

CARACTERIZACIÓN DE ALGUNOS PARAMETROS BIOQUÍMICOS DE MADURACIÓN
DE GULUPA EN ATMOSTERAS MODIFICADAS

DIEGO ALBERTO CASTELLANOS ESPINOSA

Trabajo final para optar al título de Especialista en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Directora

Dr. MARIA SOLEDAD HERNÁNDEZ

Bióloga

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESPECIALIZACIÓN EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

BOGOTÁ D.C.

18 de Enero de 2010

CARACTERIZACIÓN DE ALGUNOS PARAMETROS BIOQUÍMICOS DE MADURACIÓN
DE GULUPA EN ATMOSTERAS MODIFICADAS

DIEGO ALBERTO CASTELLANOS ESPINOSA

Trabajo final para optar al título de Especialista en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Proyecto Programa Fortalecimiento a cadenas productivas

Efecto de las condiciones poscosecha sobre la fisiología, bioquímica, conservación y
análisis proteómico en frutos de Gulupa (*Passiflora edulis Sims*)

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESPECIALIZACIÓN EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS
BOGOTÁ D.C.

18 de Enero de 2010

AGRADECIMIENTOS

El autor desea agradecer especialmente a las siguientes entidades y personas:

Al Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos (ICTA) de la Universidad Nacional sede Bogotá por facilitarnos las instalaciones de la Planta Piloto de Vegetales en donde se prepararon los frutos para los ensayos y se extrajeron las pulpas para su posterior análisis.

Al Instituto de Estudios Amazónicos (SINCHI) en donde se realizaron los análisis de color y el cual nos facilitó una guía inicial de los procedimientos de extracción y determinación de Ácidos funcionales por Cromatografía Líquida.

A la empresa OCATI S.A. la cual facilitó los frutos para el experimento.

Al Laboratorio de Fisiología Vegetal del Departamento de Biología de la Universidad Nacional sede Bogotá y a la profesora Dr. Luz Marina Melgarejo, Directora del laboratorio y Directora general del Proyecto Macro por facilitar el acceso y el uso de las instalaciones, equipos y reactivos y materiales.

A la Ingeniera Química, Raquel Oriana Díaz por su colaboración y asesoría. Al Señor Químico, Leonardo Moreno encargado de la coordinación del Proyecto Macro por su dirección y colaboración, A la Señorita Sandra Crespo por su fundamental asesoría y colaboración en la corrida de las muestras en el equipo de HPLC y a todo el personal de los equipos de laboratorio del SINCHI, ICTA y del Laboratorio de Fisiología Vegetal.

A la Doctora María Soledad Hernández, directora y tutora de este trabajo, por su acertada dirección y ayuda en los momentos adversos del desarrollo del proyecto.

TEMARIO

Agradecimientos

Temario

1. *Resumen*
2. *Objetivos*
 - 2.1. *Objetivo General*
 - 2.2. *Objetivos Específicos*
3. *Justificación*
 - 3.1. *Proyecto Macro OCATI*
4. *Marco Teórico y Estado del Arte*
 - 4.1. *Las frutas de la Pasión*
 - 4.1.1. *Descripción General*
 - 4.1.2. *Procedencia*
 - 4.1.3. *Ecología*
 - 4.1.4. *Reproducción*
 - 4.1.5. *Crecimiento y Manejo*
 - 4.1.6. *Beneficios*
 - 4.1.7. *Cultivo y Producción*
 - 4.2. *Estado del Arte*
 - 4.2.1. *Algunos estudios realizados*
 - 4.2.2. *Procesos fisiológicos*
 - 4.3. *Planteamiento del Problema*
5. *Materiales y Métodos*
 - 5.1. *Definiciones*
 - 5.2. *Recolección y clasificación*
 - 5.3. *Clasificación de acuerdo al color*
 - 5.4. *tiempo de maduración*
 - 5.5. *Determinación de pérdida de humedad*
 - 5.6. *Determinación de ácidos por HPLC*
 - 5.7. *Procedimiento de extracción*
 - 5.7.1. *Extracción de la muestra del fruto*
 - 5.7.2. *Extracción de la muestra para análisis por HPLC*
 - 5.8. *Preparación de la fase móvil*
 - 5.8.1. *Cálculos*
 - 5.8.2. *Procedimiento*
 - 5.9. *Especificaciones del equipo*
 - 5.10. *Curvas de calibración para Ácidos*
6. *Resultados Obtenidos*
 - 6.1. *Cambios de peso por perdida de humedad*
 - 6.2. *Ácidos funcionales*
7. *Análisis de Resultados*
8. *Conclusiones*
9. *Referencias*
 - 9.1. *Marco teórico y estado del arte*
 - 9.2. *Metodología*

Anexos

1

RESUMEN

Se realizó un ensayo de almacenamiento de Gulupa (*Passiflora Edulis Sims*) en empaques comerciales de plástico tipo *Xtend®* a tres temperaturas de refrigeración (4, 8 y 20 °C) y con tres estados de madurez de la fruta. El criterio de selección de los frutos se realizó a partir del color de las cortezas; El experimento tuvo una duración de 4 semanas, que es el tiempo de vida comercial del producto en su transporte, distribución y venta en Europa. Se evaluó la evolución de los ácidos orgánicos incluido el ácido ascórbico durante la maduración del producto, teniendo como criterio el color de la corteza y pérdida de humedad para encontrar la relación estado de madurez inicial en el almacenamiento, temperatura de almacenamiento y tiempo de almacenamiento más adecuada para la conservación óptima de las cualidades del producto, hasta el consumidor final en ultramar.

Se encontró que a pesar del empaque hubo una pérdida significativa de masa como humedad sobre todo en los frutos mantenidos a 20 °C \pm 2°C; Además se observaron lesiones en la corteza y otros cambios indeseables como manchas para los frutos almacenados a 4 °C por lo que hacia el día 25 de seguimiento se descartaron, lo que asocia esta temperatura con daños por frío para la Gulupa. El ácido ascórbico presentó variaciones considerables, mientras que los demás ácidos evaluados presentaron concentraciones y tendencias esperadas y previamente reportadas, para otras pasifloráceas. Las mejores cualidades sensoriales y nutricionales de la gulupa almacenada en las condiciones propuestas se mantuvieron en frutos de 50% de madurez en el momento de la cosecha y temperatura de almacenamiento de 8 °C.

2

OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Caracterizar variables bioquímicas y de calidad de Gulupa almacenada en régimen de refrigeración.

2.2. Objetivos específicos

1. Caracterizar los cambios de ácidos orgánicos con carácter funcional y no funcional durante la conservación de Gulupa para las condiciones evaluadas.
2. Seleccionar y recomendar a partir de la información de pérdida de masa y de contenido de ácidos funcionales, la mejor condición de almacenamiento de la Gulupa de acuerdo a su madurez inicial y a la temperatura de conservación.

3

JUSTIFICACIÓN

La producción de Gulupa (*Pasiflora eludís Sims*) se ha visto favorecida en los últimos años por un interesante impulso del sector hortofrutícola del país que ha conseguido abrir importantes mercados internacionales (fundamentalmente el mercado europeo y Japón) y consolidar su posición en ellos. Así mismo se ha dado un incremento en el área de cultivo de Gulupa en departamentos como Boyacá, Cundinamarca, Huila y Tolima. En la búsqueda de que estos esfuerzos se vean recompensados adecuadamente se ha buscado la manera de eliminar fallas que afectan de forma notable la cadena de producción de la fruta (esto desde el cultivo hasta el transporte al mercado internacional) con el fin de que haya un incremento real de la competitividad que justifique dichos esfuerzos. Empresas del sector han querido unir esfuerzos a entidades de investigación y academia como la Universidad Nacional para realizar un mejoramiento del proceso de lo que se ha formulado una propuesta que está financiada por COLCIENCIAS para las investigaciones pertinentes.

En cuanto al manejo de pos cosecha se han realizado esfuerzos que lleven a una minimización de las pérdidas de producto mediante una implementación de mejoras a lo largo de la cadena productiva. Métodos más efectivos de recolección, de tratamiento y de conservación han mejorado de forma notable el proceso mediante la identificación de los problemas más recurrentes y los factores más sensibles a tener en cuenta para obtener un producto final de las mejores condiciones de calidad y en cantidades que sean económicamente viables.

3.1. Proyecto macro OCATI

Empresas exportadoras como OCATI S.A. cabeza del sector también se interesan en proyectos de este tipo porque en su labor exportadora se encuentran con problemas que les producen bajas en la rentabilidad y sobrecostos. Ellos han indicado que la comercialización de la Gulupa a nivel internacional se limita por la falta de tecnología adecuada para prolongar adecuadamente la vida del producto que permita una cierta flexibilidad a la hora del transporte del producto. En la actualidad la comercialización exitosa se da por medio aéreo siendo este más de un 50 % más costoso que el medio marítimo.

Para continuar con el proceso exitoso de comercialización del producto se requiere de soluciones tecnológicamente apropiadas y económicamente viables. Por esta razón OCATI S.A. se ha involucrado de lleno en este proyecto apoyándolo con recursos económicos y de infraestructura.

Así en colaboración con la Universidad Nacional de Colombia con representantes como el departamento de Biología de la Facultad de Ciencias y el Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos se ha conformado un grupo conjunto de investigación (Proyecto Macro) al cual pertenece este proyecto.

4

MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

4.1 Las frutas de la pasión

4.1.1. Descripción General

La fruta de la pasión es también conocida como parcha, granadilla, maracuyá, ceiba, lilliquea y linmangkón (Morton 1987). El prefijo Inglés "pasión" se deriva de la pasión de Cristo propuesta por el estilo de cuadro enramado que aparece en algunas de las flores. La fruta de la pasión es maderable, un producto de la vid que tiene una fruta deliciosa y se produce en las formas púrpura y amarilla (*Passiflora edulis* f. *edulis* Sims y *P. edulis* f. *flavicarpa*), conocidas como Gulupa y Maracuyá. Las plantas tienen unas raíces débiles, de color marfil ampliándose en raíces laterales. El tallo es generalmente solitario, de hasta 7 cm de diámetro basal, se extiende desde 5 hasta 10 metros o más en las copas de los árboles, y la planta está cubierta por una delgada corteza escamosa, de color marrón claro. Las ramas son de color amarillo-verde, volviéndose marrones, y se mantienen en la vegetación por medio de zarcillos que surgen en las axilas de las hojas. Las hojas son alternas, verde a amarillo-verde, de tres lóbulos (en las plantas maduras) con bordes aserrados. Los pecíolos son de 3 a 6 cm de largo y las hojas son de 5 a 11 cm de largo por 4 a 10 cm de ancho. Flores solitarias surgen en las axilas de las hojas. La medida de flores de 5 a 7 cm de diámetro con cinco sépalos verde-blanco y cinco pétalos de color blanco rematado con una franja similar a la corona de rayos rectos púrpura y blanco. Hay cinco estambres con anteras grandes y un estilo de tres brazos. El fruto es globoso u ovoide, de color púrpura o amarillo y 4 a 7 cm de diámetro. Dentro de una corteza gruesa marrón oscuro son muchas semillas de color negro envuelto en pequeños sacos llenos de jugo de color amarillo o naranja muy aromáticos. Los frutos de la fruta de Gulupa son más pequeños pero más aromáticos que los de la forma amarilla (Acevedo-Rodríguez 1985, Liogier 1994, Morton 1987).

4.1.2. Procedencia

La Gulupa es nativa del sur de Brasil encontrándose pasando a través de Paraguay hasta el norte de Argentina. La Maracuyá es probablemente nativa de la región amazónica de Brasil (Morton 1987). La Maracuyá se cultiva hoy en día en los trópicos y subtropicos, y se ha naturalizado y extendido en muchas áreas, incluyendo Florida, Puerto Rico, Islas Vírgenes de EE.UU., Hawai, Guam y Samoa Occidental (Acevedo-Rodríguez 1985, Morton 1987, las islas del Pacífico Ecosistemas en Peligro 2002).

4.1.3. Ecología

La altitud y la latitud no parecen ser una limitación, solo que no sea a través de las temperaturas asociadas con ellas. La gulupa crece mejor en un clima subtropical, y el maracuyá amarillo prefiere un clima tropical con estaciones completas de días cálidos. Sin embargo, incluso el maracuyá amarillo puede sobrevivir a temperaturas inferiores a - 5 ° C (Sentelhas y 1996, otros). En general, la precipitación anual debe ser de al menos 900 mm. Las precipitaciones en las áreas nativas que cultivan la fruta va desde 1000

hasta 2500 mm / año (Morton 1987). La especie es de raíces poco profundas, pero resiste la sequía y defoliadores. La fruta tolera una gran variedad de suelos y crece mejor en suelos bien drenados francoarenosos con pH de 6,5 a 7,5 (Morton 1987). Es moderadamente intolerante a la sombra, requiere de árboles, arbustos, o cercas de apoyo, y los beneficios de la sombra que estos aportan, pero no requiere la alteración del suelo para la reproducción. Las plantas silvestres se encuentran en bosques talados, amplias galerías, cercas, fincas abandonadas, y las porciones urbanas descuidadas. Las plantas jóvenes son comidas por el ganado, por lo que la fruta casi nunca se encuentra en aéreas de pastura. Un gran número de insectos, nematodos, hongos y virus pueden atacar tanto la planta como los frutos (Morton 1987).

4.1.4. Reproducción

La Gulupa florece en primavera y principios del verano y otra vez durante un corto período en el otoño y principios de invierno (Morton 1987). El Maracuyá amarillo florece en Puerto Rico de abril a septiembre y da sus frutos de junio a octubre (Acevedo-Rodríguez, 1985). En algunas zonas, las plantas dan frutos dos veces al año (Popenoe 1920). Las plantas usualmente comienzan la floración y fructificación en su segundo año. Las flores de maracuyá amarillo tienen partes masculinas y femeninas, pero son autoestériles. Se basan principalmente en las abejas carpinteras (*Xylocopa spp.*) para la polinización. Otros insectos y colibríes también visitan las flores. Las flores de Gulupa pueden tener auto-polinización (Morton 1987). La maracuyá forma frutos con pesos de 45 a 120 g en Puerto Rico. Existe una gran variación entre las plantas en la forma y el tamaño de los frutos. Los frutos pequeños vienen totalmente desprovistos de las semillas, y los frutos de gran tamaño pueden tener más de 200 semillas. Una colección de semillas de plantas nativas en Puerto Rico tiene un promedio de 0,0251 + 0,0004 g / semilla o 40.000 semillas / kg. Estas frutas suelen propagarse por semillas, pero se puede iniciar de cortes, capas, y de injertos (Morton 1987). Las semillas germinan mejor si se dejan fermentar durante algunos días en la pulpa del fruto antes de limpiar y son ligeramente escarificadas por corte o lijado (Morton, 1987). Un grupo de semillas en Puerto Rico fueron sembradas sin tratamiento previo en la mezcla de siembra comercial y comenzó a germinar en 14 días y concluyó la germinación en 24 días germinando cerca del 61 %. Las plantas son cultivadas en camas o macetas y trasplantadas cuando llegan a unos 25 cm de altura. Las semillas son esparcidas en la naturaleza por el hombre, los animales, especialmente cerdos y aves, y por extensión del cultivo.

4.1.5. Crecimiento y manejo

Las plantas en suelo fértil extienden sus tallos cerca de tres metros por año. Cada año durante la estación seca, las hojas caen y las ramas mueren dejando solamente el tronco principal y algunas ramas para de ahí rehacer la copa luego del comienzo de la estación de lluvias. Debido a que la fructificación tiene lugar en la madera joven, es posible realizar la poda para mejorar la entrada de luz sin afectar el rendimiento de producción de frutos. Las plantas viven de 3 a 8 años y no suelen rebrotar. Los puestos de venta se manejan en los mismos cultivos, algo así como con las uvas. Se plantan en filas en espaldera 4,5 m de distancia y espacio de 4,5 m de separación dentro de las filas. Los huertos se vuelven a sembrar cada 4 a 6 años (Bailey 1941). Alternativamente, los huertos pueden ser elaborados a partir de árboles pequeños o de bambú (Heenkenda y Punchikumarihami 1991). Las frutas caen al completar la maduración de la vid y se recogen desde el suelo al menos dos veces por semana. Las raíces normalmente forman micorrizas y las asociaciones de beneficiarse de la inoculación con cepas de hongos

superiores (Cavalcante y otros 2001). Las plantas silvestres son por lo general dispersas y hasta ahora no se han reportado intentos de manejarlas.

4.1.6. Beneficios

Con mucho, el mayor beneficio de la fruta de la pasión para la humanidad es su fruto y el jugo delicioso hecho de él. Además de ser recogida por la población local en los bosques, la fruta se cultiva en los viñedos en docenas de países. En todo el mundo se recolecta, se almacena refrigerada y se envía luego a otros lugares para su consumo. La pulpa del fruto contiene cerca de un 2,2 por ciento de proteínas, 0,7 por ciento de grasa, y el 21,2 por ciento de carbohidratos. Además, las semillas contienen 23 por ciento de aceite de girasol o similar al de aceite de soja, y el residuo de la corteza se utiliza para la alimentación del ganado (Morton 1987). Los frutos de los rodales nativos y naturalizados proporcionar alimentos para numerosas especies de mamíferos y aves silvestres. Toda la planta, especialmente las hojas, contiene alcaloides y un número de otros productos químicos fitoactivos. Entre ellas se encuentra la *passiflorine* (pasiflorina), un conocido sedante y tranquilizante (Morton 1987). Los extractos de las hojas se han utilizado durante siglos como sedantes por los nativos del Brasil. Ellos preparan una bebida de la flor para tratar el asma, la bronquitis y la tos ferina. La planta también se utiliza como un diurético para tratar las infecciones urinarias (Rain-tree, 2002).

4.1.7. Cultivo y producción

El género pasiflora comprende más de 500 especies de lianas persistentes o semipersistentes, casi todos nativos de las áreas tropicales de Suramérica, de Asia, de Australia y de la Polinesia. Los principales países productores son Sudafrica, Australia, Suráfrica, Brasil, Fiji, Hawai, Kenia, Perú y Sri Lanka. (http://plantencyclo.free.fr/sp/nmauric_passiflora_edulis_gg.html) (Didier, 2001). Pyle (1994) describe seis grupos de frutas de la pasión ubicando a la gulupa dentro del grupo de la Passiflora. Históricamente, en la mayoría de los países la producción se ha iniciado como un cultivo de traspatio y artesanal, para el consumo casero; después se ha vuelto comercial para satisfacer la demanda interna. Ese proceso ha sido más o menos lento y su desarrollo en cada país ha dependido de los apoyos gubernamentales y de los compromisos con la agroindustria. Australia y Hawaii son los que más han fomentado y apoyado la investigación, posteriormente Colombia y Brasil han hecho aportes relevantes. En la ubicación geográfica de las principales regiones productoras han ocurrido importantes cambios durante los últimos años. En 1970, siete países cubrían entre el 80 y 90% de la producción de passifloras que ingresaba al mercado mundial: Hawaii (EUA), Islas Fiji, Australia, Kenia, Suráfrica, Nueva Guinea y Nueva Zelanda. A partir de los años 80 se traslada el centro de producción a América Latina, respondiendo a una creciente demanda de jugo concentrado surgida en estos años en Europa, que no fue satisfecha por los centros tradicionales de producción. En los años 90 es el continente latinoamericano el que aporta el 90% de la producción mundial de pasifloras. Por otro lado, algunos países productores entran en una verdadera crisis como las Islas Fiji, que recientemente abandonaron este cultivo debido a que sufrió el ataque de virosis. Hasta 1950 antes que *Fusarium* se convirtiera en un problema fitosanitario serio, sólo el maracuyá morado *Passiflora edulis* se comercializaba en Australia, pero fue sustituida por el híbrido *Passiflora edulis f. flavicarpa* o maracuyá amarilla, la cual presenta resistencia a *Fusarium* y algunos nematodos.

