

**CARACTERIZACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE AZÚCARES Y
ÁCIDOS NO VOLÁTILES EN TRES MATERIALES DE MORA
(RUBUS GLAUCUS BENT) POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA
DE ALTA EFICIENCIA**

**BEATRIZ EUGENIA JARAMILLO COLORADO
MARTA LILIANA TORRES ÁVILA**

**CONVENIO CORPORACIÓN COLOMBIANA DE
INVESTIGACIÓN AGROPECUARIA -CORPOICA- REGIONAL
NUEVE, SENA REGIONAL CALDAS, UNIVERSIDAD DEL
QUINDÍO**

**CARACTERIZACION Y CUANTIFICACION DE AZUCARES Y ACIDOS NO
VOLATILES EN TRES MATERIALES DE MORA (*Rubus glaucus Bent.*) POR
CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA**

BEATRIZ EUGENIA JARAMILLO COLORADO

MARTA LILIANA TORRES AVILA

**UNIVERSIDAD DEL QUINDIO
FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS Y TECNOLOGICAS
PROGRAMA DE QUIMICA
ARMENIA, QUINDIO**

1999

**CARACTERIZACION Y CUANTIFICACION DE AZUCARES Y ACIDOS NO
VOLATILES EN TRES MATERIALES DE MORA (*Rubus glaucus Bent.*) POR
CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA**

BEATRIZ EUGENIA JARAMILLO COLORADO

MARTA LILIANA TORRES AVILA

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial
para optar al título de Químico**

DIRECTORA:

DRA. MAGNA IVONNE PINZON F.

UNIVERSIDAD DEL QUINDIO

FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS Y TECNOLOGICAS

PROGRAMA DE QUIMICA

ARMENIA, QUINDIO

1999

CONVENIO

Corpoica Regional Nueve, Sena Regional Caldas, Universidad del Quindío

Nota de aceptación

**Requisito para optar
al título de Químico.**

Alba Lucía Duque

Jurado

Milton Gómez B.

Jurado

Gustavo Ospina

Jurado

DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo con especial amor a **mi familia**, que siempre a estado a mi lado apoyándome durante todas las etapas de mi vida; les estoy infinitamente agradecida.

A **Luis Carlos**, porque me ha permitido conocer y vivir a su lado la grandeza de la amistad.

Marta liliana.

Le dedico este trabajo a mi familia, especialmente a mi hija **Laurita**, quien es el incentivo en mi vida. También agradecerle a mis padres el infinito apoyo que me han brindado.

Beatriz Eugenia.

AGRADECIMIENTOS

Al LABORATORIO DE INVESTIGACIONES EN POSTCOSECHA y a CORPOICA, Regional 9 Manizales, por presentar iniciativas de estudio y contribuir con la realización de esta investigación.

A la Dra. Magda Ivonne Pinzón F. por darnos la valiosa oportunidad de realizar este trabajo de investigación en el Laboratorio de Investigaciones en Postcosecha, el cual está bajo su cargo.

Al Dr. Germán Franco por brindarnos tan valioso apoyo durante todo el proceso de ejecución de este trabajo.

A Carlos Alberto Guevara, porque gracias a él fue posible la realización integral de este trabajo, colaborándonos con mucha paciencia y de manera desinteresada.

Al Sena Agropecuario Granja "los Cerezos", por su colaboración durante el proceso de obtención de las muestras.

Al Dr Jorge Valencia M., ya que fue una persona que nos fue de gran ayuda en la culminación de la investigación.

A los Ingeniero Diego Arias. Director Planta Piloto y Rubén Dario Chaves Ingeniero mecánico de la Planta Piloto. Universidad del Quindío.

A las personas que durante la realización de esta investigación, trabajaron conjuntamente en el laboratorio de postcosecha y nos ayudaron en todo momento.

A todas las personas que de una u otra forma brindaron su colaboración para que este trabajo se llevara a cabo.

CONTENIDO

| | pág. |
|--|------|
| RESUMEN | 17 |
| 1. INTRODUCCION | 18 |
| 2. OBJETIVOS | 20 |
| 3. MARCO TEORICO | 22 |
| 3.1. MORA DE CASTILLA (<i>Rubus glaucus Benth</i>) | 22 |
| 3.1.1. Taxonomía | 22 |
| 3.1.2. Composición química de la Mora de Castilla | 23 |
| 3.2. ACTIVIDAD METABOLICA DE LAS PLANTAS | 25 |
| 3.2.1. Índices de cosecha | 26 |
| 3.2.2. Generalidades sobre el crecimiento de los frutos y cambios fisicoquímicos durante su desarrollo y postcosecha | 26 |
| 3.3. AZUCARES Y ACIDOS ORGANICOS | 30 |
| 3.3.1. Azúcares | 30 |
| 3.3.2. Acidos no volátiles | 32 |
| 3.3.3. Asimilación de azucares y ácidos orgánicos | 34 |
| 3.3.4. Cambios en el sabor | 35 |
| 3.4. ANALISIS CROMATOGRAFICO | 36 |

| | |
|--|----|
| 3.4.1. Cromatografía líquido-líquido (LLC) o de partición | 37 |
| 3.4.2. Columnas | 37 |
| 3.4.3. Detectores | 37 |
| 3.4.4. Preparación de muestras | 39 |
| 3.4.5. Estandarización de un método cromatográfico | 42 |
| 4. ANTECEDENTES | 45 |
| 5. METODOLOGIA | 57 |
| 5.1. MATERIA PRIMA | 57 |
| 5.2. ANALISIS FISICOQUIMICOS | 60 |
| 5.2.1. Determinación del contenido de sólidos solubles | 60 |
| 5.2.2. Determinación del pH | 60 |
| 5.2.3. Determinación de acidez titulable | 60 |
| 5.2.4. Determinación del índice de madurez | 60 |
| 5.2.5. Determinación de azúcares totales y reductores por el método de Fehling | 60 |
| 5.3. ANALISIS DE AZUCARES Y ACIDOS ORGANICOS POR HPLC | 61 |
| 5.3.1. Preparación de la muestra | 61 |
| 5.3.2. Condiciones de inyección | 61 |
| 5.4. EQUIPOS Y MATERIALES | 62 |
| 5.5. REACTIVOS | 65 |
| 6. RESULTADOS Y ANALISIS | 66 |
| 6.1. ANALISIS FISICOQUIMICOS | 66 |
| 6.1.1. PH | 66 |

| | |
|---|----|
| 6.1.2. Acidez titulable | 68 |
| 6.1.3. ° Brix | 68 |
| 6.1.4. Índice de madurez | 71 |
| 6.1.5. Azúcares no reductores | 73 |
| 6.2. TRATAMIENTO DE LA MUESTRA | 73 |
| 6.3. CURVA DE CALIBRACION | 73 |
| 6.4. ANALISIS DE AZUCARES Y ACIDOS ORGANICOS POR HPLC | 74 |
| 6.4.1. Glucosa | 74 |
| 6.4.2. Fructosa | 74 |
| 6.4.3. Sacarosa | 75 |
| 6.4.4. Acido cítrico | 78 |
| 6.4.5. Acido málico | 80 |
| 6.4.6. Acido ascórbico | 82 |
| 6.4.7. Acido succínico | 82 |
| 6.4.8. Acido tartárico e isocítrico | 85 |
| 7. CONCLUSIONES | 86 |
| 8. RECOMENDACIONES | 89 |
| 9. BIBLIOGRAFIA | 90 |
| ANEXOS | 98 |

LISTA DE TABLAS

| | Pág |
|--|-----|
| Tabla 1. Composición química de la Mora | 24 |
| Tabla 2. Contenido de azúcares de la Mora | 24 |
| Tabla 3. Monosacáridos presentes en algunas frutas | 29 |
| Tabla 4. Acidos orgánicos en algunas frutas | 32 |

LISTA DE GRÁFICAS

| | Pág. |
|--|------|
| Gráfica 1. pH. Marcación 1. | 67 |
| Gráfica 2. pH. Marcación 2. | 67 |
| Gráfica 3. Acidez. Marcación 1. | 69 |
| Gráfica 4. Acidez. Marcación 2. | 69 |
| Gráfica 5. Brix. Marcación 1. | 70 |
| Gráfica 6. Brix. Marcación 2. | 70 |
| Gráfica 7. Índice de Madurez. Marcación 1. | 72 |
| Gráfica 8. Índice de Madurez. Marcación. | 72 |
| Gráfica 9. Concentración de glucosa. Marcación 1. | 76 |
| Gráfica 10. Concentración de glucosa. Marcación 2. | 76 |
| Gráfica 11. Concentración de fructosa. Marcación 1. | 77 |
| Gráfica 12. Concentración de fructosa Marcación 2. | 77 |
| Gráfica 13. Concentración de ácido cítrico. Marcación 1. | 79 |
| Gráfica 14. Concentración de ácido cítrico Marcación 2. | 79 |
| Gráfica 15. Concentración de ácido málico. Marcación 1. | 81 |
| Gráfica 16. Concentración de ácido málico. Marcación 2. | 81 |
| Gráfica 17. Concentración de ácido Succínico. Marcación 1. | 83 |

| | |
|--|----|
| Gráfica 18. Concentración de ácido Succínico. Marcación 2. | 83 |
| Gráfica 19. Concentración de ácido Ascórbico. Marcación 1. | 84 |
| Gráfica 20. Concentración de ácido Ascórbico. Marcación 2. | 84 |

LISTA DE FIGURAS

| | Pág. |
|--|------|
| Figura 1. Materiales de mora 45 día después de antesis. | 58 |
| Figura 2. Materiales de mora 50 días después de antesis. | 58 |
| Figura 3. Materiales de mora 55 días después de antesis. | 59 |
| Figura 4. Materiales de mora 60 días después de antesis. | 59 |
| Figura 5. Cromatógrafo líquido de alta resolución. | 64 |

ANEXOS

| | Pág |
|---|-----|
| Anexo 1. Curvas de calibración para ácidos orgánicos y azúcares | 98 |
| Anexo 2. Cromatogramas de estándares de azúcares y ácidos orgánicos | 102 |
| Anexo 3. Cromatogramas de los tres materiales de mora en las cuatro etapas de desarrollo | 110 |
| Anexo 4. Resultados del análisis estadístico variables físicas de mora. Marcación 1 y 2. | 123 |
| Anexo 5. Resultados del análisis estadístico variables químicas de mora. Marcación 1 y 2 | 136 |

LISTA DE CONVENCIONES

| | |
|--------------------------------|--|
| ác. | = Acido |
| H ₂ SO ₄ | = Acido sulfúrico |
| cm | = Centímetros |
| con. | = Concentración |
| N | = Concentración normal |
| HPLC | = Cromatografía líquida de alta eficiencia |
| L.L.C. | = Cromatografía líquido-líquido |
| σ | = Desviación estándar |
| V.W.D. | = Detector de longitud de onda variable |
| ° Brix | = Grados Brix |
| ° C | = Grados centígrados |
| g | = gramos |
| H.R. | = Humedad relativa |
| ICONTEC | = Instituto Colombiano de Normas Técnicas de Calidad |
| I.M. | = Índice de madurez |
| I.R. | = Índice de refracción |
| L | = Litros |

| | |
|-------------|---------------------------------|
| λ | = Longitud de onda |
| m. s. n. m. | = Metros sobre el nivel del mar |
| μ l | = Microlitros |
| μ m | = Micrómetros |
| meq. | = Miliequivalente |
| mg | = Miligramos |
| ml | = Mililitros |
| mm | = Milímetros |
| min | = Minutos |
| nm | = Nanómetros |
| psi | = Libras por pulgada cuadrada |
| pH | = Potencial de hidrógeno |
| ppb | = Partes por billón |
| ppm | = Partes por millón |
| r.p.m. | = Revoluciones por minutos |
| t_r | = Tiempo de retención |
| U.V. | = Ultravioleta |
| vel. | = Velocidad |

RESUMEN

Para lograr la identificación y cuantificación de los azúcares y los ácidos no volátiles en 3 materiales de mora (*Rubus glaucus*) CEREZOS, SARA II y VILLA MARIA, se utilizó la técnica de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) en fase reversa, técnica muy utilizada en la actualidad que proporciona de manera rápida y sencilla la identificación de los compuestos en estudio por medio de un estándar externo. El procedimiento analítico para determinar los principales ácidos orgánicos y azúcares en los 3 materiales en 4 etapas de desarrollo (recolección a los 45, 50, 55 y 60 días después de antesis), fue realizado estandarizando la metodología reportada en la literatura. Se utilizó una columna de exclusión iónica en fase reversa para la separación de los analitos y para la preparación de la muestra se utilizaron C₁₈Sep-Pak y filtros de 0.45µm. Para el análisis de ácidos orgánicos se usó un detector U.V a una longitud de onda de 210 nm y un detector de índice de refracción para carbohidratos. El programa de separación y cuantificación utilizado fue una fase móvil acuosa con H₂SO₄ 0.005M a un flujo isocrático 0.6 ml/min, una temperatura de columna de 45 C° y un tiempo de análisis de 15 minutos.

Los principales ácidos no volátiles encontrados en dichos materiales de mora fueron: ácido cítrico y ácido málico en mayor proporción en todos los materiales, ácido ascórbico y ácido succínico, en menor proporción. Los azúcares detectados fueron glucosa y fructosa.

1. INTRODUCCION

La mora de Castilla (*Rubus glaucus Bent*), es una fruta muy apetecida tanto en el mercado nacional como en el internacional, su potencial de exportación tiene mucho futuro debido a la creciente demanda mundial, lo cual aumenta las posibilidades de comercialización de la fruta fresca, congelada y de los productos derivados de su procesamiento tales como jugos, concentrados, jaleas, helados, mermeladas, repostería, etc.

En el campo tecnológico " Los Cerezos" del SENA La Enea, kilómetro 10 vía Manizales-Bogotá a 2150 m.s.n.m., con una humedad relativa del 85%, una precipitación anual de 1600 a 1800 mm y una temperatura promedio de 17 °C, existe un banco de germoplasma de 40 materiales de mora, provenientes de diferentes zonas agroclimáticas colombianas, de los cuales se seleccionaron tres: CEREZOS, SARA II Y VILLAMARIA para estudiarlos en la presente investigación; estos materiales provienen de las zonas productoras de: Manizales granja La Enea, Salamina (Caldas), Villa María (Caldas), respectivamente.

El conocimiento de las cualidades físicas, químicas y organolépticas de la mora es muy limitado, lo que causa el desaprovechamiento de esta fruta en la industria alimentaria, generándose así la necesidad de estudios que permitan determinar las principales

características de los diferentes materiales durante su proceso de maduración, con el fin de satisfacer la demanda actual.

El análisis de compuestos tales como azúcares y ácidos orgánicos es de gran importancia porque ellos influyen en gran porcentaje en el sabor y el aroma de las frutas. La interacción entre azúcares reductores y no reductores y ácidos orgánicos determinan las características de sabor; la relación °Brix/ %acidez o índice de madurez es usado como índice de aceptabilidad de consumo y de la calidad de las frutas

Para la identificación y cuantificación de los ácidos no volátiles y azúcares presentes en los 3 materiales estudiados, se utilizó la técnica instrumental de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) en fase reversa, la cual es de fácil y rápida aplicación, y proporciona resultados confiables.

Esta investigación se ejecutó con la colaboración de **CORPOICA**, regional 9 Manizales (Colombia), en el Laboratorio de Investigaciones Postcosecha de la Universidad del Quindío, dado su gran interés por proporcionar a los cultivadores de frutas materiales de mora que cumplan con las condiciones necesarias para un buen rendimiento a nivel industrial.

2. OBJETIVOS

1.1. Objetivo general

Caracterizar azúcares reductores, no reductores y ácidos no volátiles como ácido cítrico, málico, succínico, ascórbico, isocítrico y tartárico, en tres materiales de mora *Rubus glaucus*, cultivados en el banco de germoplasma de CORPOICA regional Manizales, mediante la técnica de cromatografía líquida de alta resolución.

1.2. Objetivos específicos

- Realizar análisis fisicoquímicos a los tres materiales de mora, *Rubus glaucus*: pH, °Brix y acidez.
- Estandarizar el protocolo de preparación y análisis de muestras de mora *Rubus glaucus* por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia.
- Cualificar y cuantificar azúcares totales, reductores y ácidos no volátiles (cítrico, málico, succínico, ascórbico, isocítrico y tartárico), presentes en los materiales de mora.

- Comparar los análisis realizados a los materiales durante su cultivo, para determinar cual o cuales de ellos poseen mejores características para su uso industrial.

3. MARCO TEORICO

3.1. MORA DE CASTILLA (*Rubus glaucus Bent.*)

La mora o zarzamora (*rubus spp*), es un frutal que comprende alrededor de 300 especies en todo el mundo pertenecientes a la familia de las rosáceas, pero la más difundida por la capacidad de producción, por su tamaño, sabor y aroma, es la mora de Castilla.

Se conoce con los siguientes nombres: "**mora de Castilla**" en Colombia, Ecuador y Perú, "**Zarzamora azul o mora azul**" en Colombia, "**Mora de los Andes**" en Colombia. En inglés se conoce con el nombre de "Blackberry" y en alemán "Brombeer".

3.1.1. Taxonomía

| | |
|------------------|---------------|
| Reino: | Vegetal |
| Subreino: | Embriofita |
| División: | Espermatofita |
| Clase: | Angiosperma |
| Subclase: | Dicotiledonea |
| Orden: | Rosales |
| Suborden: | Rosineae |

Familia: Rosaceae
Subfamilia: Ruboideae
Género: Rubus
Subgénero: Eubatus
Especie: Rubus glaucus (Bentham)
Variedad: Castilla.

La especie *Rubus glaucus*, mora de Castilla, es una planta arbustiva, perenne, originaria de las zonas altas tropicales de América. La mora de Castilla se adapta a alturas entre 1200 y 3200 m.s.n.m. Son frutos de color morado, largos y anchos y el haz de sus hojas es de color verde azulado. La propagación de plantas se refiere a la reproducción de especies seleccionadas por el hombre con determinadas características que le son benéficas a él. La propagación puede realizarse sexualmente mediante semilla botánica, ó asexualmente, utilizando para ello diferentes métodos tales como acodo, división de coronas, estacas y raíces (Henaó,1997).

3.1.2. Composición Química de la Mora de Castilla.

Tabla 1. Composición química proximal de la mora

| COMPONENTE | CANTIDAD |
|-------------------|-----------------|
| Proteína | 1.3 g |
| Carbohidratos | 8.1 g |
| Agua | 85 % |
| Sodio | 2 mg |
| Potasio | 260 mg |
| Calcio | 36 mg |
| Fósforo | 48 mg |
| Magnesio | 15 mg |
| Hierro | 1.6 mg |
| Tiamina | 0.05 mg |
| Riboflavina | 0.04 mg |
| Niacina | 0.4 mg |
| Vitamina C | 10 mg |

Tomado de: La gran guía de la composición de los alimentos. Universidad J. Liebig de Giessen (Alemania), 1997.

Tabla 2. Contenido de azúcares de la mora de Castilla

| Componente | % de la fracción |
|-------------------|-------------------------|
| Glucosa | 3.2 % |
| Fructosa | 2.9% |
| Sacarosa | 0.2% |
| pH | ≈3.4 |

Tomado de: Food chemistry. Belitz, 1984, p. 794.

3.2. ACTIVIDAD METABÓLICA DE LAS PLANTAS

Las frutas y vegetales antes y después de la cosecha experimentan cambios con relación a su contenido de carbohidratos, pectinas y ácidos no volátiles, los cuales influyen en varias cualidades y atributos de los productos. Pocas generalizaciones pueden hacerse en cuanto a cambios en almidones y azúcares. Las frutas verdes tienen contenidos altos de almidón y bajos en azúcares y continúan madurando después de la cosecha; en contraste a través de la maduración aumentan el contenido de azúcares y disminuyen los de almidón. Sin embargo esto no necesariamente quiere decir que el almidón sea la fuente de la nueva formación de azúcares. El contenido de ácidos orgánicos de las frutas generalmente decrece durante el almacenamiento y maduración de las mismas, como por ejemplo en la naranja.

Muchas veces los pigmentos de las plantas son sensibles a los ácidos presentes en ellas afectando el color de las frutas, cuando se presentan cambios en el contenido de ácidos. Adicionalmente la viscosidad del gel péctico de las frutas es afectado por el contenido de ácidos y azúcares, los cuales cambian su concentración durante la maduración.

La mayoría de las frutas como la mora, maduran en el árbol, por lo tanto su concentración de azúcares sufre los mayores cambios durante este proceso. La concentración de sólidos solubles en el jugo de las frutas puede ser determinada mediante el uso de un refractómetro o hidrómetro, y expresada como grados Brix ($^{\circ}$ Brix), los cuales relacionan la gravedad

específica de una solución a una concentración equivalente de sacarosa pura. (Potter, 1995, 417,429).

3.2.1. Índices de Cosecha. Los índices de cosecha de las frutas se pueden evaluar desde variados criterios. Entre los más representativos se tienen:

- Índices de tipo climatológico o metereológico
- Índices de tipo físico y fisiológico, (textura, peso específico, comportamiento respiratorio)
- Índices de naturaleza química, entre los cuales encontramos contenido de almidón, contenido de ácidos, contenido de azúcares, relación ácidos/azúcares, entre otros.
- Por medio de cálculos
- Por medios visuales
- Otros índices: Relación pulpa hueso, jugosidad de la pulpa, actividad enzimática, etc.

Si los frutos se cosechan fisiológicamente inmaduros, no adquieren la coloración adecuada, ni el sabor característico, siendo de calidad inferior para el consumo. En la mora a medida que el fruto va madurando adquiere un color rojo negruzco como resultado de la desaparición de la clorofila y la aparición de pigmentos carotenoides y antocianinas. (Planella, 1987, 62).

3.2.2. Generalidades sobre el crecimiento del fruto y cambios fisicoquímicos durante su desarrollo y postcosecha. Piedrahita (1981), comenta que los frutos recién cosechados

tienen alta actividad enzimática. Si los frutos tienen alto contenido de humedad como es el caso de la fresa y la mora (85-90%), esta actividad actúa sobre las estructuras que dan fortalecimiento al fruto, produciendo ablandamiento o pérdida de la textura y en algunos casos, si las estructuras fuertes son mínimas (piel) pueden facilitar el escape de líquidos mediante la actividad de estas enzimas.

Se ha observado que existe una relación entre el crecimiento del fruto y los cambios de pigmentación, acidez y azúcares reductores. El crecimiento de la mora presenta 3 fases:

- Crecimiento acelerado
- Crecimiento lento
- Crecimiento rápido

El fruto de la mora se forma y desarrolla en un período de 58 a 64 días luego de anthesis (ovario fecundado). Los mayores contenidos de sólidos solubles se encuentran en aquellas épocas de mayor radiación solar y de menor pluviosidad. Como la mora es un fruto no climatérico no progresa en su maduración una vez cosechada. El punto normal de cosecha es $\frac{3}{4}$ rojo o vino tinto según la variedad. El almacenamiento ideal va de 0 °C a 1 °C y 95% de humedad relativa, de esta forma los frutos se conservan hasta 4 días.

Según Duran (1983, 21), el fenómeno de maduración se inicia con el envero (cuando el fruto verde cambia de color) y finaliza con la madurez de consumo, al alcanzar todas sus cualidades organolépticas. La acidez aumenta a partir de los 15 días después de anthesis, al

mismo tiempo que el pH disminuye. Hay un aumento repentino en la concentración de azúcares, 45 días después de anthesis.

En el transcurso de la maduración y como parte integral de la misma, tienen lugar una serie de fenómenos que en esencia son: fotosíntesis, respiración, transpiración, fermentación, emisión de sustancias volátiles y modificación de sustancias que constituyen el fruto.

Entre las principales reacciones bioquímicas de la maduración, están las modificaciones de los constituyentes glucídicos. En general el contenido de azúcares y el sabor azucarado aumenta en el transcurso de la maduración, a pesar del consumo de una parte de esos azúcares por la oxidación respiratoria. (Chefftel 1992, 143).

Se sabe que la glucosa, fructosa y sacarosa son interconvertibles en los tejidos vegetales; en algunas frutas la fructosa se acumula durante la maduración, como en fresas, uvas, peras, etc., mientras que en otras el contenido de sacarosa es el que aumenta durante la maduración.

En la tabla 3, se muestran algunos resultados de análisis del contenido de carbohidratos realizados a zumos de diferentes frutas, observándose que la cantidad exacta de azúcares encontrada en los frutos varía considerablemente en los diferentes cultivos.

Tabla 3. Monosacáridos de algunas frutas

| Fruta o derivado | Fructosa (g/100g) | Glucosa (g/100g) | Sacarosa (g/100g) |
|----------------------------|-------------------|------------------|-------------------|
| Pera | 8.9 | 1.2 | 1.1 |
| Ciruela púrpura | 3.5 | 3.4 | 2.0 |
| Ciruela pasa de California | 16 | 23.4 | – |
| Cereza dulce de Inglaterra | 7.2 | 4.7 | – |
| Mora de Inglaterra | 2.9 | 3.2 | 0.2 |
| Melocotón de Inglaterra | 1.5 | 0.9 g/100mL | 6.7 |
| Zumo de manzana | 6.4 | 3.1 | 1.1 |
| Zumo de Naranja | 3.0 | 2.2 | 5.2 |
| Zumo de tomate | 1.7 | 1.2 | – |

Tomado de: Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos. Robinson, 1992, 15.

En esta tabla se observa que aunque la sacarosa se hidroliza fácilmente mediante la acción de la invertasa a glucosa y fructosa, no existe una relación aritmética obvia entre el contenido de glucosa y fructosa de las distintas frutas. (Robinson, 1992, 15).

Por lo general la maduración presupone un descenso de la acidez; de esta forma la relación ° Brix/% acidez aumenta en la mayor parte de las frutas. Las reacciones de degradación de ácidos orgánicos son poco conocidas, una de ellas es la degradación anaeróbica del ácido málico. Las variaciones del contenido de ácido ascórbico no presentan las mismas regularidades, ya que durante la maduración de algunos frutos hay una síntesis activa de

vitamina C, a partir de la glucosa, cantidad que decrece en la mayoría de las frutas durante el almacenamiento. (Chefftel, 143).

3.3. AZUCARES Y ACIDOS ORGANICOS EN LAS FRUTAS

La composición química de las frutas depende esencialmente de la madurez. Los compuestos fundamentales en los productos frutícolas son azúcares, polisacáridos y ácidos no volátiles, aunque también se presentan pequeñas proporciones de compuestos nitrogenados y lípidos.

En la mayoría de los frutos la interacción entre azúcares reductores y no reductores y los ácidos orgánicos determinan las características del sabor, teniendo también influencia sobre el sabor algunos compuestos aromáticos y colorantes. (Azcon-Bieto, 1996, 471).

3.3.1. Azúcares. Los hidratos de carbono constituyen la mayor parte de la materia sólida de los frutos, verduras, hortalizas, cereales, etc. En general, casi un 75% del peso seco del material de las plantas está formado por hidratos de carbono. Se considera que los carbohidratos totales son la suma de los azúcares sencillos, polisacáridos y sustancias pécticas. (Fenema, 1982, 790).

La identidad y concentración de los azúcares varía en los diferentes frutos, dentro de cada especie el contenido de azúcares depende de la variedad, el estado de nutrición, la cantidad

de frutos y el estado de desarrollo, aunque el fruto presenta cierta capacidad fotosintética durante su evolución, la mayoría de las reservas de carbohidratos provienen de la planta.

Además de la acumulación de azúcares sencillos originada por la hidrólisis de polímeros de reserva de cadena larga, otros productos fotosintéticos principalmente en forma de sacarosa se translocan al fruto desde las hojas durante el período de cosecha.

La acumulación de azúcares en los productos carentes de almidón (fresa y mora) finaliza en los días previos a la cosecha del fruto mientras que en otros casos se completa la degradación del almidón (Azcon-Bieto, 470). (Charley, 1987, 651). La cromatografía líquida de alta eficiencia, es el método de análisis más rápido para mono y oligosacáridos no derivatizados (15 min/muestra), aunque los métodos disponibles para la detección por HPLC de carbohidratos están restringidos a la medida de cambios inespecíficos de índice de refracción ya que los carbohidratos absorben poco en el U.V. (Robinson, 11).

Azúcares sencillos. Las proporciones de sacarosa y azúcares reductores (glucosa y fructosa) varían con el tejido y la madurez. Por lo general en las frutas y verduras hay mayor cantidad de azúcares reductores que de sacarosa, con excepciones en ciertas hortalizas. La glucosa es el monosacárido más ampliamente repartido en los vegetales, se encuentra libre, como éster fosfórico, como componente de los polisacáridos y en los glucósidos. La fructosa, es la única cetohexosa corriente en los vegetales; sus ésteres fosfóricos son importantes metabolitos. (Fenema,799).

3.3.2. Ácidos no volátiles. Hay una amplia gama de ácidos orgánicos en los tejidos de las plantas. Muchos de estos ácidos se encuentran en pequeñas cantidades y actúan como intermediarios en el metabolismo básico, en particular en el ciclo del ácido tricarboxílico, la vía del ácido glioxílico y la ruta del ácido shikímico, otros ácidos no asociados hasta ahora con ningún trayecto metabólico, de los que no se sabe que tengan importancia fisiológica, pueden acumularse en grandes cantidades en los tejidos de las plantas. Por todo ello, las frutas suelen ser ácidas y, en algunas ocasiones, tienen un sabor agrio. La acidez proporcionada por estos componentes puede variar desde valores muy bajos hasta 50 meq de ácido por 100 g en ciertos frutos.

Los ácidos orgánicos se encuentran en constante dinámica metabólica en la mayoría de las verduras y frutas. Por lo general los niveles de ácidos orgánicos descienden durante la madurez del fruto, con algunas excepciones como en el plátano y también pueden aumentar en algunos ácidos específicos. La mayoría de los frutos contiene elevadas concentraciones de ácidos del ciclo de ácidos tricarboxílicos y otros ciclos metabólicos, con diferentes proporciones relativas, cuyo exceso se acumula en la vacuola. (Fenema, 806).

Tabla 4. Ácidos orgánicos en diversas frutas

| FRUTA | ACIDO PRINCIPAL | OTROS ACIDOS |
|---------|-----------------|--------------|
| Manzana | Málico | Quínico |
| Pera | Málico | Cítrico |

| | | |
|-----------|-----------|------------------------------|
| Cereza | Málico | Cítrico, quínico, shiquímico |
| Ciruela | Málico | Quínico |
| Fresa | Cítrico | Málico |
| Frambuesa | Cítrico | Málico |
| Uva | Tartárico | Málico |
| Naranja | Cítrico | Málico, quínico |
| Limón | Cítrico | Málico, quínico |
| Piña | Cítrico | Málico |
| Plátano | Málico | Málico |
| Guayaba | Cítrico | Málico |

Tomado de: Food chemistry. Belitz, 1988, p.644.

Los ácidos presentes con mayor frecuencia y abundancia en los tejidos de las plantas comestibles son el málico y el cítrico cada uno de los cuales puede constituir hasta el 3% (en peso fresco) de un determinado tejido. El ácido cítrico es el principal ácido en los cítricos, frambuesas, fresas, arándanos, piñas y peras, mientras que el ácido málico domina en las manzanas, la mayoría de las frutas en forma de drupa, plátanos y ruibarbo.

Entre las especies en las que no prevalece el citrato ni el malato, deben citarse las uvas, que acumulan el ácido tartárico, las espinacas (oxálico) y las moras negras en las cuales predomina el ácido isocítrico y el málico, además del ácido lactoisocítrico, shikímico, quínico, y trazas de ácido cítrico y oxálico. En las variedades de mora azul (Mora de

Castilla) se encuentran ácidos tales como: el cítrico (mayor cantidad), málico, glicérico, citramálico, glicólico, succínico, entre otros.

En cuanto al pH las limas y limones tienen los valores más bajos de 2.0 a 2.2. Las grosellas rojas, ciruelas, manzanas, zarzamoras y fresas poseen pH entre 3.0-3.4. El pH promedio de los duraznos, frambuesas, *blueberries* (arándanos azules), naranjas, peras cae dentro del límite de 3.5 a 3.9. (Charley, 661).

3.3.3. Asimilación de los azúcares y los ácidos orgánicos. Los azúcares y los ácidos orgánicos son usados como sustratos en la respiración, estos se requieren para que participen en la producción de energía dentro de la fruta. Los azúcares más comunes son la sacarosa, fructosa y glucosa y los ácidos que prevalecen son el malato y el citrato. Ambos, los azúcares y los ácidos se originan en la asimilación fotosintética.

Los frutos verdes son capaces de realizar fotosíntesis, pero esta es limitada; la mayor cantidad de la asimilación es provista por el resto de la planta. Sin embargo, las frutas difieren en la manera como realizan la asimilación y acumulación durante su desarrollo y maduración. Algunas frutas acumulan la mayor cantidad de sus carbohidratos antes de terminar la maduración, éstas lo almacenan principalmente ya sea como almidón (banano) o como azúcares (tomate). Otras frutas continúan su acumulación de azúcares de la planta durante su maduración y en algunos casos (tales como en la fresa y la uva), estos constituyen una parte importante de su sabor. Mientras estas diferencias son de poca

importancia para la respiración (la cual usa solamente una relativamente pequeña fracción de los asimilados) son de principal importancia en las consideraciones del sabor.

