UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Estudio de los cambios físicos y químicos de la gulupa (*Passiflora edulis* Sims fo. *edulis)* durante la maduración

Aleyda María Jiménez Thorrens

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Química.
Bogotá, Colombia
2010

Estudio de los cambios físicos y químicos de la gulupa (*Passiflora edulis* Sims fo. *edulis)* durante la maduración

Aleyda María Jiménez Thorrens

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

Director (a):
Dra. Coralia Osorio Roa

Línea de Investigación:
Estudio de aroma, color y características fisicoquímicas en frutas.
Grupo de Investigación:
Grupo de Aditivos Naturales de Aroma y Color (GANAC)

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencia, Departamento de Química
Bogotá, Colombia

2010

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mis sinceros agradecimientos:

Al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural y a la empresa OCATI S.A., por la financiación que permitió la realización de esta tesis.

A la Dra. Coralia Osorio por su dirección, por sus buenos consejos y por su continuo apoyo que me llevo a la realización de esta tesis, contribuyendo significativamente en mi formación personal y profesional.

A la Dra. Consuelo Díaz del ICTA por su colaboración en el préstamo del texturómetro.

Al Dr. Cesar Sierra por su continuo apoyo y el préstamo del UV-Vis.

A la Dra. Diana Sinuco por su orientación en el estudio de aroma.

A la Dra. Ivonne Nieto por sus buenos consejos y por el préstamo del CG-EM.

Al Dr. P. Schieberle y al Dr. M. Steinhause del DFA por recibirme en su instituto y colaborarme en mi investigación sobre el aroma.

Al Dr F. Heredia y a la Dra. L. Gonzales por su colaboración en el análisis de imagen para el estudio del color de la gulupa.

A mis compañeros de grupo GANAC por hacer más agradable el trabajo en el laboratorio.

A mis amigos Edwin Baquero, Diana Martínez, Doris Gutiérrez, Daniel Gallego, Lorena Torres, Laura Pardo, Lorena Novoa, Alex Silva, Fernando Barbosa y Kelly

Silva por regalarme tantos momentos especiales y agradables en este largo camino.

A mi familia que siempre me ha apoyado mis papitos y mi juanito que siempre han estado a mi lado apoyándome y soportándome, a mis hermanitos que alegran mi vida.

Y finalmente a todas aquellas personas que de una u otra forma me colaboraron en el desarrollo de este trabajo.

Resumen

Se estudiaron las características físicoquímicas de la gulupa en tres estados de madurez. El pH y los sólidos solubles totales incrementaron durante el proceso de maduración, mientras que la acidez titulable disminuyó. La textura se mantuvo constante. Se encontró cianidina-3-O-β-D-glucopiranosido como antocianina mayoritaria. Los cambios de color fueron estudiados por colorimetría triestímulo usando análisis de imagen. Se utilizó Análisis de componentes Principales (PCA) para el análisis de datos. Grupos de los datos fueron encontrados dependiendo del estado de maduración. Finalmente se encontraron 25 compuestos activos olfativamente reportados por primera vez en gulupa.

Palabras clave: maduración, gulupa, aroma, color, características fisicoquímicas.

Abstract

This study was undertaken to characterize the physicochemical properties of this fruit in three maturity stages. In all stages, the pH, °Brix, texture, and titratable acidity were determined. pH value and solid soluble content increased during ripening and titratable acidity decreased during this process; in contrast, texture values did not show significance variance. It was confirmed the presence of cyanidin-3-O-β-D-glucopyranoside as major anthocyanin. The changes on colour were followed by tristimulus colorimetry using image analysis, a very useful new approach for the measurement of non-homogeneous colours. By using PCA (Principal Component Analysis), clusters of data corresponding to each stage could be defined. 25 new odor active compounds were found for first time in gulupa pulp.

Keywords: ripening, gulupa, aroma, color, physicochemical characteristic.

LISTA DE ABREVIATURAS

CG: cromatografía de gases

CG-EM: cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

CG-O: cromatografía de gases acoplada a olfatometría

CG-FID: cromatografía de gases acoplado a detector fotométrico de llama

HS-MEFS: headspace microextracción en fase sólida

DES: Destilación por arrastre con vapor extracción simultánea con solvente orgánico

SAFE: Solvent Assisted Flavour Evaporation

HPLC-EM: High Performance Liquid Chromatography acoplado a Espectrometría de masas

ESI-MS: electrospray ionization-mass spectrometry

DAD: diode-array detector

d.i. : diámetro interno

AEDA: Aroma Extract Dilution Analysis

DTT: ditiotreitol

ERA: Extracto rico en antocianinas

CC: Cromatografia en columna

FID: detector de ionización de llama

UV-VIS: Ultravioleta-visible

TABLA DE CONTENIDO

Pág.

AGRADECIMIENTOS 1
LISTA DE ABREVIATURAS 5
1 INTRODUCCION 11
2 ESTADO ACTUAL DEL TEMA 13
2.1 Cambios físicos y químicos durante el proceso de maduración en frutas 13
2.2 Pigmentos en frutas 18
2.2.1 Clorofilas. 18
2.2.2 Carotenoides. 19
2.2.3 Betalainas. 19
2.2.4 Antocianinas. 19
2.3 Análisis de compuestos volátiles 24
2.4 Estudio de volátiles en Passiflora edulis 28
2.5 Descripción de la planta y la fruta 30
2.6 Análisis de componentes principales (ACP) 32
3 PARTE EXPERIMENTAL 33
3.1 Material Vegetal 33
3.2 Caracterización fisicoquímica 34
3.2.1 Acidez titulable y pH. 34
3.2.2 Sólidos solubles totales. 34
3.2.3 Textura. 35
3.2.4 Análisis de color. 35
3.3 Análisis de volátiles 35
3.4 Perfil Sensorial de la fruta 36
3.5 Análisis de los compuestos volátiles activos olfativamente en el aroma de la gulupa 37
3.5.1 Análisis preliminar. 37
3.5.2 Extracción de compuestos volátiles por SAFE. 37
3.5.3 Determinación de las zonas activas olfativamente. 37
3.5.4 Aroma Extract Dilution Analysis (AEDA). 38
3.5.5 Identificación de los compuestos volátiles activos olfativamente. 38
3.5.6 Fraccionamiento del extracto de volátiles obtenido por SAFE 39

3.5.6.1 Extracción selectiva de tioles. 39
3.5.6.2 Cromatografía en columna. 39
3.6 Análisis de los pigmentos presentes en la cáscara de la gulupa 41
3.6.1 Obtención del extracto. 41
3.6.2 Análisis por HPLC-EM. 41
3.6.3 Cuantificación de antocianinas monoméricas. 42
3.7. Análisis estadístico 43
4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN 44
4.1 Caracterización fisicoquímica 44
4.2 Análisis de color 44
4.3 Análisis de pigmentos 47
4.4 Análisis de Componentes Principales (ACP) 48
4.5 Análisis de volátiles 52
4.6 Análisis de aroma de gulupa 55
5 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 59
BIBLIOGRAFIA 61

INDICE DE FIGURAS

Pág.

Figura 1. Coordenadas de color CIE *L*a*b** y sus coordenadas polares *L*C*h.* 17
Figura 2. Estructura de antocianidinas comúnmente encontradas en la naturaleza.[19] 21
Figura 3. Efecto del pH sobre la estructura de las antocianinas. 21
Figura 4. Patrones de fragmentación de la antocianina acilada Cianidina-3-(di-sinápil-di-glucosa)-5-glucosa.[25] 24
Figura 5. Esquema del equipo para extracción del aroma asistida por solvente (SAFE).[29] 26
Figura 6. Foto del A) maracuyá morado (*Passiflora edulis* Sims) y B) gulupa (*Passiflora edulis* Sims fo *edulis*). 31
Figura 7. Representación de las coordenadas cromáticas de la cascara de gulupa en el diagrama *a*b** para las tres cosechas estudiadas (A Junio, B Agosto y C Octubre 2009), en los tres estadios de madurez. 46
Figura 8. Análisis de HPLC para el ERA obtenido a partir de cáscara de gulupa en estado maduro y espectro ESI-EM de cianidina-3-β-D-glucopiranósido. 48
Figura 9. Gráfica de Q y T^2 de Hotelling para gulupa en diferentes estados de madurez. 49
Figura 10. Análisis de componentes principales. A, datos organizados en el nuevo espacio de las componentes V (verde), P (pintón) y M (madura); ▲ (octubre), ■ (junio) y ● (agosto). B, distribución de las variables en el espacio de las nuevas componentes. 51

INDICE DE TABLAS

Pág.

Tabla 1. Caracterización fisicoquímica de gulupa (*Passiflora edulis* Sims. fo. *edulis*) 45
Tabla 2. Volátiles identificados por HS-MEFS en gulupa en tres diferentes estados de madurez (verde I, pintona II y madura III). 53
Tabla 3. Compuestos activos olfativamente en el aroma de la gulupa. 57

1 INTRODUCCION

La demanda alimenticia mundial ha impulsado la globalización de una amplia variedad de productos alimenticios como las frutas tropicales, que han entrado a mercados donde inicialmente eran totalmente desconocidas, generando una amplia aceptabilidad debido a su gran valor nutricional, ya que son especialmente ricas en vitaminas A, B y C, fibra, en calcio, hierro, potasio y magnesio[1] y a que exhiben nuevos sabores, colores y aromas[2]. Estas características sensoriales otorgan ventajas a estas frutas ya que uno de los criterios de decisión más importantes al momento de elegir un alimento es su flavour[a].

Colombia es considerado uno de los principales países productores de frutas tropicales a nivel mundial. Entre ellas sobresalen las que pertenecen al género *Passiflora,* el maracuyá amarillo (*Passiflora edulis* var. Flavicarpa), la granadilla (*Passiflora ligularis*), el maracuyá purpura (*Passiflora edulis* Sims) y la gulupa (*Passiflora edulis* Sims fo *edulis*), son muy apreciadas por sus propiedades organolépticas y han mostrado un crecimiento positivo en el mercado exportador de Colombia desde 1995. Las excelentes propiedades organolépticas de la gulupa han permitido el crecimiento de su popularidad en Europa, siendo los principales compradores los Países Bajos, Alemania, el Reino Unido y Bélgica con ventas cercanas a 5.400.000 USD en el 2008 que se incrementaron a los 6.500.000 USD en el 2009 y hasta junio de 2010 estaban alrededor de 5.500.000 USD.[3]

Sin embargo a pesar de la creciente demanda de exportaciones de frutales, aun no se cuenta con condiciones óptimas para su transporte y mantenimiento. Además se tienen problemas fitosanitarios que se acentúan al momento de utilizar empaques poliméricos que carecen de características fisicoquímicas que prevengan o retarden la generación de los síntomas de deterioro, lo que genera

[a] Flavour es un término que no tiene una palabra equivalente en el español y denota el conjunto de sensaciones percibidas en forma simultánea por los sentidos del gusto, el olfato y tacto cuando un alimento entra en la boca, debido a la cercanía de los receptores.

pérdidas considerables durante este proceso. En el caso de la gulupa, el tiempo de transporte es muy largo, aproximadamente de 29 a 31 días para llegar a los consumidores europeos, durante este tiempo se pierde un porcentaje alto de fruta (40 %) debido al proceso natural de maduración y deshidratación que genera un arrugamiento en la cáscara, característica que no es aceptable por los consumidores. Estos inconvenientes se han subsanado con la utilización de un empaque importado que previene los daños de los frutos por compresión, impacto, abrasión, contaminación o condiciones adversas y además retarda el proceso de maduración de la fruta; no obstante este empaque resulta muy costoso para los agricultores colombianos.

Es así como este trabajo se enmarca en el proyecto “Materiales poliméricos para la fabricación de un empaque apropiado para el manejo poscosecha de la gulupa (*Passiflora edulis* Sims. fo. *edulis*)” financiado por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural y la empresa OCATI S.A., con el objeto de conocer los cambios químicos y físicos que sufre el fruto durante su maduración en forma natural. Este conocimiento se aplicará al manejo poscosecha de la gulupa y al desarrollo de un empaque que preserve las características sensoriales y nutricionales.

2 ESTADO ACTUAL DEL TEMA

2.1 Cambios físicos y químicos durante el proceso de maduración en frutas

Existen varias definiciones del término madurez, quizá la más completa es en la cual definen la maduración como “el conjunto de cambios internos y externos, que un fruto experimenta cuando completa su crecimiento”[4]. Durante la maduración el fruto cambia la coloración del pericarpio (en la mayoría de las frutas), disminuye el contenido de almidón, aumenta la concentración de azúcares, se reduce el contenido de ácidos, hay pérdida de firmeza y suceden otros cambios físicos y químicos. Superada esta etapa, el fruto pierde firmeza, aumenta su sensibilidad a las condiciones del medio, pierde el control metabólico e inicia su senescencia.[4]

En la literatura se encuentran tres definiciones de madurez: madurez de consumo, madurez comercial o de recolección y madurez fisiológica. La madurez de consumo es el momento donde se alcanzan las mejores características organolépticas y la fruta es más adecuada para el consumo; la madurez comercial o de recolección es el momento en el que la fruta debe ser recolectada, en general es un periodo anterior a la madurez de consumo y la madurez fisiológica es el momento en que la fruta se encuentra en su máximo estado de crecimiento y desarrollo, y todas las partes especialmente las semillas, están formadas, maduras y aptas para la reproducción.[5]

El proceso de maduración es muy específico para cada especie y variedad y está ligado a las condiciones de producción de las frutas así como a la temperatura y al tiempo. Este depende también de si el fruto es o no climatérico. El climaterio de los frutos corresponde a un período de aumento significativo de la actividad respiratoria asociada al final del proceso de maduración. Este período de respiración climatérica es una fase de transición entre la maduración y la senescencia.[6] La velocidad de respiración de los frutos durante el proceso de maduración determinará si son frutos climatéricos o no climatéricos. Un fruto

climatérico (por ejemplo plátano, pera, manzana, mango, papaya, entre otros) permitirá ser cosechado y manipulado en estado pre-climatérico, para luego ser madurado durante su comercialización y trasporte, preservando sus características de calidad para el consumidor final; es decir, un fruto climatérico es aquel que es capaz de seguir madurando incluso después de haber sido recolectado. En contraste, los frutos no climatéricos, no presentan incremento de la velocidad respiratoria durante el proceso de maduración, sino que por el contrario, muestran una progresiva y lenta velocidad de respiración durante la senescencia debido a la invasión microbiana y fungosa que conduce a la descomposición del fruto. Algunos ejemplos de frutos no climatéricos son naranja, limón, cereza, uva, pepino, entre otros. Estos siguen madurando ligeramente una vez son separados de la planta.[7]

El aroma de las frutas presenta cambios durante el proceso de maduración debido a las diferentes rutas biogenéticas que se activan durante este proceso. Los compuestos volátiles de las frutas son metabolitos secundarios, los cuales se distinguen funcionalmente de los metabolitos primarios, como proteínas, carbohidratos y lípidos, en que no poseen ninguna función fisiológica directa. Los metabolitos secundarios con frecuencia se sintetizan a partir de metabolitos primarios. Todas las frutas comparten en gran medida los mismos compuestos volátiles. La mayoría de constituyentes volátiles de las frutas contienen cadenas de hidrocarburos alifáticos o sus derivados (ésteres, alcoholes, ácidos, aldehídos, cetonas y lactonas). Pero la diferencia de aroma radica en la cantidad de cada uno de ellos.

Determinando la estructura de los volátiles libres que se generan durante el proceso de maduración de las frutas es posible conocer cuales rutas biosinteticas se están activando. Es así como los ésteres, alcoholes, ácidos y cetonas de cadena alifática se derivan del metabolismo de los ácidos grasos. La mayoría de las frutas verdes, por ejemplo manzanas, plátanos y fresas, producen una gran variedad de ácidos grasos que se convierten en ésteres, cetonas y alcoholes

durante la maduración. La biosíntesis de alcoholes de cadena ramificada y ésteres en frutas y hortalizas es debida a la transformación enzimática de aminoácidos como la leucina, adicionalmente los compuestos aromáticos como el eugenol y el aldehído cinámico son provenientes de la ruta del ácido shikimico.[8]

Para determinar el estado de madurez de una fruta existen diferentes parámetros fisicoquímicos que pueden ser medidos, por ejemplo: textura, color, sólidos solubles totales, acidez titulable, pérdida de peso y contenido de volátiles libres. Estos parámetros se han utilizado en diferentes estudios para determinar las variables que pueden llegar a influir en el proceso de maduración de las frutas; por ejemplo, cambios en el empaque o material de recubrimiento del fruto[9], en el proceso de transporte, en las fechas de recolección o en el lugar de cultivo. Estos parámetros sufren cambios durante el proceso de maduración que pueden servir como indicativo de madurez.

En muchos casos a medida que la maduración transcurre se presenta un proceso de ablandamiento donde cambia la textura o firmeza del fruto debido a la degradación de carbohidratos poliméricos especialmente de la pectina y celulosa, que provocan que se debiliten las paredes celulares y las fuerzas cohesivas que mantienen las células unidas a las otras.[10] La medida de este parámetro se realiza usualmente por compresión dependiendo de las características físicas del fruto como la dureza de la cáscara y pulpa. Los equipos utilizados son texturómetros que disponen de sondas o émbolos bien definidos (con una referencia definida en cuanto a dimensiones y material con el que están construidos) y permiten registrar la resistencia de los alimentos a la compresión, al cizallamiento o, en general, a una combinación de fuerzas, dependiendo de la sonda utilizada[11]. En el caso de la gulupa que es una fruta con cascara fina y dura, es mejor una compresión completa que la utilización de penetrómetro debido a que con la maduración su cáscara se arruga tornándose flexible.

El color es quizá la característica más notoria en muchos alimentos durante su maduración y por ello es utilizado como criterio para definir madurez[12]. En los alimentos suele ser un parámetro muy importante para la selección de los consumidores por lo cual la industria alimenticia ha invertido mucho dinero en ofrecer colores que sugieran o se relacionen con el buen estado de los alimentos.

Para determinar los cambios de color es útil la comparación con tablas de colores; sin embargo, actualmente estas medidas se realizan con colorímetros, espectroradiómetros ó espectrofotómetros los cuales dan como resultado coordenadas cromáticas.

Existen varios modelos para el análisis objetivo del color; el más utilizado quizá es el modelo triestímulo *L*a*b*,* el cual es un modelo estándar internacional de medida, desarrollado por la CIE (Commission Internationale d'Eclairage en 1976). El modelo cuenta con una componente *L** de luminosidad con valores entre 0 (negro) y 100 (blanco); y otras dos componentes cromáticas con valores entre -120 y +120, *a** de verde a rojo y *b** de azul a amarillo respectivamente. Los valores correspondientes en coordenadas polares *L*C*h* son también muy utilizados para el análisis del color (Figura 1), este modelo numéricamente explica el color en términos de luminosidad, tonalidad (saturación) y color. El valor de *L** representa la luminosidad, al igual que en el espacio *L*a*b**, y comparten el mismo parámetro, *C** (Croma) es la saturación del color y *h* (hue) es el tono y se expresa en grados.