El principal productor de pasifloras a nivel mundial a partir de los años 80 ha sido Brasil.

En este país se han dedicado a su cultivo 25,000-33,000 hectáreas durante los últimos años, generando el 50% de la producción mundial (250,000-420,000t). Por sus condiciones climáticas, en este país se puede cosechar prácticamente durante todo el año. Su productividad oscila de 1.2 a 45 t/ha, el promedio es de 12 t/ha, sus costos, por lo tanto, son muy variables, pero en explotaciones orientadas al mercado, en un ciclo de tres años, oscilan entre 180-290 US\$/t, con lo que se obtuvo en promedio una ganancia neta de US\$ 1,500 por hectárea, durante los últimos 5 años. De su producción anual, se comercializa el 70% como fruta fresca. Su participación en el mercado mundial es de 10% de las exportaciones. En 1995 la producción de Brasil no fue suficiente para satisfacer su creciente demanda interna, hecho que se explica por el favorable desarrollo económico del país, aunado a un creciente poder adquisitivo de la población y a la reducción cíclica de la producción. Por esta razón, Brasil se convirtió en un importador neto de jugo de maracuyá y de algunas pasifloráceas como la gulupa (Reboucas, 1996; Lima, 1981).

En Colombia el cultivo comercial de passifloras se inició en los años 60 y fue hasta los 80 que se lanzó al mercado internacional. La superficie dedicada varía entre 2,500 y 7,000 hectáreas y el 70% de la producción se exporta, dejando el 30% para el mercado interno. El rendimiento medio alcanza las 20 t/ha, marcando la punta mundial, y su costo medio de producción, en el ciclo de tres años, es de US\$ 180/t. Colombia participa en el mercado mundial de manera variable; en 1993 aportó del 60 al 70%, aunque en 1994 contribuyó sólo el 7.3%. En este país el ICA promovió ampliamente el cultivo al tiempo que se dio un fuerte soporte técnico y créditos accesibles a los productores por parte de la Caja de Crédito Agrario y de la Federación Nacional de Cafeteros (Referencia 19, 2008).

Cuando la fruta se encuentra fisiológicamente en su máximo estado de crecimiento y desarrollo, y todas sus partes, están formadas, maduras y aptas para su reproducción, es el estado que se conoce como madurez fisiológica. La madurez de cosecha o comercial es aquella etapa fisiológica en el desarrollo de la fruta en la cual se desprende del árbol y puede llegar a desarrollar su madurez de consumo; esta última es aquel momento del desarrollo fisiológico del fruto cuando todas las características sensoriales propias de éste, como el sabor, el color, el aroma, la textura y la consistencia, son completas y armónicas (Pinzón et al 2007). El estado de madurez del fruto es crítico para las condiciones de almacenamiento y mantenimiento de la vida útil.

4.2. Estado del Arte

4.2.1. Algunos estudios realizados

La maracuyá amarilla (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) ha sido más estudiada debido a su mayor difusión: Es posible encontrar reportes de fisiología poscosecha y el efecto de tratamientos como empaques, ceras, temperaturas (Aular et al., 2001; Gómez, 2000; Gómez et al., 1999; Arjona et al., 1992; Quesada y Matta, 1992;). Además se ha estudiado la actividad de enzimas como pectinmetilesterasa, poligalacturonasa y celulasa (Aponte y Guadarrama, 2003; Menéndez et al. 2006); análisis de la hidrólisis enzimática de compuestos responsables del aroma (Chassagne et al, 1999), tratamientos realizados con etileno (Arjona y Matta, 1991). En otras Passifloraceas como la Badea (*Passiflora quadrangularis*) se han realizado estudio de caracterización de aroma (Osorio et al.,2005). Aular et al. (2001) Encontraron que para el maracuyá la utilización de envolturas plásticas no afecta las características fisicoquímicas de los frutos ni los cambios que se presentan de manera normal durante la maduración; sin embargo bajo esas condiciones se

incrementa la incidencia de pudriciones y si el tiempo de almacenamiento es muy largo se presenta pérdida de masa fresca y disminución de los sólidos solubles totales y el ácido ascórbico. Gómez (2000) encuentra también que la utilización de empaque plástico con diferentes espesores (0,001; 0,0015 y 0,002 pulgadas) y número de perforaciones (0, 6 y 12 de 0,5 mm de diámetro), ocasiona un retraso en la maduración de los frutos, lo cual combinado con una temperatura entre 10 y 12°C, prolonga en un 50 % el tiempo de conservación (30 días), disminuye las pérdidas de peso y estabiliza la composición química del fruto.

Pocos son los estudios referenciados en gulupa, entre estos, Shiomi et al (1996) reportan que el fruto púrpura o morado alcanza su máximo tamaño 20 días después de la antesis de la flor. Además encuentra que la tasa de respiración del fruto (aun pegado a la planta) decrece gradualmente pero sin mostrar un pico climatérico y la producción de etileno incrementa claramente después de 70 días de la floración, después de lo cual se mantiene constante. Después de retirar los frutos de la planta alrededor o cerca del día 40 (después de la floración) se observa un pico climatérico. El cambio en el color de verde a púrpura fue visto entre los 70 y 80 días después de la floración y corresponde con el comienzo de la actividad autocatalítica del etileno. Los resultados muestran que la gulupa tiene una madurez fisiológica alrededor de 60 días después de la salida de la flor y puede ser cosechada 70 días después de la antesis. En otro estudio Shiomi et al (1996) encuentran que durante maduración del fruto aumenta el contenido de glucosa y fructosa, decrece el contenido de sacarosa. Los Ácidos cítrico y málico aumentan en las primeras etapas de maduración y luego decrecen. La aplicación de etileno entre uno y cinco días después de la cosecha estimula la producción de etileno; ellos indican que *Passiflora edulis* Sims, puede ser transportado en frío al lugar de venta y allí se puede inducir el cambio de color (verde a morado) aplicando etileno. (Pachón et al, 2006) estudiando el efecto del empaque, encerado y temperatura sobre las características fisicoquímicas y organolépticas de la gulupa plantean el uso del papel plástico vinipel como una muy buena alternativa de empaque de frutos, solo o en combinación con encerado incluso a temperatura ambiente aunque por un tiempo menor. El peso fresco y la acidez titulable tienden a decrecer con el tiempo aun con este empaque.

Debido a las diferentes condiciones ambientales en las que se desarrollan la gulupa y la maracuyá amarilla, estas presentan diferencias en cuanto a la resistencia a las bajas temperaturas. Las condiciones óptimas de almacenamiento de maracuyá amarillo están entre 7°C y 10°C con una humedad relativa del 90 al 95%; este a su vez puede tener un potencial de sobrevivencia (en almacenamiento) de dos semanas. La gulupa mientras tanto es más resistente al enfriamiento y puede ser almacenada entre 5 y 8°C, por un tiempo entre tres y cinco semanas (Paull y Chen, 2008). La temperatura letal para el maracuyá morado o gulupa se encontró entre -10°C a -12°C (Quesada y Matta, 1992). Otras diferencias se observaron en el aroma, mientras que para ambas, gulupa (maracuyá morada) y maracuyá (maracuyá amarillo) se encuentran concentraciones importantes de alcoholes aromáticos, los fenólicos se consideran como característicos de la morada (Chassagne et al., 1999). Pinzón et al (2007) reportan bajo condiciones de Colombia los estados de madurez de gulupa. En Colombia, la gulupa (*Passiflora edulis* Sims) se cultiva principalmente entre los 1.800 y 2.400 msnm con temperatura promedio de 16 a 24°C y precipitaciones de 1.500 a 2.500 mm (Pachón et al., 2006). El color del exterior del fruto (pericarpio) se caracteriza por ser verde durante su etapa juvenil para luego cambiar a púrpura en su estado de madurez (Hurtado y Nieto, 1985). Actualmente se encuentran cultivos a los 900 msnm (OCATI, comunicación personal). Actualmente en Colombia, la gulupa ocupa el tercer renglón dentro de las frutas exportadas hacia el

mercado europeo después del banano y la uchuva. Se cosecha directamente de la planta. Dado los pocos estudios realizados en el país sobre el momento óptimo de cosecha Pinzón et al (2007) determinaron los estados de madurez del fruto, así como algunas características físicas y químicas. Determinaron seis estados de madurez de la gulupa desde totalmente verde (estado 0) hasta sobremaduro (estado 6) para facilitar el reconocimiento del momento óptimo de cosecha. De acuerdo a las características físicas (peso, tamaño, densidad, firmeza, color), químicas (sólidos solubles totales [SST], acidez total titulable [ATT], pH) y el índice de madurez para cada estado del fruto se determinó que el momento óptimo de cosecha es el estado 3 el cual corresponde a un fruto 40-50% verde y 40-50% púrpura; en este estado el fruto es más denso y alcanza su máximo en peso fresco de fruto total y de la pulpa. En este estado el fruto contiene la mayor concentración de SST (15,9ºBrix) y además comienza a aumentar el pH (desde 3,0 hasta 3,6 [en estado 6]), mientras disminuye la ATT (13%). Actualmente algunas empresas exportadoras como OCATI empaacan los frutos en el estado 3 (aunque en algunas ocasiones empaacan mezclado entre estado tres y cuatro) en empaques tipo Xtend; sin embargo bajo las condiciones de almacenamiento, transporte y empaque los frutos se maduran o sobremaduran o sufren daños y en muchos casos presentan problemas fitosanitarios antes de llegar a su sitio destino perdiéndose calidad del fruto para el consumo (OCATI, información personal).

4.2.2. Procesos fisiológicos

Las tasas de procesos fisiológicos en las frutas, incluyendo la respiración y la acción y evolución del etileno, son reguladas por la temperatura, y son más bajas justo sobre el punto de congelación del tejido. De esta forma las tasas de maduración de las frutas y el ablandamiento de la pulpa y la progresión de senescencia dependen de la temperatura a la cual se encuentra la fruta. Mientras que las tasas de pérdida de agua resultan de diferencias de presión de vapor entre la fruta y su ambiente, las cuales son controladas por la temperatura de la fruta, humedad relativa y velocidad del aire en la atmósfera circundante. En general la máxima vida poscosecha se alcanza justo sobre el punto de congelación, el cual puede ser menor a -1°C para cultivos que presentan una alta concentración de sólidos solubles totales (Vendrell, M, 1995). Los azúcares, proteínas y otros componentes sufren importantes modificaciones, siendo de gran importancia porque influyen en los cambios que se producen durante el almacenamiento, transporte y comercialización de las frutas, afectando también en cierta medida su valor nutritivo. Enzimas como la pectinmetilesterasa, poligalacturonasa (Aponte y Guadarrama, 2003; Menéndez et al.,2006) determinados en maracuyá amarillo, por ejemplo, ejercen una actividad diferencial en cada estado de maduración observándose su máxima actividad en los estados maduros y sobremaduros.

4.3. Planteamiento del problema

Aunque el deseo de los productores y exportadores de la Gulupa es consolidar y ampliar los mercados internacionales colonizados hasta el día de hoy diversos factores de la poscosecha del producto han hecho que este deseo no pueda verse plenamente materializado.

Actualmente una cantidad bastante apreciable del producto exportado (se estima en un 15 %) es rechazada por los compradores por qué no cumple los criterios establecidos de calidad; las fallas principales que se han visto son irregularidades en la coloración y daños por efecto del cambio de la temperatura y de la humedad en el almacenamiento y transporte además de daños por agentes fitopatógenos. Por supuesto estas pérdidas son prohibitivas y es por esto que los productores y comercializadores requieren unificar criterios que permitan realizar una aproximación conjunta a la solución pronta de estas fallas y así fortalecer la cadena productiva de la gulupa de exportación.

De acuerdo a lo anterior se pensó en un proyecto de estudio del comportamiento fisiológico y bioquímico de la Gulupa en condiciones de almacenamiento con variación en los parámetros de temperatura, empaque y madurez del fruto.

Así el plan es trabajar con el fruto en tres estados de madurez: pintón (50% verde y 50% púrpura), 75% de madurez y maduro (100% púrpura); Así mismo con tres temperaturas controladas de almacenamiento: $4^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, $8^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ (temperatura crítica de almacenamiento). Los frutos se empacan en bolsas tipo Xtend®.

Los ejemplares evaluados en las condiciones de refrigeración se comparan directamente con los que se encuentran a temperatura de $20^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ sirviendo estos últimos como testigo y observando las diferencias en los cambios propios en la maduración y la senescencia del producto almacenado.

Pretende llegarse entonces a encontrar los parámetros de temperatura de almacenamiento y de madurez inicial para este mismo más adecuados que permitan la mejor conservación de la Gulupa de exportación.

5

MATERIALES Y METODOS

5.1. Definiciones

Unidad experimental: Unidad de medición constituida por dos bolsas cada una con cuatro frutos utilizables para la extracción de las muestras de pulpa, para ocho frutos en total.

5.2. Recolección y clasificación

Se recolectaron frutos de Gulupa, provenientes de un solo sitio y sembrado bajo las mismas condiciones, de tres estados de madurez clasificados de acuerdo al color de la corteza: pintón (50% verde y 50% púrpura), 75% de madurez y maduro (100% púrpura), caracterizándose dichos estados de madurez a través del uso de un colorímetro Hunterlab que reporta unidades LCH (Luminosidad, Cromo y Hue) de acuerdo al estado de maduración del fruto. Los frutos recolectados se acondicionaron bajo los mismos parámetros que se hace comercialmente y luego se han empacado en bolsas Xtend® repartidos de a cuatro frutos por bolsa todos con el mismo grado de madurez y almacenándose luego a temperaturas de $4^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$; $8^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ y $20^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Las frutas fueron proporcionadas por la empresa OCATI S.A. las cuales provenían de una misma cosecha y fueron cultivados en la misma fecha. Los frutos provienen de la finca Beltrán, ubicada en la Vereda Agudelo del municipio Santa Sofía (Boyacá), a 2387 msnm y una temperatura promedio de 16°C . Después de ser cosechados, fueron transportados en frío ($8-10^{\circ}\text{C}$) al punto de distribución en Cota (Cundinamarca). Posteriormente, se aplicó el producto antimicótico y fueron secados con ventiladores. Se refrigeraron a 10°C y fueron almacenados en canastas y transportados a la planta de Vegetales del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos (ICTA) en la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, lugar donde fueron clasificados y adecuados para la experimentación.

5.3. Clasificación de acuerdo a color

Los frutos se caracterizaron determinando su grado de maduración observando el color de su corteza en dos rondas de medición. En un primer término se hizo una preclasificación a simple vista clasificando los frutos cuyas diferencias de color eran más evidentes; de experiencias previas se tenía conciencia de los estados de madurez de acuerdo a la tabla de colores presentada por Pinzón, I., et al (2007), en la cual todo el proceso de maduración es dividido en 7 etapas (de 0 a 6), siendo 0 el estado más inmaduro con una coloración verde y 6 un estado sobremaduro de coloración púrpura oscuro. De acuerdo a lo reportado por el mismo autor, el estado 0, son frutos 100 % verdes, el estado 5 son frutos 100% púrpura. De esta forma se seleccionaron frutos en el

estado 3 que corresponden a un 40- 50% verde y 40–50% púrpura; un segundo grupo 25% verde – 75% purpura; y un tercer grupo 100% purpura.

Seguido a esto se hizo una clasificación definitiva utilizando un colorímetro. En los frutos de color uniforme en toda su superficie se realizó una única medición. Para los frutos donde el color no era uniforme en toda su superficie sino que se evidenciaron manchas se realizaron dos determinaciones de color.

Los frutos que estaban fuera de los intervalos de clasificación fueron descartados del ensayo.



Imagen 1. Tabla gráfica de estados de madurez de la Gulupa. Pinzón, I., et al 2007.

5.4. Tiempo de medición

El ensayo cubrió un periodo de 4 semanas (entre septiembre y octubre del año 2009) haciéndose la extracción de muestras dos veces por semana. Las muestras se evaluaron a través de HPLC para determinar la presencia y el cambio de ácidos funcionales de interés (Ácido ascórbico, ácido málico, ácido oxálico y ácido cítrico). Además se tomaron las muestras para el día cero a 20 °C para los tres estados de madurez.

Cada día de extracción se tomaron tres unidades experimentales por estado de madurez, por cada temperatura totalizando 27 unidades experimentales y 54 bolsas. Esto se aprecia mejor en la tabla 3.

	Temperatura
Madurez	20 °C
50%	1 unid.
75%	1 unid.
100%	1 unid.
<i>subtotal</i>	3 unid.
total	3 unid.

Tabla 1. Número de unidades experimentales examinadas el día cero.

	Temperatura		
Madurez	4 °C	8 °C	20 °C
50%	3 unid.	3 unid.	3 unid.
75%	3 unid.	3 unid.	3 unid.
100%	3 unid.	3 unid.	3 unid.
<i>subtotal</i>	9 unid.	9 unid.	9 unid.
total			27 unid.

Tabla 2. Número de unidades experimentales examinadas diariamente entre el día 1 y el día 8.

Así entonces se examinarán 27 unidades experimentales diariamente lo que es 54 bolsas. En este punto hay que mencionar que algunos de los frutos alcanzaron su estado de senescencia en la parte final del desarrollo de la experimentación y estaban en tan malas condiciones que se descartaron para realizar cualquier determinación; es así que en el día seis de experimentación se descartaron los frutos de todos los estados de madurez a temperatura ambiente y en los días siete y ocho se descartaron también los frutos de todos los estados de madurez almacenados a 4 °C.

	unidades analizadas			
Temperatura	<i>Día 1 -5</i>	<i>Día 6</i>	<i>Día 7</i>	<i>Día 8</i>
4 °C	9 (x5 días)	9	ninguna	ninguna
8 °C	9 (x5 días)	9	9	9
20 °C	9 (x5 días)	ninguna	ninguna	ninguna
<i>Total</i>	27 (x5 días)	18	9	9

Tabla 3. Número de unidades experimentales examinadas efectivamente en los días de experimentación desde el día uno en adelante.