Aquellos frutos que acumulan sus asimilados antes de la madurez pueden ser cosechados en un estado de maduración verde y sin embargo conseguir un sabor aceptable en la madurez, factor importante cuando se considera la necesidad de cosechar rápidamente para optimizar la vida de anaquel.

En general los niveles de ácidos declinan durante la maduración, se cree que es debido a su utilización como substrato en la respiración, en algunos productos este proceso se lleva a cabo después de haber logrado su máximo contenido de ácidos en estados intermedios de la maduración. Durante la maduración los niveles de azúcar dentro del fruto tienden a incrementar, debido ya sea al incremento de la importación del azúcar por la planta o a la movilización de las reservas de almidón dentro del fruto, dependiendo del tipo de fruto y de si se madura o no en la planta.

3.3.4. Cambios en el sabor. La percepción del sabor se basa en dos sentidos, el gusto y el olfato. Se pueden distinguir básicamente cuatro diferentes sabores, estos son: dulce, ácido, amargo y salado. En las frutas son principalmente los azúcares y los ácidos orgánicos los que contribuyen a su sabor, aunque la naturaleza astringente de algunas frutas se puede atribuir a su contenido de taninos y compuestos fenólicos. Sin embargo, el sabor característico de las frutas para cada persona es usualmente derivado de su sentido del olfato y es debido a la producción de aromas volátiles específicos. Así el sabor de una fruta

depende de una completa interacción de los azúcares, ácidos no volátiles, compuestos fenólicos y más compuestos especializados en el sabor, incluyendo un amplio grupo de volátiles. (Seymour, 1993, 9-11).

La maduración es el proceso mediante el cual las frutas y las verduras presentan su desarrollo y alcanzan el grado óptimo de sus características para consumo. La maduración se produce sin que haya en muchos casos un crecimiento en tamaño, es una transformación interna de la fruta. El fruto en pocos días pasa de ser simple, sin atractivo, a uno atractivo, de un alto sabor y aroma y deseable para ser consumido. Estos cambios se presentan especialmente en los principales constituyentes del sabor ácidos, azúcares y compuestos aromáticos. Una manera de cuantificar las variaciones en los componentes del sabor es por medio del índice de madurez o *ratio* el cual muestra la relación entre los azúcares y la acidez presente en los frutos, este índice proporciona niveles de aceptabilidad de consumo y de la calidad de las frutas. (Gallo, 1997, 93).

3.4. ANALISIS CROMATOGRAFICO

Según define la IUPAC, "La cromatografía es un método, usado primariamente para la separación de los componentes de una muestra, en el cual los componentes se distribuyen en dos fases, una de las cuales es estacionaria, mientras la otra se mueve. La fase estacionaria puede ser un sólido, un líquido retenido sobre un sólido o un gel.

3.4.1. Cromatografía líquido-líquido (LLC) o de partición. En este tipo de cromatografía, las moléculas de soluto se distribuyen entre dos líquidos: uno es la fase móvil, y el otro la fase estacionaria, que se encuentra homogéneamente dispersa en un soporte sólido finamente dividido. (Quattrocchi, 1992, 6).

3.4.2. Columnas. Las columnas para cromatografía de líquidos se construyen generalmente con tubos de acero inoxidable de diámetro interno uniforme y en algunas ocasiones, de vidrio de paredes resistentes (presión menor de 600 PSI). La mayoría de las columnas tienen una longitud entre 10 y 30 cm. El diámetro interno a menudo es de 4 a 10 mm y tamaño de partícula de los rellenos de 3.5 a 10 μm . Los rellenos más comunes son de Sílice o alúmina. (Skoog, 1994, 737).

La presión a la entrada de la columna puede ser máximo de 200 bares, la presión de trabajo en la columna está entre 25 y 100 bares, esta presión corresponde a un aproximado de 1-5 mL/min a través de la columna. La presión desarrollada depende de la longitud de la columna, el tamaño de la partícula de la fase estacionaria y la viscosidad y velocidad de flujo de la fase móvil. (Lindsay, 1992, 289).

3.4.3. Detectores. El detector es la parte del equipo cromatográfico que permite ver y ubicar en tiempo y en espacio la posición de cada componente de una muestra a la salida de la columna cromatográfica. Los detectores pueden ser generales y selectivos.

Los detectores generales miden el cambio de alguna propiedad física de la fase móvil que contiene el analito en comparación con la misma fase móvil pura. Ejemplo de ellos son el detector de índice de refracción (I.R.) y el de conductividad. Los detectores selectivos son aquellos sensibles a alguna propiedad propia del soluto, como el detector de UV, que produce una señal proporcional a la absorbancia del soluto, a una longitud de onda dada, otro ejemplo es el detector de fluorescencia, empleado para la detección de solutos con fluorescencia natural o conferida por reacción con un reactivo clorogénico.

3.4.3.1. Detector de índice de refracción. Este detector mide la diferencia de índice de refracción entre el solvente puro y el solvente que contiene la muestra. Es un detector universal (ya que es altamente improbable que el índice de refracción del soluto sea similar al del solvente) y no destructivo. Como contrapartida es muy poco sensible, lo cual limita su campo de aplicación y es muy afectado por cambios de temperatura.

3.4.3.2. Detector U.V. Posee buena sensibilidad y rango lineal, y permite detectar analitos en el orden de los nanogramos. No es destructivo y puede emplearse con gradiente de solventes, con la única limitación de que éstos sean transparentes en la longitud de onda de trabajo. Es un detector muy poco sensible a los cambios de caudal y de temperatura; opera en el rango de 190 a 350 nm, y en algunos equipos se puede extender a la zona visible del espectro (350 a 700 nm) recibiendo así el nombre de detector de UV-Visible.

La concentración del analito en la muestra se determina por la aplicación de la ley de Beer:

$$A = a.b.C$$

Donde: **A:** es la absorbancia

a: es la absortividad molar del analito

b: es el camino óptico de la celda medido en cm

C: es la concentración del analito en la muestra expresado en moles/L.

Cuando el detector U.V. tiene una respuesta inadecuada existen otros detectores que ofrecen ventajas (fluorescencia, electroquímica) o la muestra puede ser derivatizada. (Quattrocchi, 106).

3.4.4. Preparación de muestras. Las muestras para HPLC pueden tener diversos orígenes y usualmente no son mezclas simples de compuestos orgánicos puros, todos solubles y separables por la misma fase móvil. Muchas muestras biológicas contienen proteínas, sales y una amplia gama de compuestos orgánicos con un rango amplio de polaridad. (Lindsay, 309).

Las muestras vienen o se encuentran en varias formas:

- Soluciones listas para inyectar
- Soluciones que requieren dilución, adición de buffer o adición de estándar interno o de alguna manipulación volumétrica.
- Sólidos que deben ser disueltos o extraídos.

- Muestras que requieran pretratamiento para remover interferencias, y/o proteger la columna o el equipo de daños. Este es el objetivo primordial en la preparación de muestras, además que sea compatible con el método propuesto en el equipo.

La preparación de la muestra es una parte esencial del análisis cromatográfico, estos son algunos de los aspectos que se deben tener en cuenta:

◆ PROCESO PRELIMINAR:

- Reducción del tamaño de poro.
- Secado de la muestra
- Filtración.
- Centrifugación

La reducción del tamaño de poro, consiste esencialmente en una homogeneización de la muestra, la cual es finamente dividida. Este método es usado en tejidos de plantas y animales, alimentos, muestras ambientales; pueden ser usados solventes orgánicos o acuosos. Para permitir mayor fluidez de la muestra se puede usar hielo seco o tierra diatomácea.

La operación de centrifugación se realiza colocando las muestras en tubos de centrifuga a altas velocidades, luego se decanta el líquido sobrenadante. En este proceso se remueven

cuantitativamente sólidos de las muestras que generan problemas en los procesos posteriores.

Filtración, en este método de pretratamiento de muestras, la muestra líquida es pasada a través de filtros de membranas para remover partículas suspendidas. Este proceso es altamente recomendado para prevenir problemas de excesos de presión en la columna, preservando así su vida.

◆ PRETRATAMIENTO PARA MUESTRAS LÍQUIDAS:

- Extracción Líquido-líquido
- Extracción en fase sólida
- Membranas de separación

◆ PRETRATAMIENTO PARA MUESTRAS SÓLIDAS:

- Agitación con Ultrasolnido
- Soxleth
- Extracción con fluido supercrítico
- Extracción acelerada con microondas
- Derivatización
- Limpieza de la muestra (Snyder, 1997, 103).

Existen variados sistemas para retener y eliminar impurezas e interferencias en las muestras uno de ellos es el uso de cartuchos Sep-pack; ellos están disponibles en empaques con silica o alumina enlazada a C_{18} (silano) o silica enlazada a otra variedad de productos químicos. La muestra se hace pasar a través del Sep-pack con previo acondicionamiento del cartucho (activación con solventes menos polar a más polar). Las interferencias quedan retenidas, los compuestos de interés que quedan en él pueden ser removidos por elución con solventes de diferente polaridad. (Lindsay, 309)

3.4.5. Estandarización de un método cromatográfico. Una buena cromatografía con fases móviles interactivas requiere un equilibrio adecuado entre las fuerzas intermoleculares existentes entre los tres participantes activos en el proceso de la separación: el soluto, la fase móvil y la fase estacionaria. Estas fuerzas intermoleculares se describen cualitativamente en términos de polaridad relativa de cada uno de los reactivos.

Al elegir una columna para una separación cromatográfica de reparto, la polaridad de la fase estacionaria ha de ser bastante similar a la de los analitos, y para la elución se utiliza entonces una fase móvil con una polaridad considerablemente distinta.

Si se quieren obtener buenas separaciones en un tiempo razonable, las polaridades del soluto, de la fase móvil y de la fase estacionaria se han de armonizar cuidadosamente. Una vez hecha la elección de la fase estacionaria, se deben realizar una serie de ensayos tentativos obteniendo los cromatogramas con varias fases móviles, hasta que se llega a una

separación satisfactoria. Si la resolución de todos los componentes de la mezcla resulta imposible, se ha de elegir otro tipo de columna. (Skoog, 1994, 749).

En resumen, para desarrollar un método cromatográfico es importante tener en cuenta los siguientes factores:

- ◆ **ELECCIÓN DE LA FASE MÓVIL:** Esta es el motor de las separaciones en fase inversa. Su elección depende de factores tales como:
 - Solubilidad y estabilidad de la muestra.
 - Cantidad de muestra
 - Tipos de separación
 - Influencia del detector
 - Pureza

- ◆ **ELECCIÓN DE LA FASE ESTACIONARIA:**
 - Dimensiones: Diámetro de la columna, longitud, espesor de la fase estacionaria.
 - Manejo de la columna.
 - Elección del detector

- ◆ **ENSAYOS EXPLORATORIOS:** Una vez tomada la decisión respecto a la fase móvil, la columna y el detector, queda la tarea de determinar las condiciones cromatográficas

óptimas para alcanzar una completa separación de todos los componentes en el menor tiempo posible.

◆ DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS OPTIMAS:

Se registra el cromatograma de un blanco en un tiempo corto por ejemplo 10 minutos, con gradiente lineal desde un 10% hasta un 100% del componente final de la fase móvil (repetir varias veces hasta estabilidad de la línea base); a continuación se repite el gradiente con una inyección de la disolución filtrada de la muestra. Se determina si los compuestos que nos interesan pueden detectarse a las concentraciones requeridas, si dichos compuestos son retenidos y eluidos en la columna.

- ◆ OPTIMIZACIÓN. La regla general es que si desea acortar el cromatograma hay que aumentar la concentración del componente más fuerte, mientras que si se desea aumentar el tiempo de retención hay que disminuir la concentración de tal componente. (Yost, 1981, 122).

4. ANTECEDENTES

Se han realizado diferentes estudios de los cambios en la concentración de azúcares y ácidos orgánicos en diferentes frutos, tanto climatéricos como no climatéricos.

PEREZ et al (1997), utilizaron la técnica de HPLC para la determinación rápida de azúcares y ácidos no volátiles incluyendo ácido ascórbico en fresas y otras frutas (duraznos, manzanas, bananos y kiwi). Se usó un cartucho C₁₈Sep-pack en el proceso de limpieza de la muestra, una columna de exclusión iónica, fase móvil H₂SO₄ 0.0085N, velocidad de flujo 0.4 mL/min y detectores U.V. con arreglo de diodos e índice de refracción.

Los principales ácidos y azúcares que se encontraron en los extractos de fresa fueron: ácido cítrico, ácido málico, ácido ascórbico. En cuanto a azúcares se detectó sacarosa, glucosa y fructosa. En las otras frutas encontraron ácido oxálico, ácido cítrico, ácido málico, ácido ascórbico, ácido quínico, ácido succínico, y azúcares sacarosa, glucosa, fructosa.

PERKINS-VEAZIE et al (1996), analizaron los cambios fisiológicos y bioquímicos producidos durante numerosos estados de madurez en diferentes frutos de la familia Rubus (variedades Navaho, Choctaw, Choyenne, Shawnee). Como conclusión se estableció la

influencia de la maduración sobre la calidad postcosecha, observándose que el 50% de los frutos maduros presentaron menor acidez titulable y mayor concentración de sólidos y antocianinas que los frutos en otros estados de madurez.

BARTOLOME et al (1996), estudiaron la influencia del congelamiento y almacenamiento sobre la concentración de azúcares en dos variedades de piña (Smooth cayenne y Red spanish), La piña se cortó en tajadas y se almacenó a -18 °C por 12 meses. Las muestras fueron evaluadas antes de ser congeladas y 1, 2, 4, 6, y 8 meses después de almacenarlas congeladas. El contenido de azúcares fue determinado por HPLC y comparado con el contenido total de los sólidos solubles determinado por índice de refracción. El contenido de sólidos solubles de las dos variedades, no cambia significativamente durante la congelación. Después de un año de almacenamiento se presentó el incremento en los azúcares totales en ambas variedades, 48.7% en la variedad Smooth Cayene y 13,5% en Red Spanish. Con este trabajo se concluyó que no son importantes los cambios en el contenido de azúcares, asociados a los procesos de congelación y almacenamiento de las tajadas de piña congeladas.

LOPEZ et al (1996), determinaron ácidos orgánicos, azúcares y glicerol en productos de vino blanco, teniendo en cuenta factores como el clima y la variedad de las uvas. Mediante el método de HPLC por exclusión iónica y con el detector de índice de refracción se encontraron en los mostos (Macabeo, Xare y Parellada) y en vino blanco (de 5 cosechas

1989-1993) ácido cítrico, tartárico, málico, succínico, galacturónico y láctico. En cuanto a azúcares: glucosa y fructosa; y glicerol.

DURST et al (1994), cuantificaron los principales azúcares y ácidos en jugo de frambuesa por medio de HPLC, utilizando la columna Aminex HPX-87 H y los detectores de I.R. y el de UV. Como principales ácidos cuantificaron el ácido cítrico 95.6% y de ácido málico de 0.3 a 9.6% de los ácidos totales, encontrando también ácido isocítrico y fumárico en los jugos. Los azúcares cuantificados en mayor proporción fueron la fructosa y la glucosa los cuales se encuentran en concentraciones entre 2,5 y 3,0 g/100 ml de jugo.

FERNANDEZ et al (1994), investigaron varios métodos para la separación y cuantificación de 10 ácidos orgánicos (orótico, cítrico, pirúvico, láctico, úrico, fórmico, acético, propiónico, butírico, e hipúpico) en yogurth natural, con una elución isocrática, con columna 2 para HPLC con acetonitrilo y agua vs 0.01 N de H_2SO_4 . Los yogures hechos bajo condiciones del laboratorio fueron almacenados a 4°C por 4 semanas (durante la fermentación se tomaron las muestras cada hora y después de 4 semanas de almacenamiento.); éstas muestras se analizaron con columna Aminex HPX 87H de intercambio iónico con fase móvil 0.0078 N de H_2SO_4 . y detector U.V a 210 nm. Los niveles de ácido acético y propiónico aumentaron durante la fermentación y el almacenamiento.

BERTOLINI et al (1994), realizaron un procedimiento para identificar ácidos orgánicos en vinagres, (se analizaron 3 vinagres de manzana, 8 vinagres de vinos y 1 vinagre de malta), basándose en la decoloración de la muestra con carbón activado y la remoción de los azúcares por intercambio de iones. El análisis se llevó a cabo con una columna Aminex HPX 87-H⁺, fase móvil H₂SO₄ 0.013N y un detector U.V. a una $\lambda = 210$ nm. Este método se comparó con una técnica enzimática. Se detectaron ácidos cítrico, láctico, tartárico y succínico. El ácido láctico fue el que se presentó en mayor cantidad en el vinagre de vino.

RIAZ et al (1994), determinaron ácidos orgánicos (oxálico, málico, cítrico y succínico) en diferentes variedades de frambuesa (*Boyle*, *Festival*, *Killarney* y *Prestige*), cultivadas en Maine, este estudio se realizó durante 3 años (1989-1991). Las concentraciones de ácidos orgánicos presentaron diferencias significativas dependiendo de las variedades. El ácido cítrico se encontró en mayor cantidad en los jugos de frambuesa (1.7-2.7%) y el ácido málico en menor cantidad (0.05-0.1), el ácido succínico se presenta en pequeñas cantidades en los jugos de estas frutas. La variedad *Festival*, presentó mayor contenido de ácidos. El contenido total de ácidos orgánicos fue menor en la variedad *Prestige*. Las condiciones climáticas (temperatura, % de radiación solar y la precipitación) mostraron un gran efecto sobre la concentración de los ácidos, durante el crecimiento de las frambuesas.

FULEKI et al (1994), procesaron jugos de 11 variedades de manzana, antes y después de almacenamiento. Los jugos fueron analizados para azúcares individuales por medio de

HPLC. Los rangos de concentración (g/100 ml) encontrados para jugos producidos de frutas frescas y almacenadas, fueron los siguientes respectivamente: Sacarosa 1.33-4.8, 0.62-3.3; fructosa 4.12-6.78, 4.27-7.43; y glucosa 0.7-2.27, 0.88-2.65; xilosa; galactosa, rafinosa y sorbitol. Los azúcares totales reportados son 8.26-13.21, 7.79-11.96, sólidos solubles totales 9.7-15, 9.7-13.4. La variedad así como el almacenamiento muestran una influencia significativa sobre el contenido de los principales azúcares. Las estaciones afectan solamente las cantidades de glucosa y rafinosa; mientras que la zona de cultivo no tiene un efecto importante en la concentración de los analitos. Muchos jugos comerciales de manzana tienen composición similar a los jugos naturales, excepto cuando ellos contienen cantidades cuantificables de etanol y furfural.

CANO et al (1994), desarrollaron un método para la determinación de ácidos no volátiles en frutas por medio de HPLC. Las muestras se extrajeron con metanol, luego se centrifugaron, el metanol fue eliminado por evaporación y reemplazado con agua desionizada. Las muestras se pasaron a través de sep-pak C18. La cromatografía se llevó a cabo usando una columna de intercambio iónico con una fase móvil H_2SO_4 0.00425 M, flujo de 0.4 ml/min y una $\lambda = 214$ nm. El método permitió la cuantificación de ácido oxálico, oxoglútamico y fumárico en varias frutas (kiwi, mango, papaya, piñas y bananos).

MONTANA et al (1994), llevaron a cabo un análisis de la composición de ácidos orgánicos en una serie de productos de piña (jugos y néctares) para detectar adulteraciones. Los

ácidos se determinaron por medio de la técnica de HPLC, utilizando una columna Acero Ion -300, con H_2SO_4 0.00425 M como fase móvil. Los ácidos evaluados fueron ácido oxálico, cítrico, L-málico, quínico y succínico. Se presentaron también resultados del pH y la acidez titulable. Los resultados muestran que una relación ácido cítrico/L-málico = 2, indica la autenticidad de los productos de piña.

LEE (1993), utilizó un método de HPLC, para evaluar ácidos orgánicos en jugos de naranja. Se identificaron 10 ácidos carboxílicos en jugos de naranja Valencia, con elución isocrática a 20 °C, con KH_2PO_4 20 mM (pH = 2,8) como fase móvil y un flujo de 0.7 ml/min.; usando un detector U.V. a 214 nm. Las muestras fueron purificadas usando cartuchos SCX.

MCFEETERS (1993), desarrolló una técnica para analizar 11 compuestos presentes en pepinos frescos o fermentados, sobre una columna de intercambio iónico y con soporte polimérico de estireno-divinilbenzeno sulfonatado. Se trabajó con elución isocrática ácido heptafluorobutírico 16 mM, empleando detectores de conductividad para el análisis de ácidos y un detector amperométrico para el análisis de azúcares y alcoholes. La identificación de los compuestos se realizó por medio de estándares externos e internos y la cuantificación se hizo basándose en las alturas y las áreas de los picos. Como resultado de la separación y elución se identificaron los siguientes compuestos: glucosa, fructosa, glicerol, etanol, 1-propanol, ácido málico, succínico, láctico, acético, propiónico y butírico.

WANG et al (1993), cuantificaron los cambios en ácidos orgánicos durante la maduración de duraznos (*Prunus persica L. Bastsch*) en diferentes variedades (*Babygold 5, Babygold 7 y Freestone*). En la madurez total las variedades *Babygold 5, Babygold 7*, presentaron contenidos de aproximadamente 60% de ácido málico, 20% ácido cítrico y 19% de ácido quínico; mientras que en la otra variedad los contenidos de los tres ácidos fueron 37, 35 y 28 % respectivamente. Algunas variedades durante la maduración de la fruta muestran incremento en el contenido de ácido málico y disminución de los ácidos cítrico y quínico, mientras que en otras variedades se presentan pocos cambios.

DAOOD et al (1992), separaron y determinaron carotenoides, azúcares y ácidos orgánicos en frutas de placaminero; usando HPLC, bajo condiciones isocráticas. Se encontró que estas frutas son una excelente fuente de vitamina A. La fruta contiene principalmente glucosa, fructosa y un oligosacárido no identificado. La sacarosa no se detectó en frutos verdes ni maduros. La HPLC de pares iónicos permitió la separación y cuantificación de ácido málico, isocítrico, cítrico, ascórbico, fumárico y gálico. El ácido málico fue el que predominó en estas frutas; cuando las frutas presentaron madurez total se observaron pérdidas considerables en las concentraciones de azúcares solubles y ácidos orgánicos.

OTLES et al (1992), por medio de la técnica de HPLC determinaron el contenido de azúcar en 8 variedades de manzana. Los azúcares predominantes fueron fructosa (4.77-6.84%), glucosa (1.33-2.84%), y sacarosa (0.74-2.68). El contenido total de azúcar entre las

variedades no presentó diferencias muy significativas, encontrándose en un rango de 11 a 8.56 %.

BLANCO et al (1992), estudiaron los cambios en la cantidad de los principales ácidos y azúcares en cinco variedades de manzana asturiana, durante su etapa final de maduración, por medio de HPLC. Los cambios en polifenoles, azúcares y almidones en estas variedades fueron estudiados en el mismo periodo. Se notaron diferencias en las cantidades de los principales azúcares (glucosa, fructosa y sacarosa) y en el sorbitol, en las cinco variedades estudiadas: La fructosa se acumula en las frutas durante la etapa final de la maduración, mientras que las concentraciones de ácido málico y almidón disminuyen.

ACKERMANN et al (1992), analizaron por medio de HPLC los cambios en azúcares, principales ácidos y aminoácidos en manzanas durante la maduración de los frutos y un posterior almacenamiento a 4 °C. La fructosa fue el principal azúcar encontrado. La glucosa, sacarosa y fructosa se incrementan en diferentes niveles durante la maduración, luego los niveles permanecen constantes hasta que se inicia su descenso. Los principales ácidos encontrados fueron el cítrico y el málico. Todos los cambios producidos en la fruta son relacionados con la actividad metabólica durante el crecimiento y maduración de la fruta.

NISPEROS et al (1992), utilizaron la técnica de HPLC para hacer una detección simultánea de ácido dehidroascórbico, ascórbico y otros ácidos orgánicos en frutas y vegetales. Utilizaron cromatografía en fase reversa con un detector UV con arreglo de diodos. Se realizó la separación de varios ácidos no volátiles en diferentes frutas y vegetales, encontrando como principales componentes los ácidos cítrico, málico, y ascórbico; se observó la descomposición del ácido ascórbico durante el almacenamiento de las frutas.

SEAGER et al (1992), llevaron a cabo la determinación de los azúcares totales solubles y almidón en frutos de kiwi (*Actinia deliciosa*, Variedad *deliciosa*). Para realizar esta investigación utilizaron la técnica de HPLC, por medio de la cual se evaluó la recuperación de azúcares en el extracto. Las muestras fueron inyectadas sobre una columna HPX-87C Bio-Rad y eluidas con agua a 85°C, durante 90 minutos. Los componentes se detectaron por índice de refracción. En el análisis de los extractos se identificaron como principales azúcares fructosa 48%, glucosa 39% y sacarosa 13%, no se encontraron oligosacáridos, ni disacáridos. Este procedimiento puede ser aplicado en varios aspectos de investigación sobre los frutos de kiwi, concernientes a la relación entre la composición de carbohidratos y el desarrollo de la fruta.

BOUZAS et al (1991), determinaron de manera simultánea el contenido de ácidos orgánicos y azúcares en queso Cheddar por HPLC. La metodología incluyó la utilización de una columna Aminex HPX-87 H y los detectores de índice de refracción y UV. La fase

móvil utilizada fue ácido sulfúrico 0.009 N. Los azúcares y los ácidos se identificaron por los tiempos de retención. Este método de HPLC proporciona una forma simple de monitorear los cambios de estos compuestos durante la maduración del queso.

HUNTER et al (1991), llevaron a cabo diferentes procesos de extracción para la determinación de azúcares y ácidos orgánicos en uvas, y compararon su efectividad. En los diferentes procedimientos se obtuvo una alta tasa de recuperación de azúcares y ácidos. Los procedimientos consistían en extracción por liofilización de los extractos, con agua desionizada, durante 60 min. a temperatura ambiente. El análisis de ácidos y azúcares realizado por HPLC arrojó los siguientes resultados:

- Glucosa 105.1 %
- Fructosa 106.08 %
- Ac. Tartárico 99.33 %
- Ac. Málico 99%

Para prevenir la descomposición de las uvas y la interconversión entre compuestos, las muestras fueron liofilizadas y analizadas tan pronto como fue posible.

DOYON et al (1991), utilizaron la técnica de HPLC para la separación y cuantificación de más de 50 ácidos orgánicos, azúcares y alcoholes, encontrados comúnmente en productos comestibles. Este trabajo se realizó utilizando una columna polimérica de intercambio de cationes y los detectores U.V.-Visible y el I.R.. Para lograr una óptima separación y cuantificación de los ácidos láctico y succínico se usó una fase móvil de H_2SO_4 0.008 N a

55°C. Para compuestos tales como ácidos tricarbónicos, azúcares simples y alcoholes, presentes en las frutas frescas y en jugos, la mejor separación y cuantificación se obtuvo empleando H_2SO_4 0.0065 N a 25 °C. Con esta técnica se analizaron cerca de 53 compuestos de manera rápida y versátil.

ROMERO et al (1990), determinaron y cuantificaron ácidos orgánicos en frutas, emplearon una técnica de HPLC, la cual comprendía la maceración de las frutas, filtración del extracto y análisis del filtrado. Utilizando una precolumna Newguard RP18 y una columna Spherisorb ODS 2, como fase móvil se empleó agua acidificada a pH 2,2 y un detector U.V.-Visible, operado a 214 nm. Esta metodología se aplicó a frutos de babaco (*Carica pentagonia*) y Kiwi (*Actinidia chinensis*). Los ácidos predominantes fueron quínico, málico, cítrico. (Romero, 1990, 299).

LOPEZ et al (1989), utilizaron un método de HPLC en fase reversa, para la separación y determinación de ácidos no volátiles en jugos de frutas (9 muestras), 7 néctares y 2 bebidas frías. Para la separación se utilizó una columna Spheri SRP18. La fase móvil fue agua grado 1 ajustada a un pH de 2.2, con un flujo de 0.4 ml/min. Los principales ácidos orgánicos fueron determinados a 214 nm, el ácido ascórbico y el sórbico a 254 nm, y el ácido benzoico a 230 nm. Se analizaron jugos manzana, naranja, piña, pera y uva. Los ácidos cítrico y málico se encontraron en todas las muestras.

BUSHWAY et al (1984), aplicaron la técnica de HPLC en la determinación de ácidos orgánicos en papas, se utilizó columna de exclusión iónica HPX-87; como fase móvil H_2SO_4 0.018 N; volumen de flujo 0.7 mL/min y detector U.V. Los principales ácidos encontrados fueron el ácido oxálico, cítrico, málico, succínico, fumarico y piroglutámico.

WROLSTAD et al (1980), investigaron la composición de azúcares y ácidos no volátiles en mora con el propósito de adquirir datos básicos que puedan ser usados para establecer la autenticidad de productos de mora. Los azúcares y los ácidos fueron aislados por técnicas de intercambio iónico. Se analizaron 15 muestras, considerando la madurez, la variedad y los efectos del proceso en su selección. La glucosa y fructosa fueron los únicos azúcares detectados. La relación glucosa/fructosa para todas las muestras fue de 0.71; se identificaron ácidos fosfórico, málico, lactoisocítrico, cítrico, isocítrico y quínico, los cuales mostraron considerables variaciones; el ácido lactoisocítrico estuvo ausente en 6 de las muestras. La madurez tuvo considerable efecto sobre la composición, mientras el procesamiento en concentrados produjo cambios mínimos.

SISTRUNK y CASH (1973), analizaron por HPLC los ácidos no volátiles en 4 variedades de fresa en diferentes estados de maduración, concluyeron que el ácido predominante en ellas fue el ácido cítrico y en menor concentración el málico; además de ácido L-aspartico, ácido L-glutámico, ácido quínico, ácido succínico, y ácido fosfórico. Estos ácidos no volátiles en estas variedades no varían cualitativamente, pero encontraron diferencias cuantitativas entre la variedad y la madurez de las fresas.

5. METODOLOGIA

5.1. MATERIA PRIMA

Los materiales de mora fueron cultivados en la granja "los Cerezos", del SENA Agropecuario en la Enea Manizales, a una altitud de 2150 m.s.n.m., con una humedad relativa del 85%, y una temperatura promedio de 17 °C. El terreno tiene una pendiente entre el 30-40%. El cultivo consta de 40 materiales diferentes los cuales están distribuidos en surcos (1 surco por cada material) los surcos distan entre sí 2.5 m; cada surco esta compuesto de 10 plantas, la distancia entre plantas es de 2.0 m.

Los materiales de mora analizados en esta investigación se denominan: CEREZOS, SARA II Y VILLA MARÍA. Las plantas se marcaron al inicio de la floración, se cosecharon frutos para los análisis a los 45, 50, 55 y 60 días luego de anthesis (ver figuras 1,2,3,4). Las muestras de cada material estaban compuestas por 5 o 6 frutos de mora y fueron recolectadas por triplicado, la recolección se hizo completamente al azar. Se realizaron dos marcaciones (marcación 1 y marcación 2) al cultivo experimental.

El análisis de la población se realiza mediante un diseño estadístico de bloque al azar, con el cual se minimiza el error experimental dentro de cada bloque. El error puede deberse a la intensidad solar, pluviosidad, etc. El análisis de varianza se realizó mediante el S.A.S. (Stadist Analist System) y las diferencias entre los tratamientos se establecieron con las pruebas múltiples de Duncan.



Figura 1.



Figura 2.

MUESTRAS DE MORA 60
DÍAS DESPUES DE ANTESIS



Figura 3.

MUESTRAS DE MORA 55
DÍAS DESPUES DE ANTESIS



Figura 4.

5.2. ANALISIS FISICOQUIMICOS

5.2.1. Determinación del contenido de sólidos solubles: Se determinaron por el método refractométrico y se expresó como % de sólidos solubles o grados Brix.

5.2.2. Determinación del pH: Método potenciométrico.

5.2.3. Determinación de acidez titulable: Se realizó mediante el método de titulación potenciométrica. Se expresa como % de ácido málico:

$$\% \text{ de ácido málico} = (V_1 * N_1 / V_2) * K * 100$$

Donde:

V_1 = Volumen de NaOH consumido (mL)

V_2 = Volumen de la muestra (2 mL)

K = peso equivalente del ácido málico (0.067 g/meq)

N = Normalidad del NaOH. (0.1 meq / mL).

5.2.4. Determinación del índice de madurez (I.M.): Se calculó mediante la fórmula:

$$\text{I.M.} = \% \text{ sólidos solubles} / \% \text{ de ácido málico}$$

5.2.5. Determinación de azúcares reductores y totales por el método de Fehling: La determinación de azúcares no reductores, se hizo mediante la diferencia entre los azúcares totales y azúcares reductores, utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Título Fehling} = V \text{ (ml glucosa)} / 10 \text{ ml Fehling} * 5 \text{ mg ml glucosa}$$

5.3. ANALISIS DE ÁCIDOS Y AZUCARES POR HPLC

5.3.1. Preparación de la muestra:

- Extracción manual del jugo de la fruta
- Tamizado
- Centrifugación a 4000 rpm, durante 10 minutos a 0°C
- Obtención del sobrenadante (jugo)
- Dilución del jugo 1:5 con agua grado 1
- Filtración del extracto con filtro sep-pack C18
- Filtración por membrana 0.45µm
- Envasado en vial de 2 ml
- Inyección de la muestra en el HPLC.