En el caso de sólidos donde el color no es homogéneo, la aplicabilidad de los instrumentos conocidos de medida del color está restringida. Por esto, se han desarrollado programas computacionales para medir el color, los cuales únicamente necesitan la toma de fotografías con una cámara de mínimo 2.1 magapixeles y una iluminación regular para luego transformar las imágenes en coordenadas de color. Este método de medida de color ya se ha utilizado para análisis de frutas, vegetales, carne, pimienta, maduración en quesos y granos,

entre otros, con resultados reproducibles y muy cercanos a la realidad debido a que se hace un análisis por pixeles que toma en cuenta el alimento completo.[13]

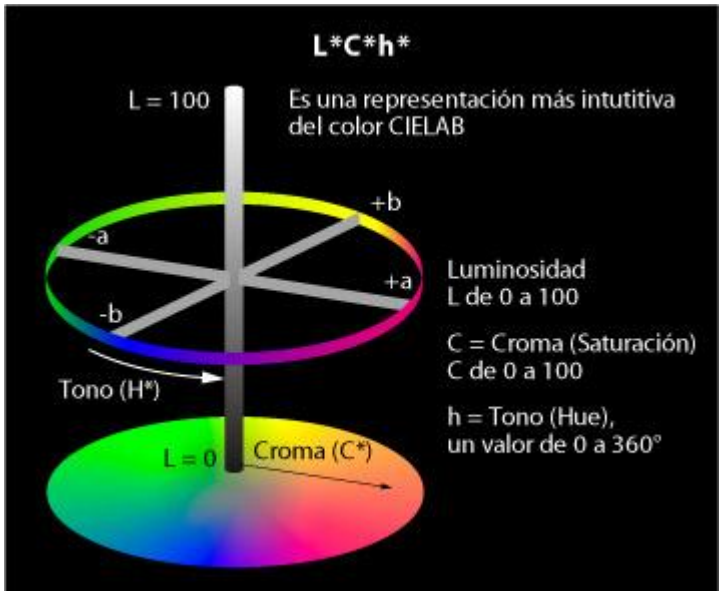


Figura 1. Coordenadas de color CIE *L*a*b** y sus coordenadas polares *L*C*h.*[14]

Otro de los aspectos que refleja el proceso de maduración de los frutos es el comportamiento de los sólidos solubles totales (SST) que están constituidos por azúcares disueltos en el jugo celular (entre el 80 y 95%). La acumulación de los azúcares se asocia con el desarrollo de la calidad óptima para el consumo de frutas. Estos pueden ser transportados al fruto por la savia, y también son aportados por el desdoblamiento de las reservas de almidón de los frutos. Los valores de este parámetro se expresan en grados Brix, los cuales relacionan la gravedad específica de una solución con la concentración equivalente de sacarosa pura. La concentración de los sólidos solubles en el jugo de una fruta puede ser medida por un refractómetro o un hidrómetro. Las medidas mencionadas se basan en la propiedad de los líquidos para detener o refractar un rayo de luz, proporcional a la concentración de los líquidos.[11]

La acidez total titulable (ATT) es un parámetro que generalmente disminuye en los frutos con la maduración, debido a que los ácidos orgánicos se usan durante la respiración, porque son componentes esenciales en el ciclo respiratorio de los ácidos tricarboxilicos. Los resultados de esta determinación se reportan con respecto al ácido que se encuentre en mayor proporción en la fruta. La concentración del ácido puede ser medida por una simple titulación química del jugo de la fruta. Para muchos frutos la proporción entre azúcares y ácidos tiene influencia directa en el sabor.[11]

2.2 Pigmentos en frutas

Gran parte del interés que frutas y hortalizas generan en nuestras dietas se debe a sus atractivos y variados colores. Los pigmentos responsables del color de las frutas y hortalizas se encuentran principalmente encerrados en el plasto celular, como son los cloroplastos y otros cromoplastos; y en cantidades menores, disueltos en gotas de grasa o agua, dentro de los protoplastos y vacuolas de la célula. Los principales pigmentos naturales se pueden clasificar en cuatro grupos: clorofilas, carotenoides, betalainas y flavonoides.[11]

2.2.1 Clorofilas. La clorofila es un pigmento fotosintético verde con cuatro anillos pirrólicos formando un macrociclo que contiene el catión magnesio. Se encuentran en gran cantidad en los cloroplastos y tienen una misión importante en la producción fotosintética de carbohidratos a partir de dióxido de carbono y agua. El color verde brillante de las hojas y otras partes de la planta se debe principalmente a las clorofilas solubles en aceite, las cuales están en la naturaleza ligada a las moléculas de proteína en complejos altamente organizados.

Si las células de las plantas son destruidas por envejecimiento, tratamiento o cocimiento, las proteínas de estos complejos se desnaturalizan y la clorofila puede desprenderse; ésta es muy inestable y cambia rápidamente de color, de verde

olivo a café. Este cambio de color se debe la conversión de la clorofila en feofitina por pérdida del ion magnesio.[11]

2.2.2 Carotenoides. Los pigmentos que pertenecen a este grupo son solubles en grasa y fluctúan en color, desde el amarillo pasando por el anaranjado hasta el rojo. Muchas veces se hallan junto con las clorofilas en los cloroplastos, pero también están presentes en otros cromoplastos. Los carotenoides más comunes se encuentran en alimentos como zanahorias, maíz, albaricoque, melocotones, en frutas cítricas y calabazas. Estos pigmentos raramente se encuentran aislados unos de otros en el interior de las células de las plantas.

Durante el tratamiento de los alimentos, los carotenoides son bastante resistentes al calor, a los cambios de pH y son permeables al agua por ser grasas solubles; sin embargo, son muy sensibles a la oxidación que produce la pérdida de color y destrucción de la actividad de la vitamina A[15].

2.2.3 Betalainas. Son pigmentos N-heterociclicos solubles en agua, de mayor polaridad que las antocianinas, localizadas en las vacuolas de las células. Estos pigmentos imparten colaciones naranjas y violetas a las frutas y hortalizas, aun que menos comunes en la naturaleza resultan ser excluyentes con las antocianinas.[11]

2.2.4 Antocianinas. Son compuestos polifenólicos encontrados frecuentemente en frutas, vegetales y granos, son solubles en agua y responsables de las coloraciones moradas, azules y rojas de frutas y flores. Los beneficios a la salud que se le atribuyen a las antocianinas son muy amplios: antioxidantes, actividad contra alergias, inflamaciones, diferentes virus, hipertensión, artritis, diabetes y cáncer[16].

Las antocianinas pueden ser analizadas en un extracto que contenga otros compuestos fenólicos por su medida de absorción a la longitud de onda máxima en la región de 490 a 550 nm en el espectro visible, que es característica de este tipo de compuestos.[17]

La estructura básica de las antocianinas es la antocianidina (aglicona), que se encuentra conformada por el ion flavilio. Las diferentes sustituciones suelen ser grupos hidroxilos, metoxilos y azúcares en algunos casos aciladas con ácidos alifáticos tales como el ácido malónico y aromáticos como el ferúlico o fumárico, dando origen a las casi 600 antocianinas encontradas hasta el momento. Las antocianidinas más comunes que se encuentran en plantas se presentan en la Figura 2.

Las seis antocianidinas más comunes en frutas y vegetales son: cianidina, delfinidina, pelarginidina, peonidina, petunidina y malvidina.[18]

La estabilidad de las antocianinas se ve afectada por varios factores como pH, luz, temperatura de almacenamiento, presencia de oxígeno y presencia de enzimas[19]. En el caso del pH los cambios estructurales sufridos por las antocianinas provocan un cambio de color que es bastante notable (Figura 3); sin embargo, aunque estas reacciones son equilibrios estos suelen estar desplazados hacia las especies incoloras a medida que el pH aumenta.

Para la extracción de antocianinas usualmente se utilizan solventes polares como etanol, metanol o acetona, acidulados con ácidos débiles en baja concentración debido a que los ácidos fuertes o muy concentrados pueden causar la hidrólisis de las antocianinas.

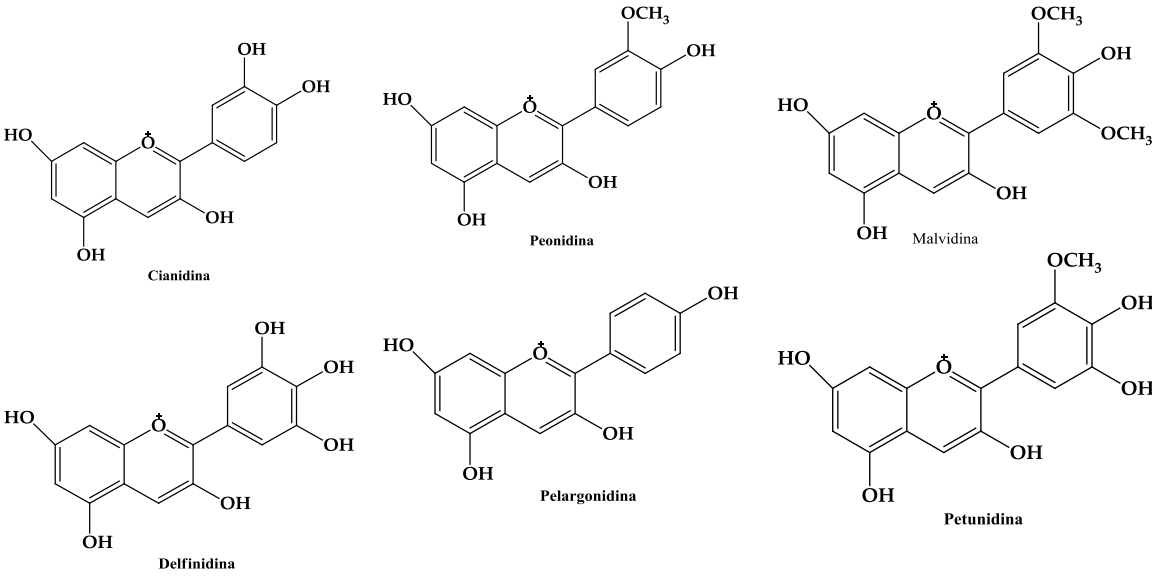


Figura 2. Estructura de antocianidinas comúnmente encontradas en la naturaleza.[19]

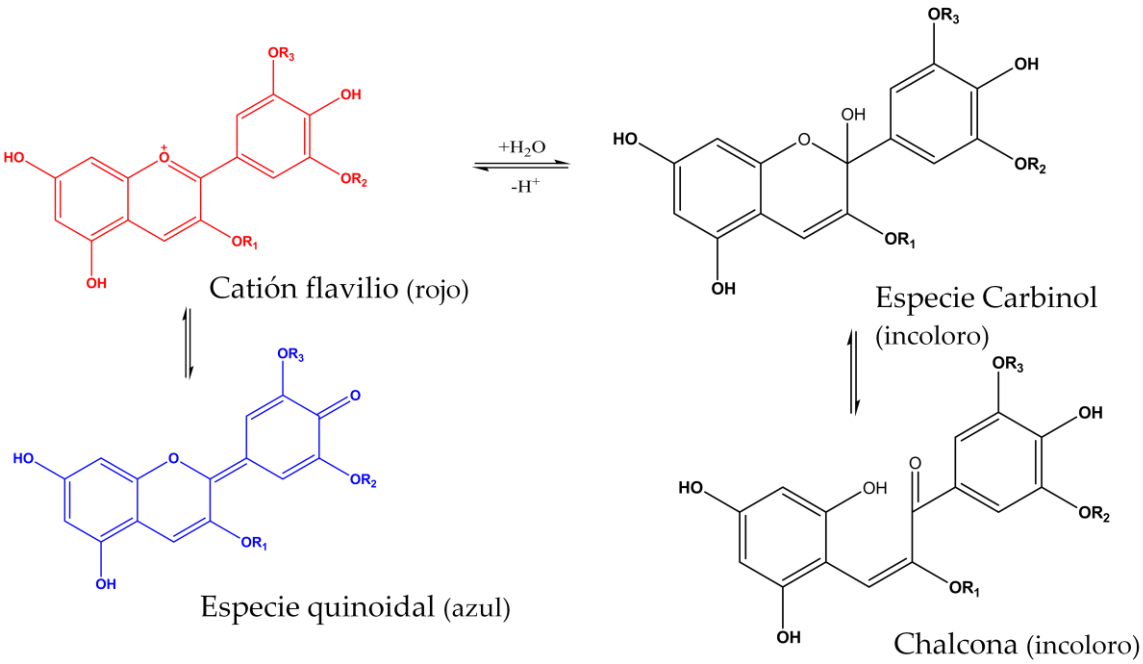


Figura 3. Efecto del pH sobre la estructura de las antocianinas.[20]

Al iniciar la extracción de antocianinas se recomienda la limpieza de la muestra de posibles impurezas polares como lo son azúcares, ácidos orgánicos y otros compuestos polifenólicos; esto se realiza en columnas de extracción en fase sólida

como Sephadex[21] o Amberlita XAD-7.[22] Adicionalmente cuando se tienen muestras complejas se puede utilizar la cromatografía en contracorriente para el fraccionamiento del extracto crudo. Esta técnica cromatográfica tiene la ventaja de fraccionar mayor cantidad de muestra, además de la ausencia de fase estacionaria sólida que permite una recuperación completa de toda la muestra.[23] El método de análisis más utilizado para el estudio de antocianinas es HPLC acoplado a detector de arreglo de diodos (DAD) o con espectrómetro de masas. Aunque aún no ha sido definido ningún proceso estándar de muestras y matrices, ciertas condiciones son seguidas comúnmente.

Las columnas más utilizadas son las de fase reversa (C_{18}) debido a que otro tipo de polaridad superior, suele producir retención de las antocianinas y baja resolución de la separación por interacción de la fase estacionaria con estos compuestos. Como fase móvil se utiliza usualmente mezclas de metanol, acetonitrilo o agua. El pH del sistema debe mantenerse siempre ácido con pequeñas cantidades de ácido acético, fórmico o trifluoroacético. La polaridad de la aglicona (antocianidina) es el factor más importante que afecta la retención, de modo que este decrece conforme incrementa la polaridad. En el caso de las antocianinas glicosiladas la presencia de azúcar incrementa la polaridad es decir disminuye la retención en la columna eluyendo las diglicosiladas en primer lugar que las monoglicosiladas.

El detector que se utiliza es UV visible o arreglo de diodos (DAD), ya que los espectros UV visibles de estos compuestos brindan información valiosa de las características estructurales de la molécula. La longitud máxima de absorción se relaciona con el patrón de hidroxilación; por ejemplo, en una solución de metanol acidificada, pelargonidina 3-glucósido exhibe una λ_{max} de absorción alrededor de 505 nm, cianidina y peonidina 3-glucósido tienen una λ_{max} entre 520 y 526 nm mientras que delfinidina, malvidina y petunidina muestran una λ_{max} entre 532 y 537 nm[24]. También es posible conocer el patrón de glicosidación a partir del espectro UV. Por ejemplo, los 3-glicósidos y los 3,5-diglicósidos presentan diferencias

espectrales en la región de 400 a 460 nm la cual se expresa normalmente en términos de proporción E_{440} / E_{max}. Los 3-glicósidos exhiben valores dos veces mayores que los 3,5-diglicósidos. La absorbancia a 310 nm es debida a la presencia de una acilación y usualmente se expresa también en proporción de E_{max} del grupo acilo / E_{max} en el visible.[25]

En los últimos años la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas ha sido muy útil en el análisis preliminar de las antocianinas. La interface más utilizada es la de ionización por electrospray (ESI), debido a que esta técnica es útil para compuestos de alto peso molecular, termolábiles y de alta polaridad.[23]

La espectrometría de masas en tándem (MS-MS) permite la formación de colisiones de baja energía, induciendo la disociación de fragmentos. Es así como moléculas individuales pueden ser seleccionadas en el primer analizador en cuadrupolo y fragmentadas por colisión con gas, usualmente argón, para ser analizadas en el segundo cuadrupolo. Esta información resulta muy valiosa en el caso de las antocianinas debido a que se puede obtener información del tipo de antocianidina y las posibles sustituciones, incluso cuando se presentan coeluciones y sea imposible su análisis por UV. Por ejemplo en un estudio sobre col se ejemplifica la utilidad de esta técnica donde fue posible el reconocimiento de dos sustituciones de ácido sinápico sobre glucosas en el carbono 3, que resulto en un fragmento m/z = 1023.6. Adicionalmente se obtuvo el ion que indicaba la presencia de la antocianina sustituida en el carbono 5 por una glucosa, y el pico correspondiente a la antocianidina (Figura 4).[26]

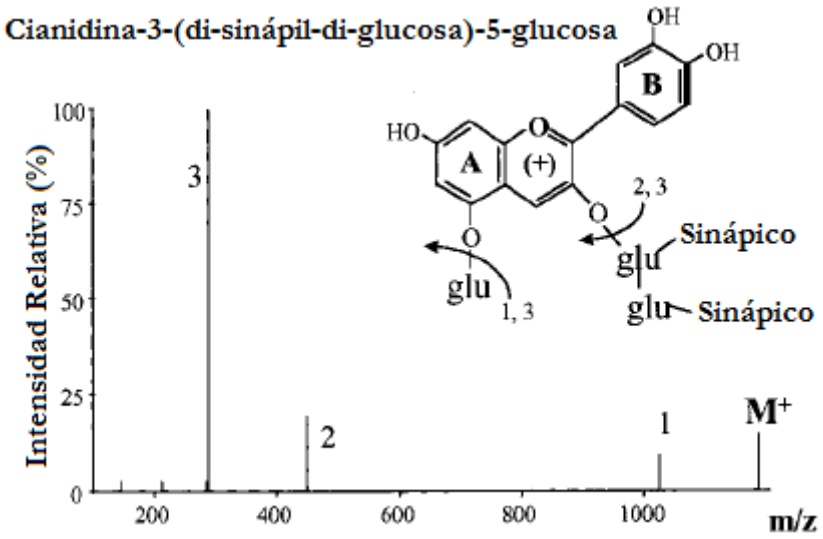


Figura 4. Patrones de fragmentación de la antocianina acilada Cianidina-3-(di-sinápil-di-glucosa)-5-glucosa.[25]

La resonancia magnética nuclear también se utiliza para determinar exactamente la posición del enlace glicosídico, y confirmar la información obtenida por HPLC-EM.

2.3 Análisis de compuestos volátiles

Para el estudio de compuestos volátiles en frutas, existen varias técnicas de extracción que actualmente son empleadas: *headspace* (HS), extracción por procesos de absortividad (*headspace* microextracción en fase sólida HS-MEFS) y métodos con solventes por extracción o destilación (líquido-líquido, destilación por arrastre con vapor extracción simultánea con solvente orgánico (DES) y SAFE (solvent assisted flavour evaporation).

La microextracción en fase sólida (MEFS) emergió rápidamente como una técnica robusta, rápida, sin la utilización de solvente o preconcentración de compuestos orgánicos volátiles en varias disciplinas científicas como la química ambiental, toxicología, ciencias forenses y microbiólogia, entre otras. En los últimos años ha habido un creciente uso de la MEFS para el análisis de compuestos volátiles lo

cual se ve reflejado en las publicaciones que se pueden encontrar. Por ejemplo una búsqueda en la literatura relacionada con MEFS aplicada a análisis de compuestos volátiles tomando en cuenta los años 1999 y 2000 muestra como resultado más de 62 referencias, lo cual indica los buenos resultados que muestra esta técnica para estos estudios[27].

La MEFS utiliza la partición de compuestos orgánicos entre una solución, su fase vapor y una delgada fibra de sílica fundida con diferentes recubrimientos poliméricos; desde no polares como polidimetilsiloxano (PDMS) hasta los recubrimientos más polares como Carbowax.[26] Esta técnica es independiente de la forma de la matriz: líquidos, sólidos o gases y todos pueden ser muestreados rápidamente. La MEFS es una técnica de equilibrio y para tener buenos resultados es necesario que las condiciones de extracción sean cuidadosamente controladas ya que cada compuesto puede comportarse de manera distinta dependiendo de su polaridad, volatilidad, coeficiente de partición, volumen de la muestra, velocidad de agitación, pH de la solución y temperatura de la muestra. Así el control de estas variables asegura el éxito del trabajo.

Sin embargo, cuando se desea estudiar el aroma de los alimentos el método de extracción no debe discriminar ningún componente, las condiciones de extracción no deben alterar la estructura original del aroma y los componentes no volátiles deben ser removidos completamente del extracto.[28] Un método de extracción que cumple estos requisitos, es la extracción con solventes. Estos métodos presentan dificultades en alimentos ricos en lípidos, pues junto con los componentes volátiles se extrae una gran cantidad de triglicéridos, fosfolípidos y ceras que producen un extracto de aroma con una base lipídica, lo cual impide la concentración efectiva de los compuestos de aroma y su posterior análisis cromatográfico.[29]

Dado este inconveniente el uso de la extracción con solventes se ha combinado con procesos de destilación a alto vacío, con el fin de transferir los componentes volátiles del alimento por acción del vacío a una serie de trampas frías donde son

condensados, logrando remover así el material no volátil.[30] Es así como Engel[27] y colaboradores diseñaron un equipo de extracción que involucra la destilación a presión reducida de un extracto orgánico del alimento, lo cual elimina el calentamiento de la muestra o el solvente y permite obtener el extracto libre de sustancias no volátiles especialmente ácidos grasos y pigmentos.[29] En la figura 5 se presenta el diagrama de este equipo comúnmente conocido como SAFE (Solvent Assisted Flavor Extraction).

