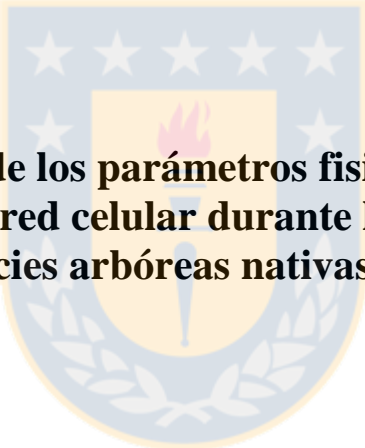




Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Forestales-Programa de Magister en Ciencias Forestales



**Caracterización de los parámetros fisicoquímicos y de los
componentes de la pared celular durante la maduración del fruto
de especies arbóreas nativas de Chile.**

Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias Forestales.

FELIPE ANDRÉS SÁEZ QUINTANA
CONCEPCIÓN-CHILE
2016

Profesor Guía: Dr. Carlos Figueroa Lamas
Dpto. Silvicultura
Facultad de Ciencias Forestales

Caracterización de los parámetros fisicoquímicos y de los componentes de la pared celular durante la maduración del fruto de especies arbóreas nativas de Chile

Comisión Evaluadora:

Carlos Figueroa Lamas (Profesor guía)
Ingeniero Agrónomo, Dr.

Eduardo Pereira U. (Profesor co-guía)
Químico, Dr.

Lida Fuentes. (Comisión evaluación)
Licenciado en Bioquímica, Dra.

(Comisión evaluación)
Título Profesional, Dr (a).
Ingeniero.

Regis Teixeira.
Ingeniero Químico, Dr.
Director de Postgrado.

Manuel Sánchez Olate.
Ingeniero Forestal, Dr.
Decano Facultad de Ciencias Forestales.





Donde haya un árbol que plantar, plántalo tú.
Donde haya un error que enmendar, enmiéndalo tú.
Donde hay un esfuerzo que todos esquivan, hazlo tú.
Sé tú el que aparta la piedra del camino.

AGRADECIMIENTOS

Agradecer a todos los que hacen que me levante cada vez que la vida me golpea. Principalmente a mi hijo Bastián, a mi novia Marioly, a mis padres Carlos y Ruth, a mi hermana Carla y mi sobrino Cristóbal, junto a mi abuela que me cuida desde el cielo.

Al proyecto CONAF064/2011 del Ministerio de Agricultura de Chile, al Fondo de Investigación del Bosque Nativo de CONAF, al Centro de Biotecnología de la Universidad de Concepción principalmente al Laboratorio de Cultivo de Tejidos y al Laboratorio de Recursos renovables y a sus directores la Dra. Matilde Uribe y El Doctor Regis Teixeira, los cuales hicieron posible el financiamiento y la factibilidad para la realización de esta tesis.

A la directora de Postgrado la Dra. Darcy Ríos por su confianza y apoyo en momentos difíciles, y quien siempre me entrego una palabra amable para continuar.

A los dos pilares que consolidaron mi formación profesional, al Dr. Carlos Figueroa, por su constante apoyo, confianza, dirección y consejos en momentos difíciles, y que finalmente me llevaron a concluir esta tesis y al Dr. Cristian Echeverría quien actuó como tutor, amigo y jefe, y de quien aprendí mis mayores enseñanzas, no solo académicas, sino también de la vida.

A quienes fueran mis compañeros durante de análisis y laboratorio durante este periodo, Gabriela, Paz, Daniela, Nicolás y Leticia, a los cuales agradezco enormemente el acompañarme durante este trabajo.

A mis compañeros de LEP, quienes durante se convirtieron en parte de mi familia y con los cuales trabaje en arduas campañas a terreno y que me hicieron comprender la biodiversidad en sus diferentes escalas.

En general a todos los que pusieron un grano de arena, para mi formación, doctores, profesionales, compañeros, administrativos, auxiliares, amigos, familia y a Dios.

RESUMEN GENERAL

Los productos forestales no madereros (PFNM) que proveen los ecosistemas boscosos nativos de Chile, fueron la base alimenticia y medicinal de los pueblos originarios. Debido a esto su importancia y valor han permanecido y trascendido en el tiempo. No obstante, a pesar de su relevancia cultural y social, actualmente existen diversos recursos nativos que aún no han sido investigados en profundidad, y cuyas propiedades podrían entregar grandes beneficios para el desarrollo y diversificación de actividades asociadas al fortalecimiento de Chile como potencia agroalimentaria y forestal. En este sentido los frutos se han convertido en uno de los pilares de exportación de PFNM en el país, lo que sumado a alto grado de endemismo de nuestro territorio convierte a este tipo de productos en una alternativa potencial para su desarrollo. Sin embargo, a pesar de su gran relevancia, aún existe desconocimiento sobre muchas propiedades que poseen las plantas, árboles y principalmente frutos del bosque nativo chileno.

El estudio de los frutos de especies nativas y endémicas, además de su proceso de maduración, podría ser el primer paso para la elaboración de nuevos productos y oportunidades de mercado. Este punto es de suma importancia, ya que el proceso de la maduración afecta no solo a los componentes nutritivos y bioquímicamente activos del fruto, sino que también presenta gran relevancia en la post cosecha y exportación de los productos frutícolas. Diversos estudios demuestran que el ablandamiento del fruto tiene una alta implicancia en la postcosecha y la calidad del fruto. De lo anterior se desprende que la caracterización de la maduración, en especial de los componentes de la pared celular del fruto, corresponde a un área determinante en la investigación de los atributos de las plantas nativas y endémicas de Chile, pudiendo convertir a estas especies en productos únicos y comercialmente atractivos a nivel nacional e internacional. El presente trabajo plantea la caracterización de la maduración en frutos de especies arbóreas nativas que se distribuyen desde la Región de Valparaíso a la Región del Biobío con potencial comercial para una futura domesticación y propagación. Estas especies incluyen a naranjillo (*Citronella mucronata*), pitao (*Pitavia punctata*), belloto del sur (*Beilchmedia berteriana*), lleuque (*Prumnopitys andina*) y arrayán (*Luma apiculata*).

Las especies fueron caracterizadas en su distribución, fechas de cosecha y mediante un análisis de los parámetros agronómicos de maduración y potencial saludable en los estadios verde, transición y maduro. Los parámetros a evaluar fueron: peso, forma, color, acidez titulable, sólidos solubles y cuantificación de polímeros de pared celular mediante la separación y fraccionamiento químico de los componentes pécticos de pared.

Dentro de los resultados se observaron diferencias significativas durante la maduración de los parámetros de calidad (diámetro, peso, color, CSS, AT) en los frutos de *L. apiculata*, y *P. andina*, sin diferencias significativas evidentes entre localidades, por otra parte los frutos de *C. mucronata*, *P. punctata* y *B. berteroana* similarmente presentaron diferencias significativas entre estadios de maduración, salvo *P. punctata* quien no presentó cambios significativos en peso y tamaño. se observó que los frutos salvo en los frutos de *P. punctata* espera encontrar especies emergentes con posible interés o aplicación en el área agroindustria y frutícola. Por otra parte los frutos de *P. punctata* presentaron altos valores de AOX y TPC en su estadio maduro, incluyendo un importante potencial antimicrobiano.

Los contenidos de RIA y lignina disminuyeron significativamente durante la maduración de todos los frutos, lo que podría estar relacionado con la pérdida de firmeza. Así mismo, el fraccionamiento de los RIA presentó un aumento significativo en el contenido de AU y AN de las FSA y FSC durante la maduración de todos los frutos salvo *P. punctata* y una disminución de FSN. En relación a los frutos de *L. apiculata* y *P. andina* ambos frutos presentaron diferencias significativas en el contenido de AN en Andes.

Finalmente, los resultados de la composición de azúcares en RIA, indicó una reducción en el contenido de Ara, Ac. gal y glc para *L. apiculata*, mientras que los frutos de *P. andina* de manera opuesta mostraron un incremento en el contenido Ac. gal, y una reducción de Ara, Rha, Gal, Xyl y Ac. Glc. Además de esto, los resultados en relación al diámetro de partícula en la FSA, indicó un aumento significativo durante la maduración mientras que las FSC y FSN presentaron una disminución durante la maduración de ambos, salvo *P. andina* en FSC que no presentó diferencias significativas. Finalmente la FSK no presentó diferencias significativas durante la maduración.

ABSTRACT

The Non-Timber Products (NTP's) that provide natural forest ecosystems of Chile, were the basis of medicine and alimentary of native peoples. For these reason they importance and value have remained and transcended time. However, despite their cultural and social relevance, actually there are many native resources with out investigation, and whose properties could deliver large benefits to the development and diversification of activities associated with the strengthening of Chile in activities such as agri-food and forestry. In this sense the fruits have become a mainstay of export of NTP's in the country, which added with the high endemism of our territory, makes this kind of product an alternative potential for development. However, even their great importance, there is still lack of knowledge about many properties that the plants, trees and fruits possessed.

The study of the fruits of native and endemic species, and their maturation process could be the first step in the development of new products and market opportunities. This is an essential point, since the ripening process affects not only nutritious and biochemically active components of the fruit, but also has great relevance in the post-harvest and the export of fruits products. Studies show that the fruit softening has a high involvement in post-harvest and quality of the fruit.

Considering this, the ripening characterization, especially the cell wall components of the fruit, corresponds to a determinant research area in the attributes of Chile native plants, being able to convert these species into unique products and commercially attractive to national and international levels. This study proposes the characterization of ripening in fruits of different tree native species, distributed from Valparaiso to Biobío region with commercial potential for future domestication and propagation. These species include "naranjillo" (*Citronella mucronata*), "pitao" (*Pitavia punctata*), "belloto del sur" (*Beilchmedia berteroana*), "lleuque" (*Prumnopitys andina*) and "arrayan" (*Luma apiculata*). The species were characterized in their distribution, harvesting dates, agronomic parameters analysis and healthy potential during the

ripening. The parameters evaluated were: weight, form, color, titratable acidity, soluble solids concentration and quantification of cell wall polymers by chemical fractionation

The results shows significant differences during the ripening of the quality parameters (diameter, weight, color, SSC, TA) in the fruits of *L. apiculata*, and *P. andina* without significant differences between localities, moreover the fruits of *C. mucronata*, *P. punctata* and *B. berteroana* shows similar significant differences between stages of maturation, except *P. punctata* who dosent show significant changes in weight and size. We observed that the fruits of *P. punctate* present hight values of AOX and TPC in its ripe estage, including an important antimicrobial potential.

The contents of RIA and lignin decreased significantly during the ripening of all the fruits, which could be related to the loss of firmness. Likewise, the fractionation of the RIA showed significant increased content of AU and AN in the diferent FSA and FSC during ripening and decreased of FSN of all fruit except *P. punctata*. In relation to the fruits of *L. apiculata* and *P. andina* showed significant differences in the content of AN in Andes. Finally, the results of sugar composition in RIA, showed a reduction in the content of Ara, Ac. gal and glc for *L. apiculata*, while the fruits of *P. andina* oppositely showed an increase in the content Ac. gal, and reduced Ara, Rha, Gal, Xyl and Ac. Glc. In addition to this, the results in relation to the particle diameter at the FSA, indicated a significant increase during ripening while the FSC and FSN showed a decrease during maturation of both, except in FSC *P. andina* showed no significant differences. Finally the FSK no significant differences during ripening.

INDICE GENERAL

RESUMEN GENERAL	V
ABSTRACT	VII
INDICE DE FIGURAS	XI
INDICE DE TABLAS.....	XIV
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
HIPÓTESIS DE TRABAJO:.....	4
OBJETIVOS.....	4
CAPITULO I. Cambios en los parámetros físico-químicos y en los componentes de la pared celular durante la maduración del fruto de arrayán (<i>Luma apiculata</i>) y lleuque (<i>Prumnopitys andina</i>) provenientes de la Cordillera de la Costa y los Andes de la Región del Biobío.....	5
I.1. Resumen.	5
I.2. Introducción.....	7
I.3 Metodología.....	11
I.3.1. Material vegetal.	11
I.3.2. Caracterización físico-química de los frutos.....	12
I.3.3. Análisis de pared celular.....	13
I.3.4. Análisis colorimétrico de las fracciones.	16
I.3.5. Composición de azúcares en hemicelulosas.	17
I.3.6. Obtención de la masa molar promedio (MM) y diámetro de partícula efectivo de pectinas (DP) y el índice de polidispersidad (PD).	18
I.3.7. Diseño experimental y análisis estadístico.	19
I.4. Resultados.....	19
I.4.1. Clasificación morfológica de estadios y caracterización fisicoquímica de la maduración de frutos de <i>L. apiculata</i> y <i>P. andina</i>	19
I.4.1.1. Caracterización morfológica.....	19
I.4.1.2. Caracterización y comparación de parámetros físico-químicos generales de la maduración.	20
I.4.1.3 Cambios en la composición de color durante la maduración.	23
I.4.1.4. Cambios en la firmeza del fruto.....	26
I.4.2. Cambio en el contenido de pared celular y contenido de lignina.	27
I.4.3. Contenido de pectinas totales.....	28

I.4.4. Cambios en las fracciones pécticas.....	29
I.4.5. Análisis de los cambios en el contenido de pectinas	33
I.4.6. Hemicelulosas	35
I.4.7. Cuociente de ramificación	37
I.4.8. Composición de azúcares en RIA por cromatografía gas-masa (C-GM).	38
I.4.9. Masa molar (MM), diámetro de partícula (DP) promedio y polidispersidad de pectinas.....	42
I.5. Discusión.	50
I.6. Conclusión.....	57
I.7. Bibliografía.....	59
CAPITULO II. Physiochemical and antibacterial characterization of fruits of <i>Citronella mucronata</i> (<i>Cardiopteridaceae</i>), <i>Pitavia punctata</i> (<i>Rutaceae</i>) and <i>Beilschmedia berteroa</i> (<i>Lauraceae</i>), three endemic and threatened Chilean trees	66
II.1. Abstract	67
II.2. Introduction	68
II.3 Materials and methods.	70
II.3.1. Plant material:.....	70
II.3.2. Fruit quality assessments and chlorophyll determination.....	71
II.3.3. Cell wall analysis.....	72
II.3.4. Total phenolic content (TPC) and antioxidant capacity (AOX) determination.....	72
II.3.5 Antibacterial assays.	73
II.3.6. Statistical analysis.....	74
II.4. Results and discussion.....	75
II.4.1. Characterization of fruit quality attributes.....	75
II.4.2. Analysis of cell wall material, lignin and cell wall composition.....	81
II.4.3. Analysis of total phenolic content (TPC) and antioxidant capacity (AOX).....	84
II.4.4. Determination of antibacterial activity of fruit extracts.	85
II.5. Conclusion.....	86
II.6. References.	87
DISCUSIÓN GENERAL	92
CONCLUSIONES GENERALES	95
BIBLIOGRAFIA GENERAL.	97

INDICE DE FIGURAS

Figura I.1. Representación esquemática del ramnogalacturonano tipo I (RG I). Adaptado de Somerville <i>et al.</i> , 2004.....	8
Figura I.2. Localización geográfica de las poblaciones naturales de <i>L. apiculata</i> y <i>P. andina</i> muestreadas en la presente tesis. De la Costa, “Reserva Nacional Nonguen” para <i>L. apiculata</i> (1), “Angol” para <i>P. andina</i> (2), y de los Andes “San Fabián de Alico” para ambas especies.....	12
Figura I.3. Esquema de los pasos del fraccionamiento de pared celular realizados en la presente tesis. Se describen las diferentes fracciones enriquecidas con pectinas y polímeros de pared celular. Fracción Soluble en Agua (FSA), Fracción soluble en CDTA (FSC), Fracción Soluble en Na ₂ CO ₃ (FSN) y Fracción Soluble en KOH (FSK).....	16
Figura I.4. Imagen representativa de los frutos de <i>L. apiculata</i> y <i>P. andina</i> estudiados en la presente tesis (A): <i>L. apiculata</i> y (B) <i>P. andina</i> , en sus diferentes estadios de desarrollo (Verde (V), transición (T) y maduro (M))......	20
Figura I.5. Distribución de los valores de los parámetros de color L* y a* en frutos de <i>L. apiculata</i> durante los estadios de maduración (verde (V), transición (T) y maduro (M)). A) Andes y B) Costa.....	23
Figura I.6. Distribución de los valores de los parámetros de color L* y a* en frutos de <i>P. andina</i> durante los estadios de maduración (verde (V), transición (T) y maduro (M)). A) Andes y B) Costa.....	24
Figura I.7. Firmeza de los frutos de (A) <i>L. apiculata</i> y (B) <i>P. andina</i> durante los estadios de maduración (verde (V), transición (T) y maduro (M)). Diferencias entre letras mayúsculas indican diferencias significativas entre estadios, mientras que diferencias entre letras minúsculas indican diferencias entre localidades de maduración de la especie ($P \leq 0.05$). Los datos corresponden a una media de tres replicas \pm D.E.	26
Figura I.8. Contenido de RIA (A) y contenido de lignina (B) en frutos de <i>L. apiculata</i> y <i>P. andina</i> en tres estadios de maduración (verde (V), transición (T) y maduro (M)). Letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas entre localidades, mientras que letras minúsculas distintas indican diferencias entre estadios de maduración de la especie ($P \leq 0.05$). Los datos corresponden a una media de tres replicas \pm D.E.	28

Figura I.9. Cambio en el contenido de pectinas totales como ácidos urónicos (A) y azúcares neutros (B) en los frutos de *L. apiculata* y *P. andina* durante los estadios de maduración (verde (V), transición (T) y maduro (M)). Letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas entre localidades, mientras que letras minúsculas distintas indican diferencias entre estadios de maduración de la especie ($P \leq 0.05$). Los datos corresponden a una media de tres replicas \pm D.E.....29

Figura I.10. Contenidos de ácidos urónicos (AU) en fracción soluble en agua (FSA), fracción soluble en CDTA (FSC) y fracción soluble en Na_2CO_3 (FSN) en los frutos de *L. apiculata* y *P. andina* en tres estadios maduración (verde (V), transición (T) y maduro (M) en dos localidades (Costa y Andes). Letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas entre localidades, mientras que letras minúsculas distintas indican diferencias entre estadios de maduración de la especie ($P \leq 0.05$). Los datos corresponden a una media de tres replicas \pm D.E.....31

Figura I.11. Contenidos de Azúcares Neutros (AN) en fracción soluble en agua (FSA), fracción soluble en CDTA (FSC) y fracción soluble en Na_2CO_3 (FSN) en los frutos de *L. apiculata* y *P. andina* en tres estadios maduración (verde (V), transición (T) y maduro (M) en dos localidades (Costa y Andes). Letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas entre localidades, mientras que letras minúsculas distintas indican diferencias entre estadios de maduración de la especie ($P \leq 0.05$). Los datos corresponden a una media de tres replicas \pm D.E.....33

Figura I.12. Cambios en la relación de fracciones pécticas en base a contenido de AU (%) en los frutos de *L. apiculata* y *P. andina* en tres estadios maduración (verde (V), transición (T) y maduro (M), en dos localidades (Costa y Andes). A, *L. apiculata*; B, *P. andina*. Letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas entre localidades, mientras que letras minúsculas distintas indican diferencias entre estadios de maduración de la especie ($P \leq 0.05$). Los datos corresponden a una media de tres replicas.....34

Figura I. 13. Cambios en la relación de fracciones pécticas en base a contenido de AN (%) en los frutos de *L. apiculata* y *P. andina* en tres estadios de maduración (verde (V), transición (T) y maduro (M), en dos localidades (Costa y Andes). A, *L. apiculata*; B, *P. andina*. Letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas entre localidades, mientras que letras

minúsculas distintas indican diferencias entre estadíos de maduración de la especie ($P \leq 0.05$). Los datos corresponden a una media de tres replicas.	35
Figura I. 14. Contenidos de Azúcares Neutros (AN) en fracción soluble en KOH (FSK), en los frutos de <i>L. apiculata</i> y <i>P. andina</i> en tres estadíos maduración (verde (V), transición (T) y maduro (M) en dos localidades (Costa y Andes). Letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas entre localidades, mientras que letras minúsculas distintas indican diferencias entre estadíos de maduración de la especie ($P \leq 0.05$). Los datos corresponden a una media de tres replicas \pm D.E.	36
Figura I. 15. Cambios en la relación entre azúcares neutros y ácidos urónicos (medidos como Glu/GalA) de las diferentes fracciones pécticas de las especies bajo estudio. A, contenido de AN/AG por 100 mg de RIA en FSA, FSC y FSN de <i>L. apiculata</i> ; B, contenido de AN/AG por 100 mg de RIA en FSA, FSC y FSN de <i>P. andina</i> . Letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas entre localidades, mientras que letras minúsculas distintas indican diferencias entre estadíos de maduración de la especie ($P \leq 0.05$). Los datos corresponden a una media de tres replicas \pm D.E.	38
Figura I.16. Cambio en la distribución de azúcares neutros y ácidos (%) en hemicelulosas totales en frutos de <i>L. apiculata</i> y <i>P. andina</i> durante la maduración. A) <i>L. apiculata</i> , localidad de la Costa; B) <i>L. apiculata</i> , localidad de los Andes; C) <i>P. andina</i> , localidad de la Costa; D) <i>P. andina</i> , localidad de los Andes.	40
Figure II.1. Fruits and locations of the three tree species studied in the present research. (A) Representative photographs of the three fruits: 1) <i>Citronella mucronata</i> , 2) <i>Pitavia punctata</i> and 3) <i>Beilschmiedia berteroana</i> . (B) Geographical locations of the natural populations in Biobío Region (Chile) for the three species (B): ‘Hualpén’ for <i>C. mucronata</i> (1), ‘Nonguén’ for <i>P. punctata</i> (2) and ‘Bulnes’ for <i>B. berteroana</i> (3). See text for geographic coordinates for each location.	70

INDICE DE TABLAS

Tabla I.I. Caracterización físico-química general de tres estadios de desarrollo de frutos de <i>L. apiculata</i> y <i>P. andina</i> en las localidades de la Cordillera de la Costa y de los Andes.	22
Tabla I.II. Cambios en el color de tres estadios de desarrollo de frutos de <i>L. apiculata</i> y <i>P. andina</i> en las localidades de la Cordillera de la Costa y de los Andes.....	25
Tabla I.III. Cambios en el porcentaje de azúcares durante los tres estadios de desarrollo de frutos (V, T y M) de <i>L. apiculata</i> y <i>P. andina</i> en las localidades de la Cordillera de la Costa y de los Andes.	41
Tabla I.IV. Cambios diámetro de partícula (DP), polidispersidad (PD), masa molar (MM) de fracciones pécticas FSA durante la maduración de frutos de <i>L. apiculata</i> y <i>P. andina</i> en dos localidades.	43
Tabla I.V. Cambios diámetro de partícula (DP), polidispersidad (PD), masa molar (MM) de fracciones pécticas FSC durante la maduración de frutos de <i>L. apiculata</i> y <i>P. andina</i> en dos localidades	45
Tabla I.VI. Cambios diámetro de partícula (DP), polidispersidad (PD), masa molar (MM) de fracciones pécticas FSN durante la maduración de frutos de <i>L. apiculata</i> y <i>P. andina</i> en dos localidades.	47
Tabla I.VII. Cambios diámetro de partícula (DP), polidispersidad (PD), masa molar (MM) de fracción FSK durante la maduración de frutos de <i>L. apiculata</i> y <i>P. andina</i> en dos localidades.	49
Table II.I. Quality assessments of <i>C. mucronata</i> , <i>P. punctata</i> and <i>B. berteriana</i> fruits in two developmental stages.....	77
Table II.II. Characterization of colour and composition of chlorophylls of <i>C. mucronata</i> , <i>P. punctata</i> and <i>B. berteriana</i> fruits in two developmental stages.	80
Table II.III. Cell wall material (AIR), lignin content, and content of uronic acids (UA) and neutral sugars (NS) in water-soluble (WSF), CDTA-soluble (CSF) and Na ₂ CO ₃ -soluble (NSF) fractions of <i>C. mucronata</i> , <i>P. punctata</i> and <i>B. berteriana</i> fruits in two developmental stages..	83
Table II.IV. Total phenolic content (TPC) and antioxidant capacity by FRAP method of <i>C. mucronata</i> , <i>P. punctata</i> and <i>B. berteriana</i> fruits at developmental stage II.....	84

Table II.V. Minimum Inhibitory Concentration (% v/v) of extracts of *C. mucronata*, *P. punctata* and *B. berteroana* fruits at developmental stage II against American Type Culture Collection (ATCC) bacterial strain.....85



INTRODUCCIÓN GENERAL

La diversidad biológica es la base de todos los bienes y servicios de los ecosistemas que nos proveen de alimentos y agua, amortiguan los impactos del cambio climático, controlan la propagación de enfermedades y sustentan el ciclo de los nutrientes. En general la importancia de la biodiversidad no solo radica en su importancia en el ciclo de la vida, también se reconoce que esta resulta indispensable para el desarrollo social, la integridad cultural, los medios de vida de la población y la supervivencia de las generaciones actuales y venideras (CONAMA 2003; Seguel, 2008).

La Organización de las Naciones Unidas (ONU) y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, por sus siglas en inglés) estiman que más de 1,6 billones de personas en el mundo dependen de los bosques y de los Productos Forestales No Madereros (PFNM) (Nepstad y Schwartzman 1992; Ros-Tonen y Wiersum 2005). Esta cifra incluye 60 millones de personas indígenas que son sumamente dependientes de este tipo de materia prima, y cerca de 350 millones de personas que viven al interior o cercano a bosques de los cuales depende sus sustento y vida (FAO, 2001). El Banco Central (Washington D.C) y la FAO, han estimado que los recursos que entrega el bosque contribuyen a la supervivencia del 90% de 1,2 billones de personas que viven en extrema pobreza, e indirectamente ayuda al soporte de la agricultura y la comida de cerca de la mitad de la población en desarrollo del mundo (World Bank, 2004; FAO, 2001).

Chile es considerado un país con un alto valor de endemismo conteniendo alrededor de 5.000 especies vasculares, siendo aproximadamente la mitad propias de nuestro país, distinguiendo a Chile como un “hotspot” de biodiversidad (Myers *et al.*, 2000). No obstante, aunque los recursos nativos son un factor preponderante para el desarrollo del país, una gran parte de la biodiversidad nativa no ha sido investigada y podría entregar grandes beneficios para la mejora y diversificación de actividades asociadas al fortalecimiento económico del país.

El 2009 la exportación de PFMN en Chile totalizó US\$ 62 millones, representando el 1,5% de las exportaciones de productos forestales, cifra muy superior a las exportaciones de productos maderables que equivalen solo al 0,36% del total sectorial, equivalente a US\$ 17,8 millones. Los frutos corresponden al principal tipo de PFMN exportado por Chile, alcanzando durante el 2009 un monto de US\$ 22,2 millones, equivalentes al 35,8% del total de PFMN destinados en su gran mayoría al mercado Europeo (INFOR, 2010). Estas cifras indican una oportunidad importante para el estudio y desarrollo de los frutos de las especies arbóreas nativas, las cuales tienen el potencial para impulsar un importante desarrollo de la industria agroalimentaria y farmacéutica. Debemos considerar que los frutos comprenden una fuente de elementos funcionales con un doble rol en relación a su particular proceso durante la maduración y los diferentes beneficios que otorgan a la salud humana (Martínez Tomé *et al.*, 2001).

Los frutos en general comprenden una fuente de elementos funcionales que poseen y acumulan una variedad de componentes bioquímicos que tienen múltiples usos, ya sea para la salud humana por consumo directo (Martínez Tomé *et al.*, 2001) o para la industria farmacéutica por la obtención y purificación de metabolitos de interés. Es por esta razón que el estudio de las características fisiológicas de los frutos y de su proceso de maduración contribuye a generar los primeros antecedentes para la valorización de PFMN de interés nacional.

Un aspecto de gran importancia para la comercialización de un fruto de buena calidad, es la mantención de sus características organolépticas y nutricionales. Estas características son determinadas por los procesos bioquímicos que ocurren durante el desarrollo y la maduración del fruto (Giovannoni, 2001). De esta forma, es importante conocer los eventos fisicoquímicos que suceden durante el desarrollo del fruto, para comprender e implementar condiciones de manejo que favorezcan la mantención de la calidad del fruto.

La maduración de frutos carnosos implica una serie de procesos que se realizan en forma coordinada, lo que incluye la modificación del color, textura, contenido de azúcares, calidad nutricional, sabor y aroma (Giovannoni, 2004). Entender como estos procesos son regulados durante la maduración permitiría desarrollar un producto de mayor calidad y por ende mayor

valor (Li *et al.*, 2010). En la mayoría de los casos la maduración es acompañada por un ablandamiento y pérdida de las propiedades mecánicas de las paredes celulares (Abbott *et al.*, 1992; Ranwala *et al.*, 1992; Brummell y Harpster, 2001; Perez-Almeida y Carpita, 2006), proceso que reduce la vida de estantería, provoca pérdidas, y limita el transporte y almacenamiento, todo lo cual afecta los costos (Brummell y Harpster, 2001).

Las paredes celulares son estructuras complejas y dinámicas, compuestas principalmente por celulosa, hemicelulosas, pectinas y proteínas estructurales altamente glicosiladas y eventualmente, lignina (Somerville *et al.*, 2004). Los principales componentes de la pared celular en frutos son las pectinas, que alcanzan aproximadamente el 60% de la masa de la pared celular en muchos frutos (Redgwell *et al.*, 1997). Cabe destacar que, además de su importante rol estructural, las pectinas constituyen un ingrediente valioso de los alimentos funcionales y son ampliamente empleadas como gelificantes, emulsionantes y estabilizantes (Ahrabi *et al.*, 2000; Willats *et al.*, 2006). Además, el consumo de este tipo de polisacárido constituyente de la fibra soluble de las frutas y verduras, tiene importantes efectos positivos sobre la salud humana, incluyendo la reducción del colesterol sérico y los niveles de glucosa (Behall y Reiser, 1986; Brown *et al.*, 1999; Yamada, 1996).

