ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES

Tabla A2.2.1 Matriz de correlaciones

	ASC	OXA	CIT	MAL	SUC	CAR	SAC	FRU	GLU	BCAR	L	C	H	SST	ATT	pH
Correlación ASC	1,000	-,017	,341	-,270	-,031	,244	,478	,206	,124	,182	,295	,425	-,526	,400	,304	-,257
OXA	-,017	1,000	-,107	,538	,142	,226	-,138	,023	-,024	-,169	-,037	-,123	,157	,121	,007	,286
CIT	,341	-,107	1,000	-,190	-,343	,282	,496	,292	,230	,314	,396	,551	-,600	,442	,688	-,602
MAL	-,270	,538	-,190	1,000	,541	-,041	-,388	,269	,280	-,240	-,250	-,399	,518	-,132	-,274	,418
SUC	-,031	,142	-,343	,541	1,000	-,205	-,276	,343	,395	-,157	-,305	-,378	,428	-,230	-,466	,409
CAR	,244	,226	,282	-,041	-,205	1,000	,488	,122	,065	,214	,046	,173	-,426	,459	,294	,035
SAC	,478	-,138	,496	-,388	-,276	,488	1,000	,111	,038	,135	,051	,327	-,828	,542	,469	-,232
FRU	,206	,023	,292	,269	,343	,122	,111	1,000	,931	,386	,255	,288	-,064	,322	,078	-,183
GLU	,124	-,024	,230	,280	,395	,065	,038	,931	1,000	,376	,227	,231	,020	,271	-,022	-,159
BCAR	,182	-,169	,314	-,240	-,157	,214	,135	,386	,376	1,000	,222	,282	-,188	,288	,217	-,462
L	,295	-,037	,396	-,250	-,305	,046	,051	,255	,227	,222	1,000	,932	-,375	,242	,409	-,479
C	,425	-,123	,551	-,399	-,378	,173	,327	,288	,231	,282	,932	1,000	-,647	,394	,549	-,552
H	-,526	,157	-,600	,518	,428	-,426	-,828	-,064	,020	-,188	-,375	-,647	1,000	-,553	-,598	,401
SST	,400	,121	,442	-,132	-,230	,459	,542	,322	,271	,288	,242	,394	-,553	1,000	,645	-,299
ATT	,304	,007	,688	-,274	-,466	,294	,469	,078	-,022	,217	,409	,549	-,598	,645	1,000	-,535
pH	-,257	,286	-,602	,418	,409	,035	-,232	-,183	-,159	-,462	-,479	-,552	,401	-,299	-,535	1,000

		ASC	OXA	CIT	MAL	SUC	CAR	SAC	FRU	GLU	BCAR	L	C	H	SST	ATT	pH
Sig. (Unilateral)	ASC		,441	,001	,008	,394	,015	,000	,033	,137	,053	,004	,000	,000	,000	,003	,011
	OXA	,441		,172	,000	,105	,022	,112	,419	,416	,067	,371	,138	,082	,143	,476	,005
	CIT	,001	,172		,046	,001	,006	,000	,004	,020	,002	,000	,000	,000	,000	,000	,000
	MAL	,008	,000	,046		,000	,360	,000	,008	,006	,016	,013	,000	,000	,121	,007	,000
	SUC	,394	,105	,001	,000		,034	,007	,001	,000	,083	,003	,000	,000	,020	,000	,000
	CAR	,015	,022	,006	,360	,034		,000	,141	,283	,029	,341	,062	,000	,000	,004	,380
	SAC	,000	,112	,000	,000	,007	,000		,164	,369	,116	,327	,002	,000	,000	,000	,019
	FRU	,033	,419	,004	,008	,001	,141	,164		,000	,000	,011	,005	,286	,002	,245	,052
	GLU	,137	,416	,020	,006	,000	,283	,369	,000		,000	,021	,020	,431	,007	,423	,080
	BCAR	,053	,067	,002	,016	,083	,029	,116	,000	,000		,024	,006	,048	,005	,027	,000
	L	,004	,371	,000	,013	,003	,341	,327	,011	,021	,024		,000	,000	,015	,000	,000
	C	,000	,138	,000	,000	,000	,062	,002	,005	,020	,006	,000		,000	,000	,000	,000
	H	,000	,082	,000	,000	,000	,000	,000	,286	,431	,048	,000	,000		,000	,000	,000
	SST	,000	,143	,000	,121	,020	,000	,000	,002	,007	,005	,015	,000	,000		,000	,003
	ATT	,003	,476	,000	,007	,000	,004	,000	,245	,423	,027	,000	,000	,000	,000		,000
	pH	,011	,005	,000	,000	,000	,380	,019	,052	,080	,000	,000	,000	,000	,003	,000	

**Tabla A2.2.2 Varianza total explicada**

Componente	Autovalores iniciales			Sumas de las saturaciones al cuadrado de la extracción		
	Total	% de la varianza	% acumulado	Total	% de la varianza	% acumulado
1	5,723	35,769	35,769	5,723	35,769	35,769
2	2,637	16,481	52,250	2,637	16,481	52,250
3	1,884	11,776	64,026	1,884	11,776	64,026
4	1,315	8,219	72,245	1,315	8,219	72,245
5	1,039	6,495	78,740	1,039	6,495	78,740
6	,805	5,031	83,771			
7	,648	4,050	87,820			
8	,510	3,190	91,010			
9	,351	2,194	93,204			
10	,308	1,923	95,126			
11	,261	1,628	96,755			
12	,199	1,242	97,996			
13	,159	,994	98,990			
14	,095	,595	99,585			
15	,055	,343	99,929			
16	,011	,071	100,000			

Método de extracción: Análisis de Componentes principales.

**Tabla A2.2.3 Matriz de componentes<sup>a</sup>**

	Componente				
	1	2	3	4	5
ASC	,565	,098	,191	-,166	,511
OXA	-,186	,259	,548	,629	-,054
CIT	,774	,102	,006	,076	-,184
MAL	-,515	,583	,290	,348	-,096
SUC	-,508	,606	,075	-,208	,319
CAR	,415	,077	,643	-,043	-,184
SAC	,679	-,128	,466	-,384	,127
FRU	,291	,893	-,105	-,139	,010
GLU	,209	,903	-,170	-,175	-,005
BCAR	,456	,296	-,267	-,271	-,478
L	,618	,123	-,420	,505	,293
C	,811	,068	-,291	,323	,297

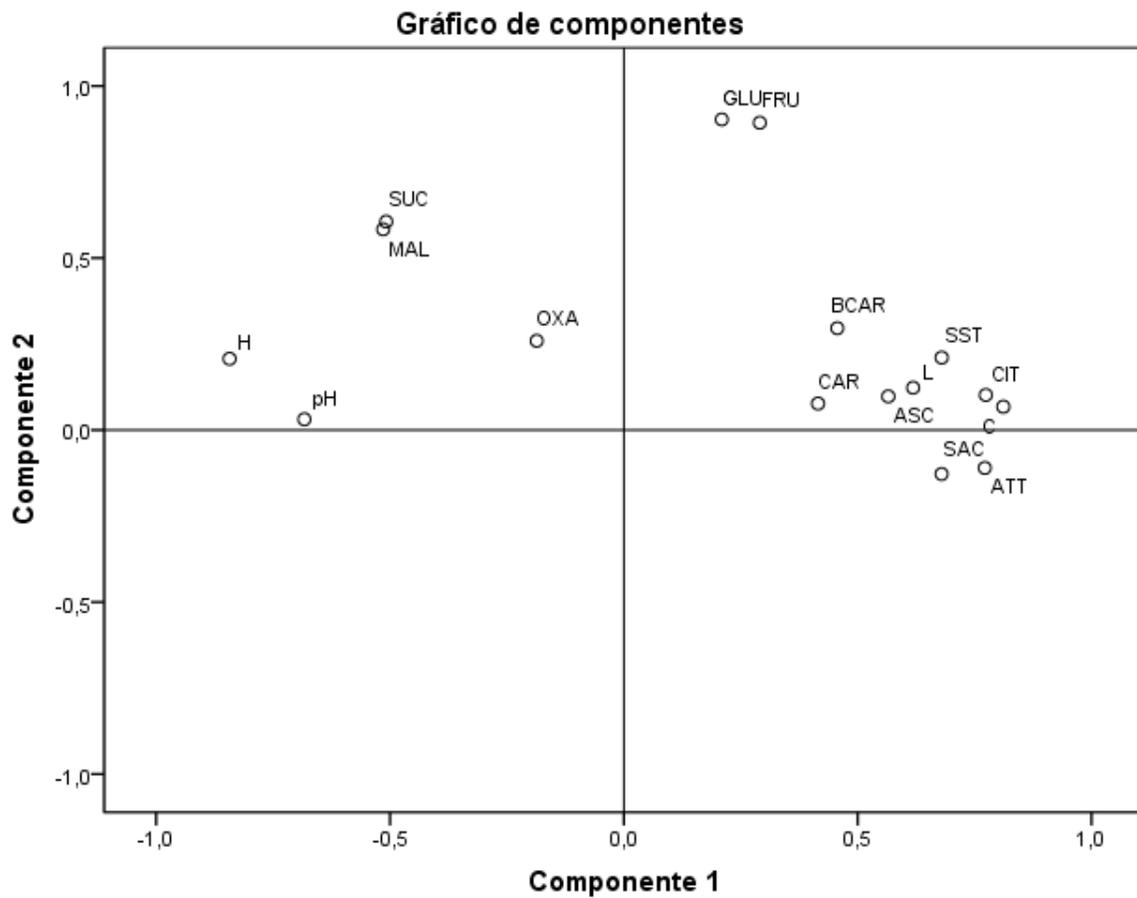
Tabla A2.2.3 Matriz de componentes<sup>a</sup>

	Componente				
	1	2	3	4	5
H	-,843	,207	-,248	,133	-,213
SST	,680	,211	,402	,018	-,146
ATT	,772	-,110	,143	,267	-,220
pH	-,683	,031	,459	-,036	,250

Método de extracción: Análisis de componentes principales.

a. 5 componentes extraídos

Ilustración A2.2.1 Gráfico de componentes principales



## A2.3 ANÁLISIS CANÓNICO DE DISCRIMINANTES

### A2.3.1 ANÁLISIS CANÓNICO DE DISCRIMINANTES PARA COMPARACIÓN ENTRE MORFOTIPOS

Tabla A2.3.1.1 Estadísticos de grupo

MOR	N válido (según lista)		
	No ponderados	Ponderados	
1	CIT	30	30,000
	FRU	30	30,000
	GLU	30	30,000
	C	30	30,000
	H	30	30,000
	ATT	30	30,000
2	CIT	30	30,000
	FRU	30	30,000
	GLU	30	30,000
	C	30	30,000
	H	30	30,000
	ATT	30	30,000
3	CIT	30	30,000
	FRU	30	30,000
	GLU	30	30,000
	C	30	30,000
	H	30	30,000
	ATT	30	30,000
Total	CIT	90	90,000
	FRU	90	90,000
	GLU	90	90,000
	C	90	90,000
	H	90	90,000
	ATT	90	90,000

Tabla A2.3.1.2 Autovalores

Función	Autovalor	% de varianza	% acumulado	Correlación canónica
1	,275 <sup>a</sup>	85,6	85,6	,464
2	,046 <sup>a</sup>	14,4	100,0	,210

a. Se han empleado las 2 primeras funciones discriminantes canónicas en el análisis.

**Tabla A2.3.1.3 Lambda de Wilks**

Contraste de las funciones	Lambda de Wilks	Chi-cuadrado	gl	Sig.
1 a la 2	,750	24,310	12	,018
2	,956	3,806	5	,578

**Tabla A2.3.1.4 Coeficientes estandarizados de las funciones discriminantes canónicas**

	Función	
	1	2
CIT	,097	1,035
FRU	-1,326	-1,108
GLU	1,886	,140
C	,148	,509
H	,802	,915
ATT	,655	-,117

**Tabla A2.3.1.5 Matriz de estructura**

	Función	
	1	2
GLU	,690*	-,557
H	,266*	,114
FRU	,463	-,613*
CIT	,141	,263*
ATT	,114	,167*
C	,081	,083*

Correlaciones intra-grupo combinadas entre las variables discriminantes y las funciones discriminantes canónicas tipificadas

Variabes ordenadas por el tamaño de la correlación con la función.

**Tabla A2.3.1.5 Matriz de estructura**

	Función	
	1	2
GLU	,690*	-,557
H	,266*	,114
FRU	,463	-,613*
CIT	,141	,263*
ATT	,114	,167*
C	,081	,083*

Correlaciones intra-grupo combinadas entre las variables discriminantes y las funciones discriminantes canónicas tipificadas

VARIABLES ordenadas por el tamaño de la correlación con la función.

\*. Mayor correlación absoluta entre cada variable y cualquier función discriminante.

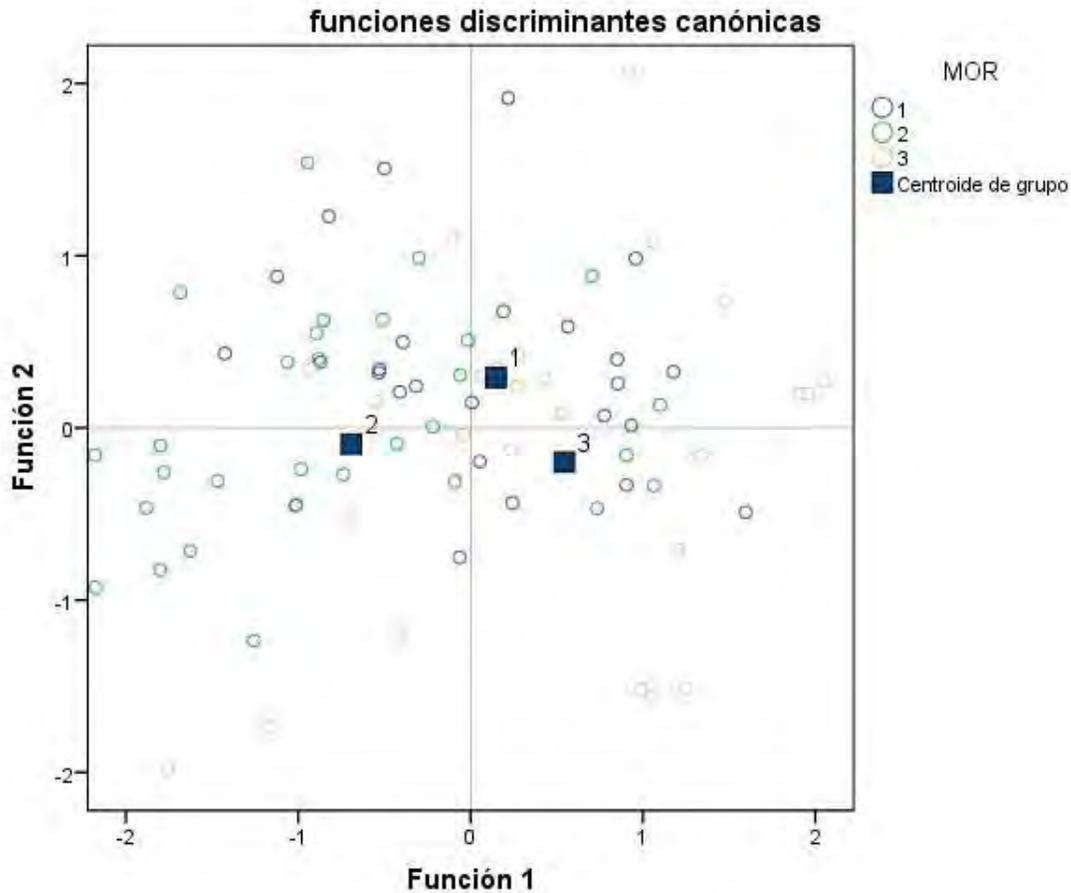
**Tabla A2.3.1.6 Funciones en los centroides de los grupos**

MOR	Función	
	1	2
1	,148	,292
2	-,692	-,094
3	,544	-,198

Funciones discriminantes canónicas no tipificadas evaluadas en las medias de los grupos

**Tabla A2.3.1.7 Probabilidades previas para los grupos**

MOR	Previas	Casos utilizados en el análisis	
		No ponderados	Ponderados
1	,333	30	30,000
2	,333	30	30,000
3	,333	30	30,000
Total	1,000	90	90,000



### A2.3.2 ANÁLISIS CANÓNICO DE DISCRIMINANTES PARA COMPARACIÓN ENTRE DIAS DE DESARROLLO

**Tabla A2.3.2.1 Estadísticos de grupo**

DÍA		N válido (según lista)	
		No ponderados	Ponderados
35	CIT	15	15,000
	FRU	15	15,000
	GLU	15	15,000
	C	15	15,000
	H	15	15,000
	ATT	15	15,000
42	CIT	15	15,000
	FRU	15	15,000
	GLU	15	15,000
	C	15	15,000
	H	15	15,000

**Tabla A2.3.2.1 Estadísticos de grupo**

DÍA		N válido (según lista)	
		No ponderados	Ponderados
	ATT	15	15,000
49	CIT	15	15,000
	FRU	15	15,000
	GLU	15	15,000
	C	15	15,000
	H	15	15,000
	ATT	15	15,000
56	CIT	15	15,000
	FRU	15	15,000
	GLU	15	15,000
	C	15	15,000
	H	15	15,000
	ATT	15	15,000
63	CIT	15	15,000
	FRU	15	15,000
	GLU	15	15,000
	C	15	15,000
	H	15	15,000
	ATT	15	15,000
70	CIT	15	15,000
	FRU	15	15,000
	GLU	15	15,000
	C	15	15,000
	H	15	15,000
	ATT	15	15,000
Total	CIT	90	90,000
	FRU	90	90,000
	GLU	90	90,000
	C	90	90,000
	H	90	90,000
	ATT	90	90,000

**Tabla A2.3.2.2 Autovalores**

Función	Autovalor	% de varianza	% acumulado	Correlación canónica
1	23,971 <sup>a</sup>	93,7	93,7	,980
2	1,220 <sup>a</sup>	4,8	98,5	,741
3	,301 <sup>a</sup>	1,2	99,7	,481
4	,088 <sup>a</sup>	,3	100,0	,284
5	,000 <sup>a</sup>	,0	100,0	,006

a. Se han empleado las 5 primeras funciones discriminantes canónicas en el análisis.

**Tabla A2.3.2.3 Lambda de Wilks**

Contraste de las funciones	Lambda de Wilks	Chi-cuadrado	gl	Sig.
1 a la 5	,013	362,106	30	,000
2 a la 5	,318	95,034	20	,000
3 a la 5	,706	28,839	12	,004
4 a la 5	,919	6,984	6	,322
5	1,000	,003	2	,999

**Tabla A2.3.2.4 Coeficientes estandarizados de las funciones discriminantes canónicas**

	Función				
	1	2	3	4	5
CIT	,255	-,190	,091	,116	-,330
FRU	-,555	-,259	,414	-1,290	2,120
GLU	,705	,150	-,118	2,027	-1,389
C	,577	,839	-,174	-,122	-,028
H	-,929	,464	,269	-,070	-,088
ATT	,369	,026	,820	-,091	-,130

**Tabla A2.3.2.5 Matriz de estructura**

	Función				
	1	2	3	4	5
H	-,654*	,555	,426	,208	-,105
C	,419	,877*	-,089	-,048	,172
ATT	,254	-,025	,886*	-,260	-,219
CIT	,243	-,084	,540*	,154	-,162
GLU	,035	,152	,200	,837*	,482
FRU	,055	,120	,286	,564	,747*

Correlaciones intra-grupo combinadas entre las variables discriminantes y las funciones discriminantes canónicas tipificadas

Variables ordenadas por el tamaño de la correlación con la función.

\*. Mayor correlación absoluta entre cada variable y cualquier función discriminante.

**Tabla A2.3.2.6 Funciones en los centroides de los grupos**

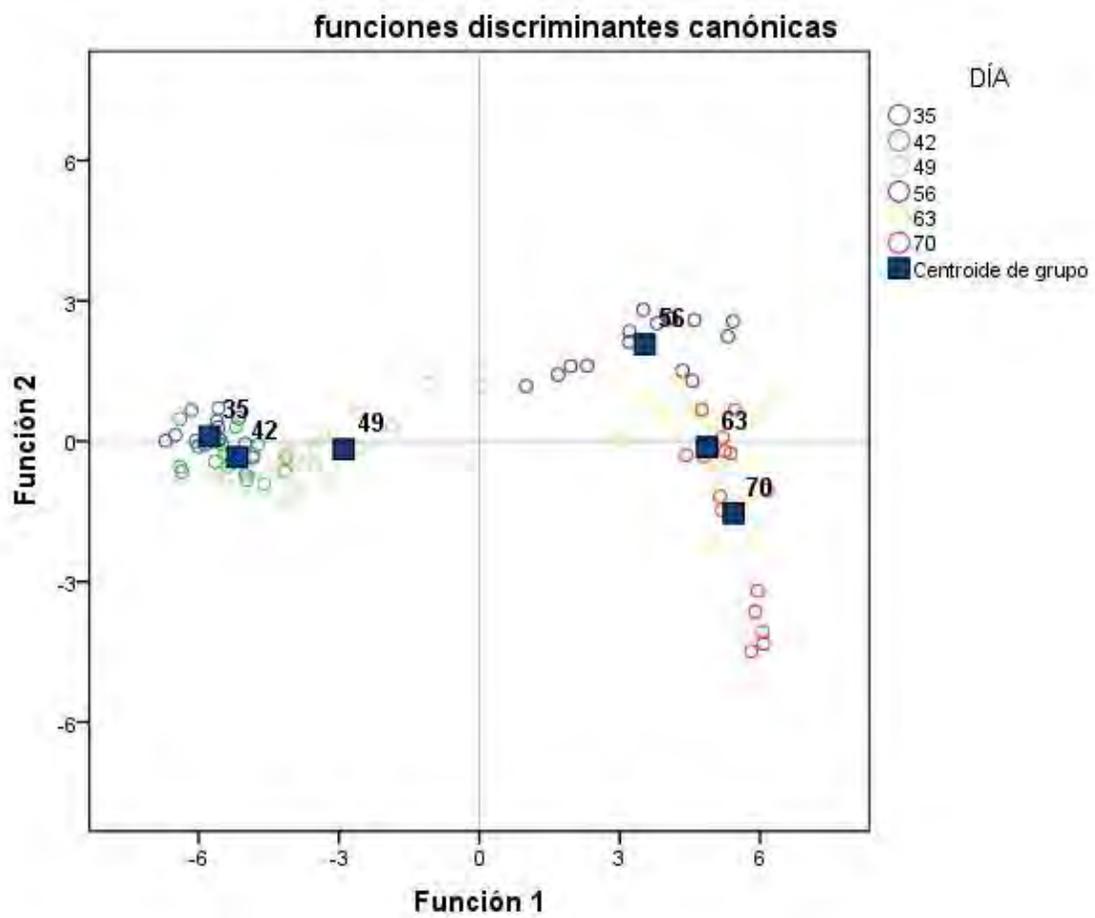
DÍA	Función				
	1	2	3	4	5
35	-5,770	,104	-,963	-,129	,000
42	-5,174	-,340	,445	,495	,000
49	-2,899	-,171	,722	-,473	,001
56	3,537	2,071	,065	,051	-,004
63	4,869	-,125	-,123	,056	,011
70	5,437	-1,540	-,146	-,001	-,007

Funciones discriminantes canónicas no tipificadas evaluadas en las medias de los grupos

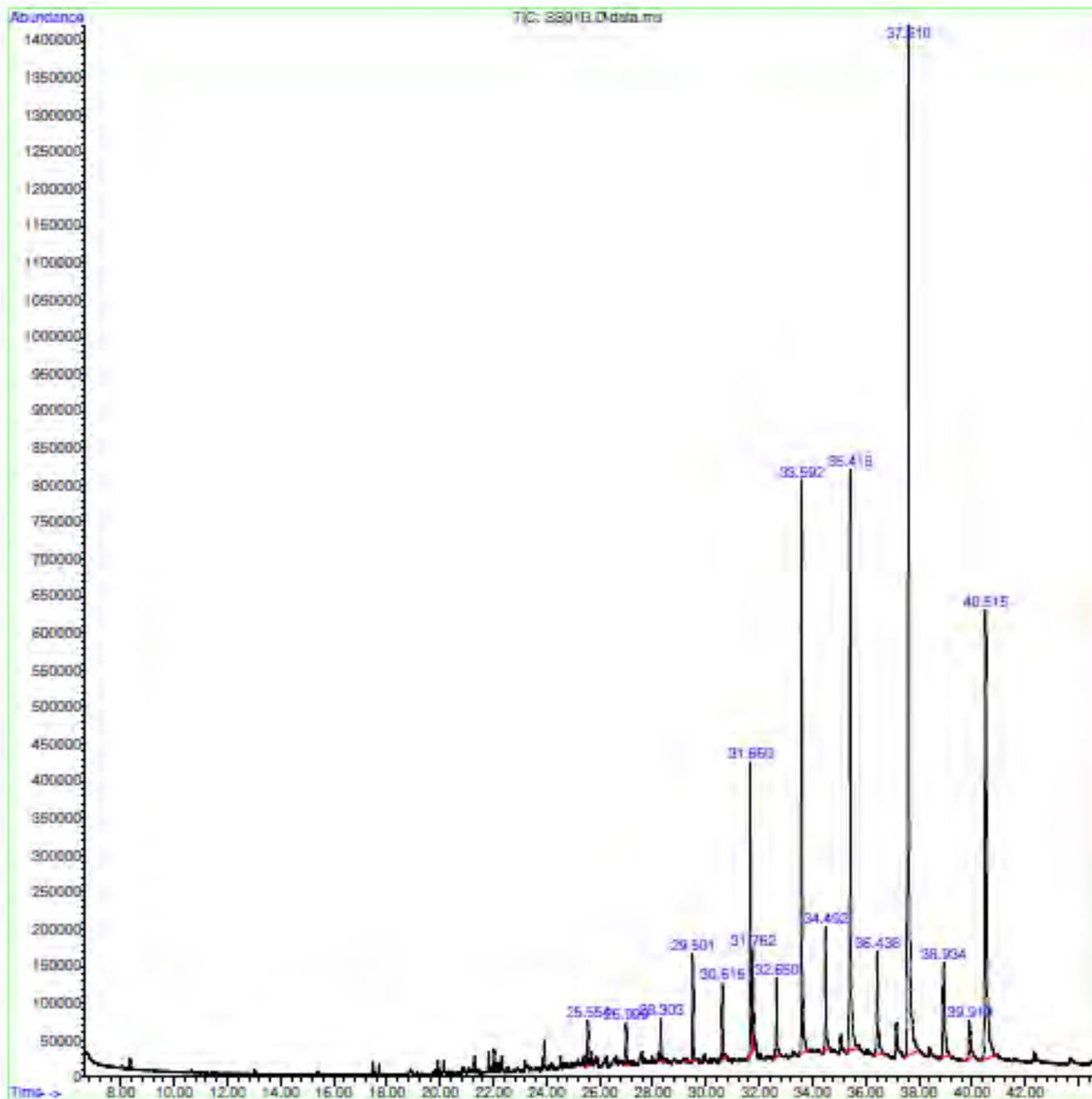
**Tabla A2.3.2.7 Probabilidades previas para los grupos**

DÍA	Previas	Casos utilizados en el análisis	
		No ponderados	Ponderados
35	,167	15	15,000
42	,167	15	15,000
49	,167	15	15,000
56	,167	15	15,000
63	,167	15	15,000
70	,167	15	15,000
Total	1,000	90	90,000

Ilustración A2.3.2.1 Gráfico de grupos combinados de las funciones discriminantes canónicas 1 y 2

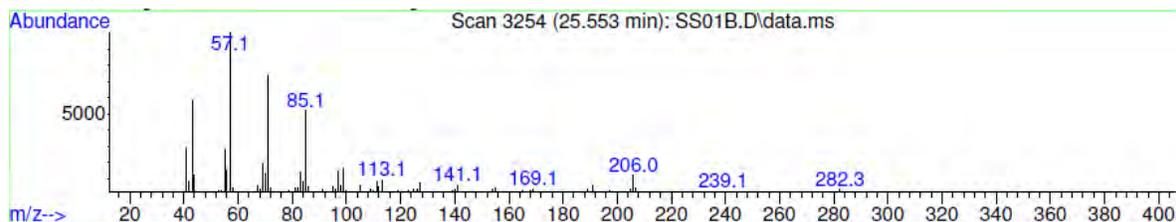


### ANEXO A3. ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICO Y CROMATOGRÁFICO DE LA MEZCLA C1 A3.1 CORRIENTE IÓNICA RECONSTRUIDA DE LA MEZCLA C1