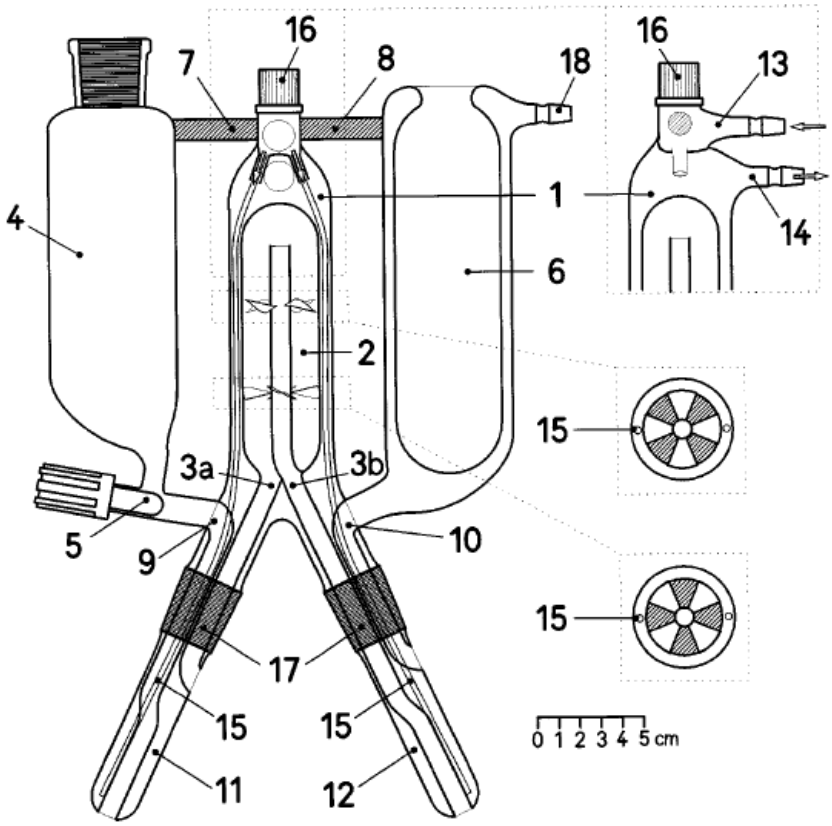


Figura 5. Esquema del equipo para extracción del aroma asistida por solvente (SAFE).[29]

El equipo SAFE cuenta con un embudo de adición (4), una trampa fría (6) y una cabeza central (2) de la cual se desprenden dos tubos de vidrio (11 y 12) equipados con una sección esmerilada (17), a la cual se conectan herméticamente dos balones. El balón conectado al extremo del embudo de adición se coloca en un baño termostatado a 40°C, mientras que el segundo balón conectado a la

trampa fría se coloca sobre un baño con nitrógeno líquido. La cabeza y los tubos de vidrio se encuentran completamente termostatados a 40°C con agua que ingresa hasta el fondo de los tubos de vidrio mediante tubos de polietileno (15) asegurando una trampa homogénea. El equipo se conecta por el extremo (18) a una bomba de alto vacio a una presión de 10^{-3} Pa. La destilación se inicia cuando desde el embudo de adición se dejan caer gotas que debido a la presión se atomizan. Las volátiles y el solvente son transferidos por medio del tubo (3a) dentro de la cabeza de destilación (2). El destilado, a través del tubo (3b) entra en el balón donde el solvente y los componentes volátiles son condensados por adición de nitrógeno líquido. De esta forma se obtiene un extracto incoloro, libre de componentes no volátiles que usualmente posee el olor característico del alimento.[31]

Actualmente el estudio de aroma de los alimentos no se limita solamente a dar un listado de compuestos volátiles sino que se ha enfocado en aquellos compuestos que se encuentran en concentraciones superiores a su valor umbral de olor es decir aquellos compuestos activos olfativamente. Esto se logra realizando análisis por CG-Olfatometría en dos columnas de diferente polaridad, es decir que aparte de detector de FID se cuenta con un panelista entrenado que capta cada una de las zonas activas olfativamente en el extracto, permitiendo así establecer una relación entre la señal instrumental y la percepción olfativa.[31]

La percepción del aroma en el eluyente cromatográfico depende de varios factores tales como la cantidad del alimento extraído, el grado de concentración de la fracción volátil y la cantidad de muestra separada por CG. Estas limitaciones se superan por medio de un análisis de CG-O de una serie de diluciones en el extracto de aroma. Esta técnica recibe el nombre de AEDA (Aroma Extract Dilution Assay)[32] y permite establecer la contribución individual de los diferentes compuestos presentes en una mezcla compleja de aroma y su relación con un parámetro físico reproducible como es el índice de retención. En este método el

aporte sensorial de cada compuesto puede ser determinado sin necesidad de conocer la estructura química del mismo.[31]

2.4 Estudio de volátiles en *Passiflora edulis*

Entre los frutos de las especies *Passiflora edulis* se destacan el maracuyá morado (*Passiflora edulis* Sims), el maracuyá amarillo (*Passiflora edulis* var. *Flavicarpa)* y la gulupa (*Passiflora edulis* Sims. fo. *edulis*). En maracuyá amarillo se han realizado varios estudios de volátiles y aroma. Entre los volátiles se han encontrado compuestos tipo ésteres, alcoholes y terpenoides[33] como componentes de esta fruta. Adicionalmente, estudios de AEDA reportan hexanoato de 2-metilbutilo[34] como odorante potente en maracuyá amarillo.

En el maracuyá morado (*Passiflora edulis* Sims) se han realizado estudios sobre compuestos volátiles, en 1972[35] se publicó un artículo en donde realizan una destilación con arrastre con vapor para extraer los compuestos volátiles, con posterior partición acido-base. En la fracción de compuestos neutros se encontraron 17 compuestos, estando en mayor proporción el butirato de etilo seguido por el hexanoato de metilo. En la fracción ácida se identificaron ácidos comúnmente encontrados en frutas como el ácido acético y el ácido hexanoico. La identificación de los componentes volátiles se realizó con detector de masas e infrarrojo, encontrando que aproximadamente el 80% del total de compuestos de la fracción neutra eran ésteres.

Posteriormente en 1982[36] apareció otro estudio en maracuyá morado (*Passiflora edulis* Sims), sin embargo en este caso emplearon la técnica de headspace para el análisis de volátiles utilizando un polímero (Tenax) para atrapar dichos compuestos, el cual fue posteriormente calentado para desorber lo retenido. Como resultado se encontraron 60 compuestos volátiles de los cuales la mitad fueron compuestos tipo éster. Los compuestos mayoritarios fueron acetato de etilo,

butirato de etilo, hexanoato de hexilo y hexanoato de etilo, lo cual fue coherente con lo encontrado en estudios anteriores donde el butirato de etilo fue reportado como el componente mayoritario. La identificación se hizo por espectrometría de masas y la cuantificación con el método de patrón interno.

En el año 2000[37] se reportó otro estudio de volátiles en maracuyá morado (*Passiflora edulis* Sims) donde la extracción se realizó por expansión rápida al vacio (flash vacuum-expansion) y los resultados se compararon con otro tipo de extracciones como extracción líquido-líquido y DES. En este caso se cuantificó con patrón interno utilizando isobutanoato de isoamilo y como resultado se encontraron 54 compuestos volátiles de los cuales están en mayor proporción: el hexanoato de hexilo, butanoato de etilo, hexanoato de (*Z*)-3-hexenilo y hexanoato de etilo. Para la mayoría de los compuestos la eficiencia de la extracción es similar excepto para algunos ésteres como butanoato de etilo, butanoato de butilo, hexanoato de etilo y monoterpenos como limoneno, (*Z*)-ocimeno y α-pineno los cuales fueron extraídos más eficientemente por extracción líquido-líquido. En el caso del limoneno la concentración fue entre 30 y 200 veces mayor en el extracto líquido-líquido que en el extracto obtenido por DES.

Sobre el maracuyá morado (*Passiflora edulis* Sims) también se han realizado estudios de identificación de terpenoides provenientes de precursores no volátiles,[38] realizando extracción e hidrólisis de estos compuestos. En este estudio encontraron como compuesto principal el linalol, junto con α-terpineol, citronelol y geraniol. Un total de quince C_{13} norisoprenoides fueron identificados por primera vez en maracuyá morado como volátiles enlazados glicosidicamente.

Existe también otro artículo más reciente cuyo objetivo fue establecer diferencias entre los frutos de maracuyá morado y amarillo,[39] se determinaron diferencias en la proporción de los enantiómeros de los alcoholes secundarios y sus ésteres. Se empleó cromatografía de gases multidimensional y una fase estacionaria modificada de β-ciclodextrina. En este estudio se concluyó que los ésteres de

alcoholes secundarios son útiles para determinar diferencias entre las dos variedades de maracuyá. Los ésteres hexanoato y butanoato de 2-heptilo se encuentran en mayor proporción como enantiómeros *R* (>99%) en el maracuyá morado mientras que en el maracuyá amarillo el exceso enantiomérico es mucho menor. Así mismo los alcoholes 2-heptanol y 2-pentanol se encuentran en el maracuyá morado principalmente como enantiómeros *R*.

En el caso de otra passiflora relacionada, la chulupa (*Passiflora maliformis* L.) o gulupa dependiendo de la región del país, se realizó una destilación-extracción simultánea para analizar los compuestos volátiles. En este estudio encontraron 43 compuestos volátiles, principalmente ésteres, seguidos por alcoholes y ácidos. Los compuestos mayoritarios fueron hexanoato de etilo, butanoato de etilo, butanoato de metilo, *E*-2-butenoato de metilo y 2-hexanol.[40]

2.5 Descripción de la planta y la fruta

La gulupa cuyo nombre científico es *Passiflora edulis* Sims. fo. *edulis* pertenece a la familia de las Pasifloráceas, así como la badea, la curuba, la granadilla y muchas otras especies que se hallan distribuidas en diferentes regiones de América Tropical. El fruto es globoso y redondo aunque a veces elíptico, con diámetro de 4 centímetros en promedio, de color verde que se vuelve morado al llegar a la madurez; las semillas son numerosas, rodeadas por un arilo que forma la pulpa amarillo-naranja gelatinosa que es muy rica en vitaminas y exhibe un intenso aroma. Las hojas son alternas y lobuladas, el tallo y ramas están provistos de zarcillos con los cuales, como las demás pasifloráceas, se agarra de los objetos que les sirven de soporte; las raíces son fibrosas y se extienden hasta cubrir un radio proporcional a la parte aérea, lo que indica que el terreno debe ser suelto para que se desarrollen bien, de acuerdo con las necesidades de la planta.[3]

En Colombia tomando los cultivos de gulupa se encuentran ubicados entre 1600 y 2400 msnm.[41]

En la revisión bibliográfica que se realizó no se encontró ningún estudio químico referente al aroma o color de la gulupa (*Passiflora edulis* Sims. fo. *edulis*). Sin embargo existe cierta confusión sobre su identidad al usar el nombre común. Los exportadores frecuentemente la denominan como "maracuyá morado" o por su nombre en inglés "purple passion fruit" que en realidad corresponde a *Passiflora edulis* Sims. En la Figura 6 se observa que las dos especies están relacionadas pero morfológicamente son diferentes, adicionalmente se encuentran en diferentes pisos térmicos dado que la gulupa es sembrada en pisos térmicos más altos.

A B

Figura 6. Foto del A) maracuyá morado (*Passiflora edulis* Sims) y B) gulupa (*Passiflora edulis* Sims fo *edulis*).[b]

En *Passiflora edulis* reportan como antocianina principal la cianidina 3-glucósido (97%), seguida por cianidina 3-(6´´malonil glucósido) (2%) y pelargonidina 3-glucósido (1%).[42]

En la literatura hay muy poco publicado, sobre la maduración en frutos de gulupa. El análisis de los compuestos volátiles en los diferentes estadios de madurez no

[b] Fotografías tomadas en el grupo de investigación

se ha realizado a pesar que la gulupa sea reconocida por su agradable aroma. El color solo ha sido estudiado por comparación con tablas de colores sin tener en cuenta los compuestos responsables del color[43] o la medida objetiva con colorimetría triestímulo.

2.6 **Análisis de componentes principales (ACP)**

Las técnicas del análisis multivariado tratan con datos asociados a conjuntos de medidas sobre un número de individuos u objetos. El conjunto de individuos junto con sus variables, pueden disponerse en un arreglo matricial X, donde las filas corresponden a los individuos y las columnas a cada una de las variables. Los métodos de análisis multivariado se presentan en dos clases: los que suministran información sobre la interdepencia entre las variables y los que dan información acerca de la dependencia entre una o varias variables respecto a otra u otras. El ACP es un método de interdependencia es decir busca el cómo y el por qué se relacionan o asocian un conjunto de variables. Esta técnica de reducción de datos tiene como objetivo la estructuración de un conjunto de datos multivariado mediante la reducción de un número de variables, adicionalmente realiza un escalamiento de estas para hacerlas comparables entre sí. [43]

El ACP transforma el conjunto de variables originales en un conjunto más pequeño de variables, las cuales son combinaciones lineales de las primeras, que contienen la mayor parte de la variabilidad presente en un conjunto inicial.
El análisis por componentes principales tiene como objetivos, entre otros, los siguientes:

- Generar nuevas variables que expresen la información contenida en un conjunto de datos.
- Reducir la dimensión del espacio donde están inscritos los datos.
- Eliminar las variables (si es posible) que aportan poco al estudio del problema.
- Facilitar la interpretación de la información contenida en los datos.

El propósito central es la determinación de unos pocos factores (componentes principales), que retengan la mayor variabilidad contenida en los datos. Las nuevas variables poseen algunas características “deseables”, tales como independencia y no correlación[44].

Este análisis ha sido aplicado en estudios sobre alimentos. Un ejemplo fue el realizado sobre mandarina, naranja y un hibrido.[45] En este caso, se analizó el contenido de carotenoides y se utilizó el área bajo la curva de estos compuestos en los cromatógramas para realizar ACP y discriminar o encontrar diferencias por medio de los grupos formados en el nuevo espacio de componentes principales entre los tres tipos de fruta. La mandarina y la naranja resultaron ser distintas, el hibrido presentó características similares a las otras dos frutas.

Otra aplicación encontrada fue en vinos,[46] donde utilizan metabolitos producidos durante el proceso de fermentación los cuales son determinantes en la calidad del vino para encontrar la cepa de levadura que produjera mejores características. En este caso utilizaron la producción de estos metabolitos para cada cepa, graficando sobre las nuevas componentes el contenido de cada uno de estos, clasificando las cepas según la cantidad producida.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Material Vegetal

Se utilizó fruta calidad de exportación recolectada en tres estadios de madurez de acuerdo al color de la cáscara (verde, pintona y madura), proveniente y recolectada de diferentes cultivos de Cota (Cundinamarca). Fue suministrada por la empresa OCATI S.A. en tres diferentes cosechas del año (junio, agosto y

octubre del 2009) para desarrollar los análisis por triplicado. Cada lote de muestras estaba construido por 80 frutos.

Una muestra de la planta: hojas, tallo y fruto, fue clasificada taxonómicamente bajo el registro: COL 527652 en el Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia.

3.2 Caracterización fisicoquímica

Este análisis fue llevado a cabo para cada cosecha y cada estado de madurez. Las frutas se seleccionaron al azar para organizarlas en 10 grupos de 8 frutas que presentaran características físicas similares (color homogéneo, igual tamaño y sin arrugas). La composición química de la fruta fue determinada siguiendo procedimientos publicados por AOAC (2006)[47] en el Instituto de Ciencia y Tecnologia ICTA.

3.2.1 Acidez titulable y pH. La ácidez titulable fue determinada siguiendo el procedimiento estándar (AOAC, 2006)[46], a partir de 1 g de pulpa. El resultado fue expresado como porcentaje de acido cítrico. El pH de la pulpa fue determinado usando pHmetro C6820 (Schott Gerate, Berlin, Alemania).

3.2.2 Sólidos solubles totales. Los sólidos solubles totales o °Brix se midieron según la norma técnica colombiana NTC 4624. Se adicionó una gota de pulpa de fruta sobre el vidrio inferior del refractómetro, luego se cerró y se tomó la medida a contraluz en escala de °Brix. El refractómetro utilizado fue un ATAGO HRS-500.

3.2.3 Textura. La textura de la gulupa fue determinada en un analizador de textura TA-TX PLUS (Stable Micro System Ltda, Godalming, United Kingdom). Las frutas fueron comprimidas un 25% de su tamaño a 2 mm/s con un plato de compresión p/75 una sola vez y por la sección ecuatorial. Las medidas fueron expresadas en kilogramos- fuerza.

3.2.4 Análisis de color. El color de la cáscara de las frutas fue determinado por medio de análisis de imagen. Se tomaron 5 fotografías a la fruta en cada estadio de madurez de la misma cosecha frente a un blanco de color ($BaSO_4$) en una cámara de iluminación controlada. Para cada imagen se cortó un área fija de 180 x 180 pixeles. La heterogeneidad de los frutos fue medida a través de la proporción de pixeles que se desviaban más del 10% de la intensidad promedio de imagen. El software DigiFood® fue utilizado para el procesamiento de la imagen.

3.3 Análisis de volátiles

Para cada estado de madurez los compuestos volátiles liberados del *headspace* de la fruta fueron analizados por HS-MEFS. SE mezcló la pulpa de 10 frutos en el mismo estado de madurez, luego se tomó una fracción de 10 g y se colocó en un vial de 20 mL, donde se dejó equilibrar durante 1 h. Los compuestos volátiles fueron colectados en una fibra de divinilbenceno-carboxen-polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS 75 µm, Supelco Inc., Bellefonte, PA, USA) durante 1 h. Posteriormente, los compuestos adsorbidos fueron directamente inyectados (tiempo de desorción de 5 min) en un cromatógrafo de gases Shimadzu CG 17A acoplado a un detector de masas QP5050 y operado en modo splitless. Se trabajó en modo ionización electrónico 70 eV, utilizando un rango m/z 40-350.

Cada determinación se realizó por triplicado y se analizó en una columna FFAP (30 m x 0.25 mm d.i., 0.32 µm) y una RTX-5 (30 m x 0.25 mm d.i., 0.25 µm). Para la columna FFAP la temperatura del horno fue programada desde 50°C (4 min) a 4°C/min hasta 250°C (4 min); la temperatura del puerto de inyección fue de

250°C; se utilizó Helio como gas de arrastre a 1.5 mL/min. Para la columna RTX-5 la temperatura del horno se programó desde 50°C (4 min) a 4°C/min hasta 300°C (5 min); la temperatura del puerto de inyección fue de 300°C; se utilizó Helio como gas de arrastre a 1,5 mL/min.

Una mezcla patrón de parafinas de C_6 a C_{26} se inyectó bajo las mismas condiciones cromatográficas para determinar los valores de los índices de retención.[48]

Para la cuantificación de volátiles se inyectaron diferentes ésteres bajo las mismas condiciones cromatográficas del análisis de pulpa de gulupa, luego se seleccionó el butanoato de butilo como patrón interno (50 µg/kg de fruta) debido a que se ajustó muy bien al cromatograma y no presentó coelución con ningún compuesto en la muestra.

3.4 Perfil Sensorial de la fruta

Para este análisis se realizó un estudio previo con un panel entrenado con el fin de establecer las notas olfativas más representativas en la pulpa de la fruta. Posteriormente se prepararon 5 patrones que representaban cada una de las notas más relevantes en la fruta: verde (hexanal), frutal (butanoato de etilo), acida (ácido acético), azufrada (acetato de 3-mercapto hexilo) y dulce (furaneol). Se preparó una solución de cada uno de estos compuestos de referencia en una concentración 10 veces mayor a su umbral de olor. Posteriormente se entrenó a cada uno de los panelistas para que reconocieran e identificaran las notas olfativas haciendo uso de los patrones preparados en el paso anterior.
Finalmente los panelistas entrenados evaluaron la pulpa de la fruta en los diferentes estados de madurez, respondiendo en una escala de intensidad de 0 a 5, que tan intensas percibían las notas en cada una de las muestras.

3.5 Análisis de los compuestos volátiles activos olfativamente en el aroma de la gulupa

3.5.1 Análisis preliminar. Se tomaron porciones de 20 g de pulpa de fruta en estado maduro y se extrajeron separadamente con tres diferentes solventes (pentano, éter etílico y diclorometano) con el fin de seleccionar el solvente que extrajera los compuestos volátiles más representativos del aroma de la fruta. Tres panelistas entrenados seleccionaron analizaron el extracto con diclorometano como el que representaba más el aroma de la gulupa.

3.5.2 Extracción de compuestos volátiles por SAFE. 100 g de pulpa de fruta se extrajeron a partir de frutos maduros. Se homogenizó durante 5 minutos y posteriormente se adicionó 300 mL de diclorometano, enfriando la mezcla sobre un baño de hielo. Luego se adicionó pequeñas porciones de sulfato de sodio anhidro hasta completar 300 g con agitación continua. El sólido obtenido se empacó en una columna de vidrio y se eluyó con 200 mL de diclorometano. La fase orgánica obtenida que presentó el aroma característico de la gulupa y una coloración amarilla intensa se sometió a destilación a presión reducida usando el equipo SAFE. El destilado no presentó coloración y exhibió el aroma característico de la fruta. Finalmente se concentró en una columna Vigreux hasta obtener un volumen de 1 mL.

3.5.3 Determinación de las zonas activas olfativamente. Para la determinación de las zonas activas olfativamente en el cromatograma el extracto se analizó mediante cromatografía de gases acoplada a olfatometría para este fin se empleó un cromatógrafo (Thermo Fisher Scientific (Milano, Italia) usando Helio como gas de arrastre. El cromatógrafo contaba con un puerto de inyección *on-column* que se mantuvo siempre a 40°C. El eluente de la columna cromatográfica se dividió al final (1:1) por medio de un divisor de cuarzo para obtener respuesta simultánea en el detector fotométrico de llama (FID) y el puerto de olfacción (O). Los dos detectores se mantuvieron a 250°C. El detector olfatométrico consistía en un tubo

de aluminio (10 cm x 2 cm d.i.) que se mantuvo a 250°C, al final un panelista entrenado realizaba la descripción de las notas olfativas de los compuestos que eluían de la columna.