Así, en total se tuvieron muestras de 174 unidades experimentales.

En la siguiente tabla se encuentra la equivalencia entre los días de experimentación (días del 1 al 8) y los días de seguimiento transcurridos desde el inicio del experimento.

<i>Día No</i>	<i>Días transcurridos</i>
Día 0	0
Día 1	3
Día 2	10
Día 3	14
Día 4	17
Día 5	21
Día 6	25
Día 7	28
Día 8	31

Tabla 4. Días de experimentación y números de días de seguimiento transcurridos.

En la sección de discusión de resultados se explicaran de forma más detallada las razones por las cuales se descartaron los frutos a las temperaturas referidas en los días finales del experimento.

5.5. Determinación de pérdida de humedad

La pérdida de humedad para cada una de las unidades experimentales en todos los días de medición fue registrada haciendo la diferencia entre los pesos inicial y registrado en el día de medición, siendo esta diferencia la masa perdida hasta dicho día.

5.6. Determinación de cambios en Ácidos por HPLC

La determinación y cuantificación del contenido de ácidos orgánicos (ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido oxálico y ácido málico) se hizo por cromatografía líquida de alta eficiencia utilizando un equipo HPLC con detector UV-VIS (Hernández et al., 2007 y Barrera et al, 2008) realizando la extracción de la muestra con una fase móvil de ácido fosfórico 5 mM (Protocolo Laboratorio de Fisiología Vegetal, Departamento de Biología Universidad Nacional, especificaciones técnicas de la columna).

Los tratamientos propuestos se distribuyeron en un diseño completamente aleatorizado de una vía (DCA) con arreglo factorial 3*2 y tres temperaturas de almacenamiento. Se realizó un análisis de componentes principales para determinar el grado de correlación existente entre las variables de respuesta evaluados.

5.7. Procedimiento de extracción

5.7.1. Extracción de la muestra del fruto

En primer término se procede a destacar las unidades experimentales a evaluar. Se hace la identificación de cada unidad de acuerdo al estado de madurez inicial y a la temperatura de almacenamiento que junto con el peso inicial se han registrado con antelación. Luego de esto cada bolsa es pesada y se procede a realizar el proceso de extracción. Los frutos son seccionados en dos mitades. El contenido interior (endocarpio, pulpa) es entonces retirado separándolo por completo de la corteza para ser después separado en jugo y semillas con ayuda de un filtro o exprimidor; el jugo es entonces

colectado y depositado en recipientes cerrados cubiertos con papel aluminio y guardados en congelación a -80° (Matta, Arjona, Garner y Silva, 2006).

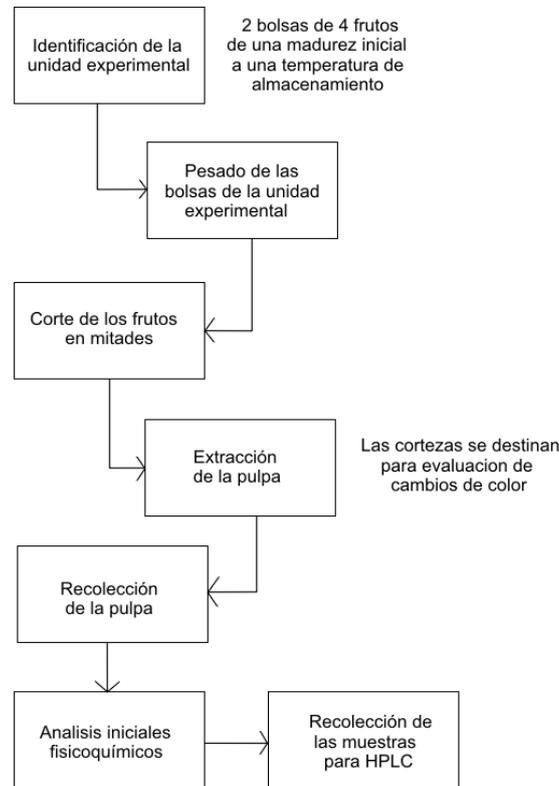


Figura 1. Extracción de la muestra del fruto.

5.7.2. Extracción de la muestra para el análisis por HPLC

Todo el desarrollo del procedimiento se realiza en condiciones de mínima presencia de luz. La muestra se retira del congelador y se procede a pesar en una balanza analítica una cantidad cercana a 1,5 – 2,0 gramos en un tubo falcon de 15 ml; el tubo se recubre con papel aluminio para evitar el contacto del material con la luz. Después se agregan 12 ml de Acido Orto fosfórico 5 mM y se procede a homogenizar en Vortex durante un tiempo de 15 minutos. Luego de esto la muestra es centrifugada a 6000 rpm y 4°C durante 30 minutos. El tiempo de separación de las dos fases y la velocidad puede variar dependiendo de la muestra a analizar. Al finalizar la centrifugación se observa la clara formación de dos fases bien definidas (una fase líquida translúcida y un precipitado naranja); si esto no ocurre se centrifuga por otros 20 minutos más.

Después de esto se retira con micropipeta el sobrenadante cuidando de no mezclar las fases. Entonces se filtra cada muestra en un filtro pre-heringa de PTFE de $0,45\ \mu\text{m}$ ó 0.2

μm y 13 mm de diámetro y el filtrado se introduce en los viales para ser llevados luego al equipo de HPLC. Luego de esto se hace el análisis por HPLC de acuerdo al analito:

Para Ácido ascórbico en una muestra individual (Iwase, I., 2000)

Se hace el análisis a una longitud de onda de $\lambda = 240 \text{ nm}$.

Para los demás ácidos:

Para ácidos orgánicos, se hace el análisis a una longitud de onda de $\lambda = 207 \text{ nm}$.

Se hace dos veces el análisis cada 100 muestras para calibrar el equipo (Comunicación personal).

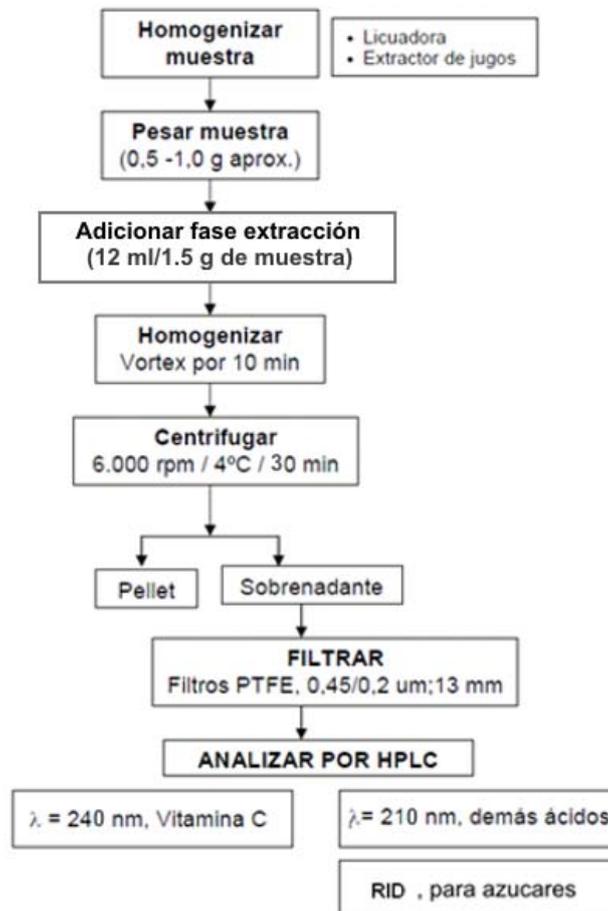


Figura 2. Procedimiento de extracción y análisis de muestras HPLC.

5.8. Preparación de la fase móvil

5.8.1. Cálculos

La fase móvil, en este caso Ácido Fosfórico 5 mM también se utiliza como solvente de extracción.

Para preparar 1 litro (1000 mL) de solución 5 mM de Ácido O. fosfórico:

$$C_{H_3PO_4} = \frac{1,7g \times 1000}{1ml \times 97,97g/mol} \quad (1)$$

$$C_{H_3PO_4} = 17,35M$$

$$V_1 = \frac{0,005M \times 1000ml}{17,35M} = 0,286 \text{ ml} = 286\mu l \quad (2)$$

Fase de limpieza de la columna (Ácido sulfúrico 5mM).

Según las recomendaciones del equipo (ver anexo C) debe hacerse una corrida con la fase de limpieza al finalizar cada ciclo de medición.

Para preparar 1 litro (1000 mL) de solución 5 mM de Ácido Sulfúrico:

Se dispone de A. Sulfúrico 96 % p/p.

$$C_{H_2SO_4} = \frac{96g \times 1,84g \times 1000}{100g \times 1ml \times 98,08g/mol} \quad (3)$$

$$C_{H_2SO_4} = 18M$$

$$V_1 = \frac{0,005M \times 1000ml}{18M} = 0,278 \text{ ml} = 278\mu l \quad (4)$$

5.8.2. Procedimiento

a. Preparación de la fase móvil y de extracción, solución 5 mM de A. Fosfórico

Se toman 286 μ l de ácido fosfórico (17,35 M) con micropipeta y se llevan a 1000 mL con agua tipo HPLC en un balón aforado previamente purgado con agua tipo HPLC.

Se pasa entonces esta solución a un frasco de vidrio de 1000 mL previamente purgado (2-3 veces) con la solución preparada y se lleva luego a refrigeración (se marca con el nombre, la concentración y la fecha de preparación).

b. Preparación de la fase de limpieza, solución 5 mM de H_2SO_4

Se toman 278 μ l de H_2SO_4 al 96% y se llevan a 1000 mL con agua tipo HPLC en un balón aforado previamente purgado con agua tipo HPLC.

Se pasa entonces esta solución a un frasco de vidrio de 1000 mL previamente purgado (2-3 veces) con la solución preparada y se lleva luego a refrigeración (se marca con el nombre, la concentración y la fecha de preparación).

5.9. Especificaciones del equipo

(Equipo HPLC Laboratorio de Fisiología Vegetal, Departamento de Biología Universidad Nacional sede Bogotá)

Columna Rezex ROA-Organic Acid H+

Dimensiones 300 x 7.8 mm

Especificaciones:

Tamaño de partícula: 8µm

Resina de forma iónica: Hidrógeno

Soporte: Copolímero de divinilbenceno-estireno sulfonatado

Presión Máxima: 600 psi

Temperatura máxima: 85°C

pH: 1-3

Fase móvil: H_2SO_4 5mM

CONDICIONES

Flujo 0.5 mL/min

Temperatura de horno 35°C

Para Acido Ascórbico:

Tiempo de corrida: 30 minutos

Tiempo de retención: 20.96 min.

Longitud de Onda de Detección: 240 nm

Para otros Ácidos:

Tiempo de corrida 30 minutos

Tiempos de retención

Acido Oxálico: 13.73 min.

Acido Cítrico: 16.93 min.

Acido Málico: 19.95 min.

Longitud de Onda de Detección: 207 nm

Más información acerca de las especificaciones del equipo puede encontrarse en el Anexo C.

5.10. Curvas de calibración para ácidos

El equipo de HPLC reporta al final de su operación un grafico en donde se tienen representados las diferentes sustancias por simas, cada una ubicada sobre el tiempo de retención de la sustancia en la columna (sobre el eje x) y con unas áreas determinadas; el área de cada domo o sima, está directamente relacionada con la concentración de la sustancia en cuestión en la muestra analizada y para saber la ecuación que relaciona estas dos variables es necesario obtener una representación grafica (una curva de calibración) que se construye a partir de concentraciones conocidas de la sustancia que reportan unas áreas determinados. Generalmente la relación entre las variables

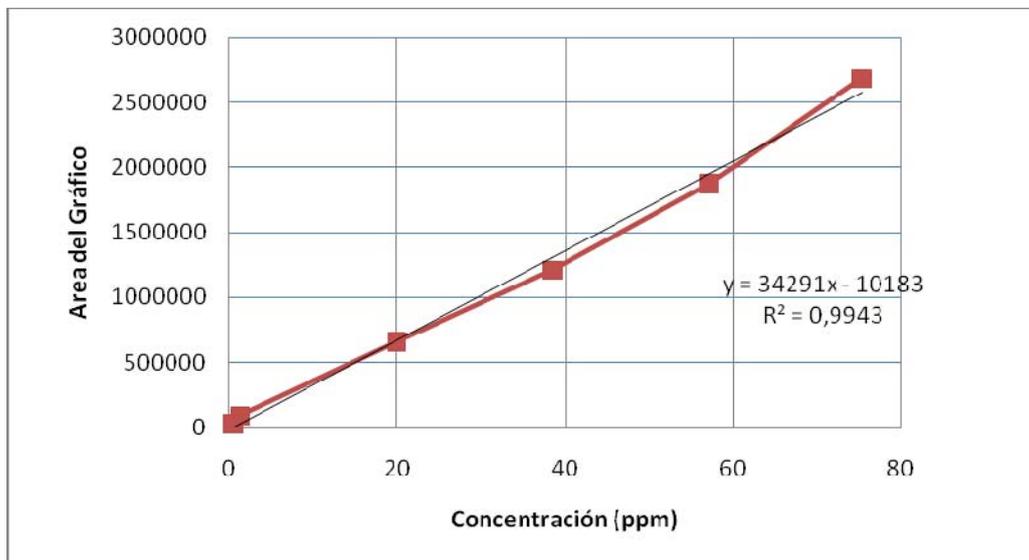
concentración y área es una ecuación de la forma $y = ax + b$ representada como una recta. Para este caso lo es.

Para cada uno de los ácidos evaluados se generaron curvas de calibración haciendo pasar varias muestras de concentración conocida encontrando la relación entre el área y la concentración. A continuación se presentan estos resultados:

a. Ácido Ascórbico

ASCÓRBICO		
Muestra	CONCENTRACIÓN	AREA
N5	75,3	2681432
N4	57,12	1875550
N3	38,51	1209693
N2	19,9	658024
N1	1,28	92406
N0	0,5	26579
INTERCEPTO	-10183,0	
PENDIENTE	34291,0	
r ²	0,99400	

Tabla 5. Datos de calibración A. Ascórbico.

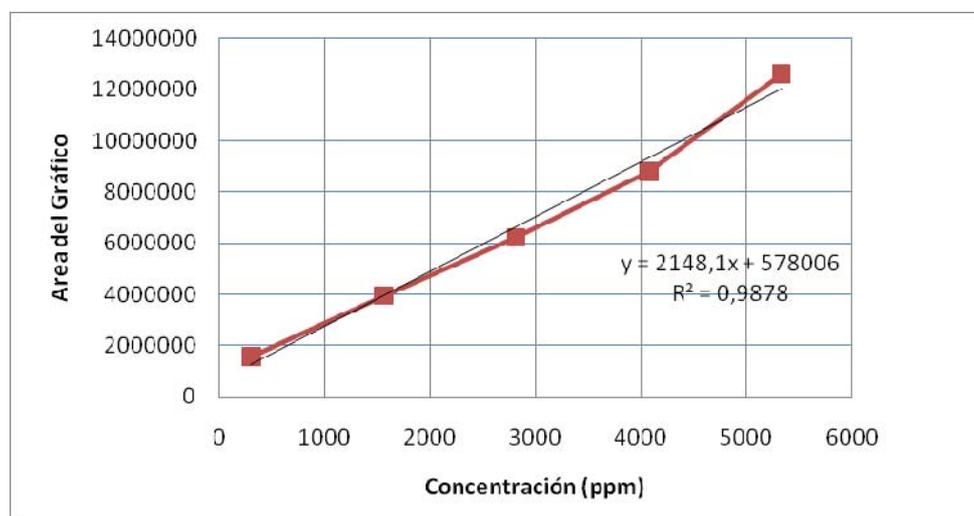


Gráfica 3. Concentración vs. Área de gráfico, A. Ascórbico.

b. Ácido Cítrico

CÍTRICO		
Muestra	CONCENTRACIÓN	AREA
N5	5330,507	12621636
N4	4072,643	8804043
N3	2817,862	6221994
N2	1563,081	3947192
N1	308,3	1567144
INTERCEPTO	57800,0	
PENDIENTE	2148,1	
r2	0,98779	

Tabla 6. Datos de calibración A. Cítrico.

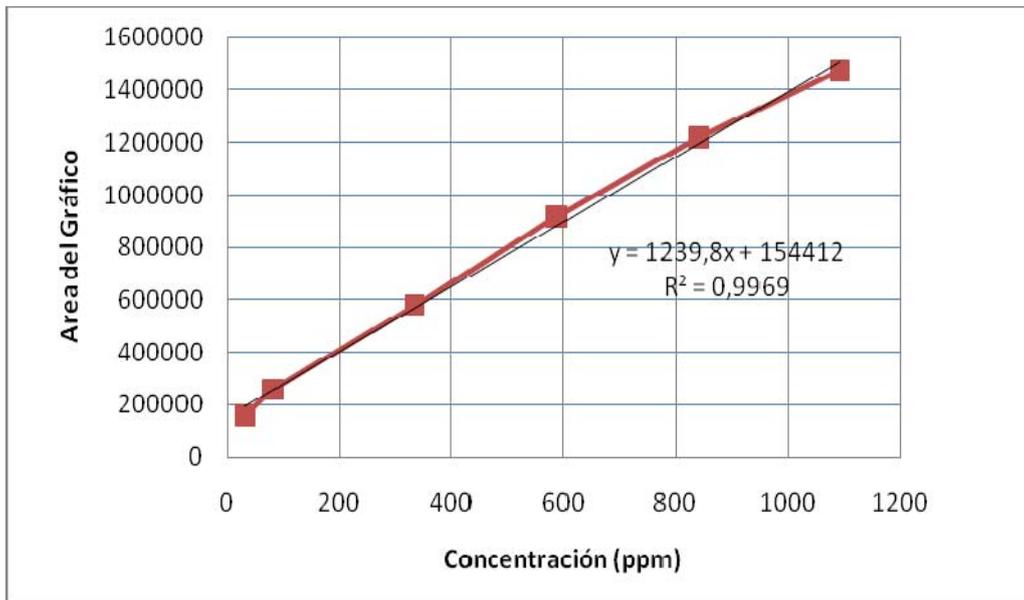


Gráfica 4. Concentración vs. Área de gráfico, A. Cítrico.

c. Ácido Málico

MÁLICO		
Muestra	CONCENTRACIÓN	AREA
N5	1093,71	1472654
N4	840,47	1217870
N3	587,23	916819
N2	333,99	580255
N1	80,74	258138
N0	31,3	159865
INTERCEPTO	15441,0	
PENDIENTE	1239,8	
r2	0,996	

Tabla 7. Datos de calibración A. Málico.