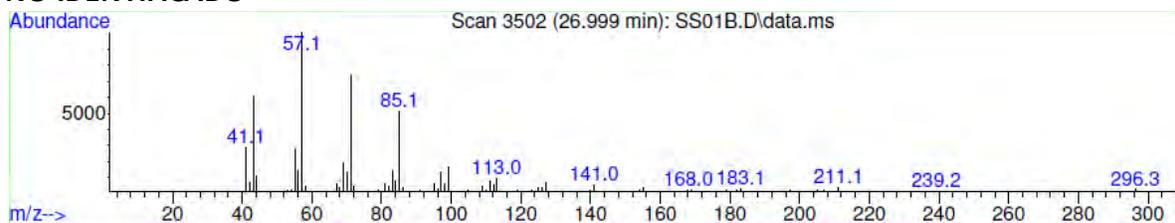


## A3.2 ESPECTROS DE MASAS DE LOS COMPONENTES DE LA MEZCLA C1

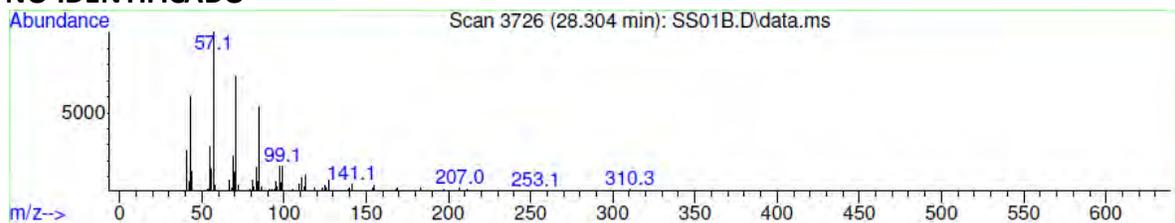
### Eicosano



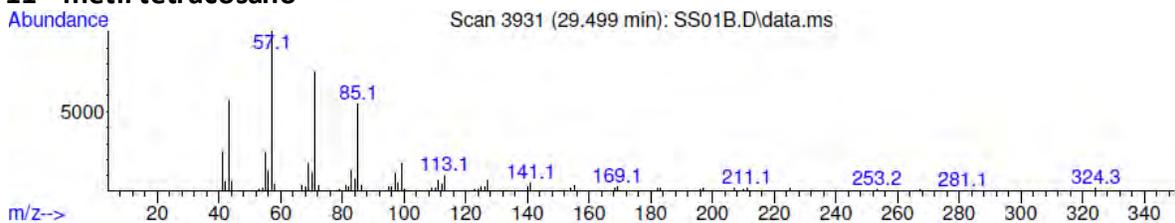
### NO IDENTIFICADO



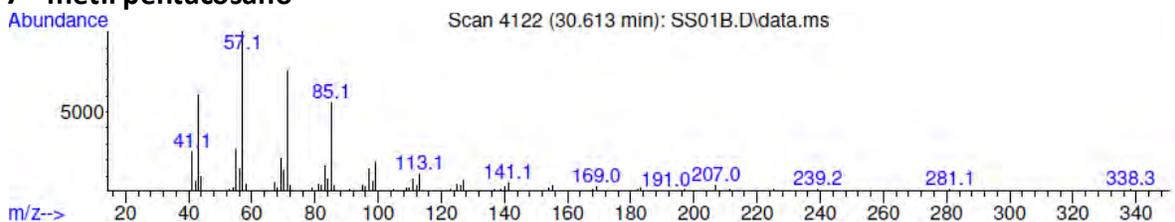
### NO IDENTIFICADO



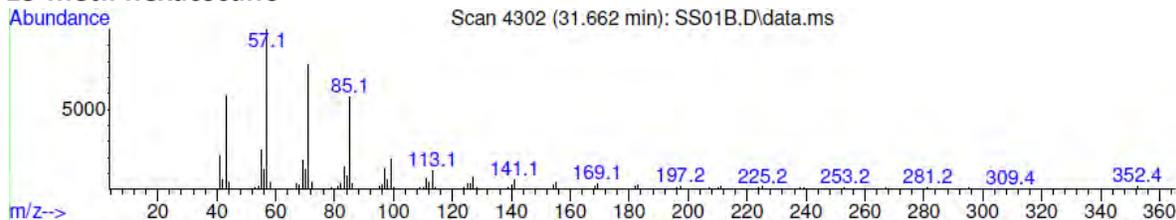
### 11 - metil tetracosano



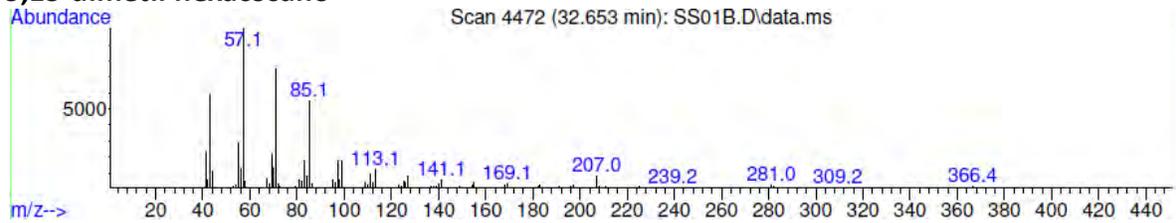
### 7 - metil pentacosano



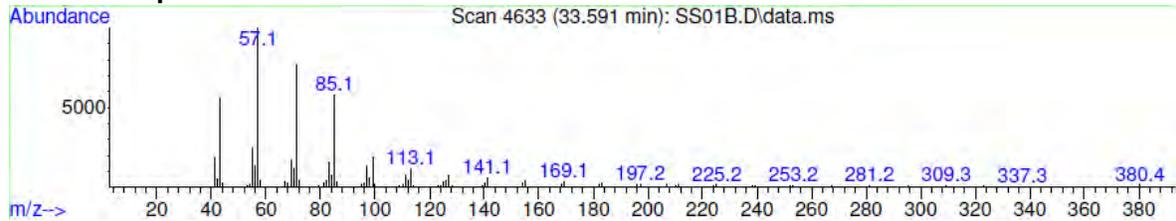
### 13-metil hexacosano



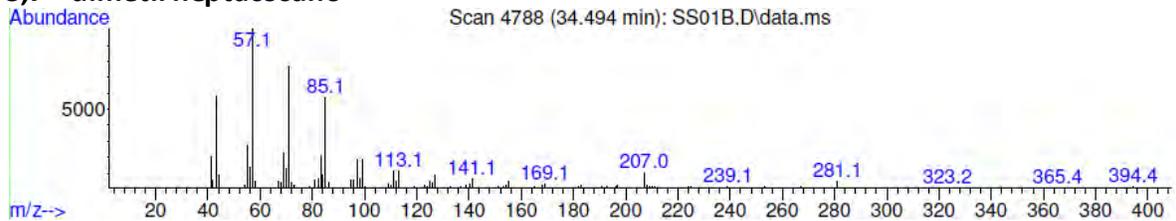
### 9,13-dimetil hexacosano



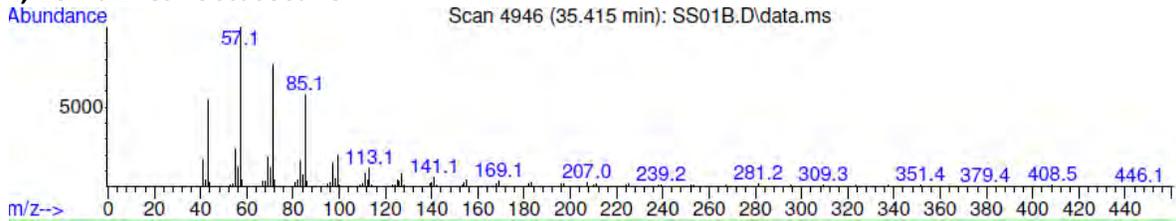
### 9 - metil heptacosano



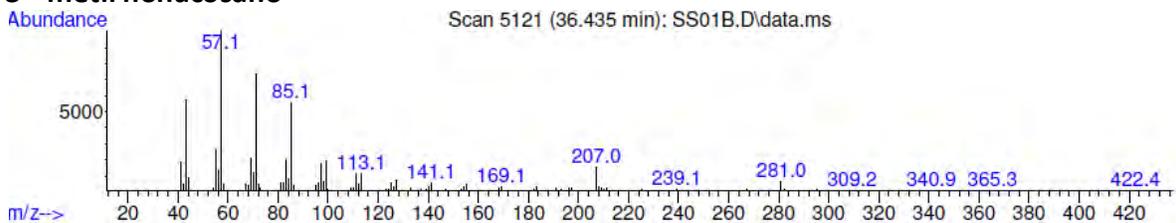
### 3,7 - dimetil heptacosano



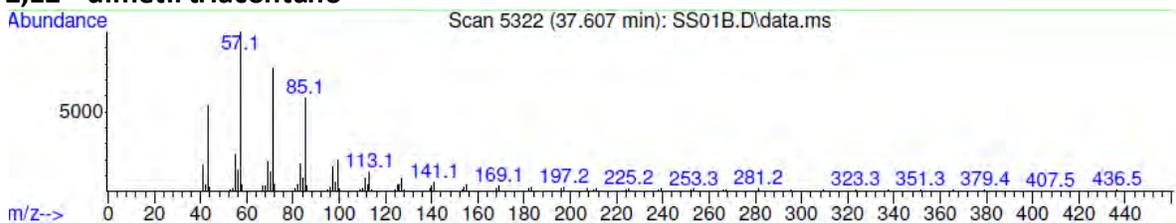
### 4, 16 - dimetil octacosano



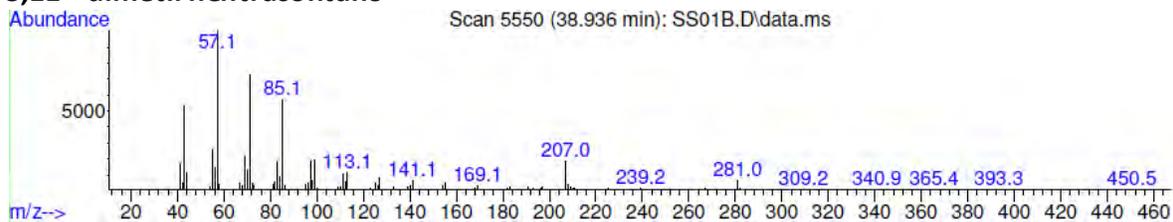
### 3 - metil nonacosano



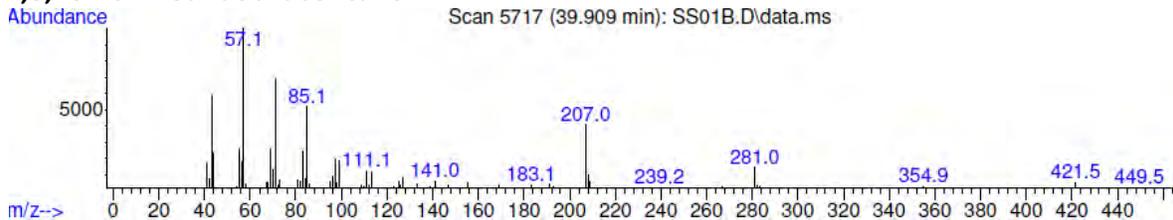
### 2,12 - dimetil triacontano



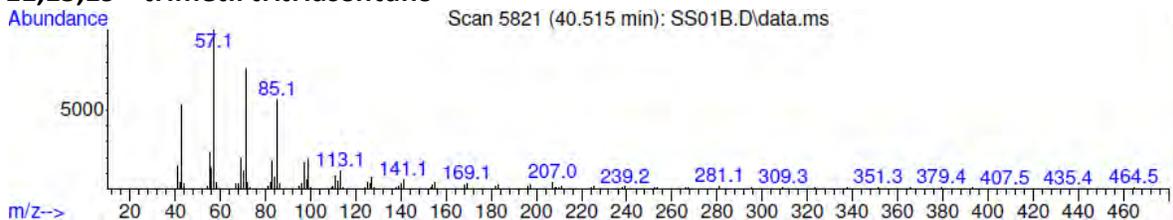
### 3,11 - dimetil hentracontano



### 4,8,16 - trimetil dotriacontano



### 11,15,19 - trimetil tritriacontano

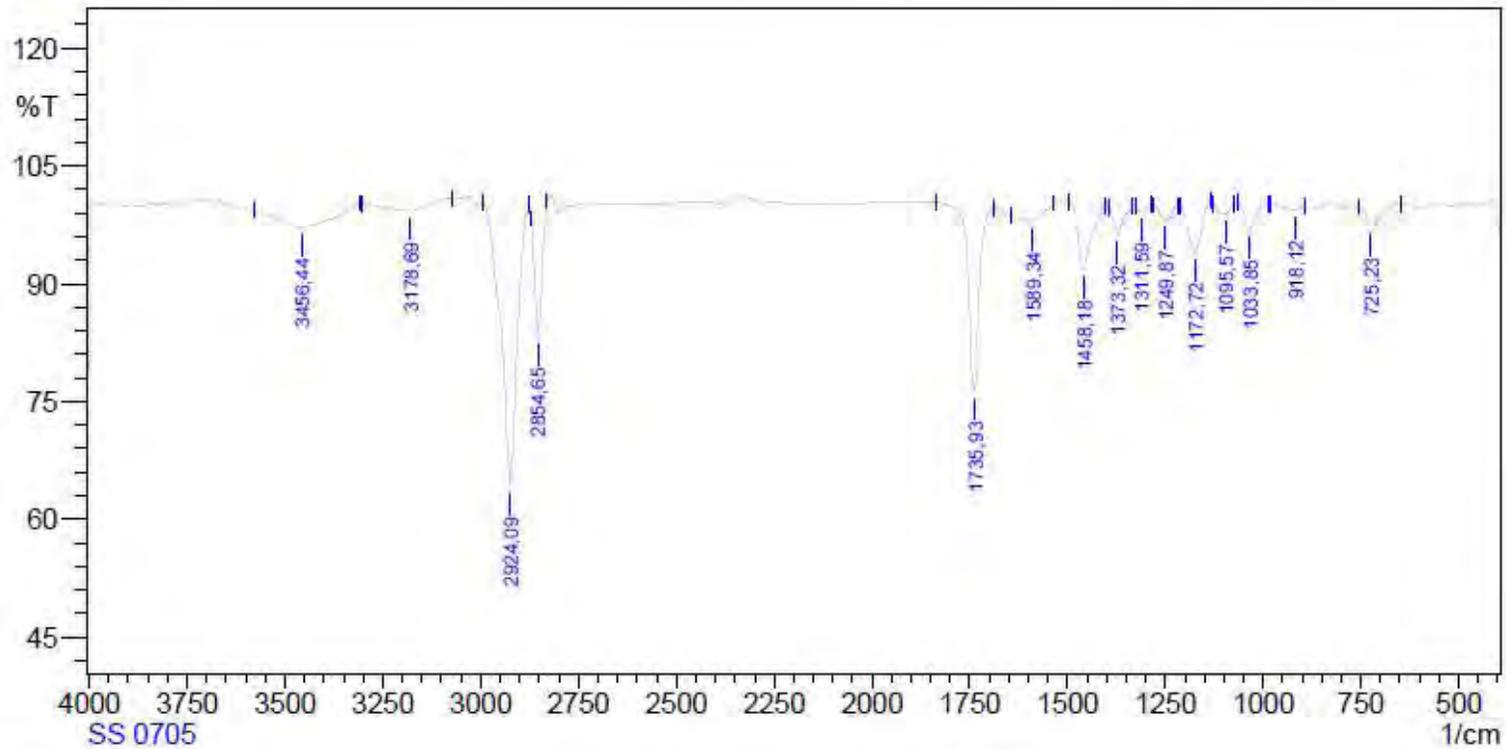


## ANEXO A4. ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICO Y CROMATOGRÁFICO DE LA MEZCLA C2

### A4.1 ESPECTRO INFRARROJO DE LA MEZCLA C2



GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN MACROMOLÉCULAS  
LABORATORIO DE ESPECTROSCOPIA MACROMOLÉCULAS 226  
ANÁLISIS INFRARROJO

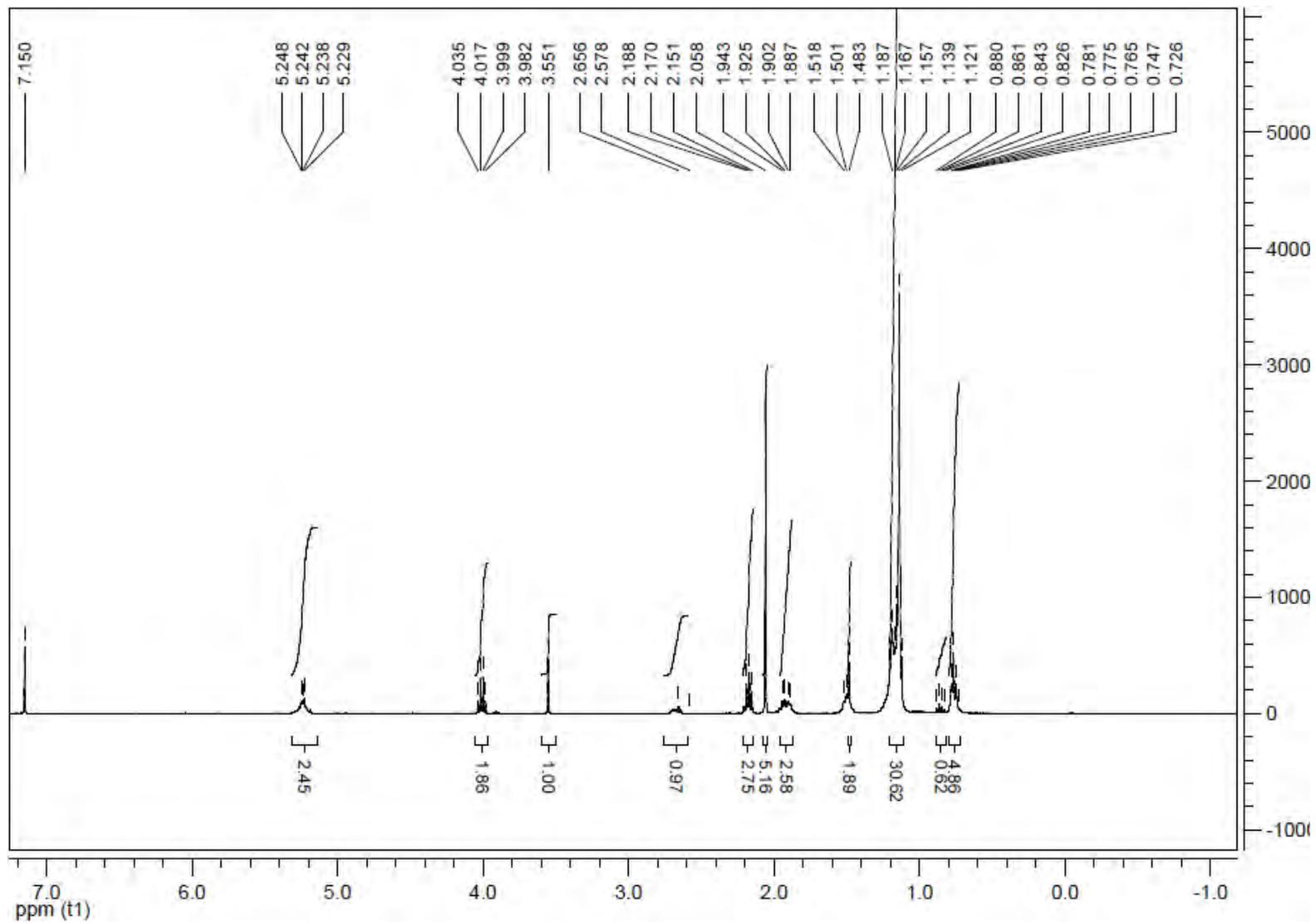


14/03/2011

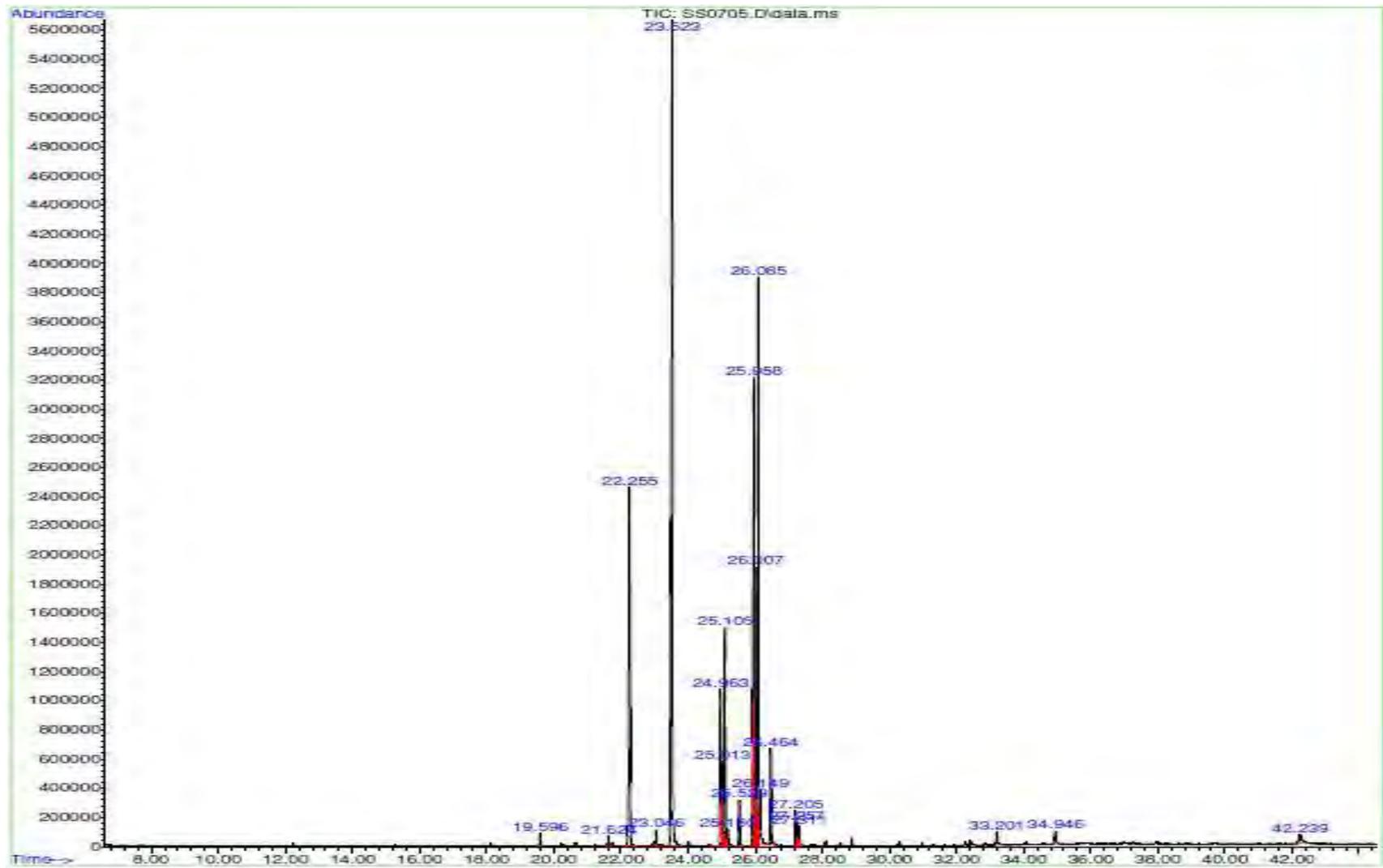
12:40:44

C:\Archivos de programa\Shimadzu\IRsolution  
PrintTemplates\makro.ptm

### A4.2 ESPECTRO DE RMN<sup>1</sup>H DE LA MEZCLA C2

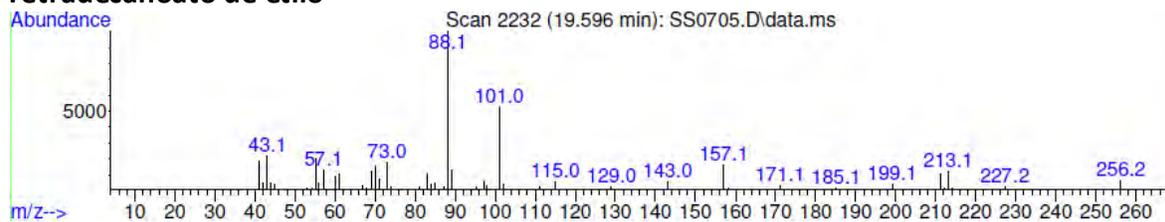


### A4.3 CORRIENTE IÓNICA RECONSTRUIDA DE LA MEZCLA C2

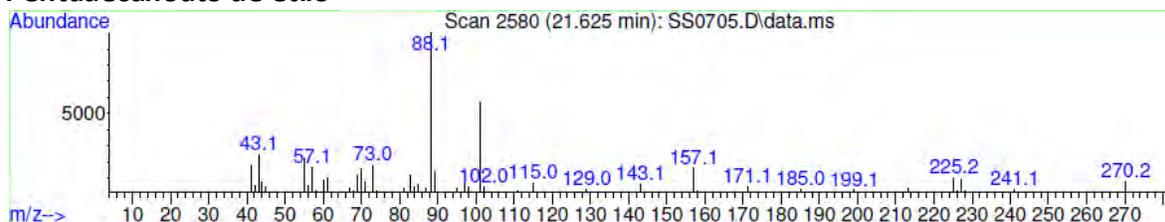


#### A4.4 ESPECTROS DE MASAS DE LOS COMPONENTES DE LA MEZCLA C2

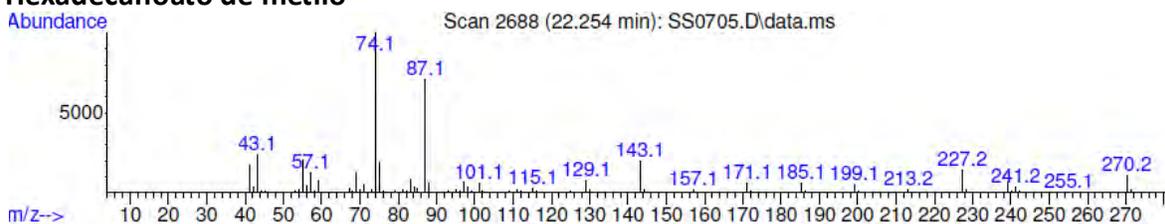
##### Tetradecanoato de etilo



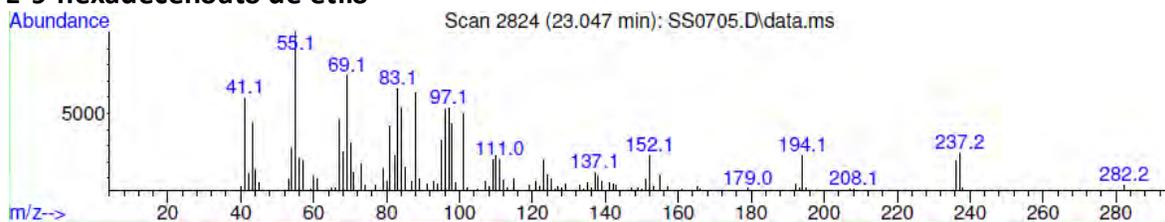
##### Pentadecanoato de etilo



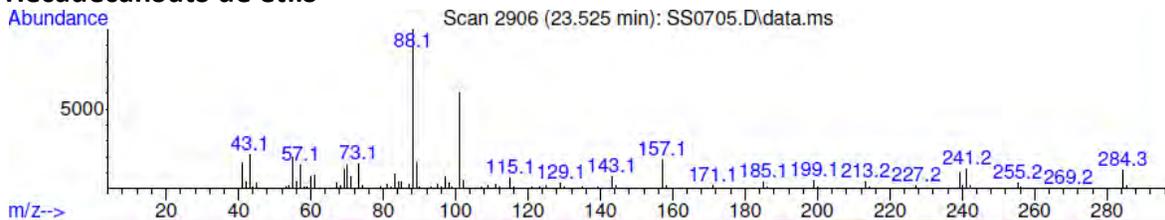
##### Hexadecanoato de metilo



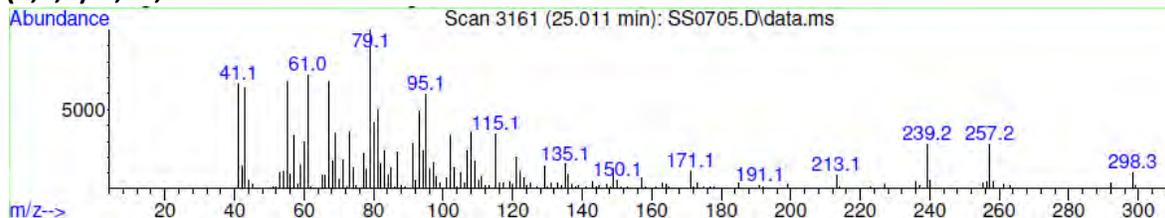
##### E-9-hexadecenoato de etilo



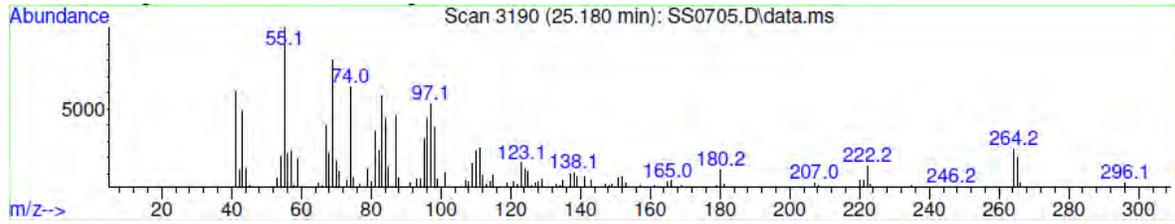
##### Hecadecanoato de etilo



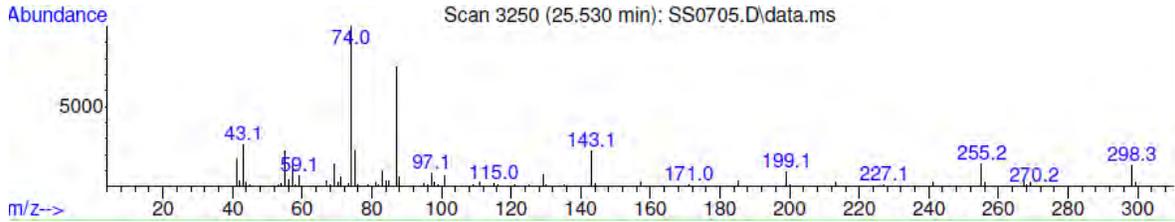
##### (Z,Z,Z)-9,12,15-octadecatrienoato de metilo