5.3.2. Condiciones de inyección: las variables estandarizadas en el HPLC durante el análisis de las muestras y de los estándares fueron:

Fase móvil: H₂SO₄ 0.005M

Flujo: 0.6 ml/min

Presión: 950-1050 psi

Velocidad de inyección: 200 µL/min

Volumen de inyección: 20µL

Columna: Aminex HP-87X

Temperatura: 45 °C

Detectores: INDICE DE REFRACCION y U.V-VISIBLE longitud de onda variable.

$\lambda = 210 \text{ nm}$

Tiempo de análisis: 15 min/muestra.

5.4. EQUIPOS Y MATERIALES

- Cromatógrafo Líquido de alta resolución (HPLC), marca Hewlett Packard serie 1050, manejado bajo el software "Asterix Hewlett Packard" (1988). Consta de los siguientes módulos:

Bomba cuaternaria Ref. 79852A

Desgasificador al vacío en línea

Automuestreador Ref. 79855A

Detector VWD Ref. 79853A

Horno para columnas Ref.3216G-05954

Detector de índice de refracción Ref.1047-A

- Columna de exclusión iónica marca BIO-RAD AMINEX HPX-87H.

Dimensiones: 300 mm de largo * 7.8 mm de diámetro

Soporte: Copolímero Divinil Benceno estireno sulfonado

Tamaño de partícula: 9 μm

Presión máxima: 1500 psi

Temperatura máxima: 65 °C

Flujo máximo a temperatura máxima: 1ml/min

Fase móvil típica: H₂SO₄ 0.005N

Rango de pH: 1-3

Guarda columna Ref.125-0129

- Microbalanza electrónica, doble rango marca Precisa modelo 40sm - 200^a
- Agitador magnético con plato de calentamiento marca IKA, modelo IKAMAG, RCT.
- Centrífuga de mesa programable refrigerada marca Internacional Equipment Company, modelo Centra MP4R, Máxima vel. 14000 rpm, rango de temperatura: -5 a 40 °C.
- Sistema MILLI-RO MILLI-Q para obtención de, agua tipo I (resistividad 18 megaohmnios.cm y un nivel máximo de carga orgánica total de 10 ppb). Posee un filtro millipack con membrana durapore de 0.22 µm de poro. Marca Milli Pore
- Equipo de microfiltración (jeringas, cartuchos sep-pack C18 y membranas filtrantes, tamaño de poro 0.45µm y 13 mm de diámetro) marca Waters.
- Potenciómetro marca Metrohm ref.704. Electrodo de platino ref. 6.0238.000.
- Refractómetro manual.
- Micropipeta de 100-1000 µL, marca Brand.



Figura 5. Cromatógrafo líquido de alta eficiencia

5.5. REACTIVOS

- Estándares de ácidos orgánicos marca Supelco ref.4-7264.

Acido cítrico ref. R-474175

Acido málico ref. R-474180

Acido ascórbico ref. R-600408

Acido succínico ref. R-475160

- Estándares de azúcares (Glucosa, Fructosa) marca Sigma

D(+) Glucose (Dextrose; corn sugar). G 7528 RT, SIGMA Ultra Anhydrous >99.5%
HPLC.

D(-) Fructose (D-Levulose; fruit sugar). F 2543 RT, SIGMA Ultra.

- Acido sulfúrico 96% marca Carlo Erba Reagente, Código # 410301.
- Alcohol etílico absoluto anhidro J:T BAKER Reactivo, ACS. 9000-05.
- Sodio Hidróxido anhidro en lentejas marca Carlo Erba RPE-ACS, Código # 480507
- Agua grado HPLC. Ultra Pure Water System marca MILLIPORE, Milli-Q plus.
- Solución sobresaturada de acetato de plomo.
- Solución de oxalato de sodio.
- Acido cítrico, marca Carlo Erba Reagente puro, código #403727.
- Fehling A (Tartrato de sodio y potasio)
- Fehling B (Sulfato de cobre)
- Solución de azul de metileno al 1%.

6. RESULTADOS Y ANALISIS

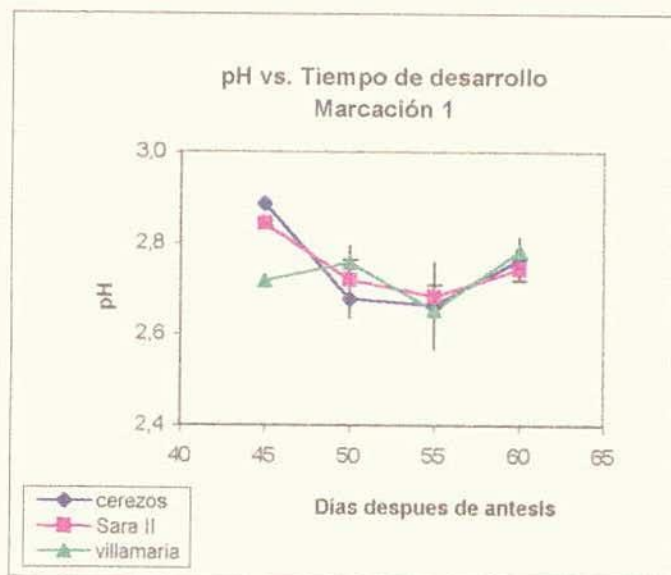
Los resultados de los materiales analizados fueron obtenidos de dos marcaciones realizadas al cultivo experimental el 2 de marzo y el 5 de abril de 1999.

6.1. ANALISIS FISICOQUÍMICO

6.1.1. pH: El análisis estadístico aplicado a los datos obtenidos en las determinaciones del pH, muestran un coeficiente de variación entre 1.45% y 1.47%, además que no existen diferencias significativas entre los tres materiales; pero sí en cuanto a las épocas de desarrollo, en las dos marcaciones. Estas variaciones eran esperadas ya que a medida que aumenta el tiempo de desarrollo, disminuye la concentración de algunos ácidos generándose un aumento en el pH. (Gráfica 1 y 2). En las dos marcaciones los materiales CEREZOS y SARA II, presentan un comportamiento muy similar, ya que muestran un mínimo a los 50 días después de antesis (ver gráfica 1), donde aparentemente la concentración de ácidos se incrementa notablemente, causando descenso del pH y luego viene la etapa de degradación de los ácidos, provocando un aumento en el pH hasta el día 60 que corresponde al estado de madurez máximo analizado. El material VILLAMARIA en contraste,

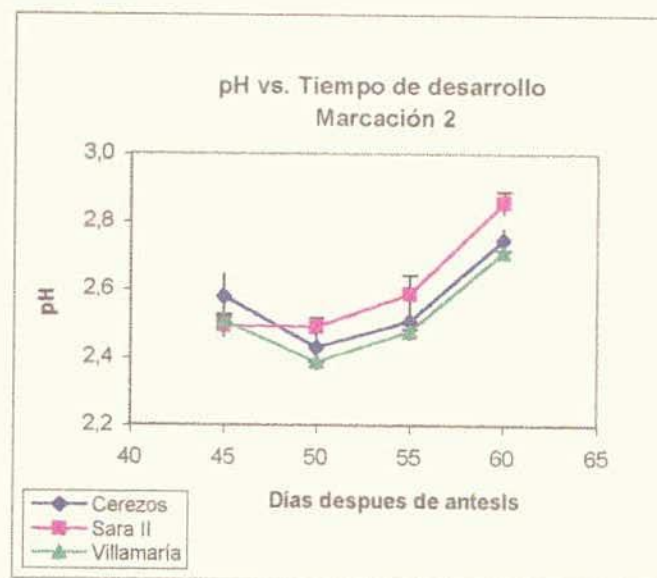
presenta comportamiento poco homogéneo en la primera marcación debido a la falta de uniformidad del material estudiado.

GRAFICA 1. Materiales de mora
pH



| pH vs. Tiempo de desarrollo. | | | | | | |
|------------------------------|---------|----------|---------|----------|-------------|----------|
| Marcación 1 | | | | | | |
| Días | Cerezos | σ | Sara II | σ | Villa María | σ |
| 45 | 2,89 | 0,01 | 2,84 | 0,01 | 2,72 | 0,01 |
| 50 | 2,68 | 0,04 | 2,72 | 0,04 | 2,76 | 0,04 |
| 55 | 2,66 | 0,09 | 2,68 | 0,03 | 2,65 | 0,05 |
| 60 | 2,76 | 0,03 | 2,74 | 0,03 | 2,78 | 0,03 |

GRAFICA 2. Materiales de mora
pH



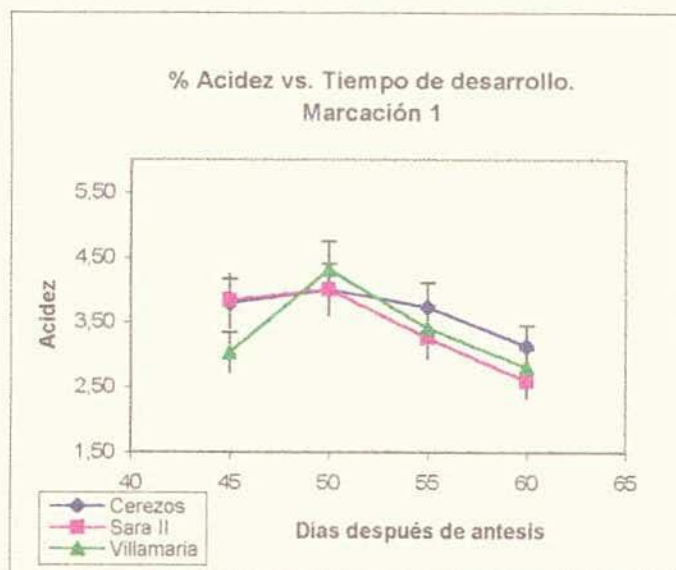
| pH vs. Tiempo de desarrollo | | | | | | |
|-----------------------------|---------|----------|---------|----------|------------|----------|
| Marcación 2 | | | | | | |
| Días | Cerezos | σ | Sara II | σ | Villamaria | σ |
| 45 | 2,58 | 0,06 | 2,49 | 0,03 | 2,51 | 0,015 |
| 50 | 2,43 | 0,04 | 2,49 | 0,03 | 2,39 | 0,023 |
| 55 | 2,51 | 0,03 | 2,59 | 0,06 | 2,48 | 0,021 |
| 60 | 2,75 | 0,03 | 2,86 | 0,03 | 2,71 | 0,017 |

6.1.2. Acidez titulable: Existe una diferencia altamente significativa entre las épocas (días) para los 3 materiales en cuanto a la acidez titulable. Este resultado es de esperarse ya que a mayor tiempo de desarrollo se presenta una menor acidez por el metabolismo de los ácidos orgánicos a azúcares, generalmente.

En las dos marcaciones se presenta un máximo de acidez a los 50 días. Los materiales entre sí no presentan diferencias significativas en el comportamiento de los ácidos orgánicos a través del tiempo, en las 2 marcaciones (gráficas 3 y 4).

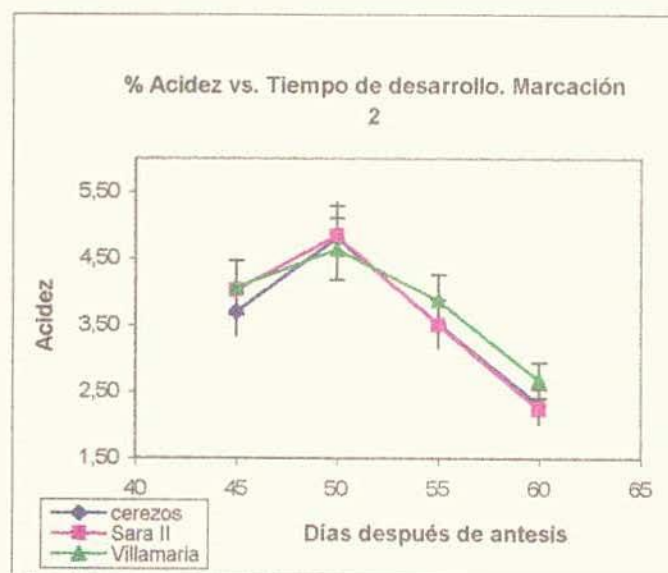
6.1.3. °Brix: Para esta variable existe diferencia altamente significativa entre las épocas de recolección y los 3 materiales según el análisis estadístico de Duncan. El comportamiento de los °Brix en la marcación 1 es muy irregular (gráfica 5), cada uno de los materiales exhibe un máximo en diferentes épocas (días). En la marcación 1 los materiales CEREZOS y SARA II presentaron el mínimo (3.93 °Brix) a los 60 días, mientras que el material VILLAMARIA lo presentó a los 55 días (4.67 °Brix). Esto puede ser debido a la diferencia de madurez que presentaban los 3 materiales al ser recolectados ya que cada material presenta un ciclo de desarrollo diferente. En la marcación 2 el comportamiento para los 3 materiales es muy similar obteniéndose su máxima concentración de °Brix a los 60 días (gráfica 6), etapa en la cual la mora presentó una alta madurez; en esta marcación se presenta una diferencia significativa entre las épocas de recolección típica de su madurez.

GRAFICA 3. Materiales de mora
% acidez



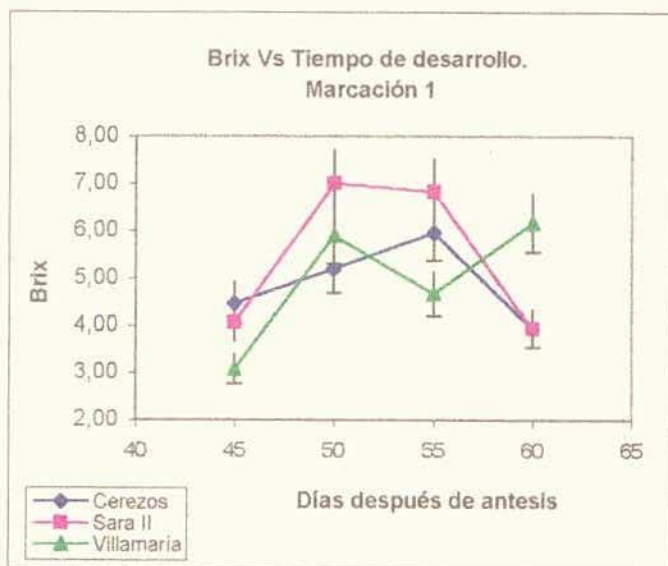
| Acidez vs. Tiempo de desarrollo | | | | | | |
|---------------------------------|---------|----------|---------|----------|-------------|----------|
| Marcación 1 | | | | | | |
| Días | Cerezos | σ | Sara II | σ | Villa María | σ |
| 45 | 3,79 | 0,08 | 3,84 | 0,27 | 3,03 | 0,06 |
| 50 | 4,00 | 0,40 | 4,01 | 0,57 | 4,31 | 0,09 |
| 55 | 3,73 | 0,65 | 3,26 | 0,20 | 3,41 | 0,63 |
| 60 | 3,13 | 0,06 | 2,59 | 0,07 | 2,80 | 0,26 |

GRAFICA 4. Materiales de mora
% acidez



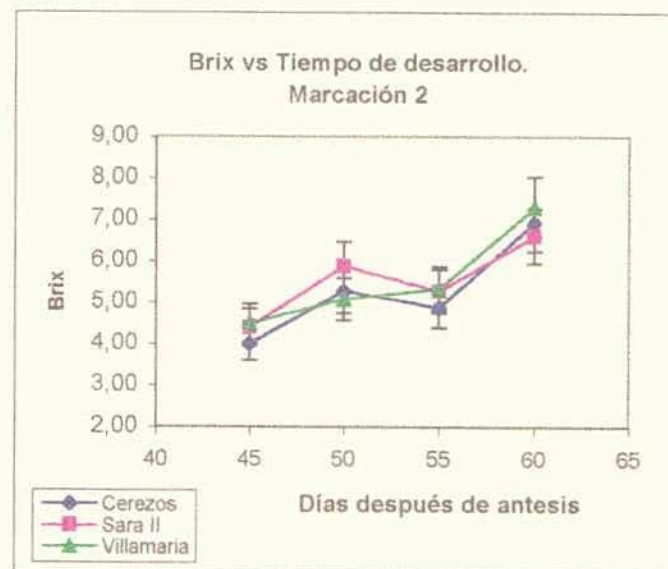
| Acidez vs. Tiempo de desarrollo | | | | | | |
|---------------------------------|---------|----------|---------|----------|------------|----------|
| Marcación 2 | | | | | | |
| Días | Cerezos | σ | sara II | σ | Villamaria | σ |
| 45 | 3,70 | 0,00 | 4,02 | 0,00 | 4,06 | 0,34 |
| 50 | 4,81 | 0,10 | 4,85 | 0,05 | 4,64 | 0,24 |
| 55 | 3,53 | 0,15 | 3,51 | 0,06 | 3,87 | 0,24 |
| 60 | 2,31 | 0,21 | 2,24 | 0,51 | 2,67 | 0,02 |

GRAFICA 5. Materiales de mora
Grados Brix



| Brix vs. Tiempo de desarrollo | | | | | | |
|-------------------------------|---------|----------|---------|----------|-------------|----------|
| Marcacion 1 | | | | | | |
| Días | Cerezos | σ | Sara II | σ | Villa maria | σ |
| 45 | 4,47 | 0,12 | 4,07 | 0,12 | 3,07 | 0,06 |
| 50 | 5,20 | 0,10 | 7,00 | 0,10 | 5,90 | 0,10 |
| 55 | 5,97 | 0,12 | 6,83 | 0,15 | 4,67 | 0,58 |
| 60 | 3,93 | 0,12 | 3,93 | 0,12 | 6,17 | 0,29 |

GRAFICA 6. Materiales de mora
Grados Brix

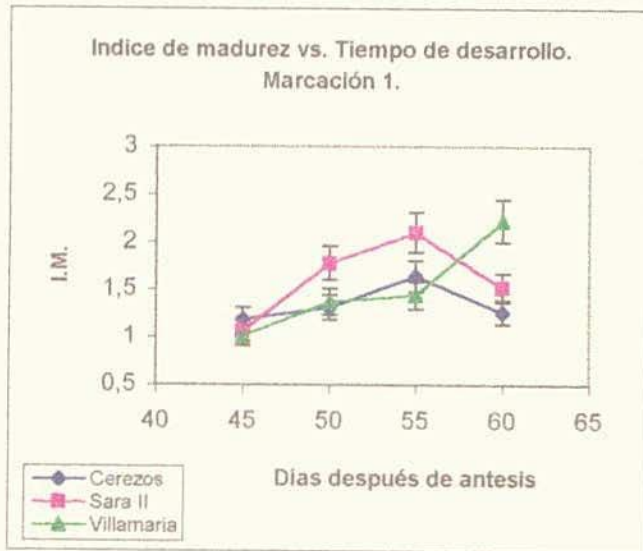


| Brix vs. Tiempo de desarrollo | | | | | | |
|-------------------------------|---------|----------|---------|----------|------------|----------|
| Marcacion 2 | | | | | | |
| Días | Cerezos | σ | Sara II | σ | Villamaria | σ |
| 45 | 4,00 | 0,00 | 4,40 | 0,17 | 4,50 | 0,50 |
| 50 | 5,27 | 0,46 | 5,87 | 0,12 | 5,07 | 0,12 |
| 55 | 4,87 | 0,71 | 5,27 | 0,25 | 5,33 | 0,12 |
| 60 | 6,93 | 0,12 | 6,60 | 0,17 | 7,30 | 0,17 |

6.1.4. Índice de madurez: Al comparar los 3 materiales analizados, el material VILLAMARÍA presenta un comportamiento proporcional de su madurez con relación a su tiempo de desarrollo. Se aprecia una curva normal de ascenso en el índice de madurez (gráficas 7 y 8). Los materiales CEREZOS y SARA II muestran un pico máximo en el índice de madurez a los 55 días después de antesis, donde se presenta el mayor % de °Brix y una disminución de la acidez. En la marcación 2 el material SARA II presenta una mayor relación °Brix/acidez, esta puede ser causada por la baja acidez de la muestra. Los materiales CEREZOS y VILLAMARIA exhiben una buena relación de madurez, lo que indica que se tiene un equilibrio en el desarrollo de los azúcares y los ácidos durante el proceso de maduración de estos dos materiales.

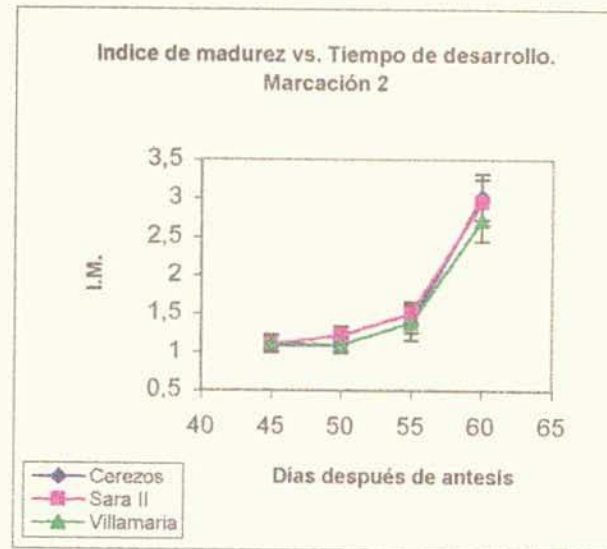
Comparando los resultados de las dos marcaciones en cuanto al índice de madurez, se aprecia que hasta los 55 días los tres materiales analizados en la marcación 1, evolucionan más rápidamente (gráfica 7 y 8); sin embargo a los 60 días los tres materiales de la marcación 2, alcanzaron índices de madurez por lo menos dos veces mayores respecto del día 55, con relación a los mismos materiales analizados en la marcación 1. Este resultado puede ser debido a que los frutos de la marcación 1 maduraron (45-60 días luego de antesis) en condiciones climatológicas más intensas (temperatura ambiente mayor, menor precipitación pluvial); a diferencia de los frutos de la marcación 2 donde las condiciones climatológicas en las mismas épocas de desarrollo fueron menos severas, lo que pudo generar un aceleramiento de la

GRAFICO 7. Materiales de mora
Indice de madurez en cuatro etapas de desarrollo



| I. madurez vs. Tiempo de desarrollo marcacion 1. | | | | | | |
|---|---------|----------|---------|----------|------------|----------|
| Días | cerezos | σ | sara II | σ | villamaria | σ |
| 45 | 1.19 | 0,03 | 1.06 | 0,04 | 1.01 | 0,01 |
| 50 | 1.31 | 0,11 | 1.78 | 0,30 | 1.37 | 0,00 |
| 55 | 1.64 | 0,33 | 2.1 | 0,12 | 1.44 | 0,32 |
| 60 | 1.26 | 0,06 | 1.52 | 0,07 | 2.22 | 0,28 |

GRAFICO 8. Materiales de mora
Indice de madurez en cuatro etapas de desarrollo



| I. madurez vs. Tiempo de desarrollo marcacion 2. | | | | | | |
|---|---------|----------|---------|----------|------------|----------|
| Días | Cerezos | σ | Sara II | σ | Villamaria | σ |
| 45 | 1.08 | 0,00 | 1.1 | 0,30 | 1.11 | 0,09 |
| 50 | 1.09 | 0,08 | 1.21 | 0,03 | 1.09 | 0,04 |
| 55 | 1.38 | 0,24 | 1.5 | 0,05 | 1.38 | 0,08 |
| 60 | 3.02 | 0,30 | 2.95 | 0,05 | 2.71 | 0,09 |

1.
maduración sin alcanzar el índice de madurez adecuado, en el caso de la marcación

6.1.5. Azúcares no reductores: El porcentaje de azúcares reductores obtenido mediante la prueba de Fehling fue de 0.825%.

Azúcares totales - Azúcares reductores =Azúcares no reductores.

(10.825%) - (10.0%) = 0.825 % de azúcares no reductores.

6.2. TRATAMIENTO DE LA MUESTRA:

La metodología utilizada, permitió la obtención de la muestra para análisis de manera rápida y sencilla, generándose así un buen rendimiento en cuanto al tiempo de análisis. La utilización del Sep-pack en el acondicionamiento de la muestra fue de gran ayuda para el análisis instrumental, porque permitió la eliminación completa del color en el extracto de mora, evitándose de esta manera saturaciones y daños en la columna.

6.3. CURVA DE CALIBRACIÓN:

En el ANEXO 1, se muestran las curvas de calibración utilizadas para cuantificar cada uno de los analitos presentes en los materiales de mora (*Rubus glaucus Bent.*) por HPLC. En las gráficas se puede apreciar el rango de linealidad de éstas gráficas y sus excelentes coeficientes de correlación, para todos los compuestos estudiados. La solución utilizada en la elaboración de la curva de calibración estaba compuesta por ácido cítrico, málico, succínico, ascórbico, glucosa y fructosa.

6.4. ANÁLISIS DE AZÚCARES Y ÁCIDOS ORGÁNICOS POR HPLC.

Los resultados de la separación cromatográfica de las muestras y de las soluciones estándar son presentados en el ANEXO 2. Se observó una óptima retención de los ácidos cítrico, málico, ascórbico y succínico y de los azúcares glucosa y fructosa, utilizando la columna HPX 87H en fase inversa. La identificación de los analitos presentes en la mora se realizó mediante la utilización de estándares externos, comparando tiempos de retención y aumento en las áreas de los picos.

6.4.1. Glucosa ($t_R = 8.92$ min.): Se presenta diferencia altamente significativa entre las épocas de desarrollo respecto de la concentración de glucosa (gráficas 9 y 10). La marcación 1 presentó para los tres materiales un comportamiento similar: un ascenso constante en su concentración de glucosa hasta los 55 días, y luego al finalizar su desarrollo un leve descenso para los materiales SARA II y VILLAMARIA, el material CEREZOS continuó incrementando su concentración de glucosa (gráfica 9). Para la segunda marcación (gráfica 10), se presentó un aumento constante en la concentración de glucosa, hasta su etapa final de maduración.

6.4.2. Fructosa ($t_R = 9.70$ min.): En las dos marcaciones, la composición de fructosa en los tres materiales muestra diferencias altamente significativas entre las épocas de maduración. Los materiales de la marcación 1, exhiben su máximo en la

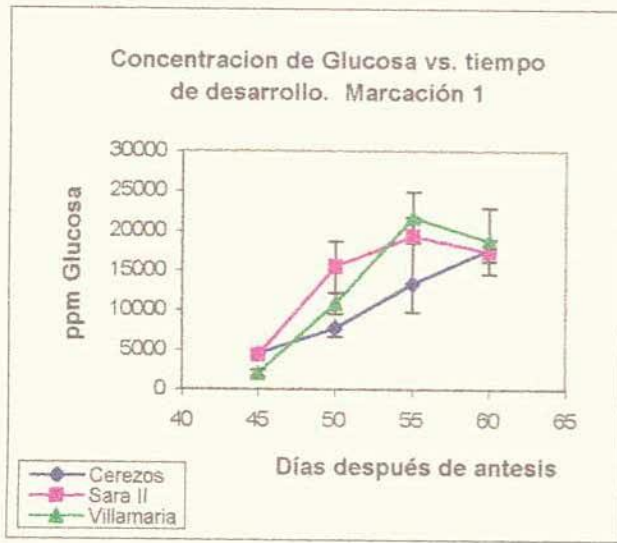
composición de fructosa, a los 55 días después de antesis, gráfica 11, puesto que son muestras mucho más maduras que las de la marcación 2, por lo tanto presentan un desarrollo bioquímico más rápido. En la marcación 2, se visualiza, según la gráfica 12, un comportamiento ascendente en la concentración de fructosa; el máximo se encontró a los 60 días, ya que su proceso de maduración fue más lento debido a factores climáticos.

Los resultados obtenidos en el comportamiento de los azúcares, durante los análisis realizados en las cuatro diferentes épocas de desarrollo a los materiales de mora eran esperados, teniendo en cuenta el proceso bioquímico de maduración de frutos, mediante el cual carbohidratos y ácidos se interconvierten en azúcares, que son entre otros los responsables del sabor, aroma y cambios en la textura.

6.4.3. Sacarosa ($t_R = 7.50$ min.): Durante la realización del análisis instrumental, en la identificación de azúcares no se encontró sacarosa en ninguno de los 3 materiales de mora, los cromatogramas no muestran picos en t_R de 7.5 minutos, correspondiente al t_R de la sacarosa. La ausencia de este azúcar no reductor, se comprobó mediante la prueba de Fehling (para azúcares totales y reductores); esto se debe posiblemente a que las pequeñas cantidades de sacarosa que posean los frutos, se vean involucradas en la generación del ácido málico; ya que es el principal precursor del malato en todas las frutas de bayas, (Seymour, 211,216). Además la sacarosa se hidroliza fácilmente mediante la acción de invertasa a glucosa y fructosa, durante el

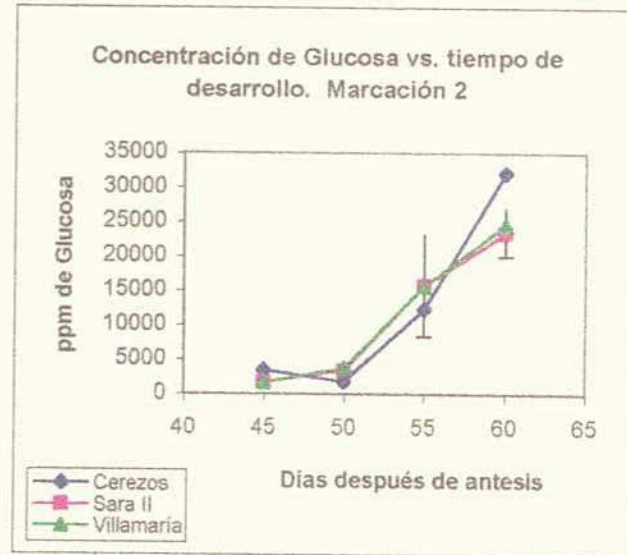
proceso de desarrollo de las frutas, (Robinson, 12). En investigaciones realizados a frutos de la especie rubus, tampoco se reporta la presencia de sacarosa (ver antecedentes, Wrolstad, 1980).

GRAFICA 9. Materiales de mora Glucosa



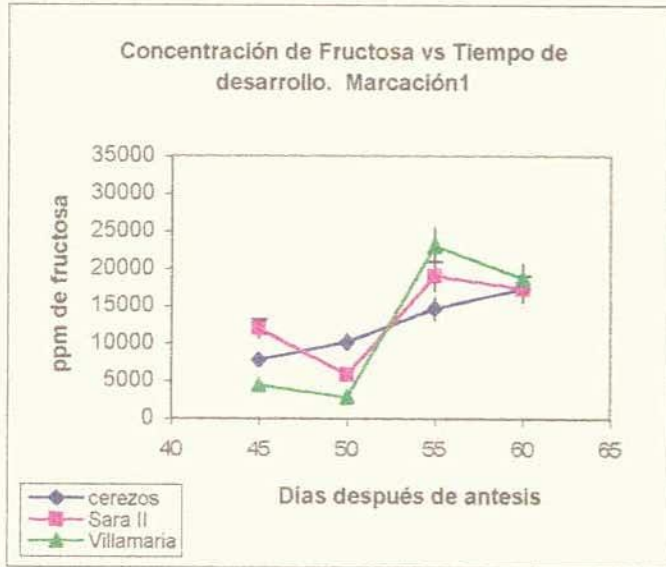
| Glucosa vs. Tiempo de desarrollo | | | | | | |
|----------------------------------|---------|----------|---------|----------|------------|----------|
| Marcación 1 | | | | | | |
| Días | Cerezos | σ | Sara II | σ | Villamaria | σ |
| 45 | 4527 | 68,49 | 4292 | 314,6 | 1976 | 412 |
| 50 | 7668 | 1070 | 15500 | 3122 | 10793 | 1323 |
| 55 | 13285 | 3580 | 19333 | 2309 | 21666 | 3215 |
| 60 | 17666 | 1528 | 17333 | 1528 | 18666 | 4163 |

GRAFICA 10. Materiales de mora Glucosa



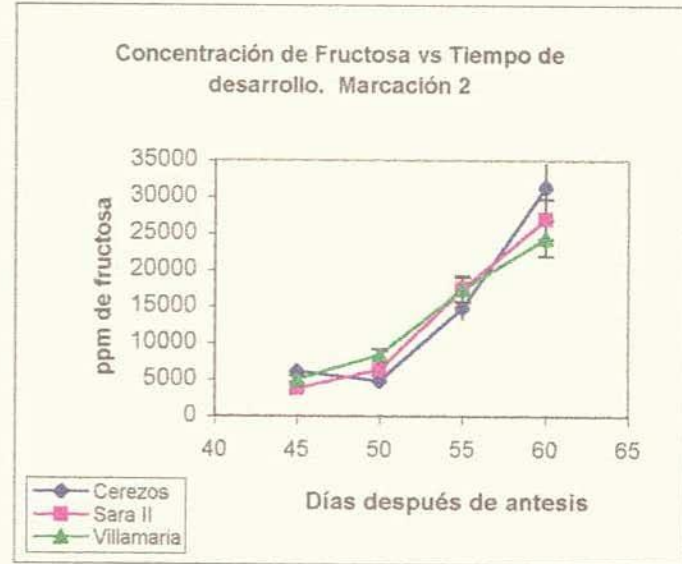
| Glucosa vs. Tiempo de desarrollo | | | | | | |
|----------------------------------|---------|----------|---------|----------|------------|----------|
| Marcación 2 | | | | | | |
| Días | cerezos | σ | Sara II | σ | Villamaria | σ |
| 45 | 3472 | 434,5 | 1692 | 47,5 | 1690 | 573,7 |
| 50 | 1741 | 525,1 | 3459 | 944 | 3692 | 321,5 |
| 55 | 12270 | 5042 | 15739 | 7448 | 15666 | 3215 |
| 60 | 32166 | 8070 | 23400 | 3418 | 24666 | 1155 |

GRAFICA 11. Materiales de mora Fructosa



| Fructosa Vs. Tiempo de desarrollo | | | | | | |
|-----------------------------------|---------|----------|---------|----------|------------|----------|
| marcación 1 | | | | | | |
| Días | Cerezos | σ | Sara II | σ | Villamaria | σ |
| 45 | 7796 | 711,8 | 12000 | 1732 | 4405 | 894,7 |
| 50 | 10164 | 1448 | 5903 | 2053 | 2842 | 862,9 |
| 55 | 14666 | 3055 | 19000 | 1732 | 23000 | 2646 |
| 60 | 17333 | 1155 | 17333 | 1528 | 18666 | 3215 |

GRAFICA 12. Materiales de mora Fructosa



| Fructosa vs. Tiempo de desarrollo | | | | | | |
|-----------------------------------|---------|----------|---------|----------|-------------|----------|
| marcación 2 | | | | | | |
| Días | cerezos | σ | Sara II | σ | Villa Maria | σ |
| 45 | 6093 | 792,5 | 3772 | 797,1 | 4982 | 1654 |
| 50 | 4790 | 1177 | 6388 | 1076 | 8360 | 313,2 |
| 55 | 14800 | 4668 | 17433 | 5335 | 17333 | 5508 |
| 60 | 31333 | 5686 | 27000 | 1000 | 24333 | 2517 |

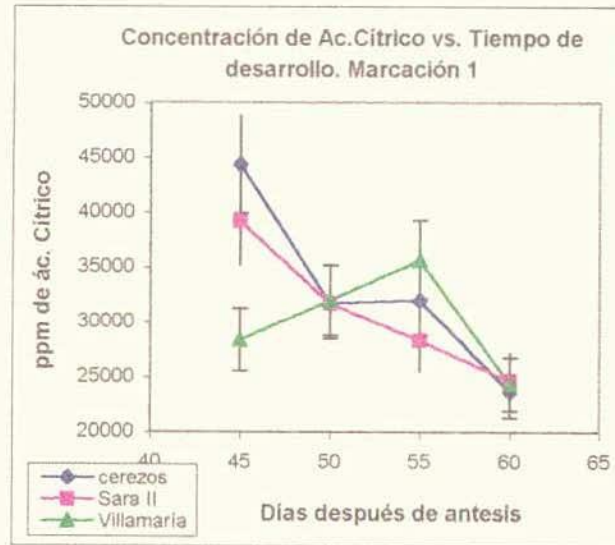
6.4.4. Ácido cítrico ($t_R = 7.82 \text{ min}$): En el análisis estadístico de todos los ácidos orgánicos presentes en los materiales de mora: ácido cítrico, málico, ascórbico, y succínico (gráfica 13 a 20), se observan diferencias altamente significativas entre la concentración de los ácidos y las épocas de desarrollo.