Las columnas empleadas fueron: DB-FFAP y DB-5 (J&W Scientific, Chromatographie-Handel Müller, Fridolfing, Alemania) de 30m x 0,32 mm d.i., df=0,25 µm. El programa de temperatura utilizado fue de 40°C por 2 minutos luego se incremento la temperatura a una velocidad de 6°C/min hasta 190°C y a una velocidad de 12°C/min hasta 240°C por 10 minutos.

Este análisis fue realizado por tres panelistas en las dos columnas, encontrándose un mayor número de zonas olfativas al utilizar la columna DB-FFAP.

3.5.4 Aroma Extract Dilution Analysis (AEDA). Este análisis se realizó mediante la dilución del extracto obtenido por SAFE a partir de 100 g de fruta. Se prepararon las diluciones con un factor de dilución de 2^n, y cada dilución fue analizada por CG-O en las condiciones mencionadas anteriormente, localizando las zonas activas en el cromatograma. El análisis finalizó en la última dilución donde fue posible detectar un compuesto activo.

3.5.5 Identificación de los compuestos volátiles activos olfativamente. Por comparación de los índices de retención obtenidos en las columnas DB-FFAP y DB-5 y las notas olfativas encontradas, se seleccionaron una serie de compuestos como posibles responsables de las zonas activas olfativamente. Se prepararon soluciones con patrones de estos compuestos a una concentración de 50 µg/mL para corroborar el índice de retención, y 1 µL de estas soluciones fueron inyectadas en el cromatógrafo bajo las condiciones cromatográficas mencionadas en el numeral 4.5.3, posteriormente se realizaron diluciones de manera tal que quedara a una concentración similar a la encontrada en el extracto y se analizaron por CG-O, Finalmente cada uno de estos compuestos se analizaron por CG-EM.

Para el análisis de CG-EM se utilizó un cromatógrafo Trace Ultra (Thermo Scientific, Dreieich, Germany) acoplado a un espectrómetro de masas Saturn 2200 (Varian, Darmstad, Germany) operado en modo impacto electrónico con una energía de ionización de 70 eV en un intervalo de adquisición de masas 40-350u, equipado con una columna FFAP (30m x 0,32 mm d.i., df=0,25 µm). El programa de temperatura utilizado fue el siguiente 40 °C durante 2 minutos, luego calentamiento a una velocidad de 6 °C/min hasta 190 °C y a una velocidad de 10 °C/min hasta 230 °C por 5 minutos.

3.5.6 Fraccionamiento del extracto de volátiles obtenido por SAFE

3.5.6.1 Extracción selectiva de tioles. Un extracto obtenido a partir de 100 g de fruta fue extraído con diclorometano y concentrado hasta 5 mL. Luego, se empacó una columna con agarosa mercurada Affi-Gel 501 (1 cm x 0,5 cm d.i.) y se acondicionó con 5 mL de isopropanol. Posteriormente se adicionó el extracto lentamente y se eluyó con 15 mL de una solución de pentano:diclorometano (2:1, v/v) para eliminar otros volátiles. Los tioles retenidos en la agarosa se eluyeron con 50 mL de una solución de pentano:diclorometano (2:1, v/v) que contenía disueltos 77,15 mg de ditiotreitol DTT. El eluído obtenido se sometió a extracción SAFE para remover el exceso de DTT. Finalmente el extracto se concentró hasta 20 µL usando un vial Dünges (microdestilador). La fracción enriquecida en tioles de analizó por CG-O y CG-EM usando una columna DB-FFAP en las condiciones mostradas en el numeral 4.5.3 y 4.5.5 respectivamente.

3.5.6.2 Cromatografía en columna. Se realizó la extracción de los compuestos volátiles por el método SAFE a partir de 500 g de pulpa de fruta y el extracto obtenido se concentró hasta 100 mL.

Para disminuir la complejidad del extracto, los compuestos fueron separados según su naturaleza química en dos fracciones: compuestos neutros-básicos (CNB) y compuestos ácidos (CA). Así la partición del extracto orgánico con una

solución 0,5 M de carbonato de sodio permitió extraer los compuestos ácidos. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhídro y se concentró hasta 4 mL; luego se tomaron 0,5 mL para analizarlos por CG-O y determinar la presencia de los compuestos activos olfativamente, el resto se concentró hasta 1 mL. La fase acuosa remanente se acidifico con 3 mL de HCl concentrado hasta lograr un pH entre 2-3, luego se extrajeron los CA con 200 mL de diclorometano, los cuales fueron posteriormente secados con sulfato de sodio anhídro. Finalmente el extracto se concentró hasta 1 mL, y se realizaron estudios de CG-O y CG-EM.

En una columna (25 x 1 cm d.i.) que contenía 8 g de sílica gel se fraccionó la fracción CNB. Posteriormente se eluyó sucesivamente con 50 mL de pentano, 50 mL de pentano / éter etílico (9 / 1 v / v), 50 mL de pentano / éter etílico (7 / 3 v / v) y 50 mL de éter etilico, en todos los casos se recogieron fracciones de 10 mL. Cada una de las fracciones se concentró hasta un volumen de 1 mL y se analizaron por CG-O para ubicar los compuestos activos olfativamente encontrados en AEDA; finalmente las fracciones seleccionadas se analizaron por CG-EM bajo las condiciones mencionadas en el numeral 3.5.5.

3.6 Análisis de los pigmentos presentes en la cáscara de la gulupa

3.6.1 Obtención del extracto. A partir de 3Kg de fruta madura se obtuvieron 1,439 Kg de cáscara que fueron sometidos a extracción con 900 mL de metanol:ácido acético 19:1 (v / v) a temperatura ambiente y en la oscuridad durante 24h. Al extracto obtenido se le eliminó el solvente en rotavapor a 40°C obteniendo 11,16 g de extracto. Posteriormente 2g de extracto fueron sometidos a una retención selectiva en una columna empacada con Amberlita XAD-7 (20 x 4,5 cm) (Aldrich Chemical Company, Milwaukee, WI, USA) de acuerdo al procedimiento descrito por Degenhardt, Knapp y Winterhalter[49]. Después de lavado exhaustivo con agua se adicionaron 500 mL de acetato de etilo y luego se eluyó la columna con 500 mL de metanol:ácido acético 19:1 v/v. El solvente se eliminó en rotavapor y el residuo se liofilizó obteniendo 1,05 g de la fase de acetato de etilo (Fa) y 460,3 mg de la fase de metanol:ácido acético 19:1 (Fm). La fracción de interés que contenía las antocianinas era la fracción Fm, la cual se analizó por HPLC-EM.

3.6.2 Análisis por HPLC-EM. El análisis del ERA fue llevado a cabo en un cromatógrafo Shimadzu LCMS-2010 System (Shimadzu, Tokyo, Japan), equipado con un detector UV/Vis (SPD-10A) y dos bombas (LC-10AD) acopladas on-line con un espectrómetro de masas MS-2010. Los datos de UV y EM fueron adquiridos y procesados usando un software Shimadzu LCMS Solution. El equipo también contaba con un desgasificador DGU-14A y una válvula de inyección con un loop de 5 µL.

Una columna Luna RP-18 5µm (150 x 2.0 mm d.i., Phenomenex®, USA) fue utilizada para el análisis de los constituyentes presentes en Fm. Se utilizó como fase móvil una mezcla de solventes así: A, (agua:ácido fórmico:acetonitrilo, 87:10:3 v/v/v) y B, (agua:ácido fórmico:acetonitrilo, 40:10:50 v/v/v) a una velocidad de flujo de 0.2 mL/min, con el siguiente gradiente: 0 min, 6%B; 0-20 min 6% B hasta 20% B; 20-35 min, de 20% B hasta 40% B; 35-40 min, de 40% B hasta 60%

B; 40-45 min, de 60% B hasta 90% B; 45-50 min de 90% B hasta 6% B. El espectrómetro de masas fue operado en modo positivo scan entre m/z 200-800 para el análisis de los compuestos monoméricos. Las condiciones del equipo fueron las siguientes: temperatura CDL 200 °C, flujo del gas nebulizador 1.5 L/min, bloque de calentamiento 200 °C, voltaje en el detector 1.55 kV, tiempo de acumulación de iones 20 msec. La energía y el gas de colisión se fijaron en 15 % según Osorio et. al.[50]

3.6.3 Cuantificación de antocianinas monoméricas. Cáscara de gulupa (cantidad procesada: 1.4 kg / 3 kg de fruta, 0.245 kg / 0.507 kg de fruta y 0.220 kg / 0.409 kg de fruta para los tres estadios, madura, pintona y verde, respectivamente) fue separadamente homogenezada y extraída durante 48 h en la oscuridad con metanol : ácido acético (19 : 1 v/v) a temperatura ambiente. El solvente se eliminó en rotavapor a 40°C y el residuo se aplicó en una columna de Amberlita XAD-7 bajo las mismas condiciones experimentales descritas en el numeral 3.6.1. El solvente fue removido nuevamente en rotavapor a 40°C y el residuo acuoso se liofilizó. El producto final (ERA) obtenido en cada caso fue de 11.2 g, 2.1 g y 1.1 g, para los tres estados madura, pintona y verde respectivamente. La concentración de antocianinas en cada uno de los ERA para cada estadio de madurez se determinó por el método del pH diferencial de acuerdo con el procedimiento descrito por Giusti y Wrolstad[51] y Lee y colaboradores.[52] Así se prepararon soluciones de 0.025 M de cloruro de sodio y 0.4 M de acetato de sodio, ajustando el pH a 1.0 y 4.5 respectivamente con acido clorhídrico. La absorbancia de cada solución fue medida a 520 y 700 nm contra agua destilada como blanco usando un espectrómetro Thermo Scientific Evolution 300 UV-Vis (Madison, WI, USA). La concentración de antocianinas fue calculada empleando como base la cianidina 3-glucosido cuyo peso molecular es 449,2 y coeficiente de extinción molar (ε) 26900 mol^{-1} cm^{-1}.[19] Las medidas se realizaron por triplicado en celdas plásticas de volumen reducido de 1 cm de paso de luz. La cantidad de antocianinas monoméricas totales (AMT) se calculó según las ecuaciones:

$$A= (A_{520nm}-A_{700nm})pH_{1.0}-(A_{520nm}-A_{700nm})pH_{4.5}$$

$$AMT= (A \times pm \times FD \times 1000)/\varepsilon \times 1$$

FD: Factor de dilución

3.7. Análisis estadístico

Los datos obtenidos en los análisis de las características fisicoquímicas de la gulupa se sometieron a análisis de Tukey para determinar diferencias significativas entre los estadios de madurez. Adicionalmente se realizó análisis de componentes principales para determinar la influencia de cada variable sobre los datos obtenidos.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Caracterización fisicoquímica

En los análisis fisicoquímicos se encontró que el pH y el contenido de sólidos solubles totales aumentan levemente durante la maduración, mientras que la acidez titulable decreció con valores significativamente diferentes entre cada estado como puede ser apreciado en la Tabla 1. En el caso de los sólidos solubles totales su incremento se le atribuye a la hidrólisis de almidón y otros carbohidratos durante el proceso de maduración en frutas; así mismo la disminución de la acidez titulable se debe al consumo de los ácidos orgánicos en el proceso de respiración de la fruta.

En la mayoría de las frutas con el proceso de maduración suele presentarse un ablandamiento acompañado de la aparición de arrugas en la superficie; sin embargo en las condiciones de análisis la textura externa presentó un valor constante, sin diferencias significativas entre los tres estados de madurez. En estudios previos sobre frutos de gulupa[44] reportaron una pérdida del 12 % de la firmeza entre gulupa verde y madura, no obstante las condiciones de análisis no fueron especificadas.

4.2 Análisis de color

Las coordenadas de color CIE fueron obtenidas por análisis de imagen (Tabla 1). Los resultados obtenidos por colorimetría triestimulo muestran una disminución en la luminosidad (L^*) así mismo el croma (C^*_{ab}) muestra una disminución durante la maduración por el desarrollo del color purpura (oscuro). El tono (h_{ab}) también disminuyó del estado verde al estado maduro, de acuerdo con los cambios de color de amarillo-verde a purpura. La representación de los datos obtenidos por análisis de imagen y en los diferentes estadios de madurez en el diagrama a^*b^* para las frutas en las diferentes cosechas (Figura 7) muestran una dispersión que

representa la heterogeneidad cromática sin embargo es posible obtener “clusters” para los diferentes estadíos de madurez.

Tabla 1. Caracterización fisicoquímica de gulupa (*Passiflora edulis* Sims. fo. *edulis*)

Propiedad	Verde I	Pintona II	Madura III
Humedad, % m/m[a]	85.3 ± 0.1[b]	83.2 ± 0.1[c]	82.1 ± 0.1[d]
Sólidos solubles totales (°Brix)	13.5 ± 0.8[b]	15.8 ± 0.9 [c]	17.4 ± 0.7[d]
pH	2.45 ± 0.20[b]	2.62 ± 0.16 [c]	2.77 ± 0.20[c]
Acidez titulable (% ácido cítrico)	4.68 ± 0.39[b]	3.51 ± 0.51 [c]	2.51 ± 0.60[d]
Textura (Kg)	18.65 ± 3.04[b]	17.47 ± 0.38[b]	17.46 ± 3.24[b]
Contenido de antocianinas monoméricas (g cianidina-3-glu equiv / kg de fruta)	-	0.45 ± 0.04 [b]	1.73 ± 0.18[c]
Proteína %[a]	0.8 ± 0.1 [b]	0.7 ± 0.1 [b]	0.9 ± 0.1 [b]
Grasa %[a]	0	0	0
Fibra cruda %[a]	0.1 [b]	0.1	0.1
Carbohidratos %[a]	13.2 ± 0.1 [b]	15.5 ± 0.1[c]	16.5 ± 0.1[d]
Cenizas %[a]	0.6 ± 0.1 [b]	0.5 ± 0.1[b]	0.5 ± 0.1[b]
Parámetros de color			
L^*	55.5 ± 11.8 [b]	34.8 ± 4.1[c]	20.1 ± 3.9[d]
a*	-18.9 ± 5.4 [b]	-0.4 ± 2.4[c]	4.4 ± 2.8[d]
b*	40.5 ± 10.3 [b]	14.6 ± 3.6[c]	3.0 ± 1.2[d]
C^*_{ab}	45.2 ± 9.4 [b]	14.91 ± 3.6[c]	5.5 ± 2.8[d]
h_{ab}	116.1 ± 8.7 [b]	88.8 ± 9.6[c]	38.2 ± 7.8[d]

Todos los datos son el resultados de 10 medidas ± desviación estándar. Letras iguales en la misma fila significa que no hay diferencias significativas con base en el test de Tukey, ($p < 0.05$); - no detectado. [a] Análisis realizado por el Instituto de Ciencia y Tecnología ICTA, solo tres medidas.

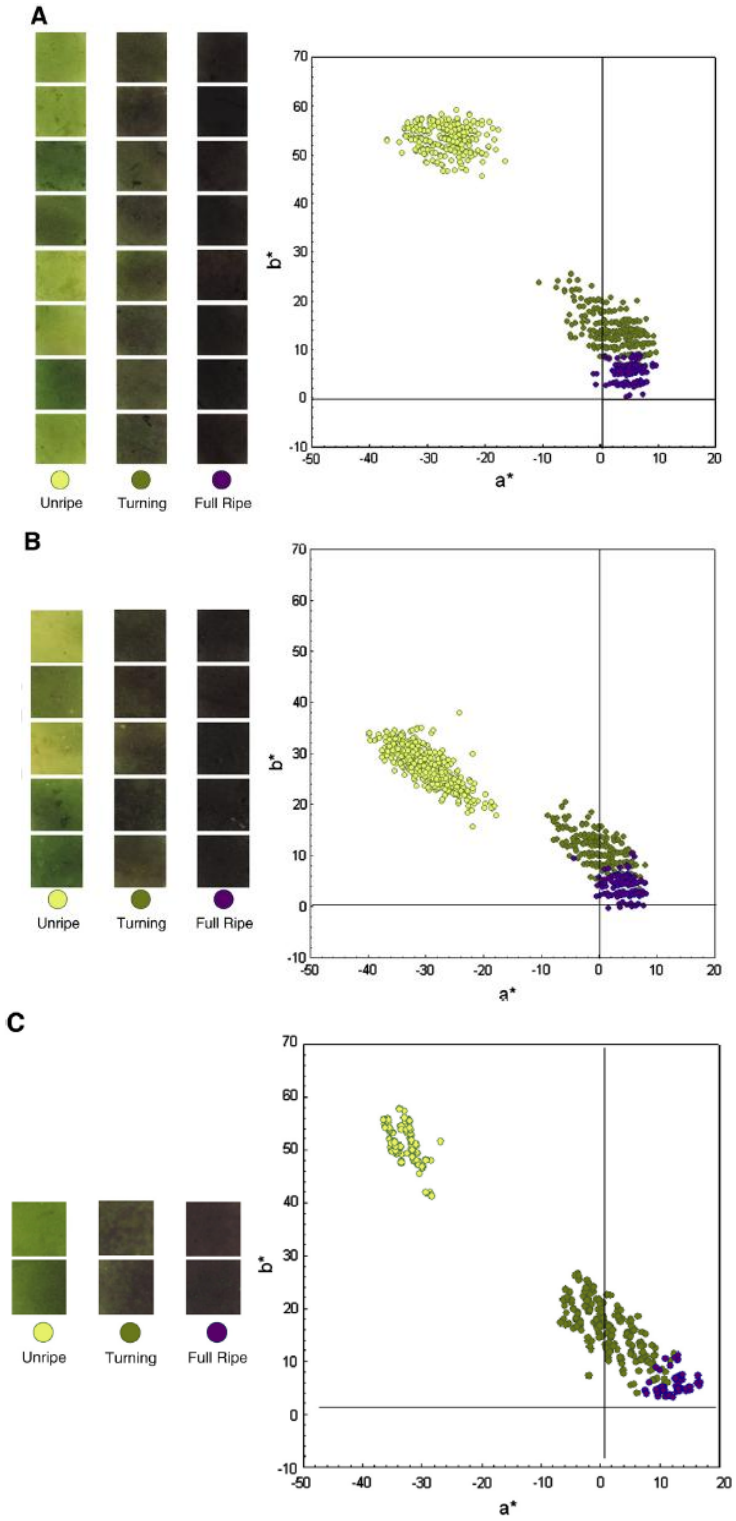


Figura 7. Representación de las coordenadas cromáticas de la cascara de gulupa en el diagrama *a*b** para las tres cosechas estudiadas (A Junio, B Agosto y C Octubre 2009), en los tres estadios de madurez.

El cambio mas notable se observó en el eje *a** el cual incrementa significativamente durante la maduración. Esto se explica debido al cambio de color de la fruta durante este proceso reemplanzando el color verde por purpura el cual incrementa durante la maduración. La comparación de los datos obtenidos para los tres tiempos de cosecha muestran que los valores de *b** fueron menores para el estado verde en la cosecha de agosto (figura 2B), lo cual puede ser atribuido al tiempo de sequia que se presentó en ese mes del año.

La aplicación del análisis de imagen es útil para la industria porque puede ser posible la diferenciación y la determinación del estado de madurez de la fruta al comparar el color de la cáscara con cartillas de color obtenidas a partir de los datos de análisis de imagen.

4.3 Análisis de pigmentos

El color de la cáscara de gulupa es uno de los criterios más usados para juzgar el estado de madurez del fruto. La fruta normalmente cosechada en un estado inmaduro es de color verde y algunas veces con puntos color rosa, después de cosechada el color purpura continua desarrollándose hasta cubrir toda la cáscara. Por esto el contenido de antocianinas fue determinado en los tres estados de madurez usando el método de pH diferencial.

No fué posible determinar el contenido en el estado verde pues este no presentó absorbancia a 520 nm; en contraste el contenido de antocianinas se incrementó en los estadios pintón y maduro. La cantidad fue casi cuatro veces mayor en el estado maduro que en el estado pintón. El estudio de los ERA por HPLC-DAD en los tres estados de madurez mostró la presencia de una antocianina mayoritaria con un máximo de absorción en 511 nm (Figura 9). La presencia de fragmentos característicos en el análisis en ESI-EM mostró que este compuesto es un derivado de cianidina (m/z 287). Finalmente este compuesto fue identificado como cianidina-3-O-β-D-glucopiranósido por comparación de sus características

cromatograficas con las exhibidas en las muestras patrones pertenecientes a nuestro grupo de investigación. Adicionalmente el espectro de masas exhibió ion molecular en m/z en 449.1039, que concuerda con el calculado para $C_{21}H_{21}O_{11}(M^+)$: 449.1078.