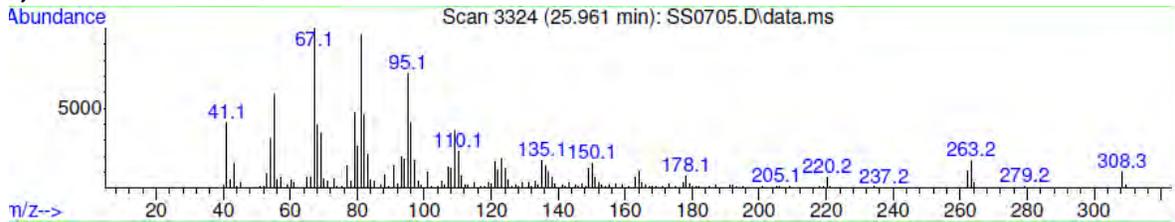
### 9-octadecenoato de metilo



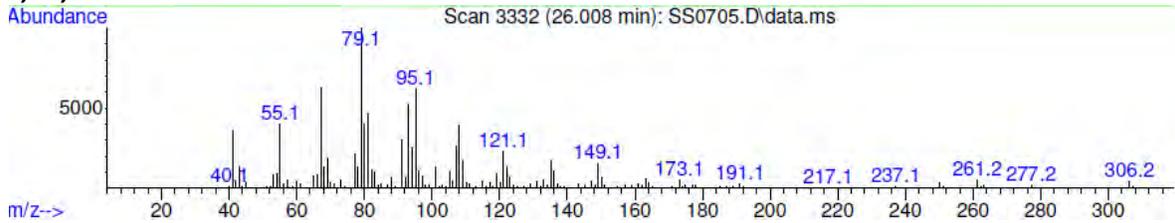
### Octadecanoato de metilo



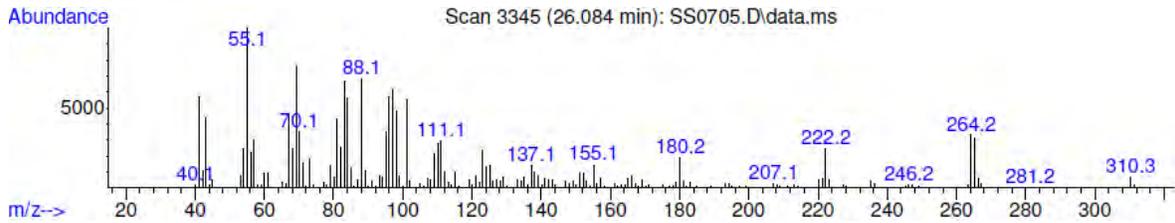
### 9,12-octadienoato de etilo



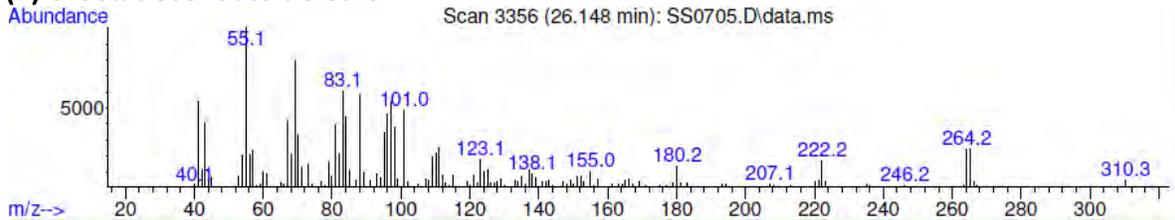
### 9,12,15-octatrienoato de etilo



### Oleato de etilo



### (E)-9-octadecenoato de etilo

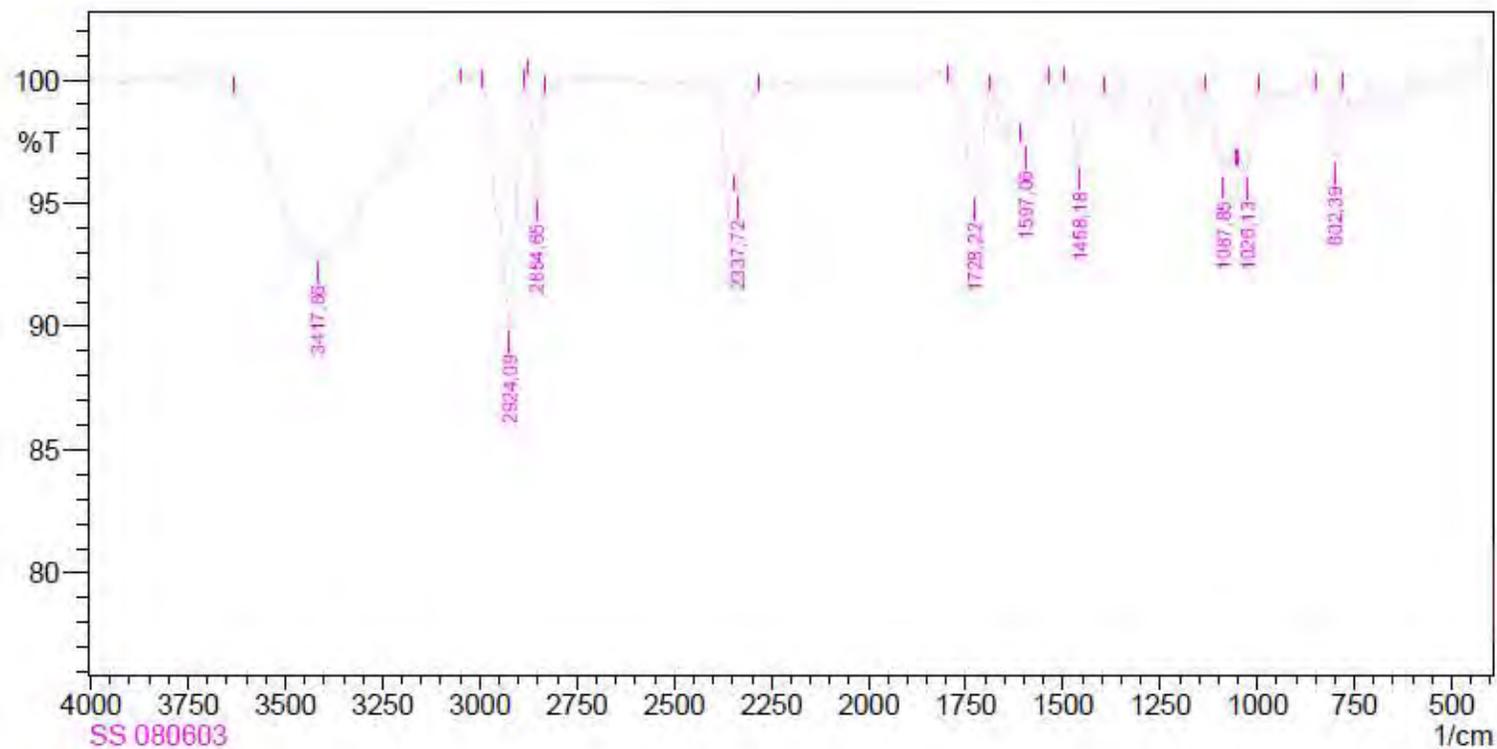


## ANEXO A5 ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICO Y CROMATOGRÁFICO DE LA MEZCLA C3

### A5.1 ESPECTRO INFRARROJO DE LA MEZCLA C3



GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN MACROMOLECULAS  
LABORATORIO DE ESPECTROSCOPIA MACROMOLÉCULAS 226  
ANÁLISIS INFRARROJO

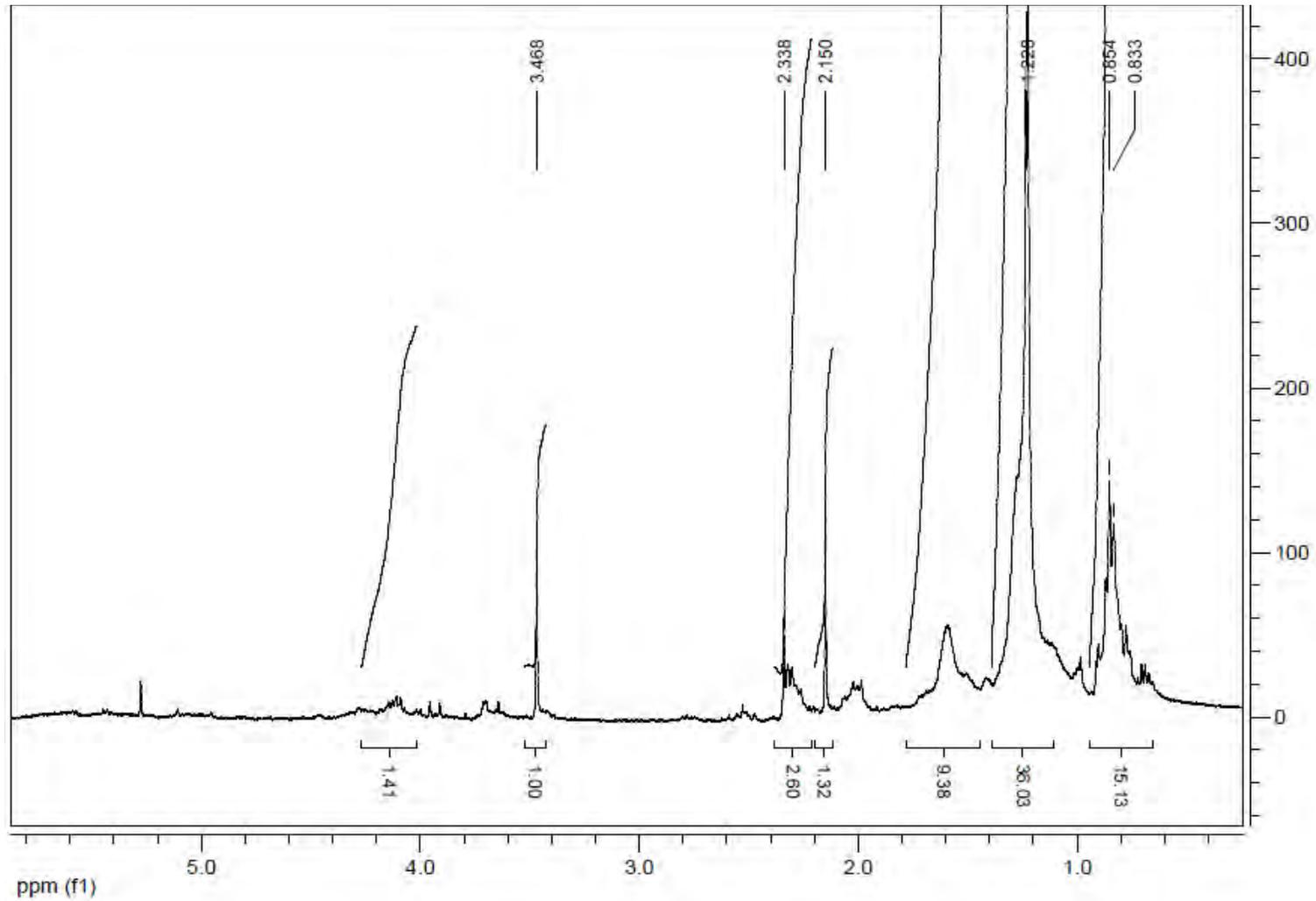


14/03/2011

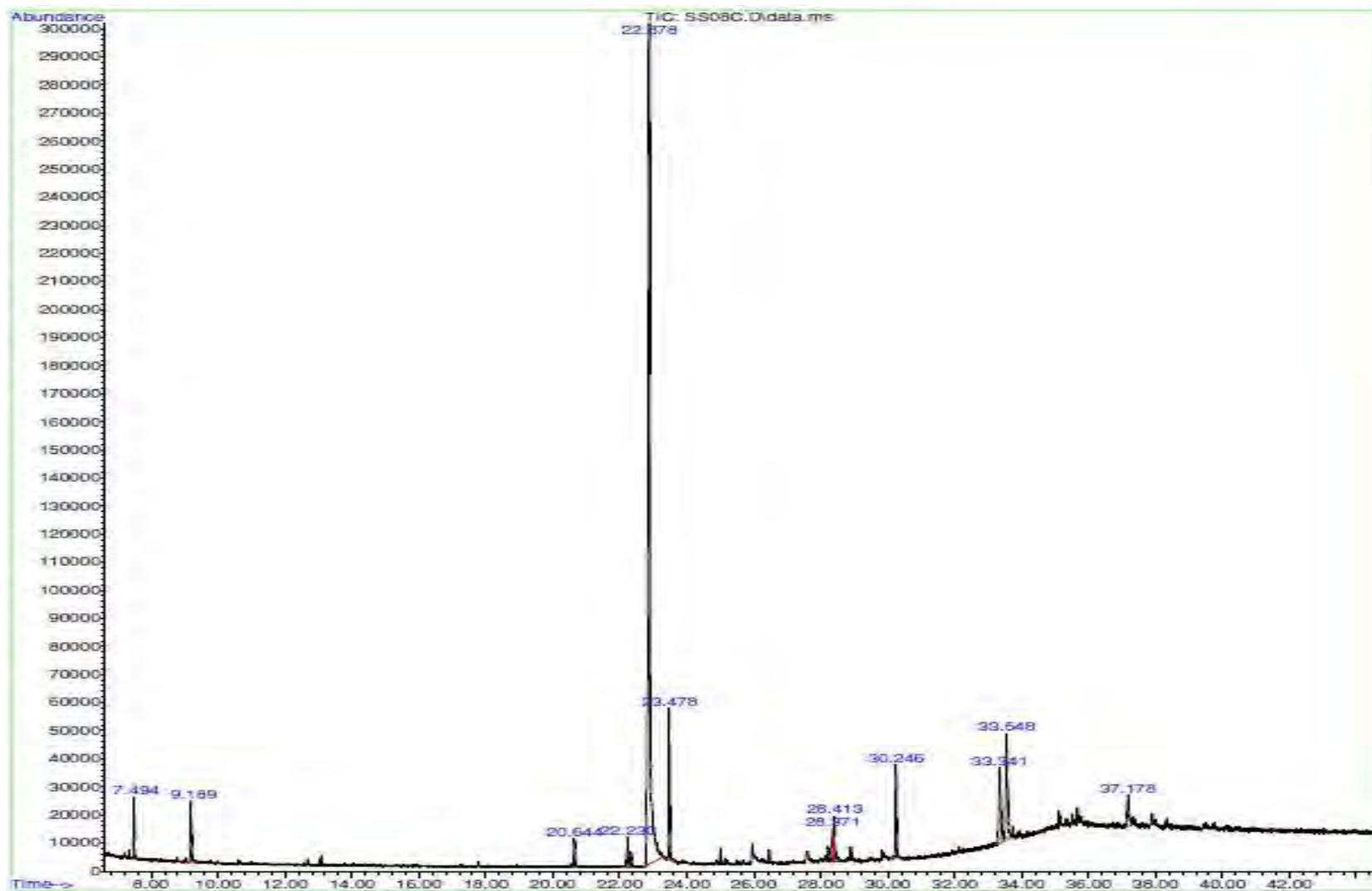
12:20:14

C:\Archivos de programa\Shimadzu\IRsolution  
\PrintTemplates\makro.pptm

### A5.2 ESPECTRO DE RMN<sup>1</sup>H DE LA MEZCLA C3

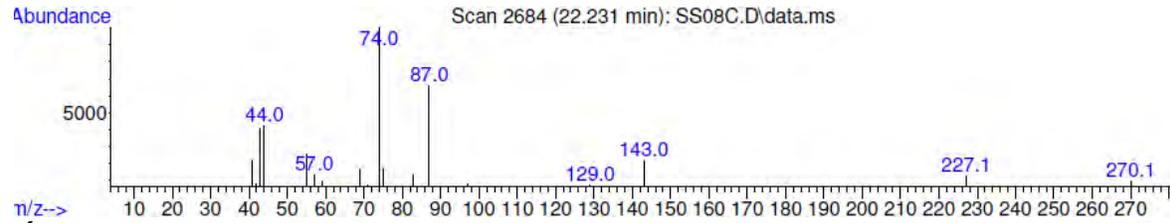


### A5.3 CORRIENTE IÓNICA RECONSTRUIDA DE LA MEZCLA C3

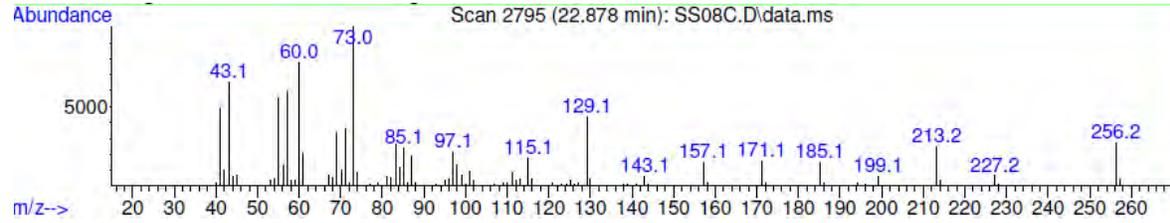


## A5.4 ESPECTROS DE MASAS DE LOS COMPONENTES DE LA MEZCLA C3

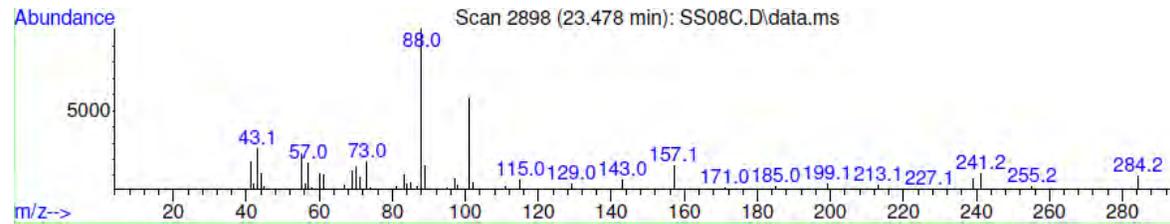
### Hexadecanoato de metilo



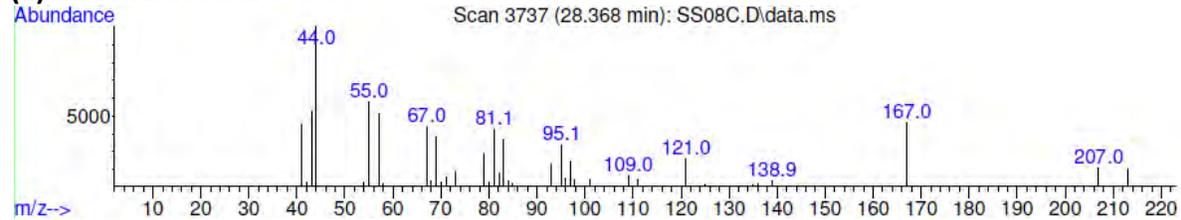
### Ácido n-Hexadecanoico



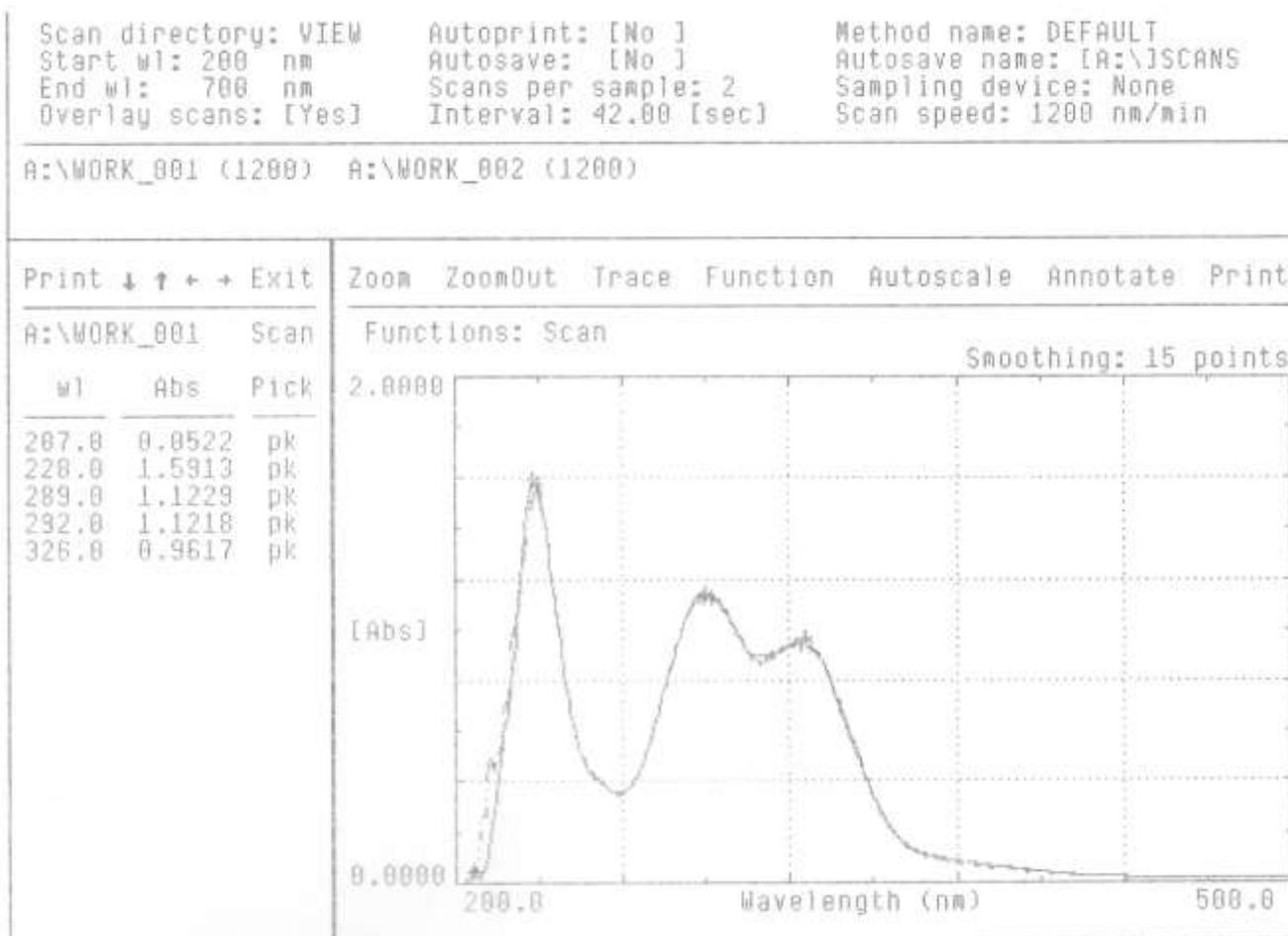
### Hexadecanoato de etilo



### (Z)-11-Hexadecenil acetato

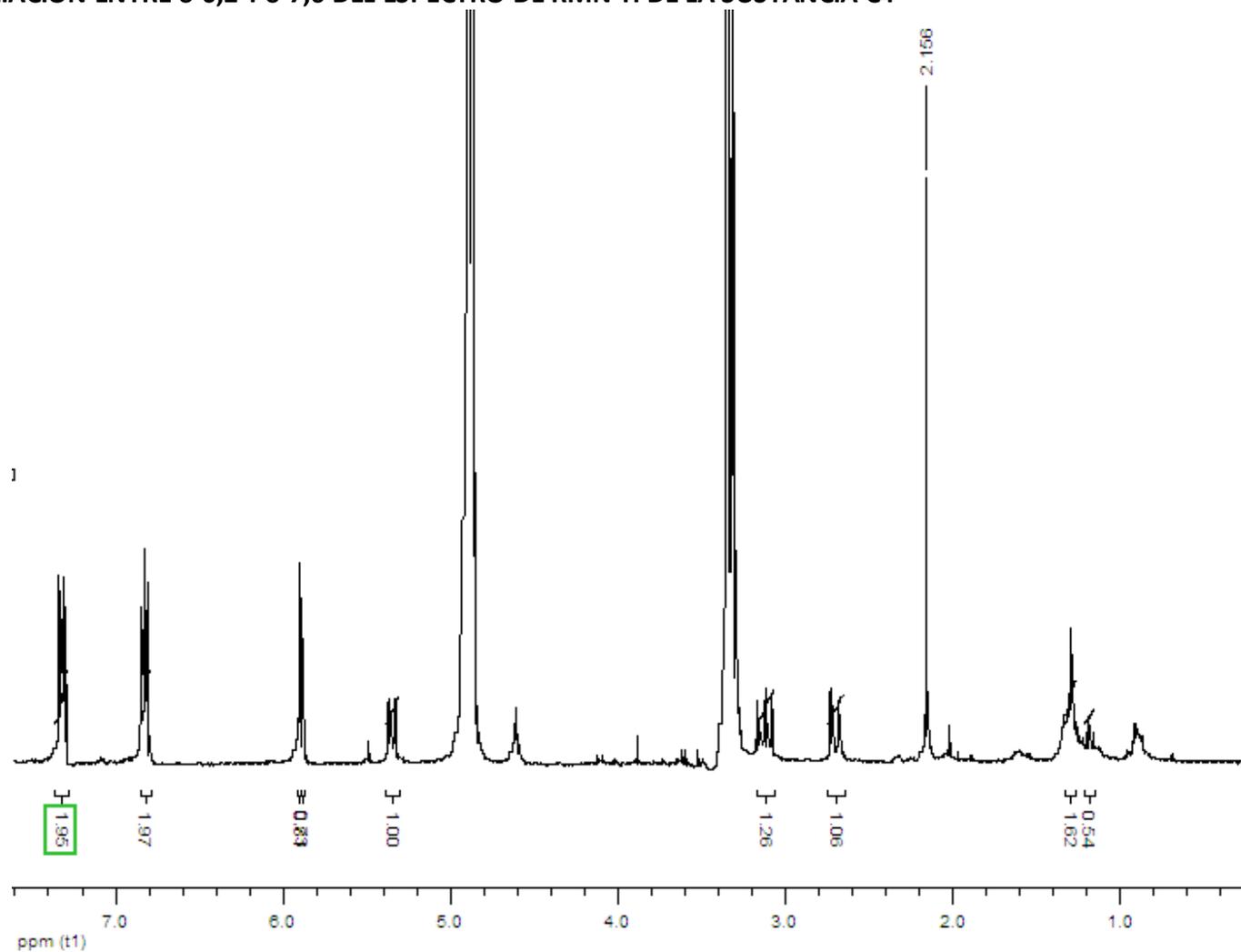


**ANEXO A6. ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICO Y CROMATOGRÁFICO DE LA SUSTANCIA C4**  
**A6.1 ESPECTRO DE UV-Vis DE LA SUSTANCIA C4**

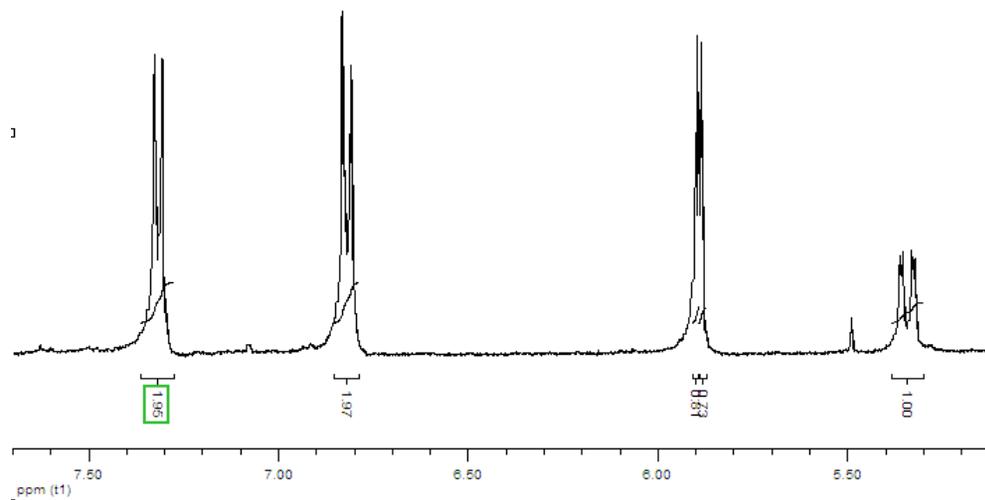


## A6.2 ESPECTRO DE RMN<sup>1</sup>H DE LA SUSTANCIA C4

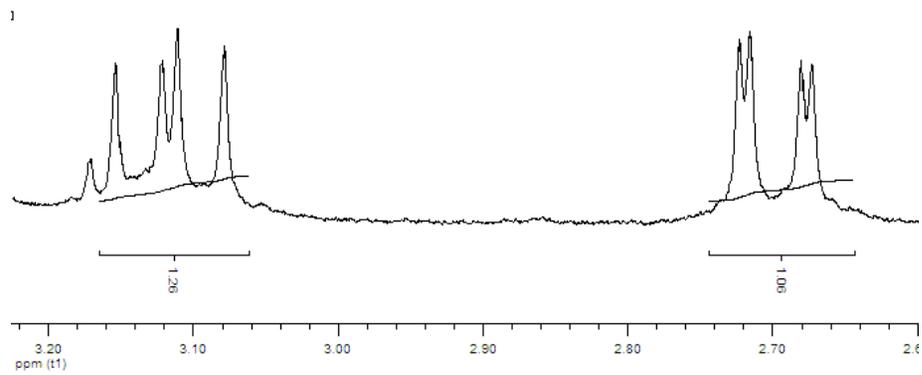
### A6.2.1 AMPLIACIÓN ENTRE $\delta$ 0,2 Y $\delta$ 7,6 DEL ESPECTRO DE RMN<sup>1</sup>H DE LA SUSTANCIA C4



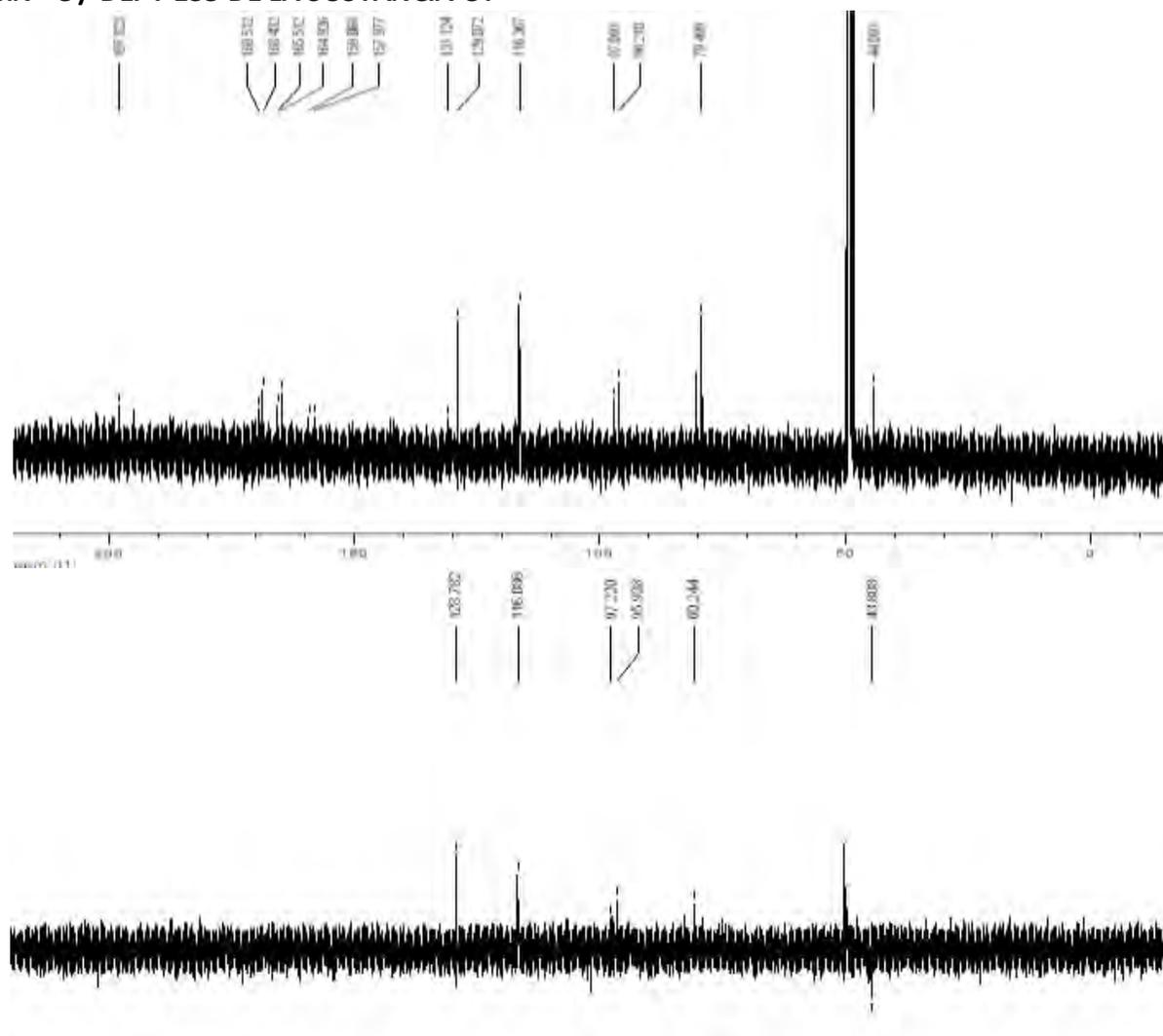
### A6.2.2 AMPLIACIÓN ENTRE $\delta$ 5,1 Y $\delta$ 7,7 DEL ESPECTRO DE RMN<sup>1</sup>H DE LA SUSTANCIA C4