Para el ácido cítrico en la marcación 1, los materiales CEREZOS y SARA II tienen un comportamiento descendente a través de toda su época de desarrollo, mostrando un mínimo marcado a los 60 días luego de antesis, producto de la degradación del ácido cítrico durante su proceso de maduración. El material VILLAMARÍA, presenta un comportamiento diferente, ya que muestra un aumento en la concentración de ácido cítrico hasta los 55 días y luego disminuye notablemente.

La marcación 2, enseña un comportamiento similar a la 1, a los 60 días luego de antesis, pero difiere a los 50 días, donde se produce un aumento de la cantidad de ácido cítrico, para los tres materiales. (Gráficas 13 y 14).

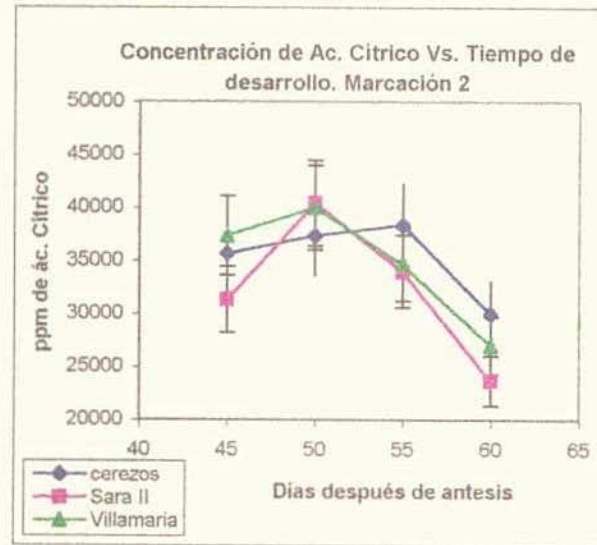
Este comportamiento se asemeja al reportado en la literatura, donde (Seymour, 9), se indica que la disminución de los ácidos orgánicos durante la maduración de las frutas, es debida a la utilización de los mismos como sustrato en la respiración. Además, en algunas frutas, después de haber logrado el máximo contenido de ácidos en los estados intermedios de la maduración, se inicia el proceso de degradación y utilización de éstos en otras actividades metabólicas.

GRAFICO 13. Materiales de mora
Acido cítrico en cuatro etapas de desarrollo



| Ac cítrico vs. Tiempo de desarrollo | | | | | | |
|-------------------------------------|---------|----------|---------|----------|------------|----------|
| Marcación 1 | | | | | | |
| Días | Cerezos | σ | Sara II | σ | Villamaria | σ |
| 45 | 44333 | 2081,7 | 39166 | 3175 | 28366 | 8038 |
| 50 | 31666 | 2309,4 | 31666 | 3055 | 32000 | 2646 |
| 55 | 32000 | 3605,6 | 28333 | 1155 | 35666 | 3512 |
| 60 | 23666 | 577,35 | 24666 | 577,4 | 24333 | 2887 |

GRAFICO 14. Materiales de mora
Acido cítrico en cuatro etapas de desarrollo



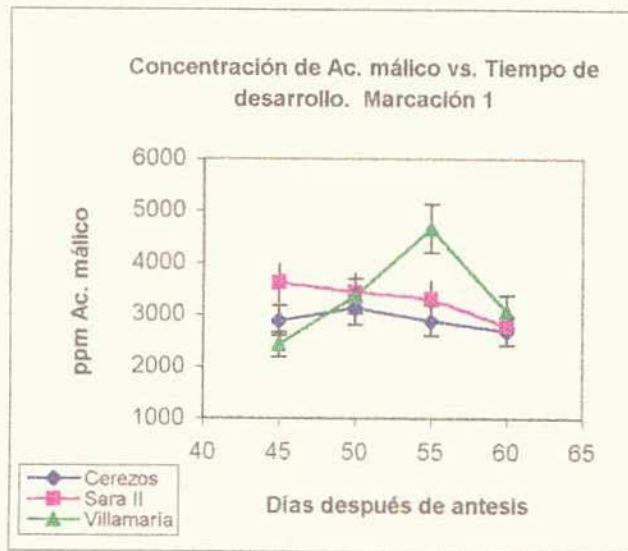
| Ac cítrico vs. Tiempo de desarrollo | | | | | | |
|-------------------------------------|---------|----------|---------|----------|------------|----------|
| Marcación 2 | | | | | | |
| Días | Cerezos | σ | Sara II | σ | Villamaria | σ |
| 45 | 35666 | 3512 | 31333 | 6110 | 37333 | 11504 |
| 50 | 37333 | 6028 | 40400 | 2506 | 40000 | 2646 |
| 55 | 38366 | 8075 | 34000 | 5568 | 34666 | 2887 |
| 60 | 30000 | 4583 | 23666 | 577,4 | 27000 | 2000 |

6.4.5. Acido málico ($t_R = 9.32$ min.): Respecto del ácido málico, además de las diferencias entre las épocas de desarrollo, también hay diferencias entre las variedades durante las marcaciones 1 y 2 (gráficas 15 y 16) entre los materiales CEREZOS y SARA II, con relación al material VILLAMARIA. Los dos primeros materiales disminuyen su concentración de ácido a medida que avanza su madurez, mientras que VILLAMARIA, aumenta hasta los 55 días, 4666 ppm de ácido y luego disminuye notablemente su concentración de ácido málico hasta 3000 ppm.

Según Seymour (207-354), la concentración de ácido influye directamente sobre los valores de la acidez, ya que la pérdida de la acidez total, se debe principalmente a la reducción en el contenido de ácido málico. En las frutas blandas como la fresa y la mora, el contenido de ácidos disminuye durante la maduración, causado por efectos externos principalmente la temperatura, condiciones de calor continuo producen un aceleramiento en la degradación de ácido málico.

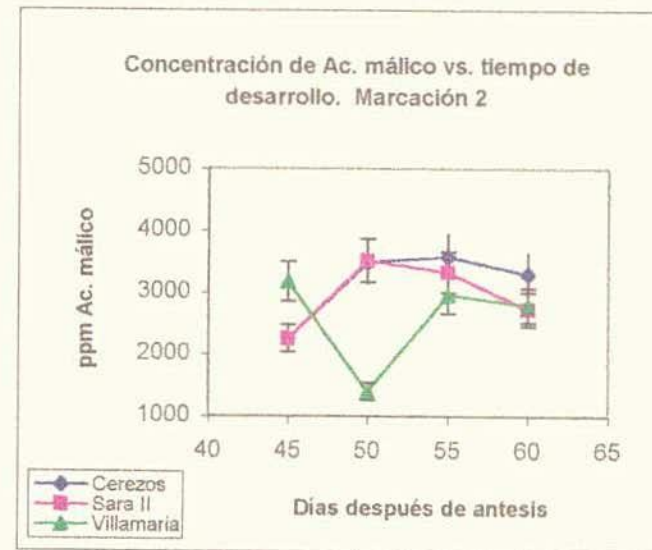
Esta apreciación se hace muy visible, en la comparación de las dos marcaciones; donde la marcación 1, presenta una disminución muy significativa de la concentración del ácido málico, al finalizar su desarrollo (60 días después de anthesis), marcación que fue recolectada durante épocas de mayor temperatura y menor precipitación; lo cual puede compararse con lo dicho por Azcon, quien dice que los ácidos cítrico y málico se interconvierten en frutos verdes y el metabolismo del ácido cítrico decrece durante la maduración, mientras que el ácido málico se oxida a CO_2 o se convierte en ácido cítrico, lo que posiblemente explicaría el

GRAFICO 15. Materiales de mora
Acido málico en cuatro etapas de desarrollo



| Ac. málico vs. Tiempo de desarrollo | | | | | | |
|-------------------------------------|---------|----------|---------|----------|------------|----------|
| Marcación 1 | | | | | | |
| Días | Cerezos | σ | Sara II | σ | Villamaria | σ |
| 45 | 2882 | 25,16 | 3613 | 265,96 | 2422 | 540,52 |
| 50 | 3121 | 325,27 | 3429 | 465,02 | 3357 | 411,37 |
| 55 | 2884 | 243,80 | 3308 | 371,10 | 4666 | 596,73 |
| 60 | 2686 | 463,99 | 2785 | 84,35 | 3062 | 654,64 |

GRAFICO 16. Materiales de mora
Acido málico en cuatro etapas de desarrollo



| Ac. Málico vs. Tiempo de desarrollo | | | | | | |
|-------------------------------------|---------|----------|---------|----------|-------------|----------|
| Marcación 2 | | | | | | |
| Días | Cerezos | σ | Sara II | σ | Villa Maria | σ |
| 45 | 2262 | 101,32 | 2251 | 521,83 | 3176 | 1076 |
| 50 | 3488 | 424,98 | 3519 | 161,74 | 1393 | 581,13 |
| 55 | 3578 | 472,14 | 3331 | 544,06 | 2957 | 556 |
| 60 | 3299 | 192,9 | 2727 | 211,07 | 2792 | 472,55 |

dos marcaciones.

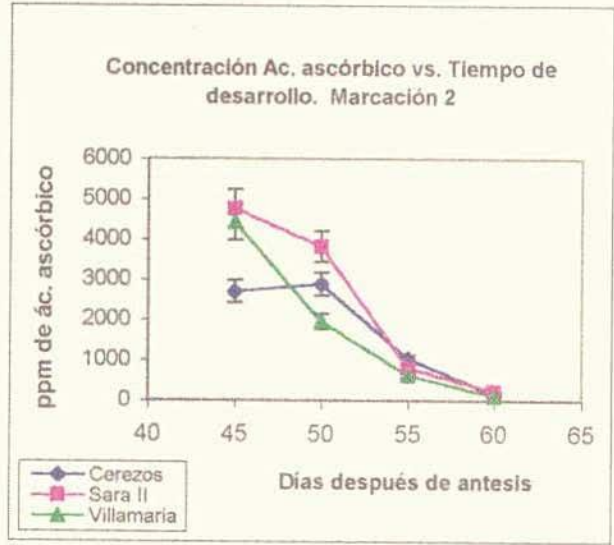
descenso del ácido málico durante la maduración de los 3 materiales de mora en las

6.4.6. Ácido ascórbico ($t_R = 8.50$ min): Los frutos más maduros de los materiales de la marcación 1 presentan gran diferencia en su comportamiento con relación a la marcación 2. Se observa en la gráfica 17 una mínima cantidad de ácido ascórbico para los 3 materiales a los 50 días, con un aumento después de esta época de maduración. El material VILLAMARIA, incrementa su concentración a los 55 días después de antesis. En la marcación 2, para los tres materiales se presenta el mismo fenómeno de disminución del ácido ascórbico durante todo su proceso de maduración; a diferencia de lo reportado para la fresa (Chefftel,143) en la cual durante la maduración hay una síntesis activa de vitamina C a partir de glucosa, , los frutos de la marcación 2, para los tres materiales muestran una drástica disminución de la concentración de ácido ascórbico, desde 4000 ppm hasta 166 ppm, durante todo el tiempo de maduración , este comportamiento es contrario al mostrado por los frutos analizados de la marcación 1.

6.4.7. Ácido Succínico ($t_R = 11.50$ min): En las gráficas 19 y 20, se observa que no hay un comportamiento homogéneo en los tres materiales de mora. En la primera marcación, los materiales SARA II y VILLAMARIA, presentan un aumento drástico en la concentración de ácido succínico a los 50 días después de antesis. El material CEREZOS muestra un comportamiento uniforme a través de toda su etapa de maduración, en cuanto a la concentración del ácido succínico. En la marcación 2, los materiales CEREZOS y SARA II mostraron un aumento progresivo en la concentración de ácido succínico hasta los 55 días, mientras el material

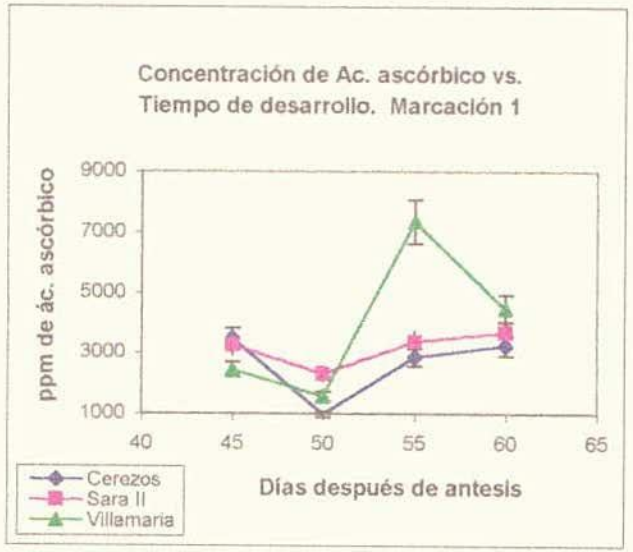
VILLAMARIA exhibió un descenso, es su concentración desde 1250 ppm hasta 800 ppm, en esa misma época, y a los 60 días los materiales VILLAMARIA y CEREZOS, enseñan un ascenso, a diferencia del SARA II, que disminuye drásticamente.

GRAFICO 18. Materiales de mora
Ac.ascórbico en cuatro etapas de desarrollo



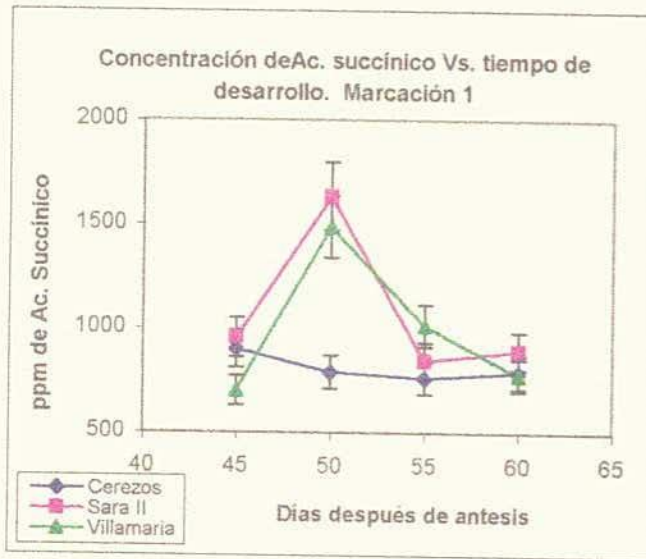
| Ac. Ascórbico vs. Tiempo de desarrollo marcación 2 | | | | | | |
|--|---------|----------|---------|----------|-------------|----------|
| Días | Cerezos | σ | Sara II | σ | Villa Maria | σ |
| 45 | 2706 | 1338 | 4761 | 1198 | 4426 | 894,2 |
| 50 | 2885 | 2118 | 3830 | 1558 | 1949 | 260,7 |
| 55 | 1026 | 98,43 | 807 | 48,88 | 612 | 37,32 |
| 60 | 166 | 70,32 | 216 | 115,8 | 110 | 48,34 |

GRAFICO 17. Materiales de mora
Ac.ascórbico en cuatro etapas de desarrollo



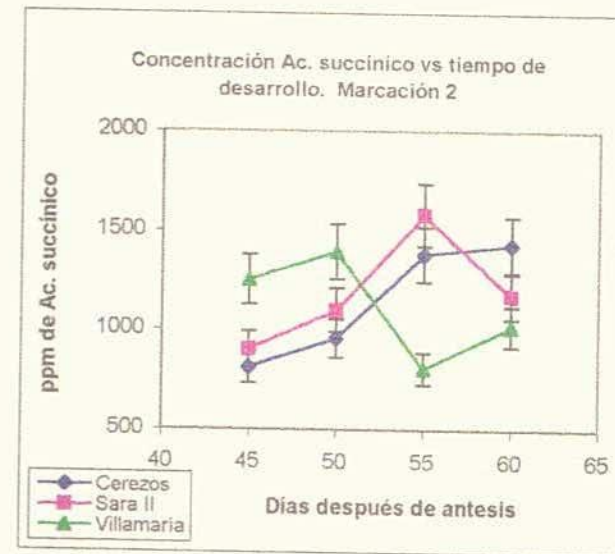
| Ac. Ascórbico vs. Tiempo de desarrollo marcación 1 | | | | | | |
|--|---------|----------|---------|----------|------------|----------|
| Días | Cerezos | σ | Sara II | σ | Villamaria | σ |
| 45 | 3460 | 298,88 | 3250 | 1062 | 2444 | 777 |
| 50 | 973 | 81,989 | 2313 | 452,7 | 1567 | 976 |
| 55 | 2853 | 477,22 | 3362 | 281,3 | 7345 | 496 |
| 60 | 3230 | 1261,8 | 3676 | 459,7 | 4471 | 1113 |

GRAFICO 19. Materiales de mora
Ac. Succínico en cuatro etapas de desarrollo



| Ac. Succínico vs. Tiempo de desarrollo | | | | | | |
|--|---------|----------|---------|----------|------------|----------|
| Marcación 1 | | | | | | |
| Días | Cerezos | σ | Sara II | σ | Villamaria | σ |
| 45 | 900 | 67,04 | 953 | 144,09 | 700 | 285,41 |
| 50 | 789 | 104,48 | 1633 | 432,95 | 1485 | 737,19 |
| 55 | 760 | 362,01 | 844 | 224,81 | 1012 | 238,86 |
| 60 | 788 | 110,29 | 892 | 156,39 | 776 | 93,66 |

GRAFICO 20. Materiales de mora
Ac. Succínico en cuatro etapas de desarrollo



| Ac. Succínico vs. Tiempo de desarrollo | | | | | | |
|--|---------|----------|---------|----------|------------|----------|
| Marcación 2 | | | | | | |
| Días | Cerezos | σ | Sara II | σ | Villamaria | σ |
| 45 | 813 | 259,74 | 901 | 249,02 | 1251 | 271,38 |
| 50 | 957 | 288,70 | 1099 | 174,45 | 1393 | 580,76 |
| 55 | 1379 | 245,68 | 1580 | 306,78 | 806 | 128,40 |
| 60 | 1427 | 145,93 | 1173 | 229,33 | 1018 | 165,45 |

6.4.8. Ácidos tartárico e isocítrico: Al realizar los análisis preliminares sobre los ácidos presentes en extractos de mora, se concluyó que los ácidos tartárico ($t_R = 12.9$ min.) e isocítrico ($t_R = 7.89$ min.) no se encontraban en los 3 materiales de mora, ya que al correr los estándares de los ácidos y comparar sus respectivos tiempos de retención con los cromatogramas de las muestras éstos no correspondían a dichos tiempos de retención.

Luego de comparar el comportamiento de los 3 materiales respecto de las marcaciones 1 y 2 se aprecia una mayor consistencia en la evolución de las propiedades fisicoquímicas, de los azúcares y de los ácidos no volátiles en la marcación 2. En general se observó que tanto los ácidos no volátiles como los azúcares aumenta marcadamente hasta cierta época de desarrollo (55 días después de antesis) disminuyendo luego sus concentraciones.

Las variaciones en la concentración de ácidos influyen en la acidez titulable de los materiales, mientras que los cambios en la concentración de azúcares afectan la concentración de sólidos solubles; parámetros que determinan la calidad fisicoquímica y organoléptica de los materiales estudiados.

7. CONCLUSIONES

7.1. ANALISIS FISICOQUIMICOS

- **pH:** El pH de los materiales de mora analizados: CEREZOS, SARA II y VILLAMARIA, aumentó constantemente a partir del día 50 luego de anthesis.
- **Acidez titulable:** Los tres materiales de mora presentan un permanente descenso en el % de ácido málico durante la evolución de su maduración.
- **Brix:** Los factores agroclimatológicos afectan dramáticamente el contenido de sólidos solubles de los materiales de mora durante el periodo de maduración (3 semanas).

A mayor temperatura ambiente y menor precipitación pluvial (marcación 1) se presentó un comportamiento no homogéneo en dicho contenido, a diferencia de la marcación 2 (menor temperatura y menor lluviosidad) en la cual aumentaron constantemente los brix.

- **Indice de madurez:** Las dos marcaciones muestran un comportamiento opuesto.

El índice de madurez de los tres materiales aumenta durante toda la maduración de los frutos de mora

7.2. ANALISIS DE AZUCARES Y ACIDOS NO VOLATILES

- Se estandarizó el protocolo de preparación y análisis de muestras de mora por la técnica de cromatografía líquida de alta eficiencia. La longitud de onda (λ) utilizada en el detector U.V. para los ácidos, es una λ media, ya que los ácidos orgánicos se detectan en un rango de 205-245 nm. La temperatura de análisis es un factor que influye directamente sobre los detectores de I.R. utilizados para azúcares, por lo tanto se debe tener en cuenta el control de esta variable durante el corrido de las muestras.
- Los azúcares encontrados por HPLC con detector de Índice de Refracción en los tres materiales de mora fueron glucosa y fructosa, en concentraciones similares. El contenido de estos dos azúcares aumenta constantemente durante todo el proceso de maduración.
- La sacarosa no fue encontrada como azúcar constituyente en la composición de los materiales de mora.
- Los ácidos no volátiles detectados y cuantificados por HPLC con detector de U.V. fueron el ácido cítrico en mayor proporción, seguido del ácido málico y en menores proporciones ácido ascórbico y ácido succínico.
- La concentración de los ácidos en los tres materiales de mora desciende regularmente durante el periodo de maduración; de manera análoga y según lo previsto desde el punto de vista del comportamiento bioquímico de la fruta a través de todo el tiempo de análisis.

- Los materiales CEREZOS y SARA II, exhiben en general un comportamiento más uniforme durante la evolución de sus características químicas respecto del observado para el material VILLAMARIA en las dos marcaciones analizadas.
- Los factores climáticos afectan las propiedades químicas de los frutos de mora, ya que a mayor temperatura y radiación solar, se acelera el proceso de maduración; lo cual se debe tener en cuenta durante el cultivo de la mora.
- Mediante la interrelación de las características analizadas en las muestras de mora, se observó que la mejor época para la recolección de los frutos de mora es a los 55 días después de antesis, en condiciones climáticas de verano y menor pluviosidad; y para condiciones de menor temperatura y mayor precipitación los frutos se deben recolectar a los 60 días.

7.2. ANALISIS DE AZUCARES Y ACIDOS NO VOLATILES

- Se estandarizó el protocolo de preparación y análisis de muestras de mora por la técnica de cromatografía líquida de alta eficiencia. La longitud de onda (λ) utilizada en el detector U.V. para los ácidos, es una λ media, ya que los ácidos orgánicos se detectan en un rango de 205-245 nm. La temperatura de análisis es un factor que influye directamente sobre los detectores de I.R. utilizados para azúcares, por lo tanto se debe tener en cuenta el control de esta variable durante el corrido de las muestras.
- Los azúcares encontrados por HPLC con detector de Índice de Refracción en los tres materiales de mora fueron glucosa y fructosa, en concentraciones similares. El contenido de estos dos azúcares aumenta constantemente durante todo el proceso de maduración.
- La sacarosa no fue encontrada como azúcar constituyente en la composición de los materiales de mora.
- Los ácidos no volátiles detectados y cuantificado por HPLC con detector de U.V. fueron el ácido cítrico en mayor proporción, seguido del ácido málico y en menores proporciones ácido ascórbico y ácido succínico.
- La concentración de los ácidos en los tres materiales de mora desciende regularmente durante el periodo de maduración, de manera análoga y según lo previsto desde el punto de vista del comportamiento bioquímico de la fruta a través de todo el tiempo de análisis.

- Los materiales CEREZOS y SARA II, exhiben en general un comportamiento más uniforme durante la evolución de sus características químicas respecto del observado para el material VILLAMARIA en las dos marcaciones analizadas.
- Los factores climáticos afectan las propiedades químicas de los frutos de mora, ya que a mayor temperatura y radiación solar, se acelera el proceso de maduración; lo cual se debe tener en cuenta durante el cultivo de la mora.
- Mediante la interrelación de las características analizadas en las muestras de mora, se observó que la mejor época para la recolección de los frutos de mora es a los 55 días después de antesis, en condiciones climáticas de verano y menor pluviosidad, y para condiciones de menor temperatura y mayor precipitación los frutos se deben recolectar a los 60 días.

8. RECOMENDACIONES

□ **Del protocolo de preparación y análisis de muestras**

- Ensayar diferentes temperaturas y velocidades de centrifugación durante el proceso de limpieza de la muestra.
- Realizar análisis de HPLC modificando variables de proceso tales como: fase móvil, concentración de la fase móvil, longitud de onda, temperatura de la columna, velocidad de flujo, tiempo de análisis.

□ **De los materiales de mora**

- Continuar el estudio de otros materiales de mora del banco de germoplasma, para tener mayores elementos de juicio con los cuales definir aquellos con las mejores características para la tecnificación y propagación del cultivo, procurando la satisfacción de la demanda actual de mora.

9. BIBLIOGRAFIA

ACKERMAN, et al. Cambios en azúcares, ácidos y aminoácidos durante la maduración y almacenamiento de manzanas. *J. Agriculture and F. Chemistry*, 40 (7), p. 1992. 1131-1134.

AZCON, J. *Fisiología y Bioquímica Vegetal*. España: MacGraw Hill. 1996, p. 470,471.

BARTOLOME, A. P. Cambios en los azúcares solubles en dos variedades de piña durante la congelación y el almacenamiento. *Food chemistry*.52 (2), 1996, p. 163-166.

7 BELITZ, H.D. *Food Chemistry*. Alemania: Universidad J.Liebig de Giessen. 1987, p. 749, 756, 759, 763.

BERRIO, Lucena. Tesis: Identificación y cuantificación de ácidos orgánicos en 3 clones de lulo (*Solanum quitoense lam*). Universidad del Quindío. Armenia 1998.

BERTOLINI, L et al. Identificación de ácidos orgánicos en vinagre por HPLC. *Industrie delle Bevande*, 23 (132). 1994, p. 324-326.

BLANCO, D. Estudio bioquímico de la maduración de variedades de manzana cidra. *Zeitschrift-fuer-lebensmittel-untersuchung und-forschung*; 194 (1), p. 1992. 33-37.

BOUZAS, "Determinación simultánea de azúcares y ácidos orgánicos en queso cheddar por HPLC" *J. of Food science* 56 (1), p. 1991. 276-278.

BUSWAY, R.J. Determinación de ácidos orgánicos en papas por HPLC. *J. of Food science*. Vol 49. 1984, p 75-77.

CANO, Pilar. Determinación de ácidos orgánicos no volátiles en algunas frutas exóticas en España, mediante cromatografía de intercambio iónico. *Zeitschrift-fuer-lebensmittel-untersuchung und-forschung*; 199 (3), 1994, p. 214-218.

CHARLEY, Helen. *Tecnología de Alimentos "procesos físicos y químicos en la preparación de alimentos*. México: Limusa. 1987, p. 648, 651, 661.

CHEFTEL, J.C. *Introducción a la Bioquímica y tecnología de alimentos*. España: Acribia, 1992, p. 143.

DAOOD, H.G. Investigación cromatográfica de Carotenoides, azúcares y ácidos orgánicos en frutas de *Dyospiros Kaki*. *Food Chemistry*, 45 (2). 1992, p. 151-155.

DOMINGUEZ, A.L. Tesis: Determinación de carbohidratos en 3 clones de lulo (*Solanum quitoense lam*). Universidad del Quindío. Armenia 1998.

DOUGLAS, C. Diseño y Análisis de Experimentos. México: Iberoamericana S.A. 1991.

DOYON, G, et al. Determinación simultánea de ácidos orgánicos, azúcares y alcoholes. Canadian institute of food science and technology journal, 24 (1/2). 1991, p. 87-94.

DURAN, S. Frigoconservación de las frutas. 1 ed. Barcelona: Biblioteca Aedos, 1983, p. 9-21.

DURST, R. Azúcares, ácidos no volátiles, relación C^{12}/C^{13} y minerales para determinar la calidad del jugo de frambuesa. J. AOAC International; 78 (5). 1995, p. 1195-1204.

FENENMA. Introducción a la Ciencia de los Alimentos. España: Reverté, 1982, p. 790, 793, 799, 801, 806.

FERNANDEZ, E. Determinación de ácidos orgánicos durante la fermentación y almacenamiento en frío de yogurth. Journal of dairy science; 77 (10), 1994, p. 2934-2939.

FULEKI, T. et al. Composición de azúcares en varios jugos de manzana fresca y almacenada. J. of agricultural and food chemistry; 42 (6), 1994, p. 1266-1275.

GALLO, Fernando. Manual de Fisiología, patología, postcosecha y control de calidad de frutas y hortalizas. 2 ed. Armenia: Convenio SENA-Reino Unido, 1997, p. 93-97.

GUIDELINES FOR USE AND CARE OF AMINEX RESIN-BASED COLUMNS: Technical Service Bio Rad. Laboratories, p. 9.

HENAO, José R. Tesis: Manejo de la mora de Castilla (*Rubus glaucus benth*) con énfasis en postcosecha en el departamento del Quindío. Armenia: Universidad del Quindío 1997.

HPLC COLUMNS METHODS AND APLICATIONS: Bio-Rad. Laboratories, p. 59, 62, * 66, 69.

HPLC FOR FOOD ANALYSIS. A primer: Hewlett Packard Company. 1996, p. 2, 3.

HUNTER, J.J. et al. Preparación y extracción de ácidos orgánicos y azúcares en uvas para su determinación por HPLC. American J. of enology and viticulture; 42 (3), 1991, p. 237-244.

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TECNICAS Y CERTIFICACION. Normas Colombianas para la presentación de tesis de grado. Santafé de Bogotá: ICONTEC, 1996. 37 p. NTC 1486.

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TECNICAS Y CERTIFICACION. Normas Colombianas para frutas fresca, especificaciones de la mora de castilla. Santafé de Bogotá: ICONTEC, 1997, p 5,6. NTC 4106.

LA GRAN GUIA DE LA COMPOSICION DE LOS ALIMENTOS. Alemania: Equipo de alimentación de la Universidad de Liebig de Giessen, 1997, p. 50.

LEE, H. S. HPLC, método para la separación y determinación de ácidos orgánicos no volátiles en jugo de naranja. *J. agricultural and F. chemistry*; 41 (11), 1993, p. 1991-1993.

LINDSAY, Sandie. HPLC. 2 ed. U.S.A: Jhon Willey and Sons, 1982,1992, p. 45, 289, 309, 311.

LOPEZ, M. J. Análisis de ácidos orgánicos en jugos, néctares y bebidas frías por HPLC. *Anales de bromatología*, 41 (1), 1989, p. 65-71.