Un alto número de especies arbóreas nativas en Chile presenta escasa información acerca de la biología y utilidad económica de sus frutos. Por otra parte, muchas de estas especies presentan áreas de ocupación muy pequeñas confinadas solo a pequeñas zonas de nuestro país, las cuales han sido afectadas por la alteración de su hábitat producto de diversos cambios de uso de suelo (Hechenleitner *et al.*, 2005; Benoit, 1989). Entre las especies sometidas actualmente a diversos procesos de degradación o pérdida de su hábitat, y que presentan frutos interesantes para ser estudiados, se encuentran: naranjillo (*Citronella mucronata* (Ruiz & Pav.) D. Don) clasificado en el estado de conservación "preocupación menor"; pitao (*Pitavia punctata* Molina) especie en "peligro crítico"; belloto del sur (*Beilschmiedia berteriana* (Gay) Kosterm.) también en "peligro crítico"; lleuque (*Prumnopitys andina* (Poepp. ex Endl.) de Laub) clasificado como "vulnerable" (Benoit, 1989; UICN, 2013; MMA 2013); y arrayán (*Luma apiculata* (DC) Burret) como "preocupación menor" (UICN, 2013).

Dada la importancia de los recursos nativos y la escasa información referente a los frutos de estas especies, se realizará una caracterización de la maduración de frutos centrándose en las diferencias en los parámetros de maduración y los cambios que exhibe la pared celular durante la maduración. La información generada podría servir de plataforma para profundizar la investigación específica de las especies nativas en la búsqueda de elementos funcionales y la generación de productos atractivos comercialmente en frutos nativos.

HIPÓTESIS DE TRABAJO:

Existen diferencias cuantitativas y cualitativas que se producen a través de la maduración de frutos de especies arbóreas nativas, específicamente en relación a los atributos de calidad y a los polímeros de la pared celular,

OBJETIVOS.

- **Objetivo general**

Establecer las diferencias en parámetros fisicoquímicos de maduración y en las características de polímeros de pared celular, entre frutos de las diferentes especies, de los distintos estadios de maduración y de las poblaciones naturales a analizar.

- **Objetivos específicos**

1. Determinar las diferencias de tres estadios de maduración de frutos de los frutos de arrayán (*Luma apiculata*) y lleuque (*Prumnopitys andina*) de dos localidades (Cordillera de la Costa y de los Andes), en relación a sus parámetros fisico-químicos de maduración (firmeza, peso fresco, forma, color, contenido de sólidos solubles (CSS), acidez titulable (AT), pH y lignina) y al contenido de polímeros de pared celular, con énfasis en el tipo de pectinas a demás de peso molecular y diametro de partícula.
2. Caracterizar la maduración de los frutos de pitao (*P. punctata*), naranjillo (*C. mucronata*) y belloto del sur (*B. berteriana*), en relación a sus parámetros fisico-químicos de maduración: firmeza, peso fresco, forma, color, clorofila, contenido de fenoles, capacidad antioxidante y antibacteriana, contenido de sólidos solubles (CSS), acidez titulable (AT), pH, lignina y contenido de polímeros de pared celular.

CAPITULO I.

Cambios en los parámetros físico-químicos y en los componentes de la pared celular durante la maduración del fruto de arrayán (*Luma apiculata*) y lleuque (*Prumnopitys andina*) provenientes de la Cordillera de la Costa y los Andes de la Región del Biobío.

I.1. Resumen.

La relevancia que está adquiriendo el mercado los frutos de las especies arbóreas nativas del país y su importancia para la actividad económica rural motivan la necesidad de investigar y valorar estos productos. El arrayán (*Luma apiculata*) y el lleuque (*Prumnopitys andina*) han sido utilizadas desde la antigüedad por pueblos indígenas, no obstante a pesar de su evidente potencial no se han realizado estudios de calidad de estos frutos, lo que podría impactar positivamente en la valorización de estos recursos fitogenéticos nativos.

El objetivo del presente estudio fue estudiar las variaciones de sus características físico-químicas a demás de analizar los cambios en los componentes de la pared celular, principalmente las pectinas durante la maduración de los frutos de *L. apiculata* y *P. andina*.

Los frutos de ambas especies fueron colectados en dos localidades de la cordillera de la Costa, ("Costa") y de los Andes ("Andes") de la Región del Biobío, Chile. Los estadios de maduración fueron definidos según el tamaño, color y dulzor del fruto. Los frutos de ambas especies fueron clasificados durante el crecimiento y la maduración en tres estadios: verde (V), transición (T) y maduro (M). En cada estadio se caracterizaron parámetros físico-químicos de calidad de fruto (tamaño, peso, color (CIELAB), CSS, AT, relación CSS/AT y firmeza), y se analizó el material de pared celular (Residuos Insolubles en Alcohol (RIA)), la concentración de lignina y la composición y cambios de azúcares. En las fracciones enriquecidas de pectinas y hemicelulosas se cuantificó el grado de ramificación, peso molecular y diámetro específico de partícula.

Los resultados de los análisis físico-químicos mostraron que ambos frutos, aumentan significativamente su diámetro y peso durante la maduración alcanzando en el caso de *L. apiculata* 1 cm de diámetro, y el doble de tamaño para los frutos de *P. andina* en su estado

maduro. De manera similar la CSS aumenta notablemente en los estadíos finales de maduración llegando a valores 11.3 y 15.2 g 100 g⁻¹ PF en los frutos de *L. apicaulata* y *P. andina* respectivamente. Tendencias similares se observan en otros parámetros como pH y CSS/AT. En contraste, los atributos de firmeza y AT decaen a lo largo del proceso de maduración. En particular el parámetro de firmeza presentó una reducción significativa durante la maduración de ambas especies, donde solo los frutos de *L. apiculata* presentan diferencias significativas en la Costa. Por otra parte, el análisis CIELAB indicó una disminución significativa del parámetro L*, b*, hue y croma durante la maduración de ambos frutos, mientras que solo el parámetro a* presentó un aumento entre los estadíos de maduración con diferencias significativas entre localidades para ambas especies.

Los contenidos de RIA y lignina disminuyeron significativamente durante la maduración, lo que podría estar relacionado con la pérdida de firmeza en ambos frutos. Así mismo, el fraccionamiento de los RIA presentó un aumento significativo en el contenido de AU y AN de las fracciones soluble en agua (FSA) y en CDTA (FSC) durante la maduración de ambos frutos. Contradictoriamente en frutos de *L. apiculata*, la fracción soluble en Na₂CO₃ (FSN) disminuyó significativamente durante la maduración, mientras que *P. andina* no evidenció diferencias. En relación a las localidades, no se observaron diferencias en el contenido de AU en dicha fracción, por su parte ambos frutos presentaron diferencias significativas en el contenido de AN en Andes. Tendencias similares fueron observadas en la fracción soluble en KOH (FSK) en los frutos de *P. andina*, donde a pesar de un aumento en el estadío T, se produjo una reducción en el estadío M que resultó ser significativamente menor que el estadío V. Finalmente, los resultados de la composición de azúcares en RIA, indicó una reducción en el contenido de arabinosa, ácidos galacturónicos y glucorónicos para *L. apiculata*, mientras que los frutos de *P. andina* de manera opuesta mostraron un incremento en el contenido de ácido galacturónico, lo que puede estar asociado a la síntesis de nuevas cadenas de pectinas. Además de esto, los resultados en relación al diámetro de partícula en la FSA, indicó un aumento significativo durante la maduración mientras que las FSC y FSN presentaron una disminución durante la maduración de ambos frutos con excepción de lo descrito en los frutos de *P. andina* en FSC que no presentó diferencias significativas. Finalmente la FSK no presentó diferencias significativas durante la maduración.

I.2. Introducción.

El ablandamiento que sufren los frutos durante la maduración es característicos de cada especie, y se debe a diferencias en la composición de la pared celular, tamaño y forma de las células, la manera como se unen, sus contenidos y el turgor de estas (Somerville *et al.*, 2004). En este sentido el gran responsable del ablandamiento y los cambios texturales del fruto, es el desensamblaje de la pared celular que rodea las células vegetales y que se componen principalmente por polisacáridos de alto peso molecular como celulosa, hemicelulosas, pectinas y proteínas estructurales altamente glicosiladas y eventualmente, lignina (Somerville *et al.*, 2004). En el caso de los frutos la pared celular posee un escaso o nulo contenido de compuestos aromáticos y hasta un 65% de agua (Brummell, 2006).

La rigidez estructural y la fuerza de la pared celular dependen de la integridad de la red de celulosas y glicanos entrelazados (Perez-Almeida y Carpita 2006). Dichos componentes poseen la capacidad de determinar la forma celular, otorgar estabilidad mecánica, mantener unidas las células en un tejido, modular el crecimiento celular y constituir una barrera ante el ataque de patógenos. Se presume que el desensamblaje de la pared tiene lugar por la acción de variadas enzimas (Brummell y Harpster, 2001), las cuales realizan modificaciones covalentes de los polisacáridos de la pared celular, principalmente de su mayor constituyente las pectinas.

Ahora bien las pectinas son un conjunto heterogéneo de polímeros altamente hidratados, ricos en ácido α -D-galacturónico (AG) (Carpita y Mc Cann, 2000). En general, las pectinas son el grupo de componentes mayoritarios en la pared celular de los frutos y pueden llegar a conformar casi el 60% del contenido polimérico de la pared (Brummell, 2006; Redgwell *et al.*, 1997), organizándose principalmente en la pared primaria, y la lámina media (Jarvis y Briggs, 2003), lo que contribuye a la adhesión celular. La estructura general de estas macromoléculas está compuesta por bloques de homogalacturonanos (cadena lineal de ácido α -1,4-galacturónico) unidos covalentemente a ramnogalacturonanos del tipo I [\rightarrow 2)- α -L-rhamnosa-(1 \rightarrow 4)- α -L-ácido galacturónico-(1 \rightarrow], que llevan en sus cadenas laterales azúcares neutros como la arabinosa y la galactosa (Jarvis *et al.*, 2003; Mc Neil *et al.*, 1980; Mohnen, 2008; Ridley *et al.*, 2001) (Figura I.1). En gran medida los cambios sobre las propiedades viscoelásticas de la pared celular, y en consecuencia, en la textura de la fruta que ocurren en la

pared celular durante la maduración son producto de las modificaciones en las interacciones químicas de las pectinas (Redgwell *et al.*, 1997; Wakabayashi, 2000).

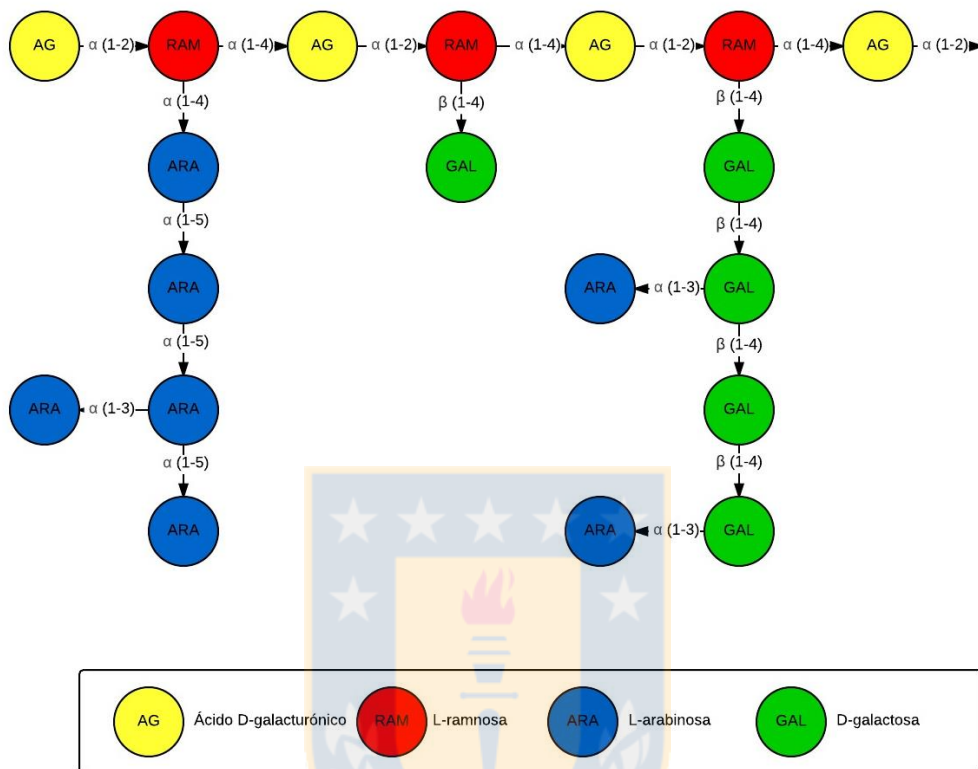


Figura I.1. Representación esquemática del ramnogalacturonano tipo I (RG I). Adaptado de Somerville *et al.*, 2004.

La importancia de las pectinas no solo recae en la estructura celular, si no que también son un ingrediente valioso de los alimentos funcionales y son ampliamente empleadas en todo el mundo en la elaboración de mermeladas, jaleas, jugos de frutas, bebidas de frutas concentrados, postres, preparados de cocción de frutas, lácteos y productos "delicatessen" (Koubala *et al.*, 2008; Tsoga *et al.*, 2004). Por otra parte, el consumo de este tipo de polisacárido constituyente de la fibra soluble de las frutas y verduras, tiene importantes efectos positivos sobre la salud humana, incluyendo la reducción del colesterol sérico y los niveles de glucosa (Behall y Reiser, 1986; Brown *et al.*, 1999; Yamada, 1996), lo que reduce el desarrollo de la úlcera y el cáncer (Jackson *et al.*, 2007; Kiyohara *et al.*, 1994; Nangia-Makker *et al.*, 2002), y estimula la respuesta inmune (Inngjerdingen *et al.*, 2007). De manera similar,

las pectinas son también empleadas en la formulación de productos cosméticos y farmacéuticos (Ahrabi *et al.*, 2000; Willats *et al.*, 2006), así como en inmovilización de enzimas (Gómez *et al.*, 2006; Gómez y Villalonga, 2000) lo que indica una gran diversidad de aplicaciones de estos polímeros.

Tradicionalmente la industria agroalimentaria utiliza los desechos de frutos cítricos, manzanas y remolachas como materia prima para la producción de pectinas (May, 1990). Sin embargo el estudio de nuevas fuentes de pectinas es un campo de interés en países en desarrollo y cuya flora no ha sido estudiada.

Considerando los antecedentes mencionados anteriormente, Chile en su calidad de “hotspot” de biodiversidad (Myers *et al.*, 2000) presenta una amplia gama de especies nativas y endémicas, lo que representa un recurso genético importante que podría entregar grandes beneficios para el desarrollo y diversificación de actividades asociadas al fortalecimiento económico del país (CONAMA 2003; Seguel, 2008). No obstante, aunque el valor de la biodiversidad sea preponderante para el desarrollo de nuestro país, la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) ha registrado un total de 323 especies endémicas con algún grado de amenazadas en nuestro país (Walter y Gillett, 1998), de las cuales un alto número presentan escasa información acerca de su biología y utilidad, además de subpoblaciones con áreas de ocupación muy pequeñas (Hechenleitner *et al.*, 2005; Benoit, 1989)

El lleuque o uva de la cordillera [*Prumnopitys andina* (Poepp. ex Endl.) de Laub., Podocarpaceae], es una especie endémica de Chile, actualmente catalogada como vulnerable (UICN 2013), localizada desde Linares (Región del Maule) hasta la provincia de Cautín (Región de la Araucanía), entre la Cordillera de los Andes y parte de la Cordillera de la Costa. El *P. andina* es una de las pocas coníferas que presentan una pseudo fruto comestible (Baeza y Llana, 1942; Donoso, 1974; Rodríguez *et al.*, 1983; Woltz, 1986), botánicamente un arilo carnoso, es decir una expansión del funículo (punto de unión de la semilla al ovario) (Anderson y Owens, 2003). Teniendo en cuenta esta aclaración, en la presente tesis se denominará "fruto" al arilo carnoso del *P. andina*. A pesar de que *P. andina* es una especie

relativamente escasa, sus usos tradicionales van desde la madera para la construcción de muebles finos debido a su color amarillento, a la preparación de bebidas fermentadas y mermeladas utilizando el arilo que rodea la semilla, incluso siendo utilizado en la alimentación animal (Rodríguez, 2004). Es posible que la consistencia viscosa de los frutos de *P. andina* tenga relación con el contenido de pectinas en los frutos, característica que potenciaría su uso para el consumo humano, como espesante de alimentos.

En este mismo campo, los frutos de arrayán [*Luma apiculata* (DC) Burret., Myrtaceae] representan una alternativa con alto potencial en la industria agroalimentaria. Tradicionalmente se conoce a esta especie con el nombre de arrayán rojo, arrayán chileno, palo colorado, quetri o temu y corresponde a una especie arbórea siempre verde (Muñoz, 1966). Habitualmente crece en los bosques templados de Chile y Argentina, extendiéndose en nuestro país desde la Región de Valparaíso hasta la Región de Aysén. Su fruto es una baya comestible, muy aromática y de intenso sabor, de color negro o morado (Montenegro *et al.*, 2004). Continuando con este punto, los frutos de arrayán han sido utilizados por poblaciones rurales en la elaboración de té y la producción de licor, debido a sus singulares características como su particular color, sabor y aroma que los convierte en insumos importantes para la innovación en la industria agroalimentaria, de igual manera se han reportado efectos beneficiosos de esta planta para la salud humana (González y Molaes, 2004). Así mismo, el arrayán ha demostrado ser una especie con favorable domesticación, siendo utilizada como árbol ornamental en jardines en Chile y Europa (Sánchez de Lorenzo y Cáceres, 2008).

Cabe señalar que a pesar de los atributos positivos de estos frutos, actualmente existen escasos estudios que revelen la composición de los polisacáridos pécticos, así como sus condiciones de extracción o su posible implicancia en la industria agroalimentaria o farmacéutica. La presente tesis aborda la caracterización de los parámetros físico-químicos y de los polisacáridos de la pared celular de los frutos de las especies *P. andina* y *L. apiculata* en tres diferentes estadios de maduración (verde, transición y maduro) en dos localidades ubicadas en la Cordillera de los Andes y la Cordillera de la Costa en Chile.

I.3 Metodología.

I.3.1. Material vegetal.

Se colectaron frutos en estadio verde (V), transición (T) y maduro (M) de las especies *L. apiculata* y *P. andina* en dos diferentes sectores (Andes, por Cordillera de los Andes y Costa, por Cordillera de la Costa) de la VIII y IX Regiones. Los sectores prospectados corresponden a San Fabián de Alico (Long: 5939803- Lat: 296746 UTM), Angol (Long: 5810808- Lat: 690947 UTM) y Reserva Nacional Nonguén (Long: 5916759- Lat: 678863 UTM) (Figura I.2). La clasificación de los estadios se realizó principalmente por estadio de desarrollo de los frutos, considerando para esto las fechas de maduración de frutos indicadas en la literatura para ambas especies (Hechenleitner *et al.*, 2005). Además se consideraron cambios físicos como el color y el tamaño de los frutos. En particular las fechas de colecta para los frutos de *L. apiculata* fueron inicialmente a mediados de febrero para su estadio V, luego entre los meses de marzo a abril para el estadio T y finalmente entre los meses de mayo a julio para el estadio M. Por otra parte, las fechas de colecta de *P. andina* fueron entre los meses de diciembre y enero para su estadio V, en febrero para su estadio T, mientras que para su estadio M fueron colectados en marzo.

Los frutos fueron recolectados desde los árboles sin alterar su estado e inmediatamente se procedió a su embalaje y transporte en frío al Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, Centro de Biotecnología de la Universidad de Concepción, siendo caracterizados según su peso, forma, tamaño, color y firmeza.

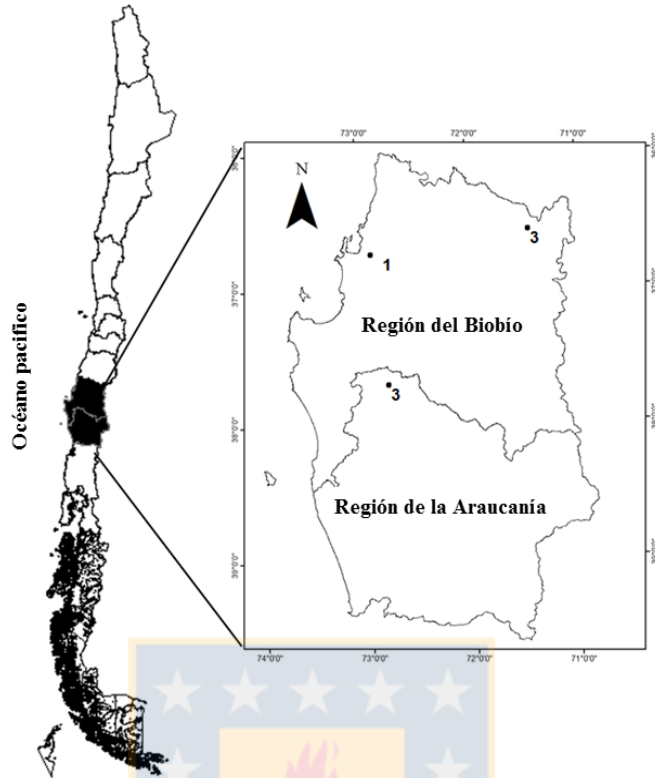


Figura I.2. Localización geográfica de las poblaciones naturales de *L. apiculata* y *P. andina* muestreadas en la presente tesis. De la Costa, “Reserva Nacional Nonguen” para *L. apiculata* (1), “Angol” para *P. andina* (2), y de los Andes “San Fabián de Alico” para ambas especies.

Los frutos de cada especie, estadio y localidad, fueron caracterizados según algunas propiedades físico-químicas que se detallan a continuación.

I.3.2. Caracterización físico-química de los frutos.

I.3.2.1. Peso fresco y tamaño de los frutos:

El peso fresco de los frutos se determinó utilizando una balanza analítica (Denver instrument company AA-200). Por su parte, el tamaño del fruto fue determinado por medio de la medición del diámetro ecuatorial de los frutos de las especies bajo análisis en sus distintos estados de maduración utilizando un pie de metro digital (CALIPER profesional). Para ambos ensayos se consideraron un número de 30 mediciones por estadio de cada especie.

I.3.2.2. Cuantificación del color de los frutos:

El color de los frutos fue determinado mediante la utilización de un colorímetro (Konica-Minolta modelo CR400, Japón) de acuerdo a los parámetros CIELAB de variación de luminosidad (L^*), variación del verde ($-a^*$) a rojo ($+a^*$) y del amarillo ($-b^*$) a azul ($+b^*$) del espectro visible de cada muestra, además de otros parámetros como Chroma y Hue. Se consideró un número de 50 mediciones para cada estadio de las especies bajo estudio.

I.3.2.3. Contenido de sólidos solubles (CSS), acidez titulable (AT) y pH:

Para la determinación de CSS, AT y pH, se realizó una molienda de 5 g de tejido de cada muestra. Posteriormente, las muestras fueron homogenizadas en agua ajustando la muestra en un volumen de 5 mL. La mezcla se filtró a través de un filtro miracloth, y el filtrado obtenido fue utilizado para determinar el CSS según González *et al.*, (2004), con algunas modificaciones. El CSS fue determinado a 20°C utilizando un refractómetro manual (Atago Co., Japón) con compensación de temperatura y los resultados se expresaron como g/g de peso fresco (PF). En el caso de la AT y pH, fue determinado mediante la titulación de una alícuota de 5 mL de jugo del fruto con 20 mM NaOH hasta alcanzar un pH 8.2. Los resultados se expresaron como mEq de ácido/g PF (San Martín *et al.*, 2012).

I.3.2.4. Medición de firmeza de los frutos:

La firmeza de los frutos se determinó utilizando un analizador de textura (modelo CT3, Brookfield Engineering Labs. Inc, USA). Las mediciones se realizaron punzando la zona ecuatorial de los frutos, realizando 2 mediciones en zonas opuestas de cada fruto, considerando 30 mediciones por estadio en cada especie y localidad.

I.3.3. Análisis de pared celular.

I.3.3.1. Extracción de residuos insolubles en alcohol (RIA):

El material de pared celular (considerando como Residuos Insolubles en Alcohol, RIA) fue extraído según lo descrito por Vicente *et al* (2007), con algunas modificaciones. Se homogenizaron 10 g de tejido de cada muestra en Ultraturrax en 4 volúmenes de etanol (40 mL de EtOH 95%) y posteriormente, hervidos durante 45 min. Luego el residuo fue filtrado en miracloth, lavando el residuo tres veces con 15 mL etanol (70°C). A continuación, el residuo

se dejó por 20 min en 15 mL cloroformo/metanol (1:1) y se filtró, lavando tres veces el residuo con 15 mL cloroformo/metanol. El residuo una vez más se dejó reposar por 20 min en 15 mL de acetona repitiendo los pasos de filtrado y los 3 lavados con 15 mL de acetona. Finalmente el RIA se secó a 37 °C por 2 días siendo pesado hasta alcanzar un peso constante. Los resultados fueron expresados como g de RIA por 100 g de PF.

I.3.3.2. Determinación de lignina:

El contenido de lignina fue determinado de acuerdo a lo reportado por Campbell y Ellis (1992), con algunas modificaciones. Después de la obtención del material de pared celular, las muestras fueron diluidas e hidrolizadas en 1 M NaOH (1/3, v/v). La cuantificación de las muestras se determinó por colorimetría utilizando ácido tioglicólico (Sigma Aldrich, USA) midiendo la absorbancia a 280 nm. Los resultados fueron expresados como µg de lignina por g PF.

I.3.3.3. Cuantificación de los componentes de la pared celular:

Los cambios en el contenido de polímeros de pared celular se determinaron realizando un fraccionamiento químico de RIA mediante solubilización secuencial en agua, CDTA, Na₂CO₃, y KOH, según lo descrito por Vicente *et al.* (2007) con algunas modificaciones (Figura I.3).

La fracción soluble en agua (FSA) se obtuvo al resuspender 100 mg de AIR en 15 mL de agua agitando durante 12 h a temperatura ambiente. Posterior a esto, la mezcla se centrifugó a 6000 rpm durante 20 min a 4°C con el fin de precipitar los residuos no solubles en agua. El sobrenadante de la mezcla se filtró con filtros de fibra de vidrio (Whatman GF/C), y posteriormente el filtrado se lavó dos veces con 15 mL de agua. El filtrado y los lavados se mezclaron y se designaron como FSA.

La fracción soluble en CDTA (FSC) se obtuvo al combinar el residuo de insoluble en agua con 15 mL de 50 mM trans-1,2-diaminociclohexano-N, N, N, N-tetraacético ácido (CDTA) (pH 6.5) por agitación de la mezcla durante 12 h. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 6000 rpm durante 20 min a 4°C, filtrando una vez más como se mencionó en la obtención de la FSA, el sedimento restante se lavó dos veces con 15 mL de solución CDTA. El filtrado y los lavados se mezclaron y se designaron como FSC.

A continuación el sedimento insoluble obtenido de CDTA se extrajo con 15 mL de Na_2CO_3 50 mM que contienen NaBH_4 20 mM, durante 1 h a 4°C , con agitación constante. El homogenizado se centrifugó y filtró en similares condiciones que las fracciones anteriores, lavando dos veces el residuo con 15 mL de solución de Na_2CO_3 . Siendo la fracción resultante denominada como FSN.

Finalmente el sedimento rescatado de la FSN, se extrajo con 15 mL de KOH 4 M que contiene NaBH_4 1 mM, durante 1 h a 4°C , en agitación constante. La mezcla con el solvente se centrifugó y filtró. Posteriormente el sedimento fue lavado dos veces con 15 ml de la solución de KOH , designando la fracción soluble en KOH como FSK.

Para todas las fracciones se consideró tres extracciones independientes por cada réplica biológica.



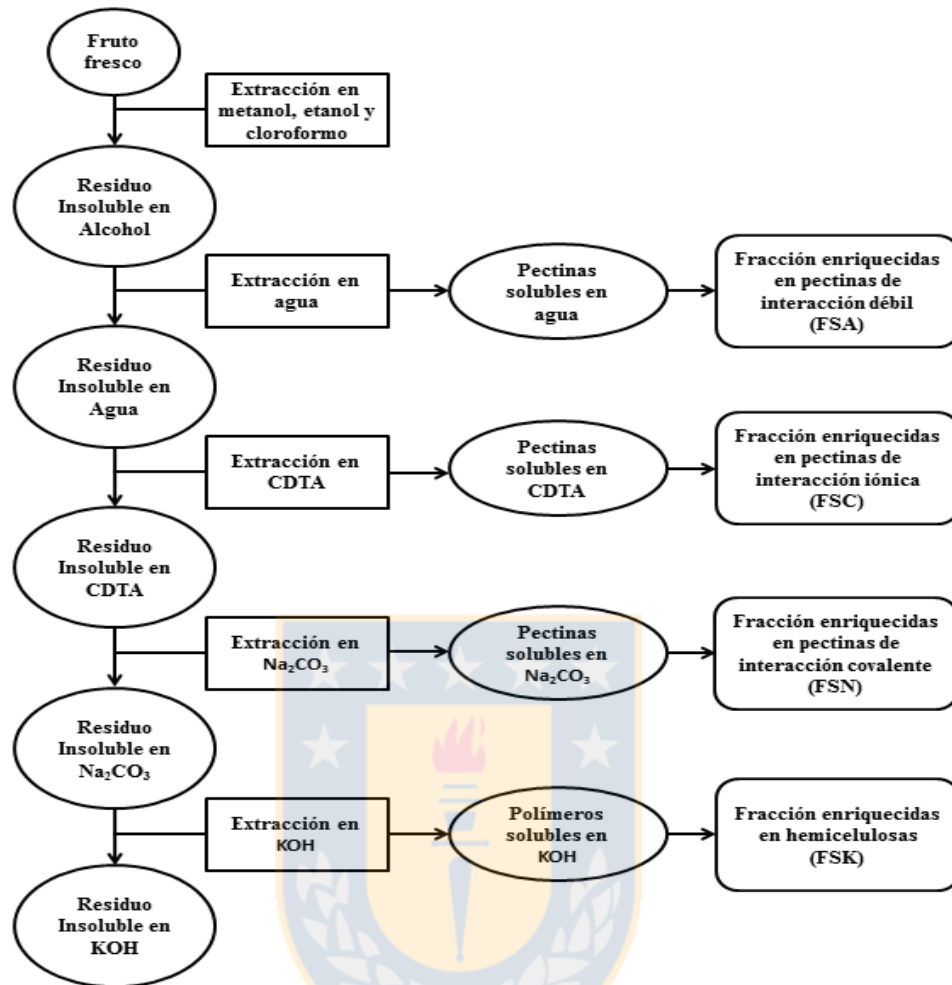


Figura I.3. Esquema de los pasos del fraccionamiento de pared celular realizados en la presente tesis. Se describen las diferentes fracciones enriquecidas con pectinas y polímeros de pared celular. Fracción Soluble en Agua (FSA), Fracción soluble en CDTA (FSC), Fracción Soluble en Na_2CO_3 (FSN) y Fracción Soluble en KOH (FSK).