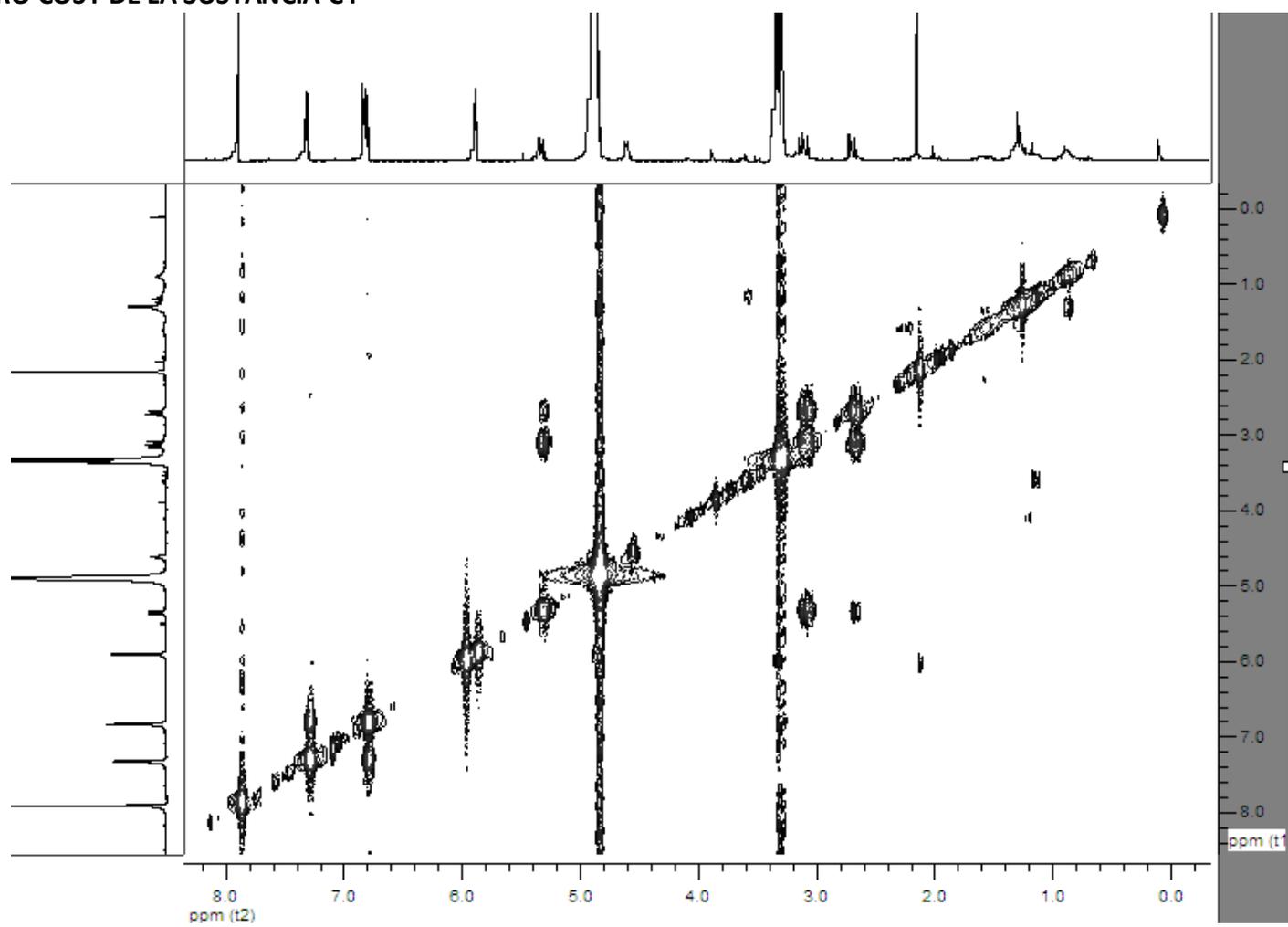
### A6.2.3 AMPLIACIÓN ENTRE $\delta$ 2,6 Y $\delta$ 3,2 DEL ESPECTRO DE RMN<sup>1</sup>H DE LA SUSTANCIA C4



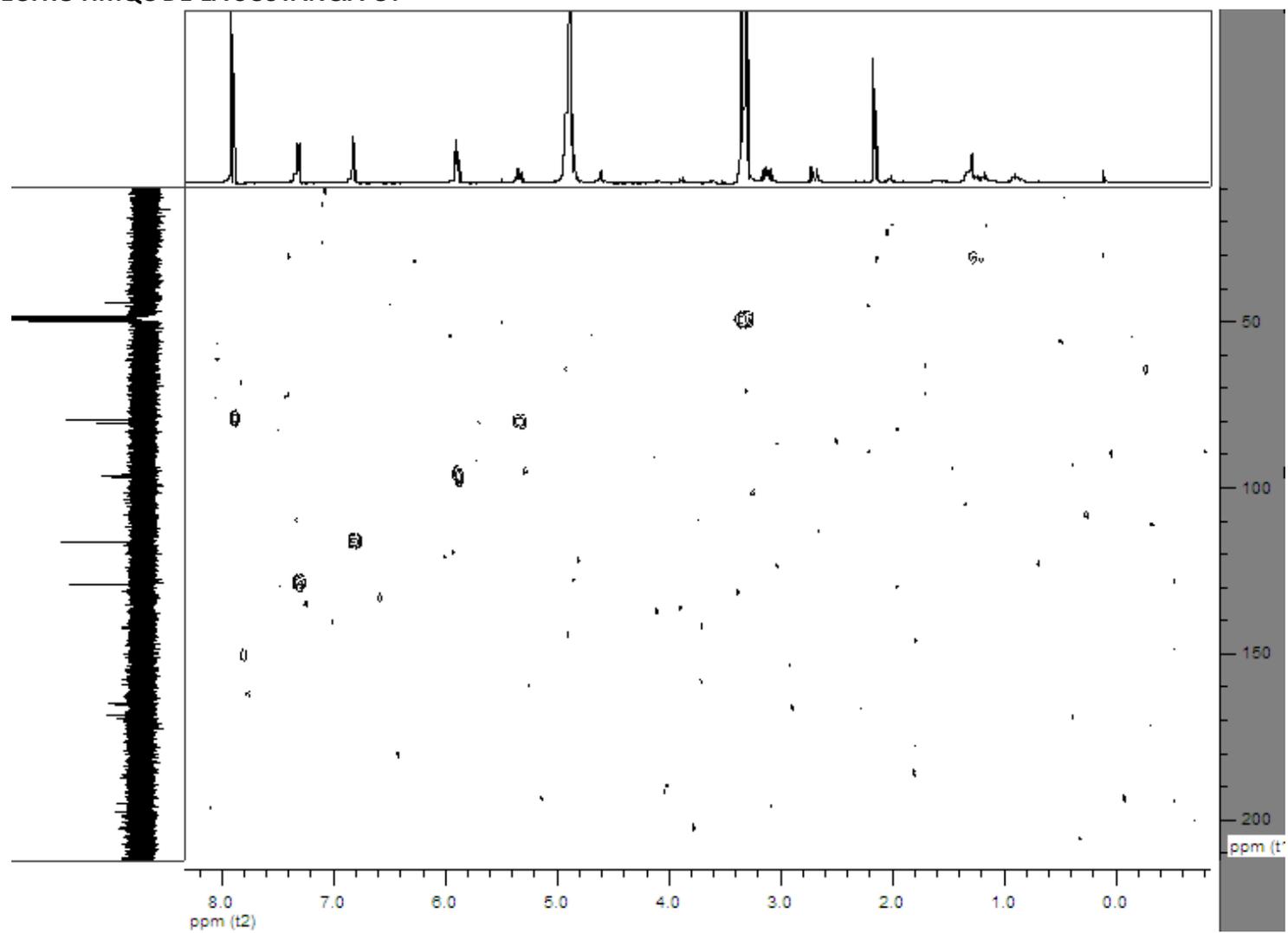
### A6.3 ESPECTROS RMN<sup>13</sup>C / DEPT 135 DE LA SUSTANCIA C4



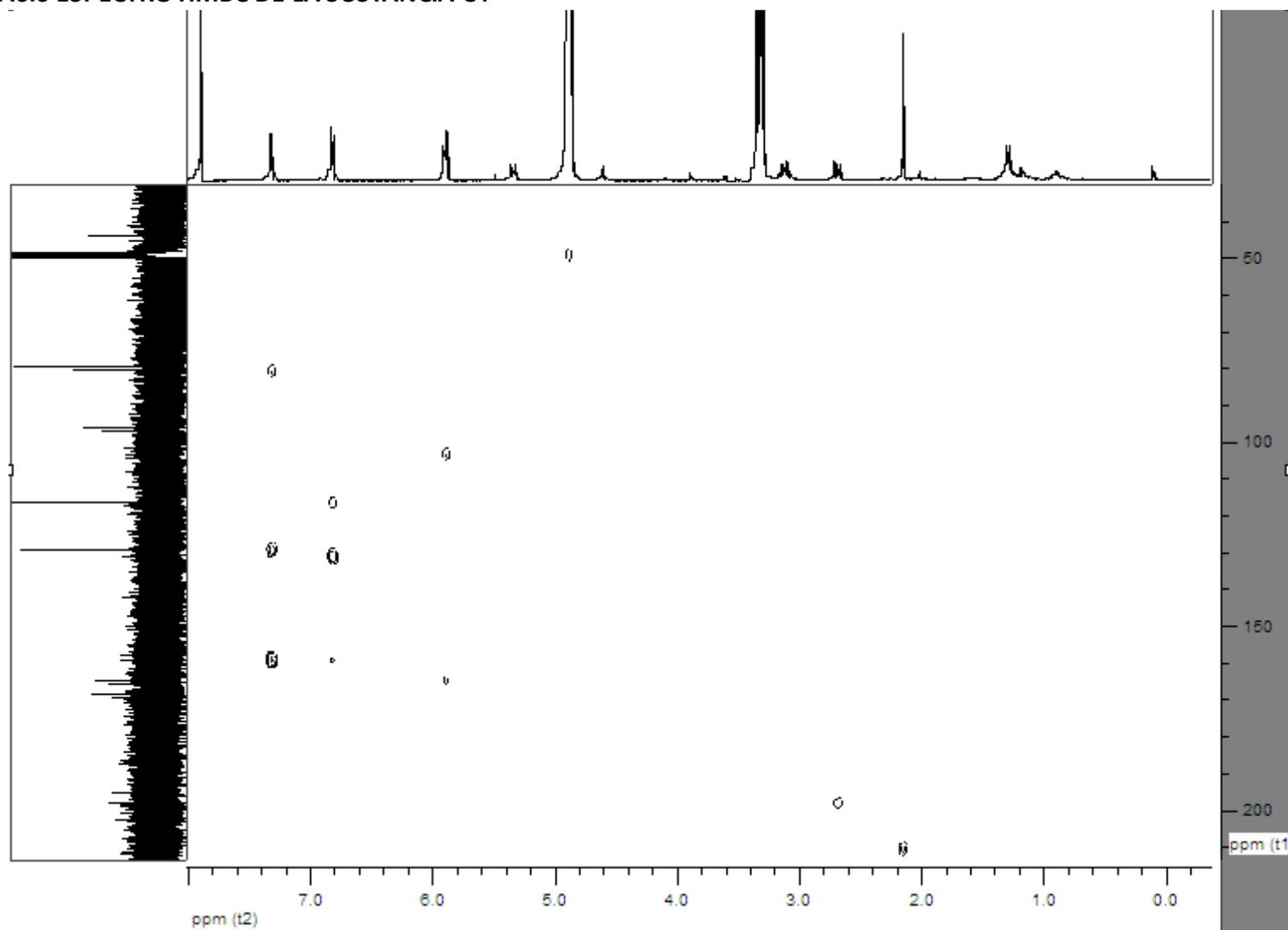
#### A6.4 ESPETRO COSY DE LA SUSTANCIA C4



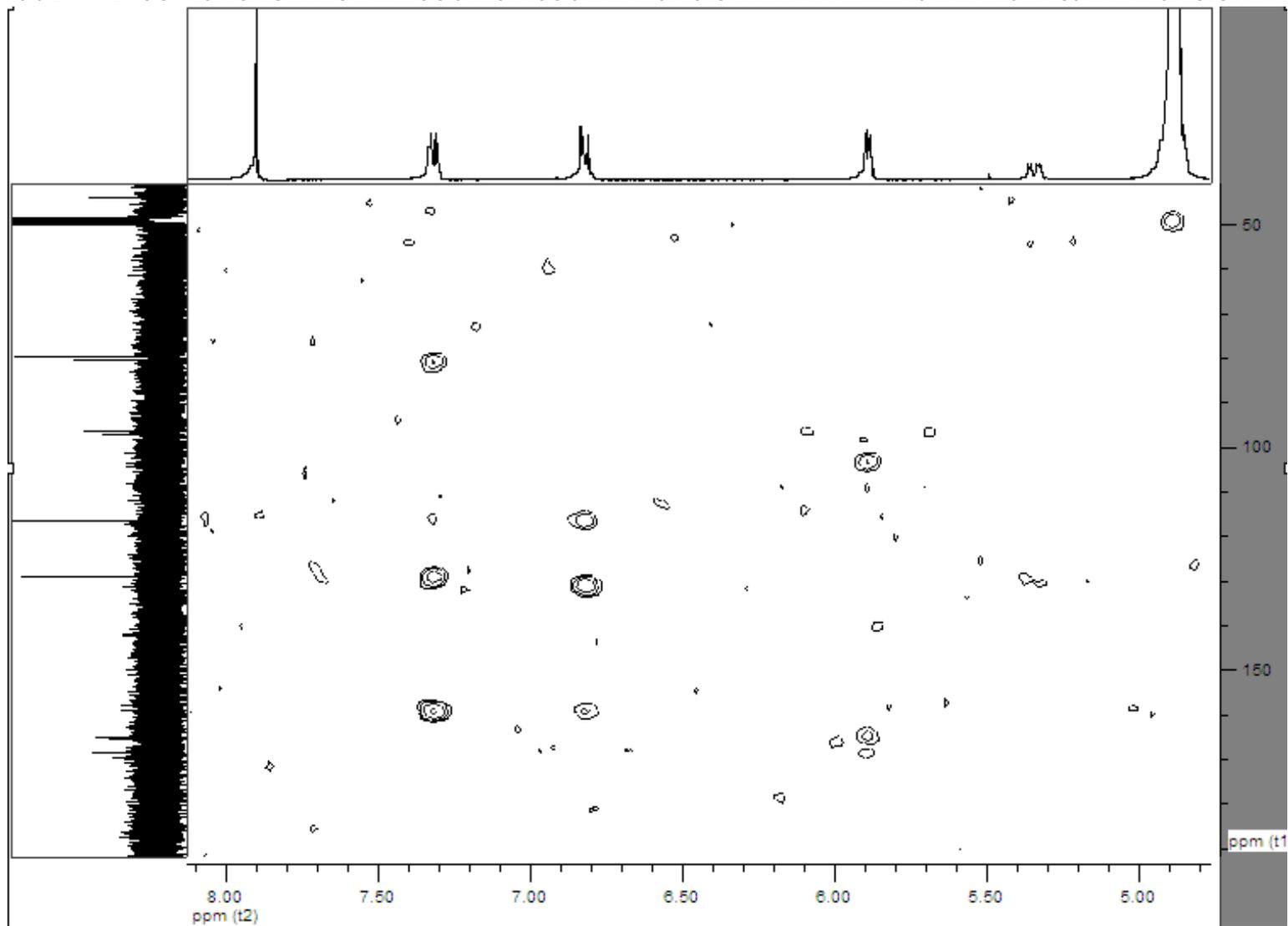
### A6.5 ESPECTRO HMQC DE LA SUSTANCIA C4



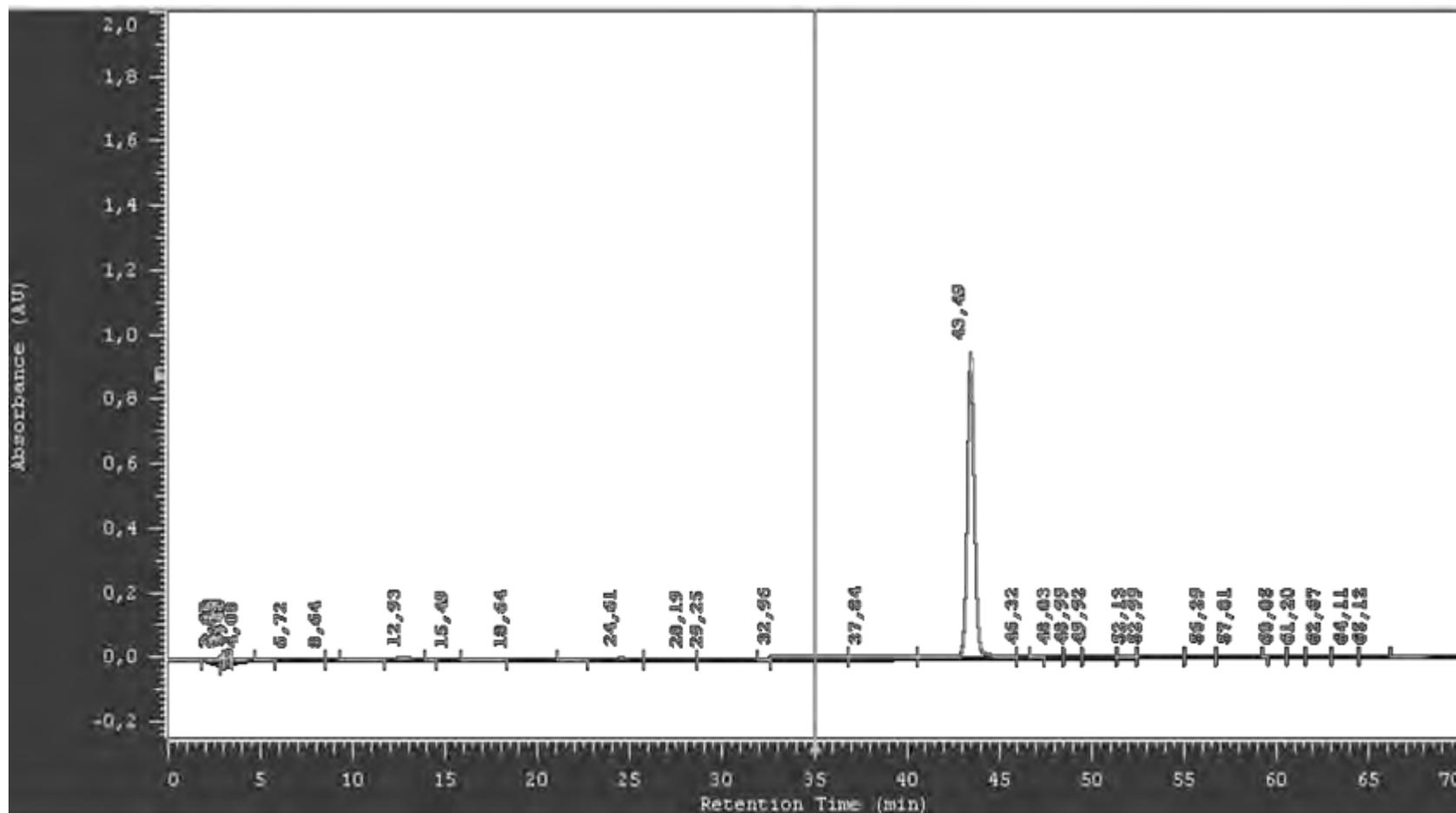
### A6.6 ESPECTRO HMBC DE LA SUSTANCIA C4



A6.6.1 AMPLIACION ESPECTRO HMBC ENTRE  $\delta$  8.0 HASTA  $\delta$  5.0 PPM RESPECTO A  $\text{RMN}^1\text{H}$  Y ENTRE 40 PPM HASTA 180 PPM RESPECTO A  $\text{RMN}^{13}\text{C}$

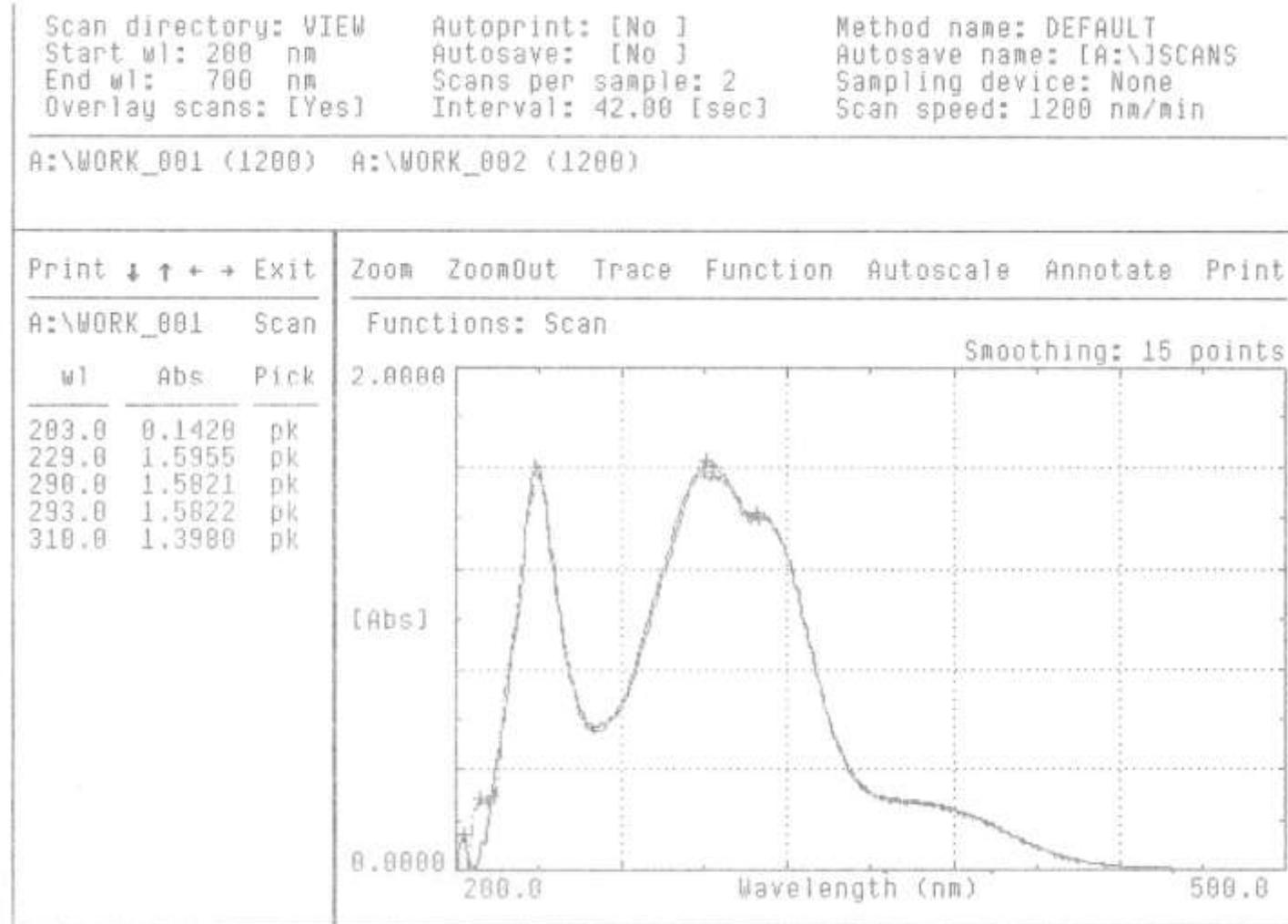


### A6.7 PERFIL CROMATOGRÁFICO OBTENIDO POR HPLC-DAD PARA LA SUSTANCIA C4



## ANEXO A7. ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICO Y CROMATOGRÁFICO DE LA SUSTANCIA C5

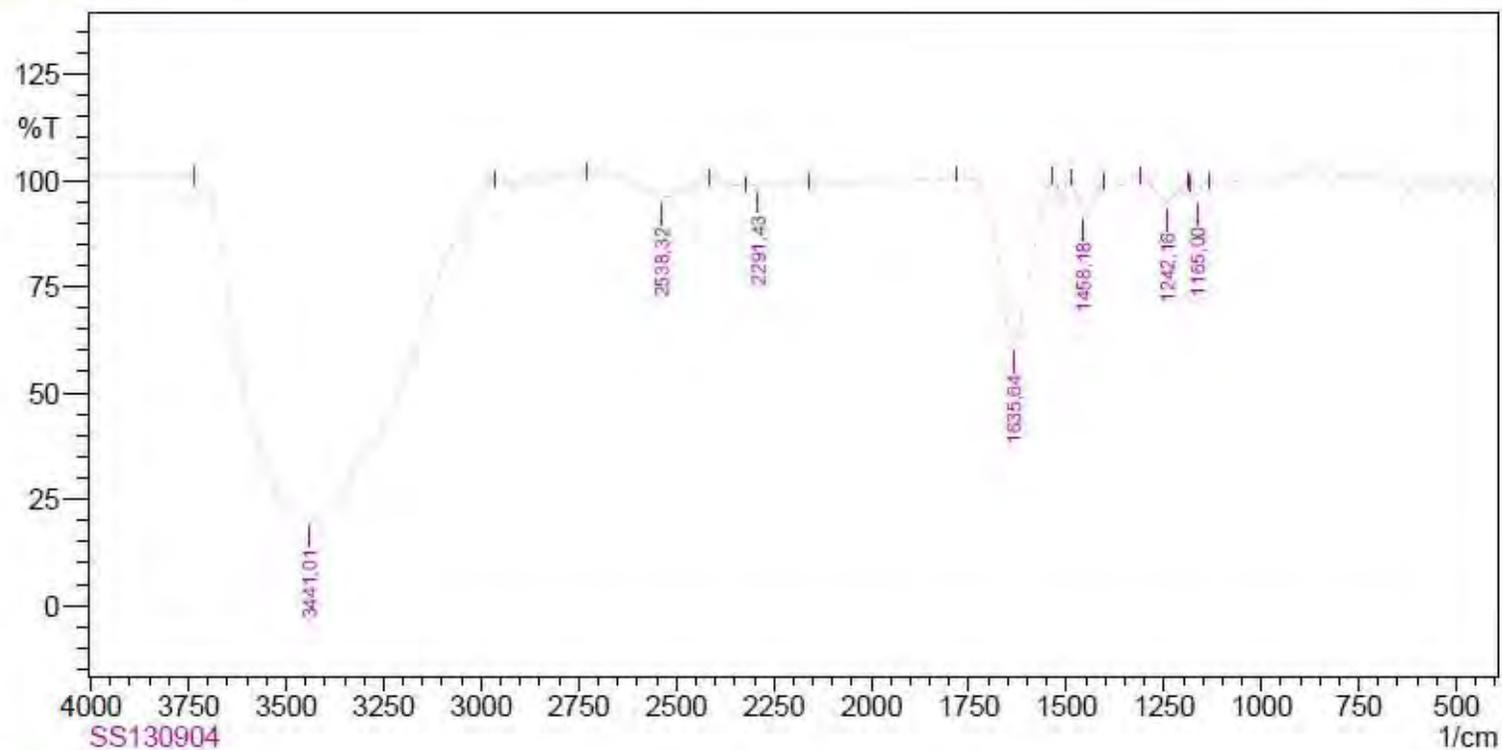
### A7.1 ESPECTRO UV-Vis DE LA SUSTANCIA C5



## A7.2 ESPECTRO DE INFRARROJO DE LA SUSTANCIA C5



GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN MACROMOLECULAS  
LABORATORIO DE ESPECTROSCOPIA MACROMOLÉCULAS 226  
ANÁLISIS INFRARROJO

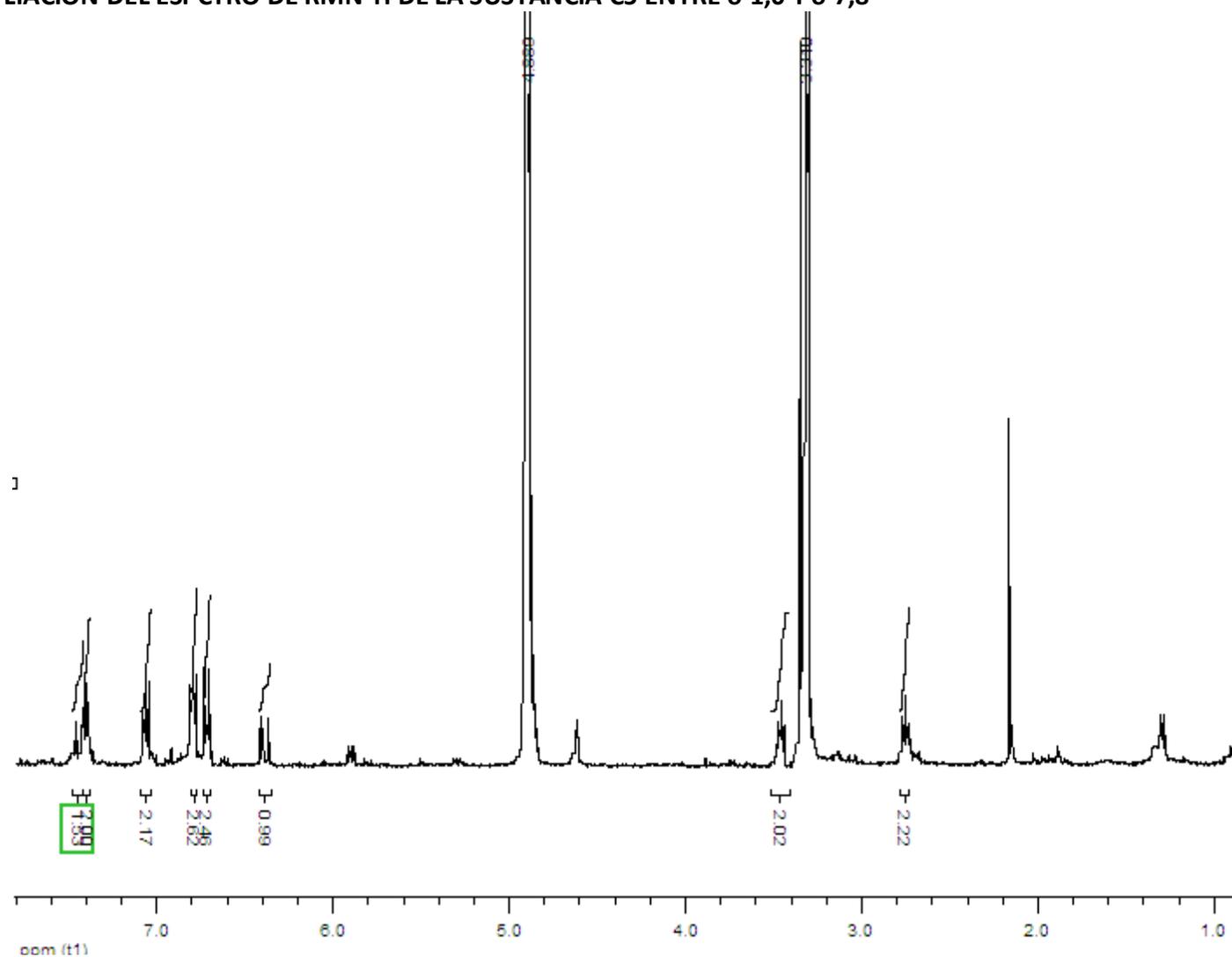


14/03/2011 12:11:23

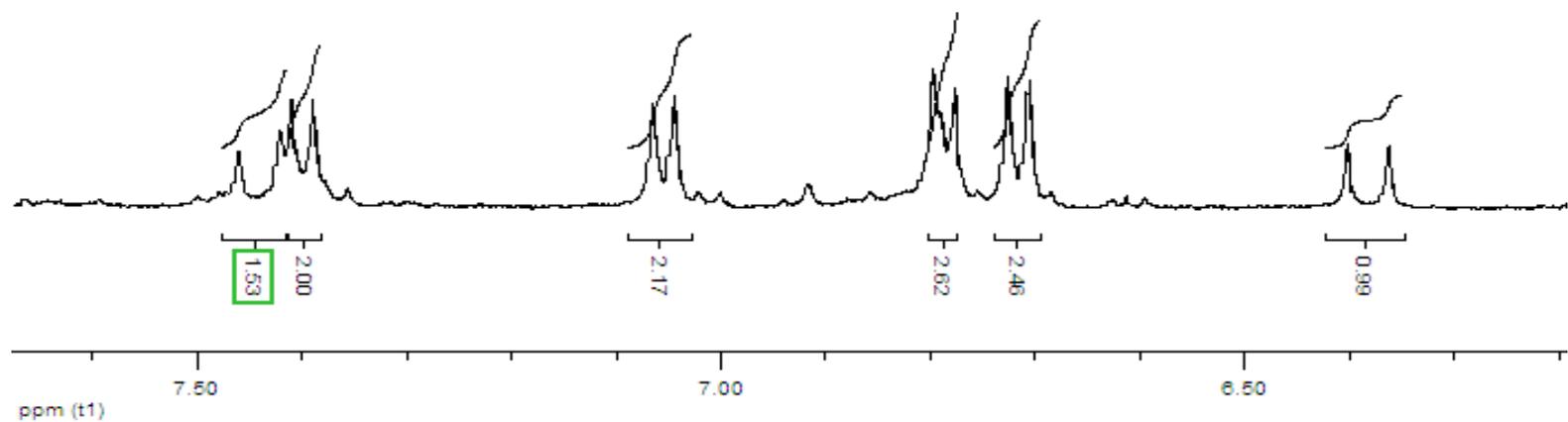
C:\Archivos de programa\Shimadzu\IRsolution  
\PrintTemplates\makro.ptm