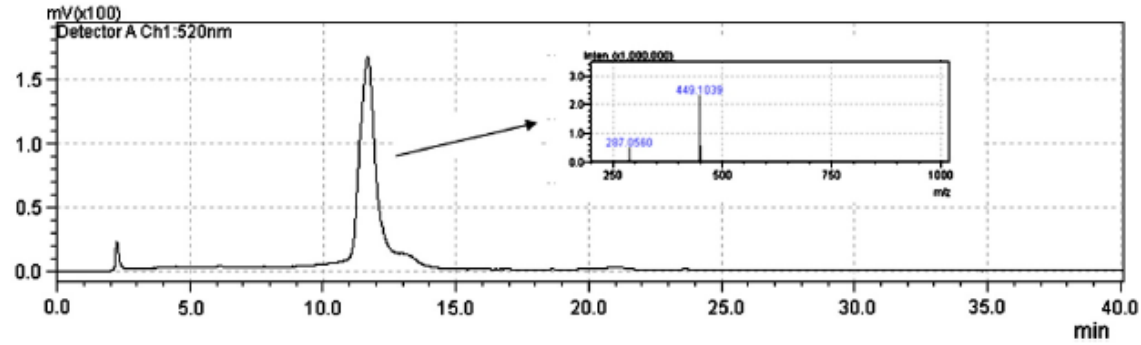


Figura 8. Análisis de HPLC para el ERA obtenido a partir de cáscara de gulupa en estado maduro y espectro ESI-EM de cianidina-3-β-D-glucopiranósido.

4.4 Análisis de Componentes Principales (ACP)

El análisis de componentes principales es útil para conocer de una manera global la correlación entre dos variables, es decir la dependencia y la interdependencia entre estas. Así como la influencia que estas ejercen sobre cada uno de los resultados. En este análisis se realizó un escalamiento de las variables para eliminar la dependencia de los valores a su unidad y escala, de esta manera se hacen comparables a las demás, adicionalmente la importancia de la variable dependerá de su varianza o información y no de su escala.

Este análisis describe como las muestras son posicionadas en el nuevo espacio de las componentes principales. Cada componente principal representa la dirección de máxima variancia o información de los datos. Para los datos de maduración de la gulupa, se escogieron 2 componentes principales que tienen en cuenta el 52.26% y el 29.18% de la varianza total, respectivamente.

El descarte de datos fue llevado a cabo siguiendo el modelo de ACP, con las gráficas del estadístico Q y la T^2 de Hotelling. El estadístico Q indica cuán bien cada muestra se ajusta al modelo de la ACP. Un valor de Q alto significa que la muestra es muy aproximada, mientras que un valor bajo indica que esta se encuentra bien representada. La T^2 de Hotelling indica si una muestra es explicada por el modelo. T^2 de Hotelling alto indica que la muestra está en el modelo pero es distante a las otras, contrario a esto un T^2 de Hotelling bajo indica que esta es explicada bajo el modelo y es igual a las demás.[43] Con respecto al valor de Q solo pocos datos fueron desviados del modelo debido a que muestran un valor alto (Figura 9).

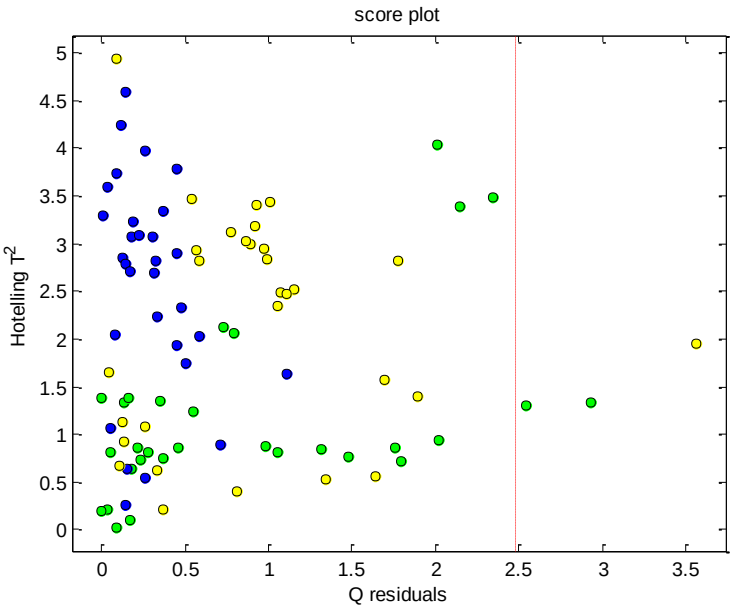
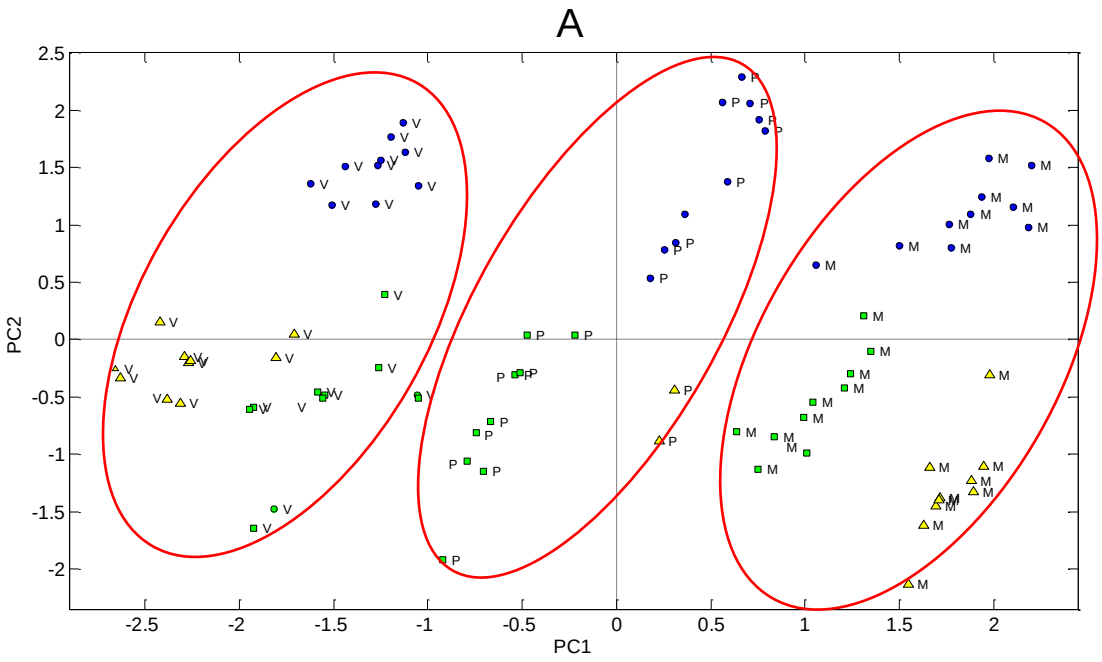


Figura 9. Gráfica de Q y T^2 de Hotelling para gulupa en diferentes estados de madurez.

El análisis de ACP mostró la tendencia de los datos a organizarse en grupos de acuerdo a su estado de madurez (Figura 10 A), cada color corresponde a una cosecha diferente, el color verde (cosecha de junio), el color azul (cosecha de agosto) y finalmente el color amarillo (cosecha de octubre). Los datos de la cosecha de agosto los datos fueron diferentes de los otros dos, lo cual se puede

explicar por el tiempo de sequia que se presentó en la región durante ese tiempo, que probablemente influyó en el desarrollo normal de la fruta.[53]

La gráfica del ordenamiento de las variables sobre las componentes principales muestra que el contenido de sólidos solubles totales (°Brix) es una variable importante para el estado maduro (Figura 10 B). Los altos valores de esta variable en este estado son explicados debido al aumento del contenido de carbohidratos como resultado del proceso de maduración lo que convierte esta variable en un parámetro determinante para conocer el estado de madurez del fruto. En el caso de la acidez titulable se observa un valor alto sobre la segunda componente principal; además, esta es una variable importante en la determinación del estado de madurez verde, debido a que la concentración de ácidos en este estado es mayor que en los otros.



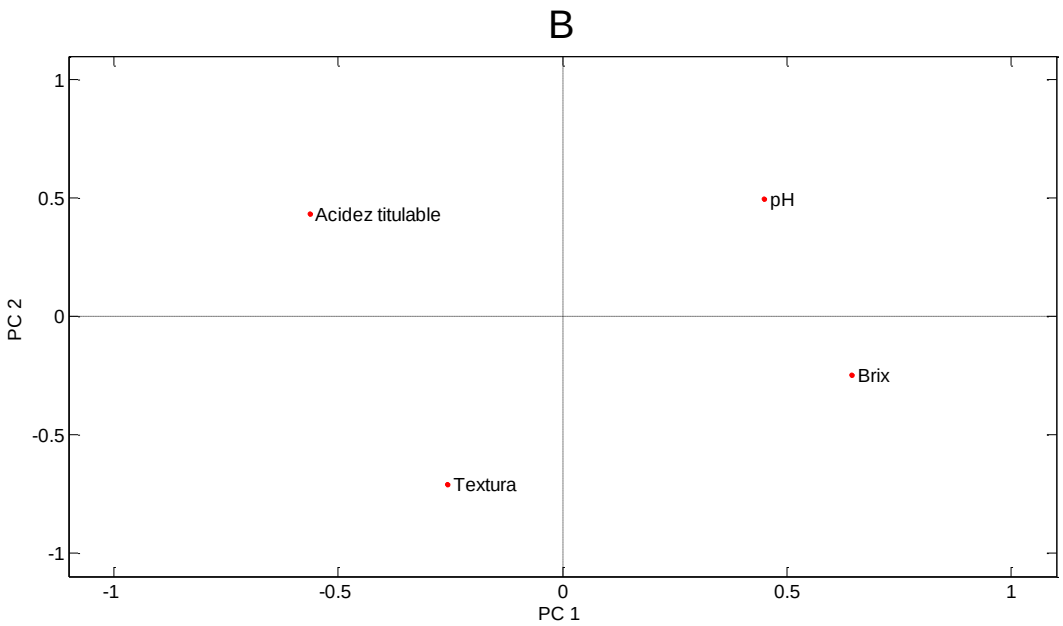


Figura 10. Análisis de componentes principales. A, datos organizados en el nuevo espacio de las componentes V (verde), P (pintón) y M (madura); ▲ (octubre), ■ (junio) y ● (agosto). B, distribución de las variables en el espacio de las nuevas componentes.

También presentó una correlación negativa con los °Brix, es decir que entre mayores valores tome la acidez titulable, menores valores se obtendrán para los °Brix y viceversa.

La textura fue una variable que no varió significantemente en los diferentes estados de madurez y no contribuye a la clasificación de la gulupa. En la gráfica 10 B se observa que no tomó valores importantes sobre las componentes principales, es decir no fué determinante para la distribución de los datos sobre el nuevo espacio. Finalmente se puede inferir que bajo las condiciones de estudio los grupos o “clusters” obtenidos permiten clasificar la gulupa según su estado de madurez de acuerdo a sus características fisicoquímicas.

4.5 Análisis de volátiles

En primera instancia se caracterizaron los compuestos volátiles obtenidos por HS-MEFS en los tres estados de madurez. Estos resultados junto con los índices de retención, las notas olfativas y la cantidad relativa en los tres estadios de madurez se presentan en la Tabla 2. En las condiciones del análisis se identificaron veinticinco compuestos volátiles que se reportan por primera vez como constituyentes volátiles de la gulupa. Los componentes mayoritarios en los tres estadios de madurez fueron ésteres y C_{13} norisoprenoides.

Se detectaron tres compuestos monoterpenoides presentes en los estados II y III, el único que aumento su concentración relativa con la maduración fue el 1,8-cineol.

La mayoría de compuestos tipo C_{13} norisoprenoides presentó un aumento en su concentración relativa con la maduración, en los casos que no hubo aumento la concentración relativa se mantuvo constante a excepción de la β-ionona que tuvo sus máximos de concentración en los estados I y II.

Tabla 2. Volátiles identificados por HS-MEFS en gulupa en tres diferentes estados de madurez (verde I, pintona II y madura III).

No.[a]	Compuesto	IR[c]		Estado/Cantidad (µg/kg de fruta)			Nota Olfativa[d]
		FFAP	RTX-5	I	II	III	
1	acetato de etilo	889	623	968±59	179±4	182±7	frutal, fresca
2	butanoato de etilo	1024	801	-	140±16	189±74	frutal
3	acetato de butilo	1086	-	-	13±1	39±5	como piña
4	1,8-cineol	1199	-	-	47±4	111±2	verde
5	hexanoato de etilo	1226	1001	-	23±4	133±14	frutal
6	*trans*-β-ocimeno[b]	1240	1050	-	147±11	124±7	frutal
7	acetato de hexilo	1264	1016	95±5	205±6	264±10	graso
8	3-hexenoato de etilo[b]	1294		-	67±5	46±6	-
9	acetato de *cis*-3-hexenilo	1308	1002	42±7	267±7	219±8	frutal
10	heptanoato de etilo	1322	1095	-	10±2	9±4	-
11	butanoato de 1-metilhexilo[b]	1391	-	-	25±2	32±3	-
12	butanoato de hexilo	1405	1194	-	147±29	979±21	frutal
13	octanoato de etilo	1425	1199	-	599±22	2347±33	frutal
14	butanoato de *cis*-3-hexenilo	1449	1188	-	-	117±18	frutal
15	edulano II[b]	1454	1259	214±26	394±45	633±1	-
16	Edulan0 I[b]	1462	1316	139±19	79±1	86±10	-
17	*cis*-4-octenoato de etilo[b]	1464	1192	-	20±8	34±10	-
18	linalol	1543	-	-	35±2	57±14	floral
19	7,8-dehydro-β-ionol[b]	1584	-	-	39±10	222±6	Similar a moho
20	megastigma-4,6(Z),(8)-trieno[b]	1594	1363	-	129±4	132±14	-
21	hexanoato de hexilo	1597	1388	209±14	164±2	540±44	Similar a manzana
22	hexanoato de *cis*-3-hexenilo	1643	1383	278±23	112±16	213±14	-
23	acetato de bencilo	1713	1163	-	63±5	32±4	floral
24	benzoato de 2-hidroximetilo[b]	1753	-	840±20	129±10	64±10	-
25	β-ionona	1933	1489	39±12	13±2	31±1	floral, violeta

[a]Los compuestos fueron numerados de acuerdo a su tiempo de retención en la columna FFAP; [b] tentativamente identificados por su espectro de masas; [c]IR= índice de retención; característica olfativa percibida en el detector de aroma durante CG-O; - no detectado

Los compuestos tipo éster representaron más del 80% de los volátiles totales para los estados II y III, presentando mayor concentración relativa el butanoato de hexilo y el octanoato de etilo. La mayoría de estos compuestos aumentaron o

mantuvieron igual su concentración relativa. El único compuesto de esta clase que disminuyó con la maduración fue el acetato de etilo que mostró su máximo de concentración en el estado de madurez I.

Con el estudio previo de los volátiles se escogió el estado III para el análisis olfativo. Un total de 16 regiones activas olfativamente se detectaron, entre los cuales hay diez áreas con aroma frutal (1-3, 5-6, 9, 12-14, 21), tres notas florales (18, 23, 25), una nota similar a moho (19), y dos notas verdes (4, 8).

En el estado de madurez I, se obtuvo el menor número de compuestos volátiles, así mismo, se encontró la menor cantidad de zonas activas olfativamente. Esto se relaciona directamente con el perfil sensorial de la fruta (Figura 11), donde se percibió poca intensidad en el aroma, predominando la nota verde. En los estados II y III se detectaron casi la misma cantidad de compuestos volátiles; sin embargo, la concentración relativa fué diferente. Esto concuerda con la similitud en el perfil sensorial de la gulupa para estos dos estados, donde las diferencias fueron pocas. Entre las cuales cabe destacar el aumento de la nota frutal y la disminución de la nota verde en el estado maduro.

Estos resultados se pueden correlacionar con la caracterización de los compuestos volátiles del maracuyá morado (*Passiflora edulis*). En donde los compuestos mayoritarios fueron ésteres. En general, los ésteres C4 y C6 predominan en las diferentes especies de Passifloraceaes. Además de los ésteres, otros componentes volátiles del maracuyá morado son los C_{13} norisoprenoides, que se han considerado los compuestos impacto del aroma de esta especie. Estos compuestos se detectaron en gulupa, pero no se encontró ningún interés en el aroma de la fruta en las condiciones del análisis.

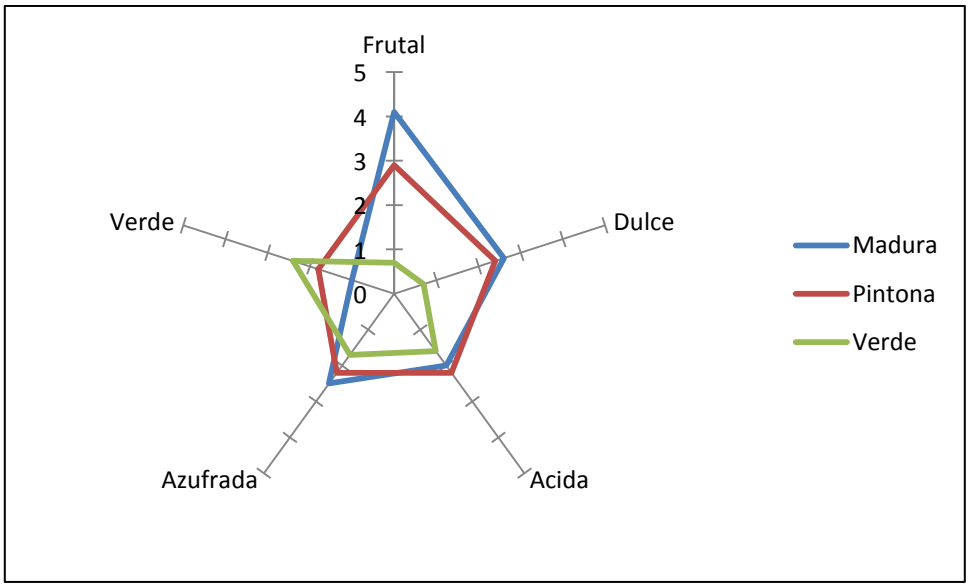


Figura 11. Perfil sensorial de pulpa de gulupa en tres estados de madurez (verde, pintona y madura).

4.6 Análisis de aroma de gulupa

La gulupa se caracteriza por su exótico e intenso aroma que la hace altamente atractiva para los consumidores, sin embargo hasta el momento no existe ningún estudio al respecto.

Para el estudio de aroma se realizaron ensayos preliminares para elegir el solvente a utilizar, por esto la pulpa de gulupa se sometió a extracción con solventes de diferente polaridad (pentano, éter etílico y diclorometano), con el objeto de obtener un extracto cuya percepción olfativa fuese lo más cercana posible al aroma de la fruta fresca. El análisis olfativo arrojó como resultado que el extracto que representaba mejor el aroma de la fruta fresca era el obtenido con diclorometano. Sin embargo el extracto obtenido con este solvente exhibía un color amarillo debido a la presencia de pigmentos que dificultan el proceso de concentración y su posterior análisis cromatográfico. Este inconveniente se superó con la utilización del método de extracción SAFE ya que es una destilación a

presión reducida que permite separar los compuestos cuya presión de vapor es igual o menor a la del solvente de extracción.

Una vez se obtuvo un extracto que representara el aroma de la fruta se analizó por CG-O detectando cada una de las zonas activas olfativamente. Este estudio cualitativo del aroma se complementó con un análisis cuantitativo (AEDA), en donde se determinó la contribución de cada zona activa olfativamente en el aroma global de la gulupa. Los resultados del AEDA se expresaron como valores FD (Factor de dilución de aroma), los cuales indican el número de partes de solvente necesarios para que un componente olfativamente activo deje de ser percibido en el extracto de aroma de la fruta.

Como resultado se detectaron 19 compuestos activos olfativamente en el aroma de la gulupa, en donde se encuentran notas frutales, florales, cremosas, verde, champiñón, azufrados, vainilla, entre otras.

La identificación de los compuestos activos olfativamente se realizó mediante la comparación de los criterios cromatográficos, espectrales (Anexo 1) y olfativos de cada analito contra sustancias de referencia, analizados bajo las mismas condiciones. Debido a que se presentaron algunos inconvenientes en la obtención de los espectros de masas de los compuestos fue necesario fraccionar para reducir a complejidad del extracto. La extracción selectiva de tioles dió como resultado la identificación del acetato de 3-sulfanilhexilo el cual es el responsable de la nota “como sudor” dentro del extracto, este compuesto se ha encontrado en otras frutas como es el caso de la guayaba.[54] También se fraccionó el extracto en compuestos neutros básicos y compuestos de naturaleza ácida. En la fracción ácida se identificaron los ácidos butanoico y una mezcla de 2 / 3-metilbutanoico los cuales bajo las condiciones de análisis no se pudieron separar, sin embargo por las características espectrales (ver anexo 1) teniendo en cuenta la longitud de los picos m/z 74 para el ácido 2-metilbutanoico y m/z 60 para el ácido 3-metilbutanoico se estableció un contenido en la mezcla de 70% y 30%

respectivamente. La fracción CNB se sometió a separación en una columna de sílica. Se recogieron en total 16 fracciones las cuales se analizaron por CG-O para localizar los compuestos del AEDA y de esta manera analizarlos por CG-EM para obtener su espectro de masas, de aquí se lograron identificar en gran mayoría de los compuestos con excepción de la 1-octen-3-ona y el metional, los cuales se identificaron teniendo en cuenta sus características cromatográficas y su nota característica de olor. Estos resultados se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3. Compuestos activos olfativamente en el aroma de la gulupa.