I.3.4. Análisis colorimétrico de las fracciones.

I.3.4.1. Determinación de ácidos urónicos (AU):

Las concentraciones de ácido urónico de todas las fracciones pécticas fueron estimadas por el método de *m*-hidroxifenil usando ácido galacturónico (AG) como estándar (Blumenkrantz *et al.*, 1973). De cada fracción péctica se extrajo un volumen de 210 μL el cual se hidrolizó con 1250 μL de una solución consistente en 0,0125 M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ en H_2SO_4 concentrado, incubando la muestra durante 1 min en mezcla agua-hielo, para luego mezclar por vórtex. Posteriormente

la solución se incubó 10 min en agua hirviendo, y se agregó 20 μ L de la solución 0,15% (p/v) 3-fenilfenol (PhPOH) en 0,5% (p/v) de NaOH. La absorbancia de la mezcla se determinó a 520 nm en espectrofotómetro (Spectronic Genesys 2). La curva de calibración se realizó utilizando una dilución seriada a partir de 0,33 mM AG en 50 mM ácido acético/acetato de sodio (pH 5.5) (Blumenkrantz *et al.*, 1973).

I.3.4.2. Determinación de azúcares neutros (AN):

La concentración de azúcares neutros (AN) de todas las fracciones de pared celular se estimó por el método de antrona usando glucosa como estándar (D' Amour *et al.*, 1993). De cada fracción se extrajo un volumen de 200 μ L el cual se hidrolizó con 2 mL de una solución consistente en 0,05% (p/v) antrona (Sigma, USA) en 66% (v/v) H_2SO_4 , la cual se mezcló con vórtex. La muestra se incubó durante 20 min en agua hirviendo y después 1 min en baño agua-hielo. Luego, se dejó por 15 min en oscuridad, para posteriormente determinar la absorbancia de la mezcla a 620 nm en espectrofotómetro (Spectronic Genesys 2). El contenido de AN de las fracciones pécicas fue calculado en base a una curva de calibración utilizando una dilución seriada a partir de 0,16 mg/ml de 0,04% (p/v) glucosa en agua destilada (Blumenkrantz *et al.*, 1973; Yemm y Willis, 1954).

Tanto para AG y AN, las mediciones se realizaron por triplicado, y los resultados se expresaron como microgramos de ácido galacturónico o glucosa por miligramo de AIR.

I.3.4.3. Cociente de ramificación.

El coeficiente de ramificación de pectinas fue calculado en base a la relación del contenido de azúcares neutros/ácidos urónicos. Los resultados fueron expresados como glucosa/ácido galacturónico, y se calcularon para cada fracción y estadio de maduración.

I.3.5. Composición de azúcares en hemicelulosas.

El contenido de los azúcares (%) en los residuos insolubles en alcohol, se determinó por medio de una metanólisis ácida según lo descrito por Ferraz *et al.* (2005). Por cada muestra 12 a 17 mg de RIA se mezclaron con 2 ml de cloruro de acetilo/ etanol en un matraz de corazón en estufa a 100° C durante 3 h. Posteriormente, las muestras fueron enfriadas hasta temperatura

ambiente para agregar 10 µl de pirimidina y 4 ml de un estándar preparado con 5 mg de sorbitol en 50 ml de metanol. Las muestras fueron secadas en rotavapor para luego recuperar el residuo con 100 µl de pirimidina. Luego se agregó 150 µl de hexametil y 80 µl de cloritrimetil dejando reposar la mezcla toda la noche. Finalmente las muestras fueron centrifugadas y 100 µl se inyectaron en un cromatógrafo de gas (Clarus 600 PerkinElmer™). Los estándares fueron generados con una mezcla de 0,05 gr de los azúcares arabinosa (Ara), xilosa (Xyl), galactosa (Gal), rhamnosa (Rha), glucosa (Glu), ácido galacturónico (GalA) y ácido glucorónico (GlcA) en 5 ml de sorbitol. La mezcla fue agitada en un agitador magnético y centrifugada a 2500 rpm. Posteriormente se inyectaron 100 µl del estandar en un cromatógrafo de gas (Clarus 600 PerkinElmer™) y la identificación de los azúcares se generó por la visualización de los picos en sus respectivos tiempos de retención cromatográficos característico de cada azúcar.

I.3.5.1. Procesamiento de muestras para análisis cualitativo de azúcares y pectina

Previo al análisis por HPLC y DLS las muestras fueron dializadas en membranas de diálisis (Sigma Spectra Por 3 de 3500 D). La diálisis se realizó contra agua destilada estéril en agitación constante durante 24 h, con un cambio de agua a las 12 h. La preparación de la membrana se llevo a cabo según las especificaciones del proveedor.

I.3.6. Obtención de la masa molar promedio (MM) y diámetro de partícula efectivo de pectinas (DP) y el índice de polidispersidad (PD).

Las diferentes muestras de pectinas fueron medidas utilizando la técnica de Dispersión de Luz Dinámica (DLS), mediante el equipo "90 Plus Particle Size Analyzer" (Brookhaven Corp.) equipado con un láser de alto poder (35 mW). Para esto, dispersiones diluidas de cada muestra de pectina (0,1 g/mL) fueron preparadas utilizando 0,1 mol/L nitrato de sodio como solvente en la relación 1:1. Adicionalmente, las mezclas fueron filtradas a través de filtros de membrana de 0,45 µm. La variación de la luz dispersada en función del tiempo fue medida a un ángulo de 90° a 25 °C obteniéndose 5 registros por cada muestra. A fin de obtener la masa molar promedio de las pectinas en kDa, diámetro de partícula efectivo (nm) e índice de

polidispersidad. Los resultados se ajustaron a la ecuación de un modelo lineal para polisacáridos Mark–Houwink–Sakurada (Wagner, 1985).

I.3.7. Diseño experimental y análisis estadístico.

El análisis estadístico de las mediciones consideró un diseño factorial considerando los diferentes estadios de maduración y localidad de procedencia. Las mediciones consideraron tres réplicas biológicas y tres replicas técnicas. Los resultados fueron analizados mediante análisis de varianza fue realizado utilizando el software estadístico InfoStat (Version 2008), utilizando un test de comparacion de medias LSD a un nivel de significancia de 0,05.

I.4. Resultados.

I.4.1. Clasificación morfológica de estadios y caracterización fisicoquímica de la maduración de frutos de *L. apiculata* y *P. andina*.

I.4.1.1. Caracterización morfológica

Debido a que existe muy poca información con respecto a la clasificación de la maduración de frutos nativos en Chile, la caracterización de sus diferentes estadios fue realizado por variables físicas. Los frutos de arrayán fueron caracterizados por su cambio en la coloración de la piel, en su estado inicial presenta un 100% del fruto en un color verde (V), luego en su estado de transición (T) presenta una coloración de un 50% a 75% rosa a morado, finalmente en su estado maduro (M) el fruto alcanza una coloración completamente morada llegando incluso a un color cercano al negro. Luego, debido a que los frutos de *P. andina* no presentan cambios importantes en la coloración del fruto, se realizó una clasificación de sus estadios de maduración basada en los atributos de tamaño (calibre) y sabor. En su estado inicial los frutos presentan una coloración verde, un sabor ácido y una textura firme, a continuación en su estado de transición el color de los frutos tienen un color verde pálido, sabor ácido y una textura mucilaginosa, posteriormente el sabor del fruto varía a dulce, su color se torna verde amarillento y su consistencia se vuelve aun más mucilaginosa (Figura I.4).

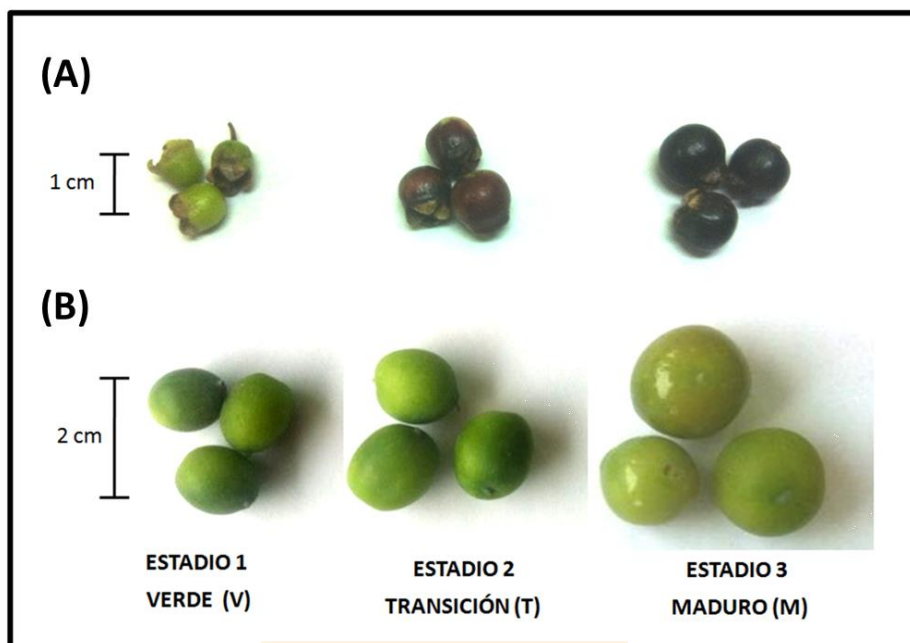


Figura I.4. Imagen representativa de los frutos de *L. apiculata* y *P. andina* estudiados en la presente tesis. (A) *L. apiculata* y (B) *P. andina*, en sus diferentes estadios de desarrollo (verde (V), transición (T) y maduro (M)).

I.4.1.2. Caracterización y comparación de parámetros físico-químicos generales de la maduración.

El análisis general de los cambios físico-químicos asociado a la maduración de los frutos de *L. apiculata* y *P. andina* en las dos localidades, reveló que para los parámetros de peso y diámetro, en ambas especies presentan un incremento significativo durante el desarrollo y maduración (Tabla I.I). Luego, el análisis entre localidades determinó que los frutos de *L. apiculata* presenta valores significativamente mayores para estos atributos en la localidad de la Costa, mientras que los frutos de *P. andina* no se presentaron diferencias significativas entre las diferentes localidades. Cabe destacar que los valores más altos relacionados con estos parámetros se observaron en los frutos de *P. andina* (estadio M) con un promedio de 3,6 g y 20,15 mm, mientras que los más bajos se presentaron en los frutos de *L. apiculata* en su estado inmaduro con un promedio de 0,3 g y 7,45 mm (Tabla I.I).

En relación a los valores de pH, los frutos de *L. apiculata* mostraron un aumento significativo durante la maduración variando desde un pH 5.0 en el estadio V, a un pH 6.0 en M. A diferencia de lo observado previamente los frutos de *P. andina* presentaron valores de pH bajos (3.5) en su estado inmaduro (V) y valores cercanos a 4.1 en el estadio M. Similarmente ambas especies presentaron los valores significativamente menores en la Costa, salvo en el estadio M donde en la localidad de los Andes es mayor.

En cuanto a la acidez titulable (AT) se observó una reducción significativa durante la maduración del fruto de ambas especies, en este sentido los frutos de *L. apiculata* solo exhibieron diferencias entre el estadio M y los estadios V y T, mientras que en los frutos de *P. andina* se observaron diferencias significativas entre todos los estadios de maduración. El análisis entre localidades de los frutos de *L. apiculata* indicó que no existen diferencias significativas, mientras que los frutos de *P. andina* presentaron diferencias significativas entre los estadios V y M en los Andes.

Acerca de los valores de SSC y de la relación SSC/TA en ambas especies se observó un incremento durante la maduración, observando diferencias significativas entre los diferentes estadios de maduración. De manera similar a los valores de pH, los frutos de *L. apiculata* presentaron mayores valores en la Costa para ambos atributos. En contraste, los frutos de *P. andina* fueron significativamente mayores en la localidad de los Andes (Tabla I.I).

Tabla I.I. Caracterización físico-química general de tres estadios de desarrollo de frutos de *L. apiculata* y *P. andina* en las localidades de la Cordillera de la Costa y de los Andes.

Especie/localidad	Estadios	Peso fresco (gr)	Diámetro (mm)	pH	SSC	TA	CSS/TA
					(g 100 g ⁻¹ PF)	(% ácido cítrico)	
<i>L. apiculata</i> Costa	Verde	0,37±0,07 ^{Bb}	7,1±1,1 ^{Ab}	5,0±0,04 ^{Ba}	5,6±0,3 ^{Ac}	4,57±0,32 ^{Aa}	1,16±0,01 ^{Ac}
	Transición	0,47±0,15 ^{Aab}	8,1±1,4 ^{Ab}	5,2±0,05 ^{Ba}	7,7±0,25 ^{Ab}	4,12±0,09 ^{Aa}	1,35±0,09 ^{Ab}
	Maduro	0,68±0,11 ^{Aa}	10,9±1,3 ^{Aa}	5,6±0,05 ^{Ba}	9,8±0,2 ^{Ba}	3,64±0,48 ^{Ab}	3,15±0,37 ^{Aa}
<i>L. apiculata</i> Andes	Verde	0,25±0,12 ^{Ab}	7,8±0,9 ^{Ab}	5,4±0,15 ^{Ab}	5,3±0,4 ^{Ab}	4,19±0,01 ^{Aa}	1,3±0,09 ^{Ac}
	Transición	0,5±0,19 ^{Aab}	8,2±1,5 ^{Ab}	5,5±0,06 ^{Ab}	5,6±2,6 ^{Ab}	4,15±0,01 ^{Aa}	1,87±0,1 ^{Ab}
	Maduro	0,5±0,03 ^{Ba}	10,1±1,1 ^{Aa}	6,0±0,04 ^{Aa}	11,3±0,3 ^{Aa}	3,94±0,14 ^{Ab}	2,48±0,09 ^{Aa}
<i>P. andina</i> Costa	Verde	2,1±0,17 ^{Ab}	12,6±1,1 ^{Ac}	3,3±0,01 ^{Bc}	11,5±0,5 ^{Bc}	0,84±0,06 ^{Aa}	13,8±1,85 ^{Bc}
	Transición	2,5±0,6 ^{Aab}	17,3±1,0 ^{Bb}	3,4±0,05 ^{Bb}	13,4±0,5 ^{Bb}	0,49±0,09 ^{Ab}	27,67±4,5 ^{Ab}
	Maduro	3,3±0,8 ^{Aa}	20,4±1,3 ^{Aa}	4,5±0,03 ^{Aa}	15,2±0,4 ^{Aa}	0,31±0,03 ^{Ac}	48,56±5,03 ^{Ba}
<i>P. andina</i> Andes	Verde	2,4±0,07 ^{Ab}	13,9±1,1 ^{Ab}	3,7±0,01 ^{Aa}	12,3±0,7 ^{Ab}	0,71±0,06 ^{Ba}	17,3±1,1 ^{Ac}
	Transición	2,7±0,6 ^{Ab}	19,5±1,6 ^{Aa}	3,6±0,01 ^{Ab}	14,4±0,5 ^{Aa}	0,49±0,01 ^{Ab}	29,4±0,5 ^{Ab}
	Maduro	3,9±0,9 ^{Aa}	19,9±0,9 ^{Ba}	3,7±0,01 ^{Ba}	15,2±0,6 ^{Aa}	0,16±0,02 ^{Bc}	104,5±10,4 ^{Aa}

Los datos indican la media de tres replicas ± D.E. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre localidades de la misma especie, letras minúsculas representan diferencias significativas entre estadios ($P \leq 0.05$).

I.4.1.3 Cambios en la composición de color durante la maduración.

Los parámetros de color mostraron diferencias significativas durante el desarrollo y maduración de los frutos de ambas especies (Tabla I.II). En relación al parámetro L^* (-luminosidad/+oscuridad) se observó una disminución en los valores durante la maduración de los frutos de *L. apiculata*. Estos valores descienden en promedio un 60% desde el estadio V al M, sin presentar diferencias significativas entre localidades. Resultados similares fueron observados para los parámetros b^* , croma y hue (h°) en los frutos de *L. apiculata* donde se observaron diferencias significativas desde el estadio verde al maduro. En particular en el parámetro b^* y croma solo presentaron valores significativamente mayores en el estadio V y T en la localidad de la Costa y Andes respectivamente mientras que para el parámetro hue no se evidenciaron diferencias significativas durante la maduración entre localidades (Tabla I.II). En contraposición, los resultados en torno al parámetro a^* (-verde/+rojo) en los frutos de *L. apiculata*, indican un aumento significativo desde su estado verde a los estadios maduros, por otra parte solo el estado T presentó valores significativamente mayores en la localidad de la Costa.

La evolución de los valores de L^* y a^* a través del desarrollo y maduración de los frutos de *L. apiculata* muestra una disminución drástica del parámetro L^* en ambas localidades (Figura I.5).

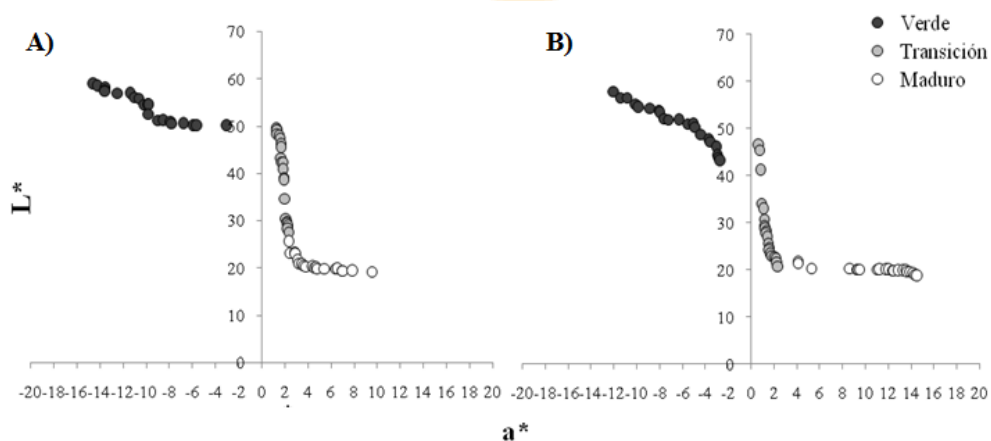


Figura I.5. Distribución de los valores de los parámetros de color L^* y a^* en frutos de *L. apiculata* durante los estadios de maduración (verde (V), transición (T) y maduro (M)). A) Andes y B) Costa.

Los resultados en el parámetro L^* en los frutos de *P. andina*, solo mostraron diferencias significativas durante la maduración en la localidad de los Andes, no obstante esta disminución fue menos drástica (solo de un 10%) que lo reportado en los frutos de la *L. apiculata*. Por su parte, el análisis del parámetro a^* indicó que existen diferencias significativas durante la maduración, presentando valores significativamente mayores en el estado T y M en ambas localidades. Lo opuesto fue observado en los parámetros b^* y croma en los frutos de *P. andina*, donde se observaron valores significativamente menores en el estado M en ambas localidades. En contraste en el parámetro hue no fue posible establecer diferencias significativas durante la maduración de los frutos (Tabla I.II). En relación a las diferencias entre localidades, solo el estadio maduro de la localidad de los Andes presentó valores significativamente menores en los parámetros L^* , a^* , b^* y croma, mientras que el resto de los valores resultó ser significativamente similar.

El análisis de la evolución de los valores de L^* y a^* a través del desarrollo y maduración de los frutos indicó una disminución durante la maduración aunque menos pronunciada que lo observado para *L. apiculata* (Figura I.6).

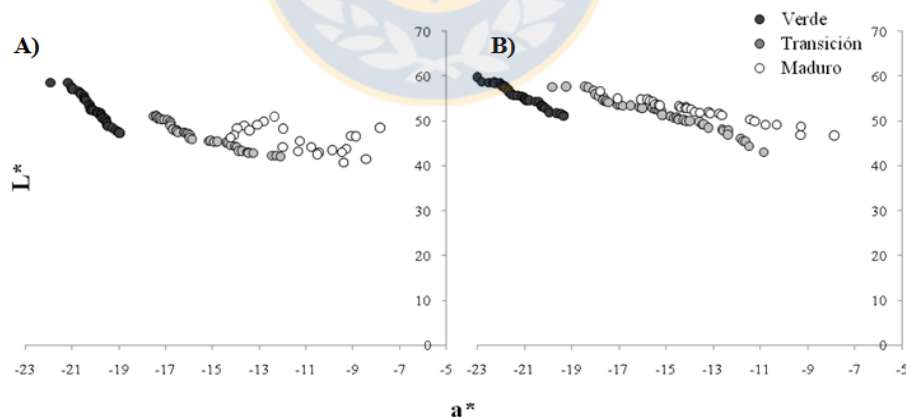


Figura I.6. Distribución de los valores de los parámetros de color L^* y a^* en frutos de *P. andina* durante los estadios de maduración (verde (V), transición (T) y maduro (M)). A) Andes y B) Costa.

Tabla I.II. Cambios en el color de tres estadios de desarrollo de frutos de *L. apiculata* y *P. andina* en las localidades de la Cordillera de la Costa y de los Andes.

Especie/localidad	Estadios	L^*	a^*	b^*	Croma	Hue (h°)
<i>L. apiculata</i>	Verde	50,1±5,3 ^{Aa}	-7,1±3,6 ^{Ac}	16,0±7,5 ^{Ba}	22,1±8,1 ^{Aa}	111,5±6,2 ^{Aa}
C. Costa	Transición	29,1±9,1 ^{Ab}	10,4±3,8 ^{Aa}	5,5±2,7 ^{Ab}	12,7±3,2 ^{Aa}	29,2±14,0 ^{Ab}
	Maduro	20,1±1,1 ^{Ab}	1,5±0,7 ^{Ab}	0,7±0,3 ^{Ac}	1,7±0,8 ^{Ab}	28,3±14,0 ^{Ab}
<i>L. apiculata</i>	Verde	50,2±6,1 ^{Aa}	-10,2±4,1 ^{Ab}	31,3±5,3 ^{Aa}	33,1±5,9 ^{Aa}	107,2±5,2 ^{Aa}
C. de los Andes	Transición	41,2±12,6 ^{Aab}	4,4±2,2 ^{Ba}	2,9±1,6 ^{Ab}	6,8±2,4 ^{Bb}	35,1±18,9 ^{Ab}
	Maduro	21,4±3,2 ^{Ab}	2,09±0,8 ^{Aa}	0,8±0,3 ^{Ab}	2,1±0,1 ^{Ac}	24,2±8,1 ^{Ab}
<i>P. andina</i>	Verde	53,6±3,5 ^{Aa}	-20,8±1,1 ^{Ab}	42,5±2,5 ^{Aa}	47,1±2,7 ^{Aa}	116,3±1,5 ^{Aa}
C. Costa	Transición	51,6±3,5 ^{Aa}	-15,3±2,1 ^{Aa}	35,4±3,9 ^{Ab}	38,5±3,9 ^{Ab}	114,1±2,3 ^{Aa}
	Maduro	52,5±1,9 ^{Aa}	-14,2±1,9 ^{Aa}	35,8±2,7 ^{Ab}	38,7±2,8 ^{Ab}	111,8±2,1 ^{Aa}
<i>P. andina</i>	Verde	51,7±3,5 ^{Aa}	-19,9±0,7 ^{Ab}	37,9±2,5 ^{Aa}	42,8±2,8 ^{Aa}	117,7±1,8 ^{Aa}
C. de los Andes	Transición	46,9±3,2 ^{Ab}	-15,5±1,9 ^{Aa}	30,7±2,9 ^{Ab}	34,1±3,7 ^{Ab}	117,7±1,7 ^{Aa}
	Maduro	45,9±2,6 ^{Bb}	-11,6±1,7 ^{Ba}	23,9±4,0 ^{Bc}	26,9±4,0 ^{Bc}	115,0±2,4 ^{Aa}

Los datos indican la media de tres replicas ± D.E. Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas entre localidades de la misma especie, letras minúsculas representan diferencias significativas entre estadios ($P \leq 0.05$).

I.4.1.4. Cambios en la firmeza del fruto.

Los valores de firmeza registrados para frutos de *L. apiculata* revelaron una reducción significativa en dicho parámetro durante el proceso de maduración (Fig. I.7). En relación a estos resultados, los mayores valores de firmeza fueron observados al inicio del desarrollo del fruto (estadio V) de la localidad de la Costa (valores cercanos a 2 N). De manera similar frutos de la localidad de la Costa presentaron los valores más bajos de firmeza en el estadio M (cerca de 0,5 N), mostrando una caída drástica de la firmeza entre el estadio T y M. Es necesario mencionar que se observaron diferencias significativas entre ambas localidades en todos los estadios (Fig. I.7).

Para el caso de los frutos de *P. andina* estos presentaron una disminución de la firmeza durante la maduración, no obstante no existen diferencias significativas entre localidades, salvo en el estadio M donde la localidad de los Andes fue significativamente mayor. Cabe destacar que los mayores valores de firmeza fueron observados en la localidad de la Costa, presentando valores cercanos a 6,5 N en el estadio V y 2,5 en el estadio M del fruto de *P. andina* (2,5 N). Cabe destacar que la firmeza disminuye fuertemente entre el estadio T y M, en ambas especies (Figura I.7).

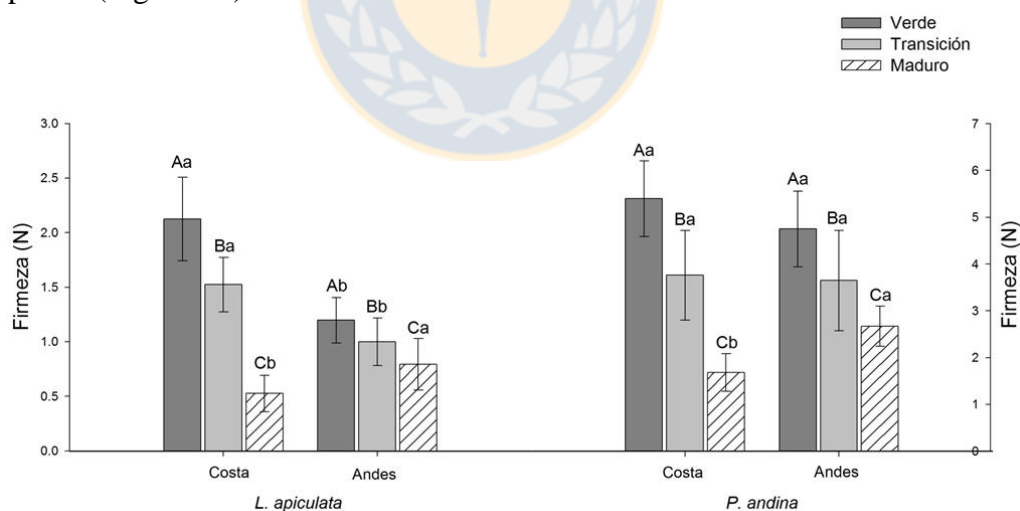


Figura I.7. Firmeza de los frutos de (A) *L. apiculata* y (B) *P. andina* durante los estadios de maduración (verde (V), transición (T) y maduro (M)). Diferencias entre letras mayúsculas indican diferencias significativas entre estadios, mientras que diferencias entre letras minúsculas indican diferencias entre localidades de maduración de la especie ($P \leq 0.05$). Los datos corresponden a una media de tres replicas \pm D.E.

I.4.2. Cambio en el contenido de pared celular y contenido de lignina.

Los residuos insolubles en alcohol (RIA), reflejan el contenido de pared celular del fruto en sus diferentes estadios de maduración siendo expresados como mg/g de peso fresco (PF). Los resultados del análisis en ambas especies exhibieron una reducción significativa durante la maduración, de igual manera fue posible identificar diferencias significativas entre las diferentes localidades. En el caso de *L. apiculata* se observaron diferencias significativas entre todos los estadios de la localidad de la Costa, mientras que en los Andes solo el estadio M fue significativamente menor. Por otra parte los mayores valores de RIA se observaron en la localidad de la Costa salvo en el estadio T. En relación a estos resultados, los frutos de *P. andina* indicaron diferencias significativas entre el estadio V y los estadios T y M (sin diferencias significativas entre ellos) en la localidad de la Costa, mientras que su contraparte de los Andes solo presento diferencias significativas en su estado M. Cabe destacar que las mayores concentraciones de RIA se observan en la localidad de los Andes (Figura I.8).

Por lo que refiere al contenido de lignina, los frutos de *L. apiculata* mostraron diferencias significativas entre estadios, siendo en la localidad de la Costa significativamente mayores en el estadio V y T, mientras que en la localidad de los Andes solo V fue significativamente mayor. En relación al análisis estadístico entre localidades, los Andes presentó valores significativamente mayores en los estadios V y M (Figura I.8). De manera similar a lo observado en *L. apiculata*, los frutos de *P. andina* presentaron un descenso en el contenido de lignina durante la maduración. Para ambas localidades los valores significativamente mayores fueron observados en el estadio V. Posteriormente en los estadios T y M, solo la Costa evidenció diferencias significativas entre estadios. Cabe mencionar que el valor de la localidad de los Andes fue significativamente mayor en el estadio V, mientras que para el estadio T y M fue mayor el valor de la localidad de la Costa (Figura I.8)

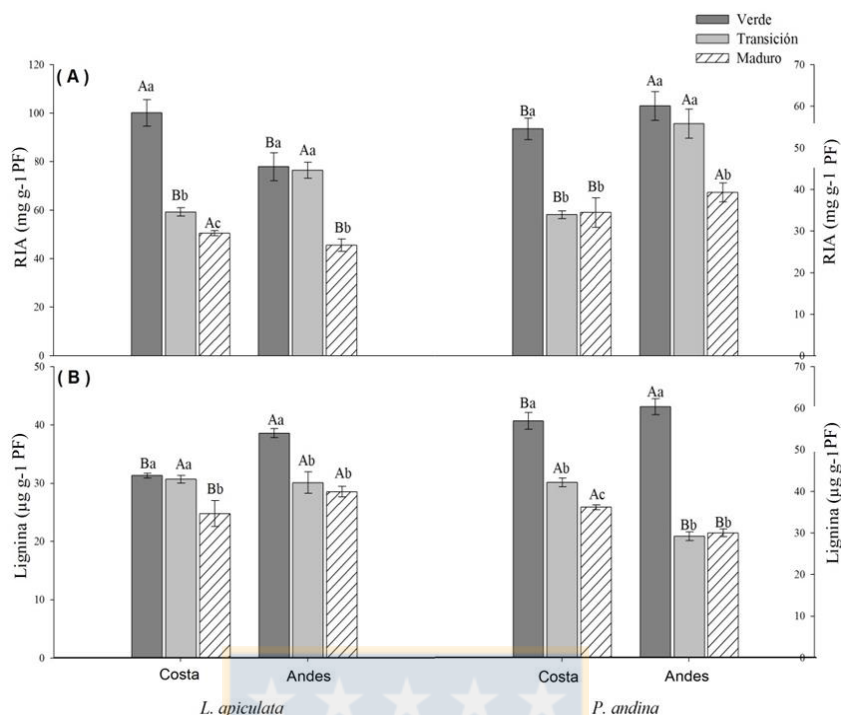


Figura I.8. Contenido de RIA (A) y contenido de lignina (B) en frutos de *L. apiculata* y *P. andina* en tres estadios de maduración (verde (V), transición (T) y maduro (M)). Letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas entre localidades, mientras que letras minúsculas distintas indican diferencias entre estadios de maduración de la especie ($P \leq 0.05$). Los datos corresponden a una media de tres replicas \pm D.E.