## A7.3 ESPECTRO DE RMN<sup>1</sup>H DE LA SUSTANCIA C5

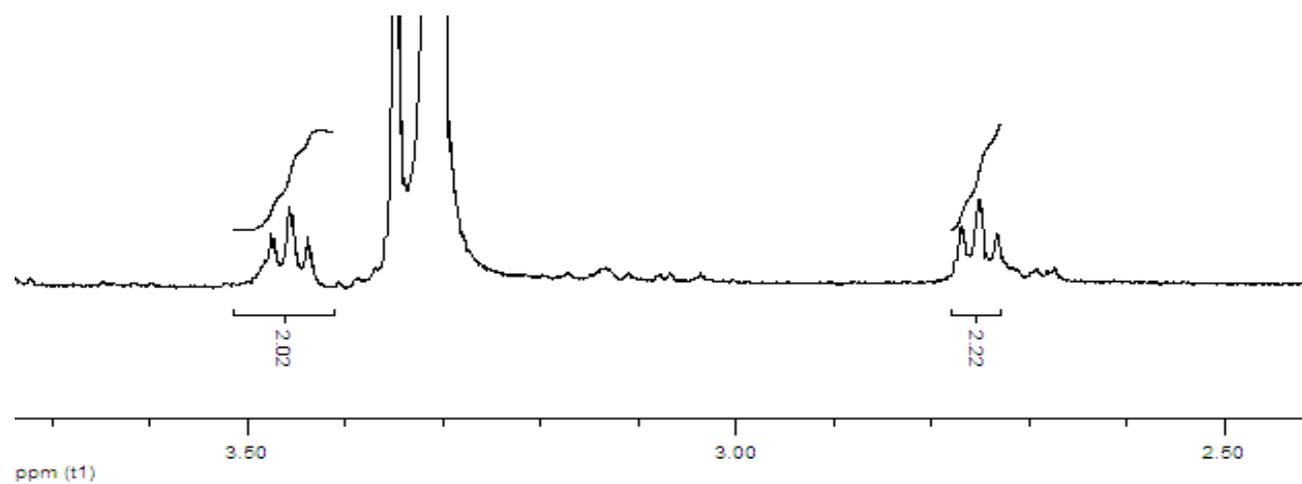
### A7.3.1 AMPLIACIÓN DEL ESPCTRO DE RMN<sup>1</sup>H DE LA SUSTANCIA C5 ENTRE $\delta$ 1,0 Y $\delta$ 7,8



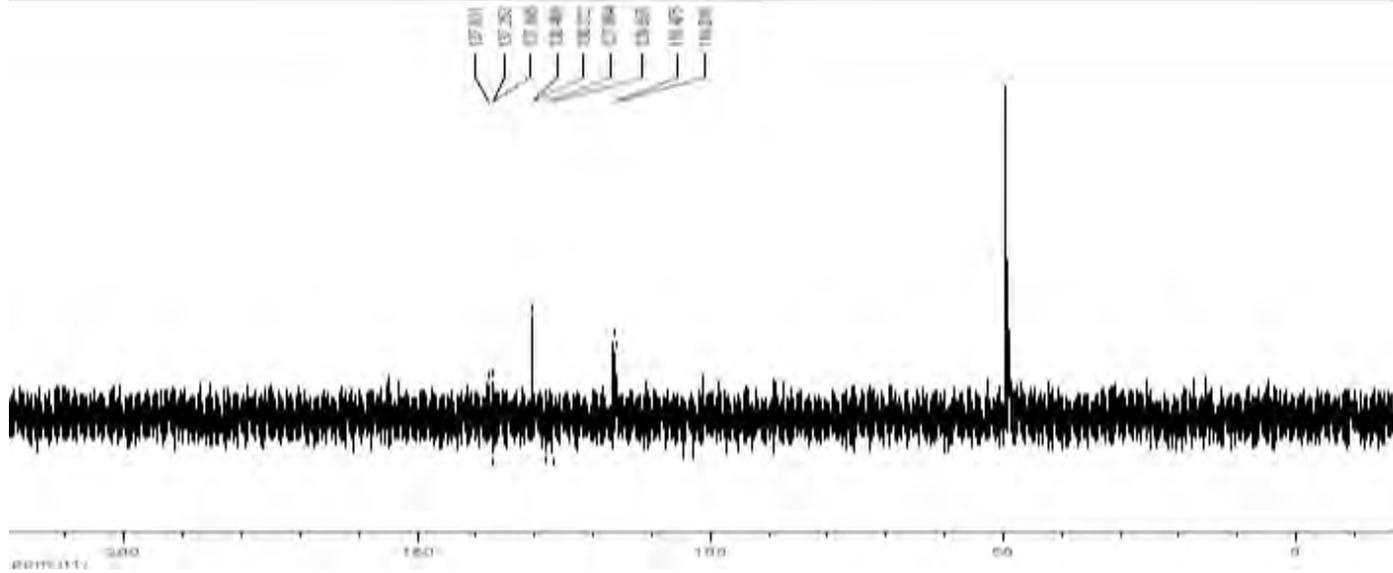
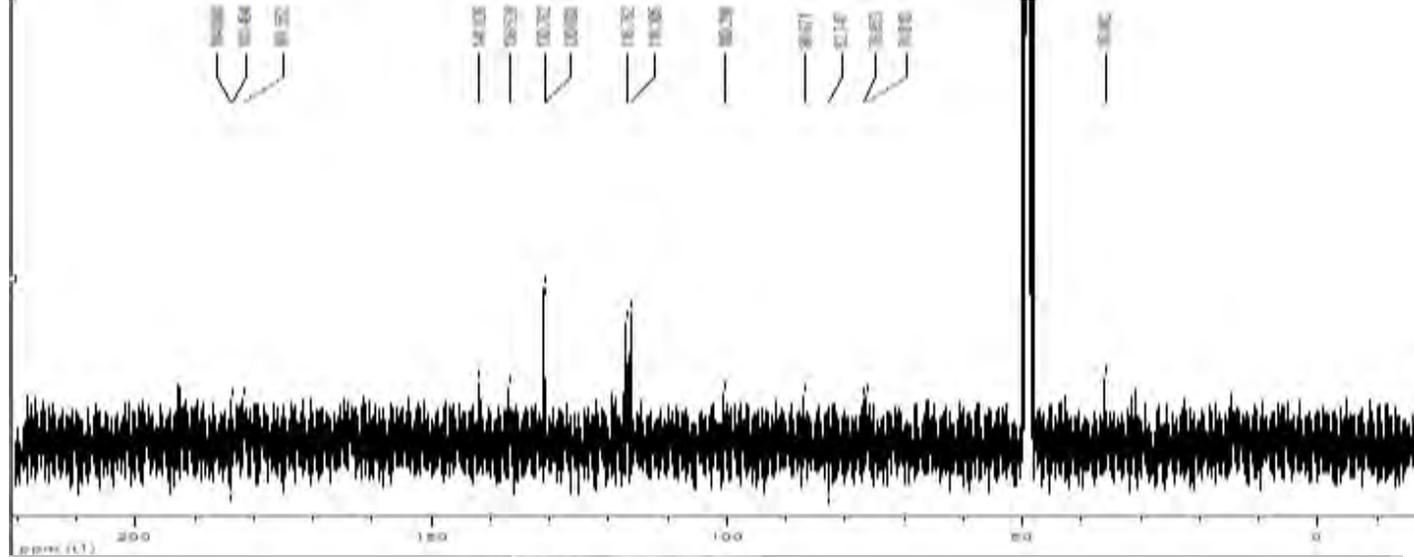
### A7.3.2 AMPLIACIÓN DEL ESPCTRO DE RMN<sup>1</sup>H DE LA SUSTANCIA C5 ENTRE $\delta$ 6,2 Y $\delta$ 7,7



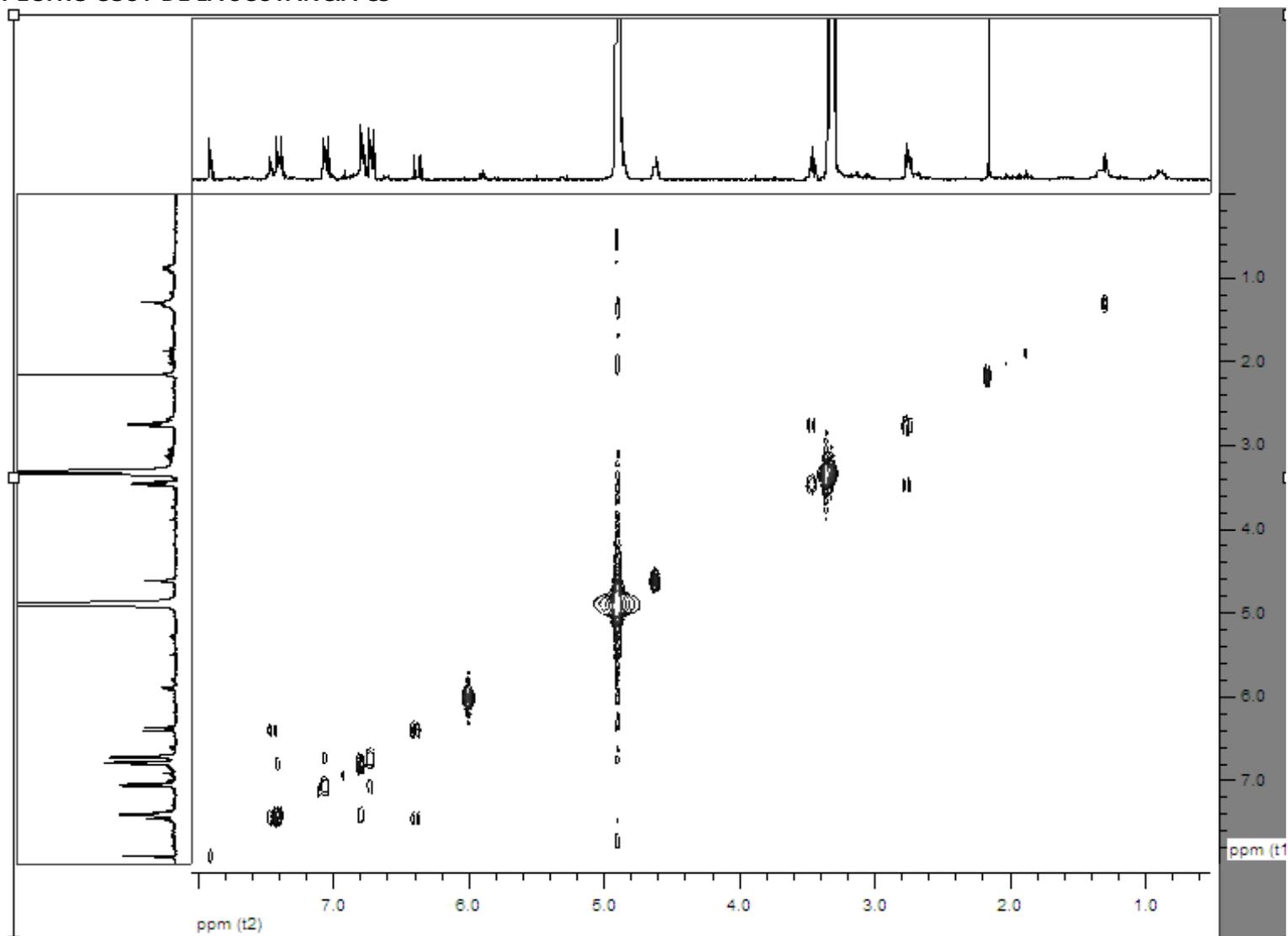
### A7.3.3 AMPLIACIÓN DEL ESPCTRO DE RMN<sup>1</sup>H DE LA SUSTANCIA C5 ENTRE δ 2,4 Y δ 3,7



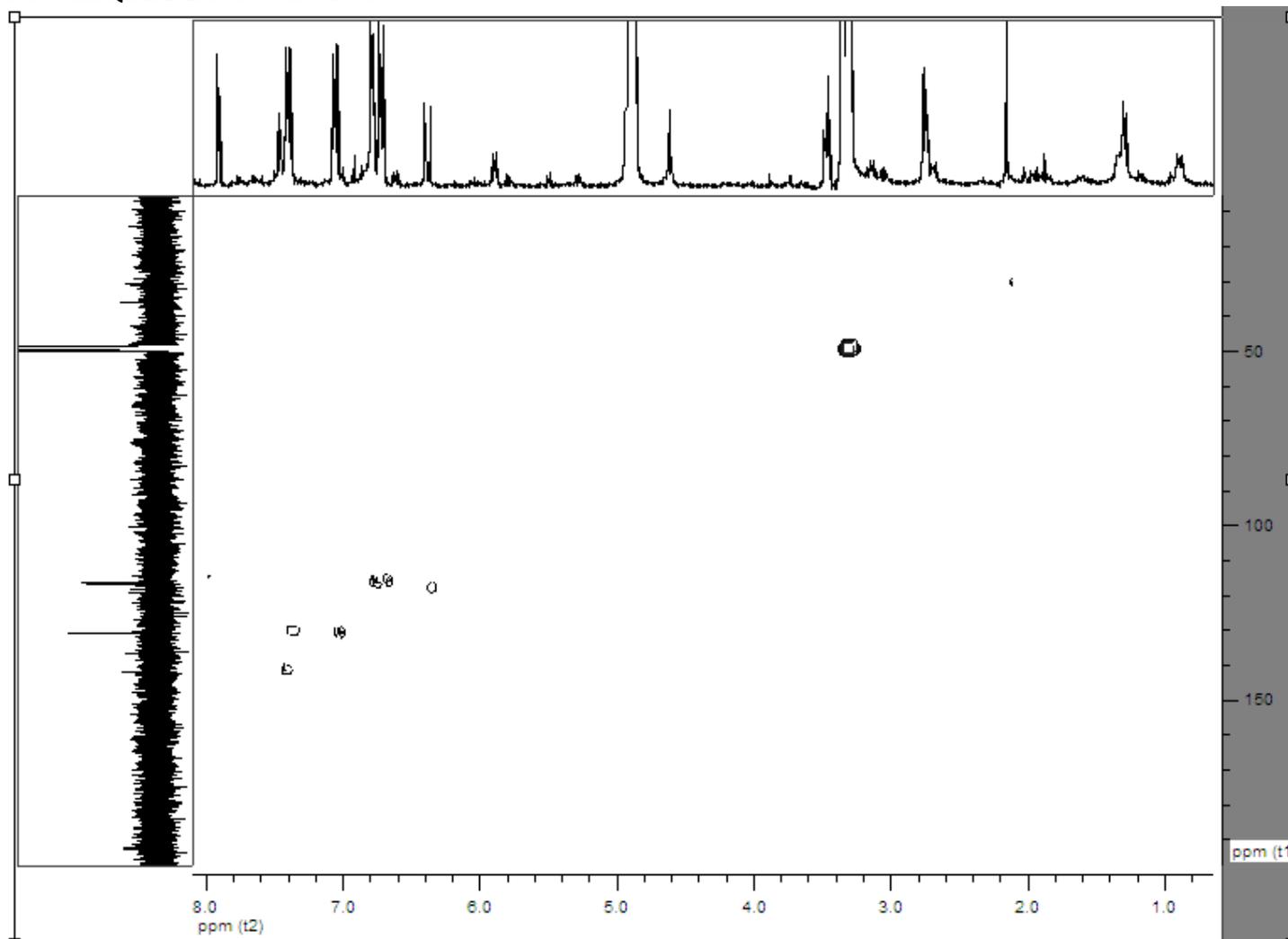
A7.4 ESPECTROS DE RMN<sup>13</sup>C / DEPT 135 DE LA SUSUTANCIA C5



### A7.5 ESPECTRO COSY DE LA SUSTANCIA C5

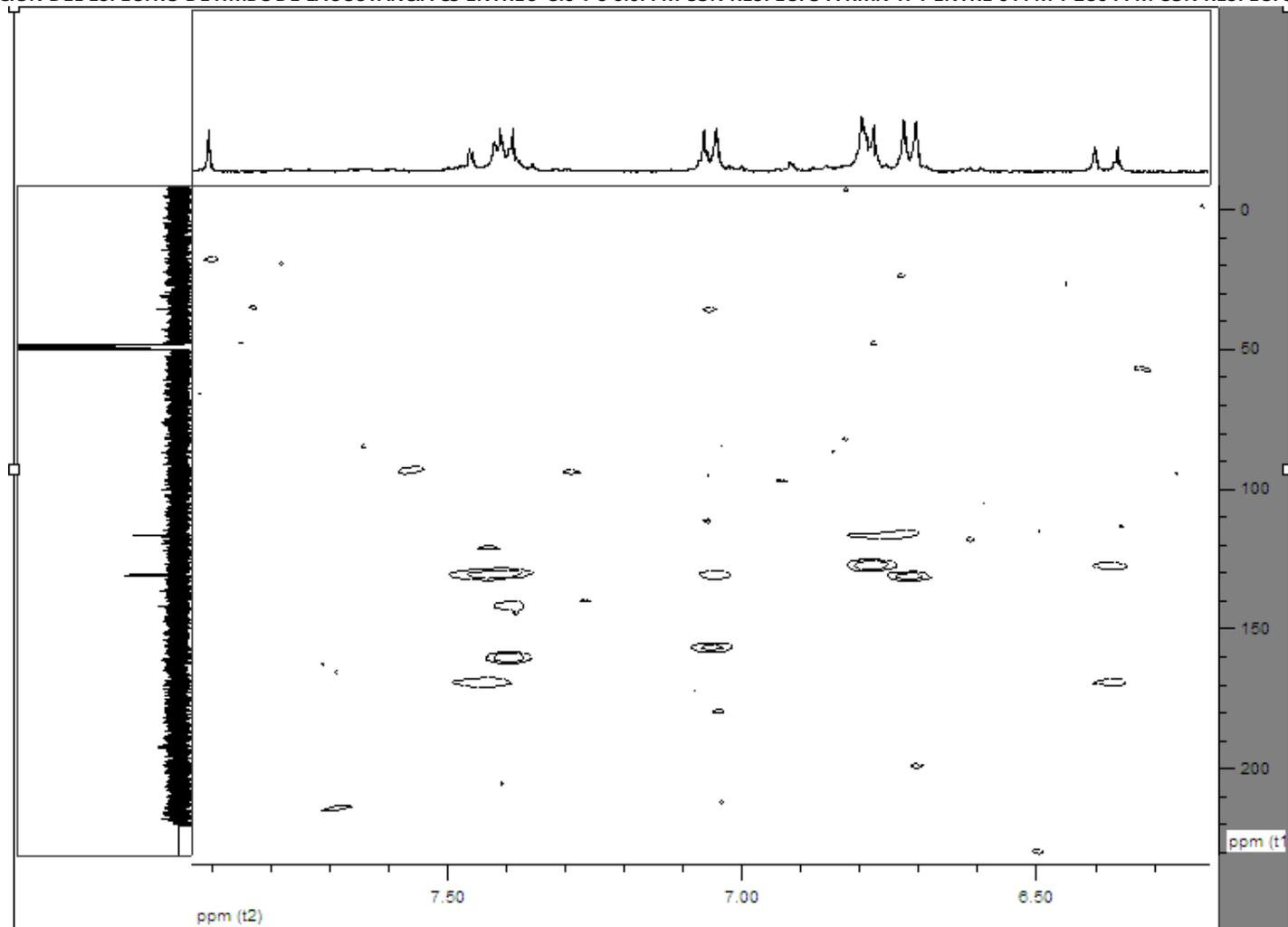


### A7.6 ESPECTRO HMQC DE LA SUSTANCIA C5

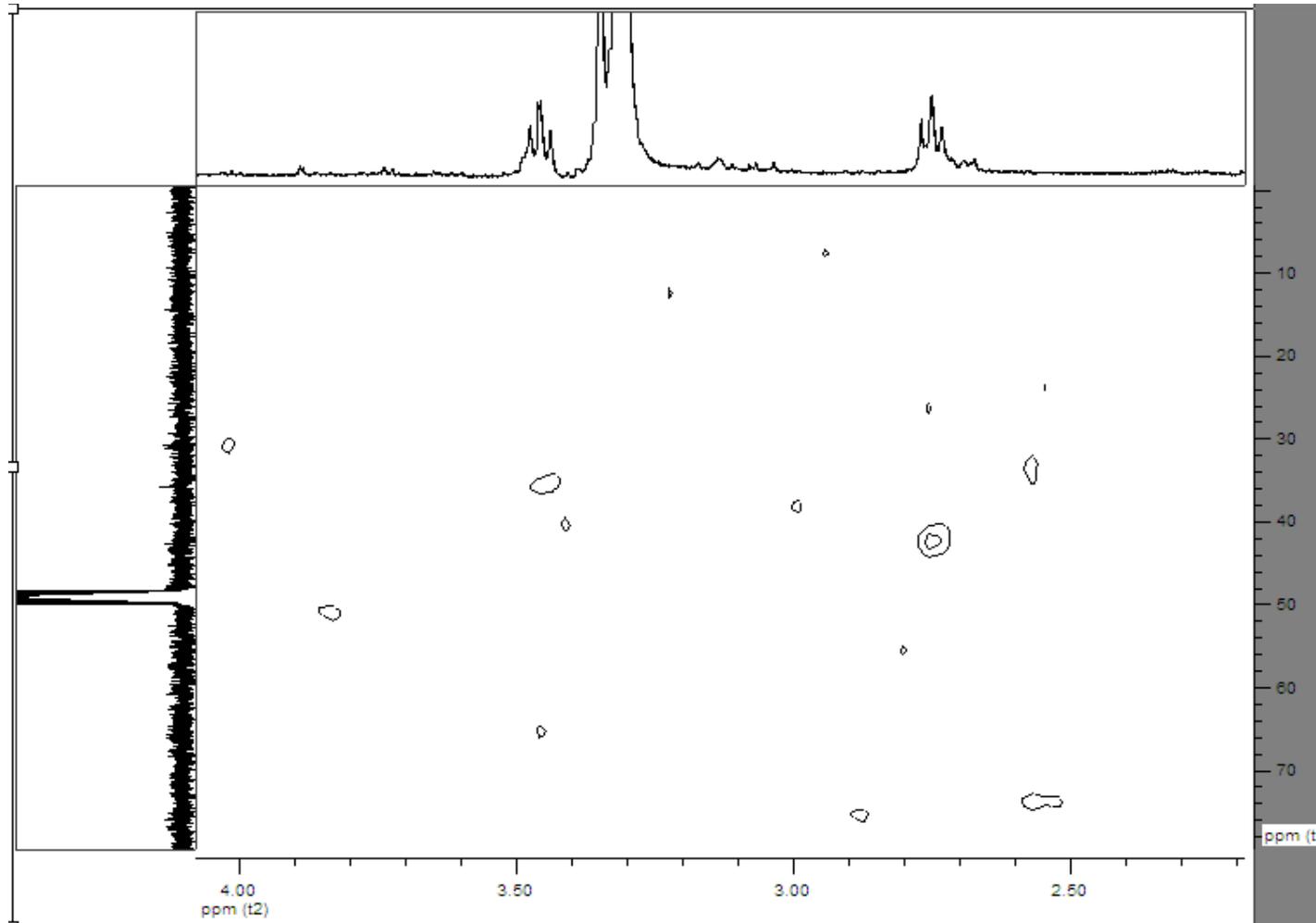


## A7.7 ESPECTRO HMBC DE LA SUSTANCIA C5

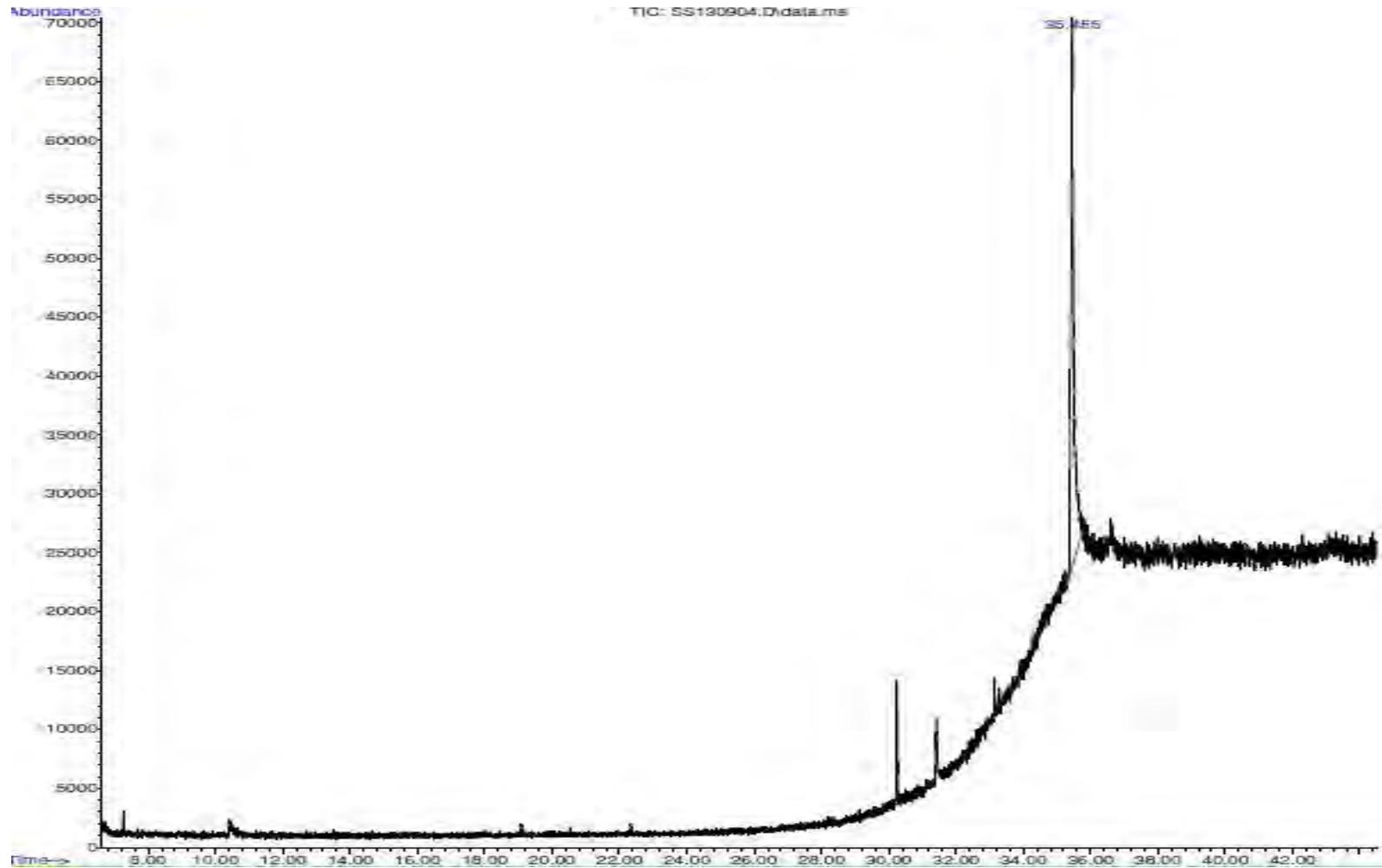
A7.7.1 AMPLIACIÓN DEL ESPECTRO DE HMBC DE LA SUSTANCIA C5 ENTRE  $\delta$  8.0 Y  $\delta$  6.0 PPM CON RESPECTO A  $\text{RMN}^1\text{H}$  Y ENTRE 0 PPM Y 230 PPM CON RESPECTO A  $\text{RMN}^{13}\text{C}$