N°	Compuesto[a]	Nota Olfativa[b]	IR[c]		FD[d]
			FFAP	DB-5	
1	2-metilpropanoato de etilo	frutal, dulce	967	758	64
2	2,3-butanodiona	cremoso	980	589	8
3	butanoato de etilo	frutal	1027	803	4096
4	3-metilbutanoato de etilo	frutal, dulce	1064	853	8
5	(*Z*)-3-hexenal	verde	1147	793	16
6	hexanoato de etilo	frutal	1227	998	64
7	1-octen-3-ona[f]	champiñón	1295	975	8
8	metional[f]	papa cocinada	1445	903	2
9	linalol	floral, cítrico	1538	1096	8
10	ácido butanoico	rancio	1620	811	1
11	ácido 2/3-metilbutanoico[e]	rancio	1675	885	16
12	acetato de 3-sulfanilhexilo[f]	sudor	1711	1245	8
13	geraniol	floral	1841	1236	256
14	β-ionona	floral	1928	1483	8192
15	δ-octalactona	coco, caramelo	1956	1283	64
16	γ-nonalactona	coco	2018	1360	8192
17	cinamato de etilo	floral	2128	1467	1024
18	γ-decalactona	coco	2138	1468	64
19	vainillina	vainilla	2570	1414	128

[a] Los odorantes fueron numerados a partir de su orden de elución en la columna FFAP. La identificación de los compuestos se basó en la comparación de los índices de retención en las columnas FFAP y DB-5, sus espectros de masa obtenidos por CG-EM y su nota característica con respecto a los compuestos de referencia.
[b] Característica de olor percibida en el puerto de olfatometría.
[c] IR = índice de retención.
[d] FD = factor de dilución del flavour.
[e] Los isómeros no fueron separados por CG con las columnas utilizadas. Los datos del espectro de masas muestran una mezcla del ácido 2 y 3-metilbutanoico. Su proporción fue calculada a partir de los fragmentos característicos en su espectro de masas como 70 % ácido 2 y 30 % 3-metilbutanoico.
[f] Compuestos identificados por su índice de retención en las columnas FFAP y DB-5 y su característica de olor.

Los FD mas altos (Tabla 3) los tuvieron los compuestos butanoato de etilo (frutal), β-ionona (floral), γ-nonalactona (como coco) y cinamato de etilo (floral), por lo cual podemos decir que estos compuestos son importantes en el aroma de la gulupa.

En el caso de la gulupa no solo los ésteres contribuyeron al aroma de la fruta como en la mayoría de las pasifloraceaes, sino que otros compuestos como la β-ionona y γ-nonalactona son importantes para el aroma de esta fruta. En comparación con el análisis de volátiles donde se encontraron ésteres y compuestos C_{13} norisoprenoides en mayor proporción, estos no fueron relevantes en el aroma de la fruta. Estos resultados justifican el análisis del aroma realizado.

5 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

A partir de los datos obtenidos para las características fisicoquímicas (sólidos solubles totales, textura, color y acidez titulable) se realizó la caracterización fisicoquímica de la gulupa (*Passiflora edulis* Sims. fo. *edulis*) durante el proceso de maduración *in situ*. Con estos resultados y con el análisis de componentes principales fue posible definir que los grados Brix, el pH y la acidez titulable presentan cambios significativos con la madurez y son parámetros útiles para diferenciar los tres estadios de madurez utilizados en este estudio; en contraste, la textura no presentó variación significativa durante el proceso de maduración.

Por medio del análisis de imagen se obtuvieron las graficas de color las cuales mostraron que la gulupa puede ser diferenciable teniendo en cuenta este parámetro.

Se identificó cianidina-3-O-β-D-glucopiranósido como la antocianina mayoritaria presente en la cáscara de gulupa (*Passiflora edulis* Sims. fo. *edulis*). La concentración de antocianinas aumenta con la maduración hasta llegar a un valor de 1.73 ± 0.18 g de cianidina-3-glucopiranósido / kg de fruta.

Del estudio de los compuestos volátiles por HS-MEFS durante la maduración de la gulupa (*Passiflora edulis* Sims. fo. *edulis*), se encontraron 25 compuestos volátiles que en su mayoría aumentan su concentración durante la maduración; como compuestos mayoritarios se encontraron los compuestos tipo éster. En el estudio del aroma de la gulupa (*Passiflora edulis* Sims. fo. *edulis*) por medio de las técnicas modernas se encontraron 19 compuestos activos olfativamente. Los compuestos de mayor FD en la fruta fueron la β-ionona y γ-nonalactona a pesar de no estar en mayor proporción dentro de los volátiles.

Se recomienda la realización de la cuantificación de los compuestos activos olfativamente en gulupa (*Passiflora edulis* Sims. fo. *edulis*) con el uso de

estándares marcados isotópicamente (SIDA) para la realización de estudios de recombinación y de esta manera establecer los compuestos impacto en el aroma de la fruta.

BIBLIOGRAFIA

[1] S. Nagy., P. E. Shaw. Tropical and Subtropical Fruits Composition, Properties and Uses. The Avi Publishing Company Inc. Wesport, Connecticut. 1980.

[2] http://www.alimentacionsana.com.ar/Portal%20nuevo/actualizaciones/frutastropicales.htm Consultada Octubre 2010.

[3] Proexport Colombia. http://www.proexport.com.co/SIICExterno/IntelExport/Producto/Importaciones.aspx?Tipo=Bieneses&Menu=IntelExportIntelExportProductos&seleccion=Importaciones_Realizadas&Header=IntelExport. Consultada Octubre 2010.

[4] M. Agustí., Fruticultura. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. 2004. Pág. 493.

[5] J. Aranceta., C. Pérez-Rodrigo. Maduración de la Fruta. 2006. III MASSON. Barcelona, España. Pág. 8.

[6] L. Hart., H. Fisher. Análisis Moderno de los Alimentos. Editorial Acribia. España. 1984. Pág. 270.

[7] J. Pech., M. Bouzayen., A. Laché. Climateric fruit ripening: Ethylene-dependent and independent regulation of ripening pathway in melón fruit. *Plant Sci*. 2008, 175, 114.

[8] C. Fisher., T. Scott. Food Flavours. Biology and Chemistry. The Royal Society of Chemistry. Newark. 1997. Pág. 25-41.

[9] K. Dang., Z. Singh., E. Swinny. Edible coating influence fruit ripening, quality, and aroma biosynthesis in mango fruit. *J. Agric. Food Chem*. 2008, 56, 1361.

[10] N. Potter. La Ciencia de los Alimentos. Edutex S.A. Zaragoza. España. 1978.

[11] G. Hough., S. Fiszman. Estimación de la Vida Útil Sensorial de los Alimentos. Programa CYTED. Madrid. España. 2005.

[12] L. Dufossé., P. Galaup., E. Carlet., C. Flamin., A. Valla. Spectrocolorimetry in the CIE *L**a*b* Color space as useful tool for monitoring the ripening process and the quality of PDO red-smear soft cheese. *Food Res. Int*. 2005, 38, 919.

[13] K. L. Yam., S. E. Papadakis. A simple digital imaging method for measuring and analyzong color of food surfaces. *J Food Eng.* 2004, 62, 137.

[14] http://www.gusgsm.com/debo_usar_la_especificacion_lab_o_la_lcab_hab. Consultada Octubre 2010.

[15] M. Mínguez. Clorofilas y Carotenoides en Tecnología de Alimentos. Universidad de Sevilla. España. 1997.

[16] H. M. Merken., G. R. Beecher. Measurement of food flavonoids by high-Performance liquid chromatography: A review. *J Agric. Food Chem*. 2000, 48 (3), 577.

[17] M. Giusti., P. Jing. Analysis of anthocyanins. En: Food Colorants Chemical and Functional Properties. Ed. C. Socaciu. CRC Press Taylor & Francis Group. United States. 2008.

[18] J. Kong., L. Chia., N. Goh., T. Chia., R. Brouillard. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*. 2003, 64, 923.

[19] C. Da Costa., D. Horton., S. Margolis. Analysis of anthocyanins in foods by liquid chromatography, liquid chromatography–mass spectrometry and capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A*. 2000, 881, 403.

[20] J. Ames., T. Hofmann. Selected natural colorants in foods and beverages. En: Chemistry and Physiology of Selected Food Colorants. Ed. J. Ames., T. Hofmann. ACS Symposium series 775. Washington. 2000.

[21] C. Frøytlog., R. Slimestad., Ø. Andersen. Combination of chromatographic techniques for the preparative isolation of anthocyanins- applied on blackcurrant (*Ribes nigrum*) fruits. *J. Cromatogr. A.* 1998, 825, 89.

[22] C. Osorio., B. Acevedo., S. Hillebrand., J. Carriazo., P. Winterhalter., A. L. Morales. Microencapsulation by spray-drying of anthocyanin pigments from corozo (Bactris guineesnsis) fruit. *J. Agric. Food Chem.* 2010, 58(11), 6977.

[23] M. Schwarz., S. Hillebrad., S. Habben., A. Degenhardt., P. Winterhalter. Application of high-speed countercurrent chromatography to the large-scale isolation of anthocyanins. 2003, 14, 179.

[24] B. Ardrey. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An Introduction. Wiley. England. 2003. Pág. 123.

[25] V. Hong., R. Wrolstad. Use of HPLC separation/photodiode array detection for characterization of anthocyanins. *J. Agric. Food Chem*. 1990, 38, 708.

[26] M. Giusti., L. Saona., D. Griffin., R. Wrolstad. Electrospray and tandem mass spectroscopy as tools for anthocyanin characterization. *J Agr. Food Chem*. 1999, 47, 4657.

[27] R. Marsili. Flavor, Fragrance and Odor Analysis. Marcel Dekker, Inc. New York. USA. 2002. Pág. 75-82.

[28] W. Engel., W. Bahr., P. Schieberle. Solvent assisted flavour evaporation: a new and versatile technique for the careful and direct isolation of aroma compounds from complex food matrices. *Eur. Food. Res. Technol*., 1999, 209, 237.

[29] G. Reineccius. Flavor Chemistry and Technology. CRC Press-Taylor and Francis Group. Second edition, USA; 2006, pág. 489.

[30] P. Schieberle. New developments in methods for analysis of volatile flavor compounds and their precursors. En: Characterization of Food: Emerging Methods. A.G. Gaonkar Ed., Elsevier, Amsterdam, 1995, pág. 403-443.

[31] B. d´Acampora Zellner., P. Dugo., G. Dugo., L. Mondello. Gas chromatography-olfactometry in food flavour analysis. *J. Chromatogr. A*. 2008, 1186, 123-143.

[32] W. Grosch. Determination of potent odourants in foods by aroma extract dilution analysis (AEDA) and calculation of odour activity values (OAVs). *Flavour Fragr. J*. 1994, 147.

[33] E. Carasek., J. Pawliszyn. Screening of tropical fruit volatile compounds using solid-phase microextraction (SPME) fibers and internally cooled SPME fiber. *J. Agric. Food Chem.* 2006, 54, 8688.

[34] M. J. Jordán., K. L. Goodner., P. E. Shaw. Characterization of the aromatic profile in aqueous essence and fruit juice of yellow passion fruit (*Passiflora edulis* Sims F. *Flavicarpa degner*) by GC-MS and GC/O. *J. Agric. Food Chem*. 2002, 50, 1523.

[35] T. Parliment. Volatile constituents of passion fruit. *J. Agric. Food Chem.*, 1972, 20, 1043.

[36] C. Chen., M. Kuo., J. Hwang., J. Swi-Bea., C. Wu. Headspace components of passion fruit juice. *J. Agric. Food. Chem*. 1982, 30, 1211.

[37] P. Brat., J. Brillouet., M. Reynes., P. Cogat., D. Ollé., Free volatile components of passion fruit puree obtained by flash vacuum-expansion. *J. Agric. Food. Chem*. 2000, 48, 6210.

[38] P. Winterhalter. Bound terpenoid in the juice of the purple passion fruit (*Passiflora edulis* Sims). *J. Agric. Food Chem*. 1990, 38, 452.

[39] H. Strohalm., M. Dregus., A. Wahl., K. Engel. Enantioselective analysis of secondary alcohols and their esters in purple and yellow passion fruit. *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55, 10339.

[40] L. P. Restrepo. Compuestos volátiles del aroma de la gulupa (*Passiflora maliformis*). Tesis de M.Sci en Química. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. 1989.

[41] R. Camacho. Manual práctico de frutales. Temas de orientación agropecuaria. Número 91-92. 7ª edición. Agosto 1987.

[42] L. Kidøy., A. M. Nygård., Ø. M. Andersen., A. T. Pedersen., D. W. Aksnes., B. T. Kiremire. Anthocyanins in fruits of *Passiflora edulis* and *P. suberosa*. *J. Food Comp. Anal*. 1997, 10, 49.

[43] I., Pinzón., G., Fischer., G., Corredor. Determinación de los estados de madurez del fruto de la gulupa (*Pasiflora edulis* Sims.). *Agronomía Colombiana*. 2007, 25, 83.

[44] L. G. Diaz M., Estadistica multivariada: Inferencia y Métodos. Departamento de Estadística. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. Sede Bogota. 2007. Pag. 197-242.

[45] K. L. Goodner., R. L. Rouseff., H. J. Hofsommer. Orange, mandarin and hybrid classification using multivariate statistics based on carotenoid profiles. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 1146.

[46] H. Son., G. Hwang., w. Park., Y. Hong. C. Lee. Metabolomic characterization of malolactic fermentation and fermentative behaviors of wine yeast in grape wine. *J. Agric. Food Chem.* 2009, 57, 4801.

[47] AOAC (2006). *Official Methods of Analysis of AOAC International* (18th ed.). Gaithersburg, USA: Association of Official Analytical Chemists.

[48] J. C. Barrios., A. L. Morales. Tabla de índices de kovats. En C. Duque., A. L. Morales (Eds.), El Aroma Frutal de Colombia. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá (Colombia). 2005. Pág. 335-341.

[49] A. Degenhardt., H. Knapp., P. Winterhalter. Separation and purification of anthocyanins by high-speed countercurrent chromatography and screening for antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* 2000, 48, 338.

[50] C. Osorio., B. Acevedo., S. Hillebrand., J. Carriazo., P. Winterhalter., A. L. Morales. Microencapsulation by spray-drying of anthocyanin pigments from corozo (Bactris guineesnsis) fruit. *J. Agric. Food Chem*. 2010, 58, 6977.

[51] M. M. Giusti., R. E. Wrolstad. Anthocyanins. Characterization and measurement with UV-Visible spectroscopy. En: R.E Wrolstad (Eds.), Current Protocols in Food Analytical Chemistry. New York (USA): Jhon Wiley and Sons. 2001. Unidad F1.2.

[52] J. Lee., C. Rennaker., R. Wrolstad. Correlation of two anthocyanins quantification methods: HPLC and spectrophotometric methods. *Food Chem*. 2008, 110 (3), 782-786.

[53] C. L. Moretti., L. M. Mattos., A. G. Calbo., S. A. Sargent. Climate changs and potential impacts on postharvest quality of fruit and vegetable crops: A review. *Food Res. Int*. 2010, 43, 1824.

[54] D. Sinuco., M. Steinhaus., C. Osorio., P. Schieberle. Characterization of odour-active compounds in two varieties of Colombian guava (*Psidium guajava* L.) during ripening. *Eur. Food Res. Technol*. 2010, 230, 859-864.

PRODUCCIÓN DE LA TESIS

Artículo

A. M. Jiménez., C. A. Sierra., F. J. Rodríguez-Pulido., M.L. González-Miret., F. J. Heredia., C. Osorio. Physicochemical characterisation of gulupa (*Passiflora edulis* Sims. fo. *edulis*) fruit from Colombia during the ripening. *Food Res. Int.* 2011.

Capitulo en libro.

A. Jiménez, C. A. Sierra, C. Osorio. Characterization of odor-active volátiles in gulupa (*Passiflora edulis* Sims. fo *edulis*). In: Flavor Chemistry & Biology. P. Shieberle, T. Hofmann, W. Meyerhof, Eds., DFA, Germany, 2011. En impresión.

Food Research International xxx (2010) xxx–xxx

Contents lists available at ScienceDirect

Food Research International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodres

Physicochemical characterisation of gulupa (*Passiflora edulis* Sims. fo *edulis*) fruit from Colombia during the ripening

Aleyda María Jiménez [a], Cesar Augusto Sierra [a], Francisco José Rodríguez-Pulido [b], María Lourdes González-Miret [b], Francisco José Heredia [b], Coralia Osorio [a,*]

[a] Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia, AA 14490, Bogotá, Colombia
[b] Lab. Food Colour and Quality, Department of Nutrition & Food Science, Faculty of Pharmacy, Universidad de Sevilla 41012-Sevilla, Spain

ARTICLE INFO

Article history:
Received 15 September 2010
Accepted 1 November 2010
Available online xxxx

Keywords:
Passiflora edulis Sims fo *edulis*
Ripening
Colour changes
Gulupa
Tropical fruit
Image analysis

ABSTRACT

Gulupa (*Passiflora edulis* Sims. fo *edulis*) is a tropical fruit native to America. This study was undertaken to characterize the physicochemical properties of this fruit in three maturity stages. In all stages, the pH, °Brix, texture, and titratable acidity were determined. pH value and solid soluble content increased during ripening and titratable acidity decreased during this process; in contrast, texture values did not show significance variance. It was confirmed the presence of cyanidin-3-*O*-β-D-glucopyranoside as major anthocyanin. The changes on colour were followed by tristimulus colorimetry using image analysis, a very useful new approach for the measurement of non-homogeneous colours. By using PCA (Principal Component Analysis), clusters of data corresponding to each stage could be defined. Additionally, the volatile composition was followed by HS-SPME (Headspace-Solid Phase Microextraction) and GC/MS (Gas Chromatography/Mass Spectrometry) analyses. The results showed an increase in the amount of volatile during fruit ripening, with aliphatic esters as major constituents.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The fruit species belonging to family *Passifloraceae* are mostly native to tropical America, and they are characterised by their exotic and distinctive aroma. They are shrubs or herbs, mostly climbers with auxiliary tendrils (Dhawan, Dhawan, & Sharma, 2004). Among these species, *Passiflora edulis* Sims. fo *edulis* commonly known as gulupa, chulupa or maracuyá púrpura, is a native species of the southern Andes, growing between 1600 and 2600 m, in climates with average temperatures between 16 and 22 °C. The fruits are round-shape, with a diameter between 4 and 6 cm, and green to purple peelings at maturity. Inside, they contain many seeds (as the other Passifloraceae species) surrounded by a gelatinous yellow pulp, that exhibited an intense aroma and sweet-acid taste. These fruits are considered as vitamin A, thiamine, riboflavin, niacin, calcium, phosphorus, and ascorbic acid source (Wenkam, 1990). Pulp is used to prepare juices and soft drinks. To the best of our knowledge there is not any chemical study concerning this fruit; however, the change of some physico-chemical properties during ripening has been published (Pinzón, Fisher, & Corredor, 2007).

Currently, Colombia is considered one of the main producer countries of tropical fresh fruit worldwide. This dynamic exportation of fruits is highly linked to the exotic fruit species, which are within the new preferences in the international markets due to they are innovative and exhibit excellent sensory, nutritional and/or nutraceuticals qualities. Tropical fruits belonging to the genus *Passiflora*, such as, the passion fruit (*Passiflora edulis* var. Flavicarpa), the purple passion fruit (*Passiflora edulis* Sims), granadilla (*Passiflora ligularis*), and gulupa (*Passiflora edulis* Sims. fo *edulis*), are species widely appreciated for their organoleptic properties and they have shown a positive growth rate in the export market in Colombia since 1995. For the case of gulupa, the main customers are Germany, the Netherlands, the UK and Belgium with sales of close to 1,700,000 USD in 2007 and up to 4,100,000 USD in 2008, being Germany the largest market taking approximately of 55% of annual production (Proexport Colombia, 2010). However, during the long shipping or air transportation periods of times, fruits undergo changes by accelerated ripening; they lose organoleptic quality generating economic losses for exporting companies up to 15% of the total volume shipped. Thus, the aim of this work was to physicochemically and sensory characterize gulupa fruits harvested in three maturity stages, to know the values of these parameters under natural ripening process. The long-term purpose is to use the obtained data as comparing quality parameters during postharvesting management of gulupa with polymeric packaging in order to preserve its sensory and nutritional characteristics during its long shipping. The development of these new polymeric materials is underway.