I.4.3. Contenido de pectinas totales.

El contenido de pectinas totales (representado por la suma del contenido de pectinas en las fracciones FSA, FSC y FSN), expresado como contenido de AU y AN en relación a RIA, mostró un aumento desde los estadios V a los estadios T y M de ambos frutos bajo estudio. En el caso de los frutos de *L. apiculata* para el contenido de AU, los valores significativamente mayores fueron observados en la localidad de la Costa, mientras que para *P. andina* no se observaron diferencias significativas, salvo en el estadio M de la localidad de la Costa. En contraste, los mayores valores de AN en los frutos de *L. apiculata* se observaron en la localidad de los Andes, mientras que *P. andina* solo presentó diferencias significativas en el estadio V de la misma localidad (Figura I.9).

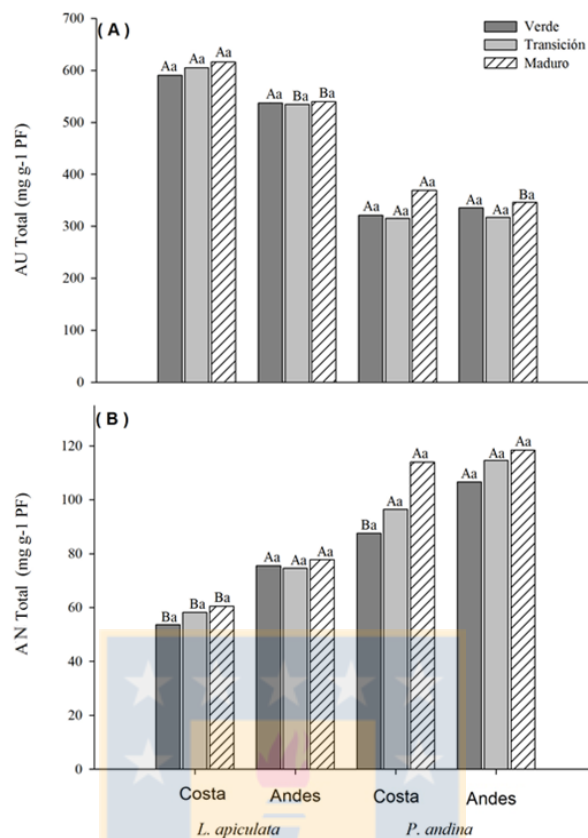


Figura I.9. Cambio en el contenido de pectinas totales como ácidos urónicos (A) y azúcares neutros (B) en los frutos de *L. apiculata* y *P. andina* durante los estadios de maduración (verde (V), transición (T) y maduro (M)). Letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas entre localidades, mientras que letras minúsculas distintas indican diferencias entre estadios de maduración de la especie ($P \leq 0.05$). Los datos corresponden a una media de tres replicas \pm D.E.

I.4.4. Cambios en las fracciones pécticas

El contenido de RIA fue sometido a extracción secuencial para obtener subclases enriquecidas de polímeros de pared celular. Generalmente, la extracción en agua solubiliza las pectinas debilmente unidas a la pared celular (FSA), mientras que las extracciones con CDTA y Na_2CO_3 permiten la obtencion de fracciones enriquecidas en pectinas unidas de forma iónica (FSC) y covalente (FSN), respectivamente (Figura I. 3). Las fracciones fueron analizadas para sus contenidos de ácido urónicos (AU) y contenidos de azúcares neutros (AN) (figuras I. 10 y I. 11).

Los valores de AU en la FSA presentaron diferencias significativas durante la maduración de ambos frutos y los valores de los frutos del estadio M fueron más altos que los en el estadio V (Fig I.10). Específicamente, los frutos de *L. apiculata* presentaron valores significativamente mayores en el estadio M en la localidad de la Costa y en el estadio T y M en los Andes. Cabe señalar que los mayores valores fueron observados en la localidad de los Andes salvo en el estadio V. Resultados similares fueron observados para los frutos de *P. andina* entre sus estadios, mientras que entre localidades el estadio M fue mayor en la Costa, T en los Andes y en el estadio V no se observaron diferencias significativas (Figura I. 10).

La FSC al igual que la FSA mostró un incremento en el contenido de AU durante la maduración de ambos frutos. En el caso de *L. apiculata* se observaron diferencias significativas entre todos los estadios de maduración. Por lo contrario, a diferencia de lo observado en FSA, los valores de AU en FSC indicaron diferencias significativas en el estadio M de la localidad de la Costa. Seguidamente los frutos de *P. andina* mostraron una caída (no significativa) en el contenido de AU entre el estadio V y T, seguido por un nuevo incremento en el estadio M, no obstante este incremento solo es significativo en la localidad de la Costa. Cabe destacar que solo se observaron valores significativamente mayores en el estadio M de la localidad de la Costa.

Por último la FSN a diferencias de los dos casos mencionados anteriormente, presentó una disminución significativa en el contenido de AU durante la maduración de los frutos de *L. apiculata*, sin evidenciar diferencias significativas entre localidades. En contraposición, los frutos de *P. andina*, no presentaron diferencias significativas durante el proceso de maduración, con excepción del estadio M de la Costa, el cual presentó los valores significativamente más bajos en el contenido de AU que los reportados en el mismo estadio de los Andes (Figura I. 10).

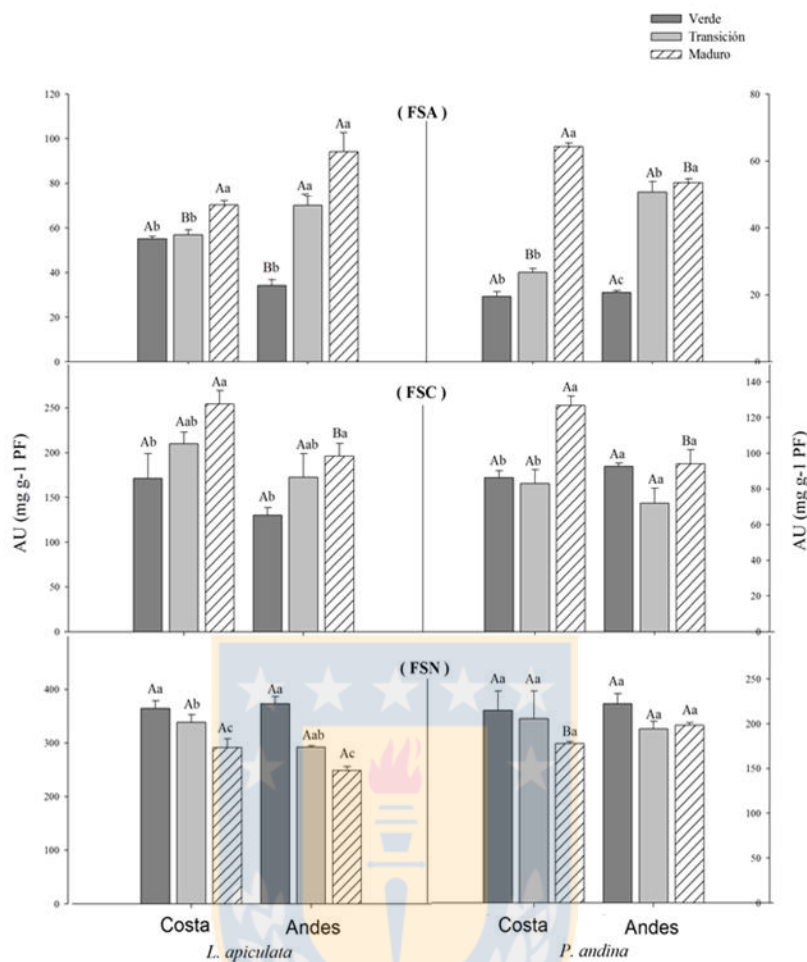


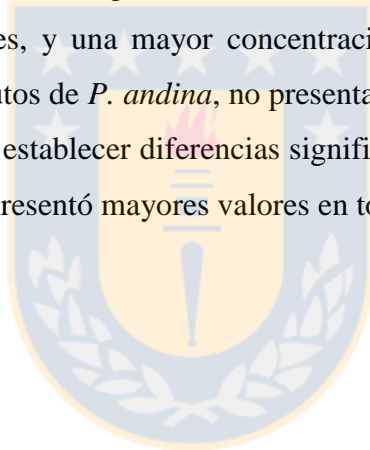
Figura I.10. Contenidos de ácidos urónicos (AU) en fracción soluble en agua (FSA), fracción soluble en CDTA (FSC) y fracción soluble en Na_2CO_3 (FSN) en los frutos de *L. apiculata* y *P. andina* en tres estadios maduración (verde (V), transición (T) y maduro (M) en dos localidades (Costa y Andes)). Letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas entre localidades, mientras que letras minúsculas distintas indican diferencias entre estadios de maduración de la especie ($P \leq 0.05$). Los datos corresponden a una media de tres replicas \pm D.E.

En relación al contenido de azúcares neutros (AN), se logró determinar un aumento en FSA durante la maduración de ambos frutos bajo estudio. En el caso de los frutos de *L. apiculata* se observaron valores mayores en el estadio M de ambas localidades siendo significativamente mayores en la localidad de la Costa, en cambio para los estadios V y T la localidad de los Andes presentó una mayor concentración de AN. De manera similar en los frutos de *P. andina*

los valores de AN son mayores en el estadio M. No obstante solo se observan diferencias significativas para el estadio T en la localidad de los Andes.

En relación a la FSC, los resultados de *L. apiculata* indicaron que existen diferencias significativas entre el estadio V y los estadios T y M, mientras que los Andes presenta solo valores significativamente mayores en el estadio M. En general se observa que la localidad de los Andes presenta valores significativamente mayores. De manera similar los frutos de *P. andina* indican diferencias significativas entre el estadio M y los estadios V y T para ambas localidades, aunque para este caso en particular solo es posible establecer diferencias significativas entre el estadio M (mayor en Costa).

La FSN evidenció una disminución significativa durante la maduración de los frutos de *L. apiculata* en ambas localidades, y una mayor concentración de AN en la localidad de los Andes. Por otra parte en los frutos de *P. andina*, no presentaron diferencias significativas entre estadios, aunque si fue posible establecer diferencias significativas entre localidades, siendo la localidad de los Andes la que presentó mayores valores en todos los estadios



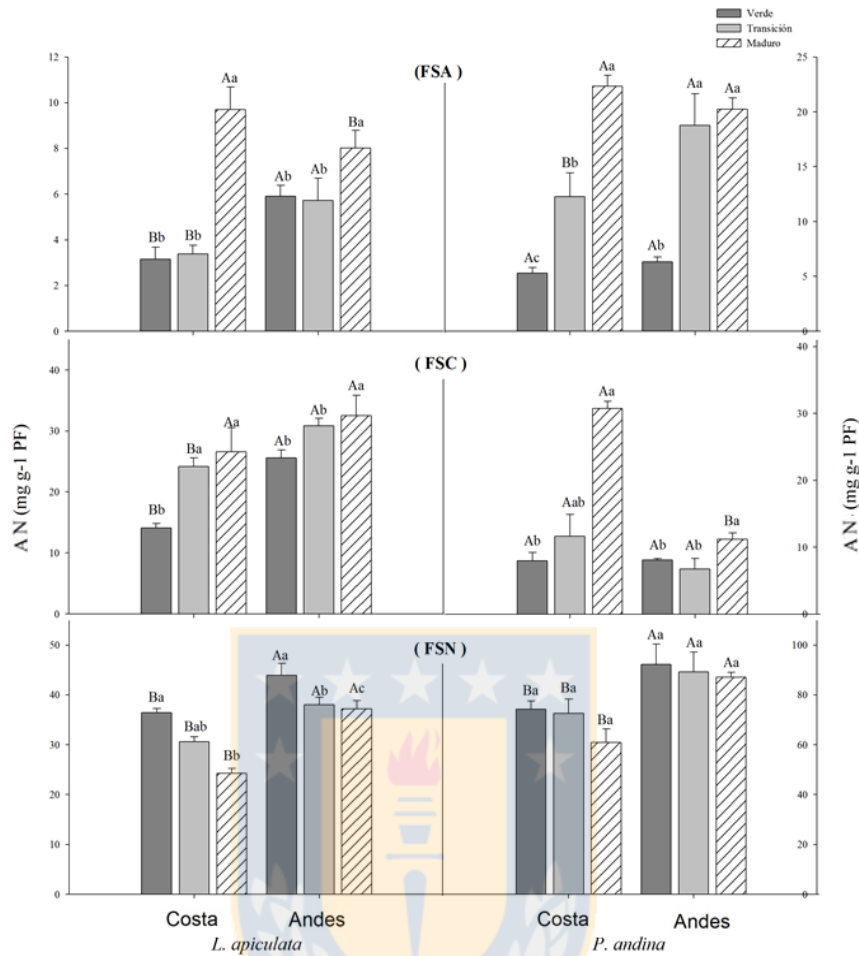


Figura I.11. Contenidos de azúcares neutros (AN) en fracción soluble en agua (FSA), fracción soluble en CDTA (FSC) y fracción soluble en Na₂CO₃ (FSN) en los frutos de *L. apiculata* y *P. andina* en tres estadios maduración (verde (V), transición (T) y maduro (M) en dos localidades (Costa y Andes). Letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas entre localidades, mientras que letras minúsculas distintas indican diferencias entre estadios de maduración de la especie ($P \leq 0.05$). Los datos corresponden a una media de tres replicas \pm D.E.

I.4.5. Análisis de los cambios en el contenido de pectinas

El análisis de la proporción de las distintas fracciones de pectinas (FSA, FSC, FSN) en relación a los valores totales obtenidos para AU y AN, reveló un incremento en la proporción del contenido de la fracción FSA durante la maduración de los frutos en ambas especies (Fig.

I.12 y I.13). Tendencias similares se observaron en el valor de AU en la FSC la cual registró un leve incremento durante el proceso de maduración en *L. apiculata* en ambas localidades, y sólo en los Andes en *P. andina* (Fig. I.12). Por otra parte se observó una disminución en la proporción de AU y AN de la fracción FSN para ambas especies y localidades analizadas durante la maduración (Figura I.12 y I.13).

En el caso de la proporción de AN, al igual que para la proporción de AU, se observó un incremento en la FSA para ambas especies, no obstante este incremento no fue tan notorio como lo mostrado en la figura I.12. De manera similar a lo reportado previamente, se observó un incremento en la FSC en los frutos de ambas especies en sus dos localidades (Figura I.13).

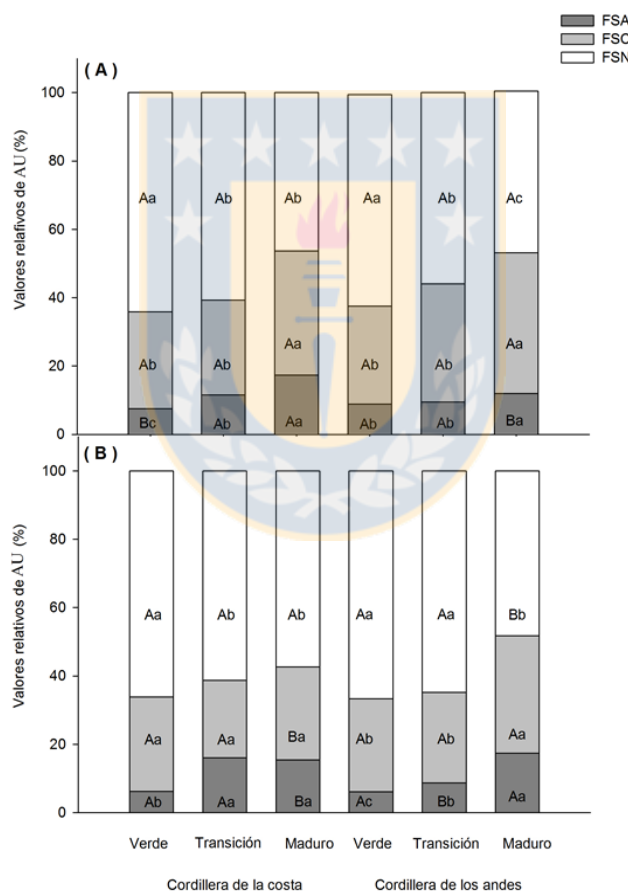


Figura I.12. Cambios en la relación de fracciones pécticas en base a contenido de AU (%) en los frutos de *L. apiculata* y *P. andina* en tres estadios maduración (verde (V), transición (T) y maduro (M), en dos localidades (Costa y Andes). A, *L. apiculata*; B, *P. andina*. Letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas entre localidades, mientras que letras

minúsculas distintas indican diferencias entre estadios de maduración de la especie ($P \leq 0.05$). Los datos corresponden a una media de tres replicas.

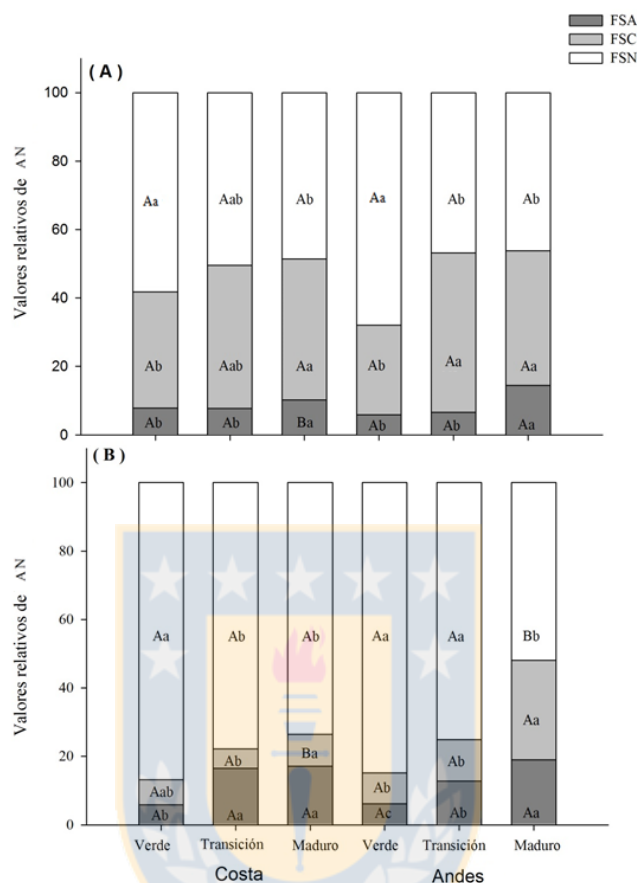


Figura I. 13. Cambios en la relación de fracciones pécticas en base a contenido de AN (%) en los frutos de *L. apiculata* y *P. andina* en tres estadios de maduración (verde (V), transición (T) y maduro (M)), en dos localidades (Costa y Andes). A, *L. apiculata*; B, *P. andina*. Letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas entre localidades, mientras que letras minúsculas distintas indican diferencias entre estadios de maduración de la especie ($P \leq 0.05$). Los datos corresponden a una media de tres replicas.

I.4.6. Hemicelulosas

El contenido de hemicelulosa (medido como mg AN por g de PF) para la fracción soluble en KOH (FSK) presentó diferentes tendencias para cada especie. Los valores de NS de los frutos de *L. apiculata* mostraron variaciones durante la maduración, inicialmente se observa una descenso desde el estado V al estado T, aumentando nuevamente en el estado maduro. En

específico solo en la localidad de la Costa se observan diferencias significativas entre el estadio V y M. Por otra parte los resultados indican que los valores de hemicelulosas fueron significativamente mayores en la localidad de los Andes.

En paralelo el análisis de los frutos de *P. andina* indicó similares diferencias entre estadios para ambas localidades analizadas. Inicialmente los frutos exhiben un incremento significativo en el contenido de AN entre el estadio V y T, para posteriormente mostrar una caída en el contenido de AN al final de la maduración, donde se observan valores significativamente menores a los expuestos en el estadio V (Figura I. 14). De modo accesorio, en ambas localidades el estadio T fue significativamente mayor que los estadios V y M. Por otra parte no se observaron diferencias significativas en un estadio entre las localidades de colecta.

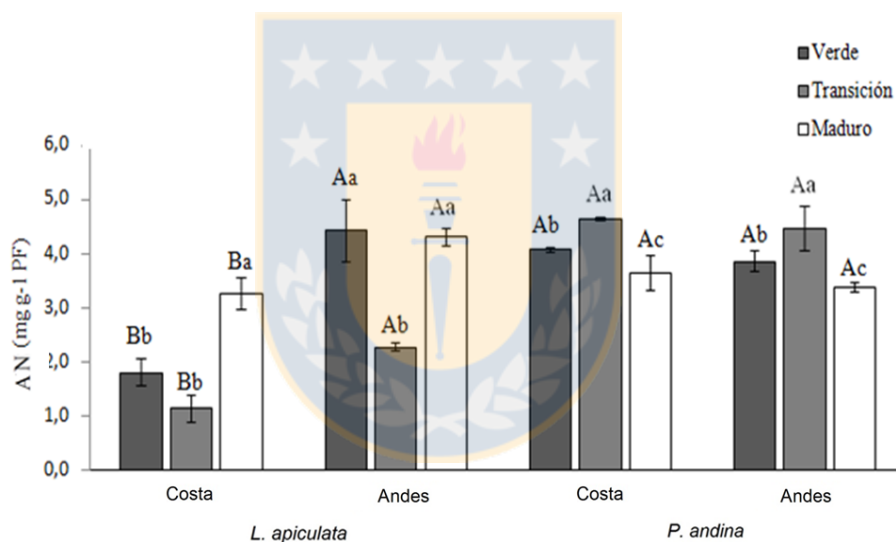


Figura I. 14. Contenidos de azúcares neutros (AN) en fracción soluble en KOH (FSK), en los frutos de *L. apiculata* y *P. andina* en tres estadios maduración (verde (V), transición (T) y maduro (M) en dos localidades (Costa y Andes). Letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas entre localidades, mientras que letras minúsculas distintas indican diferencias entre estadios de maduración de la especie ($P \leq 0.05$). Los datos corresponden a una media de tres replicas \pm D.E.

I.4.7. Cuociente de ramificación

El cociente de ramificación (AN/AU, medida como Glu/GalA) para la FSA en frutos de *L. apiculata*, mostró una disminución durante la maduración observándose diferencias significativas entre los estadíos, específicamente en el estadío V de la localidad de la Costa se registraron valores significativamente más altos entre estadíos y entre localidades, mientras que los más bajos fueron observados en el estadío M de la localidad de los Andes. En contraste, los frutos de *P. andina* exhibieron diferencias significativas entre el estadío V y M. Los mayores valores fueron observados en el estadío T de la localidad de los Andes, mientras que los más bajos se presentaron en el estadío V de la localidad de la Costa.

Los resultados del cociente de ramificación en la FSC indicaron un incremento desde el estadío V al T, valores que luego disminuyen en el estadío M. Para ambas localidades los valores significativamente mayores se observaron en el estadío T, siendo la localidad de la Costa la que presentó valores significativamente mayores que su contraparte Andes. Por otra parte los valores significativamente más bajos se observaron en el estadío V de la localidad de los Andes. Por su parte, los frutos de *P. andina* presentaron un aumento significativo del cociente de ramificación. En esta especie, se observaron diferencias significativas entre el estadío M y los estadíos V y T. Los mayores valores fueron observados en el estadío M de la localidad de los Andes mientras que los más bajos se presentaron en el estadío V de la localidad de la Costa (Figura I. 15 (A)).

Finalmente la FSN de los frutos de *L. apiculata* a diferencias de los casos anteriores presentó una disminución en el estadío T y un incremento durante la etapa final de maduración (M). Los valores significativamente más altos fueron observados en el estadío M de la localidad de la Costa, de manera similar los más bajos se observaron en el estadío T de la localidad Costa (Figura I. 15 (A)). Por su parte los frutos de *P. andina* presentaron una disminución en el parámetro medido, siendo la localidad de la Costa la que presentó valores significativamente más altos. Por otra parte los valores más bajos se presentaron en el estadío M de la localidad de los Andes (Figura I. 15 (B)).

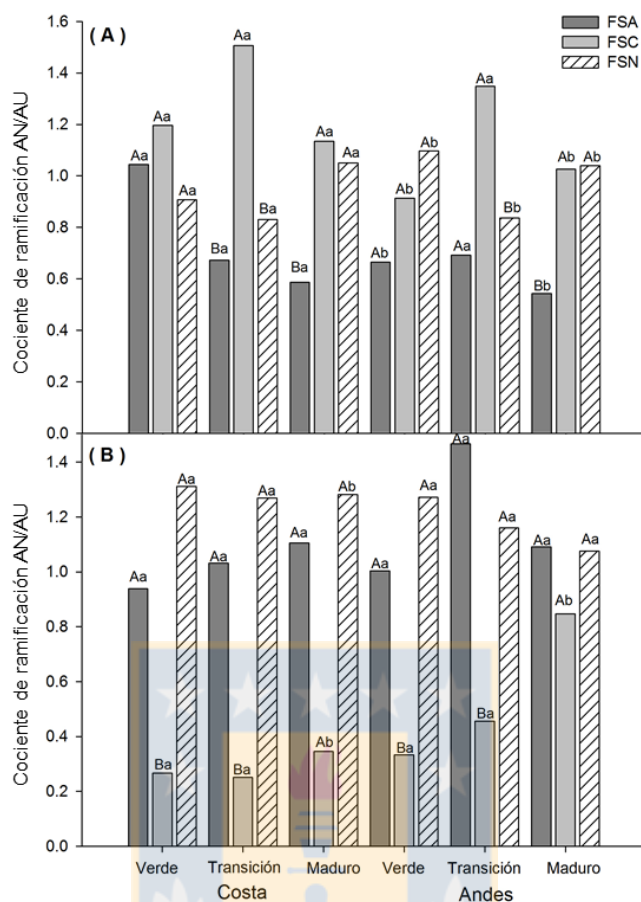


Figura I. 15. Cambios en la relación entre azúcares neutros y ácidos urónicos (medidos como Glu/GalA) de las diferentes fracciones pécticas de las especies bajo estudio. **A**, contenido de AN/AG por 100 mg de RIA en FSA, FSC y FSN de *L. apiculata*; **B**, contenido de AN/AG por 100 mg de RIA en FSA, FSC y FSN de *P. andina*. Letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas entre localidades, mientras que letras minúsculas distintas indican diferencias entre estadios de maduración de la especie ($P \leq 0.05$). Los datos corresponden a una media de tres replicas \pm D.E.

I.4.8. Composición de azúcares en RIA por cromatografía gas-masa (C-GM).

La composición de azúcares obtenidas a partir del RIA fue analizada por C-GM. Los frutos de *L. apiculata* exhibieron una notoria reducción en la distribución de arabinosa (Ara), ácidos galacturónico (GalA) y glucorónico (GlcA). Por otra parte, los otros azúcares como la xilosa (Xyl) y glucosa (Glu) no presentaron diferencias notorias en la distribución durante los estadios de maduración (Figura I. 16). Cabe señalar que el análisis estadístico de los resultados reveló

que existe una reducción significativa de los azúcares Ara, Man y Rha durante la maduración de los frutos en ambas localidades, siendo significativamente mayores en la localidad de los Andes. En el caso de Xyl y GalA, solo se observaron diferencias entre estadíos en la localidad de los Andes mientras que para los azúcares Gal y GlcA solo se observaron diferencias entre estadíos en la localidad de la Costa. Glu no presentó diferencias significativas entre estadíos. En este último caso, los azúcares en general presentaron mayores valores en la localidad de los Andes (Tabla I.III).

En los frutos de *P. andina*, se logró evidenciar un cambio drástico en la distribución de los azúcares Ara, Man, GlcA y en menor medida en Rha. Cabe destacar que se observó un cambio en el azúcar Xyl focalizado solo en la localidad de los Andes (Figura I. 16). El análisis estadístico de los resultados reveló que existen una reducción significativa del porcentaje de los azúcares Ara, Man, Gal, Rha durante la maduración de los frutos de *P. andina*. En paralelo se identificó que solo los dos primeros azúcares presentan diferencias significativas entre localidades (mayores en los Andes) mientras que los otros dos no presentan diferencias significativas, salvo en el estadio V de Rha (menor en la Costa). Por su parte el porcentaje de GlcA solo presentó cambios durante la maduración en la localidad de los Andes pero no presentó diferencias entre localidades, similar a lo reportado en Xyl. Finalmente, a diferencia de lo observado previamente, se observó un aumento en el porcentaje de Glu y GalA durante la maduración de los frutos de *P. andina*, presentando mayores valores en la localidad de los Andes (Tabla I.III).