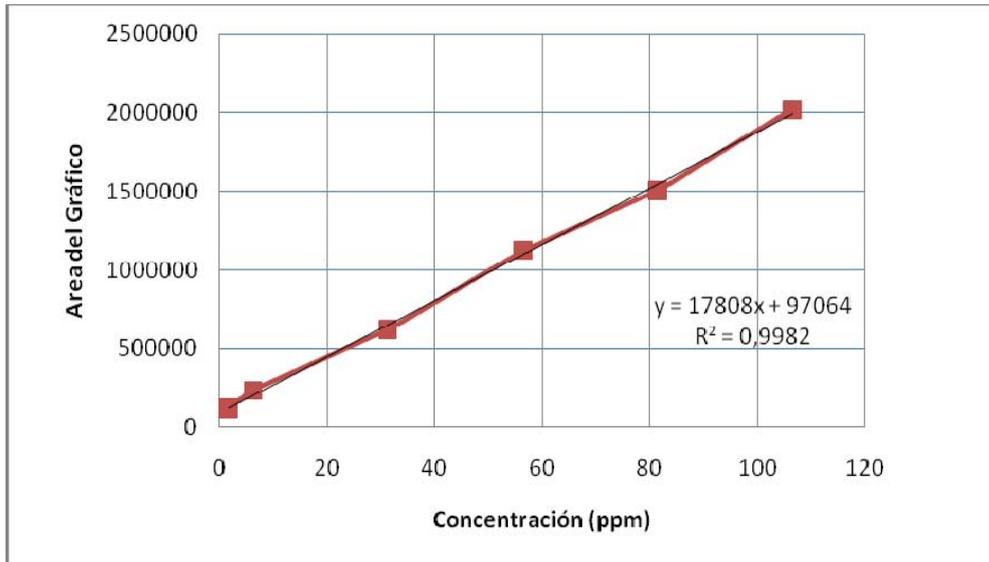


Gráfica 5. Concentración vs. Área de gráfico, A. Málico.

d. **Ácido Oxálico**

OXÁLICO		
Muestra	CONCENTRACIÓN	AREA
N5	106,46	2019870
N4	81,39	1503789
N3	56,33	1125815
N2	31,26	621770
N1	6,2	235922
N0	1,6	119979
NTERCENPTO	97064,0	
PENDIENTE	17808,0	
r2	0,99748	

Tabla 8. Datos de calibración A. Oxálico.



Gráfica 6. Concentración vs. Área de gráfico, A. Oxálico.

La concentración que se determina a través de estas graficas es la concentración de cada acido en la fase de extracción; en este caso la fase de Ácido Fosfórico 5 mM. Esta concentración en ppm es más específicamente para cada ácido:

$$[\text{Ácido}_{\text{Fase extracción}}] : \text{mg}_{\text{Ácido}} / \text{l}_{\text{Fase extracción}}$$

Sin embargo, para obtener la concentración de cada ácido en la muestra de fruta debe tenerse en cuenta el volumen de fase de extracción utilizado y el peso de la muestra:

$$[\text{Ácido}_{\text{Fruta}}] = \frac{\text{mg}_{\text{Ácido}}}{\text{l}_{\text{Fase de extracción}}} * \frac{\text{xmL}_{\text{Fase de extracción}}}{1000 \text{ml/l}} * \frac{1000^{\text{g}}/\text{Kg}}{\text{xg}_{\text{Fruta}}} : \text{mg}_{\text{Ácido}} / \text{Kg}_{\text{Fruta}} \quad (5)$$

En donde:

$\text{xmL}_{\text{Fase de extracción}}$: El volumen de fase de extracción utilizado en ml, en este caso 12 ml de Ácido Fosfórico 5mM.

xg_{Fruta} : La masa de la muestra de fruta utilizada en gramos.

Ejemplo:

Una de las muestras analizadas el día cero del experimento tenía las siguientes características:

<i>Día de seguimiento</i>	0
<i>% de madurez inicial</i>	50
<i>Temperatura (°C)</i>	20
<i>Masa muestra (g)</i>	1,9697
<i>Área de gráfico</i>	64727

Para obtener la concentración en la fase de extracción de Acido Ascórbico en esta muestra se utiliza la ecuación que aparece en la gráfica 3, quedando:

$$[\text{Ácido}_{\text{Fase extracción}}] : \frac{64727 - (-10183)}{34291} = 2,18 \text{ mg}_{\text{Ácido}} / \text{l}_{\text{Fase extracción}} \quad (6)$$

Ahora bien, para conocer la concentración de A. Ascórbico en la muestra de fruta se hace uso de la ecuación (1) así:

$$[\text{Ácido}_{\text{Fruta}}] = 2,18 \frac{\text{mg}_{\text{Ácido}}}{\text{l}_{\text{Fase de extracción}}} * \frac{12 \text{ mL}_{\text{Fase de extracción}}}{1000 \text{ ml/l}} * \frac{1000^{\text{g}} / \text{Kg}}{1,9697 \text{ g}_{\text{Fruta}}} = 13,3 \text{ mg}_{\text{Ácido}} / \text{Kg}_{\text{Fruta}} \quad (7)$$

De esta forma se procedió para calcular las concentraciones de cada ácido en cada una de las muestras analizadas.

6

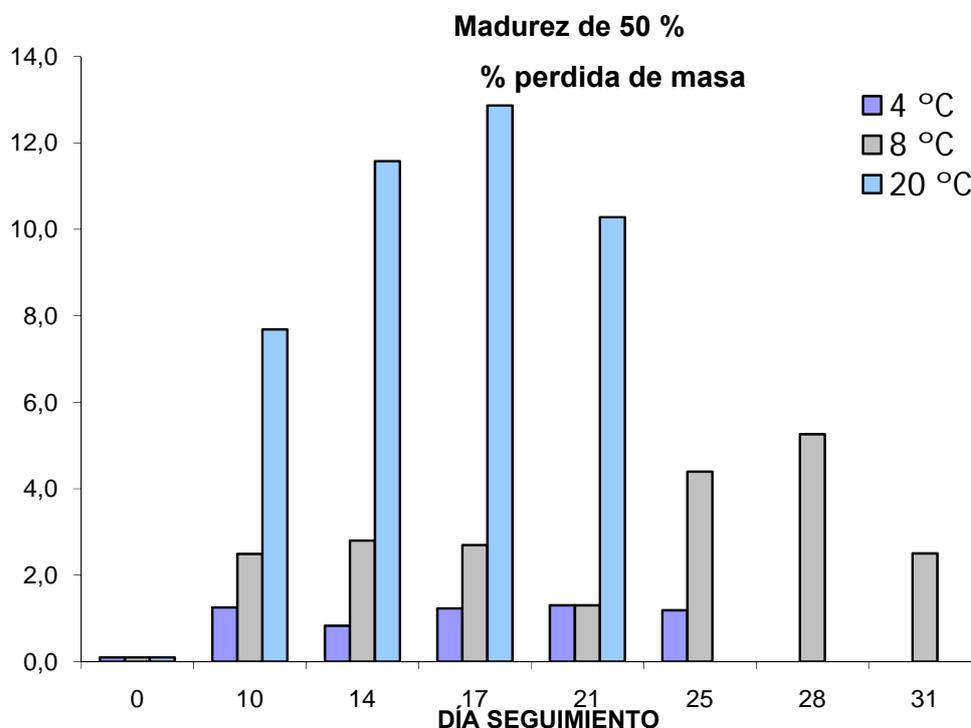
RESULTADOS OBTENIDOS

6.1. Cambios de peso por pérdida de humedad

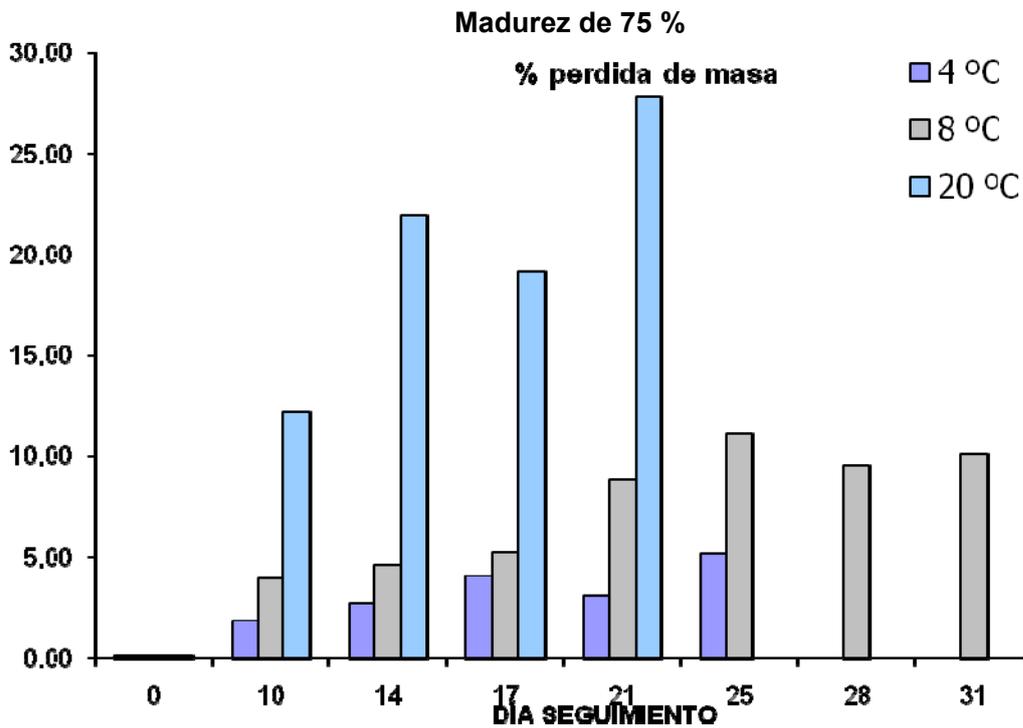
El empaque tipo Xtend permite cierta permeabilidad al vapor de agua lo que sumado a la diferencia entre la presión parcial del agua en el medio ambiente P_{H_2O} y a la presión de saturación del agua en el fruto P_{sat} siendo mayor esta última permite la transferencia de masa (en este caso de agua) por la difusión de esta a través del empaque plástico por la diferencia de concentración existente entre el fruto y el ambiente que lo rodea.

La pérdida de agua, va produciendo en la corteza del fruto una especie de “arrugamiento” en donde el fruto pierde tamaño y su corteza se va arrugando; este fenómeno no compromete en gran manera, al menos hasta que el fruto entra claramente en el estado de senescencia, el contenido nutricional del fruto y para este caso específico el contenido de ácidos funcionales pero debido a que las características sensoriales del producto se ven claramente afectadas y desmejoradas es de gran importancia considerarlo.

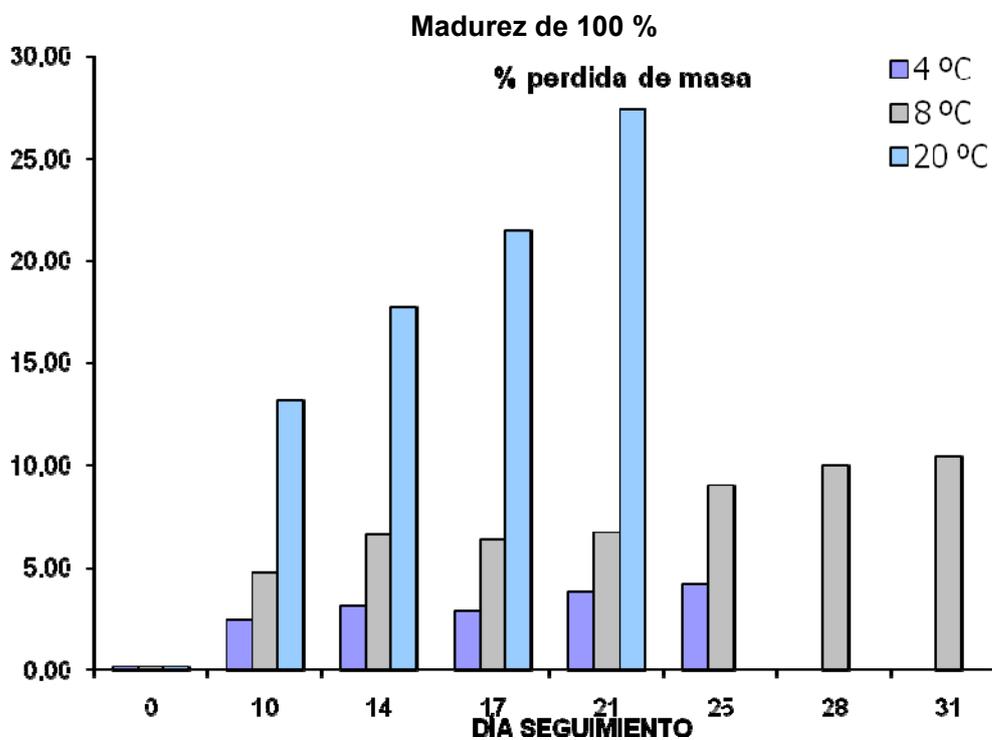
Las siguientes graficas muestran los cambios y pérdidas de peso en el transcurso del ensayo para los tres estados de maduración; los datos correspondientes a estas graficas se encuentran en el anexo A.



Gráfica 7. Porcentaje de pérdida de masa (humedad) para los frutos almacenados con un estado de madurez inicial de 50 %



Gráfica 8. Porcentaje de pérdida de masa (humedad) para los frutos almacenados con un estado de madurez inicial de 75 %



Gráfica 9. Porcentaje de pérdida de masa (humedad) para los frutos almacenados con un estado de madurez inicial de 100 %

Las pérdidas de masa para los frutos con porcentajes de madurez iniciales de 75 y 100 % y temperatura de conservación de 20 °C, eran cercanas al 30 % hacia el día 21 (día 5 de medición) mientras las de los frutos con una madurez inicial de 50 % ya llegaban al 14 % hacia el mismo día; estas pérdidas de masa son económicamente insostenibles y por esta razón no tenía caso continuar la experimentación con estos frutos por lo que se descartaron. Se hablara más a fondo de esto en el Capítulo 7 de Análisis de Resultados. Se descartaron igualmente hacia el día 25 (día 6 de medición) los frutos conservados a 4 °C debido a que se comenzaron a notar daños en la corteza de los frutos ocasionados por la baja temperatura de refrigeración (daños por frío) (Paull y Chen, 2008).

6.2. Ácidos Funcionales

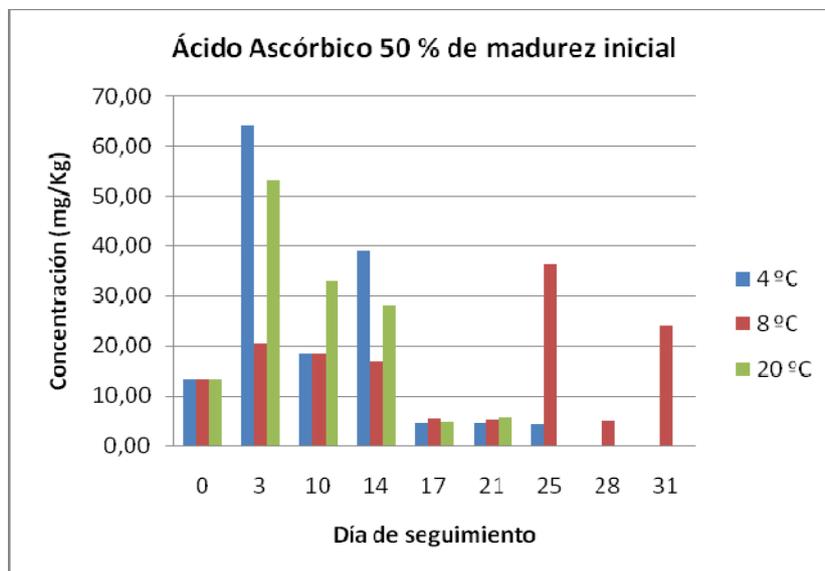
A partir de los datos provenientes de todas las unidades experimentales analizadas se generaron las tablas consolidadas que expresan los valores de concentración de cada ácido en las muestras en cada uno de los días de seguimiento, para cada temperatura y cada estado de madurez inicial.

a. 50 % de madurez inicial

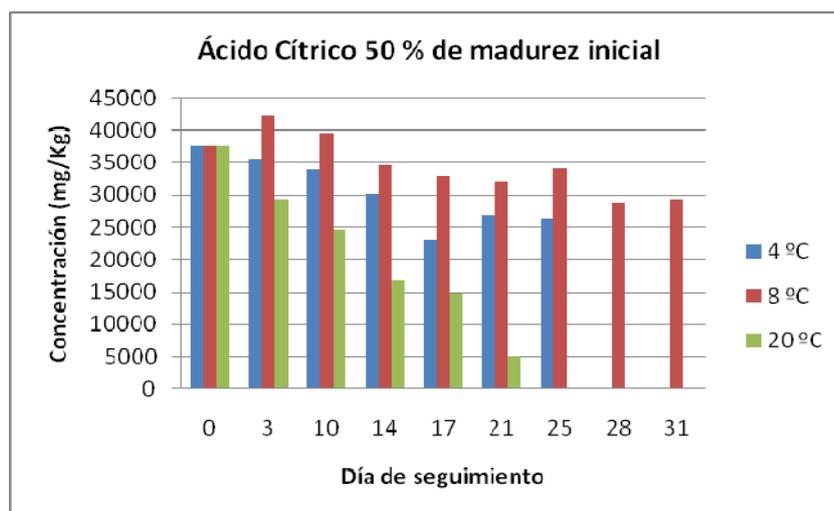
% Maduración	Día	Día Seguimiento	Temperatura (°C)	Ascórbico (mg/Kg)	Cítrico (mg/Kg)	Málico (mg/Kg)	Oxálico (mg/Kg)
50	0	0		13,31	37549,55	7135,52	233,13
50	1	3	4	64,04	35558,74	4841,81	276,69
50	2	10	4	18,37	33925,21	3967,86	234,59
50	3	14	4	39,21	30193,36	3630,54	201,38
50	4	17	4	4,48	23050,20	3647,33	255,12
50	5	21	4	4,49	26839,73	3301,55	236,18
50	6	25	4	4,43	26389,48	2763,96	205,20
% Maduración	Día	Día Seguimiento	Temperatura (°C)	Ascórbico (mg/Kg)	Cítrico (mg/Kg)	Málico (mg/Kg)	Oxálico (mg/Kg)
50	0	0		13,31	37549,55	7135,52	233,13
50	1	3	8	20,52	42367,33	4597,37	257,21
50	2	10	8	18,31	39556,42	4000,91	250,25
50	3	14	8	17,03	34623,92	4513,34	208,40
50	4	17	8	5,49	33051,89	4469,99	207,14
50	5	21	8	5,31	31989,51	4644,71	229,45
50	6	25	8	36,28	34121,78	4148,33	247,20
50	7	28	8	5,10	28768,29	4902,40	233,63
50	8	31	8	24,16	29265,29	3976,82	235,40