LOPEZ, E. Determinación de ácidos orgánicos, azúcares y glicerol en productos de vino blanco por HPLC: relación entre clima y variedad. *American J. of enology and viticulture*; 47 (2), 1996, p. 193-198.

MACFEETERS, R. F. Análisis de ácidos, azúcares y alcoholes por inyección simple con la técnica HPLC, en fermentaciones de pepino. *J. agricultural and F. chemistry*; 41 (9), 1993, p. 1439-1443.

MEMORIA PRIMER SEMINARIO DE FRUTALES DE CLIMA FRIO MODERADO. Manizales, 1996, p. 55-59.

MONTANA, M. Determinación de ácidos orgánicos en jugos y néctares de piña por HPLC. *Zietschrift-fuer-lehensmittel-untersuchung und-forschung*; 198 (1), 1994, p. 52-56.

NISPEROS, M. Determinación simultánea de ácidos dehidroascórbico, ascórbico, y algunos ácidos orgánicos en frutas y vegetales por HPLC. *J. Agricultural of Food Chemistry*. Vol 40, 1992, p. 1127-1129.

OTLES, S. Composición de azúcares en manzanas (*Malus silvester* Var. Doméstica). *Medelingen-van-de-faculteit-landbouwdtnschappen-rijks-universiteit gent*; 57 (1), 1992, p. 51-54.

PANTASTICO, ER.B. Fisiología de la postrecolección, manejo y utilización de frutas y hortalizas tropicales y subtropicales. 2 ed. México: C.E.C.S.A, 1984, p. 59-73, 77-89.

PLANELLA, Isidro. Tecnología del manejo postcosecha de frutas y hortalizas. Santafé de Bogotá: IICA, 1987, p. 62,63.

PEREZ, A. Determinación rápida de azúcares, ácidos no volátiles y ácido ascórbico, en fresas y otras frutas. *J. Agricultural of Food Chemistry*. Vol (45), 1997, p. 3545-3549.

PERKINS, P. et al. El cultivo y la madurez afecta la calidad postcosecha de los frutos de mora. *Hortscience*; 31 (2), 1996, p. 258-261.

POTTER, Norman. *Food Science*. 5 ed. Gran Bretaña: Chapman and Hall, 1995, p. 24, 409, 417, 429, 432.

QUATTROCHI, Oscar. *Introducción a la HPLC aplicación y práctica*. Argentina: Farro S.A, 1992, p. 6, 10, 26, 30, 106, 113.

RIAZ, M. N. Determinación de ácidos orgánicos en frambuesa cultivados en Maine. *Fruit varieties journal*; 48 (4), 1994, p. 206-211.

ROBINSON, David. *Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos*. España: Acribia, 1992, p. 15.

ROMERO, M. A. Identificación y cuantificación de los principales ácidos orgánicos en frutas. *Anales de bromatología*; 42 (2), 1990, p. 299-306.

SEYMOUR, G.B. *Biochemistry of fruit Ripening*. Gran Bretaña: Chapman and Hall, 1993, p. 9-11.

SISTRUNK, W.A. Ácidos no volátiles en fresa. *J. of Food Science*; Vol 38, 1973, p. 807-809.

SNYDER, R.L. *Practical HPLC method development*. 2 ed. U.S.A: John Wiley and Sons, 1997, p. 6, 101, 103, 110, 161.

SKOOG, Douglas A. *Análisis Instrumental*. 4 ed. España: MacGraw-Hill, 1994, p. 737, 739, 749.

SWADESH, Joel. *HPLC practical and industrial applications*. U.S.A: C.R.C, 1997, p. 122, 124, 131, 133.

WROLSTAD, Ronald. Sugars and acids non volatils in Blackberry. *J. Agriculture and Food Chemistry*. Vol. 28, 1980, p. 553-558.

YOST, R.W. *Introducción a la cromatografía líquida práctica HPLC*: Perkin Elmer, 1981, p. 3, 5, 122.

Anexo 1. Curva de calibración para ácidos orgánicos y azúcares

Method C:\HPCHEM\1\METHODS\MORA.M

 Calibration Table

Calib. Data Modified : 16/09/1999 07:43:25 PM

Calculate : External Standard
 Based on : Peak Area

Rel. Reference Window : 10.000 %
 Abs. Reference Window : 0.000 min
 Rel. Non-ref. Window : 5.000 %
 Abs. Non-ref. Window : 0.000 min
 Uncalibrated Peaks : compound name not specified
 Partial Calibration : Yes, identified peaks are recalibrated
 Correct All Ret. Times: No, only for identified peaks

Curve Type : Linear
 Origin : Included
 Weight : Linear

Recalibration Settings:
 Average Response : Average all calibrations
 Average Retention Time: Floating Average New 75%

Calibration Report Options :
 Printout of recalibrations within a sequence:
 Calibration Table after Recalibration
 Normal Report after Recalibration
 If the sequence is done with bracketing:
 Results of first cycle (ending previous bracket)

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=210 nm

| RetTime [min] | Lvl Sig | Amount [ppm] | Area | Amt/Area | Ref Grp Name |
|------------------|------------|-----------------|------------|------------|-----------------|
| 7.876 | 1 | 1 313.87500 | 474.61374 | 6.61327e-1 | Acido citrico |
| | | 2 627.75000 | 917.16455 | 6.84446e-1 | |
| | | 3 1255.50000 | 1810.92261 | 6.93293e-1 | |
| | | 4 2511.00000 | 3474.58154 | 7.22677e-1 | |
| | | 5 5022.00000 | 6666.13770 | 7.53360e-1 | |
| | | 6 1.00440e4 | 1.33708e4 | 7.50738e-1 | |
| 8.800 | 1 | 1 22.81000 | 6.41056 | 3.55819 | Acido ascorbico |
| | | 2 45.62500 | 13.85155 | 3.29386 | |
| | | 3 91.25000 | 29.49579 | 3.09366 | |
| | | 4 182.50000 | 53.61108 | 3.40415 | |
| | | 5 365.00000 | 101.17313 | 3.60768 | |
| | | 6 730.00000 | 203.17285 | 3.59300 | |
| 8.947 | 1 | 1 313.31000 | 3.78354e4 | 8.28086e-3 | Glucosa |
| | | 2 626.62500 | 1.01976e5 | 6.14480e-3 | |
| | | 3 1253.25000 | 2.60970e5 | 4.80227e-3 | |

| RetTime [min] | Lvl Sig | Amount [ppm] | Area | Amt/Area | Ref Grp Name |
|------------------|------------|-----------------|------------|------------|-----------------|
| | | 4 2506.50000 | 5.66989e5 | 4.42072e-3 | |
| | | 5 5013.00000 | 1.16852e6 | 4.29002e-3 | |
| | | 6 1.00260e4 | 2.48043e6 | 4.04204e-3 | |
| 9.395 | 1 | 1 76.34000 | 129.79305 | 5.88167e-1 | Acido malico |
| | | 2 152.69000 | 259.09689 | 5.89316e-1 | |
| | | 3 305.37500 | 514.21667 | 5.93864e-1 | |
| | | 4 610.75000 | 984.53839 | 6.20341e-1 | |
| | | 5 1221.50000 | 1878.40979 | 6.50284e-1 | |
| | | 6 2443.00000 | 3807.96362 | 6.41550e-1 | |
| 9.745 | 1 | 1 377.03000 | 7.10199e4 | 5.30879e-3 | Fructosa |
| | | 2 754.06000 | 1.65009e5 | 4.56982e-3 | |
| | | 3 1508.12500 | 3.89007e5 | 3.87686e-3 | |
| | | 4 3016.25000 | 8.18471e5 | 3.68522e-3 | |
| | | 5 6032.50000 | 1.65813e6 | 3.63813e-3 | |
| | | 6 1.20650e4 | 3.47438e6 | 3.47256e-3 | |
| 11.518 | 1 | 1 52.37500 | 49.37847 | 1.06068 | Acido succinico |
| | | 2 104.75000 | 96.63174 | 1.08401 | |
| | | 3 209.50000 | 189.91499 | 1.10313 | |
| | | 4 419.00000 | 365.35324 | 1.14684 | |
| | | 5 838.00000 | 706.09351 | 1.18681 | |
| | | 6 1676.00000 | 1442.54138 | 1.16184 | |

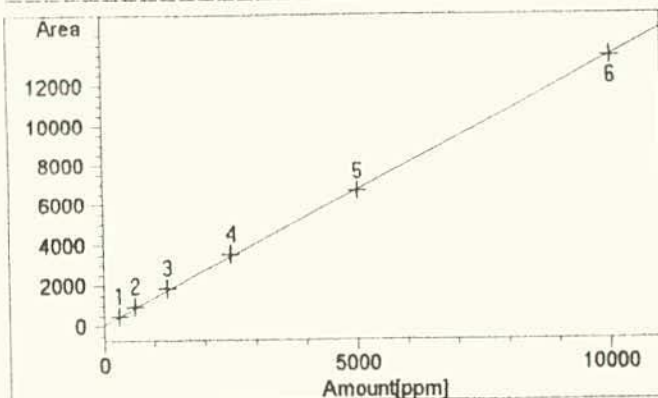
3 Warnings or Errors :

- Warning : Overlapping peak time windows at 8.8 min, signal 1
- Warning : Overlapping peak time windows at 8.947 min, signal 1
- Warning : Overlapping peak time windows at 9.395 min, signal 1

=====
Peak Sum Table
=====

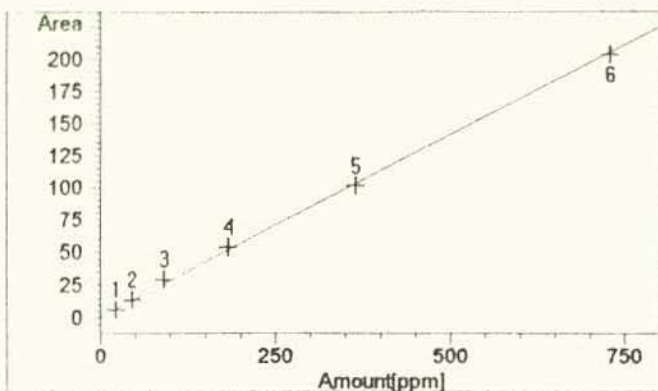
No Entries in table
=====

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



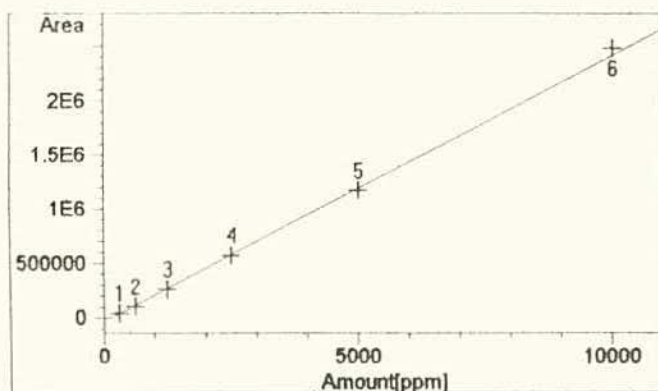
Acido citrico at exp. RT: 7.876
 VWD1 A, Wavelength=210 nm
 Correlation: 0.99971
 Residual Std. Dev.: 72.16110
 Formula: $y = mx + b$
 m: 1.33203
 b: 63.74840
 x: Amount [ppm]
 y: Area

Calibration Level Weights:
 Level 1 : 1
 Level 2 : 0.5
 Level 3 : 0.25
 Level 4 : 0.125



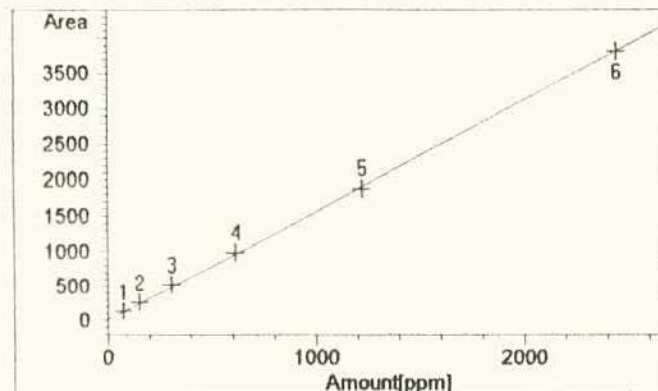
Acido ascorbico at exp. RT: 8.800
 VWD1 A, Wavelength=210 nm
 Correlation: 0.99894
 Residual Std. Dev.: 2.18090
 Formula: $y = mx + b$
 m: 2.80654e-1
 b: 7.27166e-1
 x: Amount [ppm]
 y: Area

Calibration Level Weights:
 Level 1 : 1
 Level 2 : 0.499945
 Level 3 : 0.249973
 Level 4 : 0.124986
 Level 5 : 0.062493
 Level 6 : 0.031247



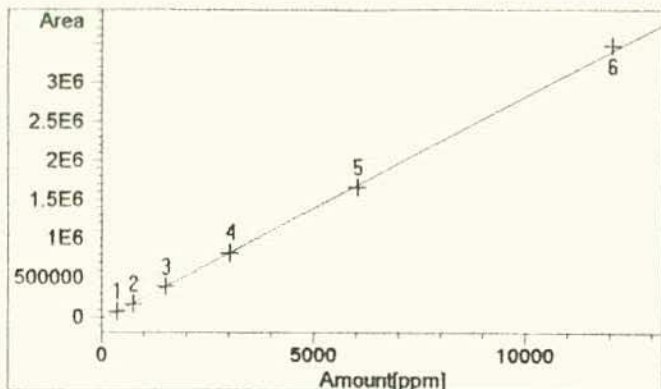
Glucosa at exp. RT: 8.947
 VWD1 A, Wavelength=210 nm
 Correlation: 0.99819
 Residual Std. Dev.: 34199.22763
 Formula: $y = mx + b$
 m: 245.20253
 b: -37208.57845
 x: Amount [ppm]
 y: Area

Calibration Level Weights:
 Level 1 : 1
 Level 2 : 0.499996
 Level 3 : 0.249998
 Level 4 : 0.124999
 Level 5 : 0.0625
 Level 6 : 0.03125



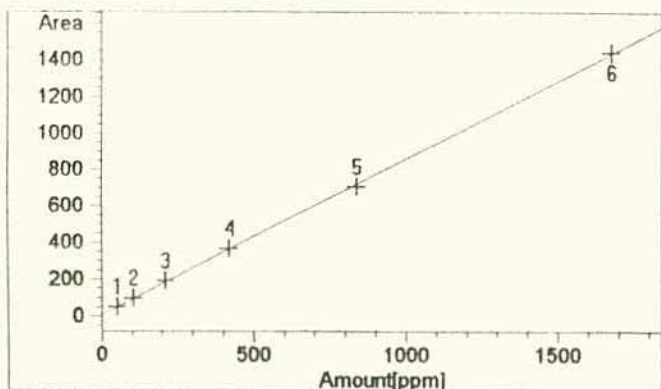
Acido malico at exp. RT: 9.395
 VWD1 A, Wavelength=210 nm
 Correlation: 0.99967
 Residual Std. Dev.: 23.16948
 Formula: $y = mx + b$
 m: 1.55593
 b: 15.08635
 x: Amount [ppm]
 y: Area

Calibration Level Weights:
 Level 1 : 1
 Level 2 : 0.499967
 Level 3 : 0.249988
 Level 4 : 0.124994
 Level 5 : 0.062497
 Level 6 : 0.031248



Fructosa at exp. RT: 9.745
 VWD1 A, Wavelength=210 nm
 Correlation: 0.99912
 Residual Std. Dev.: 35606.63647
 Formula: $y = mx + b$
 m: 285.77969
 b: -35349.80291
 x: Amount [ppm]
 y: Area

Calibration Level Weights:
 Level 1 : 1
 Level 2 : 0.5
 Level 3 : 0.249999
 Level 4 : 0.125
 Level 5 : 0.0625
 Level 6 : 0.03125



Acido succinico at exp. RT: 11.518
 VWD1 A, Wavelength=210 nm
 Correlation: 0.99979
 Residual Std. Dev.: 8.04479
 Formula: $y = mx + b$
 m: 8.54611e-1
 b: 5.00287
 x: Amount [ppm]
 y: Area

Calibration Level Weights:
 Level 1 : 1
 Level 2 : 0.5
 Level 3 : 0.25
 Level 4 : 0.125
 Level 5 : 0.0625
 Level 6 : 0.03125

=====

Anexo 2. Cromatogramas de estándares ácidos orgánicos y azúcares

File: C:\HPCHEM\1\METHODS\190499\001-0101.D

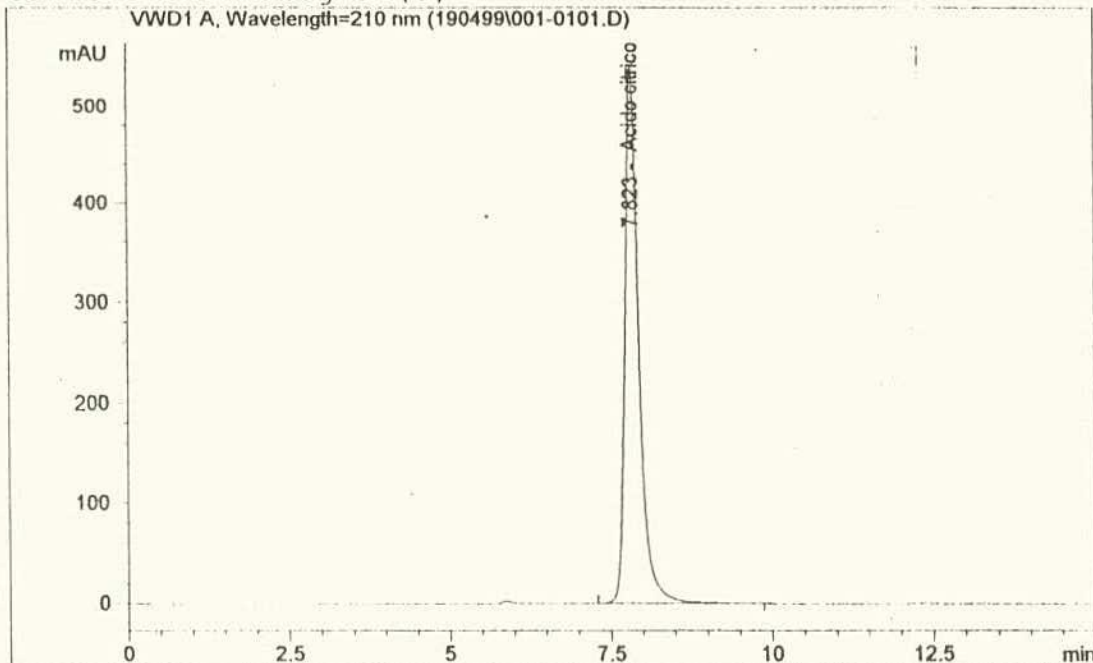
Sample Name: Ac citrico 500

```
=====
Injection Date   : 19/04/1999 10:03:13 AM      Seq. Line :    1
Sample Name      : Ac citrico 500              Vial       :    1
Acq. Operator    : Marta-beatriz               Inj        :    1
                                                    Inj Volume : 20 µl

Acq. Method      : C:\HPCHEM\1\METHODS\MORA.M
Last changed     : 19/04/1999 10:02:26 AM by Marta-beatriz
Analysis Method  : C:\HPCHEM\1\METHODS\MORA.M
Last changed     : 17/09/1999 03:07:34 PM by Marta-Beatriz
                  (modified after loading)

Estandares de Acidos no volatiles.
```

Current Chromatogram(s)



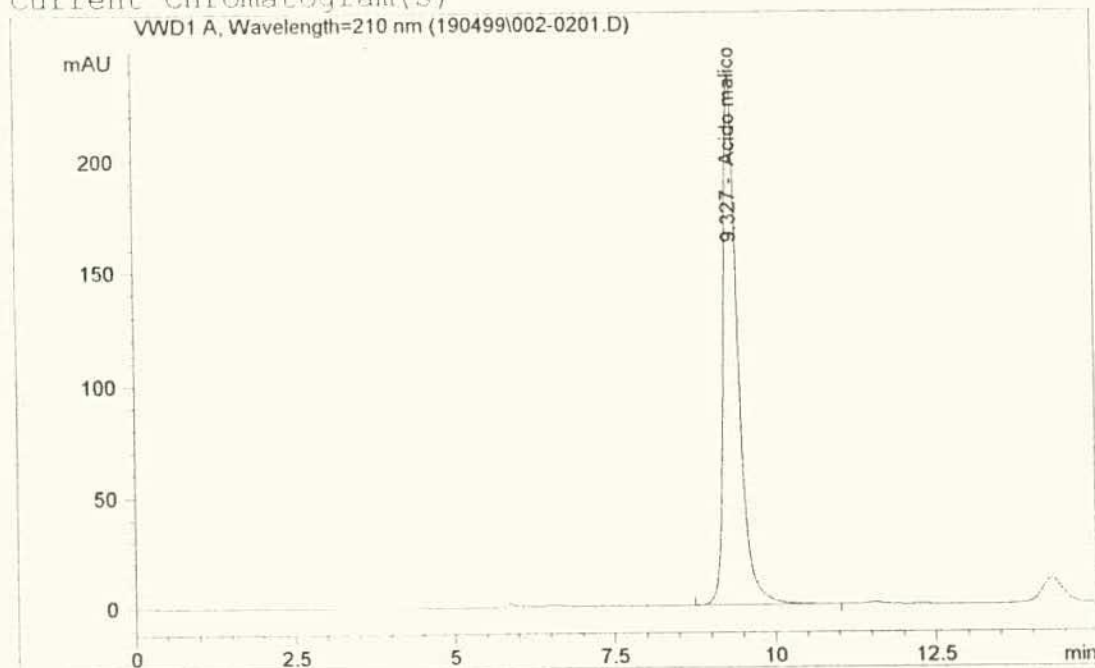
Injection Date : 19/04/1999 10:22:53 AM
Sample Name : Ac malico 3020
Acq. Operator : Marta-beatriz

Seq. Line : 2
Vial : 2
Inj : 1
Inj Volume : 20 µl

Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\MORA.M
Last changed : 19/04/1999 10:02:26 AM by Marta-beatriz
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\MORA.M
Last changed : 17/09/1999 03:07:34 PM by Marta-Beatriz
(modified after loading)

Estandares de Acidos no volatiles.

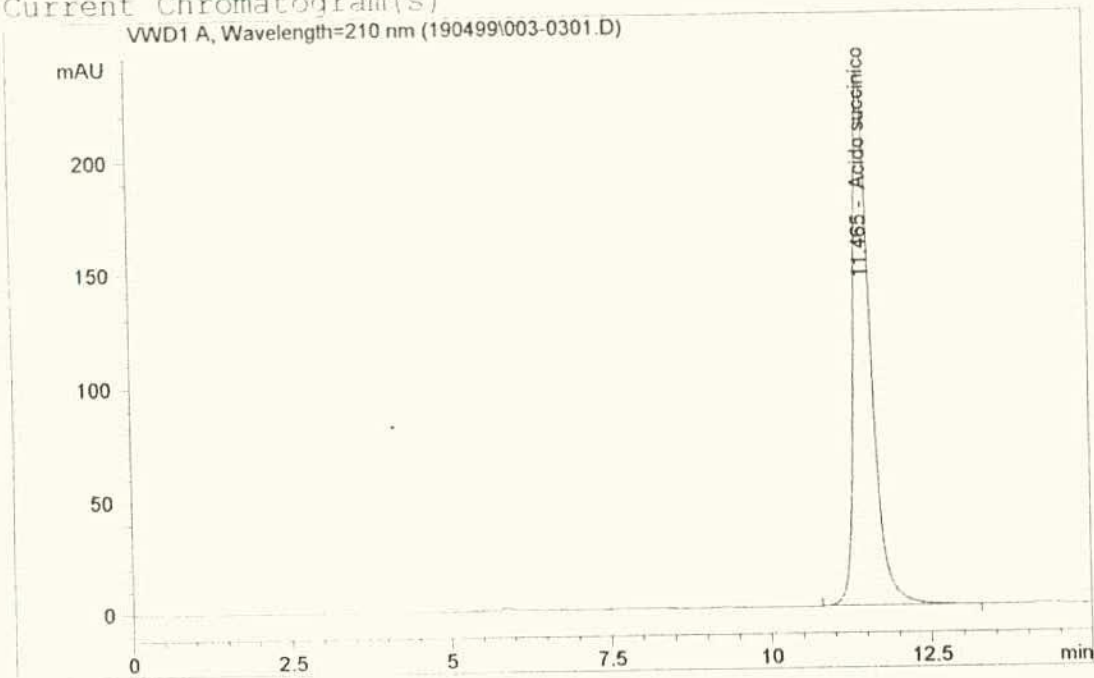
Current Chromatogram(s)



Injection Date : 19/04/1999 10:42:32 AM Seq. Line : 3
Sample Name : Ac succinico5020 Vial : 3
Acq. Operator : Marta-beatriz Inj : 1
Inj Volume : 20 µl
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\MORA.M
Last changed : 19/04/1999 10:02:26 AM by Marta-beatriz
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\MORA.M
Last changed : 17/09/1999 03:07:34 PM by Marta-Beatriz
(modified after loading)
Estandares de Acidos no volatiles.

Current Chromatogram(s)

VWD1 A, Wavelength=210 nm (190499\003-0301.D)

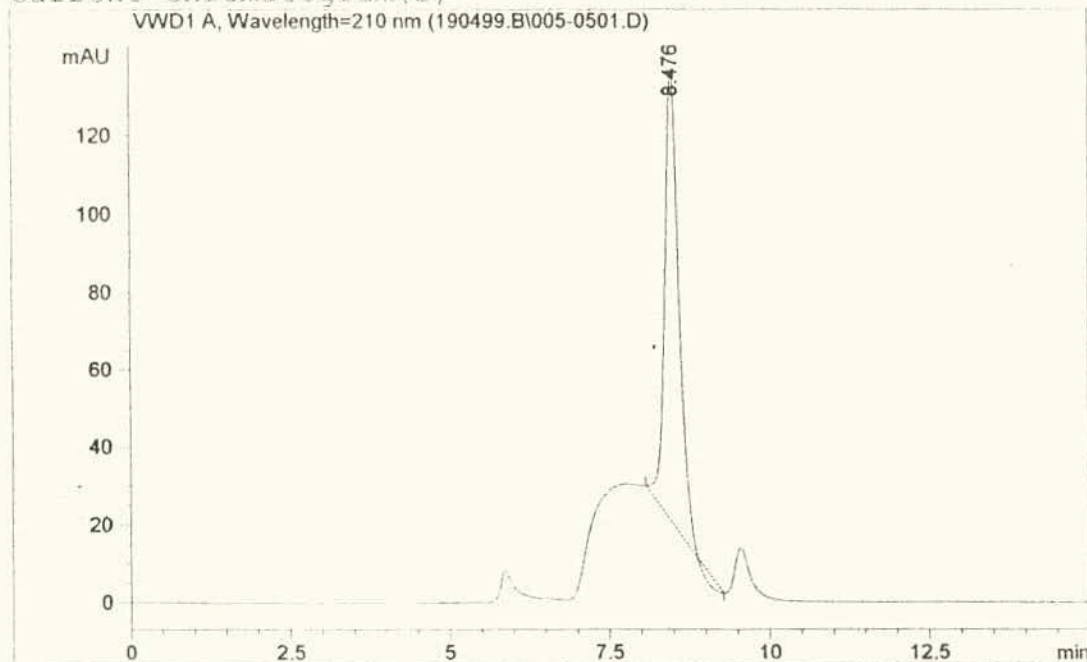


```

=====
Injection Date   : 19/04/1999 05:48:42 PM           Seq. Line   :    5
Sample Name     : Ac ascorbico 500                 Vial        :    5
Acq. Operator   : Marta-beatriz                     Inj         :    1
                                                    Inj Volume  : 20 µl

Acq. Method     : C:\HPCHEM\1\METHODS\MORA.M
Last changed    : 19/04/1999 06:01:26 PM by Marta-beatriz
                  (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\MORA.M
Last changed    : 17/09/1999 03:07:34 PM by Marta-Beatriz
                  (modified after loading)
Estandares de Acidos no volatiles.
    
```

Current Chromatogram(s)



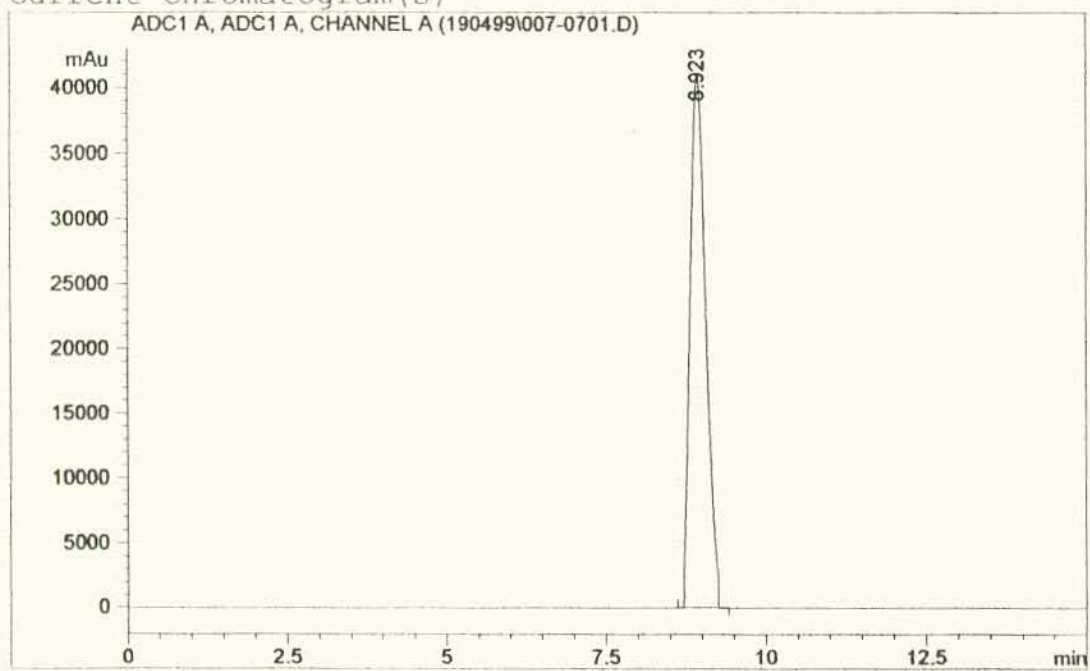
```

=====
Injection Date   : 19/04/1999 12:01:13 PM           Seq. Line :    7
Sample Name     : glucosa 3070                     Vial      :    7
Acq. Operator   : Marta-beatriz                    Inj       :    1
                                                    Inj Volume: 20 µl

Acq. Method     : C:\HPCHEM\1\METHODS\MORA.M
Last changed    : 19/04/1999 10:02:26 AM by Marta-beatriz
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\MORA.M
Last changed    : 17/09/1999 03:07:34 PM by Marta-Beatriz
                  (modified after loading)

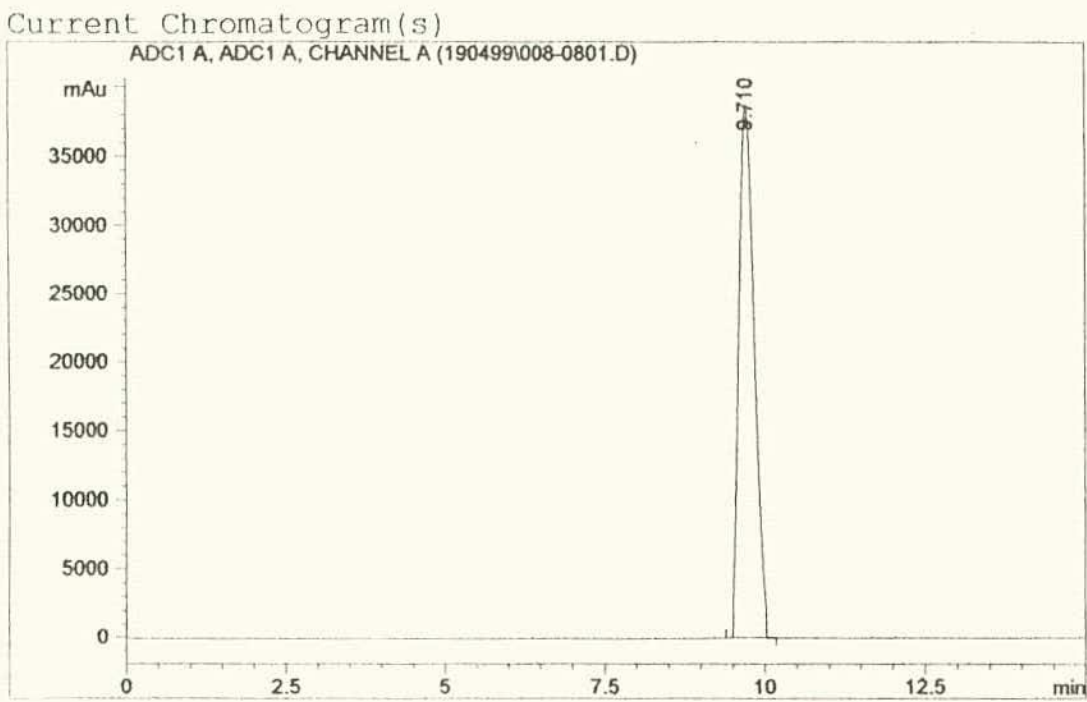
Estandares de Acidos no volatiles.
    
```

Current Chromatogram(s)



=====
Injection Date : 19/04/1999 12:20:54 PM Seq. Line : 8
Sample Name : fructosa3060 Vial : 8
Acq. Operator : Marta-beatriz Inj : 1
 Inj Volume : 20 µl

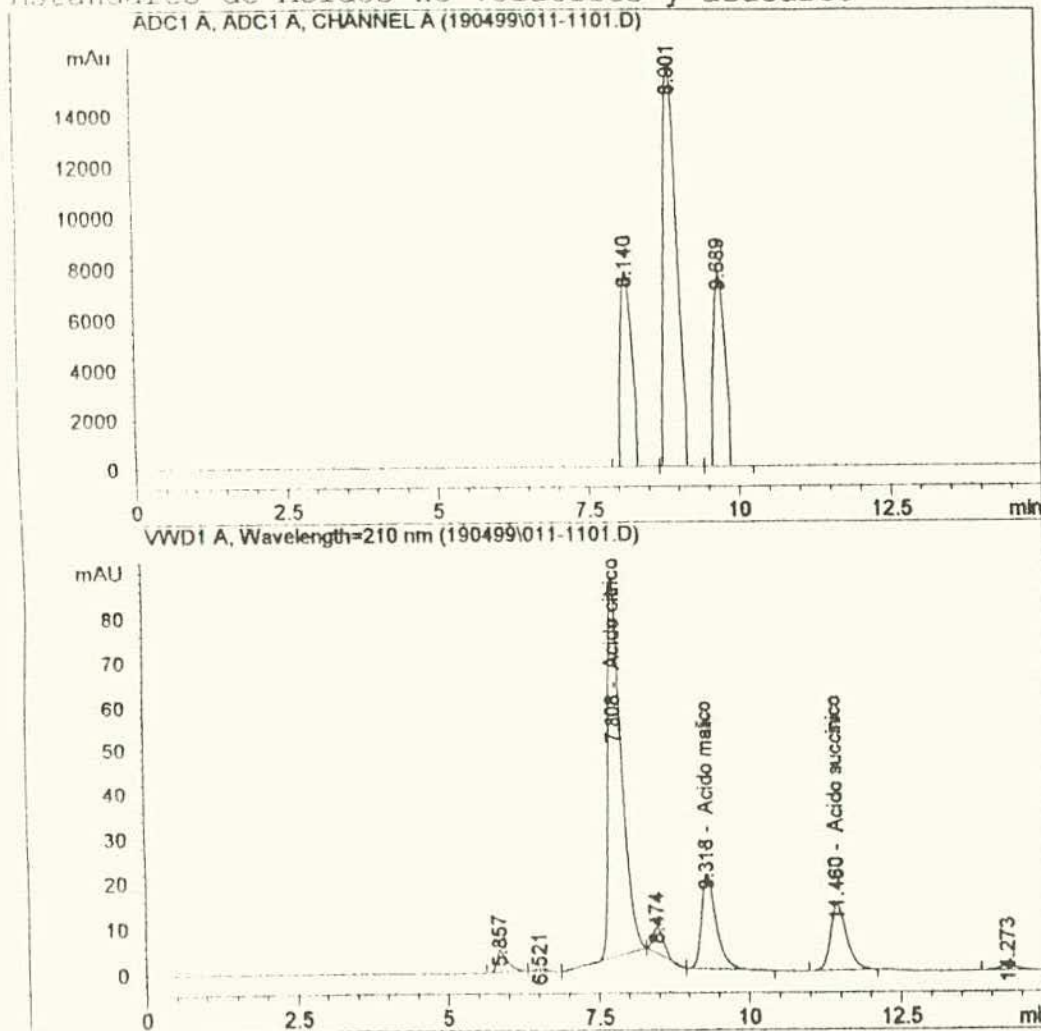
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\MORA.M
Last changed : 19/04/1999 10:02:26 AM by Marta-beatriz
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\MORA.M
Last changed : 17/09/1999 03:07:34 PM by Marta-Beatriz
 (modified after loading)
Estandares de Acidos no volatiles.