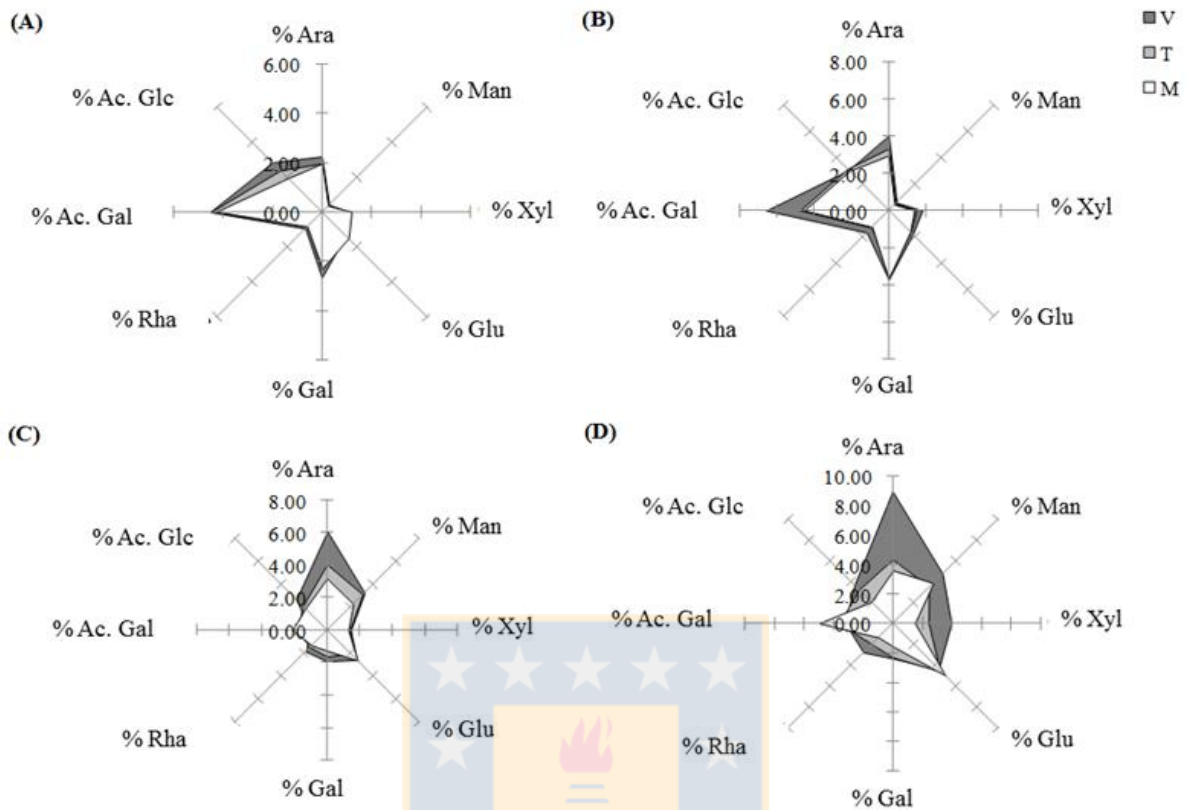


Figura I.16. Cambio en la distribución de azúcares neutros y ácidos (%) en hemicelulosas totales en frutos de *L. apiculata* y *P. andina* durante la maduración. A) *L. apiculata*, localidad de la Costa; B) *L. apiculata*, localidad de los Andes; C) *P. andina*, localidad de la Costa; D) *P. andina*, localidad de los Andes.

Tabla I.III. Cambios en el porcentaje de azúcares durante los tres estadios de desarrollo de frutos (V, T y M) de *L. apiculata* y *P. andina* en las localidades de la Cordillera de la Costa y de los Andes.

Especie	Localidad	Estadio	% Ara		% Man		% Xyl		% Glu		% Gal		% Rham		% Ac Gal		% Ac Glc	
<i>L. apiculata</i>	Andes	V	4,04	Aa	0,60	Aa	1,81	Aa	1,82	Aa	3,71	Aa	1,68	Aa	6,61	Aa	3,07	Aa
		T	3,33	Ab	0,49	Ab	1,46	Ab	1,65	Aa	3,08	Aa	1,32	Ab	4,74	Ab	3,15	Aa
		M	2,98	Ab	0,45	Ab	1,38	Ab	1,64	Aa	3,67	Aa	1,25	Ab	4,54	Ab	3,01	Aa
	Costa	V	2,24	Ba	0,42	Ba	1,09	Ba	1,36	Aa	2,64	Aa	0,94	Ba	4,52	Ba	2,83	Aa
		T	1,95	Bb	0,37	Bb	0,97	Ba	1,42	Ba	2,33	Bab	0,79	Bab	4,47	Aa	2,36	Bb
		M	1,94	Bb	0,34	Bb	1,18	Aa	1,50	Aa	2,29	Bb	0,85	Bb	4,25	Aa	1,92	Bc
<i>P. andina</i>	Andes	V	8,93	Aa	4,77	Aa	3,96	Aa	4,40	Ab	2,36	Aa	2,77	Aa	3,19	Ab	3,65	Aa
		T	4,31	Ab	3,50	Aa	2,44	Aa	4,57	Ab	2,28	Aa	1,99	Ab	3,63	Ab	3,23	Aa
		M	3,58	Ab	3,85	Ab	1,48	Aa	5,00	Aa	1,58	Ab	1,37	Ac	5,00	Aa	2,07	Ab
	Costa	V	6,04	Ba	3,24	Ba	1,45	Aa	2,55	Ba	1,90	Aa	1,85	Ba	1,07	Bb	2,68	Aa
		T	4,00	Ab	3,08	Aa	1,39	Aa	2,05	Ba	1,61	Aab	1,49	Aab	1,81	Ba	2,09	Aa
		M	3,20	Ab	2,28	Bb	1,30	Aa	2,64	Ba	1,27	Ab	1,33	Ab	2,12	Ba	1,89	Aa

Los datos indican la media de tres replicas. Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas entre localidades de la misma especie, letras minúsculas representan diferencias significativas entre estadios ($P \leq 0.05$).

I.4.9. Masa molar (MM), diámetro de partícula (DP) promedio y polidispersidad de pectinas.

Los resultados de masa molar promedio, diámetro de partícula promedio y polidispersidad fueron generados a partir de cada fracción enriquecida de polímeros de pared celular.

En el caso de la FSA, los frutos de *L. apiculata* presentaron inicialmente una caída desde el estadio V al de T en los parámetros de DP, MM para luego aumentar significativamente en el estadio M en ambas localidades bajo estudio. En general, los resultados de dichos parámetros fueron mayores en la localidad de los Andes, salvo en el estado V donde no se observaron diferencias significativas entre localidades. Por otra parte, la polidispersidad de los datos presentó mayores valores en el estadio T en la localidad de la Costa mientras que en los Andes fue mayor en el estado M de los frutos (Tabla I.IV). Los frutos de *P. andina*, a diferencia de lo observado previamente, mostraron un aumento significativo desde el estadio V al T, para luego presentar un descenso en los parámetros de DP y MM. Cabe destacar que a pesar del descenso mencionado al final del proceso de maduración se observan diferencias significativas entre el estado V y M (mayores en M). No se observaron diferencias significativas entre los parámetros analizados, con excepción del DP del estadio V de la localidad de la Costa que fue significativamente más bajo que el de la localidad de los Andes. En relación a la polidispersidad de los datos, se observó que el estadio M presentó valores significativamente mayores que los estadios V y T, no obstante no fue posible establecer diferencias significativas entre localidades (Tabla I.IV).

Tabla I.IV. Cambios diámetro de partícula (DP), polidispersidad (PD), masa molar (MM) de fracciones pécticas FSA durante la maduración de frutos de *L. apiculata* y *P. andina* en dos localidades

	Cordillera de la Costa			Cordillera de los Andes		
	Diámetro de partícula efectivo (nm)	Polidispersidad	Masa molar (kDa)	Diámetro de partícula efectivo (nm)	Polidispersidad	Masa molar (kDa)
<i>L. apiculata</i>						
Verde	160,99±7,79 Ab	0,22±0,02 Bb	51504 ± 5772 Ab	147,56±13,9 Ab	0,45±0,02 Ab	42570± 8755 Ab
Transición	60,91±20,0 Bc	0,48±1,18 Aa	6361± 402 Bc	67,78±79,9 Ac	0,37±0,02 Ab	137451± 3662 Ac
Maduro	191,37±24,5 Ba	0,43±0,02 Ab	77076± 2295 Ba	259,33±43,4 Aa	0,96±0,76 Aa	155896± 5864 Aa
<i>P. andina</i>						
Verde	198,52±23,2 Ba	0,43±0,02 Ab	84006± 21753 Ab	275,53±29,9 Ab	0,41±0,03 Ab	78406± 10521 Ab
Transición	384,52±94,9 Ab	0,47±0,18 Ab	396298± 225924 Aa	532,32±161,1 Aa	0,61±0,10 Aa	861483± 6010 Aa
Maduro	357,99±92,2 Ab	0,94±0,60 Aa	339649± 167363 Aa	405,71±147,6 Aab	0,51±0,10 Aa	483464± 3480 Aab

Los datos indican la media de tres replicas ± D.S. Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas entre localidades de la misma especie, letras minúsculas representan diferencias significativas entre estadíos ($P \leq 0.05$).

Para la fracción FSC, los frutos de *L. apiculata* presentaron una reducción significativa de los parámetros MM y DP, durante el proceso de maduración. De manera similar, se observaron valores significativamente menores en el parámetro de polidispersidad de datos del estado M con respecto a los estadios previos de madurez (V y T). El análisis estadístico entre localidades indicó que no existen diferencias significativas para los parámetros de DP y MM en el estadio V, mientras por su parte se observó que la localidad de la Costa presentó valores significativamente mayores para dichos parámetros en la localidad de la Costa, mientras que en contraposición los valores de DP y MM fueron mayores en la localidad de los Andes. A diferencia de lo observado en los estadios de maduración previamente analizados el parámetro de polidispersidad no presentó diferencias significativas entre localidades.

En lo que refiere a los frutos de *P. andina*, el análisis estadístico de los parámetros de MM y DP no permitió identificar diferencias significativas entre los estadios V, T y M en la localidad de la Costa. Ahora bien, en este mismo análisis se pudo establecer una reducción significativa entre los estadios de maduración siendo significativamente menor en el estadio M de los frutos de la localidad de los Andes (Tabla I.V). En lo que refiere a polidispersidad en la localidad de la Costa se observó un aumento significativo de los valores durante la maduración (menor en V), mientras que en la localidad de los Andes no fue posible establecer diferencias significativas. En relación a las diferencias entre las distintas localidades, se concluyó que en general no existen diferencias significativas entre localidades para ninguno de los parámetros, salvo en la polidispersidad del estadio V de la localidad de la Costa (Tabla I.V).

Tabla I.V. Cambios diámetro de partícula (DP), polidispersidad (PD), masa molar (MM) de fracciones pécticas FSC durante la maduración de frutos de *L. apiculata* y *P. andina* en dos localidades

	Cordillera de la Costa			Cordillera de los Andes		
	Diámetro de partícula efectivo (nm)	Polidispersidad	Masa molar (kDa)	Diámetro de partícula efectivo (nm)	Polidispersidad	Masa molar (kDa)
<i>L. apiculata</i>						
Verde	239,78±34,2 Aa	0,37±0,05 Aa	15649± 4236 Aa	218,29±42,2 Aa	0,38±0,03 Aa	13336± 4799 Aa
Transición	248,21±59,1 Aa	0,35±0,03 Aa	17084± 7406 Aa	179,55±21,3 Bb	0,35±0,01 Ab	9214± 1945 Bb
Maduro	141,52±8,0 Bb	0,33±0,02 Ab	5933± 610 Bb	158,15±12,4 Ab	0,33±0,02 Ac	7277± 1023 Ab
<i>P. andina</i>						
Verde	249,03±13,3 Aa	0,24±0,03 Bc	16575± 1640 Aa	246,90±15,6 Aa	0,28±0,01 Aa	16333± 1868 Aa
Transición	222,51±10,0 Aa	0,27±0,03 Ab	13500± 1121 Aa	236,90±18,2 Aab	0,29±0,01 Aa	1516± 2108 Aab
Maduro	245,87±60,4 Aa	0,30±0,01 Aa	16792± 8121 Aa	220,18±35,1 Ab	0,28±0,03 Aa	13451± 3923 Ab

Los datos indican la media de tres replicas ± D.S. Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas entre localidades de la misma especie, letras minúsculas representan diferencias significativas entre estadíos ($P \leq 0.05$).

En relación a FSN en los frutos de *L. apiculata* se observó cambios distintos en los parámetros de DP y MM, a lo observado en las fracciones previamente estudiadas (Tabla I.IV). En primer lugar en la localidad de la Costa, se observó un incremento significativo desde el estadio V al T, para luego decaer en el estadio M, llegando a valores incluso significativamente más bajos que los observados en el estadio V. Por otra parte la localidad de los Andes presentó un descenso significativo desde V a M en los dos parámetros mencionados. Al mismo tiempo se logró establecer que solo la localidad de la Costa presentó valores significativamente menores en el estadio V en los parámetros DP y MM. En relación a la polidispersidad en ambos casos se logró determinar un aumento significativo en los diferentes estadios de maduración siendo en general mayores en la localidad de los Andes.

Acerca de los frutos de *P. andina*, tanto la localidad de los Andes como la de la Costa presentaron una disminución significativa durante la maduración en los parámetros de DP y MM. Por otra parte, solo fue posible establecer diferencias significativas en el estadio M de la localidad de la Costa, la cual presentó valores significativamente mayores que su contraparte Andes en los parámetros previamente mencionados. En contraposición a los parámetros estudiados, la polidispersidad aumentó significativamente durante el proceso de maduración para los frutos de *P. andina*. Cabe destacar que los mayores valores fueron observados nuevamente en la localidad de los Andes (Tabla I.VI).

Tabla I.VI. Cambios diámetro de partícula (DP), polidispersidad (PD), masa molar (MM) de fracciones pécticas FSN durante la maduración de frutos de *L. apiculata* y *P. andina* en dos localidades.

	Cordillera de la Costa			Cordillera de los Andes		
	Diámetro de partícula efectivo (nm)	Polidispersidad	Masa molar (kDa)	Diámetro de partícula efectivo (nm)	Polidispersidad	Masa molar (kDa)
<i>L. apiculata</i>						
Verde	163,65±11,9 Bb	0,22±0,03 Bb	8204± 746 Bb	186,54±7,7 Aa	0,31±0,02 Ab	9796± 744 Aa
Transición	183,05±12,8 Aa	0,29±0,01 Ba	9485± 1228 Aa	183,50±7,1 Aab	0,31±0,01 Ab	9505± 671 Aab
Maduro	157,88±6,21 Ab	0,29±0,02 Ba	7403± 408 Ac	169,78±22,3 Ab	0,36±0,01 Aa	8333± 2012 Ab
<i>P. andina</i>						
Verde	154,20±9,4 Aa	0,30±0,01Bb	6939± 781 Aa	149,45±22,9 Aa	0,31±0,01 Ac	6638± 1975 Aa
Transición	145,70±10,7 Ab	0,30±0,01 Bab	6265± 840 Ab	138,15±14,1 Aa	0,34±0,01 Ab	5707± 1037 Aa
Maduro	148,66±8,7 Ab	0,32±0,01 Ba	6490± 698 Ab	112,65±5,5 Bb	0,36±0,01 Aa	3917± 346 Bb

Los datos indican la media de tres replicas ± D.S. Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas entre localidades de la misma especie, letras minúsculas representan diferencias significativas entre estadíos ($P \leq 0.05$).

La fracción de hemicelulosa (FSK), presentó en el caso de los frutos de *L. apiculata* un DP significativamente menor en el estadio V mientras que no fue posible determinar diferencias significativas entre los estadios T y M. Dichos resultados fueron similares en ambas localidades, no obstante la localidad de la Costa presentó en general valores significativamente mayores. En relación a MM, en ambas localidades se observó valores significativamente menores en el estadio V mientras que en los estadios T y M, no se observaron diferencias significativas en la localidad de la Costa, y en los Andes, el estadio T resultó ser el mayor. Al igual que el parámetro anterior, la localidad de la Costa presentó valores significativamente mayores. El análisis de polidispersidad mostró para la localidad de la Costa diferencias significativas durante la maduración de los frutos, mientras que para los Andes no fue posible establecer diferencias significativas entre estadios de maduración. En relación a las localidades, todos los estadios resultaron ser significativamente mayores en la localidad de la Costa.

Los resultados de los frutos de *P. andina* muestran una disminución significativa en la localidad de la Costa entre el estadio V y los estadios T y M para los parámetros DP y MM, aunque no fue posible establecer diferencias entre estos dos últimos estadios. Por su parte, para la localidad de los Andes no se pudo establecer diferencias significativas durante la maduración. No obstante los resultados indican que la localidad de los Andes presentó valores significativamente mayores para los estadios T y M. De manera anexa los valores de polidispersidad no presentaron diferencias significativas entre estadios, mientras que entre localidades, solo el estadio T de la Costa fue significativamente menor que el de los Andes (Tabla I.VII).

Tabla I.VII. Cambios diámetro de partícula (DP), polidispersidad (PD), masa molar (MM) de fracción FSK durante la maduración de frutos de *L. apiculata* y *P. andina* en dos localidades.

	Cordillera de la Costa			Cordillera de los Andes		
	Diámetro de partícula efectivo (nm)	Polidispersidad	Masa molar (kDa)	Diámetro de partícula efectivo (nm)	Polidispersidad	Masa molar (kDa)
<i>L. apiculata</i>						
Verde	226,23±20,7 Ab	0,31±0,03 Aa	13972± 2244 Ab	163,3±12,9 Bb	0,22±0,06 Ba	7714± 1091 Bc
Transición	244,62±28,1 Aa	0,27±0,02 Ab	16160± 3343 Aa	227,1±20,7 Aa	0,25±0,02 Ba	14070± 2319 Aa
Maduro	241,13±30,0 Aa	0,25±0,02 Ac	15767± 3548 Aa	201,5±19,4 Ba	0,24±0,03 Aa	11332± 1936 Bb
<i>P. andina</i>						
Verde	262,17±20,0 Aa	0,25±0,05 Aa	18238± 2562 Aa	262,55±21,5 Aa	0,27±0,06 Aa	18296± 2797 Aa
Transición	232,55±21,0 Bb	0,23±0,03 Ba	14688± 2402 Bb	259,18±20,7 Aa	0,27±0,03 Aa	17867± 2606 Aa
Maduro	215,16±35,8 Bb	0,22±0,05 Aa	12908± 4319 Bb	260,47±29,1 Aa	0,25±0,02 Aa	18098± 3625 Aa

Los datos indican la media de tres replicas ± D.S. Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas entre localidades de la misma especie, letras minúsculas representan diferencias significativas entre estadíos ($P \leq 0.05$).

I.5. Discusión.

El análisis de los cambios fisicoquímicos asociados al proceso de maduración reveló un aumento en diámetro y peso de los frutos de *L. apiculata* y *P. andina* durante la maduración (Tabla I.I). Este crecimiento está asociado con la división y expansión celular, además de la acumulación de agua en el fruto (Wills *et al.*, 1998). En relación a estos parámetros, los frutos de *L. apiculata* presentan en general un peso de hasta un 26% mayores que los frutos de murta (*Ugni molinae*) descritos previamente (Alba 1977, Novoa 1983, Hevia *et al.*, 1996). En relación al diámetro estos fueron similares a los frutos de murta descritos por Lavin y Vega (1996) y Torres *et al.*, (1999). En relación a otras especies de frutales como *Aristotelia chilensis* (maqui) los frutos de *L. apiculata* son hasta un 50% más grandes, mientras que en otros casos como en arándano son en promedio un 35% más pequeños, no obstante presentan un calibre aceptable para su comercialización y futura domesticación y mejoramiento (Hoffmann, 1997; Buzeta, 1997). Los resultados de *P. andina* referentes a su diámetro y peso concuerdan con lo reportado de Hechenlietner *et al.*, 2005, presentando un tamaño más de dos veces mayor que lo reportado en otras podocarpaceas del genero *Saxegotea* o *Podocarpus*, en los cuales se ha descrito un diámetro mayor a 1 cm (Ayma-Romay y Sanzetenea, 2008).

Respecto a los cambios en el color de la piel en los frutos de *L. apiculata*, se observó un cambio desde el color verde palido ($a^*=-7$ en Costa a $a^*=-10$ en Andes) en estadio V a un color morado oscuro en su estadio M en ambas localidades ($a^*=1,5$ en Costa a $a^*=2,9$ en Andes). Estos cambios en la composición del color pueden deberse a la disminución en el contenido de clorofila durante la maduración y a una mayor acumulación de antocianinas (Ageorges *et al.*, 2014). Los frutos de *P. andina* presentaron menores variaciones en los parámetros de color durante la maduración. Esto se debe a que el tejido que envuelve la semilla es de carácter vegetativo, lo cual podría explicar una disminución en el contenido de clorofila (Tucker *et al.*, 1993).

Los valores de pH de *L. apiculata* presentaron variaciones a un pH más básicos a medida que el fruto maduraba. Resultados similares fueron observados en los frutos de otras mirtáceas como en murta (Torres *et al.*, 1999). No obstante el análisis de pH reveló que los frutos

maduros de *L. apiculata* presentan valores más básicos que los reportados por Torres et al. (1999) en murtila. En lo que se refiere a los frutos de *P. andina* estos presentaron tendencias similares a los frutos de arrayán indicando un cambio de su pH durante el transcurso de su maduración desde el estadio V al M, aunque estos se mantuvieron en el rango de acidez (3,7 - 4,5), similar a lo reportado en frutos de arándano (Vilches, 2005). La acidez de los frutos podría estar explicado debido a que algunas células vegetales modifican su función para almacenar ácidos orgánicos en la vacuola (Willis et al. 1996) disminuyendo el pH del tejido, lo que puede estar relacionado con la formación del arilo carnoso y su función de protección de semilla (Anderson y Owens, 2003).

En el caso de la CSS para los frutos de *L. apiculata* se observó un aumento en dicho parámetro a la maduración, alcanzando valores de 9,8 a 11,3 g 100 g⁻¹ PF (Tabla I.I). Por su parte los valores de dicho parámetro en frutos maduros de *P. andina* alcanzaron un promedio de 15,2 g 100 g⁻¹ PF. En comparación los frutos maduros de murta y guayaba han reportado valores cercanos a 19,4° Brix (Torres et al., 1999) y 8,35° Brix respectivamente (Tellez et al., 2008) similares a lo reportado en análisis previos de los frutos de *L. apiculata* (9,5° Brix datos no mostrados). Por otro lado los valores de CSS registrados para los frutos maduros de *P. andina* (15,21 - 16,41°Brix datos no mostrados) son similares a los observados en frutos maduros de uva (*Vitis vinífera* L.) variedad “Muscat Gordo Blanco”, donde alcanza valores cercanos a los 18° Brix (Kylie et al., 1998). La acidez titulable es considerada como uno de los atributos que afectan las características organolépticas y la calidad del fruto (El Sheikha, 2004). En el caso de *L. apiculata* se observó un leve descenso en la AT (medida como porcentaje de ácido cítrico) en el estadio M. Una tendencia semejante ocurre con los frutos de *P. andina* durante la maduración pero con valores muy bajos, menores al 1%. Por otro lado el análisis de la relación de CSS/AT de los frutos de *L. apiculata* los valores varían de 2,48 a 3,15 en su estadio M, mientras que los valores son mucho más altos para los frutos de *P. andina* con una proporción de 48,5-104,5 en su estadio M. Ambas tendencias (de CSS y AT) en los frutos de *P. andina* concuerdan con lo reportado en los frutos de níspero (Goulas et al., 2014), donde la relación CSS/AT se observó entre 70- 80.

El ablandamiento que sufren los frutos durante la maduración es en parte consecuencia de la pérdida de rigidez de la pared celular ocasionada por la degradación de muchos de sus componentes (Waldron *et al.*, 2003). En el presente estudio, se observó un ablandamiento continuo a lo largo del desarrollo y de la maduración de ambos frutos de las especies estudiadas (Figura I.7). La pérdida de firmeza de ambos frutos se asoció fuertemente a un descenso en el material de pared celular (RIA) y la concentración de lignina (Figura I.8).

Los cambios presentados en el contenido de RIA en frutos de *L. apiculata* fueron similares a los reportados en frutos de la familia de las Myrtáceae como *U. molinae* y *P. gaujava* (Taobada *et al.*, 2010; Solarte *et al.*, 2010) u otros similares como arandano (Vicente *et al.*, 2007). El ablandamiento de los frutos está asociado a una degradación enzimática de los componentes de la pared celular como los polisacáridos pécticos durante la maduración los que a su vez pueden generar un aumento en la CSS durante la maduración (Kays, 2004; Cañizares *et al.*, 2003; Tellez *et al.*, 2008). Por su parte, los frutos de *P. andina*, al igual que los frutos mencionados anteriormente, presentan una disminución en el contenido de RIA desde 95-75 mg g⁻¹ PF a 50-40 mg g⁻¹ PF en los estadios V y M, respectivamente. Debido a que no existen estudios en frutos de podocarpáceas es difícil generar una comparación. No obstante, los frutos de *P. andina* son también conocidos como uva de la cordillera debido a las semejanzas del arilo carnoso que cubre la semilla y las características del fruto comercial antes mencionado (*V. vinifera*). Considerando esto se realizó una comparación entre la pérdida de RIA en los frutos de *P. andina* con lo reportado en frutos de *V. vinifera*, los cuales presentan una tendencia similar pero con menor concentración de RIA en su estado maduro (1,5-2 mg g⁻¹ PF) (Kylie *et al.*, 1998). También es comparable con otros frutos como cereza (*Prunus avium*), los cuales muestran una disminución en el contenido de pared celular (Batisse *et al.*, 1996).

Las pectinas son el componente mayoritario dentro de los polímeros que forman parte de la pared celular de los frutos. Como se mencionó anteriormente, los polímeros pécticos son un grupo de macromoléculas compuesto por una gran diversidad de azúcares, lo que les confiere la capacidad de establecer diferentes tipos de interacciones entre sí y con el resto de los componentes (Redgwell y Fischer 2002). En los frutos estudiados en la presente investigación

se detectó un aumento en el contenido de pectinas referido al total de de la masa obtenida de los RIA durante la maduración independiente de la localidad de procedencia. El análisis de las fracciones por separado indicó un aumento en la concentración de AU y AN en las fracciones FSA y FSC durante la maduración de ambos frutos, en contraposición de lo observado en la FSN la que presentó una disminución en el contenido de AU. Estos resultados coinciden con lo reportado en la proporción de AU y AN expresado por masa de RIA (Figura I.12), donde se observó en el caso de *L. apiculata* una disminución de FSN desde un 60% a un 40% en el estado maduro y un aumento concomitante en FSA (7% a 20% aprox.) y FSC (25% a 38% aprox.) durante la maduración. Por su parte, frutos de *P. andina* presentaron una disminución menos drástica en la proporción de AU y AN para FSN (de 65% a 50% aprox.) y un aumento de 6% a 20% en FSA y en menor medida en FSC (27% a 30%).

Los cambios en la proporción de las fracciones de ambos frutos pueden sugerir que existe un incremento en el contenido de AU en FSC debido a la síntesis de novo durante la maduración y una posterior degradación de las pectinas de interacción covalente (FSN) a pectinas de interacción labil enriqueciendo y aumentando en más de un 50% la concentración de AU y NS en la FSA en el estadio M de ambos frutos. Existe bastante evidencia que en etapas iniciales del desarrollo y maduración del fruto, en proporción, predominan las pectinas de interacción más fuerte (FSN), mientras que avanzada la maduración la relación se invierte y predominan las pectinas de interacción más débil (FSA y FSC). Según Brummell (2006), este fenómeno se explicaría por un aumento en la actividad enzimática que permite la degradación de los componentes de la pared celular de los frutos, llevando a pectinas de interacción iónica a pectinas de menor interacción producto de la depolimerización péctica. Por ejemplo, en melón, la fracción soluble en agua y agentes quelantes aumentan durante la maduración, en tanto que la cantidad de poliuronidos solubles en Na_2CO_3 disminuye (Rose *et al.*, 1998a). El aumento en la FSA y FSC también se ha reportado en frutos de murta (Taobada *et al.*, 2010), uva (Kylie *et al.*, 1998), cereza (Batisse *et al.*, 1996) y frutilla (Rosli *et al.*, 2004).

De modo idéntico, se observa una tendencia similar para acumulación de AN en FSA y FSC, mientras que recíprocamente se observó una pérdida en la FSN (Figura I.11), que podría estar asociada a la solubilización de los azúcares, del mismo modo otras especies frutales indicaron

que la eliminación de las cadenas laterales es un evento que ocurre durante la maduración (Brummell y Harpster, 2001). Cabe destacar que aproximadamente el 60% del contenido de AN están contenidos en las FSA y FSN (Figura I. 12) siendo los azúcares neutros más comunes en estas fracciones Ara y Gal (Gross y Sams 1984) lo que concuerda con los resultados del análisis C-GM de azúcares en RIA, donde se observa una caída en el contenido de Ara y Gal durante la maduración, que posteriormente pasa a formar parte de la FSA (Figura I.16). Resultados similares se aprecian en otros frutos como la frutilla (Vicente *et al.*, 2007) y el níspero (Femenia *et al.*, 1998). Los procesos de despolimerización y solubilización las cadenas laterales y ramificaciones de las pectinas en FSC y FSN, modificarían el diámetro de las moléculas de pectinas observadas, lo que se ratifica con los cambios en el diámetro de partícula y masa molar observado en los resultados de DLS (Tablas I.V, I.V, y I.VI) durante la maduración de los frutos. Esta reducción en los parámetros de DLS podría estar influenciado por la acción enzimática y la solubilización de los polímeros de pared celular. En relación a estos cambios otros frutos como melón (Rose *et al.*, 1998a) y tomate (*Solanum lycopersicum* cv. Rutgers) (Tong y Gross, 1988) presentaron tendencias similares a cambiar la distribución de sus masas moleculares durante la maduración pero en mucho menor grado a lo reportado en el presente estudio.

Los resultados del contenido de hemicelulosas (FSK) descrito en los frutos de *P. andina* concuerdan con lo reportado previamente por Brummell y Harpster (2001), e indicaron una reducción significativa durante la maduración de los frutos, sin presentar diferencias entre localidades. Relaciones similares fueron observadas en otros frutos, como en el caso del durazno (Brummell, 2006), palta (O' Donoghue y Huber, 1992) y níspero (Goulas *et al.*, 2014), además se ha demostrado una significativa despolimerización de hemicelulosas en muchos frutos (Brummell y Harpster, 2001). En contraste, los frutos de *L. apiculata* indicaron un aumento en el contenido de hemicelulosas en la localidad de la Costa a través de la maduración (aunque la localidad de los Andes no presenta diferencias significativas entre los estadios V y M). Algo semejante ocurre con los resultados de DLS, donde no se observan mayores cambios en DP. En general, es posible determinar que la pérdida de RIA (Figura I. 8) y firmeza del fruto (figura I.7), correspondan a un balance entre síntesis, degradación y solubilización de las cadenas principales y ramificaciones de los componentes pécticos.