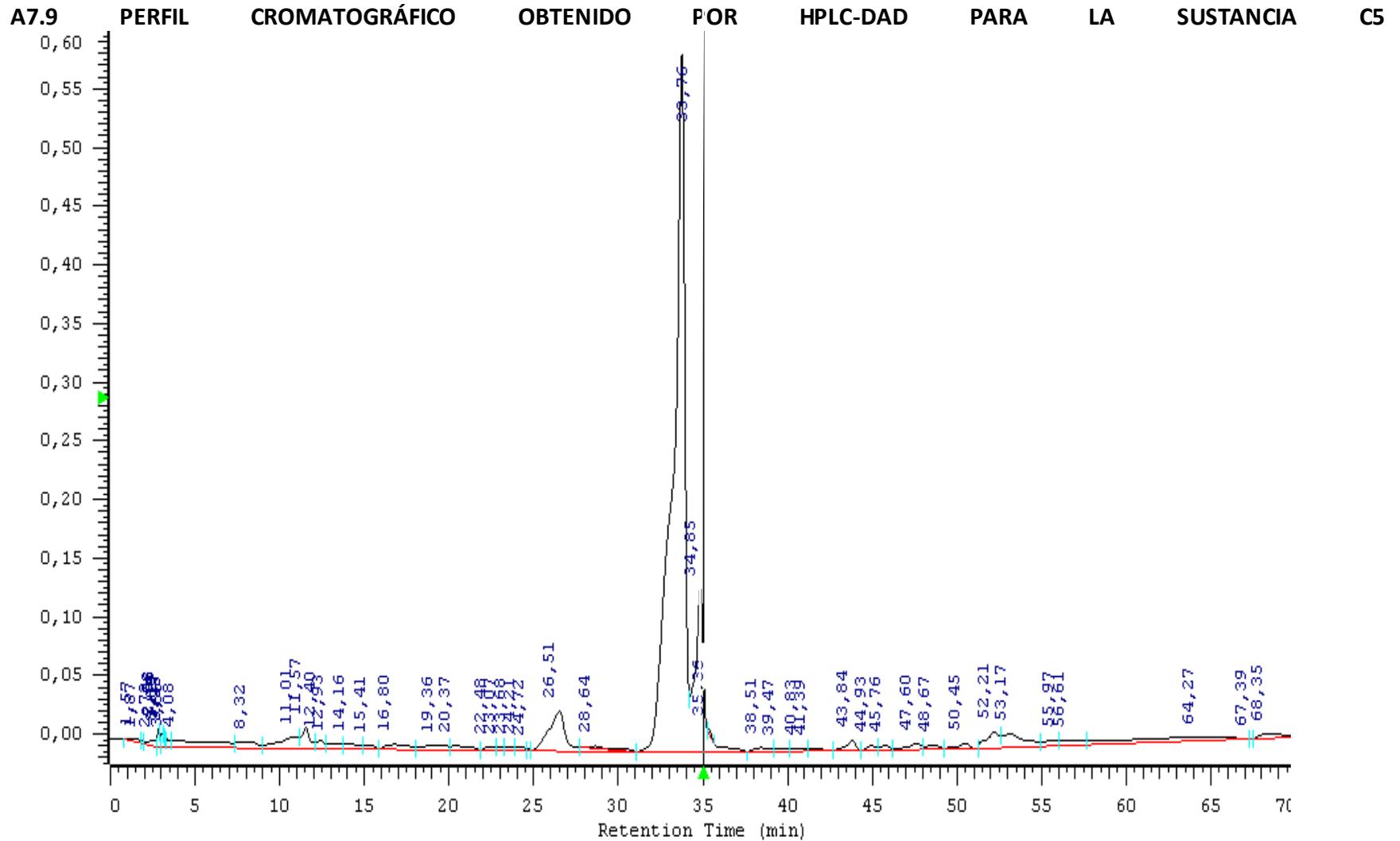


A7.7.2 AMPLIACIÓN DEL ESPECTRO DE HMBC DE LA SUSTANCIA C5 ENTRE  $\delta$  2.0 Y  $\delta$  4.0 PPM CON RESPECTO A  $\text{RMN}^1\text{H}$  Y ENTRE 0 PPM Y 80 PPM CON RESPECTO A  $\text{RMN}^{13}\text{C}$



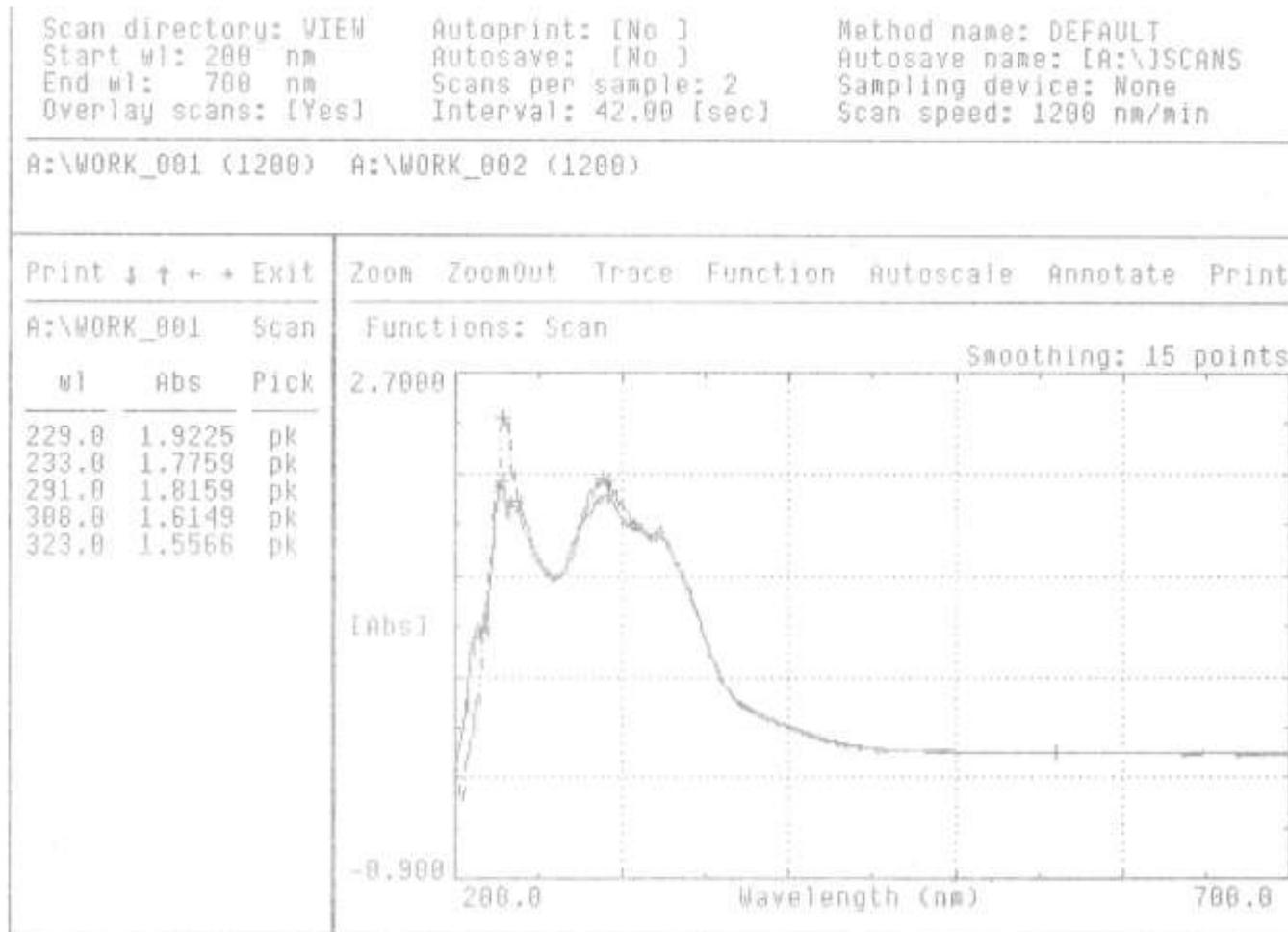
### A7.8 CORRIENTE IONICA RECONSTRUIDA DE LA SUSTANCIA C5



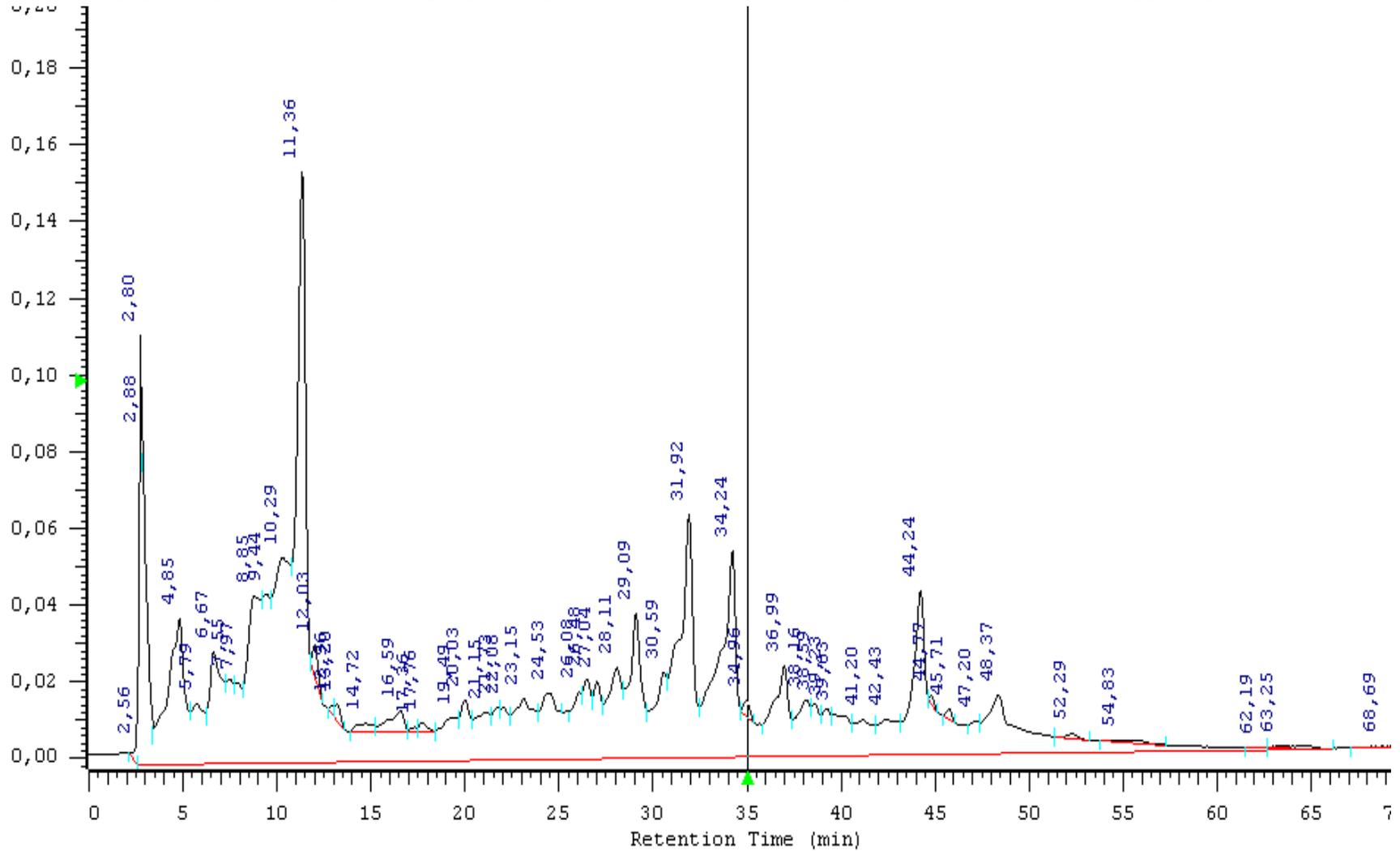


**ANEXO A8. PERFILES CROMATOGRÁFICOS Y ESPECTROS UV-Vis DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS OBTENIDOS**

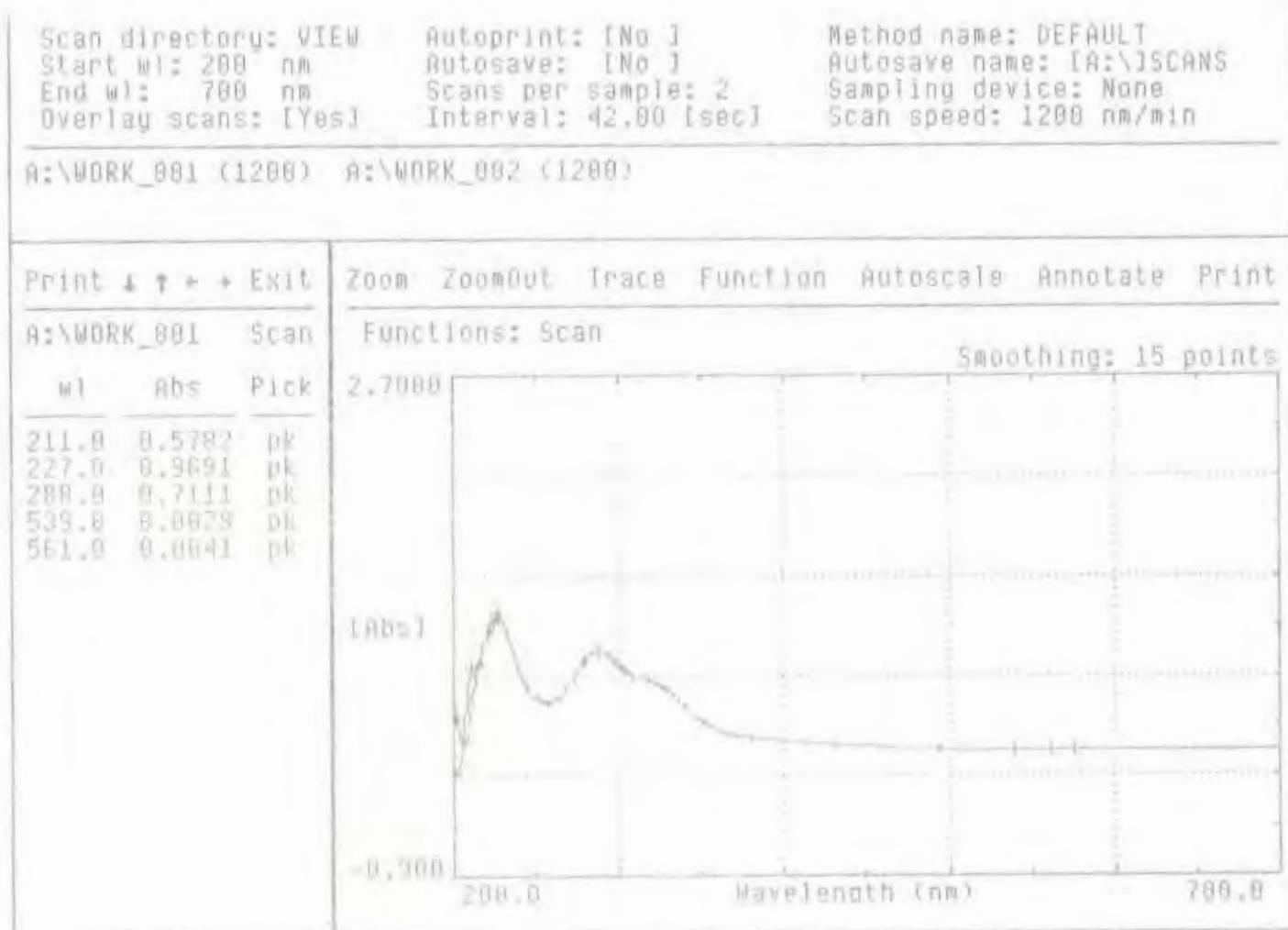
**A8.1 ESPECTRO UV-Vis DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE EPICARPIO DE COCONA OVALADA**



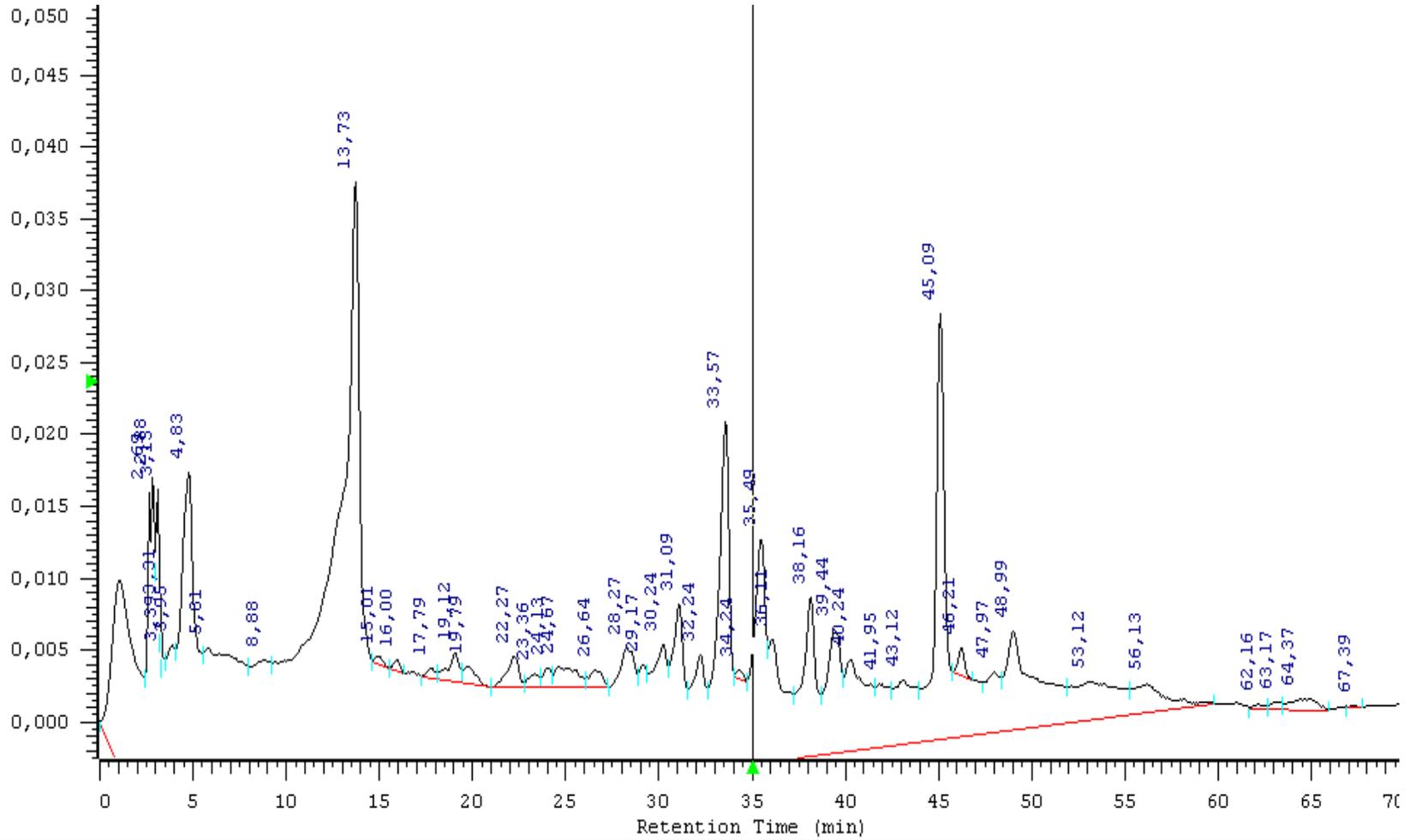
### A8.2 PERFIL CROMATOGRÁFICO OBTENIDO POR HPLC-DAD DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE EPICARPIO DE COCONA OVALADA



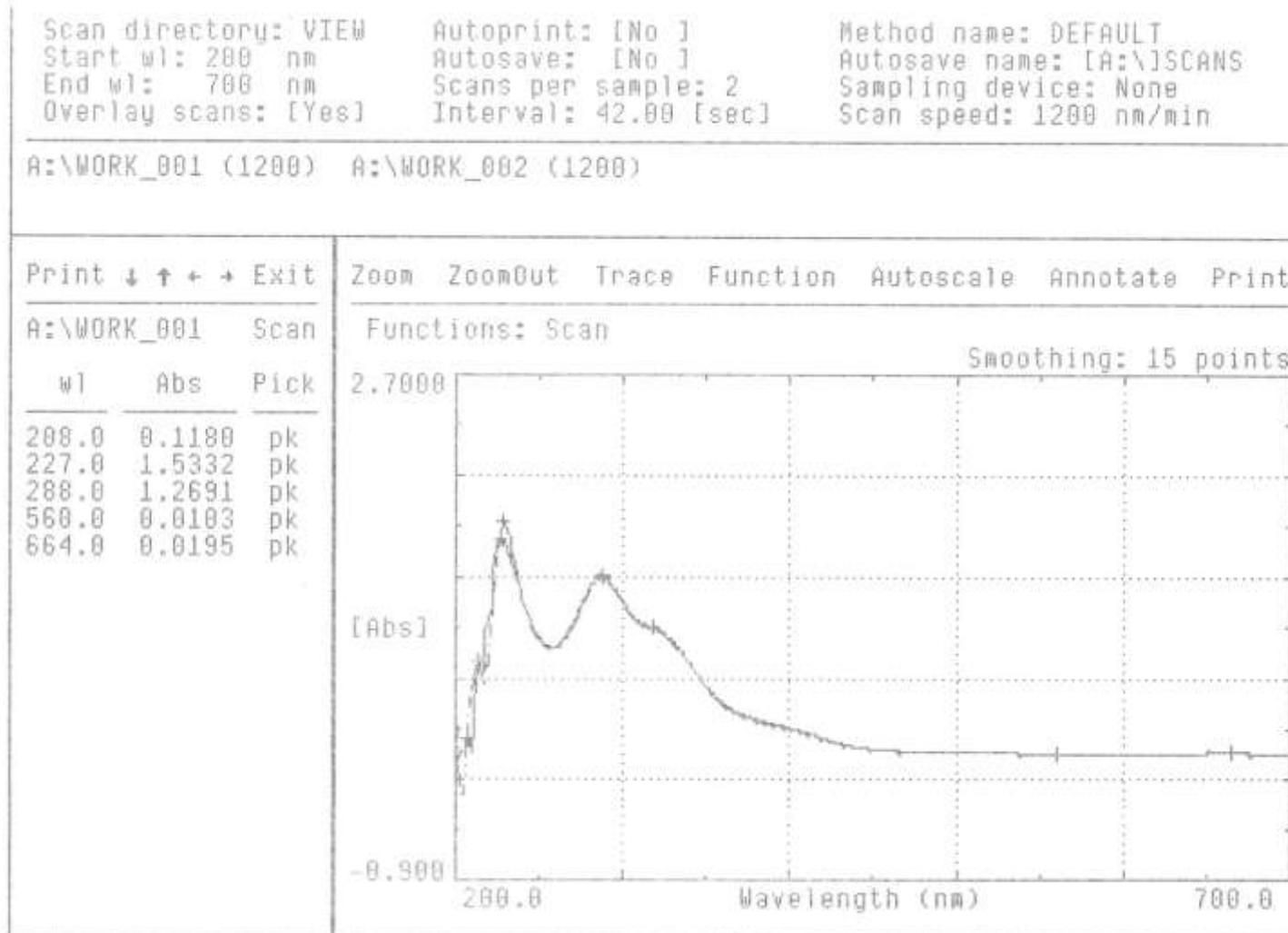
A8.3 ESPECTRO UV - Vis DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE EPICARPIO DE COCONA REDONDA PEQUEÑA



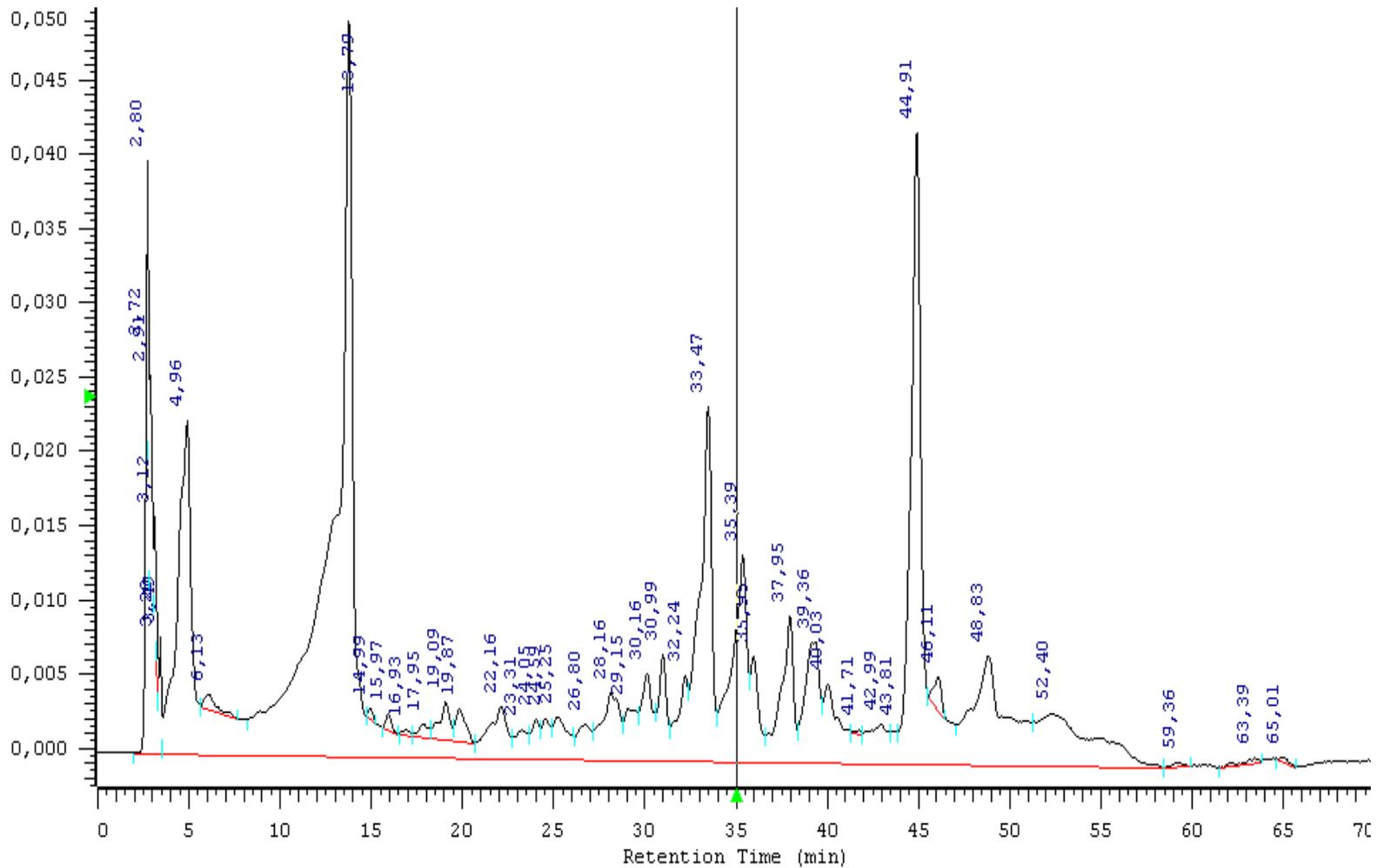
#### A8.4 PERFIL CROMATOGRÁFICO OBTENIDO POR HPLC-DAD DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE EPICARPIO DE COCONA REDONDA PEQUEÑA



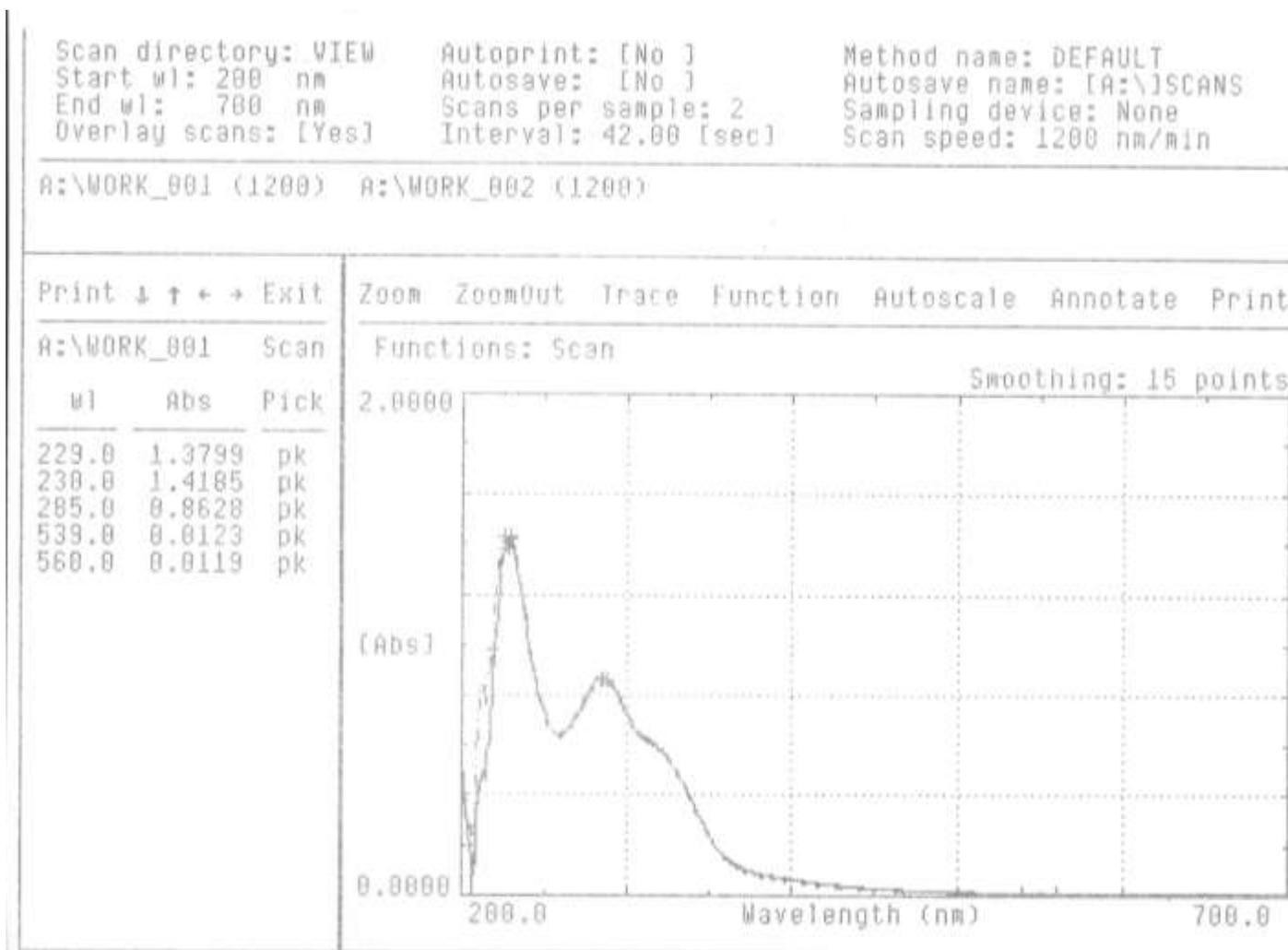
### A8.5 ESPECTRO DE UV – Vis DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE EPICARPIO DE COCONA REDONDA GRANDE