* Corresponding author. Tel.: +57 1 3165000x14472; fax: +57 1 3165220.
E-mail address: cosorior@unal.edu.co (C. Osorio).

0963-9969/$ – see front matter © 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.foodres.2010.11.007

2. Materials and methods

2.1. Plant material

The fruits (exportation quality) from different cultivars were harvested at three different degrees of maturity, and classified according to the peel colour as unripe (stage I, green), turning (stage II, purple-green), and full ripe (stage III, purple). The fruits collected in different cultivars of Cota, Cundinamarca, Colombia (whose location is latitude 4°N, longitude 74°W, and altitude 2400 m above sea level), were supplied by OCATI S.A in three different harvesting times (June, August, and October 2009), to perform all of the analyses by triplicate. Mean temperatures are more or less constant at 14 °C throughout the year with annual rainfall of about 1200 mm. The August lot was characterised by a drought season. Each sample lot consisted of 80 fruits. A voucher specimen (COL 527652) was identified and deposited at the Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia.

2.2. Physicochemical characterization

These analyses were carried out in the following way for each harvesting time and maturity stage: fruits were randomly chosen to create ten batches of eight fruits visually presenting the same high quality appearance in their physical characteristics (homogeneous colour, size, and without wrinkling). Each batch was considered as replicate. The chemical composition of the fruits was determined following the procedure published by AOAC (2006).

2.2.1. Titratable acidity and pH

Titratable acidity was determined by standard procedures (AOAC, 2006) using 1 g of pulp, and the results expressed as percentage of citric acid. The pH of the pulp was determined by using a C6820 pHmeter (Schott Gerate, Berlin, Germany).

2.2.2. Total soluble solids

Total soluble solids were determined by using an Atago refractometer (HRS-500, Tokyo, Japan) and the results were expressed as °Brix.

2.2.3. Texture

The texture of gulupa fruits was measured with a TA-TX PLUS texture analyser (Stable Micro Systems Ltda., Godalming, United Kingdom). Compression tests were performed with a 75 mm compression plate (P/75) at 2.0 mm/s until a 25% strain was reached. Each fruit was compressed in the equatorial section. All experiments were conducted at 18 °C and results were expressed as kg.

2.2.4. Anthocyanin content

Fruit peel (amount processed: 1.4 kg/3 kg fruit, 0.245 kg/0.507 kg fruit, and 0.220 kg/0.409 kg fruit at stage III, II, and I, respectively) were separately ground in a blender and extracted overnight with 900 mL of methanol–acetic acid (19:1 v/v) at room temperature, in the dark. After the solvent was removed under vacuum, the residue was applied to a 20.0×4.5 cm Amberlite XAD-7 resin open column (Aldrich Chemical Company, Milwaukee, WI, USA). The column was rinsed with water, and the adsorbed compounds were eluted with 1 L of methanol–acetic acid (19:1, v/v), according to the procedure described by Degenhardt, Knapp, and Winterhalter (2000). The solvent was removed under vacuum, and the aqueous residue was freeze-dried. The final product was 11.2 g, 2.1 g, and 1.1 g of anthocyanin-rich extract (ARE) of ripe, turning, and unripe fruits, respectively. HPLC analyses were performed as it was published by Osorio et al. (2010) for analyses of anthocyanins in *Bactris guineensis*. The concentration of anthocyanins in the ARE extracts was determined by the spectrophotometric pH-differential method (Giusti & Wrolstad, 2001; Lee, Rennaker, & Wrolstad, 2008). Dilutions were prepared in 0.025 M potassium chloride and in 0.4 M sodium acetate, adjusted respectively to pH 1.0 and 4.5 with HCl. The absorbance of each dilution was measured at 520 and 700 nm against a distilled water blank using a Thermo Scientific Evolution 300 UV–vis spectrophotometer (Thermo Electron Corporation, Madison, WI, USA). The total monomeric anthocyanin content was calculated as cyanidin-3-glucoside equivalents (in mg) per 100 mg of dry matter (ε value of cyanidin-3-glucoside dissolved in 0.1% HCl in methanol was 26,900 L cm^{-1} mol^{-1} and the molar mass is 449.2 g mol^{-1}).

2.2.5. HPLC-MS analyses

LC-MS analyses of fractions were performed using a Shimadzu LCMS-2010 System (Shimadzu, Tokyo, Japan) equipped with a UV/Vis detector (SPD-10A) and two pumps (LC-10AD) coupled on-line with a MS-2010 mass spectrometer. UV and MS data were acquired and processed using Shimadzu LCMS Solution software. The equipment also included an on-line DGU-14A degasser and a Rheodyne injection valve with a 5 μL loop. A LUNA RP-18 5 μm column (150×2.0 mm i.d., Phenomenex®, USA) was used for the analysis of the constituents present in each fraction. Two solvents composed of acetonitrile/water/formic acid: A, 3:87:10, *v*/*v*/*v*, and B, 50/40/10, *v*/*v*/*v*, were used at the flow rate of 0.2 mL/min (Schwarz, Hofmann, & Winterhalter, 2004). Linear gradient from 6% B to 20% B in 10 min, from 20% B to 40% B in 10 min, from 40% B to 50% B in 10 min, and from 50% B to 6% B in 5 min was used. The electrospray ionization (ESI) probe was operated in the positive mode: CDL, 300 °C; block at 240 °C; flow gas (N_2) at 4.5 L/min; CDL voltage, 150.0 kV; Q array voltage RF 150 V; detector voltage, 1.5 kV; and scan range *m*/*z* 100–800. HR-ESIMS was performed in the same conditions used by Osorio et al. (2010).

2.2.6. Colour measurement

The colour of the fruits (five) at different maturity stages was assessed by digital image measurements. The DigiEye imaging system (Luo, Cui, & Li, 2001) was used to capture digital images. The latter system includes a digital camera (Samsung A503, 5.2 Megapixels), a computer (provided with appropriate software), a colour sensor for calibrating displays, and an illumination cabinet designed by VeriVide Ltd. Digital images were taken in order to obtain the total appearance (non-homogeneous colour peel) of the fruits. In these measurements, the samples were illuminated by a diffuse D65 emulator. A pressed barium sulphate plate was used for calibration purposes. For each image, a 180×180 pixels fixed area was cut. The chromatic heterogeneity of the fruit was measured through the pixel proportion that deviate more than 10% of the average image intensity. The DigiFood® software (Heredia, González-Miret, Álvarez, & Ramírez, 2006) was used for image processing. In the CIELAB ($L^*a^*b^*$) colour space, L^* defines the lightness (taking values ranging from 0 (black) to 100 (white)) and coordinates a^* and b^* define the red-green and yellow-blue axes, respectively. From these coordinates, other colour parameters, namely chroma and hue, are defined within the space. The hue angle (h_{ab}) is the qualitative attribute of colour according to which each one have been traditionally regarded as bluish, yellowish, reddish, etc. Chroma (C^*_{ab}) is the attribute that allows to assess the degree of difference of any given hue relative to a grey colour with the same lightness, being considered the quantitative attribute of colourfulness. The colour parameters, chroma (C^*_{ab}) and hue (h_{ab}) were calculated according to the following equations (CIE 15, 2004):

$$C^*_{ab} = \left[\left(a^*\right)^2 + \left(b^*\right)^2\right]^{\frac{1}{2}}$$

$$h_{ab} = \arctan\left({}^{b^*}\!/_{a^*}\right)$$

Please cite this article as: Jiménez, A.M., et al., Physicochemical characterisation of gulupa (*Passiflora edulis* Sims. fo *edulis*) fruit from Colombia during the ripening, *Food Research International* (2010), doi:10.1016/j.foodres.2010.11.007

2.2.7. Volatile analyses

The volatile compounds released from the headspace of gulupa fruit pulp were analysed by HS-SPME (Headspace-Solid Phase Microextraction) (Carasek & Pawliszyn, 2006). The pulp of 10 fruits (at each maturity stage and harvesting time) was mixed and a portion of 10 g of fruit pulp, were equilibrated during 1 in a 20 mL sealed vial at 40 °C. The headspace was collected on a DVB/CAR/PDMS fibre (75 μm thickness, Supelco Inc., Bellefonte, PA, USA) during 1 h, and then directly injected (desorption time was set at 5 min) into an gas chromatograph Shimadzu GC-17A coupled to a selective mass detector QP5050 operated in splitless mode. Mass spectra were recorded in electronic impact (EI) ionization mode at 70 eV and were scanned in the range *m/z* 40–350 amu. A FFAP fused silica column (J&W Scientific, 30 m × 0.32 mm i.d., 0.25 μm film thickness) was used. The column oven was programmed from 50 (after 4 min) to 250 °C at 4 °C/min and the final temperature was held for 5 min; the injector temperature was maintained at 250 °C; carrier gas was 1.5 mL of He/min; and make up gas was nitrogen at 30 mL/min flow rate. All measurements were performed by triplicate.

Linear retention indices were calculated according to the Kovats method using a mixture of normal paraffin C_6–C_{28} as external references. Mass spectral identification was completed by comparing spectra with commercial mass spectral databases WILEY and EPA/NIH and by comparison with published data or with data from authentic reference standards (Barrios & Morales, 2005).

2.3. Aroma profile analysis

Sensory experiments were performed at 20 ± 1 °C in a sensory room with single cabins. Pulp of gulupa at each maturity stage was placed in glass vessels which were closed with ground glass lids. Then, the samples were presented to a well trained sensory panel consisting of 8 members. The assessors were asked to orthonasally evaluate the intensity of five odour qualities in the overall aroma of the gulupa fruit on a five point scale from 0 (not detectable) to 5 (intensely detectable). The odour qualities were compared with aqueous solutions of the following reference odorants: acetic acid (acid), (*Z*)-3-hexenal (green-grassy), ethyl butanoate (fruity), 3-sulfanyl-1-hexanol (sulphury), 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(*2H*)-furanone (caramel-sweet) (Schuh & Schieberle, 2006; Sinuco, Steinhaus, Schieberle, & Osorio, 2010). The concentrations of the reference odorant solutions amounted to 10 times the respective odour threshold. The data were analysed by variance and regression analysis and average values were compared using Tukey's test with a probability $p \leq 0.05$.

2.4. Statistical analysis

Principal Component Analyses (PCA) were applied to analyze the sets of data obtained during the physicochemical characterization of gulupa fruits at different maturity stage and harvesting time. PCA analysis was applied within MATLAB environment (The Mathworks, Natick, MA, USA). Similarity maps of images were drawn using the component scores. Interpretation of components was obtained by looking at the linear combination coefficients, called loadings.

3. Results and discussion

3.1. Physicochemical characterization

The pH and total soluble solids content of gulupa increased slowly whereas titratable acidity decreased at different maturity stages, with values significantly different between them (Table 1). The first finding is attributed to the hydrolysis of starch to sugars, according to the behaviour of carbohydrates during fruit ripening. The acidity varies due to the consumption of organic acids because of fruit respiration in this process. In most of the fruits during the ripening process usually occurs a softening and in the case of the gulupa the peel surface suffers a wrinkling; however, in the conditions of this study (fruits were ripened in the tree), external texture values of gulupa showed an almost constant value with no significant differences between the three stages. In a previous study (Pinzón et al., 2007), it was reported a firmness loss of 12% between green and ripe fruits, however the harvesting conditions were no specified.

Table 1
Physicochemical characterization of gulupa (*Passiflora edulis* Sims. fo *edulis*) fruit at different maturity stages.

Property		Stage I (Unripe)	Stage II (Turning)	Stage III (Full ripe)
Moisture content (% wet basis)[a]		85.3 ± 0.1[b]	83.2 ± 0.1[c]	82.1 ± 0.1[d]
Total soluble solids (°Brix)		13.5 ± 0.8[b]	15.8 ± 0.9[c]	17.4 ± 0.7[d]
pH		2.45 ± 0.20[b]	2.62 ± 0.16[c]	2.77 ± 0.20[c]
Acidity (% citric acid)		4.68 ± 0.39[b]	3.51 ± 0.51[c]	2.51 ± 0.60[d]
Texture (Kg)		18.65 ± 3.04[b]	17.47 ± 0.38[b]	17.46 ± 3.24[b]
Anthocyanin content (g cy-3-glu equiv./kg fruit)		–	0.45 ± 0.04[b]	1.73 ± 0.18[c]
Proteins (%)[a]		0.8 ± 0.1[b]	0.7 ± 0.1[b]	0.9 ± 0.1[b]
Lipids (%)[a]		0	0	0
Crude fibre (%)[a]		0.1	0.1	0.1
Carbohydrates (%)[a]		13.2 ± 0.1[b]	15.5 ± 0.1[c]	16.5 ± 0.1[d]
Ash (%)[a]		0.6 ± 0.1[b]	0.5 ± 0.1[b]	0.5 ± 0.1[b]
Colour parameters				
	L^*	55.5 ± 11.8[b]	34.8 ± 4.1[c]	20.1 ± 3.9[d]
	a^*	−18.9 ± 5.4[b]	−0.4 ± 2.4[c]	4.4 ± 2.8[d]
	b^*	40.5 ± 10.3[b]	14.6 ± 3.6[c]	3.0 ± 1.2[d]
	C^*_{ab}	45.2 ± 9.4[b]	14.91 ± 3.6[c]	5.5 ± 2.8[d]
	h_{ab}	116.1 ± 8.7[b]	88.8 ± 9.6[c]	38.2 ± 7.8[d]

All data are the mean of ten measurements ± standard deviation.
[a] Only three measurements.
[b-d] Equal letters in a file means that there are no significant differences based on Tukey test, (p<0.05); – = not detected.

3.2. Anthocyanin content

Fruit peel colour is a major criterion used to judge maturity of gulupa. The fruit usually harvested at unripe stage is green with scattered pink spots. After harvest, the purple colour continues to develop quickly until cover most of the peel. Thus, the anthocyanin content in the three stages were determined by using pH-differential method. It was no found any measurable content in the stage I; in contrast, the anthocyanin content increased in stage II, and in stage III the amount was almost four-times higher than stage II. The HPLC-PDA (High Perfomance Liquid Chromatography coupled to Photo Diode Array Detector) analysis of AREs at three maturity stages revealed the presence of one major anthocyanin with λ_{max} at 511 nm (Fig. 1). The presence of characteristic fragments of the anthocyanidin in the ESI–MS spectra evidenced that this compound was a derivative of cyanidin (*m/z* 287). Finally, this compound was identified as cyanidin-3-*O*-β-D-glucopyranoside by comparison of its chromatographic properties with those exhibited by samples belonging to our lab (Osorio et al., 2010). HR-ESIMS spectrum showed a molecular ion in m/z 449.1039 [calcd for $C_{21}H_{21}O_{11}$ $(M)^+$: 449.1078].

3.3. Colour analysis

The CIE colour coordinates were obtained by image analysis. The use of digital imaging is appropiate for colour measurements in non-homogeneous solids (such as fruit skins) and is a practical tool due to its sensitivity and low cost (Larraín, Schaefer, & Reed, 2008). Thus, the results obtained by tristimulus colorimetry showed a decrease in lightness (L^*) and chroma (C^*_{ab}) during ripening in agreement with the development of purple (dark) colour. The hue (h_{ab}) also diminished from stage I (118, 113, and 123, for each harvesting time) to stage III (43.8, 41.1, and 24.0, respectively), according with

Please cite this article as: Jiménez, A.M., et al., Physicochemical characterisation of gulupa (*Passiflora edulis* Sims. fo *edulis*) fruit from Colombia during the ripening, *Food Research International* (2010), doi:10.1016/j.foodres.2010.11.007

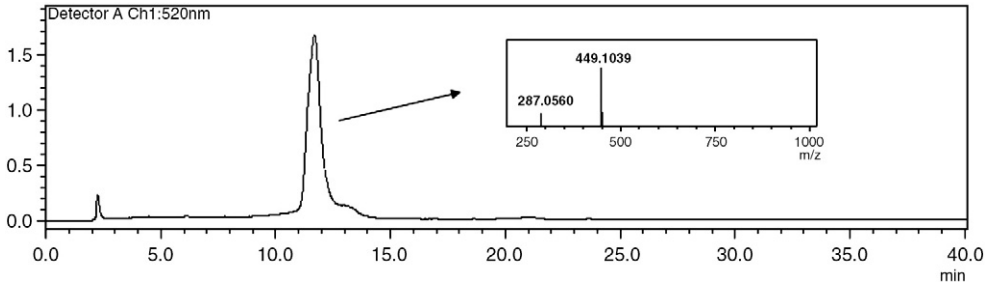


Fig. 1. HPLC analyses of ARE obtained from gulupa skin and ESIMS spectrum of cyanidin-3-*O*-β-D-glucopyranoside.

the change of colour from yellowish-green to dark-purple. The representation of data obtained by image analysis in the a^*b^* diagram of fruits from three different harvesting times (Fig. 2) showed a dispersion in agreement with the chromatic hetereogenity. However, the colour at different maturity stage could be well-differenciated. The most noticeable changes were detected in the a^* value, which increased significantly during ripening. This is in accordance with the replacement of the green colour with purple colour, which

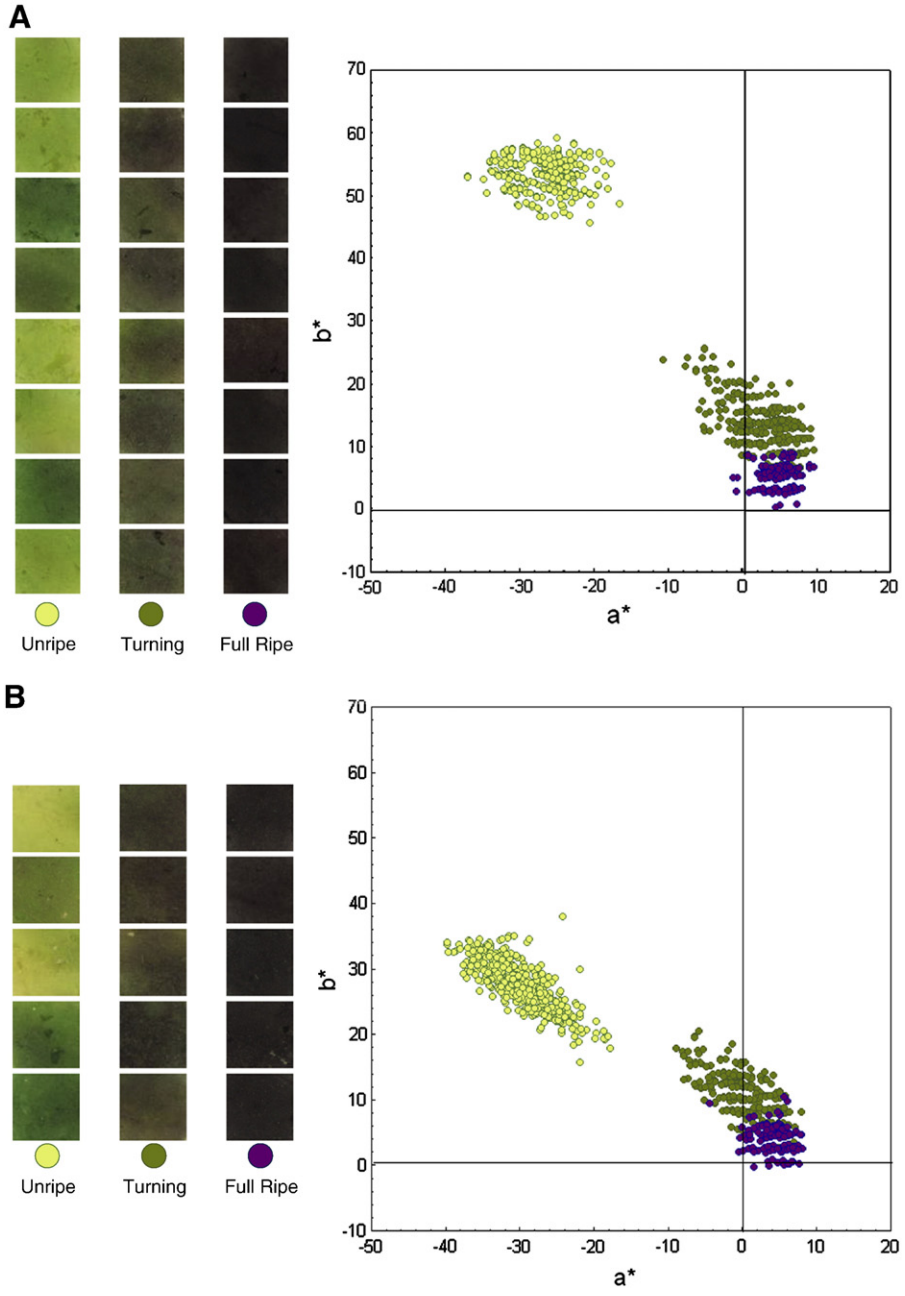


Fig. 2. Localisation area of gulupa peel colour on the (a^*b^*) diagram at three different harvesting times A) June B) August, and C) October 2009, at the three maturity stages.