Injection Date : 19/04/1999 01:19:56 PM Seq. Line : 11
 Sample Name : Acidos+azuc Vial : 11
 Acq. Operator : Marta-beatriz Inj : 1
 Inj Volume : 20 µl

Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\MORA.M
 Last changed : 19/04/1999 10:02:26 AM by Marta-beatriz
 Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\MORA.M
 Last changed : 16/09/1999 08:46:24 PM by Marta-Beatriz
 (modified after loading)

Estandares de Acidos no volatiles y azucares



External Standard Report

Sorted By : Signal
 Calib. Data Modified : 16/09/1999 07:43:25 PM
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000

Anexo 3. Cromatogramas de los tres materiales de mora en las cuatro etapas de desarrollo

Data File C:\HPCHEM\DATA\170499\001-0101.D

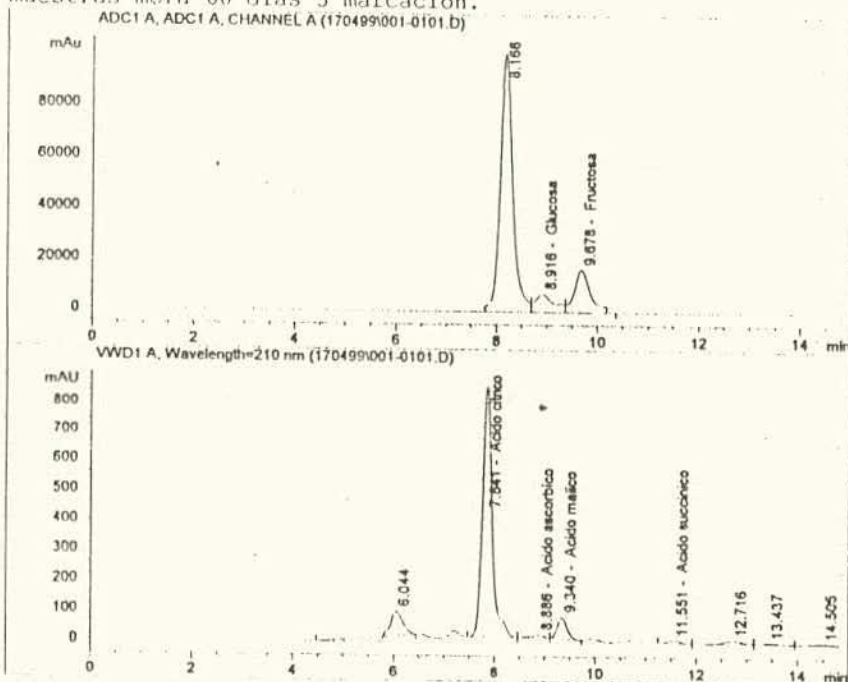
Sample Name: C45-RIT2

Cerezos 45 d, repetición 1. Dilución 1:5

```

=====
Injection Date : 17/04/1999 09:18:59   Seq. Line : 1
Sample Name    : C45-RIT2              Vial      : 1
Acq. Operator  : Marta-beatriz         Inj       : 1
                                           Inj Volume: 20 µl
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\MORA.M
Last changed   : 17/04/1999 09:18:13 AM by Marta-beatriz
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\MORA.M
Last changed   : 16/09/1999 06:46:41 PM by Marta-Beatriz
                                           (modified after loading)
=====
    
```

muestras mora 60 dias 3 marcacion.



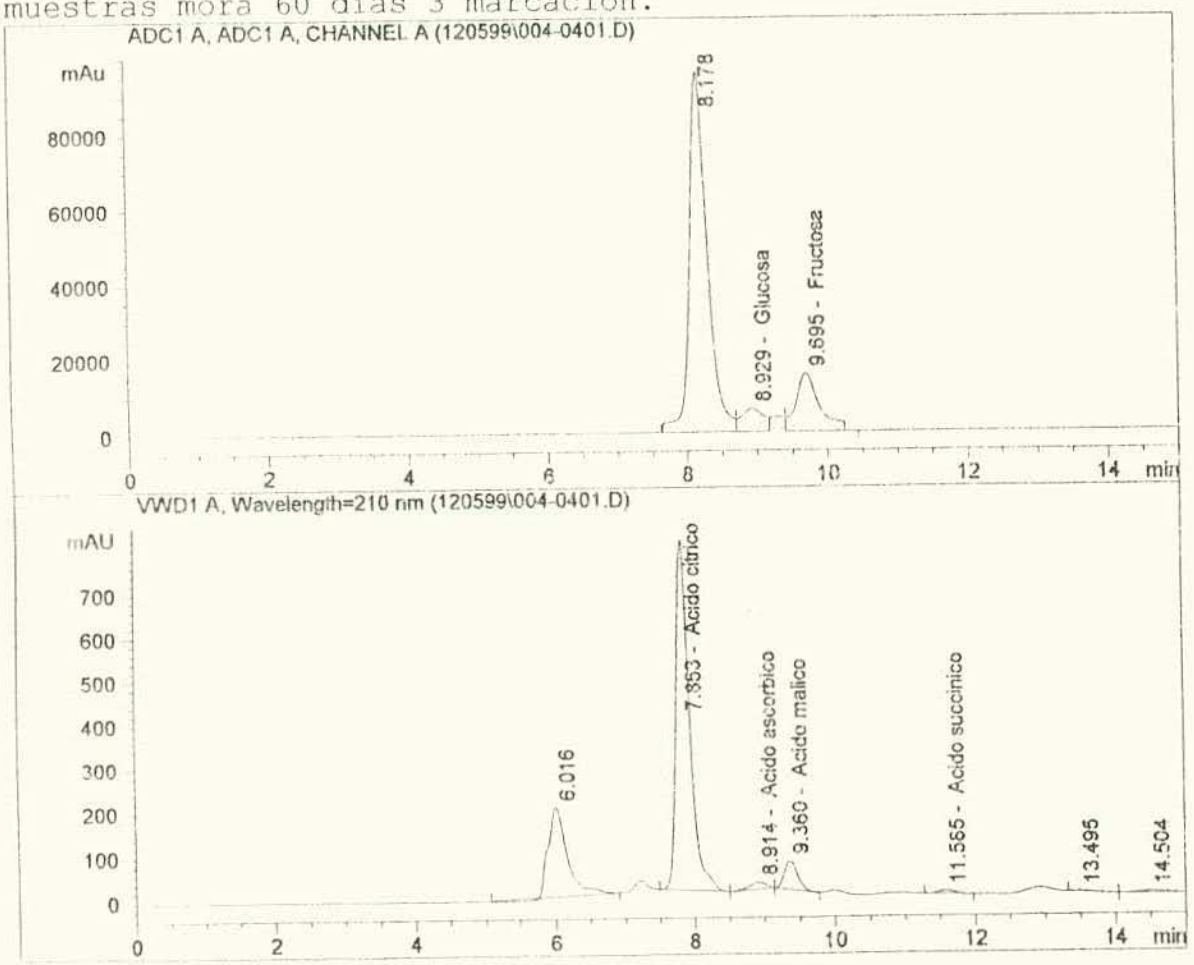
External Standard Report

```

=====
Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 15/06/1999 04:34:16 PM
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 5.0000
=====
    
```

Injection Date : 12/05/1999 11:58:10 AM Seq. Line : 4
Sample Name : S45R1 Vial : 4
Acq. Operator : Beatriz-Martha Inj : 1
Inj Volume : 20 µl
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\MORA.M
Last changed : 12/05/1999 11:10:06 AM by Beatriz-Martha
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\MORA.M
Last changed : 16/09/1999 06:46:41 PM by Marta-Beatriz
(modified after loading)

muestras mora 60 dias 3 marcacion.



External Standard Report

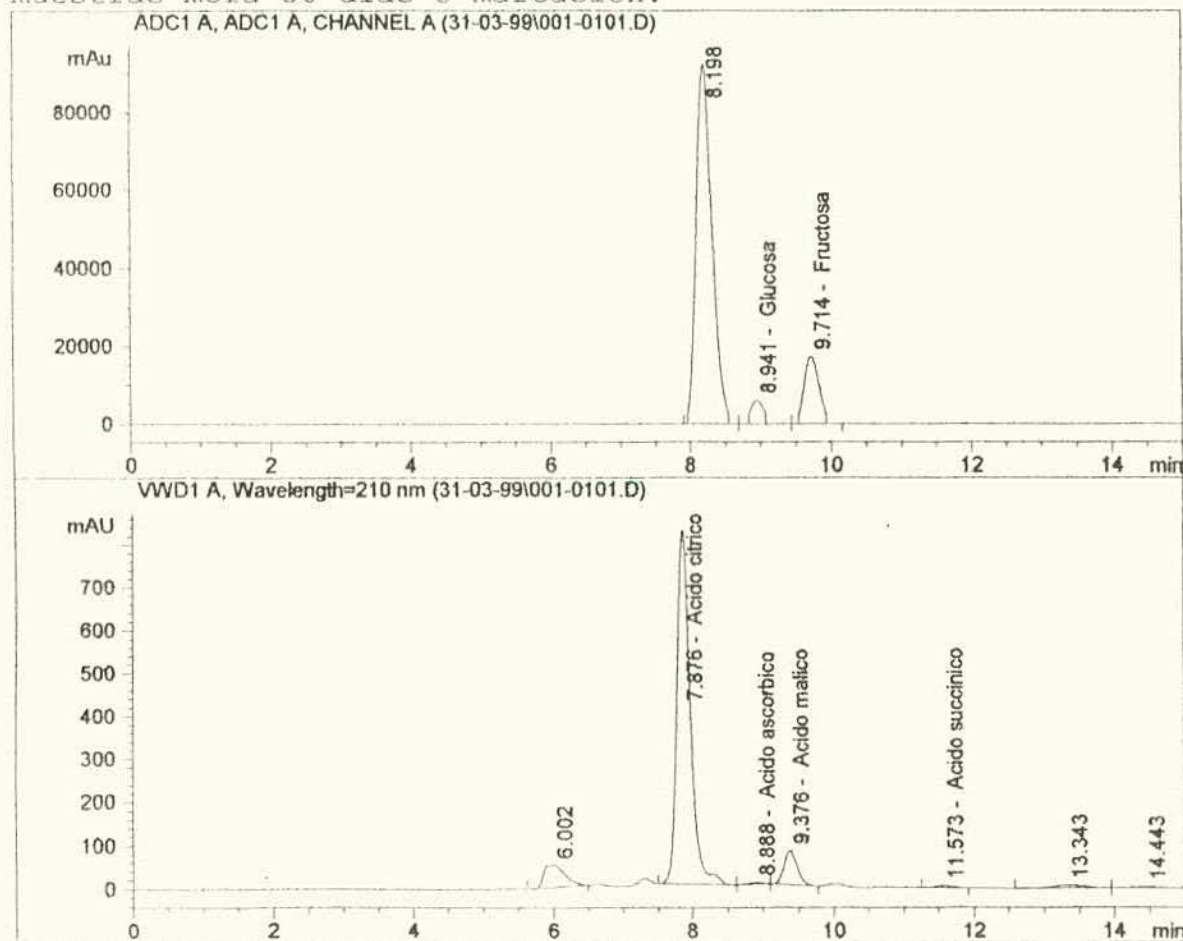
Sorted By : Signal
Calib. Data Modified : 15/06/1999 04:34:16 PM
Multiplier : 1.0000
Dilution : 5.0000


```

=====
Injection Date   : 31/03/1999 01:27:27 PM           Seq. Line :    1
Sample Name     : C50-R1                           Vial      :    1
Acq. Operator   : Beatriz-Marta                    Inj       :    1
                                                    Inj Volume: 20 µl

Acq. Method     : C:\HPCHEM\1\METHODS\MORA.M
Last changed    : 31/03/1999 01:26:42 PM by Beatriz-Marta
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\MORA.M
Last changed    : 16/09/1999 06:59:42 PM by Marta-Beatriz
                (modified after loading)
  
```

muestras mora 50 dias 3 marcacion.



External Standard Report

```

Sorted By           : Signal
Calib. Data Modified : 15/06/1999 04:34:16 PM
Multiplier          : 1.0000
Dilution            : 5.0000
  
```

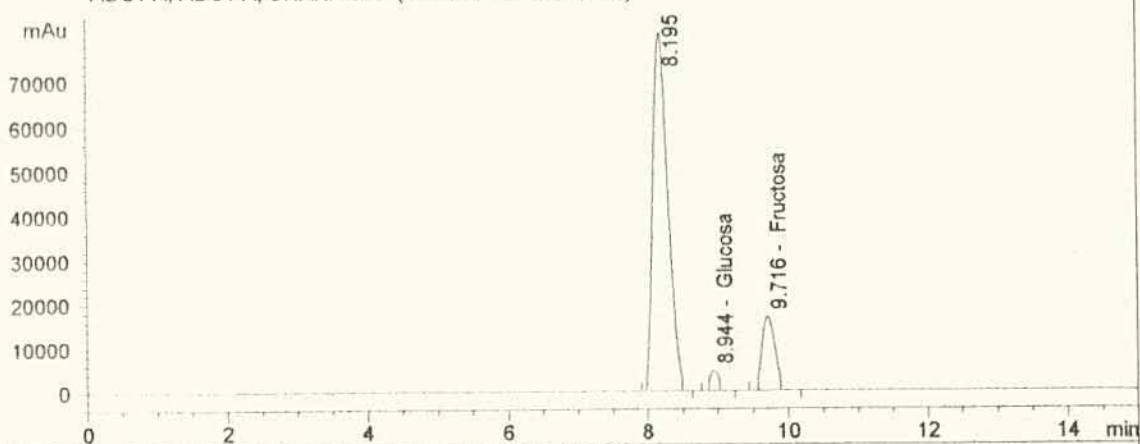
Signal 1: ADC1 A, ADC1 A, CHANNEL A

Injection Date : 31/03/1999 02:24:07 PM Seq. Line : 3
Sample Name : S50-R1 Vial : 4
Acq. Operator : Beatriz-Marta Inj : 1
Inj Volume : 20 µl

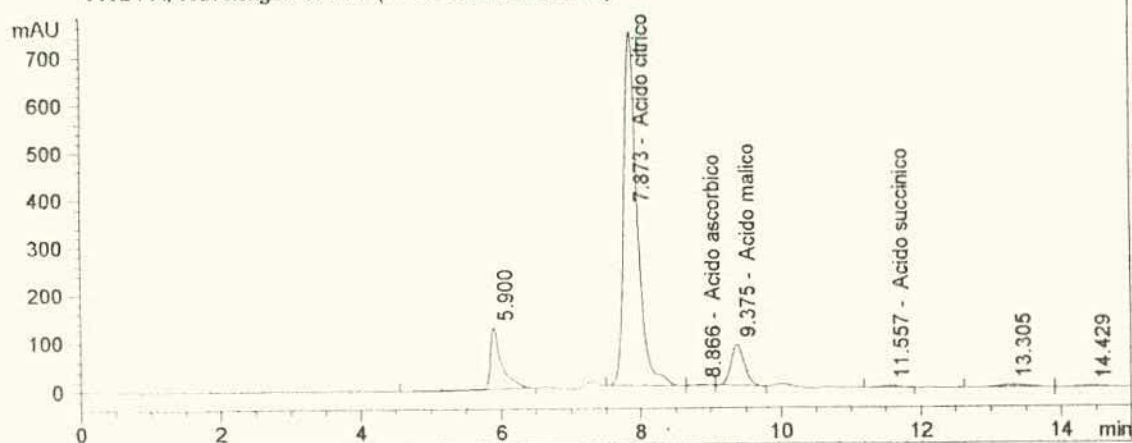
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\MORA.M
Last changed : 31/03/1999 01:26:42 PM by Beatriz-Marta
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\MORA.M
Last changed : 16/09/1999 06:59:42 PM by Marta-Beatriz
(modified after loading)

muestras mora 50 dias 3 marcacion.

ADC1 A, ADC1 A, CHANNEL A (31-03-99.A\004-0301.D)



VWD1 A, Wavelength=210 nm (31-03-99.A\004-0301.D)



External Standard Report

Sorted By : Signal
Calib. Data Modified : 15/06/1999 04:34:16 PM
Multiplier : 1.0000
Dilution : 5.0000

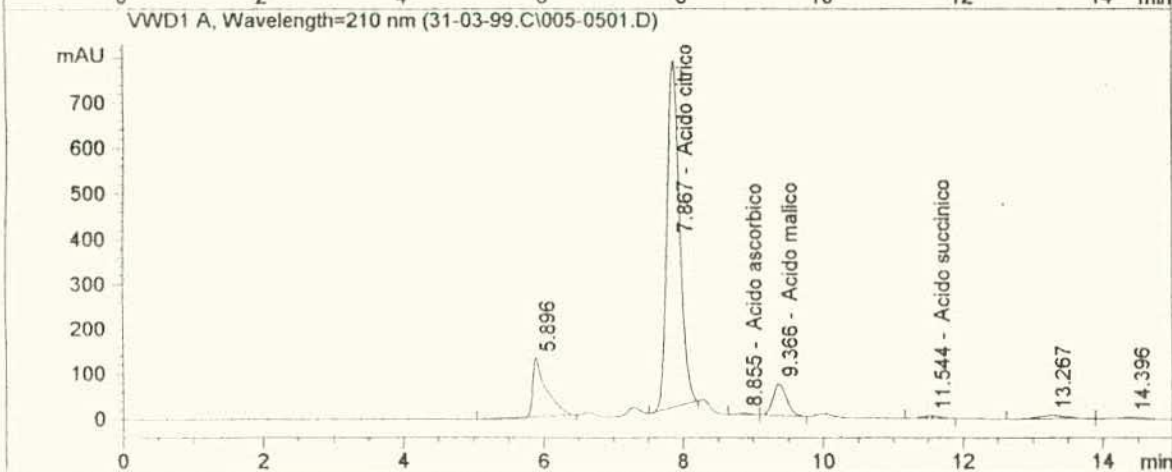
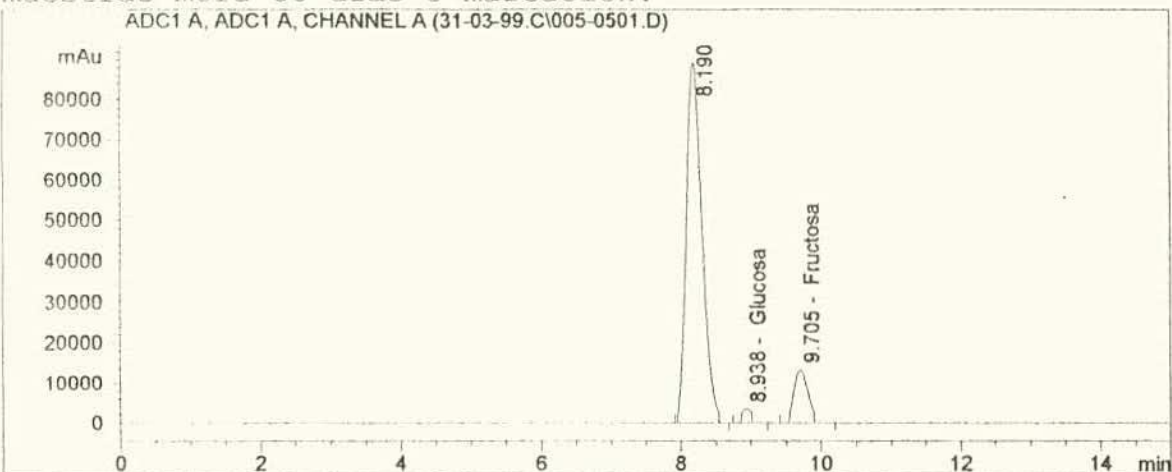
Signal 1: ADC1 A, ADC1 A, CHANNEL A

```

=====
Injection Date   : 31/03/1999 03:59:19 PM          Seq. Line :    5
Sample Name     : V50-R1                          Vial      :    5
Acq. Operator  : Beatriz-Marta                    Inj       :    1
                                                    Inj Volume: 20 µl

Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\MORA.M
Last changed   : 31/03/1999 01:26:42 PM by Beatriz-Marta
Analysis Method: C:\HPCHEM\1\METHODS\MORA.M
Last changed   : 16/09/1999 06:59:42 PM by Marta-Beatriz
                (modified after loading)
    
```

muestras mora 50 dias 3 marcacion.



External Standard Report

```

Sorted By           : Signal
Calib. Data Modified : 15/06/1999 04:34:16 PM
Multiplier         : 1.0000
Dilution           : 5.0000
    
```

Signal 1: ADC1 A, ADC1 A, CHANNEL A

Cerezos 55 dias, repeticion 2.

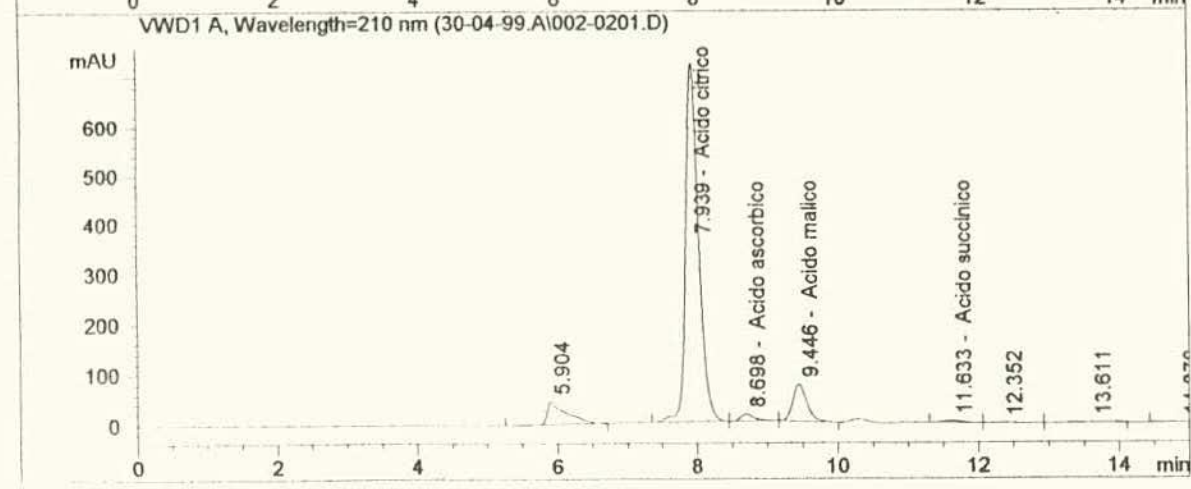
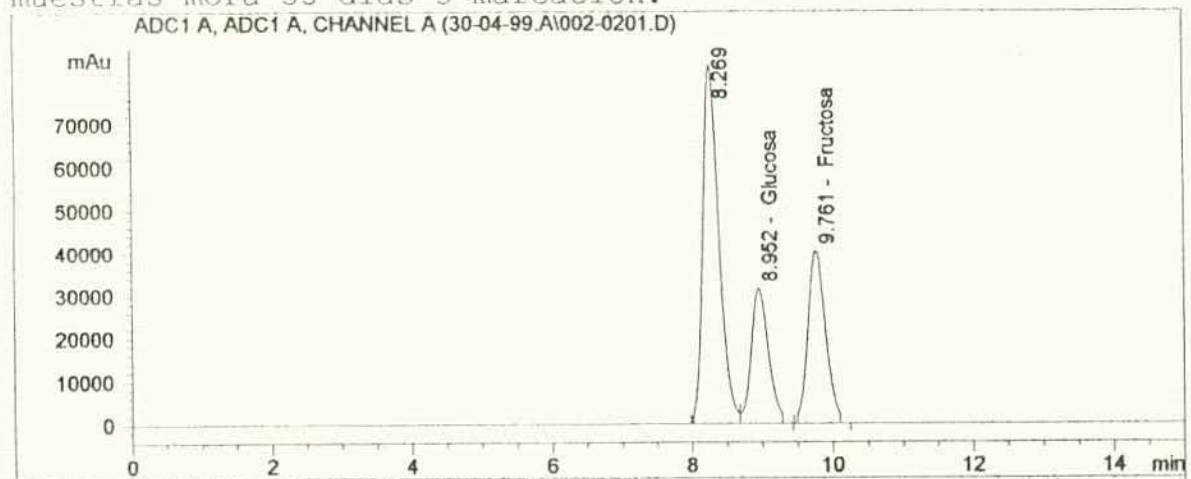
```

=====
Injection Date   : 3/05/1999 11:20:16 AM           Seq. Line   :    2
Sample Name     : C55R2                           Vial        :    2
Acq. Operator   : Beatriz-Martha                  Inj         :    1
                                                    Inj Volume  : 20 µl

Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\MORA.M
Last changed   : 3/05/1999 10:30:07 AM by Beatriz-Martha
Analysis Method: C:\HPCHEM\1\METHODS\MORA.M
Last changed   : 16/09/1999 07:10:46 PM by Marta-Beatriz
                (modified after loading)
=====

```

muestras mora 55 dias 3 marcacion.



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

```

Sorted By           : Signal
Calib. Data Modified : 15/06/1999 04:34:16 PM
Multiplier          : 1.0000
Dilution            : 5.0000

```

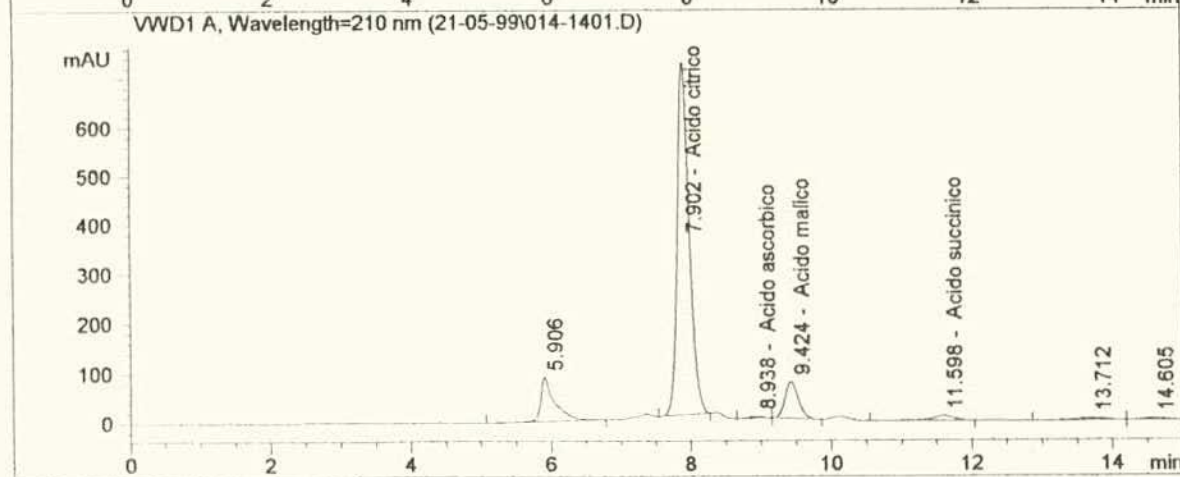
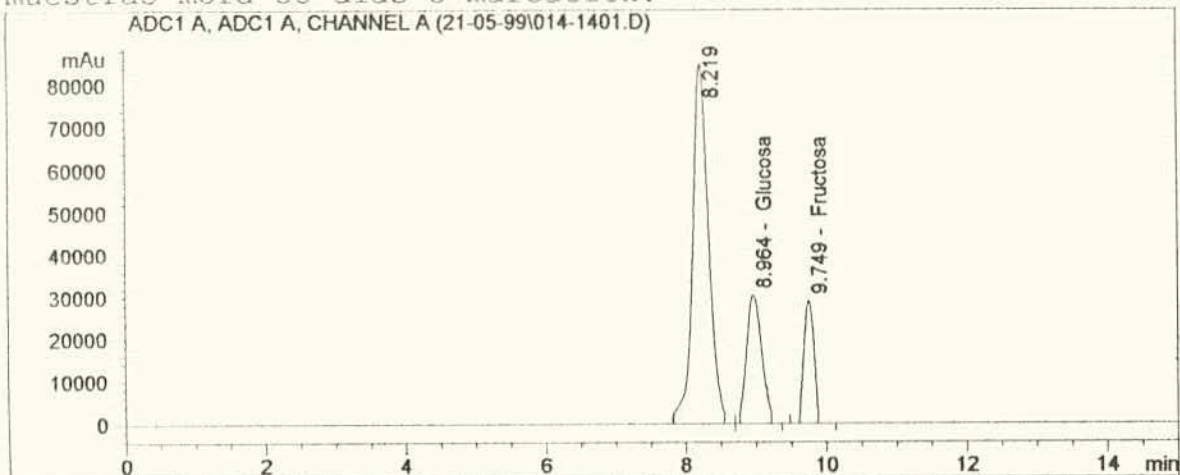
SARA II 55 DIAS REPETICION 2. TERCERA MARCACION.

```

=====
Injection Date   : 16/06/1999 10:40:22 AM           Seq. Line :   14
Sample Name     : S55R2                             Vial      :   14
Acq. Operator  : marta-beatriz                      Inj       :    1
                                                    Inj Volume: 20 µl

Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\MORA.M
Last changed   : 15/06/1999 04:49:25 PM by marta-beatriz
Analysis Method: C:\HPCHEM\1\METHODS\MORA.M
Last changed   : 16/09/1999 07:10:46 PM by Marta-Beatriz
                (modified after loading)
    
```

muestras mora 55 dias 3 marcacion.