% Maduración	Día	Día Seguimiento	Temperatura (°C)	Ascórbico (mg/Kg)	Cítrico (mg/Kg)	Málico (mg/Kg)	Oxálico (mg/Kg)
50	0	0		13,31	37549,55	7135,52	233,13
50	1	3	20	53,25	29231,11	6923,04	201,30
50	2	10	20	32,89	24551,82	6246,94	180,36
50	3	14	20	28,18	16854,53	3187,96	143,47
50	4	17	20	4,90	14913,44	3413,07	127,16
50	5	21	20	5,88	5049,72	1758,12	128,97

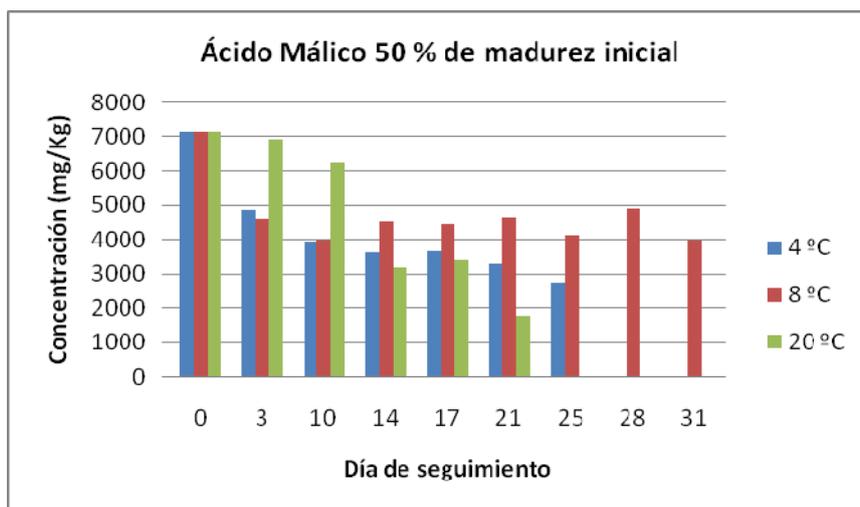
Tabla 9. Concentraciones para frutos de 50 % de madurez inicial



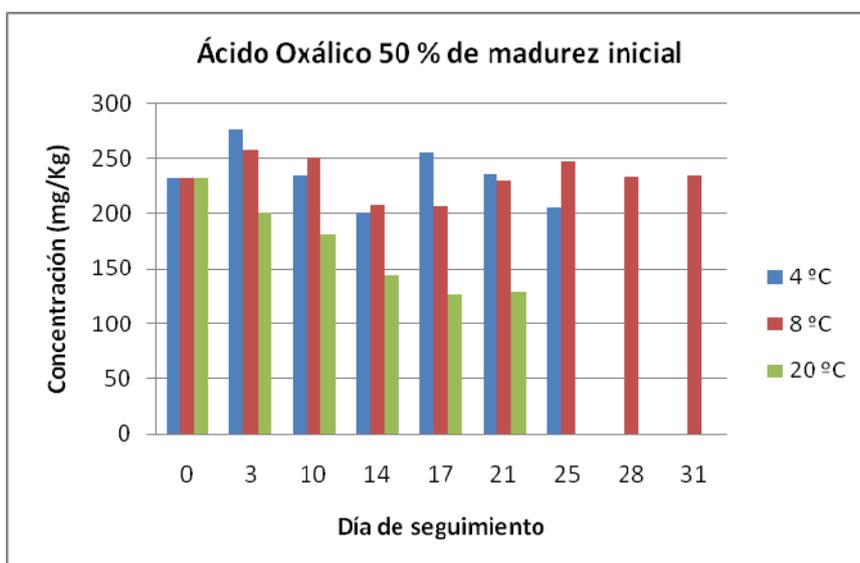
Gráfica 10. Concentraciones de A. Ascórbico para frutos de 50 % de madurez inicial.



Gráfica 11. Concentraciones de A. Cítrico para frutos de 50 % de madurez inicial.



Gráfica 12. Concentraciones de A. Málico para frutos de 50 % de madurez inicial.



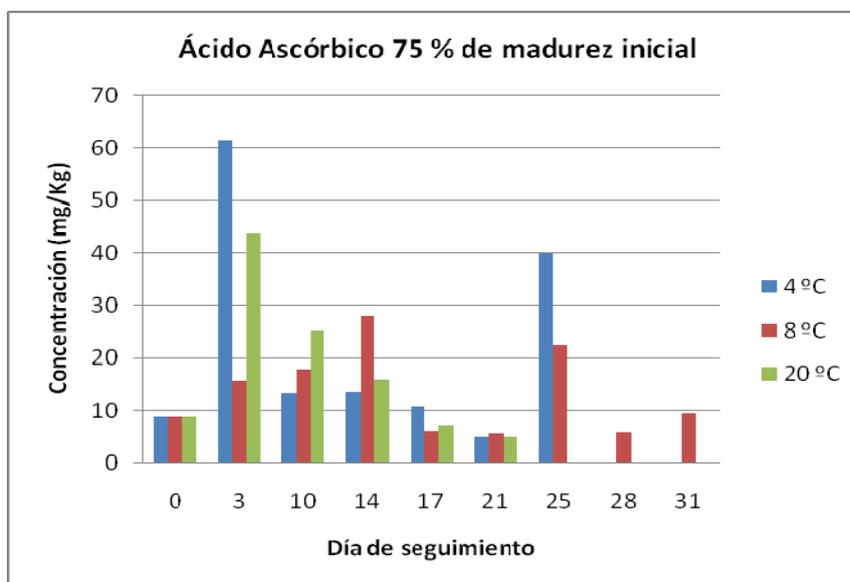
Gráfica 13. Concentraciones de A. Oxálico para frutos de 50 % de madurez inicial.

b. 75 % de madurez inicial

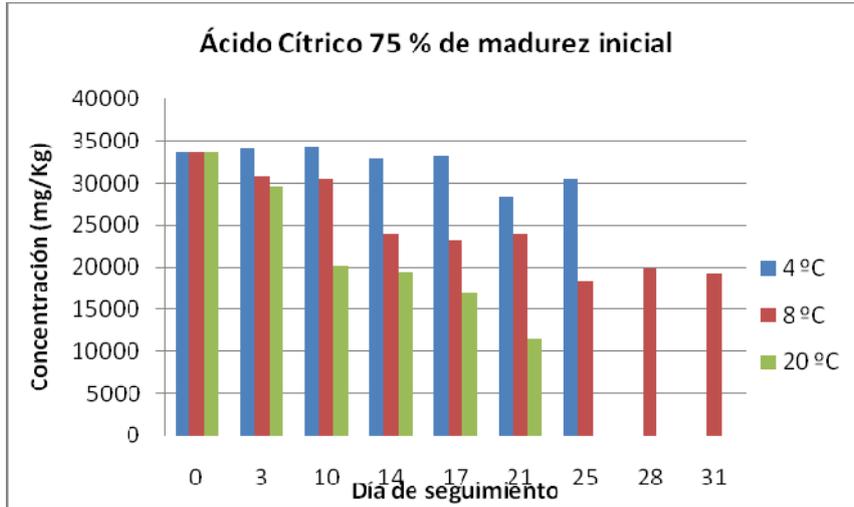
% Maduración	Día	Día Seguimiento	Temperatura (°C)	Ascórbico (mg/Kg)	Cítrico (mg/Kg)	Málico (mg/Kg)	Oxálico (mg/Kg)
75	0	0		8,79	33582,38	6733,69	280,41
75	1	3	4	61,44	34088,60	4595,82	234,47
75	2	10	4	13,07	34249,26	3757,93	215,44
75	3	14	4	13,45	32817,59	3285,49	241,90
75	4	17	4	10,75	33217,67	3544,69	222,81
75	5	21	4	4,93	28243,30	3409,04	241,18
75	6	25	4	39,95	30443,34	3596,30	245,08

% Maduración	Día	Día Seguimiento	Temperatura (°C)	Ascórbico (mg/Kg)	Cítrico (mg/Kg)	Málico (mg/Kg)	Oxálico (mg/Kg)
75	0	0		8,79	33582,38	6733,69	280,41
75	1	3	8	15,66	30805,66	6456,84	204,17
75	2	10	8	17,70	30565,97	6260,03	211,71
75	3	14	8	28,06	24036,60	4365,36	186,19
75	4	17	8	6,17	23208,46	5388,89	217,94
75	5	21	8	5,71	24048,29	5864,27	225,86
75	6	25	8	22,36	18397,88	5062,59	175,73
75	7	28	8	5,95	19839,16	5493,83	184,16
75	8	31	8	9,45	19239,96	5062,35	202,51
% Maduración	Día	Día Seguimiento	Temperatura (°C)	Ascórbico (mg/Kg)	Cítrico (mg/Kg)	Málico (mg/Kg)	Oxálico (mg/Kg)
75	0	0	20	8,79	33582,38	6733,69	280,41
75	1	3	20	43,69	29680,73	4562,29	214,44
75	2	10	20	25,07	20216,70	5099,23	187,38
75	3	14	20	15,74	19439,12	3205,56	187,65
75	4	17	20	6,90	16846,70	3211,30	194,43
75	5	21	20	5,10	11407,89	2531,04	155,72

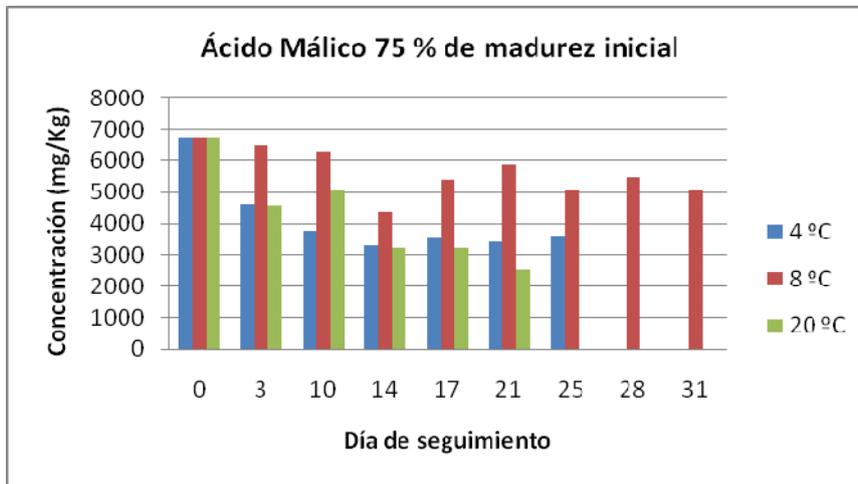
Tabla 10. Concentraciones para frutos de 75 % de madurez inicial



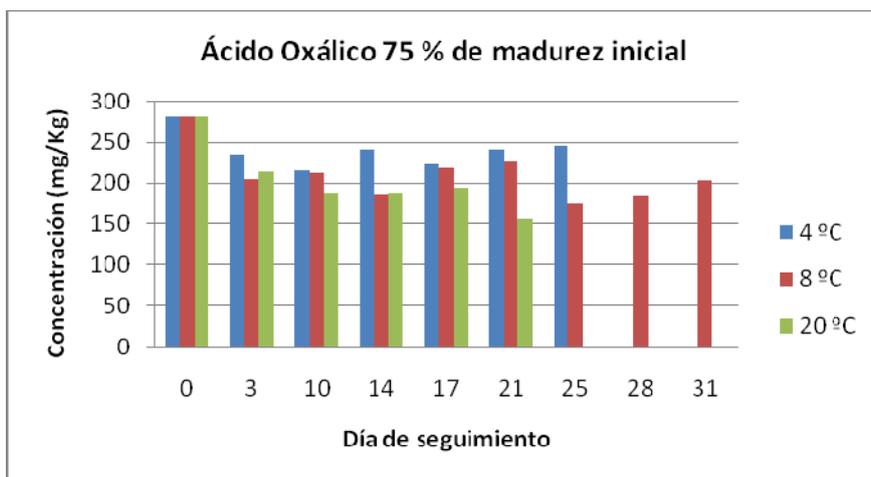
Gráfica 14. Concentraciones de A. Ascórbico para frutos de 75 % de madurez inicial.



Gráfica 15. Concentraciones de A. Cítrico para frutos de 75 % de madurez inicial.



Gráfica 16. Concentraciones de A. Málico para frutos de 75 % de madurez inicial.

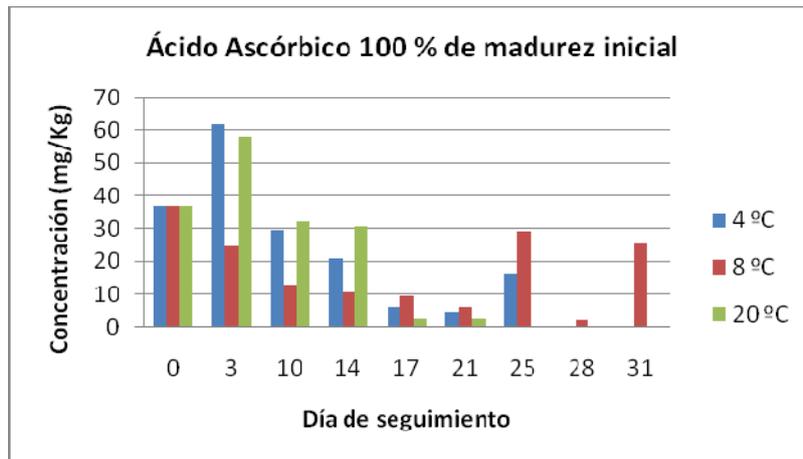


Gráfica 17. Concentraciones de A. Oxálico para frutos de 75 % de madurez inicial.

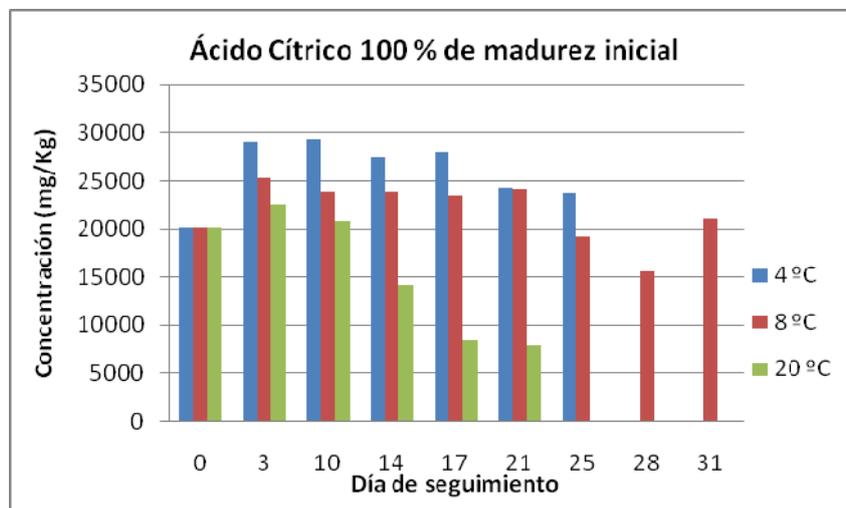
c. 100 % de madurez inicial

% Maduración	Día	Día Seguimiento	Temperatura (°C)	Ascórbico (mg/Kg)	Cítrico (mg/Kg)	Málico (mg/Kg)	Oxálico (mg/Kg)
100	0	0		36,77	20172,35	5602,19	161,34
100	1	3	4	61,96	29113,54	6419,73	215,64
100	2	10	4	29,72	29332,07	5782,27	211,52
100	3	14	4	20,77	27571,63	3610,92	199,33
100	4	17	4	6,11	28047,68	5008,47	217,05
100	5	21	4	4,68	24268,00	4452,56	214,86
100	6	25	4	16,42	23814,62	4167,18	215,50
% Maduración	Día	Día Seguimiento	Temperatura (°C)	Ascórbico (mg/Kg)	Cítrico (mg/Kg)	Málico (mg/Kg)	Oxálico (mg/Kg)
100	0	0		36,77	20172,35	5602,19	161,34
100	1	3	8	24,49	25372,23	7509,82	232,58
100	2	10	8	12,78	23851,91	5582,77	209,27
100	3	14	8	10,66	23897,88	5626,36	191,63
100	4	17	8	9,34	23466,54	5901,60	212,25
100	5	21	8	5,94	24111,26	5956,26	223,23
100	6	25	8	29,04	19191,02	4817,82	194,28
100	7	28	8	2,07	15555,41	5035,27	178,50
100	8	31	8	25,45	21190,60	4142,39	182,33
% Maduración	Día	Día Seguimiento	Temperatura (°C)	Ascórbico (mg/Kg)	Cítrico (mg/Kg)	Málico (mg/Kg)	Oxálico (mg/Kg)
100	0	0		36,77	20172,35	5602,19	161,34
100	1	3	20	57,90	22630,75	6726,23	179,42
100	2	10	20	32,29	20725,77	5535,77	200,40
100	3	14	20	30,71	14185,72	2246,78	130,69
100	4	17	20	2,75	8495,38	1740,53	137,19
100	5	21	20	2,58	7998,48	2019,63	134,07

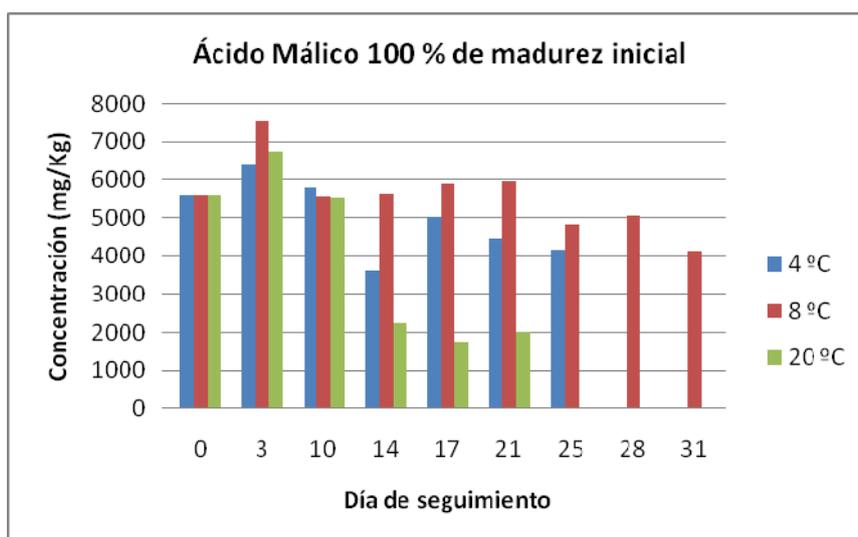
Tabla 11. Concentraciones para frutos de 100 % de madurez inicial.