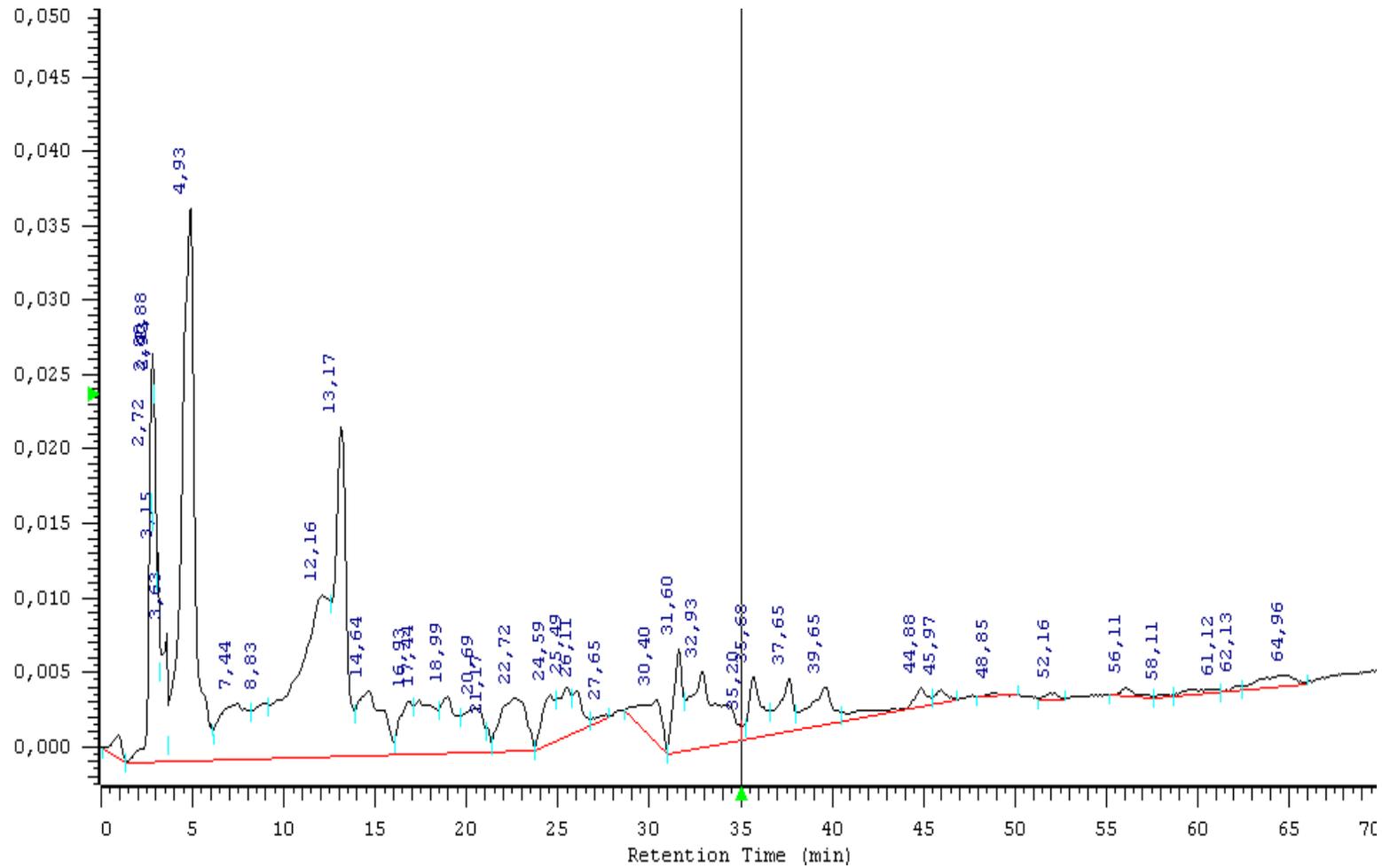
### A8.6 PERFIL CROMATOGRÁFICO OBTENIDO POR HPLC-DAD DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE EPICARPIO DE COCONA REDONDA GRANDE



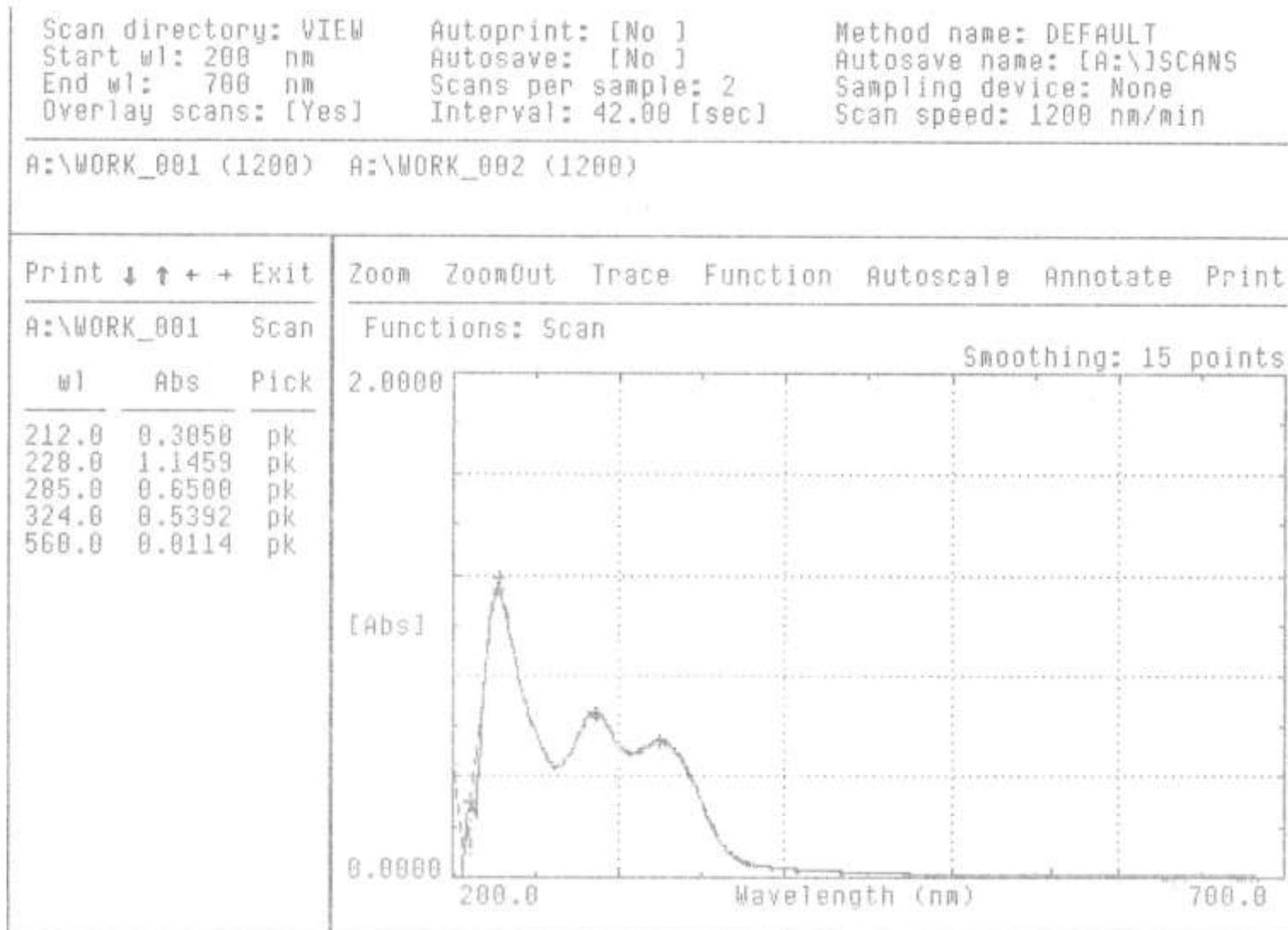
**A8.7 ESPECTRO UV – Vis DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE MESOCARPIO DE COCONA OVALADA**



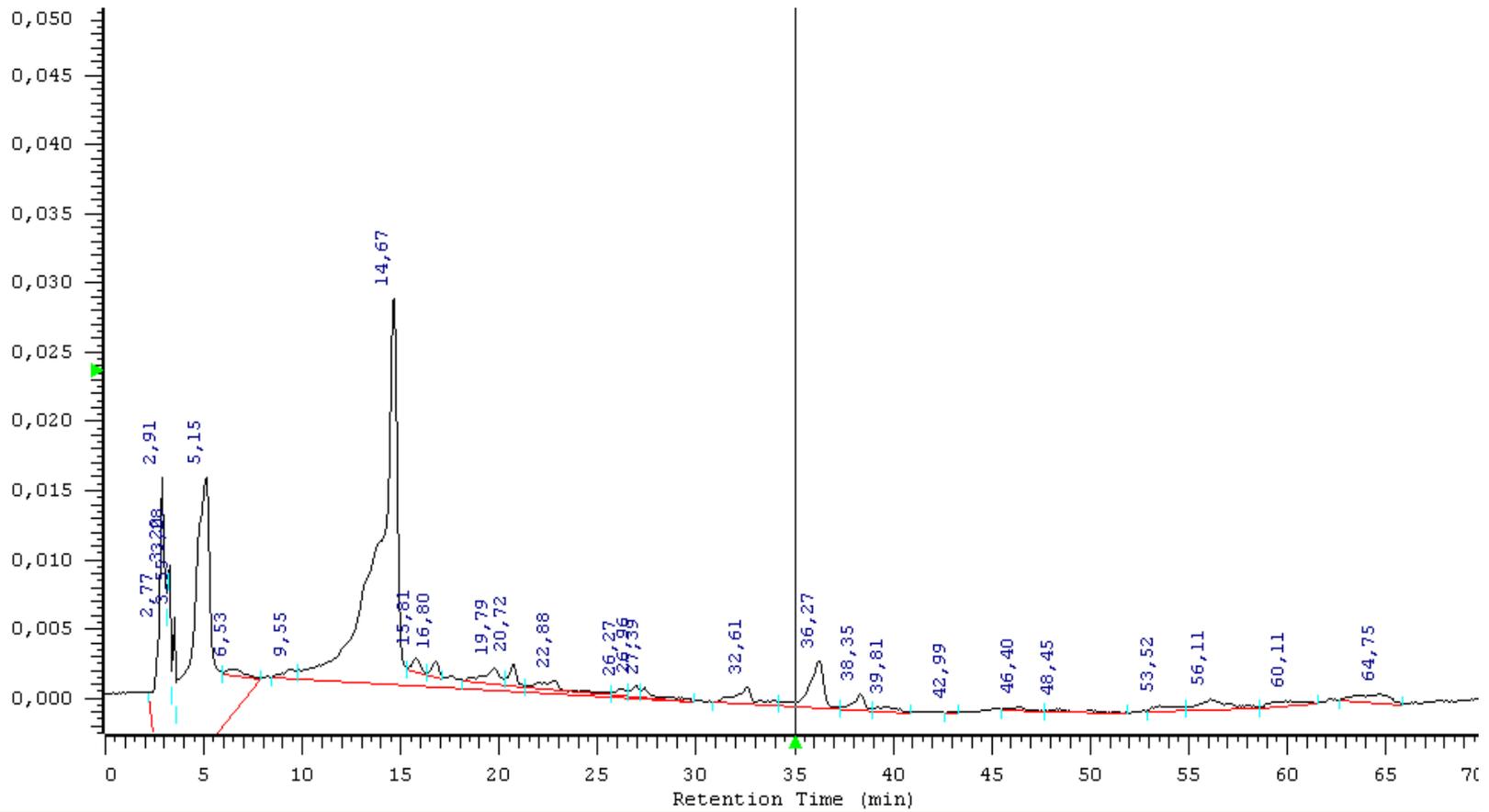
### A8.8 PERFIL CROMATOGRÁFICO OBTENIDO POR HPLC-DAD DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE MESOCARPIO DE COCONA OVALADA



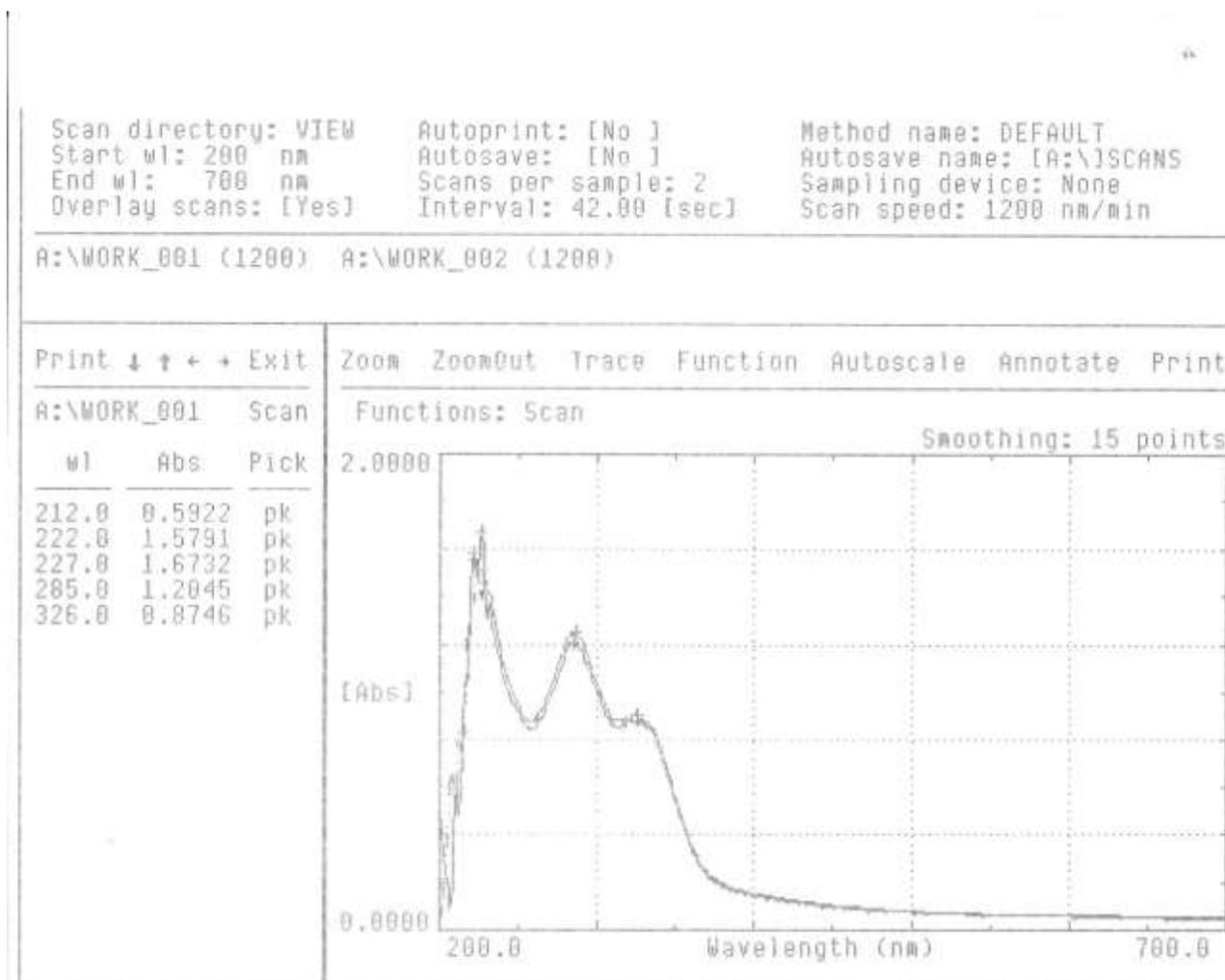
### A8.9 ESPCTRO UV-Vis DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE MESOCARPIO DE COCONA REDONDA PEQUEÑA



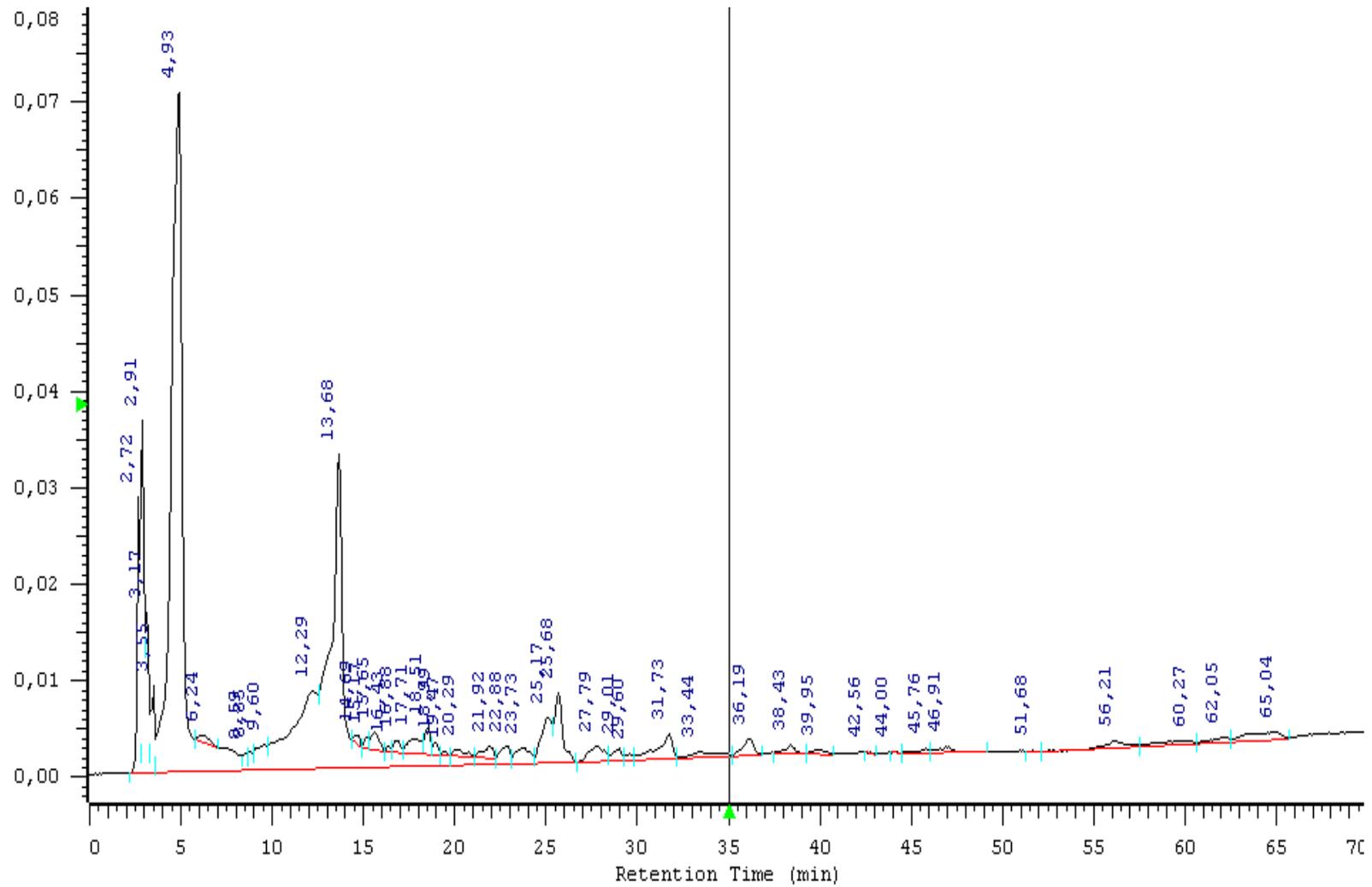
### A8.10 PERFIL CROMTAORÁFICO OBTENIDO POR HPLC-DAD DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE MESOCARPIO DE COCONA REDONDA PEQUEÑA



### A8.11 ESPECTRO UV-Vis DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE MESOCARPIO DE COCONA REDONDA GRANDE



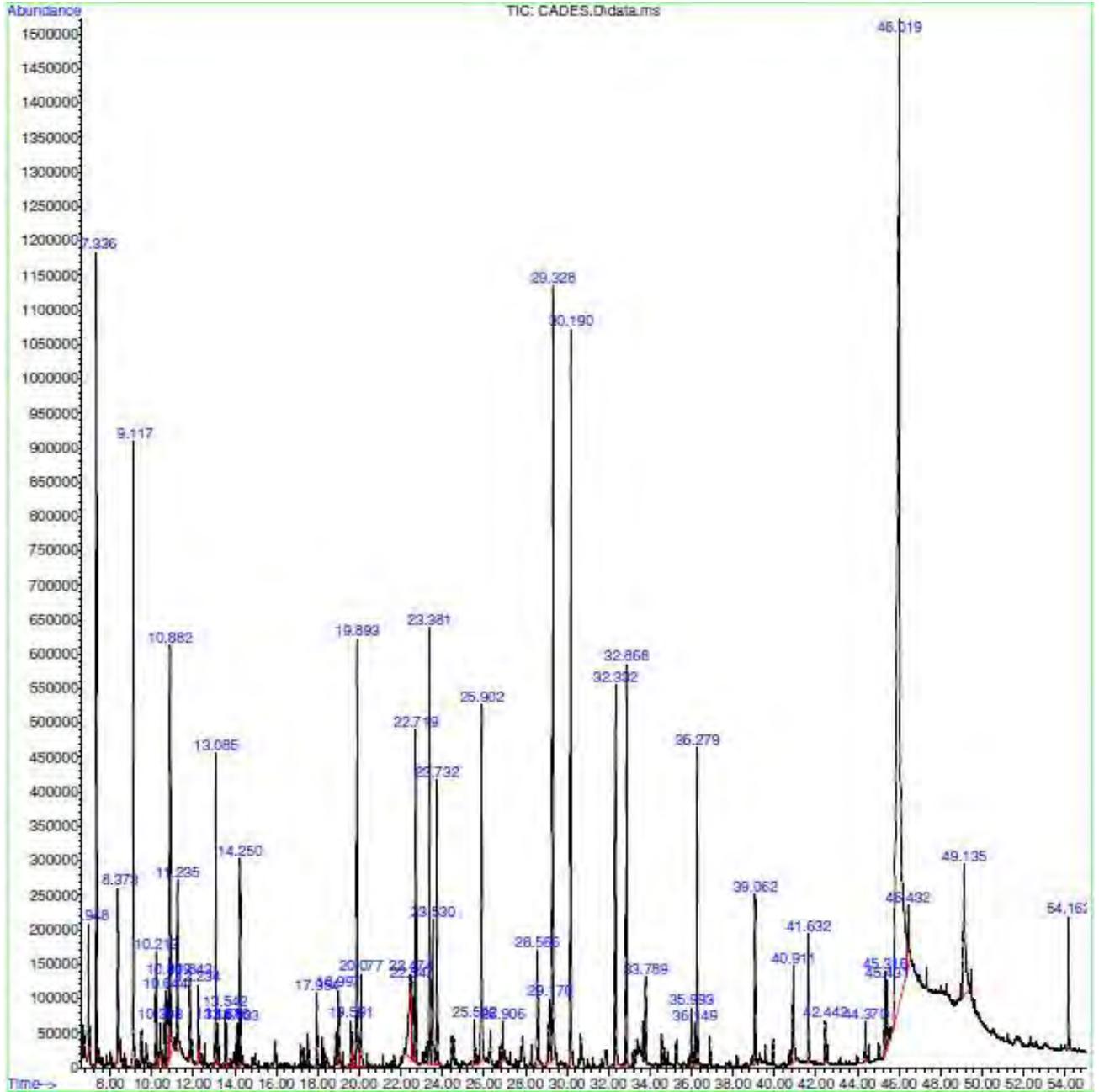
### A8.12 PERFIL CROMATOGRÁFICO OBTENIDO POR HPLC-DAD DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE MESOCARPIO DE COCONA REDONDA GRANDE



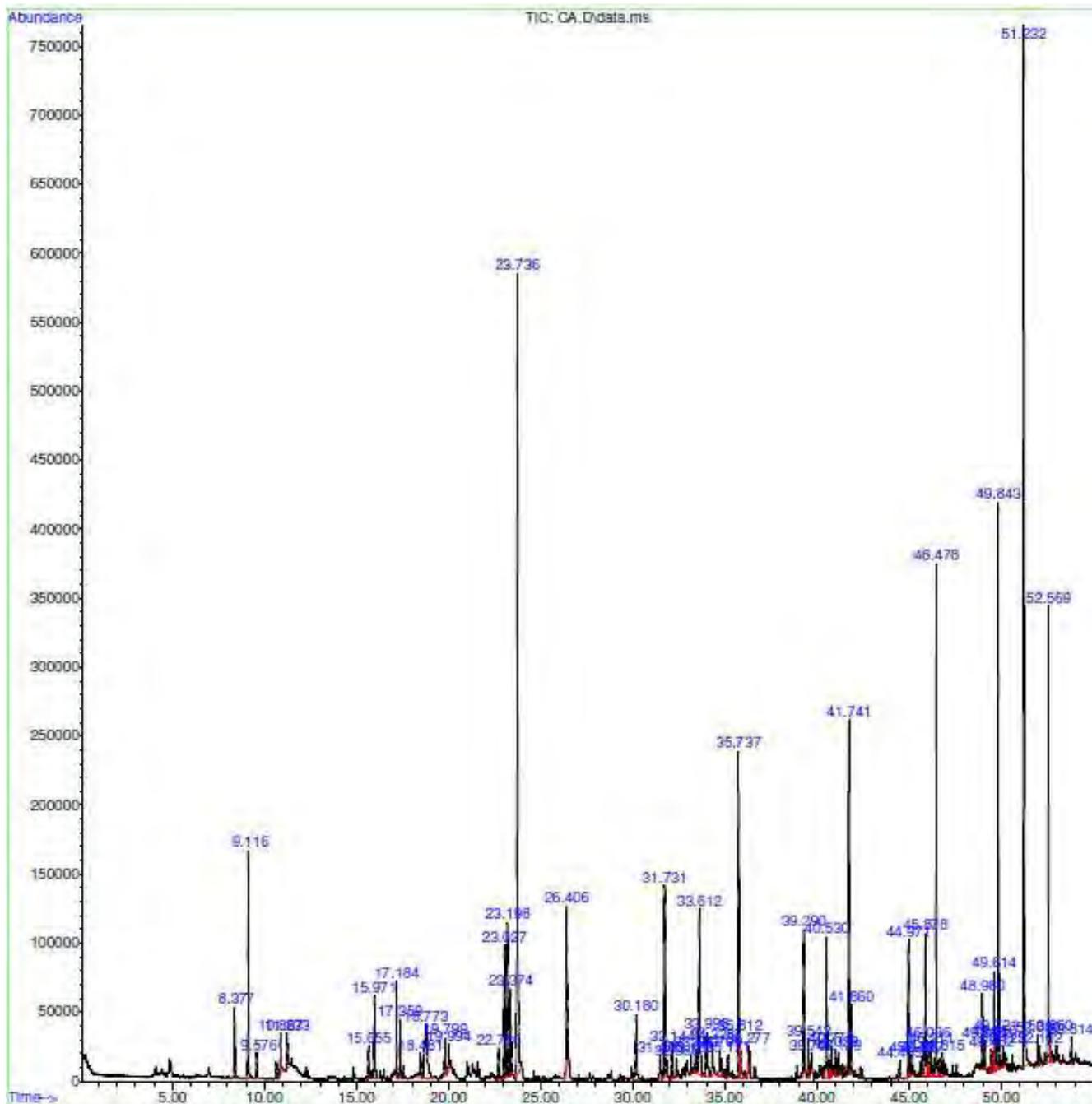


## ANEXO A9. CORRIENTES IONICAS RECONSTRUIDAS OBTENIDAS PARA LOS METABOLITOS VOLÁTILES DETERMINADOS

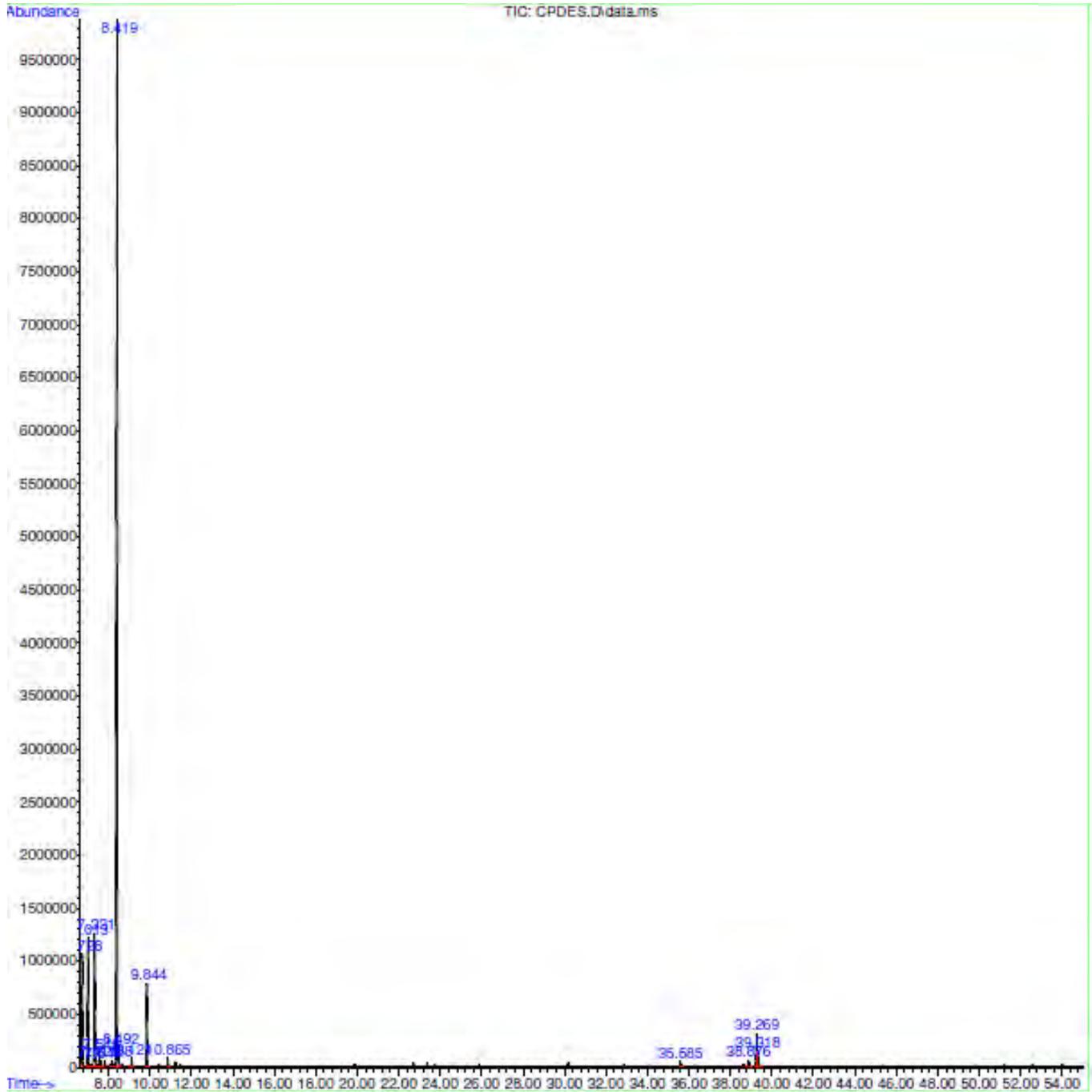
### A9.1 CORRIENTE IONICA RECONSTRUIDA DE METABOLITOS VOLÁTILES EN EL MORFOTIPO OVALADO EXTRAIDOS POR DESTILACIÓN EXTRACCIÓN SIMULTÁNEA