External Standard Report

```

=====
Sorted By       : Signal
Calib. Data Modified : 15/06/1999 04:34:16 PM
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 5.0000
    
```


Villa Maria 60 dias. repeticion1

```

=====
Injection Date   : 4/05/1999 02:13:47 PM           Seq. Line :    7
Sample Name     : V60R1                             Vial      :    7
Acq. Operator   : Beatriz-Martha                   Inj       :    1
                                                    Inj Volume: 20 µl
=====

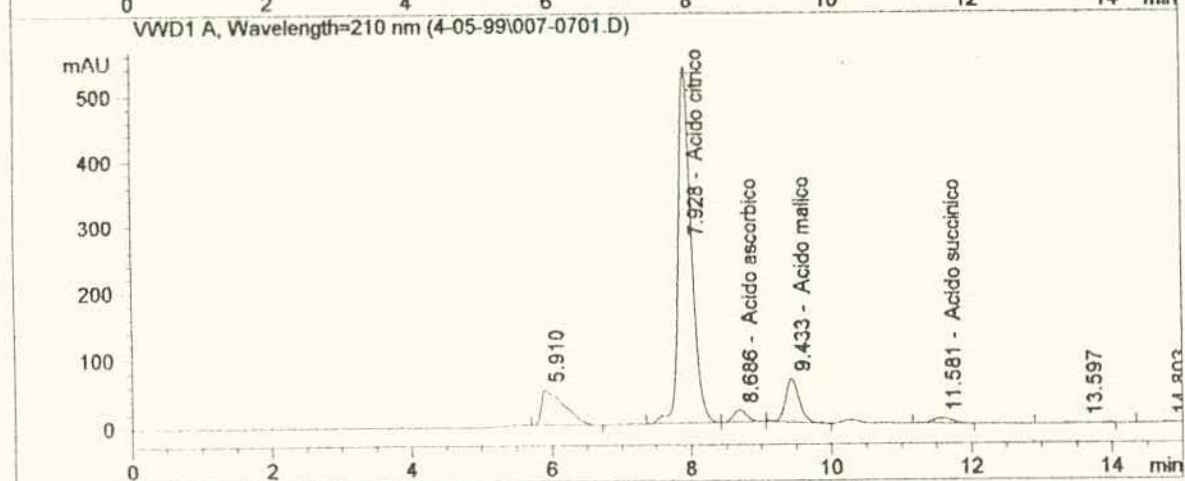
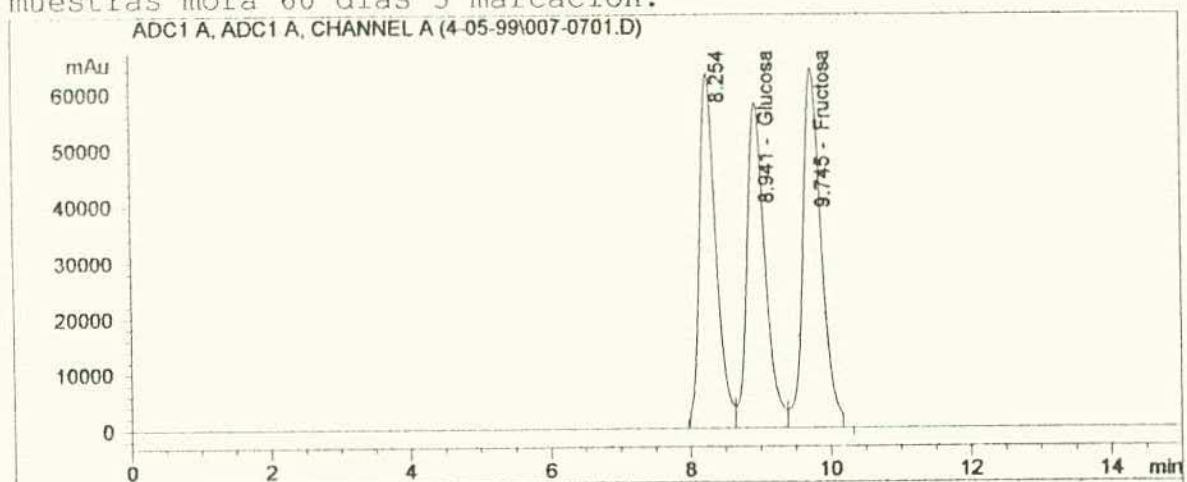
```

```

Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\MORA.M
Last changed   : 4/05/1999 02:12:42 PM by Beatriz-Martha
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\MORA.M
Last changed   : 16/09/1999 06:46:41 PM by Marta-Beatriz
                (modified after loading)

```

muestras mora 60 dias 3 marcacion.



```

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