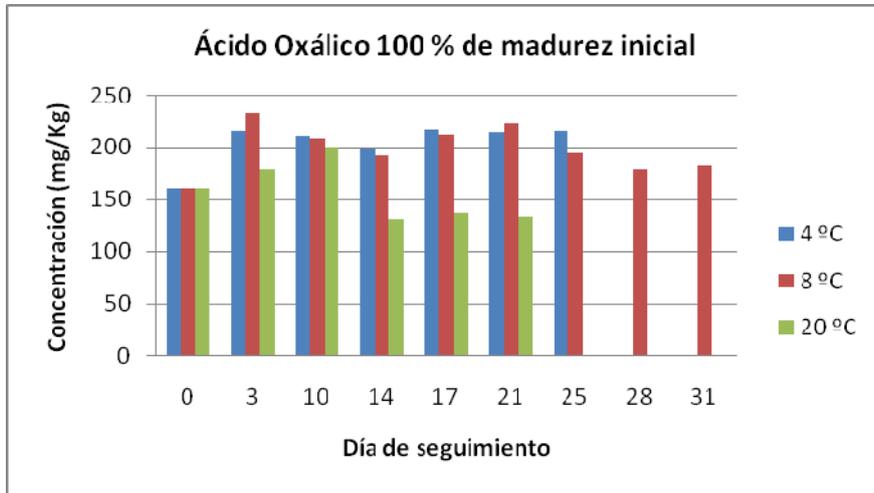
Gráfica 18. Concentraciones de A. Ascórbico para frutos de 100 % de madurez inicial.



Gráfica 19. Concentraciones de A. Cítrico para frutos de 100 % de madurez inicial.



Gráfica 20. Concentraciones de A. Málico para frutos de 100 % de madurez inicial.



Gráfica 21. Concentraciones de A. Oxálico para frutos de 100 % de madurez inicial.

Las observaciones y análisis de las gráficas y tablas anteriores se hacen en el siguiente capítulo.

7

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Peso y humedad

Como ya se ha explicado de alguna forma en el capítulo de resultados, debido a la gran pérdida de masa (incluso del 30 %) como agua evaporada que permeo el empaque de experimentación, se descartaron los frutos almacenados a 20 °C (Temperatura Ambiente) para el día 6 (transcurridos 25 días). Teniendo en cuenta la diferencia existente entre la humedad relativa (H) del ambiente, y la actividad de agua (a_w) del fruto favorable a esta última, existe gradiente de concentración de agua que permite a esta por un fenómeno de transferencia de masa conocido como difusión salir al exterior (yendo del punto de mayor concentración al de menor concentración y en este caso hacia el ambiente); en exterior del fruto, el aire en movimiento va arrastrando el agua que sale del fruto lo que permite que el gradiente de concentración se mantenga, fenómeno conocido como convección. Todo lo anterior, depende de la temperatura en que se encuentra el fruto, la humedad relativa y flujo y velocidad del aire que se generan en el exterior (Díaz-Pérez, J., et. al., 2000). Entre mayor sea el gradiente, se va a generar una pérdida mayor de agua en el tiempo lo cual se puede ver por una reducción en el peso total (Pachón, L., et. al., 2006). Las razones de esto son las siguientes: si bien el contenido nutricional puede no verse mayormente afectado la gran pérdida de agua no es nada rentable para el productor y el comercializador; El contenido de agua en estas frutas es de 80 % aproximadamente (Pinzón et al, 2007) viéndose reducido a cerca del 57 % en el caso de los frutos que se encontraban a 20 °C con una pérdida del 30 % del peso del fruto. La temperatura de 20 °C por supuesto no es la adecuada para el almacenamiento de los frutos; además, el arrugamiento de la corteza hace el producto menos atractivo al consumidor. También a partir del día 7 (transcurridos 28 días de seguimiento) se descartaron los frutos almacenados a 4 °C porque se comenzaron a evidenciar daños en la corteza en forma de manchas oscuras y otras alteraciones, lo que concuerda con Pruthi, (1963) que indica que hay daños por frío significativos por debajo de 6,5 °C; estos daños provocan que aquellos productos pierdan parte de su precio por su desmejoramiento sensorial. Debe tenerse en cuenta que este proyecto tiene como principal finalidad el encontrar la temperatura y el estado de madurez inicial óptimo para el almacenamiento de Gulupa que permita el menor cambio en todas sus propiedades durante el mayor tiempo posible mas que simplemente ver un cambio de ácidos a través del tiempo en determinadas condiciones.

Concentración de Ácidos

La concentración de todos los ácidos decrece muy rápidamente en los frutos que fueron almacenados a 20 °C, temperatura ambiente local; a esta temperatura las reacciones internas en el fruto no se detienen, produciéndose la descomposición de los ácidos de interés en el fruto (Shiomi *et al.* 1996). Independientemente del estado de madurez inicial, el decrecimiento de la concentración de ácidos es muy alto por lo que como ya era de suponerse el almacenamiento a la temperatura ambiente sea completamente inadecuado (además de las enormes pérdidas de humedad señaladas antes. Con respecto a las diferencias en la concentración de ácidos entre los tres estados de madurez evaluados, a nivel general y como ya ha sido estudiado (Guzmán y Segura, 1989) (Shiomi, 1996) a

nivel general el contenido de los ácidos es menor cuando el estado de madurez es mayor; esta tendencia tiene su excepción en el caso del ácido ascórbico donde la concentración de este aparece mayor en el caso del estado de madurez del 100 % con respecto a los otros dos en el día de inicio del experimento.

Ácido Ascórbico

El comportamiento del ácido ascórbico fue moderadamente errático. Es posible atribuir la disminución de su contenido en las muestras analizadas, como el resultado del efecto del tratamiento o eventualmente considerar que algunos niveles se vieron afectados por la termosensibilidad de los extractos, En todos los casos el contenido de A. Ascórbico se elevó por encima de 60 mg/Kg hacia el día 3 para luego decrecer en el resto del tiempo de la evaluación; esto, para la condición de 4° C especialmente. Esta respuesta indica un aumento de la actividad metabólica en los frutos, durante el período de poscosecha. En las otras dos condiciones también se presentó un aumento en todos los estados de madurez. En general a 08 C, el contenido de ácido disminuyó más rápidamente para hacerse no detectable hacia el día 21; No se descarta, que en la condición de 4 ° C la respuesta del contenido de ácido ascórbico, también pueda verse influido por el efecto de un posible daño por frío (Pruthi, 1963), teniendo en cuenta el carácter tropical de la gulupa.

Ácido Cítrico

Para el A. Cítrico, la concentración de este es superior para el estado de madurez inicial de 50, luego de 75 y la más baja de 10 %. A 4 °C la concentración de ácido decrece levemente con el tiempo terminando ligeramente por debajo de los valores iniciales para los estados de madurez de 50 y 75 % en el día de seguimiento 25 ultimo para esta temperatura; en cuanto a las muestras de madurez inicial de 100 % se presenta un aumento pero luego el mismo comportamiento que en los otros dos casos. A 20 °C se presenta el decrecimiento ya enunciado y como esta es una tendencia general para todos los ácidos no se hablara más de esta temperatura.

A 8 °C para 50 y 100 % de madurez inicial se ve un aumento de la concentración y luego un decrecimiento leve pero sostenido (más regular en el caso de 50 %); para 75 % de madurez inicial, hay un decrecimiento un poco mayor. La concentración de A. Cítrico se mantiene menor que a 8°C que ha 4 °C excepto para 50 % de madurez inicial que deja los valores más altos al final del experimento (cerca de 30000 mg/Kg).

Para este ácido en particular, esta temperatura (8°C) y este estado de madurez inicial (50 %) parecen ser los que ofrecen mejores resultados. Seguiría el estado de madurez de 75 % a la misma temperatura de almacenamiento con resultados menos satisfactorios aunque sustancialmente mejores que los de 100 % de madurez inicial a 8 °C.

No hay que decir que el contenido de Ácido Cítrico en la Gulupa es verdaderamente significativo en comparación con los otros ácidos (entre 30 y 50 veces más que la concentración de A. Ascórbico por ejemplo).

Ácido Málico

Para el Ácido Málico se presentan algunos comportamientos vistos en los otros dos ácidos. La concentración a 4 °C permanece inferior a la concentración a 8 °C e incluso en algunos de los días iniciales de seguimiento para una madurez inicial de 50 y 75 %

inferior a la concentración a 20 °C; puede inferirse como una temperatura de almacenamiento tan baja puede llegar a favorecer la descomposición del A. Málico. En general a 8 °C de temperatura de almacenamiento puede verse un leve descenso en la concentración de ácido un poco mayor para 50 % de madurez inicial que termina con valores de 5000, 4000 y 3000 mg/Kg de A. Málico para los estados de madurez inicial de 75, 50 y 100 % respectivamente. En este caso, para el A. Málico, la temperatura de almacenamiento de 8 °C y el estado de madurez inicial de 75 % parecen ser los más satisfactorios por dos razones: tiene la menor pérdida de concentración de ácido y termina con el mayor contenido de e.ste; El estado de madurez de 50 % le seguiría y el de 100 % es poco recomendable.

Ácido Oxálico

Para este ácido, como para el A. Cítrico se observa un aumento en la concentración hacia el día tres de seguimiento, seguido de un leve descenso en el resto del experimento en los estados de madurez inicial de 50 y 100 %; este comportamiento se da a las tres temperaturas de almacenamiento. Las concentraciones de A. Oxálico para las temperaturas de 4 y 8 °C permanecen muy cercanas a lo largo del experimento (esto claro, hasta el día 25 de seguimiento cuando se descartan los frutos almacenados a 4 °C) siendo ligeramente superior la concentración a 4 °C para 50 % de madurez inicial y ligeramente superior a 8 °C para 75 y 100 % de madurez inicial. A pesar de las fluctuaciones que se observan en medio de la grafica, a 8 °C y 50 % de madurez inicial se termina con la concentración más elevada (más de 230 mg/kg) con una pérdida prácticamente nula. Como en casos anteriores los resultados a 75 % de madurez inicial y 8 °C son algo menos satisfactorios y para 100 % de madurez inicial más pobres aun.

Variables recomendables

De lo consultado en la literatura se sabe que la Gulupa puede ser almacenada por un tiempo de alrededor de 30 días a una temperatura cercana a 8 °C (Paull y Chen, 2008), variables que son las más recomendables. Esta combinación tiempo temperatura puede verse confirmada en este trabajo al ver los resultados de pérdida de humedad y descenso en la concentración de los cuatro ácidos analizados.

Ahora el análisis lleva hacia establecer el porcentaje de madurez inicial en el fruto en el momento de ser almacenado

De los análisis hechos para el A. Cítrico y el A. Oxálico se encuentra que la mayor concentración y el menor decrecimiento de esta para cada ácido se tienen para una madurez inicial de 50 %; En el caso del A. Ascórbico también se tiene la concentración más alta para este estado de madurez inicial (teniendo en cuenta lo señalado para este ácido) y en el caso del A. Málico aunque el estado de madurez inicial de 75 % ofrece un resultado más satisfactorio, 50 % de madurez inicial esta cerca también.

De lo anterior podemos ver que un estado de madurez inicial de 50 % en los frutos combinado a una temperatura de almacenamiento de 8 °C conserva el contenido de ácidos más satisfactoriamente.

Lo anterior debe unirse a la determinación de otras variables que den una panorama más amplio en cuanto a la conservación de otras sustancias claves nutricionalmente y sensorialmente también; sin embargo, para los alcances de este trabajo se ha encontrado una combinación, estado de madurez inicial – temperatura de almacenamiento – tiempo que permiten la mejor conservación de los ácidos preponderantes en la Gulupa.

Futuros ensayos

Este proyecto como se menciono al inicio este englobado en uno mucho mayor que pretende un completo estudio de todas las variables implicadas e implicables en el almacenamiento de la Gulupa para ser exportada. Al pensar en cuáles son las variables que deben estudiarse en el futuro, la primera debería ser la pérdida de masa en forma de agua; aun a 8 °C esta es bastante significativa y debería pensarse en un medio de disminuirla a niveles más aceptables. La modificación en la permeabilidad del empaque Xtend disminuyendo la capacidad del agua de pasar a través de este (el coeficiente de difusión) es una primera medida, lo cual en la actualidad ya se está estudiando en este grupo de trabajo. Establecer una atmosfera modificada con una concentración de vapor de agua igual a la actividad de agua a_w en el fruto es una segunda medida que debe examinarse en profundidad para no incurrir en problemas microbiológicos que afecten el fruto (este tema ya está siendo abordado en muchas partes y es posible encontrar bastante literatura al respecto).

8

CONCLUSIONES

1. El contenido de ácido cítrico es el de mayor abundancia en la Gulupa, mientras el contenido de ácido ascórbico es el menos de los ácidos presentes de la fruta y el que experimenta mayor degradación por su sensibilidad a las condiciones ambientales.
2. La combinación de la temperatura de almacenamiento de 8 °C y el estado de madurez inicial de 50 % son las que permiten la mejor conservación de los ácidos estudiados en los frutos de gulupa analizados, siendo el tiempo de conservación de 31 días.
3. Un estado de madurez inicial de 75 % además de una temperatura de almacenamiento de 8 °C aun permite una conservación de los ácidos estudiados aceptable, mientras que un estado de madurez inicial de 100 % no es recomendable, ya que la duración de la fruta es muy corta.

9

REFERENCIAS

9.1. Marco teórico y estado del arte y Análisis de Resultados

Acevedo-Rodríguez, P. 1985. Los bejucos de Puerto Rico. Vol. 1. General Technical Report SO-58. U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station, New Orleans, LA. 331 p.

Aponte L. & Guadarrama A. 2003. Actividad de las enzimas pectinmetilesterasa, poligalacturonasa y celulasa durante la maduración de frutos de parchita maracuyá (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener). *Rev. Fac. Agron. (Maracay)* 29:145-160.

Arjona H. E., Matta F. B., Garner J. O. 1992. Temperature and Storage Time Affect Quality of Yellow Passion Fruit. *HortScience*. 27: 809 - 810.

Arjona H. E. & Matta F. B. 1991. Postharvest quality of Passion Fruit as Influenced by Harvest Time and Ethylene Treatment. *HortScience* 26(10): 1297-1298.

Aular J., Ruggiero C. Durigan J. 2001. Efecto de la envoltura plástica y el tiempo de almacenamiento sobre el comportamiento poscosecha de frutos de Maracuyá Parchita. *Bioagro* 13(1):15-21.

Bailey, L.H. 1941. *The standard cyclopedia of horticulture*. Vol. 3. The MacMillan Co. New York. p. 2,423-3,639.

Cavalcante, U.M.T., L.C. Maia, C.M.C. Costa, and V.F. Santos. 2001. Mycorrhizal dependency of passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). *Fruits* 56: 317-324.

Chassagne D., Boulanger R., Crouzet J. 1999. Enzymatic hydrolysis of edible *Passiflora* fruit glycosides. *Food Chemistry* 66 ; 281-288.

Didier C. 2001. Growing Passion Fruit. *Tropical Fruits Newsletter*. 38/39.

Gómez P. K. 2000. Effect of storage temperatures and use of wax on the respiratory activity and internal composition of passion fruit *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener cv 'Maracuya'. *Rev. Fac. Agron.* 17: 1-9.

Guzmán, N.R. y E. Segura. 1989. *Tecnología de frutas y hortalizas*. Editorial Unisur, Bogotá. 200 p.

Heenkenda, H.M.S. and S.M.A. Punchikumarihami. 1991. Alternate trellising materials for passion fruit (*Passiflora edulis* Sims) vines. *Tropical Agriculturist* 147: 11-18.

Hurtado J. & Nieto A. 1985. Adaptación fisiológica y producción de una *Passifloracea* silvestre; *Passiflora malliformis* L. en un piso térmico cálido. Trabajo de grado, Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

Inch J. 1978. Passionfruit diseases. *Queensland Agricultural Journal*. 104:479-484.

- Lima A, de A. 1981. EMBRAPA, Brasil. Ivo Manica, Maracujá. *Fruticultura Tropical*. Editora Agronomica Ceres, São Paulo, Brasil.
- Liogier, H.A. 1994. *Descriptive flora of Puerto Rico and adjacent Islands*. Vol. 3. Editorial de la Universidad de Puerto Rico, Río Piedras, PR. 461 p.
- Menéndez A. O., Evangelista L.S., Arenas O. M., Bermúdez T. K., Martínez A., Jiménez A. A. 2006. Cambios en la Actividad de alfa-Amilasa, Pectinmetilesterasa y Poligalacturonasa Durante la Maduración del Maracujá Amarillo (*Passiflora edulis* var. *Flavicarpa* Degener). *Reports. Interciencia* 31(10):728-733.
- Morton, J.F. 1987. *Fruits of warm climates*. Creative Resources Systems, Inc. Winterville,
- Nakasone H. & Paull R.E. 1998. *Tropical fruits*. CAB Internacional, Wallington, U.K. pp. 270-291.
- Osorio C., Duque C., Fujimoto Y. 2005. Capitulo 4: El aroma de la Badea (*Passiflora quadrangularis*): Composición y generación de compuestos volátiles a partir de glicósidos, fosfatos y monoterpenos oxigenados. Pag 113-131. En Duque C,B & Morales P. A. 2005. *El aroma frutal de Colombia*. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Bogotá.
- Pachón L. A., Rodriguez A. & Fischer G. 2006. Efecto del empaque, encerado y temperatura sobre las características fisicoquímicas y organolépticas de la gulupa (*Passiflora edulis* f. *edulis*) en poscosecha pag 73-78. En Salamanca G. G. 2006. *Propiedades fisicoquímicas y sistemas de procesado: Productos Hortifrutícolas en el desarrollo agroalimentario*. Editorial Guadalupe Ltda. 350 p.
- Paull R. E. & Chen C. C. 2008. *Passion Fruit*. Department of Tropical Plant and Soil Sciences. University of Hawaii at Manoa, Honolulu, HI. Consultado en Marzo 5 de 2008. <http://usna.usda.gov/hb66/104passion.pdf>. United States Department of Agriculture. Agricultural Research Service. Last modified 02/25/2008.
- Pinzón I., Fischer G., Corredor G. 2007. Determinación de los estados de madurez del fruto de la gulupa (*Sims.*). *Agronomía Colombiana*. 25 (1): 83-95
- Pruthi, J.S. 1963. *Physiology, chemistry and technology of passion fruit*, p.203-282. In: C.O. Chichester, E.M. Mark, and G.F. Stewart (eds.) *Advances in food research*. vol. 12 Academic, New York.
- Pyle K. 1994. *Growing Passion Fruit*. *Fruit Gardener*. 26(3):14-17.
- Quesada P. & Matta F. B. 1992. Cold Hardiness of *Passiflora* Species. *HortScience*, 27: 1167.
- Reboucas A. S. J. 1996. *Maracujá. Produção e Mercado*. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista - Bahia - Brasil. FNP, Brasil.
- Shiomi S., Kubo Y., Wamocho L. S., Koaze H., Nakamura R., Inaba A. 1996 a. *Postharvest ripening and ethylene biosynthesis in purple passion fruit*. *Postharvest Biology and Technology*. 8:199-207.
- Shiomi S., Wamocho L.S. & Agong S.G. 1996 b. *Ripening characteristics of purple passion fruit on and off the vine*. *Postharvest Biology and Technology*, 7(1):161-170.