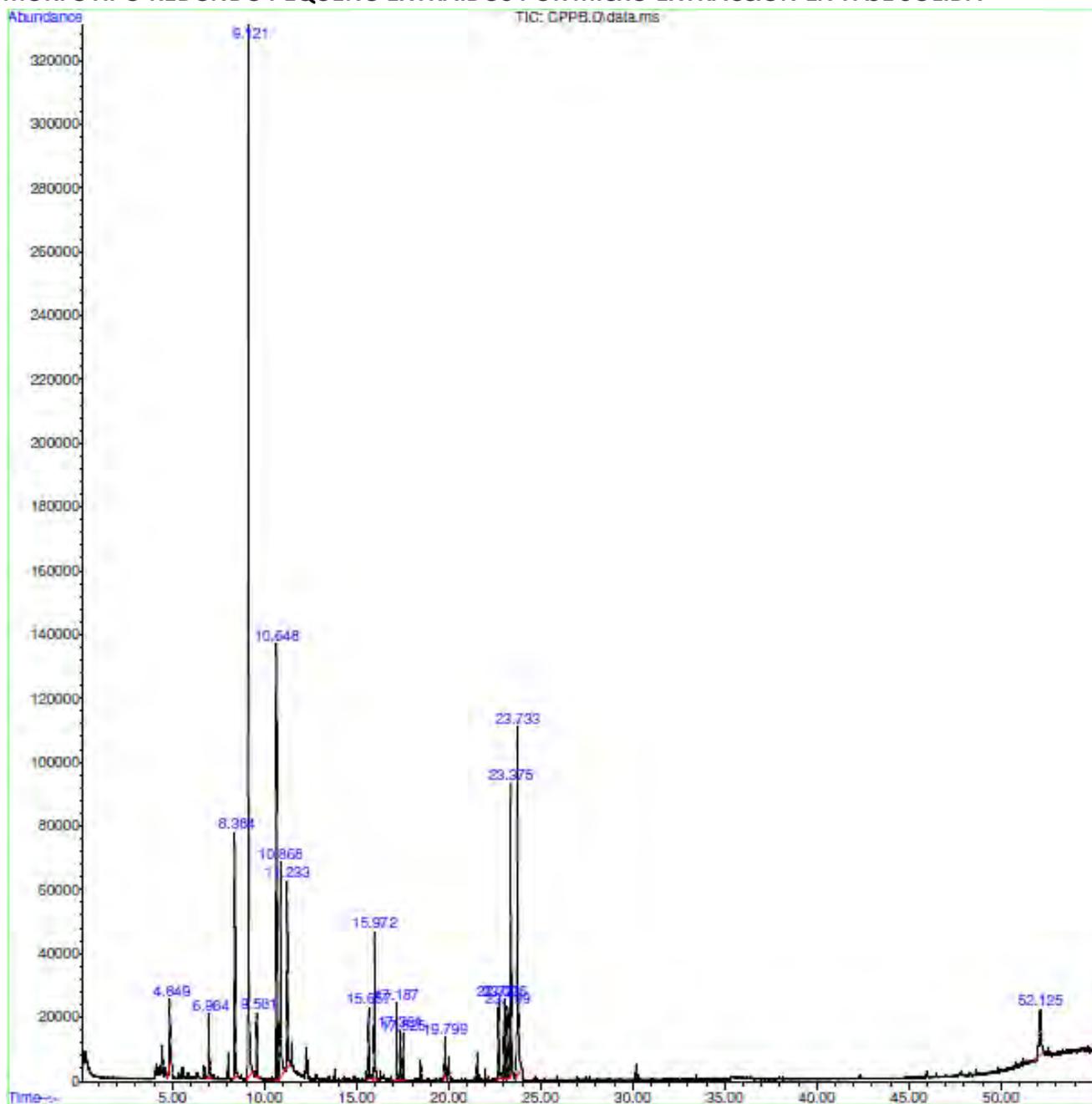
**A9.2 CORRIENTE IONICA RECONSTRUIDA DE METABOLITOS VOLÁTILES EN EL MORFOTIPO OVALADO EXTRAIDOS POR MICRO EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA**



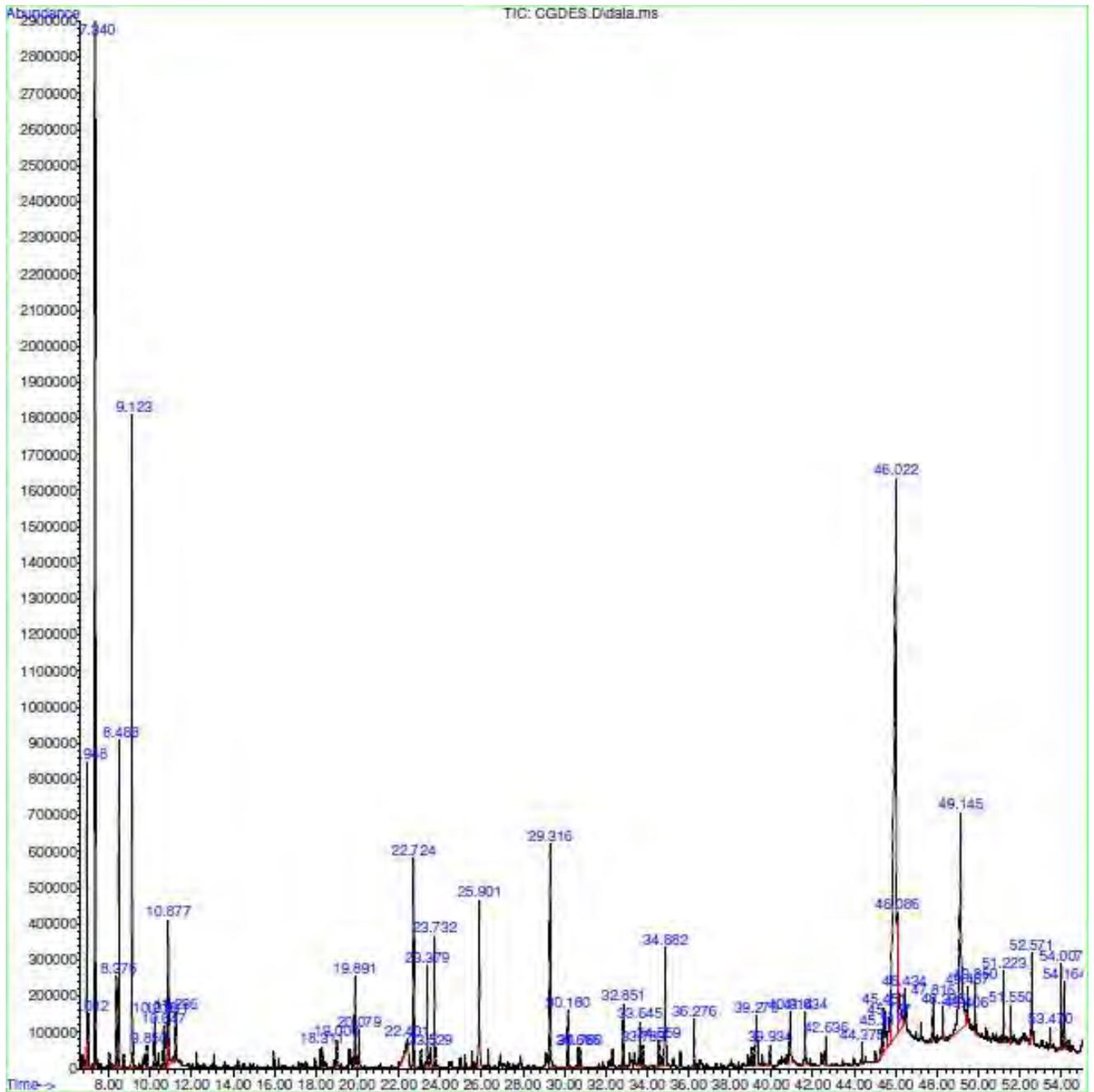
### A9.1 CORRIENTE IONICA RECONSTRUIDA DE METABOLITOS VOLÁTILES EN EL MORFOTIPO REDONDO PEQUEÑO EXTRAIDOS POR DESTILACIÓN EXTRACCIÓN SIMULTÁNEA



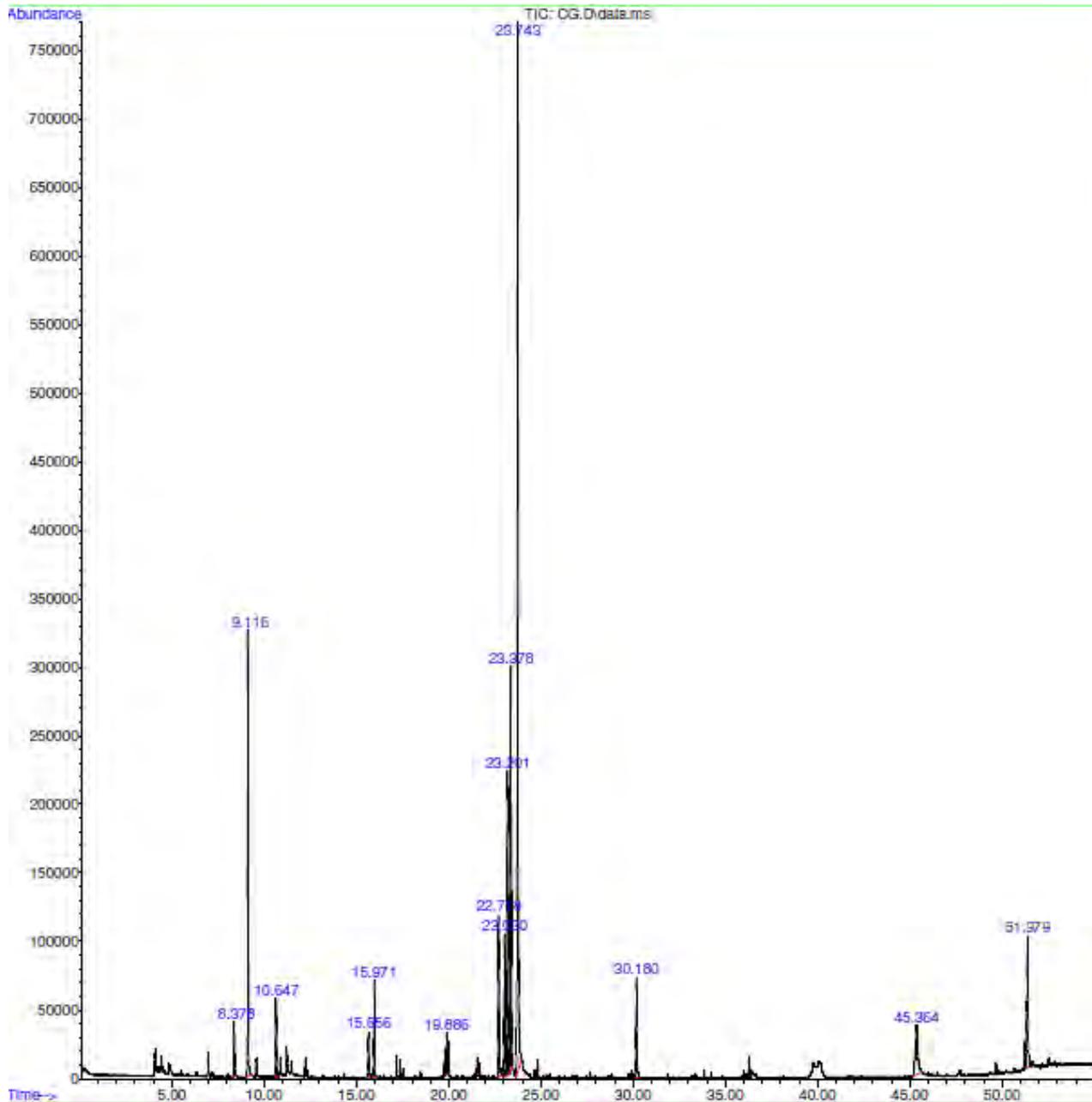
## A9.2 CORRIENTE IONICA RECONSTRUIDA DE METABOLITOS VOLÁTILES EN EL MORFOTIPO REDONDO PEQUEÑO EXTRAIDOS POR MICRO EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA



### A9.1 CORRIENTE IONICA RECONSTRUIDA DE METABOLITOS VOLÁTILES EN EL MORFOTIPO REDONDO GRANDE EXTRAIDOS POR DESTILACIÓN EXTRACCIÓN SIMULTÁNEA



## A9.2 CORRIENTE IONICA RECONSTRUIDA DE METABOLITOS VOLÁTILES EN EL MORFOTIPO REDONDO GRANDE POR MICRO EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA



## ANEXO A10. ANÁLISIS MULTIVARIADO REALIZADO PARA LOS METABOLITOS VOLÁTILES DETERMINADOS

### A10.1 ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES

Tabla A10.1.1 Varianza total explicada

Componente	Autovalores iniciales			Sumas de las saturaciones al cuadrado de la extracción		
	Total	% de la varianza	% acumulado	Total	% de la varianza	% acumulado
1	27,011	39,146	39,146	27,011	39,146	39,146
2	16,685	24,181	63,327	16,685	24,181	63,327
3	11,325	16,413	79,740	11,325	16,413	79,740
4	9,522	13,800	93,540	9,522	13,800	93,540
5	4,457	6,460	100,000	4,457	6,460	100,000

Método de extracción: Análisis de Componentes principales.

Tabla A10.1.2. Matriz de componentes<sup>a</sup>

	Componente				
	1	2	3	4	5
717	-,458	,087	,759	-,233	-,390
719	-,064	-,636	,019	,746	,187
729	-,021	-,637	-,085	,746	,172
730	-,579	,364	,725	-,017	,081
732	-,021	-,637	-,085	,746	,172
736	-,021	-,637	-,085	,746	,172
739	-,021	-,637	-,085	,746	,172
755	-,021	-,637	-,085	,746	,172
761	-,021	-,646	-,088	,740	,164
910	-,530	,662	-,470	,239	-,046
913	-,530	,662	-,470	,239	-,046
1019	,327	-,156	-,081	-,286	-,883
1024	,383	-,126	-,074	-,275	-,870
1029	-,013	-,270	-,343	-,675	,594
1042	-,530	,662	-,470	,239	-,046
1053	-,367	,100	,913	-,112	,100
1058	,884	,435	,096	,122	,074
1073	-,717	,660	,174	,142	,023
1089	-,530	,662	-,470	,239	-,046
1095	,395	-,119	-,072	-,272	-,866

Tabla A10.1.2. Matriz de componentes<sup>a</sup>

	Componente				
	1	2	3	4	5
1098	-,704	,624	-,251	-,057	,221
1103	-,717	,658	,182	,140	,024
1173	-,367	,100	,913	-,112	,100
1178	-,530	,662	-,470	,239	-,046
1183	-,404	,070	-,103	-,748	,511
1191	,358	-,273	-,367	-,811	,069
1196	,207	-,254	-,366	-,763	,420
1201	-,118	-,103	-,404	-,740	,514
1206	-,637	,701	-,240	,214	-,021
1212	,258	-,153	-,340	-,746	,488
1277	-,716	,631	,272	,119	,034
1291	,884	,435	,096	,122	,074
1374	-,530	,662	-,470	,239	-,046
1403	-,374	,599	-,549	-,211	,395
1418	-,367	,100	,913	-,112	,100
1421	-,367	,100	,913	-,112	,100
1462	,884	,435	,096	,122	,074
1467	-,530	,662	-,470	,239	-,046
1469	,884	,435	,096	,122	,074
1499	,884	,435	,096	,122	,074
1505	-,367	,100	,913	-,112	,100
1552	,884	,435	,096	,122	,074
1564	-,021	-,637	-,085	,746	,172
1576	-,530	,662	-,470	,239	-,046
1580	-,530	,662	-,470	,239	-,046
1584	-,600	,740	-,207	,221	-,013
1673	,884	,435	,096	,122	,074
1674	-,304	-,430	,647	,508	,216
1681	,884	,435	,096	,122	,074
1692	-,367	,100	,913	-,112	,100
1710	,884	,435	,096	,122	,074
1717	,884	,435	,096	,122	,074
1721	-,714	,620	,304	,112	,037
1743	-,717	,644	,232	,129	,030
1746	,884	,435	,096	,122	,074
1750	,884	,435	,096	,122	,074
1824	-,704	,584	,391	,090	,047

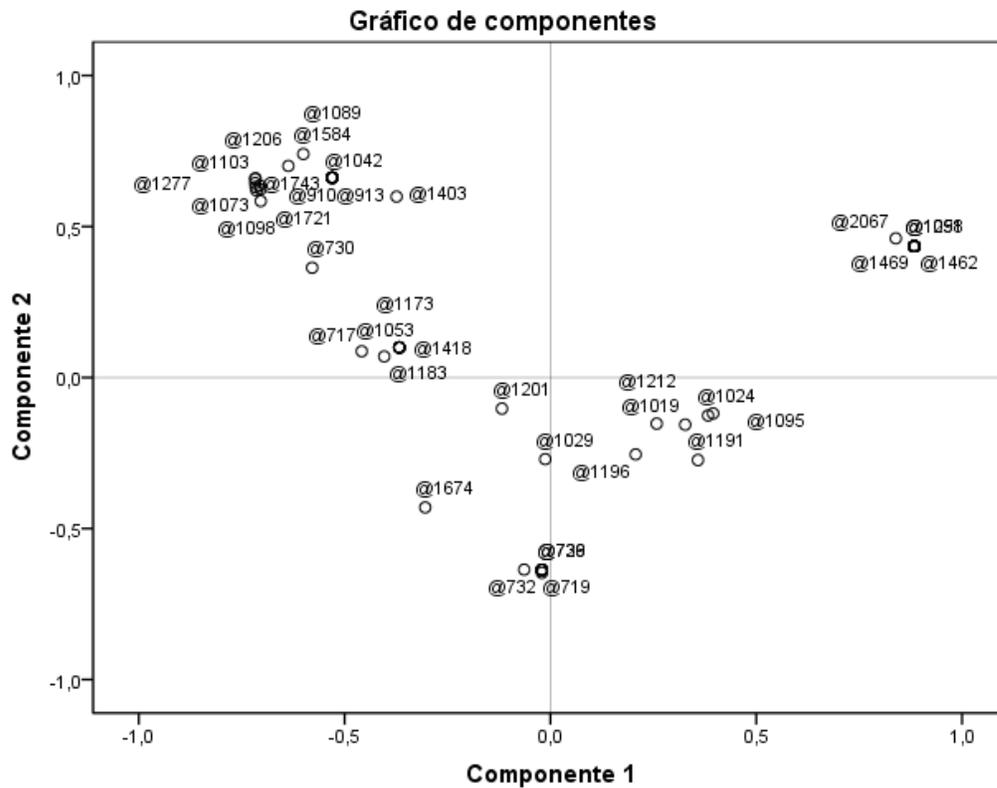
**Tabla A10.1.2. Matriz de componentes<sup>a</sup>**

	Componente				
	1	2	3	4	5
1827	,884	,435	,096	,122	,074
1842	,884	,435	,096	,122	,074
1847	,884	,435	,096	,122	,074
1869	,884	,435	,096	,122	,074
1873	-,706	,635	,287	,119	,037
1878	,884	,435	,096	,122	,074
1961	,884	,435	,096	,122	,074
1964	,884	,435	,096	,122	,074
1973	-,367	,100	,913	-,112	,100
1994	,884	,435	,096	,122	,074
2067	,839	,461	,253	,105	,093
2070	,884	,435	,096	,122	,074

Método de extracción: Análisis de componentes principales.

a. 5 componentes extraídos

**Ilustración A10.1 Gráfico de los componentes principales**



## A10.2 ANÁLISIS CANÓNICO DE DISCRIMINANTES

**Tabla A10.2.1 Variables que no pasan la prueba de tolerancia<sup>a</sup>**

	Varianza intra-grupo	Tolerancia	Tolerancia mínima
1469	,024	,000	,000
1499	,022	,000	,000
1552	,022	,000	,000
1673	,756	,000	,000
1681	,058	,000	,000
1710	,785	,000	,000
1717	,028	,000	,000
1746	3,271	,000	,000
1750	,147	,000	,000
1827	,005	,000	,000
1842	,493	,000	,000
1847	,007	,000	,000
1869	,660	,000	,000
1878	,049	,000	,000
1961	,118	,000	,000
1964	,010	,000	,000
1994	,009	,000	,000
2067	3,767	,000	,000
2070	,023	,000	,000
1584	,715	,000	,000

Todas las variables que cumplan los criterios de tolerancia se introducen simultáneamente.

a. El nivel de tolerancia mínimo es ,001.

**Tabla A10.2.2 Autovalores**

Función	Autovalor	% de varianza	% acumulado	Correlación canónica
1	36,341 <sup>a</sup>	100,0	100,0	,987
2	,009 <sup>a</sup>	,0	100,0	,095

a. Se han empleado las 2 primeras funciones discriminantes canónicas en el análisis.

**Tabla A10.2.3 Lambda de Wilks**

Contraste de las funciones	Lambda de Wilks	Chi-cuadrado	gl	Sig.
1 a la 2	,027	9,073	4	,059
2	,991	,023	1	,880

**Tabla A10.2.4 Coeficientes estandarizados de las funciones discriminantes canónicas**

	Función	
	1	2
1058	3,982	-,469
1206	3,973	,539

**Tabla A10.2.5 Matriz de estructura**

	Función	
	1	2
1206	,117	,993*
1717 <sup>a</sup>	,135	-,991*
1469 <sup>a</sup>	,135	-,991*
1499 <sup>a</sup>	,135	-,991*
1552 <sup>a</sup>	,135	-,991*
1673 <sup>a</sup>	,135	-,991*
1681 <sup>a</sup>	,135	-,991*
1058	,135	-,991*
1842 <sup>a</sup>	,135	-,991*
1847 <sup>a</sup>	,135	-,991*
1961 <sup>a</sup>	,135	-,991*
1750 <sup>a</sup>	,135	-,991*
1869 <sup>a</sup>	,135	-,991*
1878 <sup>a</sup>	,135	-,991*
1710 <sup>a</sup>	,135	-,991*
1964 <sup>a</sup>	,135	-,991*
1994 <sup>a</sup>	,135	-,991*
2070 <sup>a</sup>	,135	-,991*
1746 <sup>a</sup>	,135	-,991*
1827 <sup>a</sup>	,135	-,991*

**Tabla A10.2.5 Matriz de estructura**

	Función	
	1	2
1584 <sup>a</sup>	,163	,987*
2067 <sup>a</sup>	,295	-,955*

Correlaciones intra-grupo combinadas entre las variables discriminantes y las funciones discriminantes canónicas tipificadas

VARIABLES ordenadas por el tamaño de la correlación con la función.

\*. Mayor correlación absoluta entre cada variable y cualquier función discriminante.

a. Esta variable no se emplea en el análisis.

**Tabla A10.2.6 Funciones en los centroides de los grupos**

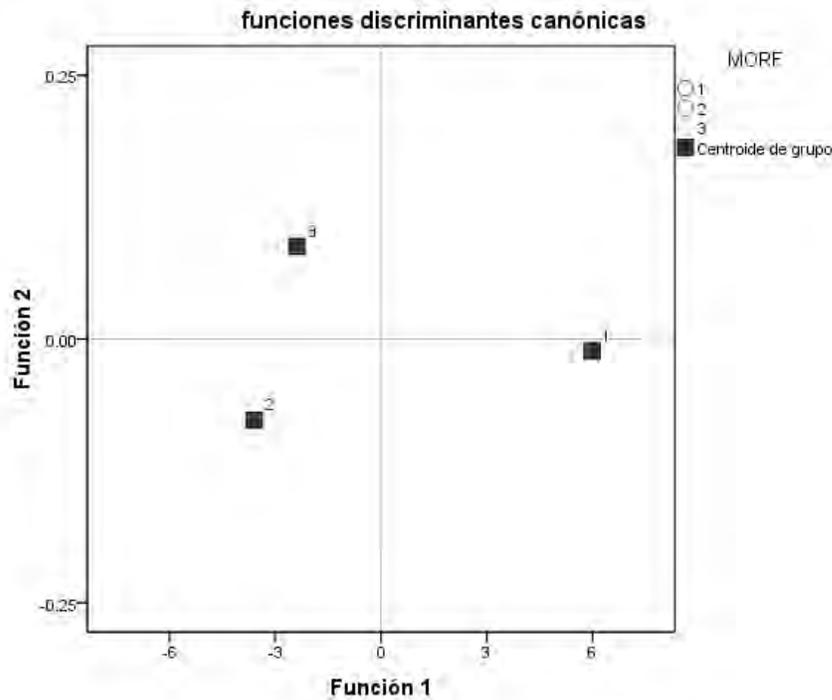
MORF	Función	
	1	2
1	5,988	-,011
2	-3,601	-,077
3	-2,387	,088

Funciones discriminantes canónicas no tipificadas evaluadas en las medias de los grupos

**Tabla A10.2.7 Probabilidades previas para los grupos**

MORF	Previas	Casos utilizados en el análisis	
		No ponderados	Ponderados
1	,333	2	2,000
2	,333	2	2,000
3	,333	2	2,000
Total	1,000	6	6,000

**Ilustración A10.2.1 Gráfico de las funciones discriminantes canónicas de los compontes volátiles de los tres morfotipos**



**A10.3 ANÁLISIS DE CONGLOMERADOS JERÁRQUICOS**

Tabla A10.3.1 Matriz de distancias

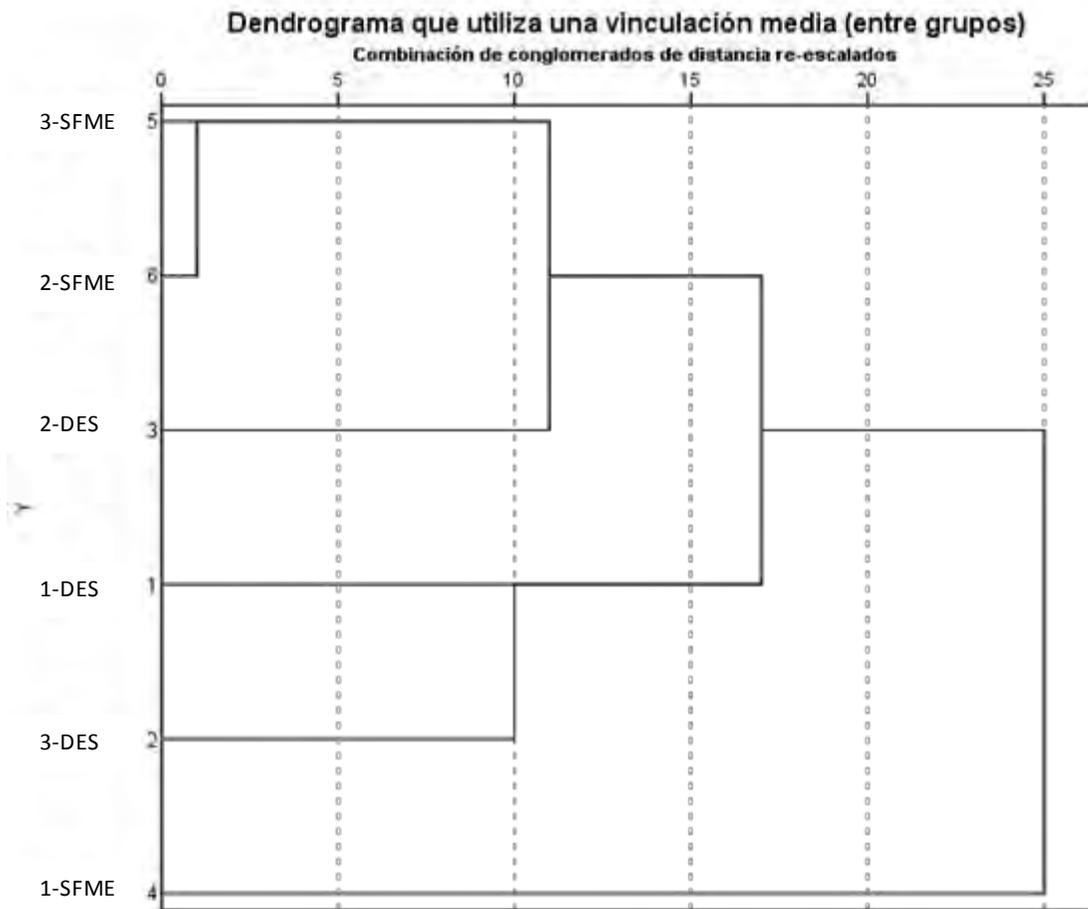
Caso	distancia euclídeana al cuadrado					
	1:ODES	2:GDES	3:PDES	4:OSFME	5:GSFME	6:PSFME
1:1 - DES	,000	19,000	36,000	46,000	23,000	26,000
2:3 - DES	19,000	,000	31,000	45,000	24,000	27,000
3:2 - DES	36,000	31,000	,000	44,000	19,000	20,000
4:1 - SFME	46,000	45,000	44,000	,000	29,000	26,000
5:3 - SFME	23,000	24,000	19,000	29,000	,000	7,000
6:2 - SFME	26,000	27,000	20,000	26,000	7,000	,000

Esta es una matriz de disimilaridades

Tabla A10.3.2 Historial de conglomeración

Etapa	Conglomerado que se combina		Coeficientes	Etapa en la que el conglomerado aparece por primera vez		Próxima etapa
	Conglomerado 1	Conglomerado 2		Conglomerado 1	Conglomerado 2	
1	5	6	7,000	0	0	3
2	1	2	19,000	0	0	4
3	3	5	19,500	0	1	4
4	1	3	27,833	2	3	5
5	1	4	38,000	4	0	0

Ilustración A10.3.1 Dendrograma



### A10.4 ANÁLISIS $\chi^2$ DE CORRELACIÓN ENTRE LOS METABOLITOS VOLÁTILES DETERMINANDOS PARA LOS TRES MORFOTIPOS ESTUDIADOS

Chi-Square Test for Heterogeneity or Independence

Case		Variable				
		AC	AL	AO	AR	CO
1	Observed	4	25	1	2	1
	Expected	3,75	18,20	1,07	1,61	
2,14	Cell Chi-Sq	0,02	2,54		0,00	0,10
0,61						
2	Observed	3	3	1	1	3
	Expected	2,12	10,30	0,61	0,91	
1,21	Cell Chi-Sq	0,36	5,18	0,26	0,01	
2,64						
3	Observed	0	6	0	0	0
	Expected	1,13	5,49	0,32	0,48	
0,65	Cell Chi-Sq	1,13	0,05	0,32	0,48	
0,65						

Case		Variable				
		EA	ER	FN	OH	
1	Observed	10	4	1	5	53
	Expected	13,92	4,28	1,61	6,42	
	Cell Chi-Sq	1,10	0,02	0,23	0,32	
2	Observed	10	2	2	5	30
	Expected	7,88	2,42	0,91	3,64	
	Cell Chi-Sq	0,57	0,07	1,31	0,51	
3	Observed	6	2	0	2	16
	Expected	4,20	1,29	0,48	1,94	
	Cell Chi-Sq	0,77	0,39	0,48	0,00	
		26	8	3	12	99

Overall Chi-Square 20,12  
 P-value 0,2150  
 Degrees of Freedom 16

CAUTION: 7 cell(s) have expected values less than 1.0