```

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 15/06/1999 04:34:16 PM
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 5.0000

```

**Anexo 4. Resultados Análisis estadístico realizado bajo el SAS.
Variables físicas de mora. Marcación 1.**

| OBS | VARI | EPO | REP | PH | ACI | BRIX |
|-----|------|-----|-----|------|------|------|
| 1 | 1 | 45 | 1 | 2.88 | 3.85 | 4.4 |
| 2 | 1 | 45 | 2 | 2.89 | 3.81 | 4.6 |
| 3 | 1 | 45 | 3 | 2.89 | 3.70 | 4.4 |
| 4 | 1 | 50 | 1 | 2.70 | 4.00 | 5.2 |
| 5 | 1 | 50 | 2 | 2.63 | 4.40 | 5.3 |
| 6 | 1 | 50 | 3 | 2.70 | 3.60 | 5.1 |
| 7 | 1 | 55 | 1 | 2.77 | 3.05 | 6.1 |
| 8 | 1 | 55 | 2 | 2.59 | 4.35 | 5.9 |
| 9 | 1 | 55 | 3 | 2.63 | 3.78 | 5.9 |
| 10 | 1 | 60 | 1 | 2.76 | 3.10 | 4.0 |
| 11 | 1 | 60 | 2 | 2.79 | 3.20 | 3.8 |
| 12 | 1 | 60 | 3 | 2.74 | 3.10 | 4.0 |
| 13 | 2 | 45 | 1 | 2.85 | 3.70 | 4.0 |
| 14 | 2 | 45 | 2 | 2.84 | 4.15 | 4.2 |
| 15 | 2 | 45 | 3 | 2.84 | 3.68 | 4.0 |
| 16 | 2 | 50 | 1 | 2.77 | 3.35 | 7.1 |
| 17 | 2 | 50 | 2 | 2.69 | 4.35 | 7.0 |
| 18 | 2 | 50 | 3 | 2.70 | 4.32 | 6.9 |
| 19 | 2 | 55 | 1 | 2.68 | 3.05 | 6.8 |
| 20 | 2 | 55 | 2 | 2.66 | 3.44 | 7.0 |
| 21 | 2 | 55 | 3 | 2.71 | 3.30 | 6.7 |
| 22 | 2 | 60 | 1 | 2.72 | 2.51 | 4.0 |
| 23 | 2 | 60 | 2 | 2.74 | 2.61 | 3.8 |
| 24 | 2 | 60 | 3 | 2.77 | 2.65 | 4.0 |
| 25 | 3 | 45 | 1 | 2.71 | 3.00 | 3.0 |
| 26 | 3 | 45 | 2 | 2.73 | 3.10 | 3.1 |
| 27 | 3 | 45 | 3 | 2.71 | 3.00 | 3.1 |
| 28 | 3 | 50 | 1 | 2.72 | 4.22 | 5.8 |
| 29 | 3 | 50 | 2 | 2.76 | 4.30 | 5.9 |
| 30 | 3 | 50 | 3 | 2.79 | 4.40 | 6.0 |
| 31 | 3 | 55 | 1 | 2.60 | 3.90 | 4.0 |
| 32 | 3 | 55 | 2 | 2.70 | 2.70 | 5.0 |
| 33 | 3 | 55 | 3 | 2.66 | 3.62 | 5.0 |
| 34 | 3 | 60 | 1 | 2.80 | 2.61 | 6.5 |
| 35 | 3 | 60 | 2 | 2.75 | 3.10 | 6.0 |
| 36 | 3 | 60 | 3 | 2.80 | 2.70 | 6.0 |

Analysis of Variance Procedure

Class Levels Values

VARI 3 1 2 3

EPO 4 45 50 55 60

REP 3 1 2 3

Number of observations in data set = 36

Dependent Variable: **PH**

| Source | DF | Sum of Squares | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-----------------|----|----------------|-------------|---------|--------|
| Model | 17 | 0.17899167 | 0.01052892 | 6.61 | 0.0001 |
| Error | 18 | 0.02868333 | 0.00159352 | | |
| Corrected Total | 35 | 0.20767500 | | | |

| R-Square | C.V. | Root MSE | PH Mean |
|----------|-----------|------------|------------|
| 0.861884 | 1.4564512 | 0.03991890 | 2.74083333 |

| Source | DF | Anova SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|----------|----|------------|-------------|---------|--------|
| REP | 2 | 0.00181667 | 0.00090833 | 0.57 | 0.5754 |
| VARI | 2 | 0.00320000 | 0.00160000 | 1.00 | 0.3860 |
| VARI*REP | 4 | 0.00783333 | 0.00195833 | 1.23 | 0.3336 |
| EPO | 3 | 0.10909722 | 0.03636574 | 22.82 | 0.0001 |
| VARI*EPO | 6 | 0.05704444 | 0.00950741 | 5.97 | 0.0014 |

Tests of Hypotheses using the Anova MS for VARI*REP as an error term

| Source | DF | Anova SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|--------|----|------------|-------------|---------|--------|
| VARI | 2 | 0.00320000 | 0.00160000 | 0.82 | 0.5041 |

Dependent Variable: **ACIDEZ**

| Source | DF | Sum of Squares | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-----------------|----|----------------|-------------|---------|--------|
| Model | 17 | 10.42331667 | 0.61313627 | 5.51 | 0.0004 |
| Error | 18 | 2.00418333 | 0.11134352 | | |
| Corrected Total | 35 | 12.42750000 | | | |

| R-Square | C.V. | Root MSE | ACI Mean |
|----------|-----------|------------|------------|
| 0.838730 | 9.5565183 | 0.33368176 | 3.49166667 |

| Source | DF | Anova SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|----------|----|------------|-------------|---------|--------|
| REP | 2 | 0.41901667 | 0.20950833 | 1.88 | 0.1811 |
| VARI | 2 | 0.52901667 | 0.26450833 | 2.38 | 0.1215 |
| VARI*REP | 4 | 0.58906667 | 0.14726667 | 1.32 | 0.2995 |
| EPO | 3 | 7.21707778 | 2.40569259 | 21.61 | 0.0001 |
| VARI*EPO | 6 | 1.66913889 | 0.27818981 | 2.50 | 0.0616 |

Tests of Hypotheses using the Anova MS for VARI*REP as an error term

| Source | DF | Anova SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|--------|----|------------|-------------|---------|--------|
| VARI | 2 | 0.52901667 | 0.26450833 | 1.80 | 0.2776 |

Dependent Variable: **BRIX**

| Source | DF | Sum of Squares | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-----------------|----|----------------|-------------|---------|--------|
| Model | 17 | 53.12833333 | 3.12519608 | 59.11 | 0.0001 |
| Error | 18 | 0.95166667 | 0.05287037 | | |
| Corrected Total | 35 | 54.08000000 | | | |

| R-Square | C.V. | Root MSE | BRIX Mean |
|----------|-----------|------------|------------|
| 0.982403 | 4.5085408 | 0.22993558 | 5.10000000 |

Analysis of Variance Procedure
 Duncan's Multiple Range Test for variable: **BRIX**
 NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate,
 not the experimentwise error rate

Alpha= 0.05 df= 4 MSE= .0266667

Number of Means 2 3
 Critical Range .18543404 .18935819

Means with the same letter are not significantly different.

| Duncan Grouping | Mean | N | VARI |
|-----------------|--------|----|------|
| A | 5.4583 | 12 | 2 |
| B | 4.9500 | 12 | 3 |
| B | | | |
| B | 4.8917 | 12 | 1 |

Analysis of Variance Procedure
 Duncan's Multiple Range Test for variable: **PH**
 NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate,
 not the experimentwise error rate

Alpha= 0.05 df= 18 MSE= .0015935

Number of Means 2 3 4
 Critical Range .03947487 .04144115 .04279955

Means with the same letter are not significantly different.

| Duncan Grouping | Mean | N | EPO |
|-----------------|--------|---|-----|
| A | 2.8156 | 9 | 45 |
| B | 2.7633 | 9 | 60 |
| C | 2.7178 | 9 | 50 |
| D | 2.6667 | 9 | 55 |

Analysis of Variance Procedure
 Duncan's Multiple Range Test for variable: **ACIDEZ**
 NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate,
 not the experimentwise error rate

Alpha= 0.05 df= 18 MSE= .1113435

Number of Means 2 3 4
 Critical Range .32997014 .34640626 .35776107

Means with the same letter are not significantly different.

| Duncan Grouping | Mean | N | EPO |
|-----------------|-------|---|-----|
| A | 4.104 | 9 | 50 |
| B | 3.554 | 9 | 45 |
| B | | | |
| B | 3.466 | 9 | 55 |
| C | 2.842 | 9 | 60 |

| Source | DF | Anova SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|----------|----|-------------|-------------|---------|--------|
| REP | 2 | 0.02166667 | 0.01083333 | 0.20 | 0.8166 |
| VARI | 2 | 2.33166667 | 1.16583333 | 22.05 | 0.0001 |
| VARI*REP | 4 | 0.10666667 | 0.02666667 | 0.50 | 0.7330 |
| EPO | 3 | 27.82888889 | 9.27629630 | 175.45 | 0.0001 |
| VARI*EPO | 6 | 22.83944444 | 3.80657407 | 72.00 | 0.0001 |

Tests of Hypotheses using the Anova MS for VARI*REP as an error term

| Source | DF | Anova SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|--------|----|------------|-------------|---------|--------|
| VARI | 2 | 2.33166667 | 1.16583333 | 43.72 | 0.0019 |

Analysis of Variance Procedure

Duncan's Multiple Range Test for variable: **PH**

NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate

Alpha= 0.05 df= 4 MSE= .0019583
 Number of Means 2 3
 Critical Range .05025143 .05131485

Means with the same letter are not significantly different.

| Duncan Grouping | Mean | N | VARI |
|-----------------|--------|----|------|
| A | 2.7475 | 12 | 1 |
| A | | | |
| A | 2.7475 | 12 | 2 |
| A | | | |
| A | 2.7275 | 12 | 3 |

Analysis of Variance Procedure

Duncan's Multiple Range Test for variable: **ACIDEZ**

NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate

Alpha= 0.05 df= 4 MSE= .1472667
 Number of Means 2 3
 Critical Range .43576999 .44499174

Means with the same letter are not significantly different.

| Duncan Grouping | Mean | N | VARI |
|-----------------|-------|----|------|
| A | 3.662 | 12 | 1 |
| A | | | |
| A | 3.426 | 12 | 2 |
| A | | | |
| A | 3.388 | 12 | 3 |

Analysis of Variance Procedure

Duncan's Multiple Range Test for variable: **BRIX**

NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate,
not the experimentwise error rate

Alpha= 0.05 df= 18 MSE= .0528704

Number of Means 2 3 4

Critical Range .22737795 .23870386 0.2465283

Means with the same letter are not significantly different.

| Duncan Grouping | Mean | N | EPO |
|-----------------|-------|---|-----|
| A | 6.033 | 9 | 50 |
| A | | | |
| A | 5.822 | 9 | 55 |
| B | 4.678 | 9 | 60 |
| C | 3.867 | 9 | 45 |

| Level of VARI | Level of EPO | N | -----PH----- | | -----ACIDEZ----- | |
|---------------|--------------|---|--------------|------------|------------------|------------|
| | | | Mean | SD | Mean | SD |
| 1 | 45 | 3 | 2.88666667 | 0.00577350 | 3.78666667 | 0.07767453 |
| 1 | 50 | 3 | 2.67666667 | 0.04041452 | 4.00000000 | 0.40000000 |
| 1 | 55 | 3 | 2.66333333 | 0.09451631 | 3.72666667 | 0.65163896 |
| 1 | 60 | 3 | 2.76333333 | 0.02516611 | 3.13333333 | 0.05773503 |
| 2 | 45 | 3 | 2.84333333 | 0.00577350 | 3.84333333 | 0.26576932 |
| 2 | 50 | 3 | 2.72000000 | 0.04358899 | 4.00666667 | 0.56888780 |
| 2 | 55 | 3 | 2.68333333 | 0.02516611 | 3.26333333 | 0.19756855 |
| 2 | 60 | 3 | 2.74333333 | 0.02516611 | 2.59000000 | 0.07211103 |
| 3 | 45 | 3 | 2.71666667 | 0.01154701 | 3.03333333 | 0.05773503 |
| 3 | 50 | 3 | 2.75666667 | 0.03511885 | 4.30666667 | 0.09018500 |
| 3 | 55 | 3 | 2.65333333 | 0.05033223 | 3.40666667 | 0.62780039 |
| 3 | 60 | 3 | 2.78333333 | 0.02886751 | 2.80333333 | 0.26083200 |

| Level of VARI | Level of EPO | N | -----BRIX----- | |
|---------------|--------------|---|----------------|------------|
| | | | Mean | SD |
| 1 | 45 | 3 | 4.46666667 | 0.11547005 |
| 1 | 50 | 3 | 5.20000000 | 0.10000000 |
| 1 | 55 | 3 | 5.96666667 | 0.11547005 |
| 1 | 60 | 3 | 3.93333333 | 0.11547005 |
| 2 | 45 | 3 | 4.06666667 | 0.11547005 |
| 2 | 50 | 3 | 7.00000000 | 0.10000000 |
| 2 | 55 | 3 | 6.83333333 | 0.15275252 |
| 2 | 60 | 3 | 3.93333333 | 0.11547005 |
| 3 | 45 | 3 | 3.06666667 | 0.05773503 |
| 3 | 50 | 3 | 5.90000000 | 0.10000000 |
| 3 | 55 | 3 | 4.66666667 | 0.57735027 |
| 3 | 60 | 3 | 6.16666667 | 0.28867513 |

**Resultados análisis estadístico realizado bajo el SAS.
Variables físicas de mora. Marcación 2.**

| OBS | VARI | EPO | REP | PH | ACI | BRIX |
|-----|------|-----|-----|------|------|------|
| 1 | 1 | 45 | 1 | 2.53 | 3.70 | 4.0 |
| 2 | 1 | 45 | 2 | 2.56 | 3.70 | 4.0 |
| 3 | 1 | 45 | 3 | 2.65 | 3.70 | 4.0 |
| 4 | 1 | 50 | 1 | 2.46 | 4.92 | 5.8 |
| 5 | 1 | 50 | 2 | 2.38 | 4.79 | 5.0 |
| 6 | 1 | 50 | 3 | 2.45 | 4.72 | 5.0 |
| 7 | 1 | 55 | 1 | 2.48 | 3.52 | 4.1 |
| 8 | 1 | 55 | 2 | 2.53 | 3.68 | 5.0 |
| 9 | 1 | 55 | 3 | 2.51 | 3.38 | 5.5 |
| 10 | 1 | 60 | 1 | 2.74 | 2.21 | 7.0 |
| 11 | 1 | 60 | 2 | 2.78 | 2.18 | 7.0 |
| 12 | 1 | 60 | 3 | 2.72 | 2.55 | 6.8 |
| 13 | 2 | 45 | 1 | 2.53 | 4.02 | 4.5 |
| 14 | 2 | 45 | 2 | 2.48 | 4.02 | 4.2 |
| 15 | 2 | 45 | 3 | 2.47 | 4.02 | 4.5 |
| 16 | 2 | 50 | 1 | 2.47 | 4.86 | 6.0 |
| 17 | 2 | 50 | 2 | 2.52 | 4.80 | 5.8 |
| 18 | 2 | 50 | 3 | 2.48 | 4.89 | 5.8 |
| 19 | 2 | 55 | 1 | 2.55 | 3.48 | 5.3 |
| 20 | 2 | 55 | 2 | 2.65 | 3.58 | 5.5 |
| 21 | 2 | 55 | 3 | 2.56 | 3.48 | 5.0 |
| 22 | 2 | 60 | 1 | 2.87 | 2.28 | 6.8 |
| 23 | 2 | 60 | 2 | 2.82 | 2.18 | 6.5 |
| 24 | 2 | 60 | 3 | 2.88 | 2.25 | 6.5 |
| 25 | 3 | 45 | 1 | 2.49 | 3.69 | 4.0 |
| 26 | 3 | 45 | 2 | 2.51 | 4.15 | 5.0 |
| 27 | 3 | 45 | 3 | 2.52 | 4.35 | 4.5 |
| 28 | 3 | 50 | 1 | 2.40 | 4.89 | 5.2 |
| 29 | 3 | 50 | 2 | 2.40 | 4.62 | 5.0 |
| 30 | 3 | 50 | 3 | 2.36 | 4.42 | 5.0 |
| 31 | 3 | 55 | 1 | 2.47 | 4.12 | 6.0 |
| 32 | 3 | 55 | 2 | 2.50 | 3.65 | 5.0 |
| 33 | 3 | 55 | 3 | 2.46 | 3.85 | 5.0 |
| 34 | 3 | 60 | 1 | 2.69 | 2.68 | 7.2 |
| 35 | 3 | 60 | 2 | 2.72 | 2.65 | 7.2 |
| 36 | 3 | 60 | 3 | 2.72 | 2.68 | 7.5 |

Analysis of Variance Procedure
 Class Level Information
 Class Levels Values
 VARI 3 1 2 3
 EPO 4 45 50 55 60
 REP 3 1 2 3
 Number of observations in data set = 36

Dependent Variable: **PH**

| Source | DF | Sum of Squares | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-----------------|----|----------------|-------------|---------|--------|
| Model | 17 | 0.64917500 | 0.03818676 | 26.75 | 0.0001 |
| Error | 18 | 0.02570000 | 0.00142778 | | |
| Corrected Total | 35 | 0.67487500 | | | |

| | R-Square | C.V. | Root MSE | PH Mean | |
|----------|----------|------------|-------------|------------|--------|
| | 0.961919 | 1.4736151 | 0.03778595 | 2.56416667 | |
| Source | DF | Anova SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
| REP | 2 | 0.00121667 | 0.00060833 | 0.43 | 0.6595 |
| VARI | 2 | 0.04511667 | 0.02255833 | 15.80 | 0.0001 |
| VARI*REP | 4 | 0.00241667 | 0.00060417 | 0.42 | 0.7899 |
| EPO | 3 | 0.56196389 | 0.18732130 | 131.20 | 0.0001 |
| VARI*EPO | 6 | 0.03846111 | 0.00641019 | 4.49 | 0.0060 |

Tests of Hypotheses using the Anova MS for VARI*REP as an error term

| Source | DF | Anova SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|--------|----|------------|-------------|---------|--------|
| VARI | 2 | 0.04511667 | 0.02255833 | 37.34 | 0.0026 |

Dependent Variable: **ACIDEZ**

| Source | DF | Sum of Squares | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-----------------|----|----------------|-------------|---------|--------|
| Model | 17 | 26.70218333 | 1.57071667 | 46.74 | 0.0001 |
| Error | 18 | 0.60491667 | 0.03360648 | | |
| Corrected Total | 35 | 27.30710000 | | | |

| | R-Square | C.V. | Root MSE | ACI Mean | |
|----------|----------|-------------|-------------|------------|--------|
| | 0.977848 | 4.9747817 | 0.18332071 | 3.68500000 | |
| Source | DF | Anova SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
| REP | 2 | 0.00631667 | 0.00315833 | 0.09 | 0.9107 |
| VARI | 2 | 0.31995000 | 0.15997500 | 4.76 | 0.0219 |
| VARI*REP | 4 | 0.00723333 | 0.00180833 | 0.05 | 0.9941 |
| EPO | 3 | 25.80943333 | 8.60314444 | 256.00 | 0.0001 |
| VARI*EPO | 6 | 0.55925000 | 0.09320833 | 2.77 | 0.0434 |

Tests of Hypotheses using the Anova MS for VARI*REP as an error term

| Source | DF | Anova SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|--------|----|------------|-------------|---------|--------|
| VARI | 2 | 0.31995000 | 0.15997500 | 88.47 | 0.0005 |

Dependent Variable: **BRIX**

| Source | DF | Sum of Squares | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-----------------|----|----------------|-------------|---------|--------|
| Model | 17 | 35.51166667 | 2.08892157 | 13.15 | 0.0001 |
| Error | 18 | 2.85833333 | 0.15879630 | | |
| Corrected Total | 35 | 38.37000000 | | | |

| | R-Square | C.V. | Root MSE | BRIX Mean |
|--|----------|-----------|------------|------------|
| | 0.925506 | 7.3117895 | 0.39849253 | 5.45000000 |

| Source | DF | Anova SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|----------|----|-------------|-------------|---------|--------|
| REP | 2 | 0.03166667 | 0.01583333 | 0.10 | 0.9056 |
| VARI | 2 | 0.60666667 | 0.30333333 | 1.91 | 0.1769 |
| VARI*REP | 4 | 0.09666667 | 0.02416667 | 0.15 | 0.9596 |
| EPO | 3 | 32.80555556 | 10.93518519 | 68.86 | 0.0001 |
| VARI*EPO | 6 | 1.97111111 | 0.32851852 | 2.07 | 0.1084 |

Tests of Hypotheses using the Anova MS for VARI*REP as an error term

| Source | DF | Anova SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|--------|----|------------|-------------|---------|--------|
| VARI | 2 | 0.60666667 | 0.30333333 | 12.55 | 0.0189 |

Analysis of Variance Procedure

Duncan's Multiple Range Test for variable: **PH**

NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate,
not the experimentwise error rate

Alpha= 0.05 df= 4 MSE= .0006042
Number of Means 2 3
Critical Range .02791152 .02850218

Means with the same letter are not significantly different.

| Duncan Grouping | Mean | N | VARI |
|-----------------|--------|----|------|
| A | 2.6067 | 12 | 2 |
| B | 2.5658 | 12 | 1 |
| C | 2.5200 | 12 | 3 |

Analysis of Variance Procedure

Duncan's Multiple Range Test for variable: **ACIDEZ**

NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate,
not the experimentwise error rate

Alpha= 0.05 df= 4 MSE= .0018083
Number of Means 2 3
Critical Range .04828857 .04931045

Means with the same letter are not significantly different.

| Duncan Grouping | Mean | N | VARI |
|-----------------|--------|----|------|
| A | 3.8125 | 12 | 3 |
| B | 3.6550 | 12 | 2 |
| C | 3.5875 | 12 | 1 |

Analysis of Variance Procedure

Duncan's Multiple Range Test for variable: **BRIX**

NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate,
not the experimentwise error rate

Alpha= 0.05 df= 4 MSE= .0241667
 Number of Means 2 3
 Critical Range .17652795 .18026362

Means with the same letter are not significantly different.

| Duncan Grouping | Mean | N | VARI |
|-----------------|--------|----|------|
| A | 5.5500 | 12 | 3 |
| A | | | |
| A | 5.5333 | 12 | 2 |
| B | 5.2667 | 12 | 1 |

Analysis of Variance Procedure

Duncan's Multiple Range Test for variable: **PH**

NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate,
 not the experimentwise error rate

Alpha= 0.05 df= 18 MSE= .0014278
 Number of Means 2 3 4
 Critical Range .03736564 .03922686 .04051267

Means with the same letter are not significantly different.

| Duncan Grouping | Mean | N | EPO |
|-----------------|--------|---|-----|
| A | 2.7711 | 9 | 60 |
| B | 2.5267 | 9 | 45 |
| B | | | |
| B | 2.5233 | 9 | 55 |
| C | 2.4356 | 9 | 50 |

Analysis of Variance Procedure

Duncan's Multiple Range Test for variable: **ACIDEZ**

NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate,
 not the experimentwise error rate

Alpha= 0.05 df= 18 MSE= .0336065
 Number of Means 2 3 4
 Critical Range .18128158 .19031139 .19654958

Means with the same letter are not significantly different.

| Duncan Grouping | Mean | N | EPO |
|-----------------|--------|---|-----|
| A | 4.7678 | 9 | 50 |
| B | 3.9278 | 9 | 45 |
| C | 3.6378 | 9 | 55 |
| D | 2.4067 | 9 | 60 |

Analysis of Variance Procedure
 Duncan's Multiple Range Test for variable: **BRIX**
 NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate,
 not the experimentwise error rate

Alpha= 0.05 df= 18 MSE= .1587963
 Number of Means 2 3 4
 Critical Range 0.39406 0.4136885 .42724874

Means with the same letter are not significantly different.

| Duncan Grouping | Mean | N | EPO |
|-----------------|-------|---|-----|
| A | 6.944 | 9 | 60 |
| B | 5.400 | 9 | 50 |
| B | | | |
| B | 5.156 | 9 | 55 |
| C | 4.300 | 9 | 45 |

| Level of VARI | Level of EPO | N | -----PH----- | | -----ACIDEZ----- | |
|---------------|--------------|---|--------------|------------|------------------|------------|
| | | | Mean | SD | Mean | SD |
| 1 | 45 | 3 | 2.5800000 | 0.06244998 | 3.7000000 | 0.0000000 |
| 1 | 50 | 3 | 2.4300000 | 0.04358899 | 4.8100000 | 0.10148892 |
| 1 | 55 | 3 | 2.5066667 | 0.02516611 | 3.5266667 | 0.15011107 |
| 1 | 60 | 3 | 2.7466667 | 0.03055050 | 2.3133333 | 0.20550750 |
| 2 | 45 | 3 | 2.4933333 | 0.03214550 | 4.0200000 | 0.0000000 |
| 2 | 50 | 3 | 2.4900000 | 0.02645751 | 4.8500000 | 0.04582576 |
| 2 | 55 | 3 | 2.5866667 | 0.05507571 | 3.5133333 | 0.05773503 |
| 2 | 60 | 3 | 2.8566667 | 0.03214550 | 2.2366667 | 0.05131601 |
| 3 | 45 | 3 | 2.5066667 | 0.01527525 | 4.0633333 | 0.33842774 |
| 3 | 50 | 3 | 2.3866667 | 0.02309401 | 4.6433333 | 0.23586719 |
| 3 | 55 | 3 | 2.4766667 | 0.02081666 | 3.8733333 | 0.23586719 |
| 3 | 60 | 3 | 2.7100000 | 0.01732051 | 2.6700000 | 0.01732051 |

| Level of VARI | Level of EPO | N | -----BRIX----- | |
|---------------|--------------|---|----------------|------------|
| | | | Mean | SD |
| 1 | 45 | 3 | 4.0000000 | 0.0000000 |
| 1 | 50 | 3 | 5.2666667 | 0.46188022 |
| 1 | 55 | 3 | 4.8666667 | 0.70945989 |
| 1 | 60 | 3 | 6.9333333 | 0.11547005 |
| 2 | 45 | 3 | 4.4000000 | 0.17320508 |
| 2 | 50 | 3 | 5.8666667 | 0.11547005 |
| 2 | 55 | 3 | 5.2666667 | 0.25166115 |
| 2 | 60 | 3 | 6.6000000 | 0.17320508 |
| 3 | 45 | 3 | 4.5000000 | 0.5000000 |
| 3 | 50 | 3 | 5.0666667 | 0.11547005 |
| 3 | 55 | 3 | 5.3333333 | 0.57735027 |
| 3 | 60 | 3 | 7.3000000 | 0.17320508 |

Anexo 5. Resultados análisis estadístico realizado bajo el SAS
VARIABLES QUÍMICAS DE MORA. MARCACIÓN 1.

| OBS | TRAT | VARI | EPO | REP | GLU | FRU | CITRI | ASCO | MAL | SUC |
|-----|------|------|-----|-----|-------|-------|-------|------|------|------|
| 1 | 1 | 1 | 45 | 1 | 4574 | 7013 | 42000 | 3126 | 2866 | 823 |
| 2 | 1 | 1 | 45 | 2 | 4449 | 8404 | 46000 | 3701 | 2911 | 942 |
| 3 | 1 | 1 | 45 | 3 | 4560 | 7971 | 45000 | 3555 | 2869 | 936 |
| 4 | 2 | 1 | 50 | 1 | 6585 | 8492 | 29000 | 927 | 2804 | 672 |
| 5 | 2 | 1 | 50 | 2 | 7690 | 11000 | 33000 | 925 | 3454 | 822 |
| 6 | 2 | 1 | 50 | 3 | 8724 | 11000 | 33000 | 1068 | 3106 | 873 |
| 7 | 3 | 1 | 55 | 1 | 17000 | 18000 | 28000 | 3227 | 2855 | 1111 |
| 8 | 3 | 1 | 55 | 2 | 13000 | 14000 | 35000 | 2316 | 3141 | 388 |
| 9 | 3 | 1 | 55 | 3 | 9857 | 12000 | 33000 | 3018 | 2656 | 783 |
| 10 | 4 | 1 | 60 | 1 | 19000 | 18000 | 24000 | 4284 | 2761 | 723 |
| 11 | 4 | 1 | 60 | 2 | 16000 | 16000 | 23000 | 3575 | 2190 | 727 |
| 12 | 4 | 1 | 60 | 3 | 18000 | 18000 | 24000 | 1832 | 3109 | 916 |
| 13 | 5 | 2 | 45 | 1 | 4654 | 14000 | 41000 | 3101 | 3841 | 947 |
| 14 | 5 | 2 | 45 | 2 | 4144 | 11000 | 41000 | 4379 | 3321 | 1100 |
| 15 | 5 | 2 | 45 | 3 | 4080 | 11000 | 35500 | 2270 | 3678 | 812 |
| 16 | 6 | 2 | 50 | 1 | 19000 | 8183 | 29000 | 2043 | 2962 | 2031 |
| 17 | 6 | 2 | 50 | 2 | 13000 | 4201 | 35000 | 2061 | 3892 | 1172 |
| 18 | 6 | 2 | 50 | 3 | 14500 | 5325 | 31000 | 2836 | 3434 | 1696 |
| 19 | 7 | 2 | 55 | 1 | 22000 | 21000 | 27000 | 3040 | 3011 | 779 |
| 20 | 7 | 2 | 55 | 2 | 18000 | 18000 | 29000 | 3492 | 3724 | 660 |
| 21 | 7 | 2 | 55 | 3 | 18000 | 18000 | 29000 | 3556 | 3189 | 1095 |
| 22 | 8 | 2 | 60 | 1 | 16000 | 16000 | 25000 | 4181 | 2877 | 1055 |
| 23 | 8 | 2 | 60 | 2 | 19000 | 19000 | 25000 | 3565 | 2768 | 880 |
| 24 | 8 | 2 | 60 | 3 | 17000 | 17000 | 24000 | 3282 | 2711 | 743 |
| 25 | 9 | 3 | 45 | 1 | 2338 | 5266 | 37000 | 3340 | 2960 | 1290 |
| 26 | 9 | 3 | 45 | 2 | 2064 | 4469 | 27000 | 2040 | 2427 | 966 |
| 27 | 9 | 3 | 45 | 3 | 1528 | 3480 | 21100 | 1954 | 1879 | 721 |
| 28 | 10 | 3 | 50 | 1 | 12000 | 3771 | 29000 | 864 | 3184 | 798 |
| 29 | 10 | 3 | 50 | 2 | 11000 | 2065 | 34000 | 2681 | 3061 | 2264 |
| 30 | 10 | 3 | 50 | 3 | 9379 | 2692 | 33000 | 1157 | 3827 | 1395 |
| 31 | 11 | 3 | 55 | 1 | 18000 | 20000 | 36000 | 7228 | 5349 | 786 |
| 32 | 11 | 3 | 55 | 2 | 23000 | 24000 | 32000 | 7889 | 4406 | 1262 |
| 33 | 11 | 3 | 55 | 3 | 24000 | 25000 | 39000 | 6919 | 4244 | 989 |
| 34 | 12 | 3 | 60 | 1 | 22000 | 21000 | 26000 | 4154 | 2761 | 877 |
| 35 | 12 | 3 | 60 | 2 | 14000 | 15000 | 26000 | 5709 | 3813 | 759 |
| 36 | 12 | 3 | 60 | 3 | 20000 | 20000 | 21000 | 3551 | 2612 | 692 |

Analysis of Variance Procedure

Class Level Information

Class Levels Values

REP 3 1 2 3

TRAT 12 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

Number of observations in data set = 36

CENTRO DE INVESTIGACION Y PROMOCIÓN
 TECNOLÓGICA DE COLOMBIA

Dependent Variable: **GLUCOSA**

| Source | DF | Sum of Squares | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-----------------|----|----------------|--------------|---------|--------|
| Model | 13 | 1501639616.61 | 115510739.74 | 22.61 | 0.0001 |
| Error | 22 | 112407408.61 | 5109427.66 | | |
| Corrected Total | 35 | 1614047025.22 | | | |

| | R-Square | C.V. | Root MSE | GLU Mean | |
|--------|----------|---------------|--------------|---------------|--------|
| | 0.930357 | 17.762484 | 2260.40431 | 12725.7222222 | |
| Source | DF | Anova SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
| REP | 2 | 14393914.06 | 7196957.03 | 1.41 | 0.2657 |
| TRAT | 11 | 1487245702.56 | 135204154.78 | 26.46 | 0.0001 |

Dependent Variable: **FRUCTOSA**

| Source | DF | Sum of Squares | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-----------------|----|----------------|--------------|---------|--------|
| Model | 13 | 1421886473.28 | 109375882.56 | 29.57 | 0.0001 |
| Error | 22 | 81364916.94 | 3698405.32 | | |
| Corrected Total | 35 | 1503251390.22 | | | |

| | R-Square | C.V. | Root MSE | FRU Mean | |
|--------|----------|---------------|--------------|---------------|--------|
| | 0.945874 | 15.072422 | 1923.12384 | 12759.2222222 | |
| Source | DF | Anova SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
| REP | 2 | 8028102.39 | 4014051.19 | 1.09 | 0.3552 |
| TRAT | 11 | 1413858370.89 | 128532579.17 | 34.75 | 0.0001 |

Dependent Variable: **CITRICO**

| Source | DF | Sum of Squares | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-----------------|----|----------------|-------------|---------|--------|
| Model | 13 | 1274457777.78 | 98035213.68 | 8.33 | 0.0001 |
| Error | 22 | 259064444.44 | 11775656.57 | | |
| Corrected Total | 35 | 1533522222.22 | | | |

| | R-Square | C.V. | Root MSE | CITRI Mean |
|--|----------|-----------|------------|---------------|
| | 0.831066 | 10.955697 | 3431.56765 | 31322.2222222 |

| Source | DF | Anova SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|--------|----|--------------|-------------|---------|--------|
| REP | 2 | 13642222.2 | 6821111.1 | 0.58 | 0.5686 |
| TRAT | 11 | 1260815555.6 | 114619596.0 | 9.73 | 0.0001 |

Dependent Variable: **ASCORBICO**

| Source | DF | Sum of Squares | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-----------------|----|----------------|--------------|---------|--------|
| Model | 13 | 86880927.6111 | 6683148.2778 | 13.52 | 0.0001 |
| Error | 22 | 10878111.6111 | 494459.6187 | | |
| Corrected Total | 35 | 97759039.2222 | | | |

| | R-Square | C.V. | Root MSE | ASCO Mean |
|--|----------|-----------|------------|--------------|
| | 0.888725 | 21.664769 | 703.178227 | 3245.7222222 |

| Source | DF | Anova SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|--------|----|--------------|-------------|---------|--------|
| REP | 2 | 2281851.056 | 1140925.528 | 2.31 | 0.1231 |
| TRAT | 11 | 84599076.556 | 7690825.141 | 15.55 | 0.0001 |

Dependent Variable: **MALICO**

| Source | DF | Sum of Squares | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-----------------|----------|----------------|-------------|---------------|--------|
| Model | 13 | 11156648.6944 | 858203.7457 | 4.74 | 0.0007 |
| Error | 22 | 3983834.9444 | 181083.4066 | | |
| Corrected Total | 35 | 15140483.6389 | | | |
| | R-Square | C.V. | Root MSE | MAL Mean | |
| | 0.736875 | 13.361537 | 425.538960 | 3184.80555556 | |

| Source | DF | Anova SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|--------|----|--------------|-------------|---------|--------|
| REP | 2 | 134123.722 | 67061.861 | 0.37 | 0.6947 |
| TRAT | 11 | 11022524.972 | 1002047.725 | 5.53 | 0.0003 |

Dependent Variable: **SUCCINICO**

| Source | DF | Sum of Squares | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-----------------|----------|----------------|--------------|--------------|--------|
| Model | 13 | 2640275.36111 | 203098.10470 | 1.98 | 0.0768 |
| Error | 22 | 2261122.27778 | 102778.28535 | | |
| Corrected Total | 35 | 4901397.63889 | | | |
| | R-Square | C.V. | Root MSE | SUC Mean | |
| | 0.538678 | 32.524331 | 320.590526 | 985.69444444 | |

| Source | DF | Anova SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|--------|----|--------------|-------------|---------|--------|
| REP | 2 | 4035.0556 | 2017.5278 | 0.02 | 0.9806 |
| TRAT | 11 | 2636240.3056 | 239658.2096 | 2.33 | 0.0438 |

Analysis of Variance Procedure

Duncan's Multiple Range Test for variable: **GLUCOSA**

NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate

Alpha= 0.05 df= 22 MSE= 5109428

| | | | | | | |
|-----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Number of Means | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| Critical Range | 3823.1235 | 4015.8983 | 4149.0306 | 4228.5545 | 4292.1096 | 4341.8954 |
| Number of Means | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | |
| Critical Range | 4381.0754 | 4412.2371 | 4437.3069 | 4457.6936 | 4474.4317 | |

Means with the same letter are not significantly different.

| Duncan Grouping | Mean | N | TRAT |
|-----------------|-------|---|------|
| A | 21667 | 3 | 11 |

| | | | |
|---|---|-------|------|
| | A | | |
| B | A | 19333 | 3 7 |
| B | A | | |
| B | A | 18667 | 3 12 |
| B | A | | |
| B | A | 17667 | 3 4 |
| B | | | |
| B | | 17333 | 3 8 |
| B | | | |
| B | C | 15500 | 3 6 |
| | C | | |
| D | C | 13286 | 3 3 |
| D | | | |
| D | E | 10793 | 3 10 |
| | E | | |
| F | E | 7666 | 3 2 |
| F | | | |
| F | G | 4528 | 3 1 |
| F | G | | |
| F | G | 4293 | 3 5 |
| | G | | |
| G | | 1977 | 3 9 |

Analysis of Variance Procedure

Duncan's Multiple Range Test for variable: **FRUCTOSA**

NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate,
not the experimentwise error rate

Alpha= 0.05 df= 22 MSE= 3698405

| | | | | | | |
|-----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Number of Means | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| Critical Range | 3252.6659 | 3416.6763 | 3529.9436 | 3597.6015 | 3651.6734 | 3694.0305 |
| Number of Means | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | |
| Critical Range | 3727.3644 | 3753.8764 | 3775.2054 | 3792.5502 | 3806.7908 | |

Means with the same letter are not significantly different.

| Duncan Grouping | Mean | N TRAT |
|-----------------|-------|--------|
| A | 23000 | 3 11 |
| B | 19000 | 3 7 |
| B | | |
| B | 18667 | 3 12 |
| B | | |
| C | 17333 | 3 8 |
| C | | |
| C | 17333 | 3 4 |
| C | | |
| C | 14667 | 3 3 |
| D | | |

| | | | |
|---|---|-------|------|
| E | D | 12000 | 3 5 |
| E | | | |
| E | F | 10164 | 3 2 |
| | F | | |
| G | F | 7796 | 3 1 |
| G | | | |
| G | H | 5903 | 3 6 |
| G | H | | |
| G | H | 4405 | 3 9 |
| | H | | |
| | H | 2843 | 3 10 |

Analysis of Variance Procedure

Duncan's Multiple Range Test for variable: **CITRICO**

NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate,
not the experimentwise error rate

Alpha= 0.05 df= 22 MSE= 11775657

| | | | | | | |
|-----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Number of Means | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| Critical Range | 5803.9648 | 6096.6203 | 6298.7312 | 6419.4582 | 6515.9424 | 6591.5233 |
| Number of Means | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | |
| Critical Range | 6651.0033 | 6698.3105 | 6736.3695 | 6767.319 | 6792.7295 | |

Means with the same letter are not significantly different.

| Duncan Grouping | Mean | N | TRAT |
|-----------------|-------|---|------|
| A | 44333 | 3 | 1 |
| A | | | |
| B | 39167 | 3 | 5 |
| B | | | |
| B | 35667 | 3 | 11 |
| C | | | |
| D | 32000 | 3 | 10 |
| D | | | |
| D | 32000 | 3 | 3 |
| D | | | |
| D | 31667 | 3 | 6 |
| D | | | |
| D | 31667 | 3 | 2 |
| D | | | |
| D | 28367 | 3 | 9 |
| D | | | |
| D | 28333 | 3 | 7 |
| E | | | |
| E | 24667 | 3 | 8 |
| E | | | |
| E | 24333 | 3 | 12 |
| E | | | |
| E | 23667 | 3 | 4 |

Analysis of Variance Procedure
 Duncan's Multiple Range Test for variable: **ASCORBICO**
 NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate,
 not the experimentwise error rate

Alpha= 0.05 df= 22 MSE= 494459.6
 Number of Means 2 3 4 5 6 7
 Critical Range 1189.317 1249.2864 1290.7018 1315.4405 1335.2116 1350.6992
 Number of Means 8 9 10 11 12
 Critical Range 1362.8875 1372.5815 1380.3803 1386.7223 1391.9293

Means with the same letter are not significantly different.

| Duncan Grouping | Mean | N | TRAT |
|-----------------|--------|---|------|
| A | 7345.3 | 3 | 11 |
| B | 4471.3 | 3 | 12 |
| B | | | |
| C B | 3676.0 | 3 | 8 |
| C B | | | |
| C B | 3460.7 | 3 | 1 |
| C B | | | |
| C B | 3362.7 | 3 | 7 |
| C B | | | |
| C B | 3250.0 | 3 | 5 |
| C B | | | |
| C B | 3230.3 | 3 | 4 |
| C | | | |
| C D | 2853.7 | 3 | 3 |
| C D | | | |
| C D | 2444.7 | 3 | 9 |
| C D | | | |
| C D | 2313.3 | 3 | 6 |
| D | | | |
| E D | 1567.3 | 3 | 10 |
| E | | | |
| E | 973.3 | 3 | 2 |

Analysis of Variance Procedure
 Duncan's Multiple Range Test for variable: **MALICO**
 NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate,
 not the experimentwise error rate

Alpha= 0.05 df= 22 MSE= 181083.4
 Number of Means 2 3 4 5 6 7
 Critical Range 719.73319 756.02457 781.08777 796.05878 808.02352 817.39609
 Number of Means 8 9 10 11 12
 Critical Range 824.77203 830.63847 835.35806 839.19601 842.34709

Means with the same letter are not significantly different.

| Duncan Grouping | Mean | N | TRAT |
|-----------------|--------|---|------|
| A | 4666.3 | 3 | 11 |
| B | 3613.3 | 3 | 5 |
| B | | | |
| C B | 3429.3 | 3 | 6 |
| C B | | | |
| C B | 3357.3 | 3 | 10 |
| C B | | | |
| C B | 3308.0 | 3 | 7 |
| C B | | | |
| C B D | 3121.3 | 3 | 2 |
| C B D | | | |
| C B D | 3062.0 | 3 | 12 |
| C B D | | | |
| C B D | 2884.0 | 3 | 3 |
| C B D | | | |
| C B D | 2882.0 | 3 | 1 |
| C B D | | | |
| C B D | 2785.3 | 3 | 8 |
| C D | | | |
| C D | 2686.7 | 3 | 4 |
| D | | | |
| D | 2422.0 | 3 | 9 |

Analysis of Variance Procedure

Duncan's Multiple Range Test for variable: **SUCCINICO**

NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate

Alpha= 0.05 df= 22 MSE= 102778.3

| | | | | | | |
|-----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Number of Means | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| Critical Range | 542.22918 | 569.57021 | 588.45221 | 599.73099 | 608.74493 | 615.80599 |
| Number of Means | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | |
| Critical Range | 621.36284 | 625.78247 | 629.33809 | 632.22952 | 634.60346 | |

Means with the same letter are not significantly different.

| Duncan Grouping | Mean | N | TRAT |
|-----------------|--------|---|------|
| A | 1633.0 | 3 | 6 |
| A | | | |
| B A | 1485.7 | 3 | 10 |
| B | | | |
| B C | 1012.3 | 3 | 11 |
| B C | | | |
| B C | 992.3 | 3 | 9 |
| B C | | | |

| | | | |
|---|---|-------|------|
| B | C | 953.0 | 3 5 |
| B | C | | |
| B | C | 900.3 | 3 1 |
| B | C | | |
| B | C | 892.7 | 3 8 |
| | C | | |
| | C | 844.7 | 3 7 |
| | C | | |
| | C | 789.0 | 3 2 |
| | C | | |
| | C | 788.7 | 3 4 |
| | C | | |
| | C | 776.0 | 3 12 |
| | C | | |
| | C | 760.7 | 3 3 |

**Resultados análisis estadístico realizado bajo el SAS.
Variables químicas de mora. Marcación 2.**

| OBS | TRAT | VARI | EPO | REP | GLU | FRU | CITRI | ASCO | MAL | SUC |
|-----|------|------|-----|-----|-------|-------|-------|------|------|------|
| 1 | 1 | 1 | 45 | 1 | 3871 | 6290 | 36000 | 1574 | 2188 | 598 |
| 2 | 1 | 1 | 45 | 2 | 3536 | 6769 | 39000 | 4183 | 2222 | 741 |
| 3 | 1 | 1 | 45 | 3 | 3009 | 5221 | 32000 | 2362 | 2378 | 1102 |
| 4 | 2 | 1 | 50 | 1 | 1617 | 3529 | 31000 | 1559 | 3012 | 705 |
| 5 | 2 | 1 | 50 | 2 | 2317 | 5859 | 43000 | 5328 | 3626 | 1272 |
| 6 | 2 | 1 | 50 | 3 | 1289 | 4984 | 38000 | 1770 | 3828 | 894 |
| 7 | 3 | 1 | 55 | 1 | 10300 | 13000 | 31000 | 1096 | 3121 | 1195 |
| 8 | 3 | 1 | 55 | 2 | 18000 | 20100 | 47000 | 1070 | 4064 | 1658 |
| 9 | 3 | 1 | 55 | 3 | 8512 | 11300 | 37100 | 914 | 3550 | 1284 |
| 10 | 4 | 1 | 60 | 1 | 38200 | 36000 | 26000 | 199 | 3193 | 1297 |
| 11 | 4 | 1 | 60 | 2 | 35300 | 33000 | 29000 | 86 | 3522 | 1400 |
| 12 | 4 | 1 | 60 | 3 | 23000 | 25000 | 35000 | 215 | 3183 | 1585 |
| 13 | 5 | 2 | 45 | 1 | 1740 | 4604 | 38000 | 6130 | 2841 | 927 |
| 14 | 5 | 2 | 45 | 2 | 1693 | 3015 | 26000 | 3905 | 1850 | 640 |
| 15 | 5 | 2 | 45 | 3 | 1645 | 3698 | 30000 | 4249 | 2062 | 1136 |
| 16 | 6 | 2 | 50 | 1 | 3106 | 5771 | 38000 | 2094 | 3391 | 901 |
| 17 | 6 | 2 | 50 | 2 | 2743 | 5763 | 40200 | 5105 | 3466 | 1229 |
| 18 | 6 | 2 | 50 | 3 | 4529 | 7631 | 43000 | 4291 | 3701 | 1168 |
| 19 | 7 | 2 | 55 | 1 | 21000 | 20000 | 33000 | 765 | 3704 | 1775 |
| 20 | 7 | 2 | 55 | 2 | 7217 | 11300 | 29000 | 797 | 2707 | 1227 |
| 21 | 7 | 2 | 55 | 3 | 19000 | 21000 | 40000 | 861 | 3583 | 1740 |
| 22 | 8 | 2 | 60 | 1 | 23000 | 26000 | 24000 | 150 | 2618 | 1006 |
| 23 | 8 | 2 | 60 | 2 | 20200 | 27000 | 24000 | 149 | 2971 | 1080 |
| 24 | 8 | 2 | 60 | 3 | 27000 | 28000 | 23000 | 350 | 2594 | 1435 |
| 25 | 9 | 3 | 45 | 1 | 2335 | 6696 | 49000 | 4996 | 4258 | 1559 |
| 26 | 9 | 3 | 45 | 2 | 1236 | 3395 | 26000 | 3396 | 2107 | 1149 |
| 27 | 9 | 3 | 45 | 3 | 1500 | 4856 | 37000 | 4888 | 3164 | 1046 |
| 28 | 10 | 3 | 50 | 1 | 3624 | 8119 | 42000 | 2249 | 967 | 968 |
| 29 | 10 | 3 | 50 | 2 | 4043 | 8714 | 37000 | 1824 | 1157 | 1157 |
| 30 | 10 | 3 | 50 | 3 | 3411 | 8247 | 41000 | 1775 | 2055 | 2055 |
| 31 | 11 | 3 | 55 | 1 | 17000 | 17000 | 33000 | 569 | 3260 | 744 |
| 32 | 11 | 3 | 55 | 2 | 12000 | 12000 | 33000 | 636 | 2316 | 954 |
| 33 | 11 | 3 | 55 | 3 | 18000 | 23000 | 38000 | 631 | 3297 | 721 |
| 34 | 12 | 3 | 60 | 1 | 24000 | 24000 | 27000 | 100 | 2933 | 950 |
| 35 | 12 | 3 | 60 | 2 | 26000 | 27000 | 29000 | 163 | 3178 | 1207 |
| 36 | 12 | 3 | 60 | 3 | 24000 | 22000 | 25000 | 68 | 2265 | 898 |

Analysis of Variance Procedure
Class Level Information

Class Levels Values
 REP 3 1 2 3
 TRAT 12 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
 Number of observations in data set = 36

Dependent Variable: **GLUCOSA**

| Source | DF | Sum of Squares | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-----------------|----------|----------------|--------------|---------------|--------|
| Model | 13 | 3779309265.86 | 290716097.37 | 19.41 | 0.0001 |
| Error | 22 | 329437786.44 | 14974444.84 | | |
| Corrected Total | 35 | 4108747052.31 | | | |
| | R-Square | C.V. | Root MSE | GLU Mean | |
| | 0.919820 | 33.250014 | 3869.68278 | 11638.1388889 | |

| Source | DF | Anova SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|--------|----|---------------|--------------|---------|--------|
| REP | 2 | 12856126.89 | 6428063.44 | 0.43 | 0.6563 |
| TRAT | 11 | 3766453138.97 | 342404830.82 | 22.87 | 0.0001 |

Dependent Variable: **FRUCTOSA**

| Source | DF | Sum of Squares | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-----------------|----------|----------------|--------------|---------------|--------|
| Model | 13 | 3070251768.53 | 236173212.96 | 20.67 | 0.0001 |
| Error | 22 | 251337800.44 | 11424445.47 | | |
| Corrected Total | 35 | 3321589568.97 | | | |
| | R-Square | C.V. | Root MSE | FRU Mean | |
| | 0.924332 | 24.342816 | 3380.00673 | 13885.0277778 | |

| Source | DF | Anova SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|--------|----|---------------|--------------|---------|--------|
| REP | 2 | 2451069.56 | 1225534.78 | 0.11 | 0.8987 |
| TRAT | 11 | 3067800698.97 | 278890972.63 | 24.41 | 0.000 |

Dependent Variable: **CITRICO**

| Source | DF | Sum of Squares | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-----------------|----------|----------------|--------------|---------------|--------|
| Model | 13 | 912593611.111 | 70199508.547 | 2.17 | 0.0524 |
| Error | 22 | 710676111.111 | 32303459.596 | | |
| Corrected Total | 35 | 1623269722.222 | | | |
| | R-Square | C.V. | Root MSE | CITRI Mean | |
| | 0.562195 | 16.644438 | 5683.61325 | 34147.2222222 | |

| Source | DF | Anova SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|--------|----|-------------|-------------|---------|--------|
| REP | 2 | 12290555.6 | 6145277.8 | 0.19 | 0.8281 |
| TRAT | 11 | 900303055.6 | 81845732.3 | 2.53 | 0.0305 |

Dependent Variable: **ASCORBICO**

| Source | DF | Sum of Squares | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-----------------|----|----------------|--------------|---------|--------|
| Model | 13 | 98877635.2500 | 7605971.9423 | 8.04 | 0.0001 |
| Error | 22 | 20807335.5000 | 945787.9773 | | |
| Corrected Total | 35 | 119684970.7500 | | | |

| | R-Square | C.V. | Root MSE | ASCO Mean | |
|--------|----------|--------------|-------------|---------------|--------|
| | 0.826149 | 49.662521 | 972.516312 | 1958.25000000 | |
| Source | DF | Anova SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
| REP | 2 | 1268033.167 | 634016.583 | 0.67 | 0.5217 |
| TRAT | 11 | 97609602.083 | 8873600.189 | 9.38 | 0.0001 |

Dependent Variable: **MALICO**

| Source | DF | Sum of Squares | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-----------------|----|----------------|--------------|---------|--------|
| Model | 13 | 14583413.7778 | 1121801.0598 | 4.17 | 0.0016 |
| Error | 22 | 5916185.7778 | 268917.5354 | | |
| Corrected Total | 35 | 20499599.5556 | | | |

| | R-Square | C.V. | Root MSE | MAL Mean | |
|--------|----------|--------------|-------------|---------------|--------|
| | 0.711400 | 17.893468 | 518.572594 | 2898.11111111 | |
| Source | DF | Anova SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
| REP | 2 | 317804.222 | 158902.111 | 0.59 | 0.5624 |
| TRAT | 11 | 14265609.556 | 1296873.596 | 4.82 | 0.0008 |

Dependent Variable: **SUCCINICO**

| Source | DF | Sum of Squares | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-----------------|----|----------------|--------------|---------|--------|
| Model | 13 | 2454554.25000 | 188811.86538 | 2.59 | 0.0238 |
| Error | 22 | 1604006.50000 | 72909.38636 | | |
| Corrected Total | 35 | 4058560.75000 | | | |

| | R-Square | C.V. | Root MSE | SUC Mean | |
|--------|----------|--------------|-------------|---------------|--------|
| | 0.604784 | 23.478071 | 270.017382 | 1150.08333333 | |
| Source | DF | Anova SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
| REP | 2 | 248809.5000 | 124404.7500 | 1.71 | 0.2047 |
| TRAT | 11 | 2205744.7500 | 200522.2500 | 2.75 | 0.0209 |

Duncan's Multiple Range Test for variable: **GLUCOSA**

NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate,
not the experimentwise error rate

| | Alpha= 0.05 df= 22 MSE= 14974445 | | | | | |
|-----------------|----------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Number of Means | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| Critical Range | 6544.9686 | 6874.9881 | 7102.9029 | 7239.0433 | 7347.8459 | 7433.0763 |
| Number of Means | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | |
| Critical Range | 7500.1502 | 7553.4973 | 7596.4153 | 7631.3162 | 7659.9709 | |

Means with the same letter are not significantly different.

| Duncan Grouping | Mean | N | TRAT |
|-----------------|-------|---|------|
| A | 32167 | 3 | 4 |
| B | 24667 | 3 | 12 |

| | | |
|---|-------|------|
| B | | |
| B | 23400 | 3 8 |
| C | 15739 | 3 7 |
| C | | |
| C | 15667 | 3 11 |
| C | | |
| C | 12271 | 3 3 |
| D | 3693 | 3 10 |
| D | | |
| D | 3472 | 3 1 |
| D | | |
| D | 3459 | 3 6 |
| D | | |
| D | 1741 | 3 2 |
| D | | |
| D | 1693 | 3 5 |
| D | | |
| D | 1690 | 3 9 |

Analysis of Variance Procedure
Duncan's Multiple Range Test for variable: **FRUCTOSA**

NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate,
not the experimentwise error rate
Alpha= 0.05 df= 22 MSE= 11424445

| | | | | | | |
|-----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Number of Means | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| Critical Range | 5716.7574 | 6005.0157 | 6204.0898 | 6323.0028 | 6418.0373 | 6492.4825 |
| Number of Means | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | |
| Critical Range | 6551.0688 | 6597.6653 | 6635.1524 | 6665.6368 | 6690.6655 | |

Means with the same letter are not significantly different.

| Duncan Grouping | Mean | N | TRAT |
|-----------------|-------|---|------|
| A | 31333 | 3 | 4 |
| A | | | |
| B A | 27000 | 3 | 8 |
| B | | | |
| B | 24333 | 3 | 12 |
| C | 17433 | 3 | 7 |
| C | | | |
| C | 17333 | 3 | 11 |
| C | | | |
| C | 14800 | 3 | 3 |
| D | 8360 | 3 | 10 |
| D | | | |
| D | 6388 | 3 | 6 |

| | | |
|---|------|-----|
| D | | |
| D | 6093 | 3 1 |
| D | | |
| D | 4982 | 3 9 |
| D | | |
| D | 4791 | 3 2 |
| D | | |
| D | 3772 | 3 5 |

Analysis of Variance Procedure

Duncan's Multiple Range Test for variable: **CITRICO**

NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate,
not the experimentwise error rate

Alpha= 0.05 df= 22 MSE= 32303460

| | | | | | | |
|-----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Number of Means | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| Critical Range | 9612.9508 | 10097.668 | 10432.419 | 10632.376 | 10792.18 | 10917.363 |
| Number of Means | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | |
| Critical Range | 11015.878 | 11094.232 | 11157.268 | 11208.529 | 11250.615 | |

Means with the same letter are not significantly different.

| Duncan Grouping | Mean | N TRAT |
|-----------------|-------|--------|
| A | 40400 | 3 6 |
| A | | |
| A | 40000 | 3 10 |
| A | | |
| A | 38367 | 3 3 |
| A | | |
| B A | 37333 | 3 9 |
| B A | | |
| B A | 37333 | 3 2 |
| B A | | |
| B A | 35667 | 3 1 |
| B A | | |
| B A | 34667 | 3 11 |
| B A | | |
| B A C | 34000 | 3 7 |
| B A C | | |
| B A C | 31333 | 3 5 |
| B A C | | |
| B A C | 30000 | 3 4 |
| B C | | |
| B C | 27000 | 3 12 |
| C | | |
| C | 23667 | 3 8 |

Analysis of Variance Procedure
Duncan's Multiple Range Test for variable: **ASCORBICO**

NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate,
not the experimentwise error rate
Alpha= 0.05 df= 22 MSE= 945788

| | | | | | | |
|-----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|
| Number of Means | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| Critical Range | 1644.8606 | 1727.8 | 1785.0789 | 1819.2932 | 1846.6371 | 1868.057 |
| Number of Means | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | |
| Critical Range | 1884.9138 | 1898.3208 | 1909.1068 | 1917.878 | 1925.0794 | |

Means with the same letter are not significantly different.

| Duncan Grouping | Mean | N | TRAT |
|-----------------|--------|---|------|
| A | 4761.3 | 3 | 5 |
| A | | | |
| B A | 4426.7 | 3 | 9 |
| B A | | | |
| B A | 3830.0 | 3 | 6 |
| B | | | |
| B C | 2885.7 | 3 | 2 |
| B C | | | |
| B C D | 2706.3 | 3 | 1 |
| C D | | | |
| E C D | 1949.3 | 3 | 10 |
| E D | | | |
| E D | 1026.7 | 3 | 3 |
| E | | | |
| E | 807.7 | 3 | 7 |
| E | | | |
| E | 612.0 | 3 | 11 |
| E | | | |
| E | 216.3 | 3 | 8 |
| E | | | |
| E | 166.7 | 3 | 4 |
| E | | | |
| E | 110.3 | 3 | 12 |

Analysis of Variance Procedure

Duncan's Multiple Range Test for variable: **MALICO**
NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate,
not the experimentwise error rate
Alpha= 0.05 df= 22 MSE= 268917.5

| | | | | | | |
|-----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|---------|-----------|
| Number of Means | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| Critical Range | 877.08516 | 921.31076 | 951.85342 | 970.09746 | 984.678 | 996.09965 |

| | | | | | |
|-----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Number of Means | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| Critical Range | 1005.0882 | 1012.2372 | 1017.9886 | 1022.6656 | 1026.5056 |

Means with the same letter are not significantly different.

| Duncan | Grouping | Mean | N | TRAT |
|--------|----------|--------|---|------|
| A | A | 3578.3 | 3 | 3 |
| A | A | | | |
| A | A | 3519.3 | 3 | 6 |
| A | A | | | |
| A | A | 3488.7 | 3 | 2 |
| A | A | | | |
| A | A | 3331.3 | 3 | 7 |
| A | A | | | |
| A | A | 3299.3 | 3 | 4 |
| A | A | | | |
| B | A | 3176.3 | 3 | 9 |
| B | A | | | |
| B | A | 2957.7 | 3 | 11 |
| B | A | | | |
| B | A | 2792.0 | 3 | 12 |
| B | A | | | |
| B | A | 2727.7 | 3 | 8 |
| B | A | | | |
| B | C | 2262.7 | 3 | 1 |
| B | C | | | |
| B | C | 2251.0 | 3 | 5 |
| C | C | | | |
| C | C | 1393.0 | 3 | 10 |

Analysis of Variance Procedure

Duncan's Multiple Range Test for variable: **SUCCINICO**

NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate,
not the experimentwise error rate

Alpha= 0.05 df= 22 MSE= 72909.39

| | | | | | | |
|-----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Number of Means | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| Critical Range | 456.69255 | 479.72053 | 495.62389 | 505.12345 | 512.71544 | 518.66262 |

| | | | | | |
|-----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Number of Means | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| Critical Range | 523.34288 | 527.06531 | 530.06003 | 532.49533 | 534.49479 |

Means with the same letter are not significantly different.

| Duncan Grouping | | Mean | N TRAT |
|-----------------|-----|--------|--------|
| | A | 1580.7 | 3 7 |
| | A | | |
| B | A | 1427.3 | 3 4 |
| B | A | | |
| B | A | 1393.3 | 3 10 |
| B | A | | |
| B | A | 1379.0 | 3 3 |
| B | A | | |
| B | A C | 1251.3 | 3 9 |
| B | A C | | |
| B | A C | 1173.7 | 3 8 |
| B | A C | | |
| B | A C | 1099.3 | 3 6 |
| B | C | | |
| B | C | 1018.3 | 3 12 |
| B | C | | |
| B | C | 957.0 | 3 2 |
| B | C | | |
| B | C | 901.0 | 3 5 |
| | C | | |
| | C | 813.7 | 3 1 |
| | C | | |
| | C | 806.3 | 3 11 |