Wenkam N.S. 1990. *Food of Hawaii and the Pacific Basin. Fruits and fruit products. Raw, processed and prepared. Vol. 4. Composition. Res. Ext. Serv. No. 110, Hawaii Agr. Exp. Sta., College Trop. Agr. Human Resources, University of Hawaii, Honolulu.*

9.2. Metodología y Análisis de Resultados

Barrera, J., Hernández, M. S., Melgarejo, L. M., Fernández-Trujillo, J. P. 2005. *Physiological changes in amazonic hot pepper accessions during growth, ripening and storage. Acta horticulturae. 682:2207-2214*

Barrera, K., Hernández, M.S., Melgarejo, L.M., Martínez, O., Fernández-Trujillo, J.P. 2008. *Physiological behavior and quality traits during fruit growth and ripening of four Amazonic hot pepper accessions. Journal of the science of food and agriculture. 88: 847-857*

Bradford, 1976. *Anal. Biochem. 72:248-256*

Giannoccaro E., Wang Y-J & Chen P. 2008. *Comparison of two HPLC systems and an enzymatic method for quantification of soybean sugars .Food Chemistry. 106: 324-330*

Hernández, M.S., Martínez, O. y Fernández-Trujillo J.P. 2007. *Behavior of araza (Eugenia stipitata Mc Vaugh) fruit quality traits during growth, development and ripening. 111 220-227*

Iwase, I., 2000. *Use of an amino acid in the mobile phase for the determination of ascorbic acid in food by highperformance liquid chromatography with electrochemical detection. Journal of Chromatography A 881, 317–326.*

Matta F.B. Arjona H. E. Garner J. O. Silva J. L. *Studies on Postharvest Quality of Passion Fruit. Missisipi Agricultural and Forestry Experimental Station. Bolletin 1153. 2006*

Makkar, H.P.S., 2002 "Quantification of tannins in tree and shrub foliage" *J. Agric. Food. Chem. 53: 6087-6093* Salekdeh, H.; Siopongco, J.; Wade, L.; Ghareyazie, B.; Bennett, J. 2002. *A proteomic approach to analyzing drought- and salt- responsiveness on rice. Field Crops Research 76: 199-219*

Poorinima, S; Upendra, N,D; 2008. *Purification and characterization of multiple forms of polygalaturonase from mango (mangifera indica cv. Dashehari) fruit. Food Chemistry. Vol.111, Issue 2. P. 345-349*

Putter, J. 1964. *Peroxidases in methods of enzymatic analysis. Bergmeyer, H (Ed) Vol II Verlag chemie winheim. P 1124*

SINCHI. Instituto amazónico de investigaciones científicas. *PROTOCOLO DE CUANTIFICACIÓN Y EXTRACCIÓN DE ACIDOS ORGÁNICOS PARA FRUTA Y/O JUGOS DE FRUTAS CON CERO O MODERADO CONTENIDO DE VITAMINA C.*

Wellings D. A. *A Practical Handbook of preparative HPLC. Elsevier LTD. 2006.*

ANEXOS

A

TABLAS DE CAMBIO DE PESO

A.1. Madurez de 50%

% Maduración	Día	Día Seguimiento	Temperatura (°C)	Δ masa (g)	% peso perdido
50	0	0		0,16	0,1
50	2	10	4	2,07	1,25
50	3	14	4	1,37	0,83
50	4	17	4	2,03	1,23
50	5	21	4	2,15	1,30
50	6	25	4	1,96	1,19
% Maduración	Día	Día Seguimiento	Temperatura (°C)	Δ masa (g)	% peso perdido
50	0	0		0,16	0,10
50	2	10	8	4,11	2,49
50	3	14	8	4,62	2,80
50	4	17	8	4,45	2,70
50	5	21	8	2,15	1,30
50	6	25	8	7,25	4,39
50	7	28	8	8,68	5,26
50	8	31	8	4,13	2,50
% Maduración	Día	Día Seguimiento	Temperatura (°C)	Δ masa (g)	% peso perdido
50	0	0		0,16	0,10
50	2	10	20	12,68	7,68
50	3	14	20	19,10	11,58
50	4	17	20	21,23	12,87
50	5	21	20	16,96	10,28

A.2. Madurez de 75%

% Maduración	Día	Día Seguimiento	Temperatura (°C)	Δ masa (g)
75	0	0		0,11
75	2	10	4	1,82
75	3	14	4	2,72
75	4	17	4	4,02
75	5	21	4	3,03
75	6	25	4	5,17
% Maduración	Día	Día Seguimiento	Temperatura (°C)	Δ masa (g)
75	0	0		0,11
75	2	10	8	3,90
75	3	14	8	4,62
75	4	17	8	5,19
75	5	21	8	8,83
75	6	25	8	11,11
75	7	28	8	9,54
75	8	31	8	10,09
% Maduración	Día	Día Seguimiento	Temperatura (°C)	Δ masa (g)
75	0	0		0,11
75	2	10	20	12,17
75	3	14	20	21,90
75	4	17	20	19,15
75	5	21	20	27,81

A.3. Madurez de 100%

% Maduración	Día	Día Seguimiento	Temperatura (°C)	Δ masa (g)
100	0	0		0,14
100	2	10	4	2,43
100	3	14	4	3,11
100	4	17	4	2,86
100	5	21	4	3,77
100	6	25	4	4,18
% Maduración	Día	Día Seguimiento	Temperatura (°C)	Δ masa (g)
100	0	0		0,14
100	2	10	8	4,77
100	3	14	8	6,58
100	4	17	8	6,32
100	5	21	8	6,68
100	6	25	8	8,99
100	7	28	8	10,01
100	8	31	8	10,39
% Maduración	Día	Día Seguimiento	Temperatura (°C)	Δ masa (g)
100	0	0		0,14
100	2	10	20	13,15
100	3	14	20	17,68
100	4	17	20	21,48
100	5	21	20	27,40

B

TABLA DE RESULTADOS PARA CADA UNIDAD EXPERIMENTAL

Se analizaron 174 unidades experimentales en 9 días de medición contando el día cero; cada unidad está identificada por un código, explicado de la siguiente forma:

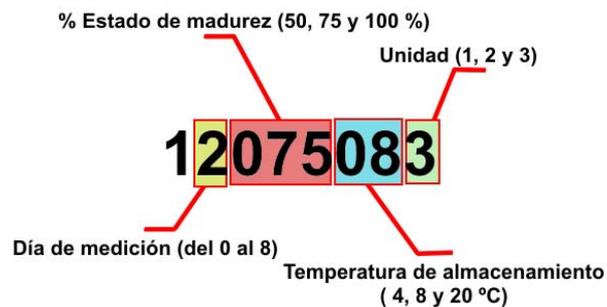


Diagrama de código de identificación.

En este caso el código informa que se trata de la unidad 3, extraída el día 2 (10 días de seguimiento del experimento), estado de madurez inicial de 75 % y temperatura de almacenamiento de 8 °C.

MUESTRA			ascórbico (240 nm)	Tr	20,9 min	cítrico	Tr	16,8 min	málico	Tr	19,8 min	oxálico	Tr	13,6 min
Número	peso (g)	Código	Área	Conc. (mg/L)	Conc. (mg/Kg)	Área	Conc. (mg/L)	Conc. (mg/Kg)	Área	Conc. (mg/L)	Conc. (mg/Kg)	Área	Conc. (mg/L)	Conc. (mg/Kg)
1	1,9697	10050201	64727	2,18	13,31	13297546	6370,67	38812,04	1467590	1059,15	6452,65	778523	38,27	233,13
2	1,9056	10075201	37662	1,40	8,79	11513403	5473,65	34468,80	1341217	957,22	6027,85	890036	44,53	280,40
3	1,9549	10100201	195210	5,99	36,77	7117005	3263,24	20031,12	1146976	800,56	4914,15	565115	26,28	161,33
4	1,6079	11050201	271693	8,22	61,35	9034538	4227,33	31549,19	1265411	896,08	6687,58	620758	29,41	219,47
5	1,5243	11050202	320083	9,63	75,82	9162362	4291,60	33785,44	1261688	893,08	7030,72	543576	25,07	197,39
6	1,682	11050203	98312	3,16	22,57	7024728	3216,84	22950,12	942040	635,26	4532,21	563920	26,22	187,03
7	1,9092	11050081	202453	6,20	38,97	7174536	3292,16	20692,41	695710	436,59	2744,10	521711	23,85	149,88
8	1,7175	11050082		0,30	2,07	13083546	6263,08	43759,50	1035105	710,33	4962,98	1026201	52,17	364,54
9		11050083												
10	1,7104	11050041	540632	16,06	112,70			-2210,23			-873,77			-38,24
11	1,6318	11050042	249715	7,58	55,74	11081187	5256,34	38654,28	911031	610,25	4487,71	741128	36,17	265,96
12	1,5736	11050043	315133	9,49	72,34	9460554	4441,52	33870,26	726201	461,18	3516,87	768240	37,69	287,41
13	1,7406	11075201	507220	15,09	104,02	9305811	4363,72	30084,24	1437956	1035,25	7137,17	650986	31,10	214,44
14	1,6222	11075202	29094	1,15	8,47		-315,03	-2330,40	1202825	845,60	6255,22	508447	23,10	170,88
15	1,6557	11075203	363195	10,89	78,92	354794	-136,65	-990,39	364455	169,41	1227,84	284248	10,51	76,18
16	1,9021	11075081	65560	2,21	13,93	7308687	3359,61	21195,17	1268503	898,57	5668,94	586070	27,46	173,24
17	1,4161	11075082	26663	1,07	9,11	9095522	4257,99	36082,12	868231	575,73	4878,75	601002	28,30	239,80
18	1,5087	11075083	64803	2,19	17,39	9636993	4530,23	36032,85	1132447	788,84	6274,31	543633	25,08	199,45
19	1,9323	11075041	304573	9,18	57,00	13254910	6349,24	39430,13	1029697	705,96	4384,19	867389	43,26	268,63
20	1,6154	11075042	249254	7,57	56,20	9578836	4500,99	33435,61	723667	459,13	3410,68	568836	26,49	196,79
21	1,5418	11075043	303155	9,14	71,12	8665414	4041,74	31457,32	726527	461,44	3591,45	641578	30,58	237,98
22	1,5325	11100201	213234	6,52	51,02	4333553	1863,78	14594,04	814999	532,80	4172,00	367823	15,20	119,05
23	1,5986	11100202	313800	9,45	70,92	8213348	3814,45	28633,45	1366594	977,69	7339,10	636299	30,28	227,30
24	2,1002	11100203	300474	9,06	51,76	9007996	4213,98	24077,62	1523224	1104,02	6308,09	695190	33,59	191,91
25	1,4447	11100081	144989	4,53	37,59	6120061	2762,00	22941,76	1190470	835,64	6940,98	694196	33,53	278,52

26	1,6402	11100082	43227	1,56	11,40	7379917	3395,42	24841,53	1171867	820,63	6003,89	577514	26,98	197,38
27	1,5106	11100083	31798	1,22	9,73	7558234	3485,08	27684,98	1238057	874,02	6943,08	697324	33,71	267,76
28	1,8067	11100041	324459	9,76	64,82	6943177	3175,84	21093,75	1137788	793,15	5268,03	592744	27,83	184,87
29	1,5742	11100042	255723	7,75	59,11	9146975	4283,86	32655,52	1150131	803,10	6121,97	657129	31,45	239,74
30	1,5675	11100043	424029	12,66	96,94	9541004	4481,97	34311,72	1030939	706,97	5412,18	614193	29,04	222,30
31	1,6797	12050201	15364	0,74	5,32	6865743	3136,91	22410,49	1084171	749,90	5357,39	600367	28,26	201,91
32	1,4397	12050202	128612	4,05	33,74	7038779	3223,91	26871,49	967884	656,11	5468,71	479319	21,46	178,91
33	1,9167	12050203	165284	5,12	32,04	8267037	3841,45	24050,38	1239227	874,96	5477,92	552909	25,60	160,26
34	1,4108	12050081	157448	4,89	41,58	5508115	2454,32	20876,02	365256	170,06	1446,47	310832	12,00	102,10
35	1,4939	12050082	3677	0,40	3,25	2198090	790,12	6346,76	176188	17,56	141,08	185490	4,97	39,89
36	1,7927	12050083	41507	1,51	10,09	7959015	3686,58	24677,28	521389	295,99	1981,28	485493	21,81	146,00
37	1,6751	12050041	10876	0,61	4,40	7696011	3554,35	25462,47	584365	346,78	2484,25	607495	28,66	205,33
38	1,6315	12050042	28354	1,12	8,27	10536972	4982,72	36648,87	668401	414,56	3049,17	654873	31,32	230,39
39	1,4047	12050043	63560	2,15	18,37	10222021	4824,37	41213,37	703778	443,09	3785,23	655816	31,38	268,04
40	1,4228	12075201	19052	0,85	7,19	4776998	2086,73	17599,67	1017993	696,52	5874,54	533964	24,53	206,92
41	1,4091	12075202	135339	4,24	36,14	4829472	2113,12	17995,46	746071	477,20	4063,91	498045	22,52	191,75
42	1,6198	12075203	54587	1,89	13,99	6786041	3096,84	22942,36	882356	587,13	4349,62	489960	22,06	163,45
43	1,8009	12075081	76584	2,53	16,86	9544305	4483,63	29875,92	1186897	832,75	5548,92	651133	31,11	207,32
44	1,5972	12075082	perdido			perdido			perdido			perdido		
45	1,9319	12075083	92209	2,99	18,55	11022337	5226,75	32465,96	1257831	889,97	5528,03	716599	34,79	216,09
46	1,5428	12075041	perdido			perdido			perdido			perdido		
47	1,5302	12075042	8150	0,53	4,19	3498767	1444,07	11324,55	196529	33,97	266,39	242628	8,17	64,10
48	1,952	12075043	62701	2,13	13,07	12025367	5731,05	35231,87	773344	499,20	3068,86	721143	35,04	215,44
49	1,8156	12100201	65002	2,19	14,49	5717568	2559,63	16917,59	1026720	703,56	4650,12	675354	32,47	214,63
50	1,453	12100202	123896	3,91	32,29	6070793	2737,23	22606,13	932405	627,49	5182,32	648484	30,96	255,73
51	1,7019	12100203	17993	0,82	5,79	6652093	3029,49	21360,76	913690	612,40	4317,99	603190	28,42	200,39
52	1,6457	12100081	49940	1,75	12,78	6031690	2717,57	19815,75	852150	562,76	4103,52	414027	17,80	129,78
53	1,7695	12100082	12951	0,67	4,58	972770	174,06	1180,37	132049	-18,04	-122,32	62175	-1,96	-13,29

54	2,0622	12100083	20705	0,90	5,24	10181990	4804,24	27956,02	1345981	961,06	5592,46	737506	35,96	209,27
55	1,4039	12100041	11128	0,62	5,31	6498514	2952,27	25234,91	869885	577,07	4932,55	584037	27,35	233,74
56		12100042												
57	1,424	12100043	110739	3,53	29,72	8478876	3947,95	33269,28	850232	561,22	4729,35	497111	22,46	189,30
58	1,3269	13050201	49110	1,73	15,64	4756283	2076,32	18777,48	442680	232,50	2102,68	420672	18,17	164,34
59	1,6772	13050202	92912	3,01	21,51	3354155	1371,36	9811,79	280804	101,94	729,37	280679	10,31	73,77
60	1,4969	13050203	192553	5,91	47,40	5364307	2382,02	19095,63	519566	294,52	2361,01	524246	23,99	192,30
61	1,1992	13050081	29009	1,14	11,44	8789876	4104,32	41070,57	640834	392,33	3925,87	451928	19,93	199,40
62	1,6449	13050082	48982	1,73	12,59	9651841	4537,70	33103,74	782489	506,58	3695,62	634290	30,17	220,08
63	1,8449	13050083	132476	4,16	27,06	10167474	4796,94	31201,32	1092102	756,30	4919,27	660288	31,63	205,71
64	1,6742	13050041	312753	9,42	67,50	11677479	5556,14	39824,20	686310	429,00	3074,93	626734	29,74	213,18
65	1,5379	13050042	204857	6,27	48,93	10215511	4821,10	37618,28	581776	344,69	2689,58	549158	25,39	198,09
66	1,6714	13050043	177070	5,46	39,21	9091519	4255,98	30556,26	611063	368,31	2644,35	575392	26,86	192,84
67	1,8021	13075201	106967	3,42	22,75	5190799	2294,78	15280,73	647692	397,86	2649,29	547536	25,30	168,44
68	1,7956	13075202	34608	1,31	8,73	6940874	3174,68	21216,41	673322	418,53	2797,03	615903	29,13	194,71
69	1,669	13075203	206106	6,31	45,35	6329384	2867,24	20615,26	476705	259,95	1869,00	591928	27,79	199,80
70	1,7641	13075081	172838	5,34	36,31	7488184	3449,86	23467,09	821059	537,69	3657,52	428849	18,63	126,73
71	1,8725	13075082	226449	6,90	44,22	8284697	3850,33	24674,99	849426	560,57	3592,41	446398	19,62	125,71
72	1,7181	13075083	7716	0,52	3,65	1888357	634,39	4430,88	203951	39,96	279,07	133393	2,04	14,25
73	1,4796	13075041	25779	1,05	8,51	8749921	4084,23	33124,33	517703	293,01	2376,43	628211	29,83	241,90
74	1,7074	13075042	79580	2,62	18,40	7517156	3464,42	24348,77	489667	270,40	1900,44	494433	22,31	156,83
75	1,5731	13075043	215919	6,59	50,30	8132903	3774,01	28789,07	502399	280,67	2141,02	475969	21,28	162,30
76	1,7551	13100201	164882	5,11	34,91	5380961	2390,39	16343,64	539288	310,42	2122,43	538581	24,79	169,51
77	1,5341	13100202	6349	0,48	3,77	1429440	403,66	3157,49	122198	-25,98	-203,24	144358	2,66	20,77
78	1,5001	13100203	218940	6,68	53,45	5594739	2497,88	19981,68	508002	285,19	2281,36	546238	25,22	201,77
79	1,3402	13100081		0,30	2,66	427557	-100,07	-895,98	59392	-76,64	-686,22	230132	7,47	66,91
80		13100082												
81	1,6627	13100083	17239	0,80	5,77	9495156	4458,92	32180,80	981996	667,49	4817,40	569895	26,55	191,62