La relación AN/AU refleja el grado de ramificación que presentan las moléculas de una determinada fracción y permite una estimación de la capacidad de interacción con otros polímeros (Batisse *et al.*, 1996). En la FSA en frutos arrayán del estadio V, se observó una relación AN/AU cercana a 1, lo que representa que la cantidad de azúcares que forman parte de las ramificaciones es similar a la que esta presente en las cadenas principales que componen esta fracción. Este cociente disminuye durante la maduración llegando a valores de 0,5 en promedio. El hecho que este cociente descendiera durante el desarrollo y comienzo de la maduración podría explicarse por la hidrólisis de las cadenas laterales, con la consiguiente eliminación de azúcares neutros. Comparativamente, los frutos de *L. apiculata* en la localidad de la Costa presenta mayores valores del cociente AN/AU en el estadio V y M indicando una menor pérdida de AN y por consiguiente una mayor interacción entre moléculas, lo que se podría relacionar con los valores de firmeza reportados previamente entre localidades (Figura I.7). Resultados similares se describieron en cereza, donde se halló una menor relación AN/AU en cultivares blandos respecto a cultivares más firmes (Batisse *et al.*, 1996).

En relación al cociente de ramificación de los frutos de *L. apiculata* en la FSC se observaron mayores valores de la relación AN/AU a los reportados en FSA, teniendo su máximo en el estadio T y disminuyendo hacia el final de la maduración del fruto. Este aumento podría asociarse a una depolimerización de las cadenas principales de las pectinas, que es coincidente con la aumento en el contenido de FSC durante la maduración. En relación a la FSN esta se mantuvo constante durante la maduración del fruto de *L. apiculata* salvo en el estadio T donde se observaron valores significativamente menores, es probable que la disminución en la etapa de transición afecte positivamente a la FSC. A pesar de esto los resultados de cuantificación indican una mayor concentración de FSN la cual se solubiliza generando los cambios en el cociente de ramificación en las FSA y FSC. Por otra parte, en *P. andina*, a diferencia de lo observado en arrayán se evidenció un incremento de la relación AN/AU en las fracciones FSA y FSC, y una reducción en la FSN, de la misma manera a lo reportado en la concentración de las fracciones de AU y AN en las tres fracciones mencionadas. Los valores del cociente de ramificación fueron mayores a 1 en los estadios T y M, lo que sugiere que este fruto presenta una mayor solubilización de los componentes pécicos, principalmente por la drástica pérdida

de Ara, Man y Rha durante la maduración de los frutos de *P. andina* (figura I.16). Por otra parte, el aumento en el contenido de GalA durante la maduración podría indicar una nueva síntesis de cadenas pécticas. Estos antecedentes nos permiten inferir que la solubilización de azúcares ramificados es mayor que la degradación de las cadenas principales de las pectinas en FSA y FSC durante la maduración de frutos.

Como se mencionó previamente los cambios en el contenido de las fracciones concuerda con los antecedentes obtenidos el análisis de azúcares de hemicelulosas a partir de RIA por C-GM. En particular en el caso de arrayán el análisis reveló una disminución de GalA y GlcA durante los estadios de maduración, al igual que un descenso en los niveles de Gal y Ara lo que sugiere la presencia de galactanos, arabinanos y/o arabinogalactanos (Willats *et al.*, 2006) como ramificaciones de la cadena principal. Otros azúcares neutros, como la Xyl, Man y Rha, estuvieron presentes pero en porcentajes muy bajos.

Para los frutos de *P. andina* el mismo análisis reveló un aumento en los niveles de GalA y Glu lo que podría indicar la nueva síntesis de homogalacturonanos. Por otra parte, se observa la reducción de Rha, lo que podría indicar que las cadenas de pectinas también están compuestas por ramnogalacturonano I o con ramnogalacturonano II, de manera similar se observó un descenso en los niveles de Ara, Gal evidenciando nuevamente la presencia galactanos, arabinanos y/o arabinogalactanos (Willats *et al.*, 2006) concordando con lo reportado por Gross y Sams (1984). A su vez también se observa una reducción dramática de Man y Xyl que pueden estar asociados a la despolimerización y solubilización de las ramificaciones de las hemicelulosas (xilanos y mananos) presentes en el fruto.

I.6. Conclusión.

Los resultados del presente capítulo indican que existen cambios evidentes y significativos en relación a la pigmentación, peso, diámetro y CSS, entre los estadios de maduración de ambas especies. De esta forma, estas características físicas son las ideales para determinar los diferentes estadios de maduración. Además los resultados nos permiten inferir que sus cualidades son atractivas para la comercialización al ser comparados con otros frutos comerciales.

El análisis de firmeza reveló cambios durante la maduración, que están directamente relacionados con la pérdida de RIA y lignina en ambos frutos. Junto con esto se determinó que las modificaciones en los componentes de la pared celular afectan directamente la calidad del fruto durante la maduración.

Por otra parte los cambios en el contenido de AU y AN en las fracciones pécticas indican que existe un incremento durante la maduración de ambas especies en la FSA y FSC producto de la solubilización y despolimerización de las pectinas de interacción covalente en la FSN, lo que indicaría una dinámica similar en el metabolismo de ambos frutos. Por otra parte se observaron diferencias entre especies en relación al contenido de hemicelulosas, lo que puede estar relacionado con la firmeza de cada fruto y la naturaleza de cada uno, no obstante es necesario investigar más este punto.

En relación al contenido de azúcares a partir de RIA, se determinó que los azúcares mayormente solubilizados fueron Ara y Gal, para ambos frutos, lo que indicaría una pérdida de las estructuras ramificadas de las pectinas de ambos frutos durante la maduración. Por otro lado, ambos frutos presentaron diferencias en el contenido de GalA: en el caso de *L. apiculata* se observa una disminución de este azúcar mientras que los frutos de *P. andina* presentan un aumento durante la maduración, lo que podría indicar una nueva síntesis de pectinas. Además de esto, este análisis reveló que los azúcares que componen los frutos de *P. andina* varían más que los observados en *P. andina*, lo que puede indicar estructuras pécticas más complejas.

Por otro lado, se observaron diferencias en el diámetro partícula, masa molar y polidispersidad en las diferentes fracciones pécticas analizadas durante la maduración de ambos frutos, lo que podría estar influenciado por los procesos de solubilización, despolimerización o bien por la acción enzimática, no obstante es necesario realizar una mayor cantidad de análisis para complementar la información presentada.

Finalmente, los parámetros físicos descritos inicialmente no presentaron variaciones significativas entre localidades, lo que podría inferir que los frutos no se ven afectados por las condiciones de la localidad. En contraposición, si fue posible establecer variaciones entre localidades para los parámetros de pared celular, lo que podría indicar que los frutos se ven afectados por las características edafoclimáticas del sitio además de la variabilidad genética de las poblaciones analizadas para cada especie.



I.7. Bibliografía

- Ageorges, A., Cheynier, V., Terrier, N. 2014. Polyphenols. In Fruit ripening: physiology, signalling and genomics; Nath, P., Bouzayen, M., Mattoo, A.K., Pech, J.-C., Eds.; CAB International: Oxfordshire, UK; 151-177.
- Ahrabi, S.F., Madsen, G., Dyrstad, K., Sande, S. A., y Graffner, C. 2000. Development of pectin matrix tablets for colonic delivery model drug ropivacaine. *European Journal of Pharmaceutical Science*, 10: 43–52.
- Alba, M. 1977. Estudios sobre algunos aspectos de producción e industrialización de Murta. Proyecto desarrollo sector Costa. Osorno, Chile. Fondo Nacional Desarrollo Regional (FNDR). 30 p.
- Anderson, E. & Owens, J. N. 2003. Analysing the reproductive biology of *Taxus*: should it be included in Coniferales? *Acta Hort.* 615: 233-234.
- Ayma-Romay, A y Sanzetenea E. 2008. Variaciones fenológicas de especies de *Podocarpaceae* en estación seca de los Yungas (Cochabamba, Bolivia). *Ecología en Bolivia*, Vol. 43(1), 16-28.
- Baeza, V.M. y A. Llana. 1942. Las coníferas chilenas. *Anales de la Facultad de Filosofía y Educación, Universidad de Chile. Cuaderno Número 1*: 5-28, 15 lám.
- Batisse C, Buret M, Coulomb PJ. 1996. Biochemical differences in cell wall of cherry fruit between soft and crisp fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44: 453-457.
- Behall, K., y Reiser, S. 1986. Effects of pectin on human metabolism. In M. L. Fishman & J. J. Ren (Eds.), *Chemistry and functions of pectins*. Washington, DC: American Chemical Society. 248–265.
- Benoit, I. 1989. Red book on Chilean terrestrial flora. Corporación Nacional Forestal (CONAF), Santiago. 151 p.
- Blumenkrantz, N., y Asboe-Hansen, G. 1973. New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry*, 54: 484–489.
- Brown, L., Rosner, B., Willett, W. W., y Sacks, F. M. 1999. Cholesterol lowering effects of dietary fiber: A meta-analysis. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 69: 30–42.
- Brummell, D.A., Harpster, M.H. 2001. Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Molecular Biology*. 47: 311-340.

- Brummell, D.A. 2006. Cell wall disassembly in ripening fruit. *Functional Plant Biology* 33: 103-119.
- Buzeta, A. 1997. Chile: Berries para el año 2000. Departamento Agroindustrial, Fundación Chile. Santiago, Chile. 135p.
- Campbell, M. Ellis, E. 1992. Fungal elicitor-mediated responses in pine cell cultures induction of phenylpropanoid metabolism, *Planta* 186 409e417.
- Cañizares, A.; Laverde, D.; Puesme, R. 2003. Crecimiento y desarrollo del fruto de guayaba (*Psidium guajava* L.) en Santa Bárbara, Estado Monagas, Venezuela. *Revista UDO Agrícola, Venezuela*, n.3, v.1, p.34-38.
- Carpita, N.C., McCann, M.C. 2000. The cell wall. In "Biochemistry and molecular biology of plants". Eds. BB Buchanan, W Gruissem, RL Jones. pp. 52-108.
- CONAMA, 2003. Estrategia Nacional de la Biodiversidad. 19 pp. Para un análisis de la presión de los sistemas urbanos sobre la biodiversidad en varias ciudades de Chile. CONAMA, Chile.
- D' Amour, J., Gosselin, C., Arul, J., Castaigne, F., Willemot, C. 1993. Gamma-radiation affects cell wall composition of strawberries. *J. Food Sci.* 58: 182-185.
- Donoso, C. 1974. Dendrología. Árboles y arbustos chilenos. Manual N°2. Fac. Cs. Forestales. Universidad de Chile. 142p.
- El Sheikha A.F., 2004. Technological, chemical and microbiological studies on some packed foods, Fac. Agric., Minufiya Univ., Egypt.
- Femenia, A., Garcia-Conesa, M., Simal, S., & Rossel, C. (1998). Characterization of the cell walls of loquat (*Eriobotrya japonica* L.) fruit tissues. *Carbohydrate Polymers*, 35, 169–171.
- Ferraz, A., Mendonca, R., Guerra, A., Ruiz, J., Rodríguez, J., Baeza, J., Freer, J. 2005. Near Infrared Spectra and chemical characteristics of *Pinus taeda* (Loblolly Pine) wood chips biotreated by the white rot fungus *Ceriporiopsis subvermispora*. *J. Wood Chem. Techn.* 24: 99 – 113.
- Gómez, L., Ramírez, H. L., Neira-Carrillo, A., & Villalonga, R. 2006. Polyelectrolyte complex formation mediated immobilization of chitosan-invertaseneoglyco conjugate on pectin-coated chitin. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 28: 387–395.

- Gómez, L., y Villalonga, R. 2000. Functional stabilization of invertase by covalent modification with pectin. *Biotechnology Letters*, 22: 1191–1195.
- González, S.B. & Molares, S. 2004. Plantas medicinales utilizadas en comunidades rurales del Chubut, Patagonia Argentina. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 3: 58-62.
- Goulas, V., Minas I.S., Kourdoulas. P.M., Vicente. A.R y Manganaris G.A. 2014. Phytochemical content, antioxidants and cell wall metabolism of two loquat (*Eriobotrya japonica*) cultivars under different storage regimes *Food Chemistry* 155 (2014) 227–234.
- Gross, K. C. 1982. A rapid and sensitive spectrophotometric method for assaying polygalacturonase using 2-cyano-acetamide. *HortScience*, 17, 933–934.
- Hechenleitner, V., Gardner, M.F., Thomas, P.I., Echeverría, C., Escobar, B., Brownless, P., Martínez, C. 2005. Plantas amenazadas del centro-sur de Chile. Distribución, Conservación y Propagación. Primera Edición. Universidad Austral de Chile y Real Jardín Botánico de Edimburgo. 188 pp.
- Hevia, F., Venegas, A., Wilckens, R., Araya F. y Tapia, M. 1993. Murtilla (*Ugni molinae* T.). III. Algunas características del fruto colectado en Chile. *Agro-Ciencia* 9 (1): 63-66.
- Hoffmann, A. 1997. Flora silvestre de Chile, zona araucana. Cuarta edición revisada. 257 pp
- Inngjerdingen, K. T., Patel, T. R., Chen, X., Kenne, L., Allen, S., Morris, G. A. 2007. Immunological and structural properties of a pectic polymer from *Glinus oppositifolius*. *Glycobiology*, 17: 1299–1310.
- Jarvis, M.C., Briggs, S.P.H., Knox, J.P. 2003. Intercellular adhesion and cell separation in plants. *Plant, Cell and Environment* 26: 977-989.
- Jackson, C. L., Dreaden, T. M., Theobald, L. K., Tran, N. M., Beal, T. L., Eid, M. 2007. Pectin induces apoptosis in human prostate cancer cells: Correlation of apoptotic function with pectin structure. *Glycobiology*, 17: 805–819.
- Kays, S. 2004. *Postharvest biology*. Athens: Exon Press, 568 p.
- Kylie J. Nunan, Ian M. Sims, Antony Bacic, Simon P. Robinson, and Geoffrey B. Fincher. 1998. Changes in Cell Wall Composition during Ripening of Grape Berries. *Plant Physiol.* 118: 783–792.

- Kiyohara, H., Hirano, M., Wen, X. G., Matsumoto, T., Sun, X. B., & Yamada, H. 1994. Characterization of an anti-ulcer pectic polysaccharide from leaves of *Panax ginseng* C.A. Meyer. *Carbohydrate Research*, 263: 89–101.
- Koubala, B. B., Mbome, L. I., Kansci, G., Tchouanguép Mbiapo, F., Crepeau, M. J., Thibault, J. F. 2008. Physicochemical properties of pectins from ambarella peels (*Spondias cytherea*) obtained using different extraction conditions. *Food Chemistry*, 106: 1202–1207.
- Lavín, A, y Vega, A. 1996. Caracterización de frutos de murtila (*Ugni molina* Turcz.) en el área de Cauquenes. *Agricultura Técnica* 56 (1): 64-67.
- McNeil, M., Darvill, A G., Albersheim, P. 1980. Structure of plant cell walls: X. rhamnogalacturonan I, a structurally complex pecticpolysaccharide in the walls of suspension-cultured sycamore cells. *Plant Physiology* 66: 1128-1134.
- Mohnen, D. 2008. Pectin structure and biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*, 11, 266–277.
- Montenegro, G., Ortega, X., Bas, F., Gómez, M., Pizarro, R., Ávila, G., Muñoz, O., Mujica, A.M., Fredes, C., Olivares, L., Díaz, J., Rizzardini, G., González, L., Santa Cruz, D. 2004. Investigación sobre flora melífera, análisis botánico y químico de mieles con fines de certificación y exportación: Proyectos y proyecciones de investigación. Primer Simposium Mundial de Cooperativismo y Asociatividad de Productos Apícolas (Mendoza, 2 al 5 de septiembre, 2004).
- Muñoz P., V. 1966. Sinopsis de la flora chilena. Ed. 2. Santiago.
- May, C. D. 1990. Industrial pectins: Sources, production and applications. *Carbohydrate Polymers*, 12, 79–99.
- Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., da Fonseca, G.A.B., Kent, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 43: 853-858.
- Novoa, R. 1983. Antecedentes sobre establecimiento y producción de frutos de la especie *Ugni molinae* Turcz. Tesis de Ingeniero Forestal Valdivia, Chile. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Forestales. 90 p.
- Nangia-Makker, P., Hogan, V., Honjo, Y., Baccarini, S., Tait, L., Bresalier, R. 2002. Inhibition of human cancer cell growth and metastasis in nude mice by oral intake of modified citrus pectin. *Journal of the National Cancer Institute*, 94: 1854–1862.

- O'Donoghue, E.M., Huber, D.J. 1992. Modification of matrix polysaccharides during avocado (*Persea americana*) fruit ripening: an assessment of the role of Cx-cellulase, *Physiol. Plantarum* 86: 33–42.
- Perez-Almeida, I., y Carpita, N. C. 2006. Las B-galactosidasas y la dinámica de la pared celular. Caracas, Venezuela. *Interciencia* 31 (7): 476-483.
- Redgwell, R.J., Fischer, M. 2002. Fruit texture, cell wall metabolism and consumer perceptions. In: *Fruit quality and its physiological basis*, M. Knee, ed., Sheffield, UK: Sheffield Academic Press, CRC Press LLC, pp. 46-88.
- Redgwell, R.J., MacRae, E.A., Hallett, I., Fischer, M., Perry, J., Harker, R. 1997. In vivo and in vitro swelling of cell walls during fruit ripening. *Planta* 203: 162-173.
- Ridley, B. L., O'Neill, M. A., & Mohnen, D. 2001. Pectins: Structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*, 57, 929–967.
- Rose JKC, Hadfield KA, Labavitch JM, Bennett AB. 1998a. Temporal sequence of cell wall disassembly in rapidly ripening melon fruit. *Plant Physiology* 117: 345-361.
- Rodríguez R., O. Matthei., M. Quezada. 1983. *Flora Arbórea de Chile*: 293-295. Ediciones de la Universidad de Concepción, Chile. 408 pp.
- Rodríguez, R. 2004. Monografía Lleuque (*Prumnopitys andina*) Especie con Problemas de Conservación en Chile. ENDESA. 47 pp.
- Rosli HG, Civello PM, Martinez GA. 2004. Changes in cell wall composition of three *Fragaria x ananassa* cultivars with different softening rate during ripening. *Plant Physiol Biochem* 42: 823–831
- Sánchez de Lorenzo-Cáceres, J.M. 2008. Selección de plantas ornamentales con bajas necesidades hídricas. III Congreso de Jardinería de Asproga Innovaciones Tecnológicas. Jardinería sostenible, Santiago de Compostela (A Coruña), 42 p.
- San Martín, C., Ordaz, V., Sánchez, P., Beryl, M., Borges, L. 2012. Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) Quality produced in hydroponics with different particle sizes of tezontle. *Agrociencia*. 243-254.
- Seguel, I. 2008. Bancos de germoplasma nativo. En: *Biodiversidad de Chile. Patrimonio y desafíos*, Comisión Nacional del Medio Ambiente (CONAMA), 2ª Edición, Santiago, Chile, Ocho Libros Editores, pp. 572-579.

- Solarte, M.E., Hernández, M.S., Morales, A.L., Fernández-Trujillo, J.P., Melgarejo, L.M. 2010. Caracterización fisiológica y bioquímica del fruto de guayaba durante la maduración. En: Morales, A.L., Melgarejo, L.M. (eds.). Desarrollo de productos funcionales promisorios a partir de la guayaba (*Psidium guajava* L.) para el fortalecimiento de la cadena productiva, cap. 3: 85-119. Ed. Panamericana. Bogotá, Colombia. ISBN: 978-958-719-410-4.
- Somerville, C., Bauer, S., Brinin stool, G., Facette, M., Hamann, T., Milne, J., Osborne, E., Paredez, A., Persson, S., Raab, T., Vorwerk, S., Youngs, H. 2004. Toward a systems approach to understanding plant cell walls. *Science* 306: 2206-2211.
- Taboada, E., Fisher, P., Jara, R., Zuñiga, E., Gidekel, M., Cabrera, J.C., Pereira, E., Gutierrez-Moraga, A., Villalonga, R., Cabrera, G. 2010. Isolation and characterization of pectic substances from murta (*Ugni molinae* Turcz) fruits. *Food Chemistry*. 123, 669-678.
- Tellez L., Juárez B y Flores H. 2008. Efecto del almacenamiento sobre algunas propiedades físico-químicas en frutos de guayaba (*Psidium guajava*). *Biologicas*, No. 10, pp. 87-93.
- Tong, C.B.S., Gross, K.C. 1988. Glycosyl-linkage composition of tomato fruit cell wall hemicellulose fractions during ripening. *Physiol. Plant*. 74: 365-370.
- Torres A., Seguel I., Contreras G y Castro M. 1999. Caracterización físico-química de frutos de murta (Murtilla) *Ugni molinae* Turcz. *Agricultura Técnica (Chile)* 59 (4): 260-270. INIA Carillanca Temuco, Chile.
- Tsoga, A., Richardson, R. K., & Morris, E. R. 2004. Role of co solutes in gelation of high methoxy pectin. Part 1. Comparison of sugars and polyols. *Food Hydrocolloids*, 18: 907-919.
- Tucker G.A., Seymour G.B., Tayler J., Tucker G.A. 1993. Introduction, in: *Biochemistry of fruit ripening*, (Eds.), Chapman & Hall, Lond., U.K. pp. 1-52.
- UICN. 2013. UICN Red list of Threatened species. Gland, Suiza y Cambridge, Reino Unido. UICN. 33 p.
- Urias, V., Rascón. A., Lizardi. J., Carvajal. E., Gardea, A y Ramírez, B. 2010 A Novel Pectin Material: Extraction, Characterization and Gelling Properties. *Int. J. Mol. Sci*.
- Vicente, R., Ortugno, C., Powell, T., Greve, C., y Labavitch, M. 2007. Temporal sequence of cell wall disassembly events in developing fruits. 1. Analysis of raspberry (*Rubusideaus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 4119-4124.

- Vilches, F. 2005. Formulación y elaboración de un “snack” de arándano con incorporación de fibra dietética. Tesis de pregrado para optar al grado de agrónomo, Facultad de ciencias agronómicas. Universidad de Chile.
- Wagner H, 1985. The mark-Houwink-Sakuraba Equation for Viscosity of Linear Polyethylene. *J. Phys. Chem. Ref. Data*. Vol 14, No 2.
- Waldron, K.W.; Parker, M.L.; Smith, A.C. 2003. Plant cell walls and food quality. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*; 2, 101-119.
- Walter, K.S., H, Gillet. 1998. 1997 IUCN Red List of Threatened Plants. Glands, Switzerland y Cambridge, Reino Unido. 862 p.
- Wakabayashi, K. 2000. Changes in cell polysaccharides during fruit ripening. *J. Plant Res.* 113: 231-237.
- Willats, W. G. T., Knox, J. P., y Mikkelsen, J. D. 2006. Pectin: New insights into an old polymer starting to gel. *Trends in Food Science and Technology*, 17: 97–104.
- Willis R.B.H., Mc Glasson W.B., Graham D., Lee T.H., Hall E.G. 1996. Postharvest - an introduction to the physiology and handling of fruit and vegetables, CBS Publ. Distrib., New Delhi, India, pp. 17–38.
- Wills, R., B. Mc Glasson, D. Graham, and D. Joyce. 1998. Postharvest. An introduction to the physiology and Handling of fruit, vegetables and ornamentals. 4th ed. 262 p. Hyde Park Press, Adelaide, Australia.
- Woltz. Ph. 1986. Les Podocarpus (s.l.) origines et evolution. Etude des plantules, caomparaison avec les familles de conifères de l’hemisphere Sud. Université de Droit, D’ Economie et Sciences. D’Aix-Marseille. France. The se pour obtenir le grade de docteur Es. Science. 190 P.
- Yamada, H. 1996. Contribution of pectins on health care. In J. Visser y A. G. J. Voragen (Eds.), *Pectins and pectinases* (pp. 173–190). Amsterdam: Elsevier.
- Yemm E., & Willis J. 1954. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *Biochemical Journal*, 57, 508–51.

CAPITULO II.

Physiochemical and antibacterial characterization of fruits of *Citronella mucronata* (*Cardiopteridaceae*), *Pitavia punctata* (*Rutaceae*) and *Beilschmedia berteriana* (*Lauraceae*), three endemic and threatened Chilean trees

Caracterización fisicoquímica y antibacteriana de frutos de *Citronella mucronata* (*Cardiopteridaceae*), *Pitavia punctata* (*Rutaceae*) y *Beilschmedia berteriana* (*Lauraceae*), árboles endémicos y amenazados de Chile.

Felipe A. Sáez¹, Gabriela F. Narváez¹, M. Fernanda Morales², Helia M. Bello², Cristián Balbontín³, Carlos R. Figueroa^{4*}

1. Facultad de Ciencias Forestales, Universidad de Concepción, Casilla 160-C, Concepción, Chile
2. Laboratorio de Investigación en Agentes Antibacterianos, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción, Casilla 160-C, Concepción, Chile
3. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, INIA-Quilamapu, Avda. Vicente Méndez 515, Chillán, Chile
4. Instituto de Ciencias Biológicas, Universidad de Talca, Casilla 747, Talca, Chile

El texto incluido en este capítulo fue enviado para publicación a la revista FRUITS con el título: "Physiochemical and antibacterial characterization of fruits of *Citronella mucronata* (*Cardiopteridaceae*), *Pitavia punctata* (*Rutaceae*) and *Beilschmedia berteriana* (*Lauraceae*), three endemic and threatened Chilean trees" por Felipe A. Sáez, Gabriela F. Narváez, M. Fernanda Morales, Helia M. Bello, Cristián Balbontín, y Carlos R. Figueroa.

II.1. Abstract

Several native tree species are scarcely studied in relation to fruit properties. In order to bring about information of these plant resources, the characterization of ripening-associated properties of the fruit of three endemic and threatened Chilean trees (*Citronella mucronata*, *Pitavia punctata* and *Beilschmedia berteroana*) was performed in the present study. The physiochemical characterization of two developmental fruit stages (I and II) in each species included the measurement of soluble solid content (SSC), titratable acidity (TA), pH, color and chlorophyll content; cell wall composition and lignin content; the total phenolic content (Folin-Ciocalteu method) and antioxidant capacity (FRAP assay). Moreover, the minimal inhibitory concentration (MIC) was carried out in fruit extracts against 11 bacterial strains. *P. punctata* and *B. berteroana* fruits exhibited similar SSC and TA values showing a significant increase of the SSC:TA ratio during development. However, *C. mucronata* showed the highest SSC value at stage II with 8.1 °Brix, accompanied by a noticeable color change. The analysis of pectin fractions suggests that solubilisation of pectic polymers increase during fruit development in all species. The fruits of *C. mucronata* presented the highest level of total uronic acids (71% of the cell wall material at stage II). The phenolic content, antioxidant capacity and MIC were particularly remarkable in *P. punctata* fruits at stage II, when fruit reaches 6.5 °Brix, with values of 942.4 mg GAE 100 g⁻¹ FW, 2.51 mM FeSO₄ g⁻¹ FW, and 6.25% v/v, respectively. Our results relate interesting properties of *C. mucronata* and *P. punctata* fruits for food and pharmaceutical industries with physiological indexes at stage II, mainly °Brix and color.

Keywords: Chile / endemic fruits / non-timber forest products / underutilised species / cell wall analysis / antioxidant activity

II.2. Introduction

Chile is considered a 'biogeographic island', with diverse climates, ecosystems, and an extraordinary biodiversity (Armesto *et al.*, 1998). While the diversity of native plants, may be low considering with other South American countries, Chile has a high percentage of endemism what makes it a 'hotspot' of biodiversity (Myers *et al.*, 2000). However, there are little information about the biology and usefulness of many of these endemic resources (Hechenleitner *et al.*, 2005).

This situation constitutes a major economic opportunity for the sustainable management of forests and their species with conservation problems. While forests have been studied for a long time under the approach of obtaining wood for industrial purposes, now its properties have gained renewed interest as a source of many Non Timber Forest Products (NFTPs), which add value to forests (Nesptad and Schwartzman, 1992). Some of the threatened endemic trees of native forests of central Chile whose fleshy drupe-type fruits are 'huillipatagua' (*Citronella mucronata* (Ruiz & Pav.) D. Don), 'pitao' (*Pitavia punctata* Molina) and 'belloto del sur' (*Beilschmiedia berteriana* (Gay) Kosterm).

These three species share a restricted distribution in wet ravines in south-central Chile and according to their conservation status they are threatened to extremely threatened (Hechenleitner *et al.*, 2005). Although there no reports that these fruits are edible, they could be interesting as raw materials or additives for food, pharmaceutical or natural products industries under a sustainable management.

Citronella mucronata is a perennial tree belongs to the *Cardiopteridaceae* family whose species are used in some African countries as an effective molluscicide (Branckenbury, 1999). The fruits of this species are small drupes of about 1.2 cm diameter, dark purple aripe stage (Hechenleitner *et al.*, 2005). *P. punctata* is a perennial tree belongs to the *Rutaceae* family, and its potential could be similar to other species of the family which have been characterized for antimicrobial properties (Esterhuizen *et al.*, 2006). An early characterization of extracts from stems and leaves of *P. punctata* reported several flavonoid compounds (Silva *et al.*,

1971). Fruits of *P. punctata* are ovoid drupes (1.8-2.5 cm diameter) green at the first developmental stages and yellowish green at ripe stage (Hechenleitner *et al.*, 2005). *B. berteriana* is an evergreen tree that belongs to the *Lauraceae* family with globular and greyish-yellow drupes (2 x 2cm) (Hechenleitner *et al.*, 2005). The information about the fruit properties of this species is scarce, however the fruits could be interesting since they would present high amounts of mucilage (Rodriguez *et al.*, 1983).

The characterization of fruit properties in this group of species has not been reported. Chilean native fruits have the potential to become in appreciated supplies for nutraceutical industry. In this sense, the extracts of the fruits of the Chilean native berries 'maqui' (*Aristotelia chilensis* (Molina) Stuntz), 'murtilla' (*Ugni molinae* Turcz.) and 'arrayan' (*Luma apiculata* (DC.) Burret) have shown interesting results for its antioxidant and antibacterial activities and potential health benefits, mainly due to the phenolic composition of their leaves and fruits (Rubilar *et al.*, 2006; Suwalsky *et al.*, 2007; Fuentes *et al.*, 2016). Pectin, a main component of the cell wall found in a wide variety of fruits, is also a valuable ingredient for food, cosmetic and pharmaceutical industries (Willats *et al.*, 2006) that could be found in this type of fruits. In addition, other interesting and particular physiological processes can be described in native or underutilised fruits that could help to understand the ripening phenomena, as is the case of Chilean strawberry (*Fragaria chiloensis* (L.) Mill.) (Cherian and Figueroa, 2014).

The objective of this work was to determine the potential of *C. mucronata*, *P. punctata* and *B. berteriana* fruits as materials for the food and pharmaceutical industries. The characterization included the analysis of physiochemical and antimicrobial properties of fruits. In a first step, fruit quality parameters such as colour, solid soluble concentration (SSC) and titratable acidity (TA), and chemical attributes such as total phenolic content (TPC) and antioxidant capacity (AOX) were evaluated as a general characterization. In a second step, to deep insight in certain fruit attributes, analyses of cell wall fractions and antibacterial assays were carried out on fruit extracts.

II.3 Materials and methods.

II.3.1. Plant material:

Fruits of the tree species were collected from three natural populations located in Biobío Region, Chile: ‘Hualpén’ (lat. 36°47’40” S; long. 73°09’42” W; 54 m a.s.l) for *C. mucronata*, ‘Nonguén’ (lat. 36°49’55” S; long. 72°58’08” W; 250 m a.s.l) for *P. punctata*, and ‘Bulnes’ (lat. 36°43’35” S; long. 72°15’26” W; 102 m a.s.l) for *B. berteriana* (Figure II. 1). Harvested fruits were immediately transported to the laboratory under refrigerated conditions. The fruits were classified in two developmental stages according to the evolution of weight and/or colour. The first stage (I) includes smaller fruits; and second stage (II) includes bigger and pigmented fruits.

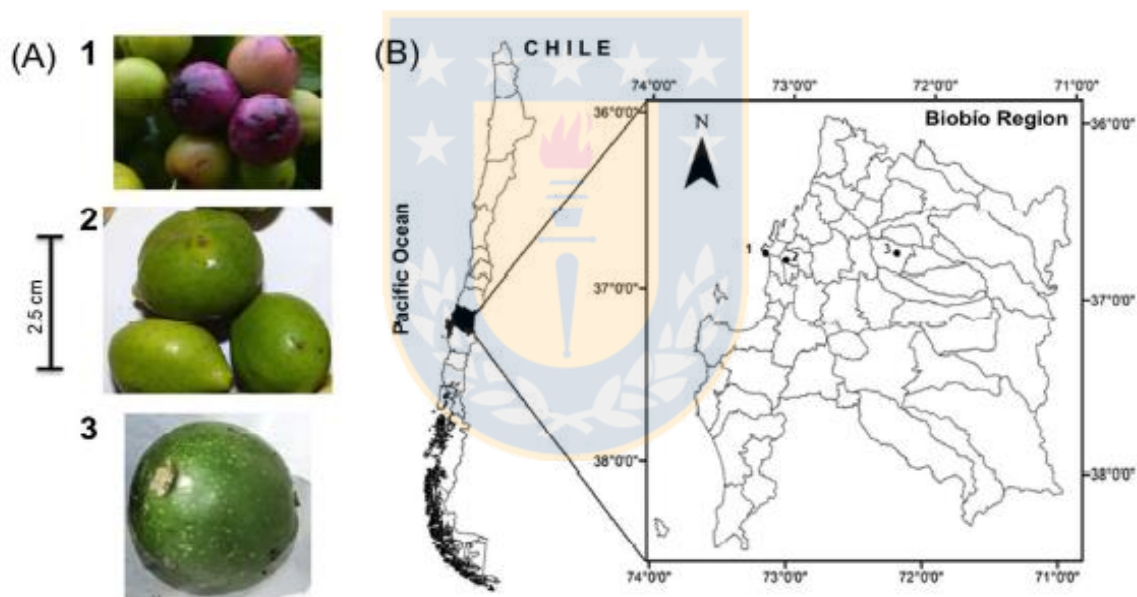


Figure II.1. Fruits and locations of the three tree species studied in the present research. (A) Representative photographs of the three fruits: 1) *Citronella mucronata*, 2) *Pitavia punctata* and 3) *Beilschmiedia berteriana*. (B) Geographical locations of the natural populations in Biobío Region (Chile) for the three species (B): ‘Hualpén’ for *C. mucronata* (1), ‘Nonguén’ for *P. punctata* (2) and ‘Bulnes’ for *B. berteriana* (3). See text for geographic coordinates for each location.

II.3.2. Fruit quality assessments and chlorophyll determination.

For each species and stage 30 fruits without external damage were analysed for weight, diameter and colour. The fruits were weighed (g) and the equatorial diameter was measured (mm) using a digital caliper (Mitutoyo, USA). Skin colour of fruits was characterized using a colorimeter (model CR-400, Konica Minolta, Japan) and expressed as CIELAB scale (L^* , a^* , b^*) along with the dimensions of colour chroma and hue angle (h°). Two measurements one each equatorial side were performed for each fruit. Firmness of stage II fruits was determined using a texture analyser (model CT3, Brookfield Engineering Labs., USA) expressing the results in Newton (N). The fruits were punctured at the equatorial region on opposite sides, using a 1 mm diameter cylinder probe. Thereafter, the fruits were cut into pieces and a bulk tissue sample was prepared in each species and stage and separated in three replicates, which were frozen in liquid nitrogen and stored at -20°C until use for the rest of the analyses.

For the determination of solid soluble content (SSC), titratable acidity (TA) and pH, 2 g of 2 g of each replicate were ground with liquid nitrogen, homogenized in 5 ml distilled water and filtered through miracloth obtaining three different juice extractions. SSC was determined in the juice at 20°C using a hand-held temperature compensated refractometer (Atago, Japan) and expressed as $^\circ\text{Brix}$. pH was measured in the juice using a pH-meter (Model pH 20, HANNA instruments, USA). TA was determined by diluting the remaining juice in distilled water (1/10, v/v), and then titrating an aliquot of 13 ml to pH 8.2 using 20 mM NaOH with a digital burette (Jencons, UK) and expressed as grams of citric acid per 100 g of FW.

Chlorophyll quantification was performed according to the method described by Lichtenthaler and Wellburn 1983, with some modifications. Briefly, fruit skin (0.2 g) was ground with liquid nitrogen, homogenized in 2 ml of acetone/H₂O (80/20, v/v) and centrifuged for 10 min at 12000 rpm at 4°C . The supernatant was then diluted (1/3, v/v) in acetone/H₂O (80/20, v/v) and then measured at 663-646 nm. The results of three replicates were expressed as micrograms chlorophyll per gram of fruit skin.

II.3.3. Cell wall analysis.

II.3.3.1. Cell wall isolation and lignin determination.

Cell wall material was extracted according to Figueroa *et al.*, 2012 with some modifications. Five grams of frozen fruit tissue was ground with liquid nitrogen, homogenized in 40 ml of 95% ethanol and boiled for 45 min. The insoluble material was filtered through miracloth and sequentially washed with 15 ml of boiling ethanol, 15 ml of chloroform/methanol (1/1, v/v) and 15 ml of acetone. The residue (Alcohol Insoluble Residue, (AIR)) was dried overnight at 37°C and weighed. The results of three replicates were expressed as milligrams of AIR per gram of FW. Lignin was extracted as described by Campbell and Ellis 1992. After cell wall preparation, the samples were diluted in 1 M NaOH (1/3, v/v) and hydrolysed. A colorimetric assay was performed using thioglycolic acid (Sigma-Aldrich, USA), and the absorbance was measured at 280 nm. The results of three replicates were expressed as micrograms of lignin per gram of FW.

II.3.3.2. Cell wall fractionation.

The fractionation of cell wall material was performed using a sequential chemical treatment of each AIR replicate as previously described (Figueroa *et al.*, 2012). The water-soluble (WSF), the trans-1,2-diaminocyclohexane-N,N,N',N'-tetraacetic acid (CDTA)-soluble (CSF), and Na₂CO₃-soluble (NSF) fractions were obtained and considered mainly pectin rich fractions. Two independent extractions were obtained from each replicate.

The uronic acid (UA) and neutral sugars (NS) concentrations in the different pectin fractions were determined colorimetrically as previously described (Blumenkrantz *et al.*, 1973; Yemm, and Willis, 1954). The results were calculated using standard curves of galacturonic acid and glucose for UA and NS, respectively. Measurements were performed in triplicate, and the results were expressed as micrograms of galacturonic acid (UA) or glucose (NS) per milligram of AIR.

II.3.4. Total phenolic content (TPC) and antioxidant capacity (AOX) determination.

Two grams of stage II fruits were ground with liquid nitrogen, homogenized in 10 mL of 100% methanol and centrifuged for 20 min at 5000 rpm. The samples were filtered through

mira cloth to obtain a clear extract. Total phenolic content (TPC) were determined using the colorimetric method described by Singleton and Rossi at 1965, using gallic acid as the standard. Briefly, 500 VL of methanol extract was mixed with 3.5 mL of distilled water and 250 VL Folin-Ciocalteu reagent, and incubated at room temperature for 5 min. Then, 500 VL of 10% (w/v) Na₂CO₃ was added and samples were incubated in darkness for 1 h at room temperature. Finally, the absorbance was read at 765 nm using an UV/Vis spectrophotometer (Spectronic GENESYS, USA). The results of three replicates were expressed as micrograms gallic acid equivalents (GAE) per gram of FW.

Measurement of antioxidant capacity (AOX) of the fruit extracts was evaluated by the ferric reducing ability of plasma (FRAP) assay according to Benzie and Strain 1996. The FRAP reagent was prepared by mixing together 10 mM 2,4,6-tripyridyl triazine (TPTZ) and 20 mM ferric chloride in 0.25 M acetate buffer, pH 3.6. One hundred microliter of methanol extract was added to 300 VL of distilled water followed by 3mL of FRAP reagent. The absorbance was read at 593 nm after 5 min of incubation at room temperature against a blank. The results of three replicates were expressed as mM FeSO₄-7H₂O equivalent per gram of FW.

II.3.5 Antibacterial assays.

II.3.5.1. Fruit samples.

Fruit samples of each species from stage II were oven-dried at 70°C for 48 h. Dried samples were finely pulverized using a food processor. Seven grams of each dried and pulverized sample were mixed with 105 mL of 100% methanol in an orbital shaker at 100 rpm for 24 h at room temperature. After extraction, each sample was filtered and stored at 4°C until use.

II.3.5.2. Bacterial strains.

Each fruit sample was tested against Gram positive *Staphylococcus aureus* ATCC29213 and ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212; Gram negative *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *Enterobacter cloacae* ATCC E705, *Escherichia coli* ATCC 25922 and ATCC 35218, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1706, ATCC BAA-1705 and ATCC700603. All bacterial strains were obtained from the Research Lab of Antibacterial Agents, University of Concepcion, Chile. The strains were maintained at

-80°C in a 2:1 ratio of 50% glycerol and broth. Cultures for antimicrobial activity tests were grown in 3 mL Tryptone Soy Broth at 37°C overnight before the assay.

II.3.5.3. Determination of Minimal Inhibitory Concentration (MIC).

The MIC was determined by broth microdilution assay according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (2012). Briefly, five microliter of inoculum adjusted to 0.5 McFarland of each of the strains were pipetted into 96-well microtiter plates with 100VL Mueller-Hinton broth (Oxoid Ltd., UK) followed by a two-fold serial dilution of fruit extract samples (final concentration of 5×10^5 CFU/mL). A positive control (not including extracts) and a negative control (without inoculum) were also included. After incubation at 37°C for 18-24 h, MIC was determined as the lowest concentration at which no growth occurred (devoid of turbidity).

II.3.5.4. Determination of Minimal Bactericide Concentration (MBC).

The MBC was calculated by taking 100 VL of broth from each well without growth than transferred to 5 mL of Trypticase Soy broth. After incubation at 37°C for 24-36 h, MBC were determined as the lowest concentration at which no growth occurred.

II.3.6. Statistical analysis.

The entire experiment was conducted using a completely randomized design, with the main factors being the three species (*C. mucronata*, *P. punctata*, and *B. berteroana*) at one or two developmental stages, as the case. The data were analysed by ANOVA using INFOSTAT (version 2008) software, and differences were considered statistically significant at $P \leq 0.05$ (LSD test).

II.4. Results and discussion.

II.4.1. Characterization of fruit quality attributes.

The physical analysis of the fruit revealed that only *C. mucronata* fruit grows during development, since an increase in fresh weight and diameter was only observed in this species (Table II. I). In addition, *C. mucronata* presented the smallest fruits among the three species (2.3 g and 13 mm of FW and diameter at stage II, respectively), and together with *B. berteriana* exhibited lower level of fruit firmness than *P. punctata* at the stage II (data not shown). The biggest fruit correspond to *B. berteriana* species, reaching 9.5 g and 23.1 mm of FW and diameter at stage II, respectively.

Regarding pH values, they remained constant during fruit development in *C. mucronata* and *P. punctata*, and increased in *B. berteriana* with the highest value compared with the other species (Table II. I). On the other hand, *C. mucronata* showed the highest SSC and TA values at stage II with 8.1 °Brix and 0.33 g citric acid 100 g⁻¹ FW, respectively (Table II. I). The SSC values reported here for *C. mucronata* differ markedly when it is compared with the Chilean native *A. chilensis* berry, which showed a SSC value close to 19 °Brix (Fredes *et al.*, 2012). Nevertheless, other Chilean native berries show SSC values more close to those exhibited by *C. mucronata* fruits. In this sense, it has been reported for 'calafate' berry (*Berberis microphylla* G. Forst.) a wide range of SSC values in ripe fruits from 9.3 to 22.9 °Brix, depending on location (Maringel *et al.*, 2013). In addition, it has recently been reported SSC values from 5.2 to 12.56 °Brix in green and ripe fruits of *L. apiculata*, respectively (Fuentes *et al.*, 2016). The SSC values for *C. mucronata* fruits are close to the lowest value for *B. microphylla* fruit (i.e., 9.3 °Brix) and with those observed for cultivated berries such as cranberry (9.3 °Brix) [Celik *et al.*, 2008] and raspberry (10.9 °Brix) [Wang *et al.*, 2009]. In the case of *P. punctata* and *B. berteriana* fruits, they exhibited lower SSC levels at stage II than those observed for *C. mucronata* (table I), similar to those values reported for ripe fruits of blackberry cultivars [Guedes *et al.*, 2013]. Differences in SSC values of fruits depend on the environment and growing season, among other factors. For instance, in *B. microphylla* high SSC values in this species are in accordance with higher degrees of south latitude (Maringel *et*

al., 2013), and in *L. apiculata* a variation between samples collected in different harvest seasons was reported (Fuentes *et al.*, 2016). In the present study, it was difficult to compare between different locations and growing seasons due to the lack of plant material since they are threatened species. On the other hand, *P. punctata* and *B. berteroana* fruits showed a significant increase of the SSC:TA ratio from stage I to II, suggesting that ripening process takes place between these two stages in *P. punctata* and *B. berteroana* fruits. Fruit at green stages has higher pectin content and starch, which decrease as the fruit ripens due to the action of enzymes that hydrolyze and produce an increase in the concentration of sugars [27]. Moreover, the TA is considered as one of the physicochemical properties which affects the organoleptic properties, since the organic acid: sugar ratio defines quality parameters at harvest time in fruits [Osorio and Ferni, 2014].



Table II.I. Quality assessments of *C. mucronata*, *P. punctata* and *B. berteroana* fruits in two developmental stages

Species	Fresh weight (g)	Diameter (mm)	pH	SSC (°Brix)	TA (g citric acid g ⁻¹ FW)	SSC/TA
<i>C. mucronata</i> (I)	1 ± 0,3 ^b	11,8 ± 0,9 ^b	6,3 ± 0,2 ^a	8,0 ± 0,3 ^a	0,23 ± 0,03 ^b	34,4 ± 3,4 ^a
<i>C. mucronata</i> (II)	2,31 ± 0,4 ^a	13 ± 1,1 ^a	6,1 ± 0,1 ^a	8,1 ± 0,9 ^a	0,33 ± 0,03 ^a	24,5 ± 1,1 ^b
<i>P. punctata</i> (I)	5 ± 0,6 ^a	21,4 ± 1,5 ^a	6,6 ± 0,1 ^a	4,2 ± 0,4 ^b	0,07 ± 0,01 ^a	61,3 ± 6,6 ^b
<i>P. punctata</i> (II)	5,19 ± 0,9 ^a	20,9 ± 1,2 ^a	6,5 ± 0,1 ^a	6,5 ± 0,9 ^a	0,05 ± 0,01 ^b	108,4 ± 11,3 ^a
<i>B. berteroana</i> (I)	8,7 ± 0,4 ^a	23 ± 1,3 ^A	7 ± 0,1 ^A	4,7 ± 0,1 ^B	0,04 ± 0,01 ^a	118,3 ± 13,9 ^b
<i>B. berteroana</i> (II)	9,52 ± 0,5 ^a	23,13 ± 1,53 ^A	6,7 ± 0,1 ^A	6,3 ± 0,4 ^B	0,04 ± 0,01 ^a	164,8 ± 12,3 ^a

Data indicate the mean of three replicates ± S.D. Different letters indicate significant differences between developmental stages in each species ($P \leq 0.05$).

Fruit pigmentation is a result of a coordinate and development-regulated process during ripening that involve the turn over of green chloroplasts into coloured chromoplasts in yellow, orange and red coloured fruits (Pech *et al.*, 2014), and the accumulation of anthocyanins that pigmented fruits of red, blue and black (Ageorges *et al.*, 2014). The CIELAB system represented in rectangular coordinates the clarity or luminosity (L^*) and chromaticity (composed by a^* and b^*). Luminosity goes from 0 to 100, where $L^*=100$ represents a perfect reflecting diffuser, and $L^*=0$ represents black. The chromaticity components have values from $(-a^*)$ to $(+a^*)$ and $(-b^*)$ to $(+b^*)$, where a^* goes from green to red, and b^* goes from blue to yellow (Yam and Papadakis, 2004). For L^* parameter, a significant decrease and increase were observed between stages in *C. mucronata* and *P. punctata* fruits, respectively (Table II. II). This confirms a greater darkening and lightness observed in *C. mucronata* and *P. punctata* fruits, respectively. In the case of *B. berteroana* fruits, no changes in luminosity were observed, with values close to the middle of the L^* scale (Table II. II). Along side this, the fruits of this species neither exhibited significant changes in the parameters a^* and b^* , suggesting that colour changes is not a good indicator for fruit ripening in *B. berteroana*. In contrast, the results of chromaticity for *C. mucronata* and *P. punctata* species showed significant differences between the developmental stages under study. The highest value in the a^* parameter and the lowest value in b^* were observed in *C. mucronata* fruit at stage II according to the purplish colour that it reaches at maturity (Table II. II, Figure II. 1A). *P. punctata* fruit turns to yellow colour in stage II according to the b^* value, which is the highest value registered (Table II. II, Figure II.1A).

The chroma and hue (h°) are combinations of a^* and b^* parameters and its behaviour can be easily differentiate the colour vividness and colour appearance of each fruits in the developmental stages. As well as a^* and b^* parameters, only *C. mucronata* and *P. punctata* showed changes in chroma and h° between developmental stages. The fruits of all species at stage I have similar h° and chroma values (green tones, 117° - 120° , with middle chroma values 36 to 39). *P. punctata* and *B. berteorana* fruits remained in this range at the stage II, although *P. punctata* exhibited a more vivid colour en stage II (chroma 43.9). On the contrary, *C. mucronata* fruits showed a severe reduction in chroma and hue values (Table II. II), indicating a change of colour and saturation in the fruit skin (Figure II. 1A).

The analysis of chlorophylls of *C. mucronata*, *P. punctata* and *B. berteroana* fruits revealed a significant decrease in the first two species during development, except in the case of chlorophyll a for *B. berteroana* which remained without significant differences (Table II. II). Remarkably, only *C. mucronata* fruits showed a dramatic decrease of both chlorophylls during development (almost 95% reduction for chlorophyll a and a 85% reduction for chlorophyll b). At the stage II, *P. punctata* and *B. berteroana* fruits still have high levels of chlorophyll in relation to *C. mucronata* fruits. However, the total content of chlorophyll becomes lower during fruit ripening in all fruits studied. This loss of chlorophyll is related with the decrease in the hue value, from green to yellow-orange colour tones, as occurred with *C. mucronata* fruits (Table II. II).



Table II. II. Characterization of colour and composition of chlorophylls of *C. mucronata*, *P. punctata* and *B. berteroana* fruits in two developmental stages

Species	Stages	Chlorophyll <i>a</i> ($\mu\text{g g}^{-1}$ FW)	Chlorophyll <i>b</i> ($\mu\text{g g}^{-1}$ FW)	<i>L</i> *	<i>a</i> *	<i>b</i> *	Chroma	Hue (h°)
<i>C. mucronata</i>	Unripe	468,5±36,1 ^{Ba}	253,2±15,1 ^{Ba}	52,48±3,0 ^{Aa}	(-)17,94±1,2 ^{Ab}	33,80±2,4 ^{Aa}	38,31±2,3 ^{Aa}	117,7±0,8 ^{Ba}
	Ripe	25,17±14,3 ^{Bb}	38,79±22,2 ^{Bb}	22,09±1,6 ^{Cb}	(+)1,67±0,3 ^{Aa}	1,83±0,3 ^{Cb}	2,44±0,81 ^{Cb}	47,09±3,94 ^{Cb}
<i>P. punctata</i>	Unripe	170,9±10,1 ^{Ba}	278,6±14,3 ^{ABa}	52,38±2,5 ^{Ab}	(-)18,16±0,4 ^{Ab}	31,59±0,9 ^{Ab}	36,69±2,4 ^{Ab}	119,89±0,2 ^{Aa}
	Ripe	144,3±5,7 ^{Ab}	246,1±2,4 ^{Ab}	62,70±0,9 ^{Aa}	(-)9,41±1,1 ^{Ba}	43,25±0,5 ^{Aa}	43,88±0,9 ^{Aa}	101,21±2,5 ^{Bb}
<i>B. berteroana</i>	Unripe	170,5±10,5 ^{Aa}	277,0±5,9 ^{Aa}	49,77±2,8 ^{Aa}	(-)18,20±1,6 ^{Aa}	34,61±3,7 ^{Aa}	39,13±3,1 ^{Aa}	118,3±1,0 ^{Ba}
	Ripe0	141,8±17,8 ^{Aa}	245,5±11,6 ^{Ab}	45,08±2,1 ^{Ba}	(-)16,0±2,6 ^{Ca}	35,4±4,95 ^{Ba}	38,44±1,4 ^{Ba}	114,8±3,6 ^{Aa}

Data indicate the mean of three replicates ± S.D. Different letters indicate significant differences between developmental stages in each species ($P \leq 0.05$).

II.4.2. Analysis of cell wall material, lignin and cell wall composition.

The AIR content decreases during development only in *P. punctata* and *B. berteroana* fruits, without significant differences between *C. mucronata* fruits (Table II. III). This suggests that degradation of cell wall occurring during fruit development of the *P. punctata* and *B. berteroana* species. Regarding lignin content, the results showed a significant decrease in *C. mucronata* and *P. punctata* fruits during development. In contrast, *B. berteroana* fruits exhibited an increase in lignin during development (Table II. III). Generally, the unripe or green stage fruits have higher fiber content, because the fruit has many polymeric carbohydrates (cellulose, hemicellulose, lignin and pectin substances), which are enzymatically degraded during the ripening process (Waldron. *et al.*, 2003). In the three species, some extent of degradation of these polymers seems to occur during development, either of cell wall in *P. punctata* and *B. berteroana*, or lignin in the case of *C. mucronata* (Table II. III).

In order to determine the proportion of the different pectic substances in the fruits, the AIR was sequentially extracted with water, CDTA and Na_2CO_3 to obtain the WSF, CSF and NSF fractions (Table II. III). Cell wall fractionation and quantification of uronic acids (UA) and neutral sugars (NS) allowed the identification of pectic composition associated to WSF, CSF and NSF fractions. It is well known that high methoxylated pectins, can be easily extracted with water, although it can only partially solubilize some of the pectic substances of the primary cell walls and middle lamellae (Selvendran and O'Neil, 1987). On the other hand, chelating agents, such as CDTA ions solubilises low methoxylated pectin fractions, and this procedure also preferentially solubilizes pectic substances from the middle lamellae. WSF fraction usually has a relatively higher degree of neutral sugar content compared with the CSF fraction. Disruptive treatment with Na_2CO_3 captured pectin fractions with lower molecular weight due to cleavage of glycosidic bonds mainly from primary cell walls (Selvendran and O'Neil, 1987).

In terms of UA content, higher values were observed at the stage II of *C. mucronata* and *P. punctata* in CSF and NSF fractions. In the case of *B. berteroana*, higher UA values were

observed at the stage II in WSF and CSF fractions. Only, *C. mucronata* fruit showed a reduction in UA content in the WSF fraction during development. Interestingly, the greater proportion of pectins is in different fractions depending on the species. Thus, WSF, CSF and NSF are the majority fraction in *B. berteroana*, *C. mucronata* and *P. punctata*, respectively (Table II. III). In terms of NS content, values are markedly lower in all species and stages with respect to UA values. Among different fractions, WSF exhibited the greater NS values: it represents 70% and 50% for *B. berteroana* and *C. mucronata*, respectively. During fruit development, an increase in NS content can be observed in *P. punctata* and *B. berteroana* in the CSF fraction, and in *C. mucronata* and *B. berteroana* in the WSF fraction (Table II. III). These data suggested that the solubilisation of pectic polymers increase during fruit development and differences in the pectin metabolism could be specific to each species, both events widely reported for many fruits (Ruiz-May and Rose, 2013). In this sense, *C. mucronata* presented the highest level of total UA in relation to AIR in the two developmental stages (for I and II, a 63% and 71%, respectively). In contrast, to the observed in this species, *P. punctata* and *B. berteroana* showed lower UA levels in stage I and II: 16% and 31%; 3% and 10%, respectively. Thus, differences in pectin contents were observed between species, suggesting that *P. punctata* and *B. berteroana* might have a higher proportion of hemicellulosic polymers in comparison to *C. mucronata*.

Table II. III. Cell wall material (AIR), lignin content, and content of uronic acids (UA) and neutral sugars (NS) in water-soluble (WSF), CDTA-soluble (CSF) and Na₂CO₃-soluble (NSF) fractions of *C. mucronata*, *P. punctata* and *B. berteroana* fruits in two developmental stages.

Species	Cell wall material (AIR, mg g ⁻¹ FW)	Lignin (μg g ⁻¹ FW)	Cell wall fractions (μg mg ⁻¹ AIR)					
			WSF		CSF		NSF	
			UA	NS	UA	NS	UA	NS
<i>C. mucronata</i> (I)	151,5±9,5 a	45±0,3 a	383,3±20,2 a	3,4±0,7 b	124,9±7,2 b	32,2±3,1 a	116,6±9,8 b	3,6±0,8 a
<i>C. mucronata</i> (II)	171,6±3,6 a	36±0,5 b	154,61±11,6 b	27,6±1,8 a	319,1±25,9 a	8,9±1,1 b	237±15 a	2,7 ±1 a
<i>P. punctata</i> (I)	270,7±7,7 a	53±0,2 a	62,4±3,7 a	3,9±0,5 a	30,3±2,9 b	1,4±0,1 b	64,2±0,8 b	2±0,4 b
<i>P. punctata</i> (II)	167,8±0,9 b	21±0,4 b	71,8±4,7 b	4,8±0,9 a	81,9±5,4 a	3,2±0,4 a	157,1±14,1 a	4,8±0,7 a
<i>B. berteroana</i> (I)	247,1±3,5 a	24±0,3 b	7,2±2,6 b	0,5±0,3 b	8,8±3,2 b	3,1±1 b	16,3±9 a	11,8±1,9 a
<i>B. berteroana</i> (II)	207,9±3,3 b	31±0,10 a	66,2±2,9 a	23,8±1,7 a	19,7±2,1 a	7,3±0,4 a	15,5±2,9 a	17±2 a

Data indicate the mean of three replicates ± S.D. Different letters indicate significant differences between developmental stages in each species (P ≤ 0.05).

II.4.3. Analysis of total phenolic content (TPC) and antioxidant capacity (AOX).

The analysis of TPC, AOX and antimicrobial assays was performed in fruits at stage II, since these fruits, when ripen, could accumulate bioactive compounds as most studied (Kanellis and Manganaris, 2014). The results of TPC and AOX showed significant differences between species. The greatest values of TPC and AOX were detected in *P. punctata* fruits where as that the lowest value of AOX were observed in *C. mucronata* fruits (Table II. IV). These results suggest that other phytochemicals rather than anthocyanins can be related with the higher TPC and AOX founded in *P. punctata* fruit since this fruit has a light yellow color (chroma 43.9 and h° 101.2) at stage II (Table II. II). It has been reported that in Citrus crops, which belong to the same botanical family that *P.punctata*, several biocompounds such as flavanones and triterpenoid acids can contribute to a significant antioxidant capacity (Yu *et al.*, 2005). In addition, the TPC values exhibited by *P. punctata* fruits are comparatively higher than those found in the worldwide known berries grown in Chile such as raspberry cv. Heritage (300 mg GAE 100 g-1 FW), blueberry cv. Brigitta (610 mg GAE 100 g-1 FW) and strawberry cv. Camarosa (630 mg GAE 100 g-1 FW) [36], and in the native calafate berry (870 mg GAE 100 g-1 FW) [37], being overcome by maqui berry which TPC values have been reported in 1460 mg GAE 100 g-1 FW (Ruiz *et al.*, 2010). On the other hand, the antioxidant capacity observed for *C. mucronata* fruit is similar to those reported for maqui berry (0.152 mmol Fe²⁺ g-1 FW) also measured by means of FRAP assay (Ruiz *et al.*, 2010).

Table II. IV. Total phenolic content (TPC) and antioxidant capacity by FRAP method of *C. mucronata*, *P. punctata* and *B.berteroana* fruits at developmental stage II.