82	1,7474	13100041	206221	6,31	43,34	8211286	3813,42	26188,05	978777	664,89	4566,06	584445	27,37	187,95
83	1,6124	13100042	18227	0,83	6,17	4290250	1842,01	13708,82	521936	296,43	2206,11	334430	13,33	99,20
84	1,4135	13100043	41559	1,51	12,81	7415170	3413,15	28976,14	818233	535,41	4545,37	539039	24,82	210,70
85	1,5595	14050201	11674	0,64	4,90	4221102	1807,24	13906,32	565381	331,47	2550,57	491691	22,16	170,51
86	1,5303	14050202		0,30	2,33	10596103	5012,45	39305,61	904617	605,08	4744,80	793657	39,12	306,73
87		14050203												
88	1,8352	14050081		0,30	1,94	5186333	2292,54	14990,45	660218	407,96	2667,56	494295	22,31	145,85
89	1,4096	14050082	11931	0,64	5,49	8397819	3907,20	33262,21	824776	540,68	4602,88	566594	26,37	224,45
90	1,5539	14050083		0,30	2,29	5997228	2700,24	20852,60	730269	464,46	3586,79	676089	32,51	251,09
91	1,6501	14050041	10925	0,62	4,48	8826228	4122,60	29980,70	637270	389,45	2832,20	625547	29,68	215,81
92	1,3689	14050042	7524	0,52	4,53	5465397	2432,85	21326,72	625850	380,24	3333,24	640174	30,50	267,35
93	1,8566	14050043		0,30	1,92	5839958	2621,17	16941,72	783745	507,59	3280,78	874540	43,66	282,18
94	1,7945	14075201	12413	0,66	4,41	4877970	2137,50	14293,68	509132	286,10	1913,18	509782	23,18	154,98
95	1,7942	14075202	15447	0,75	5,00	5838684	2620,53	17526,65	678362	422,59	2826,40	664751	31,88	213,20
96	1,7463	14075203	46123	1,64	11,28	5539557	2470,13	16973,94	628015	381,99	2624,88	654473	31,30	215,09
97	1,39	14075081	24259	1,00	8,67	8814659	4116,78	35540,54	502255	280,55	2422,05	506616	23,00	198,54
98	1,4709	14075082		0,30	2,42	11475174	5454,43	44498,68	1156034	807,86	6590,76	726337	35,34	288,28
99	1,6928	14075083	7537	0,52	3,66	7090576	3249,95	23038,39	937476	631,58	4477,20	516593	23,56	167,00
100	1,5848	14075041		0,30	2,25	8721932	4070,16	30818,96	595856	356,05	2695,97	608727	28,73	217,55
101	1,4412	14075042	9219	0,57	4,71	8699359	4058,81	33795,24	667459	413,80	3445,46	544526	25,13	209,21
102	1,6958	14075043	71183	2,37	16,79	10869675	5149,99	36442,94	737366	470,18	3327,16	705209	34,15	241,65
103	1,7235	14100201		0,30	2,07	206530	-211,19	-1470,45	27562	-102,31	-712,35	679150	32,69	227,58
104	1,9143	14100202		0,30	1,86		-315,03			-124,54			-5,45	
105	1,6629	14100203	2883	0,38	2,75	7500862	3456,23	24941,23	900873	602,06	4344,66	551059	25,49	183,97
106	1,6684	14100081	43010	1,55	11,16	6351055	2878,13	20701,04	840624	553,47	3980,82	568844	26,49	190,54
107	1,732	14100082	27012	1,08	7,52	7263455	3336,87	23119,18	1185301	831,47	5760,74	652943	31,21	216,27
108	1,7331	14100083		0,30	2,06	8151074	3783,14	26194,52	1157951	809,41	5604,35	688411	33,21	229,92
109	1,7462	14100041		0,30	2,04	8230796	3823,23	26273,46	905711	605,96	4164,22	629524	29,90	205,47

110	1,7323	14100042	30448	1,18	8,21	9344878	4383,36	30364,45	925106	621,61	4305,99	684809	33,00	228,62
111	1,4547	14100043	6470	0,49	4,01	8785965	4102,35	33840,81	1342585	958,33	7905,34	666208	31,96	263,64
112	1,9577	15050201		0,30	1,82	2716437	1050,73	6440,61	491523	271,90	1666,64	650843	31,10	190,61
113	1,8029	15050202		0,30	1,98		-315,03			-124,54			-5,45	
114	2,0242	15050203	23819	0,99	5,88	2798155	1091,82	6472,59	626272	380,58	2256,18	686733	33,11	196,30
115	1,7087	15050081	14085	0,71	4,97	10169980	4798,20	33697,22	810774	529,39	3717,85	699953	33,85	237,75
116	1,7478	15050082	16716	0,78	5,39	8550163	3983,80	27351,85	794569	516,32	3544,94	598896	28,18	193,47
117	1,483	15050083	13494	0,69	5,59	9552388	4487,69	36313,09	799117	519,99	4207,60	662930	31,78	257,12
118	1,9193	15050041	7765	0,52	3,27	10276999	4852,01	30336,12	652035	401,36	2509,41	778874	38,29	239,37
119	1,9893	15050042		0,30	1,79	10540418	4984,45	30067,57	610946	368,22	2221,20	841750	41,82	252,25
120	1,8033	15050043	12965	0,68	4,49	8721849	4070,12	27084,45	722906	458,52	3051,21	677529	32,60	216,90
121	1,6503	15075201	14786	0,73	5,29	3118189	1252,72	9109,06	395579	194,51	1414,39	484385	21,75	158,15
122	1,747	15075202		0,30	2,04	3531689	1460,62	10032,89	532129	304,65	2092,61	429504	18,67	128,23
123	1,9482	15075203	17117	0,80	4,90	4506338	1950,65	12015,11	518896	293,98	1810,75	619744	29,35	180,78
124	1,8954	15075081	20398	0,89	5,65	8006637	3710,52	23491,76	1163860	814,17	5154,63	988011	50,03	316,74
125	1,799	15075082	20504	0,89	5,97	7893910	3653,85	24372,52	1186002	832,03	5549,97	715699	34,74	231,72
126	1,8423	15075083	18911	0,85	5,53	8099468	3757,20	24472,87	1296727	921,34	6001,23	698521	33,77	219,99
127	1,8949	15075041	14582	0,72	4,57	9698739	4561,27	28885,58	727490	462,22	2927,13	888762	44,46	281,53
128	2,0115	15075042	11601	0,64	3,79	10559151	4993,87	29791,92	723745	459,20	2739,43	822868	40,76	243,14
129	1,8048	15075043	22969	0,97	6,43	8827181	4123,07	27414,06	608805	366,49	2436,78	629695	29,91	198,86
130	1,8807	15100201		0,30	1,89	2950807	1168,57	7456,16	430038	222,31	1418,45	432490	18,84	120,18
131	1,9392	15100202	88026	2,86	17,72	2636725	1010,65	6254,05	519135	294,17	1820,35	596596	28,05	173,58
132	1,9098	15100203	3890	0,41	2,58	2783558	1084,48	6814,19	391459	191,19	1201,33	404443	17,26	108,45
133	1,8768	15100081	30817	1,20	7,64	8350449	3883,38	24829,83	1051674	723,69	4627,17	715782	34,74	222,14
134	1,8738	15100082	28472	1,13	7,22	9495370	4459,02	28556,04	1436595	1034,15	6622,80	812196	40,16	257,17
135	2,0086	15100083	6823	0,50	2,96	7074441	3241,84	19367,74	1091334	755,68	4514,65	664510	31,86	190,37
136	1,842	15100041	11579	0,63	4,13	7789166	3601,18	23460,48	848775	560,04	3648,48	684463	32,98	214,88
137	1,872	15100042	18756	0,84	5,41	8792445	4105,61	26318,01	858069	567,54	3638,06	709701	34,40	220,52

138	1,8816	15100043	13960	0,70	4,49	7902870	3658,35	23331,33	914075	612,71	3907,58	681101	32,80	209,16
139	1,7643	16050081	484234	14,42	98,07	10753923	5091,80	34632,18	679735	423,70	2881,83	740788	36,15	245,86
140	1,6776	16050082	163723	5,07	36,28	10910751	5170,65	36986,03	706570	445,34	3185,59	742018	36,22	259,06
141	1,8042	16050083	190702	5,86	38,96	10508539	4968,42	33045,72	912713	611,61	4067,91	730773	35,58	236,68
142	1,4438	16050041	104671	3,35	27,84	9687882	4555,82	37865,21	526930	300,46	2497,21	672519	32,31	268,57
143	1,473	16050042	8457	0,54	4,43	7120601	3265,05	26599,14	394778	193,87	1579,37	478798	21,44	174,63
144	1,6536	16050043	103728	3,32	24,11	7752112	3582,55	25998,22	420451	214,57	1557,14	520080	23,75	172,38
145	1,7454	16075081	146370	4,57	31,39	4697959	2047,00	14073,53	913115	611,93	4207,18	445404	19,56	134,48
146	1,502	16075082	85803	2,80	22,36	4558660	1976,96	15794,61	767091	494,16	3948,00	443158	19,43	155,27
147	1,5311	16075083	150893	4,70	36,81	5554745	2477,77	19419,51	864381	572,63	4487,97	542818	25,03	196,18
148		16075041												
149	1,7518	16075042	189781	5,83	39,95	9474559	4448,56	30473,08	600285	359,62	2463,43	734191	35,78	245,07
150	1,5196	16075043	205333	6,28	49,63	8451744	3934,31	31068,55	637394	389,55	3076,21	681776	32,83	259,28
151	1,5348	16100081	164247	5,09	39,77	5302070	2350,73	18379,43	815351	533,08	4167,96	565183	26,29	205,52
152	1,7357	16100082	133837	4,20	29,04	5903300	2653,01	18341,97	967011	655,40	4531,23	543567	25,07	173,34
153	2,1135	16100083	250751	7,61	43,20	7500243	3455,92	19621,98	911395	610,55	3466,56	736758	35,92	203,95
154	1,6414	16100041	141615	4,43	32,36	7007989	3208,43	23456,27	731236	465,24	3401,29	611334	28,88	211,12
155	1,5966	16100042	193363	5,94	44,61	8429064	3922,91	29484,48	738797	471,34	3542,56	664363	31,86	239,43
156	1,5946	16100043	64658	2,18	16,42	6901435	3154,85	23741,53	657291	405,60	3052,29	560743	26,04	195,94
157	1,3536	17050081	13433	0,69	6,11		-315,03	-2792,83	756339	485,49	4303,96	516273	23,54	208,69
158	1,815	17050082	27076	1,09	7,18	9208126	4314,61	28526,32	813837	531,86	3516,44	730729	35,58	235,26
159	1,7793	17050083		0,30	2,00	9413473	4417,85	29794,97	962579	651,83	4396,09	775523	38,10	256,94
160	1,8708	17075081		0,30	1,90	7155805	3282,74	21056,73	1294444	919,50	5897,99	570063	26,56	170,37
161	1,6373	17075082	23047	0,97	7,10	5464015	2432,15	17825,57	851427	562,18	4120,30	552649	25,58	187,50
162	1,9115	17075083	16060	0,77	4,80	6859210	3133,62	19672,24	987664	672,06	4219,07	649056	31,00	194,59
163	1,8	17100081		0,30	1,98	5103242	2250,76	15005,08	1156041	807,87	5385,78	681551	32,82	218,81
164	1,656	17100082		0,30	2,15	4638710	2017,21	14617,44	689201	431,34	3125,62	436699	19,07	138,20
165		17100083												

166	1,6837	18050081	236788	7,20	51,33	9241835	4331,55	30871,68	717259	453,97	3235,49	764500	37,48	267,12
167	1,5233	18050082	94969	3,07	24,16	7779780	3596,47	28331,64	646980	397,28	3129,65	585498	27,43	216,06
168	1,7538	18050083	209327	6,40	43,80	9164110	4292,47	29370,34	719139	455,48	3116,54	677498	32,59	223,01
169	1,5921	18075081	30867	1,20	9,02	5803742	2602,96	19619,06	911083	610,30	4599,93	588420	27,59	207,96
170	1,4798	18075082	77151	2,55	20,65	5261159	2330,16	18895,74	708361	446,79	3623,11	565875	26,33	213,48
171	1,7162	18075083	38240	1,41	9,87	5561800	2481,32	17349,83	939309	633,06	4426,49	571003	26,61	186,09
172	1,6501	18100081	180143	5,55	40,36	6199663	2802,02	20377,08	590175	351,47	2555,96	473686	21,15	153,80
173	1,5349	18100082	101454	3,26	25,45	5644857	2523,07	19725,65	681289	424,95	3322,34	512950	23,35	182,58
174	1,746	18100083	192276	5,90	40,58	7072866	3241,04	22275,22	891706	594,67	4087,06	642767	30,64	210,61

C

ESPECIFICACIONES DEL EQUIPO

Table 9	RPM Monosaccharide	RHM Monosaccharide	ROA Organic Acid	RFQ Fast Acid	RCU Sugar Alcohols
Part Number	00H-0135-K0	00H-0132-K0	00H-0138-K0	00D-0223-K0	00G-0130-D0
Ionic Form	Lead	Hydrogen	Hydrogen	Hydrogen	Calcium
Standard Dimensions	300 x 7.8 mm	300 x 7.8 mm	300 x 7.8 mm	100 x 7.8 mm	250 x 4.0 mm
Matrix			Sulfonated Styrene Divinyl Benzene		
Cross Linking	8 %	8 %	8 %	8 %	8 %
Particle Size (µm)	8	8	8	8	8
Min. Efficiency (p/m) (based on last peak)	35,000	35,000	50,000 (Acetic Acid)	30,000	12,000
Typical Pressure (psi @ Max Flow Rate)	350	350	350	350	350
Max. Pressure (psi @ Max Flow Rate)	600	600	600	600	600
Max. Flow Rate (mL/min)*	0.6	0.6	0.6	1.0	0.4
Max. Temperature (°C)	85	85	85	85	85
Typical Mobile Phase	Water	Water	0.005N H ₂ SO ₄	0.005N H ₂ SO ₄	Water
pH Range	Neutral	Neutral	1-3	1-3	Neutral
Guard Column Part No.	03B-0135-K0	03B-0132-K0	03B-0138-K0	03B-0223-K0	03A-0130-D0

* Make sure the maximum pressure is not exceeded

PART II - REZEX
POLYMER-BASED COLUMNS
SPECIFICATIONS AND OPERATING PARAMETERS

Table 9 (continued)	RPM Monosaccharide	RHM Monosaccharide	ROA Organic Acid	RFQ Fast Acid	RCU Sugar Alcohols
Cleaning, Regeneration and Storage					
Organic Modifiers (Max)	Up to 10 % Methanol, IPA, EtOH, Acetonitrile				
Inorganic Modifiers (Max)	5 % Lead Nitrate	5 % HNO ₃ , H ₃ PO ₄	5 % HNO ₃ , H ₃ PO ₄	5 % HNO ₃ , H ₃ PO ₄	5 % CaSO ₄ , Ca(NO ₃) ₂ , CaCl ₂
Avoid 	>10 % Methanol, Acids, Bases, Non-Lead Salts/Metal Ions	>10 % Methanol, Acids, Bases, Salts, Metal Ions	>10 % Methanol, Acids, Bases, Salts, Metal Ions, pH > 3.	>10 % Methanol, Acids, Bases, Salts, Metal Ions, pH > 3.	>10 % Methanol, Acids, Bases, Non-Calcium Salts or Metal Ions
Cleaning Solvent	100 % Water	100 % Water	100 % Water	100 % Water	100 % Water
Flow Rate (mL/min)	0.6	0.6	0.5	0.6	0.2
Temperature (°C)	85	85	Ambient	Ambient	85
Duration (hrs)	12	12	12	12	12
Regeneration Solvent	0.1 M Pb(NO ₃) ₂	0.025 M H ₂ SO ₄	0.025 M H ₂ SO ₄	0.025 M H ₂ SO ₄	0.1 M Ca (NO ₃) ₂
Flow Rate (mL/min)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Temperature (°C)	85	85	Ambient	Ambient	85
Duration (hrs)	4-16	4-16	4-16	4-16	4-16
Ship/Storage Solvent	Water	Water	0.005 N H ₂ SO ₄	0.005 N H ₂ SO ₄	Water

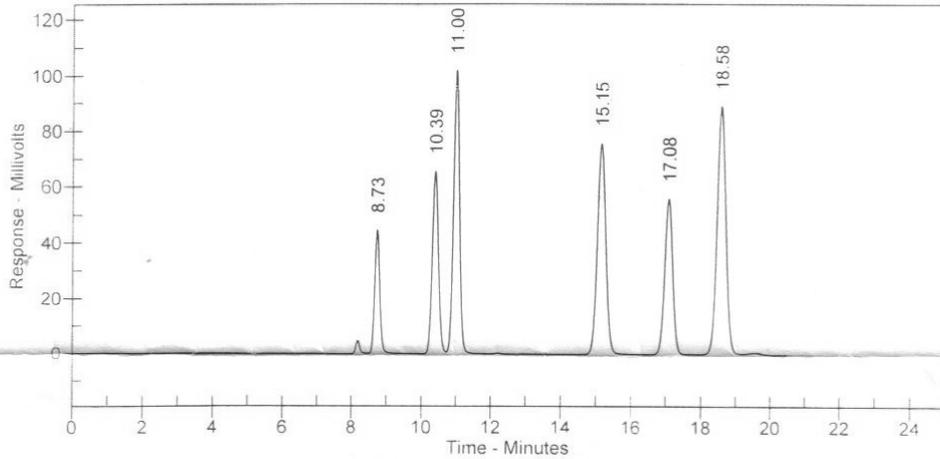
COLUMNS FOR CARBOHYDRATE
AND ORGANIC ACID ANALYSIS

Certificate of Quality Assurance

Part No.: 00H-0138-K0 Serial No.: 408488-49
Description: Rezex ROA-Organic Acid H+ (8%) Column Size: 300 X 7.8 mm

Measured Parameters Based on the ACETIC ACID Peak

Efficiency: 84360 plates/meter k Factor: 1.128
Peak Asym.: 1.09 Ret. Time: 18.58 minutes



Test Analytes

Peak	Analyte	Time	Area	k Factor	Width	Eff.	Asym.
1	Oxalic acid	8.73	452596	0.000	0.156	17342	1.12
2	Citric acid	10.39	820017	0.190	0.194	15851	1.11
3	Tartaric acid	11.00	1224114	0.260	0.185	19527	1.06
4	Succinic acid	15.15	1259654	0.735	0.258	19020	1.11
5	Formic acid	17.08	874704	0.956	0.242	27374	0.98
6	Acetic acid	18.58	1579261	1.128	0.274	25308	1.09

Testing Condition

Mobile Phase: 0.005N H2SO4 Temperature: AMBIENT
Flow Rate: 0.5 ml Injection: 10 µl
Detection: 210 NM Back Pressure: 499 psi

Checked By: _____ Instrument: QC008
Tested: Saturday, September 01, 2007
Approved By: _____ Printed: Saturday, September 01, 2007