Species	TPC(mg GAE 100 g ⁻¹ FW)	FRAP(mM FeSO ₄ g ⁻¹ FW)
<i>C. mucronata</i>	742± 56.0 ^b	0,711±0,001 ^C
<i>P. punctata</i>	942± 64,2 ^a	2,512±0,09 ^A
<i>B. berteroana</i>	724± 60.7 ^B	1,658±0,12 ^B

Data indicate the mean of three replicates ± S.D. Different letters indicate significant differences between species (P≤ 0.05).

II.4.4. Determination of antibacterial activity of fruit extracts.

The results of antibacterial activity on various bacterial species are shown in Table II. V. Additionally, the MIC for methanol was evaluated being this 50% v/v. The result indicated that most of methanol extracts obtained from fruits samples showed a MIC >12.5% (v/v). The only extract that presented the lowest MIC was from *P. punctata* against *P. aeruginosa* (6,25 % (v/v)). When MBC was determined for this extract a value >12.5% (v/v) was obtained, indicating that the extract from *P. punctata* against *P. aeruginosa* has a bacteriostatic behaviour. *P. aeruginosa* presents high resistant levels to antibiotics and compounds from plants or fungal produced antibiotics (Adwan *et al.*, 2010; Sharifi-Rad *et al.*, 2015; Mota *et al.*, 2015). The high resistance that present this bacterium is apparently by the result of a particular waterproofing membrane and the presence of efflux mechanisms (Mayaud *et al.*, 2008; Tyagi and Malik, 2011). Further more, it has been reported that the low activity of lipophilic compounds from plants may be due to multidrug pumps expulsion, including ABC transporters type (active transport) that remove antibiotics and other harmful lipophilic substances (Mulyaningsih *et al.*, 2011). In this sense, it could be interesting to deepen into the mechanisms of the bacteriostatic effect of *P. punctata* fruit extract, since these results are hopeful if we compared with others plants extracts.

Table II. V. Minimum Inhibitory Concentration (% v/v) of extracts of *C. mucronata*, *P. punctata* and *B. berteroana* fruits at developmental stage II against American Type Culture Collection (ATCC) bacterial strain

Bacterial strain		<i>P. punctata</i>	<i>C. mucronata</i>	<i>B. berteroana</i>
<i>Gram negative</i>				
- <i>A. baumannii</i>	ATCC 19606	>12,5	>12,5	>12,5
- <i>E. cloacae</i>	ATCC E705	>12,5	>12,5	>12,5
- <i>E. coli</i>	ATCC 25922	>12,5	>12,5	>12,5
- <i>E. coli</i>	ATCC 35218	>12,5	>12,5	>12,5
- <i>K. pneumoniae</i>	ATCC BAA-1706	>12,5	>12,5	>12,5
- <i>K. pneumoniae</i>	ATCC BAA-1705	>12,5	>12,5	>12,5
- <i>K. pneumoniae</i>	ATCC 700603	>12,5	>12,5	>12,5
- <i>P. aeruginosa</i>	ATCC 27853	6,25	>12,5	>12,5
<i>Gram positive</i>				
+ <i>S. aureus</i>	ATCC 29213	>12,5	>12,5	>12,5
+ <i>S. aureus</i>	ATCC 25923	>12,5	>12,5	>12,5
+ <i>E. faecalis</i>	ATCC 29212	>12,5	>12,5	>12,5
Methanol		< 25% v/v for all strain		

II.5. Conclusion.

The present research is a first approach to the characterization of the physiochemical and antibacterial properties of the fruits of *Citronella mucronata*, *Pitavia punctata* and *Beilschmedia berteriana*, three endemic and threatened trees of south-central Chile. Interestingly, this study provides indications as harvest indexes for possible use of these fruits associating physiological properties to fruit developmental stages. Specifically, it was possible to associate the highest pectin content observed at stage II of *C. mucronata* fruit with purplish color (i.e, color parameters of $L^*=22.2$; $a^*=1.7$; $b^*=1.8$) and SSC value (8.1 °Brix). These indexes could be good indicators to select fruits at that stage. Likewise, *P. punctata* fruits at stage II, with a yellowish color (i.e., $L^*=62.7$; $a^*=-9.4$; $b^*=43.3$) and 6.5 °Brix, present a high phenolic content and antioxidant capacity, which can be related with interesting antimicrobial properties of the fruit extract against the opportunistic human pathogen *Pseudomonas aeruginosa*.

The importance of this study lies on the identification of harvest indexes for two types of fruits with promising features of interest to the food and pharmaceutical industries. Finally, the challenge is to produce these interesting non-timber forest products under a proper sustainable management.

Acknowledgements. This research was supported by the CONAF/Fondo de Investigación del Bosque Nativo 064/2011 project. C.R.F. acknowledges to the CONICYT, PIA/ACT-1110 project for acquisition of the texture analyzer CT3 (Brookfield) and colorimeter CR-400 (Konica Minolta).

II.6. References.

- Adwan, G.; Abu-Shanab, B.; Adwan, K. 2010. Antibacterial activities of some plant extracts alone and in combination with different antimicrobials against multidrugresistant *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*; 3, 266-269.
- Ageorges, A.; Cheynier, V.; Terrier, N. 2014. Polyphenols. In *Fruit ripening: physiology, signalling and genomics*; Nath, P., Bouzayen, M., Mattoo, A.K., Pech, J.-C., Eds.; CAB International: Oxfordshire, UK; 151-177.
- Armesto, J. J.; Rozzi, R.; Smith-Ramírez, C.; Arroyo, M.T.K. 1998. Conservation targets in South American temperate forests. *Science*; 282, 1271-1272.
- Benzie, I. F.; Strain, J. J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*; 239, 70-76.
- Blumenkrantz, N.; Asboe-Hansen, G. 1973. New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry*; 54, 484-489.
- Brackenbury, T. 1999. The molluscicidal properties of *Apodytes dimidiata* (Icacinaceae): geographical variation in molluscicidal potency. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*; 93, 511-518.
- Campbell, M.; Ellis, B. 1992. Fungal elicitor-mediated responses in pine cell cultures. *Plant*; 186, 409-417.
- Celik H., Özgen M., Serce S., Kaya C., Phytochemical accumulation and antioxidant capacity at four maturity stages of cranberry fruit. *Sci. Hortic.* 117 (2008) 345-348.
- Cherian S., Figueroa C.R., Nair H., 'Movers and shakers' in the regulation of fruit ripening: a cross-dissection of climacteric versus non-climacteric fruit, *J. Exp. Bot.* 65 (2014) 4705-4722.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 1992. *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically (CLSI document M07-A9)*; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, Pennsylvania, USA; 88 pp.
- Esterhuizen, L. L.; Meyer, R.; Dubery I. A. 2006. Antimicrobial compounds from *Coleonema album* (*Rutaceae*). *Zeitschrift fur Natur for schung C*; 61, 489-498.

- Figuerola, C.R.; Opazo, M.; Vera, P.; Arriagada, O.; Díaz, M.; Moya-León, M. 2012. Effect of postharvest treatment of calcium and auxin on cell wall composition and expression of cell wall-modifying genes in the Chilean strawberry (*Fragaria chiloensis*) fruit. *Food Chemistry*; 132, 2014-2022.
- Fredes, C.; Montenegro, G.; Zoffoli, J. P.; Gómez, M.; Robert, P. 2012. Polyphenol content and antioxidant activity of maqui (*Aristotelia chilensis* Molina Stuntz) during fruit development and maturation in Central Chile. *Chilean Journal of Agricultural Research*; 72, 582-589.
- Fredes, C.; Montenegro, G.; Zoffoli, J.P.; Santander, F.; Robert, P. 2014. Comparison of the total phenolic content, total anthocyanin content and antioxidant activity of polyphenol - rich fruits grown in Chile. *Ciencia e Investigación Agraria*; 41,49-60.
- Fuentes L., Valdenegro M., Gómez M.G., Ayala-Raso A., Quiroga E., Martínez J.P., Vinet R., Caballero E., Figuerola C.R., Characterization of fruit development and potential health benefits of arrayan (*Luma apiculata*), a native berry of South America, *Food Chem.* 196 (2016) 1239-1247.
- Guedes M.N.S., Abreu C.M.P., Maro L.A.C., Pio R., Abreu J.R., Oliveira J.O., Chemical characterization and mineral levels in the fruits of blackberry cultivars grown in a tropical climate at an elevation. *Acta Sci.-Agron.* 35 (2013) 191-196.
- Hechenleitner, P.; Gardner, M.F.; Thomas, P.I.; Echeverría, C.; Escobar, B.; Brownless, P.; Martínez, C. 2005. *Plantas Amenazadas del Centro-Sur de Chile. Distribución, Conservación y Propagación*; Universidad Austral de Chile y RealJardín Botánico de Edimburgo: Valdivia, Chile; 188 pp.
- Kanellis, A. K.; Manganaris, G. A. 2014. Antioxidants and bioactive compounds in fruits. In *Fruit ripening: physiology, signalling and genomics*; Nath, P., Bouzayen, M., Mattoo, A.K., Pech, J.-C., Eds.; CAB International: Oxfordshire, UK; 99-126.
- Lichtenthaler, H. K.; Wellburn, A. R. 1983. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvent. *Biochemical Society Transactions*; 11, 591-593.
- Mariangel, E.; Reyes-Diaz, M.; Lobos, W.; Bensch, E.; Schalchli, H.; Ibarra, P. 2013. The antioxidant properties of calafate (*Berberis microphylla*) fruits from four different locations in southern Chile. *Ciencia e Investigación Agraria*; 40, 161-170.

- Mayaud, L.; Carricajo, A.; Zhiri, A.; Aubert G. 2008. Comparison of bacteriostatic and bactericidal activity of 13 essential oils against strains with varying sensitivity to antibiotics. *Letters in Applied Microbiology*; 47, 167-173.
- Mota, A. S.; Martins, M. R.; Arantes, S.; Lopes, V.R.; Bettencourt, E.; Pombal, S.;Gomes, A.C.; Silva, L.A. 2015. Antimicrobial activity and chemical composition of the essential oils of Portuguese *Foeniculum vulgare* fruits. *Natural Product Communications*; 10, 673-676.
- Mulyaningsih, S.; Sporer, F.; Reichling, J.; Wink, M. 2011. Antibacterial activity of essential oils from *Eucalyptus* and of selected components against multidrug resistant antibacterial pathogens. *Pharmaceutical Biology*; 49, 893-899.
- Myers, N.; Mittermeier, R.; Mittermeier, C.; Da Fonseca, G.; Kent J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*; 403, 853-858.
- Nepstad, D.C.; Schwartzman, S. 1992. Non-timber products from tropical forests: Evaluation of a conservation and development strategy. *Advances in Economic Botany*, vol. 9; The New York Botanical Garden: Bronx, New York; 164pp.
- Osorio, S.; Fernie, A.R. 2014. Fruit ripening: primary metabolism. In *Fruit ripening: physiology, signalling and genomics*; Nath, P., Bouzayen, M., Mattoo, A.K., Pech, J.-C., Eds.; CAB International: Oxfordshire, UK; 15-27.
- Pech, J.-C.; Bouzayen, M.; Latché, A. 2014. Cellular, metabolic and molecular aspects of chromoplast differentiation in ripening fruit. In *Fruit ripening: physiology, signalling and genomics*; Nath, P., Bouzayen, M., Mattoo, A.K., Pech, J.-C., Eds.; CAB International: Oxfordshire, UK; 28-47.
- Rodríguez, R.; Mattei, O.; Quezada, M. 1983. *Flora arbórea de Chile*; Editorial Universidad de Concepción: Concepción, Chile; 407 pp.
- Rubilar, M.; Pinelo, M.; Ihl, M.; Scheuermann, E.; Sineiro, J.; Nuñez, M. 2006. Murta leaves (*Ugni molinae* Turcz) as a source of antioxidant polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 54, 59-64.
- Ruiz, A.; Hermosín-Gutiérrez, I.; Mardones, C.; Vergara, C.; Herlitz, E.; Vega, M.; Dorau, C.; Winterhalter, P.; von Baer, D. 2010. Polyphenols and antioxidant activity of calafate (*Berberis microphylla*) fruits and other native berries from Southern Chile. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 58, 6081–6089.

- Ruiz-May, E.; Rose, J.K.C. 2013. Cell wall architecture and metabolism in ripening fruit and the complex relationship with softening, in *The molecular biology and biochemistry of fruit ripening*; Seymour, G.B., Poole, M., Giovannoni, J.J., Tucker, G.A., Eds.; Wiley-Blackwell: Oxford, UK; 163-187.
- Selvendran, R.R.; O'Neill, M.A. 1987. Isolation and analysis of cell walls from plant material, in *Methods of Biochemical Analysis, Volume 32*; Glick, D., Ed.; JohnWiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA; 25-153.
- Sharifi-Rad, J.; Hoseini-Alfatemi, S.M.; Sharifi-Rad, M.; Sharifi-Rad, M.; Iriti, M.; Sharifi-Rad, M.; Sharifi-Rad, R.; Raeisi, S. 2015. Phytochemical compositions and biological activities of essential oil from *Xanthium strumarium* L. *Molecules*; ,20, 7034-7047.
- Silva, M.; Cruz, M.A.; Sammes, P.G. 1971. Some constituents of *Pitavia punctata*. *Phytochemistry*; 10, 3255-3258.
- Singleton, V.L.; Rossi, J.A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*; 16, 144-158.
- Suwalsky, M.; Orellana, P.; Avello, M.; Villena, F. 2007. Protective effect of *Ugni molinae* Turcz against oxidative damage of human erythrocytes. *Food and Chemical Toxicology*; 45, 130-135.
- Tyagi, A., Malik A. 2011. Antimicrobial potential and chemical composition of *Eucalyptus globulus* oil in liquid and vapour phase against food spoil agemicro organisms. *Food Chemistry*; 126, 228-235.
- Waldron, K.W., Parker, M.L., Smith, A.C. 2003. Plant cell walls and food quality. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*; 2, 101-119.
- Wang S.Y., Chen C-T., Wang C.Y., The influence of light and maturity on fruit quality and flavonoid content of red raspberries. *Food Chem.* 112 (2009) 676-684.
- Willats, W.G.T., Knox, J.P., Mikkelsen J.D. 2006. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. *Trends in Food Science & Technology*; 17, 97-104.
- Yam, K.L.; Papadakis, S.E. 2004. A simple digital imaging method for measuring and analyzing color of food surfaces. *Journal of Food Engineering*; 61, 137-142.
- Yemm, E.W.; Willis, A.J. 1954. The estimation of carbohydrates in plant extracts byanthrone. *Biochemical Journal*; 57, 508-514.

Yu, J.; Wang, L.; Walzem, R.L.; Miller, E.G.; Pike, L.M.; Patil, B.S. 2005. Antioxidant activity of citrus limonoids, flavonoids, and coumarins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 53, 2009–2014.



DISCUSIÓN GENERAL

1. Evaluación del proceso de maduración de los frutos de especies nativas.

Durante el proceso de maduración de las especies se observó un cambio en las características físicas de los frutos, por ejemplo desde el estadio V al estadio M se observó un aumento el diámetro y peso de todos los frutos. Los frutos con mayor calibre en forma decreciente en su estadio maduro fueron *B. berteroana*, *P. punctata* y *P. andina*, no obstante los dos primeros presentan un endocarpo pétreo que constituye un 60-70% del fruto. Por otra parte, los frutos que presentan mayores cambios en relación a su peso y diámetro durante la maduración son *L. apiculata* y *P. andina* con un aumento de un 40% y 36% respectivamente durante la maduración. En relación a la CSS, los valores más altos fueron observados en *P. andina* seguidos por *L. apiculata* y *C. mucronata*, de manera opuesta *P. andina* presentó los valores más bajos de pH mientras que los más básicos fueron observados en los frutos maduros de *C. mucronata*.

Otra de las manifestaciones de la maduración de frutos es el cambio de color, variable que es comúnmente utilizada como índice de cosecha del fruto. El cambio de color se presenta por degradación de la clorofila y síntesis de otros pigmentos como carotenoides y antocianinas (Mercado-Silva *et al.*, 1998). Según análisis de los parámetros CIELAB, todos los frutos pasan de diferentes tonalidades de verde en su estado inmaduro (en promedio $L^* = 50$, $a^* = -17$, $b^* = 30$) a tonalidades de amarillo verdoso en *P. andina* y pitao, con valores de $L^* = 62$ y 45 y $a^* = -16$ y -11 respectivamente, verde azulado en el caso de belloto ($L^* = 45$, $a^* = -16$) y morado oscuro para los frutos maduros de rrayan y naranjillo ($L^* = 20$ y 22 , $a^* = 1.5$ y 1.6 respectivamente). Bajo este análisis se observó que los frutos de *L. apiculata* y *C. mucronata* muestran las mayores diferencias en relación al parámetro hue, presentando una reducción del 300% y 150% respectivamente desde el estadio V al estadio M. Dicho parámetro es un buen indicador del estado de maduración que se puede correlacionar con otras variables de calidad del fruto, como sólidos solubles totales y el índice de madurez. El color medido como ángulo Hue ($^{\circ}H$) representa el color o tonalidad, que varía de 0 o color rojo puro a 180 o color verde puro (Hernandez *et al.*, 2007). Dicho parámetro está relacionado directamente con la

degradación de la clorofila *a* y *b* como se observa en los frutos de *C. mucronata* y *P. punctata* en la tabla II.II.

2. Pérdida de componentes de la pared celular.

Durante el crecimiento de los frutos de las especies bajo análisis, la concentración de RIA y lignina, y el contenido de pectinas disminuyen como consecuencia del crecimiento celular, generando una constante pérdida de la firmeza desde el estadio V al M. En este contexto los frutos más blandos en su estado maduro fueron los de *L. apiculata* y *B. berteroana* con 0,7 y 0,62 N, respectivamente. Por otra parte, los frutos de *P. punctata* presentaron valores de firmeza muy altos (cerca de 11,3 N). Estos resultados a su vez se relacionaron con las variaciones de las diferentes fracciones analizadas, las cuales mostraron un aumento de la fracción con pectinas de interacción más lábil durante la maduración y una reducción en las pectinas de interacción covalente producto de la dinámica de la pared celular.

En el caso de FSA, con excepción *C. mucronata*, todos los frutos presentaron una disminución en la concentración de AU, mientras que en relación a los AN, todos los frutos presentaron un incremento para dicha fracción, lo que sugiere una solubilización de las pectinas de interacción más débil y sus ramificaciones. Similarmente, en FSC se observa que la concentración tanto de AU y AN aumenta durante el desarrollo de los frutos. En contraposición los frutos de *C. mucronata* mostraron resultados opuestos al resto de los frutos en relación a la concentración de AN. En relación a la concentración de AU y AN de la FSN, indicó una disminución durante la maduración en todos los frutos, salvo *P. punctata* el cual particularmente evidenció un incremento en ambos contenidos. La disminución en el contenido de pectinas se origina por una solubilización y depolimerización de pectinas de acción covalente e iónicas, aumentando de manera concomitante el contenido de los poliuronidos de la FSA, este fenómeno está estrechamente ligado con la firmeza que registra cada especie estudiada (Vicente *et al.*, 2007). Estos resultados se corroboran con los análisis de diámetro de partícula y masa molar que evidencian estos cambios principalmente en el estadio M de los frutos de *L. apiculata* y *P. andina*.

En el caso de los frutos de *C. mucronata*, *P. punctata* y *B. berteroana* se observa una disminución importante en la firmeza, lo que podría estar relacionado con la menor relación del cociente de AN/AU ($<0,5$) en FSA (datos no mostrados), indicando un menor grado de ramificación que lo observado en *L. apiculata* y *P. andina* (>1). En relación a los valores de firmeza registrados en pitao, estos pueden estar influenciados por los componentes hemicelulósicos, que no fueron evaluados para este fruto en el presente estudio. En esta misma línea, los valores de hemicelulosas (FSK) reportados para *P. andina* y *L. apiculata*, presentaron una concentración de AN baja en relación a los resultados en la FSA, FSC y FSN para el mismo parámetro, por lo cual es posible que estos no influyan en la pérdida de la firmeza de los frutos bajo estudio.

3. Contenido de fenoles (TPC), capacidad antioxidante (AOX) y potencial antimicrobiano.

Los mayores valores de TPC y AOX fueron observados en *P. punctata*, de manera similar los frutos de la especie presentaron potencial antimicrobiano, con características antagonistas sobre *P. aeruginosa* (6,25 % (v/v)), es posible que exista relación entre estos parámetros y la acumulación de antocianinas del fruto durante la maduración. De similar manera los frutos de *L. apiculata* presentaron altos valores en el contenido de fenoles (TPC= 85,33 g GA/100g) y capacidad antioxidante (23,8 mM FeSO₄) (Fuentes *et al.* 2016). Los resultados indican que las especies estudiadas son comparables a frutos comerciales como el arándano, la fresa, calafate y algunos cítricos. De manera similar los frutos de *L. apiculata* presentaron capacidades interesantes contra organismos que generan enfermedades cutáneas como (*S. aureus*). Adicionalmente los frutos de *L. apiculata* demostraron ser eficientes en el control de bacterias patógenas comúnmente encontradas en alimentos listos para el consumo (*L. monocytogenes*). Estos resultados abren la posibilidad de usar los extractos de estos frutos para la formulación de productos farmacéuticos (Figuerola *et al.*, 2013).

CONCLUSIONES GENERALES

Si bien los frutos de las especies nativas y endémicas han sido utilizados previamente por las culturas indígenas de Chile, este primer reporte en profundidad de la maduración, especialmente cómo evolucionan los componentes de la pared celular, indica el alto potencial de estos frutos para su mejoramiento y comercialización como PFNM a países extranjeros.

Mediante aproximaciones morfológicas y fisicoquímicas se logró caracterizar tres estadios de maduración en los frutos de *L. apiculata* y *P. andina*, mientras que dos estadios de desarrollo se caracterizaron para los frutos de *C. mucronata*, *P. punctata* y *B. berteriana*. Específicamente, los frutos de *L. apiculata* presentaron características organolépticas de interés (calibre y sólidos solubles) similares a otros frutos comerciales como murta o guayaba lo que lo convierte en una especie de interés comercial. Por su parte *P. andina* a pesar de ser un pseudo fruto presenta características de tamaño, CSS y AT similares a lo reportado en uva de mesa y cereza, y un pH similar a lo reportado en frutos de naranja (3.40 ± 0.18 (cv. Valencia) and 3.77 ± 0.31 (cv. Navelina) (Hours *et al.*, 2005), lo que contribuye a su característico sabor. Estos atributos complementados con la viscosidad de los frutos de *P. andina* pueden potenciar a estos frutos como fuente para productos elaborados. Por otra parte, los frutos de *P. punctata* muestran altos valores en su actividad antioxidante y antimicrobiana (contra *Pseudomonas aeruginosa*).

Las evidencias obtenidas en esta investigación, referentes a la evolución en los parámetros de calidad de maduración, afirman que en general todos los frutos analizados presentan una pérdida de firmeza y lignina, junto a la pérdida en el contenido de pared celular. Esto último, está ligado a las modificaciones que sufre la pared celular producto de la constante solubilización y a la despolimerización de pectinas y sus ramificaciones, además de los componentes hemicelulósicos de la pared celular durante la maduración de los frutos. Se determinó que los cambios que se producen en la fracción péctica tienen relación en los cambios observados en la firmeza de los frutos bajo estudio durante el proceso de madurez. Estos antecedentes toman gran relevancia por sus posibles implicancias en la selección de estrategias de manejo postcosecha para estos frutos.

Finalmente, el estudio de las características organolépticas de los frutos de especies nativas (en especial de su estadio maduro) nos permiten conocer su potencial agroalimentario, además de promover futuras investigaciones en la elaboración productos elaborados a partir de estos frutos que promuevan el manejo sustentable de los PFNM en Chile.



BIBLIOGRAFIA GENERAL.

- Abbott, A.J., Affeldt, H.A., Liljedahl, L.A. 1992. Firmness measurement of stored “Delicious” apples by sensory methods, Magness-Taylor, and sonic transmission. *Journal. America Society Hortology. Science.* 117:590-595.
- Ahrabi, S.F., Madsen, G., Dyrstad, K., Sande, S. A., y Graffner, C. 2000. Development of pectin matrix tablets for colonic delivery model drug ropivacaine. *European Journal of Pharmaceutical Science*, 10: 43–52.
- Behall, K., &Reiser, S. 1986. Effects of pectin on human metabolism. In M. L. Fishman & J. J. Ren (Eds.), *Chemistry and functions of pectins*. Washington, DC: American Chemical Society. 248–265.
- Benoit, I. 1989. Red book on Chilean terrestrial flora. Corporación Nacional Forestal (CONAF), Santiago. 151 p.
- Brown, L., Rosner, B., Willett, W. W., y Sacks, F. M. 1999. Cholesterol lowering effects of dietary fiber: A meta-analysis. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 69: 30–42.
- Brummell, D.A., Harpster, M.H. 2001. Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Molecular Biology*. 47: 311-340.
- CONAMA, 2003. Estrategia Nacional de la Biodiversidad. Para un análisis de la presión de los sistemas urbanos sobre la biodiversidad en varias ciudades de Chile. CONAMA, Chile. 19 pp.
- FAO, 2001. Global Forest Resources Assessment 2000. Food and Agricultural Organisation of the United Nations (FAO), Rome.
- Figuroa. C., Ríos. D., Fuentes. L., Valdenegro M., Martínez. J., Franco. W., Vinet. R., Sáez. F., Araya. A y Paredes. K. Informe final proyecto CONAF 064/2011: Caracterización del potencial saludable y agroalimentario de frutos de especies arbóreas nativas de la zona centro sur del país. Universidad de Concepción. Chile.
- Fuentes. L, Valdenegro. M, Gómez. M, Ayala-Raso. A, Quiroga. E, Martínez. J, Vinet. R, Caballero. E, Figuroa. C. 2016. Characterization of fruit development and potential health benefits of arrayan (*Luma apiculata*), a native berry of South America, *Food Chemistry*, Volume 196, 1 April 2016, Pages 1239-1247, ISSN 0308-8146, <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.003>.

- Giovannoni, J. J. 2001. Molecular biology of fruit maturation and ripening. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52: 725-749.
- Giovannoni, J.J. 2004. Genetic regulation of fruit development and ripening. *Plant Cell* 16: S170-S180.
- Hechenleitner, V., Gardner, M.F., Thomas, P.I., Echeverría, C., Escobar, B., Brownless, P., Martínez, C. 2005. Plantas amenazadas del centro-sur de Chile. Distribución, Conservación y Propagación. Primera Edición. Universidad Austral de Chile y Real Jardín Botánico de Edimburgo. 188 pp.
- Hernandez M. S.; Martinez O.; Fernandez-Trujillo J. P. 2007. Behavior of Araza (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh) fruit quality traits during growth, development and ripening. *Sci. Hort.* 111: 220-227.
- Hours, R. A., Ferreyra, M. M., Schwab, M. D. C., Gerard, L. M., Zapata, L. M., & Davies, C. V. 2005. Caracterización fisicoquímica y microbiológica de jugos de naranja destinados a vinificación. *Ciencia, Docencia y tecnología*, 31, 219-239.
- INFOR. 2010. Exportación de productos forestales no madereros, Boletines 1, 2, 3, 4 y 5. Santiago, Chile. 109 p.
- Li X, Xu C, Korban S, Chen K. 2010. Regulatory mechanisms of textural changes in ripening fruits. *CRC. Cr. Rev. Plan. Sci.* 29: 222-243.
- Martínez Tomé, M., García Carmona F., y Murcia M. A. 2001. Comparison of the antioxidant and prooxidant activity of broccoli aminoacids with those of common food additives. *J. Sci. Food Agric.* 81: 1019-1026.
- Mercado-Silva E.; Bautista P.; Garcia-Velasco M. 1998. Fruit development, harvest index and ripening changes of guavas produced in Central Mexico. *Postharvest Biol. Technol.* 13: 143-150.
- Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., da Fonseca, G.A.B., Kent, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 43: 853-858.
- Nepstad, D. and Schwartzman, S. 1992. Non-timber forest products from tropical forests. Evaluation a conservation and development strategy. *Advances in Economic Botany* 9. The New York Botanical Garden, New York

- Perez-Almeida, I., y Carpita, N. C. 2006. Las *B-galactosidas* y la dinámica de la pared celular. Caracas, Venezuela. *Interciencia* 31 (7): 476-483.
- Ranwala, A.P., Suematsu, C., Masuda, H. 1992. The role of *B-galactosidas* en the modification of cell wall components during musk melon fruit reopening. *Plant Physiology* 100: 1318-1325.
- Redgwell, R.J., Mac Rae, E.A., Hallett, I., Fischer, M., Perry, J., Harker, R. 1997. In vivo and in vitro swelling of cell walls during fruit ripening. *Planta* 203: 162-173.
- Ros-Tonen MAF, Wiersum K F. 2005. The scope of improving rural livelihoods through Non-Timber Forest Products: An evolving research agenda. *Forests, Trees and Livelihoods*, 15(2):129-148.
- Seguel, I. 2008. Bancos de germoplasma nativo. En: Biodiversidad de Chile. Patrimonio y desafíos, Comisión Nacional del Medio Ambiente (CONAMA), 2ª Edición, Santiago, Chile, Ocho Libros Editores, pp. 572-579.
- Somerville, C., Bauer, S., Brininstool, G., Facette, M., Hamann, T., Milne, J., Osborne, E., Paredez, A., Persson, S., Raab, T., Vorwerk, S., Youngs, H. 2004. Toward a systems approach to understanding plant cell walls. *Science* 306: 2206-2211.
- UICN. 2013. UICN Red list of Threatened species. . Gland, Suiza y Cambridge, Reino Unido. UICN. 33 p.
- Vicente, R., Ortugno, C., Powell, T., Greve, C., y Labavitch, M. 2007. Temporal sequence of cell wall disassembly events in developing fruits. 1. Analysis of raspberry (*Rubus idaeus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 4119-4124.
- Willats, W. G. T., Knox, J. P., & Mikkelsen, J. D. 2006. Pectin: New insights into an old polymer starting to gel. *Trends in Food Science and Technology*, 17, 97-104.
- World Bank, 2004. *Sustaining Forests: A Development Strategy*. The World Bank, Washington, D.C.
- Yamada, H. 1996. Contribution of pectins on health care. In J. Visser & A. G. J. Voragen (Eds.), *Pectins and pectinases* (pp. 173-190). Amsterdam: Elsevier.