Please cite this article as: Jiménez, A.M., et al., Physicochemical characterisation of gulupa (*Passiflora edulis* Sims. fo *edulis*) fruit from Colombia during the ripening, *Food Research International* (2010), doi:10.1016/j.foodres.2010.11.007

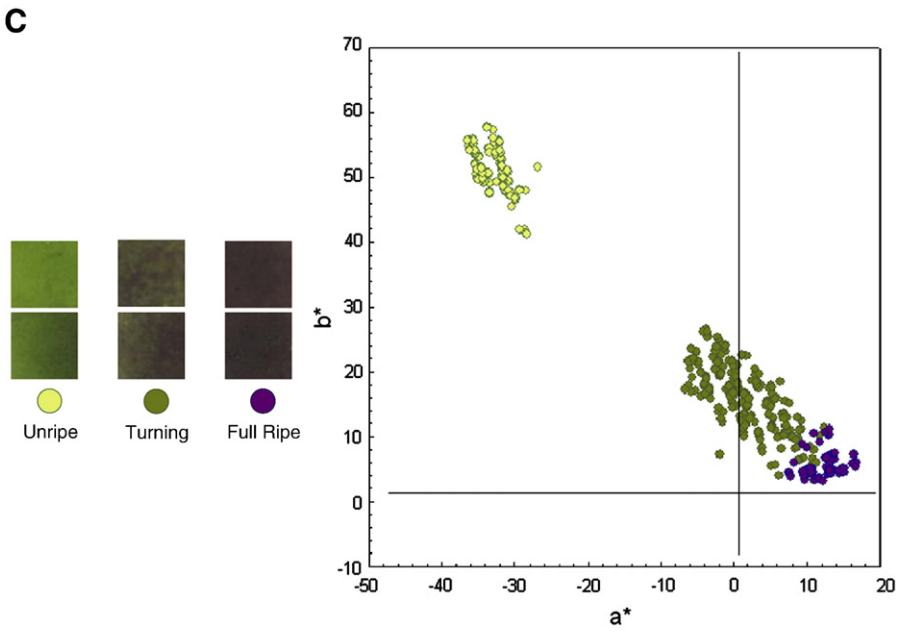


Fig. 2 (*continued*).

increased during this period. The comparison between the data obtained by the three different harvesting times, showed that the b^* values for the stage I at the second lot (Fig. 2B, August 2009) were lower than the other samples. Which could be attributable to a higher solar incidence because of the drought in this season. The application of the image analysis might be useful to the fruit industry, because is possible to determine the optimum maturation level by taking and analyzing digital images of the fruits. Additionally, standards colour charts for fruit maturation control could be made based on these images, since them include the total appearance of the fruit, not just the colour.

3.4. Sensory and volatile analysis

To get a preliminary idea of the changes in the overall fruit aroma during ripening, an aroma profile analysis was performed at the three maturity stages (Fig. 3). It was found that unripe fruits were characterised by predominant grassy and acid notes. During ripening a fruity, sweet, and sulphury odour notes were developed, but the grassy odour note was less intense.

The volatile compounds were analysed by HS-SPME finding an increase in the amount of volatile during ripening (Fig. 4). This technique was selected for the preliminary analysis of volatiles based on its high sensitivity as well as a simple and rapid sample preparation (Cheong et al., 2010). The ethyl octanoate, hexyl butanoate, hexyl hexanoate, and ethyl butanoate esters were found in significant amount in the stages II and III, indicating that their biogenesis is activated during fruit ripening (Jiménez, Sierra, & Osorio, in press). These compounds have been detected in other passifloraceas, such as yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) (Carasek & Pawliszyn, 2006) and purple passion fruit (*Passiflora edulis* Sims) (Parliment, 1972; Brat, Brillouet, Reynes, Cogat, & Ollé, 2000).

3.5. Principal component analysis (PCA)

To obtain a broad view on the physicochemical changes that occurs during gulupa ripening, the whole data set of pH, solid soluble content, texture, and titratable acidity was analysed by PCA. Each variable was located in the new space on the largest variance components or principal components (Fig. 5A). The first two principal components accounted for 52.26% and 29.88% of the total variance, respectively. Next, this analysis was further used to study the distances between the different parameters and allows getting more knowledge on the relationship between these different parameters. The physicochemical properties with the higher values (solid soluble content and pH) were placed over the first principal component. These are the most important variables during the ripening of the fruit and essential to classify the gulupa maturity stage. On the other hand, titratable acidity showed a high value over the second principal component, and a negative correlation to solid soluble content value. This fact is explained since the unripe fruits (stage I) had a higher content of acids which are consumed during the natural process of breathing. Texture is not a decisive parameter in the classification of maturity stage of gulupa, showing low values in the two main components. This parameter neither exhibited any influence over the maturity stages nor correlated with other variables, since its values were constant through ripening of gulupa (Table 1).

The discarding of data was performed based on the graphics of Q statistic and Hotelling's T^2. The Q value indicates how well each sample fits to the PCA model; a high value means that this is very approximate, while a low value indicates that the sample is well represented by the model. The Hotelling's T^2 defines whether a sample is explained by the model. High values indicate that the sample is in the model but it is distant from the others; in contrast, a low Hotelling's T^2 value indicates that the sample is explained by the

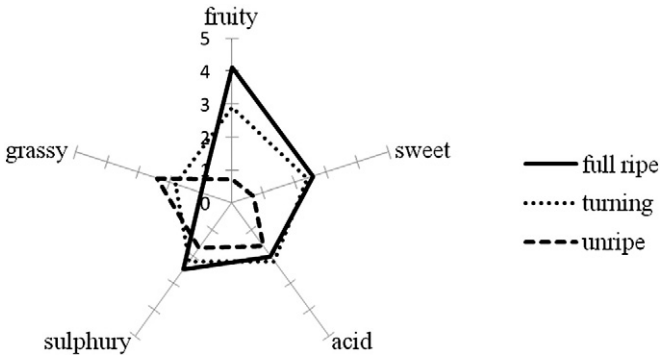
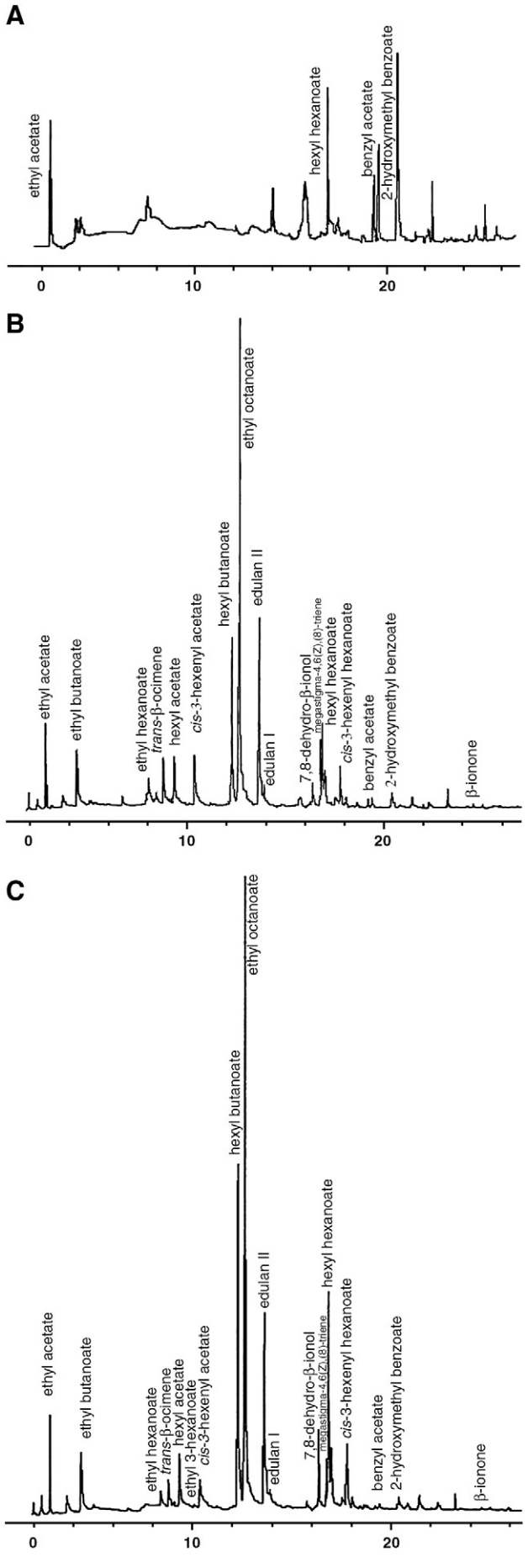


Fig. 3. Aroma profiles of gulupa at different maturity stages, unripe, turning, and full ripe.

Please cite this article as: Jiménez, A.M., et al., Physicochemical characterisation of gulupa (*Passiflora edulis* Sims. fo *edulis*) fruit from Colombia during the ripening, *Food Research International* (2010), doi:10.1016/j.foodres.2010.11.007



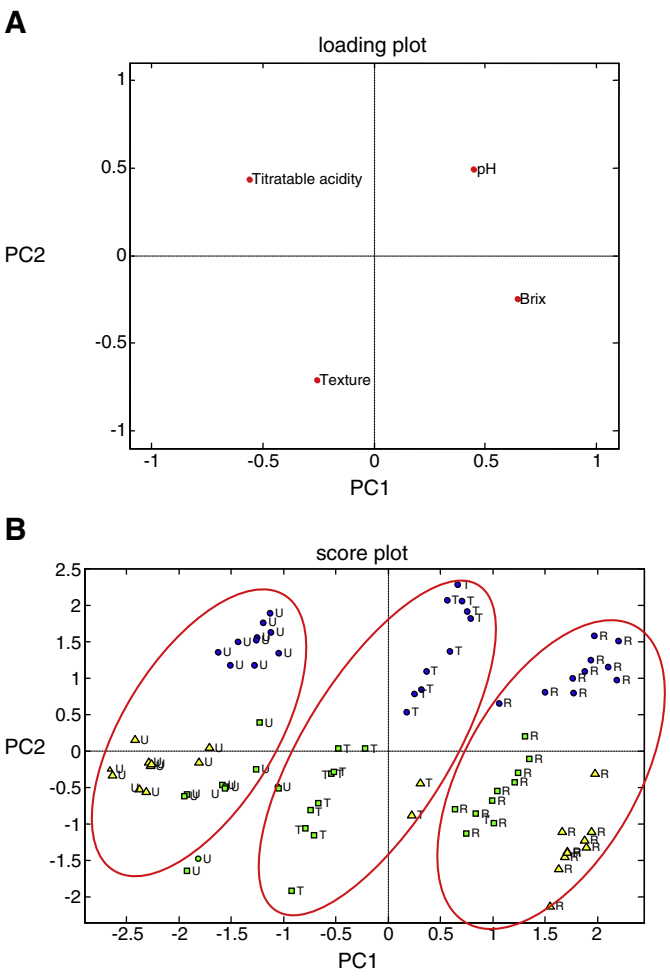


Fig. 5. A) Principle component analysis results of different physicochemical parameters measured at different maturity stages in all of the harvesting times. B) Principal component analysis results of distinct maturity stages, unripe-Stage I (U), turning-Stage II (T), and ripe-Stage III (R) as measured in the three harvesting times. (□) June, (○) August, and (▲) October of 2009.

model and is equal to the others. For the case of gulupa, some data showed high value of Hotelling's T^2, however they were not discarded because they can be explained by the model. Regarding Q value, only a few data were deviated from the model because they showed a high value. The PCA analysis showed that the tendency of these data was to group in three clusters according to their maturity stage (Fig. 5B). The graphics showed that solid soluble content (°Brix) is a very important variable for fruits at stage III (ripe). Higher values in this stage are explained by increasing of carbohydrate content as result of ripening process. However, the data obtained from fruits harvested on August were quite far from the other two. This can be explained since the weather conditions (drought) caused a deviation in the physico-chemical data from the trend (Moretti, Mattos, Calbo, & Sargent, 2010). The clusters obtained allow to classify each maturity stage according to their physicochemical properties and confirmed that they are statistical differentiable.

4. Conclusions

The results showed that ripening in gulupa fruit is a process with stages well-differentiated in their physicochemical properties. During

Fig. 4. GCMS analyses of volatile compounds from gulupa obtained by HS-SPME in different stages, A) unripe, B) turning, and C) ripe.

Please cite this article as: Jiménez, A.M., et al., Physicochemical characterisation of gulupa (*Passiflora edulis* Sims. fo *edulis*) fruit from Colombia during the ripening, *Food Research International* (2010), doi:10.1016/j.foodres.2010.11.007

ARTICLE IN PRESS

this process the volatile compounds is increased, as well as, the anthocyanin content. These findings allow growers to have a tool to select and monitoring the fruits before packaging for exportation. The use of image analysis was appropriate to give a real interpretation of the hetereogenity chromaticity exhibited by gulupa fruits. A further study on the aroma active volatiles may be important in terms of determine parameters to ultimate fruit quality.

Acknowledgements

This work was supported by the Ministry of Agriculture of Colombia (contract 057-2008 L3569-3126). OCATI (Colombia) is thanked for providing the fruits. Thanks also to Dra. Consuelo Díaz from ICTA, Universidad Nacional de Colombia (Bogotá, Colombia) for kindly lending the texture analyser.

References

AOAC (2006). *Official methods of analysis of AOAC international* (18th ed.). Gaithersburg, USA: Association of Official Analytical Chemists.

Barrios, J. C., & Morales, A. L. (2005). Tabla de índices de Kovats. In C. Duque, & A. L. Morales (Eds.), *El Aroma Frutal de Colombia* (pp. 335−341). Bogotá (Colombia): Universidad Nacional de Colombia.

Brat, P., Brillouet, J. M., Reynes, M., Cogat, P. O., & Ollé, D. (2000). Free volatile components of Passion Fruit purée obtained by flash vacuum-expansion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*(12), 6210−6214.

Carasek, E., & Pawliszyn (2006). Screening of tropical fruit volatile compounds using solid-phase microextraction (SPME) fibers and internally cooled SPME fiber. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(23), 8688−8696.

Cheong, K. W., Tan, Ch. P., Mirhosseini, H., Hamid, N. S. A., Osman, A., & Basri, M. (2010). Equilibrium headspace analysis of volatile flavor compounds extracted from soursop (*Annona muricata*) using solid-phase microextraction. *Food Research International*, *43*(5), 1267−1276.

CIE 15 (2004). Technical report colorimetry. *Commission International de l'Eclairage* (third ed): Central Bureau.

Degenhardt, A., Knapp, H., & Winterhalter, P. (2000). Separation and purification of anthocyanins by high-speed countercurrent chromatography and screening for antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*(2), 338−343.

Dhawan, K., Dhawan, S., & Sharma, A. (2004). Passiflora: A review update. *Journal of Ethnopharmacology*, *94*(1), 1−23.

Giusti, M. M., & Wrolstad, R. E. (2001). Anthocyanins. Characterization and measurement with UV–Visible spectroscopy. In R. E. (Ed.), *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* (pp. 1.2.1−1.2.13). New York (USA): John Wiley and Sons unit F1.2.

Heredia, F. J., González-Miret, M. L., Álvarez, C., & Ramírez, A. (2006). *DigiFood® (Análisis de imagen). Registro No. SE-01298*.

Jiménez, A., Sierra, C. A., & Osorio, C. in press. Characterization of odor-active volatiles in gulupa (*Passiflora edulis* fo *edulis*) fruit during ripening. In T. Hofmann, W. Meyerhof, P. Schieberle (Eds.), *Flavor Chemistry & Biology*.

Larraín, R. E., Schaefer, D. M., & Reed, J. D. (2008). Use of digital images to estimate CIE color coordinates of beef. *Food Research International*, *41*(4), 380−385.

Lee, J., Rennaker, C., & Wrolstad, R. (2008). Correlation of two anthocyanin quantification methods: HPLC and spectrophotometric methods. *Food Chemistry*, *110*(3), 782−786.

Luo, M. R., Cui, C. G., & Li, C. (2001). British Patent (Application No. 0124683.4) entitled apparatus and method for measuring colour (DigiEye System), Derby University Enterprises Limited, October 4.

Moretti, C. L., Mattos, L. M., Calbo, A. G., & Sargent, S. A. (2010). Climate changs and potential impacts on postharvest quality of fruit and vegetable crops: A review. *Food Research International*, *43*(7), 1824−1832.

Osorio, C., Acevedo, B., Hillebrand, S., Carriazo, J., Winterhalter, P., & Morales, A. L. (2010). Microencapsulation by spray-drying of anthocyanin pigments from corozo (*Bactris guineensis*) fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(11), 6977−6985.

Parliment, T. (1972). Volatile constituents of passion fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *20*(5), 1043−1045.

Pinzón, I., Fisher, G., & Corredor, G. (2007). Determinación de los estados de madurez del fruto de la gulupa (*Passiflora edulis* Sims). *Agronomía Colombiana.*, *25*(1), 83−95.

Proexport Colombia. http://www.proexport.com.co/SIICExterno/IntelExport/Producto/Importaciones.aspx?Tipo=Bieneses&Menu=IntelExportIntelExportProductos&s-eleccion=Importaciones_Realizadas&Header=IntelExport. Consulted August 2010.

Schuh, C., & Schieberle, P. (2006). Characterization of the key aroma compounds in the beverage prepared from Darjeeling black tea: Quantitative differences between tea leaves and infusion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(3), 916−924.

Schwarz, M., Hofmann, G., & Winterhalter, P. (2004). Investigations on anthocyanins in wines from *Vitis vinifera* cv. Pinotage: Factors influencing the formation of Pinotin A and its correlation with wine age. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*(3), 498−504.

Sinuco, D. C., Steinhaus, M., Schieberle, P., & Osorio, C. (2010). Changes in odour-active compounds of two varieties of Colombian guava (*Psidium guajava* L.) during ripening. *European Food Research and Technology*, *230*(6), 859−864.

Wenkam, N. S. (1990). *Food of Hawaii and the pacific basin, fruit and fruit products. Raw, processed and prepared*, *Vol 4*, Honolulu: University of Hawaii.

Please cite this article as: Jiménez, A.M., et al., Physicochemical characterisation of gulupa (*Passiflora edulis* Sims. fo *edulis*) fruit from Colombia during the ripening, *Food Research International* (2010), doi:10.1016/j.foodres.2010.11.007

CHARACTERIZATION OF ODOR-ACTIVE VOLATILES IN GULUPA (*PASSIFLORA EDULIS* F. *EDULIS*) FRUIT AND CHANGES DURING RIPENING

Aleyda Jiménez, Cesar Augusto Sierra, CORALIA OSORIO

Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, AA 14490, Bogotá, Colombia, cosorior@unal.edu.co

Abstract

The odor-active volatiles of gulupa (*Passiflora edulis* f. *edulis*), a fruit with an overall aroma including fruity, floral, green, and mold-like odor notes, were extracted and analysed by HS-SPME-GC-O and HS-SPME-GC-MS in three stages of maturity. Most of the identified odor-active volatiles were esters. Their amount slightly increased during ripening. It is assumed that these esters are responsible for the fruity odour note exhibited by gulupa.

Introduction

Among tropical fruits, those belonging to the genus *Passiflora* are widely appreciated for their excellent organoleptic properties. In particular the fruits of *Passiflora edulis f. edulis*, which in Colombia are called gulupa, exhibit a pleasant aroma with fruity, floral and green odor notes. In recent years gulupas have shown a steady increase in the export market. The main customers are Germany (taking approximately 55% of the total Colombian annual production), the Netherlands, the UK, and Belgium. Total sales were close to US$ 4 millions in 2008 [1]. However, due to accelerated maturation during the long shipping periods, gulupa fruits may show a decline in their organoleptic quality, thus generating considerable economic losses for exporting companies.

This work on the odor-active volatiles of gulupa and their changes during *in situ* maturation is a part of a long-term project under financial support from the Ministry of Agriculture of Colombia with the objective to optimize the postharvest handling of gulupa.

Experimental

Fruits were obtained from a local commercial orchard in Cota, Cundinamarca, Colombia. The fruits were hand-picked at three different degrees of maturity. For each stage, a lot of 10 fruits were cut into halves, and then the pulp was removed with a spoon and homogenized without disintegration of the seeds.

For HS-SPME analyses pulp samples (10 g) were hermetically sealed in 10 mL clear screw-top vials and equilibrated for 1 h at 20 °C. Then extraction was performed by SPME using a 50/30 µm DVB/CAR/PDMS coated fiber and an extraction time of 1 h. Immediately after extraction adsorbed volatiles were injected into the GC-MS system using a desorption time of 5 min. The HS-SPME conditions published in literature [2] were modified according to the optimization of equilibrium time and extraction time, performed in a 2 × 4 factorial design by the case of gulupa.

GC-MS and GC-O/FID analyses were performed by triplicate using either a FFAP (30 m × 0.25 mm, 0.32 µm film thickness) or a RTX-5 column (30 m × 0.25 mm i.d., 0.25 µm) and helium at a flow rate of 1.5 mL as carrier. Injector temperatures were 250 and 300 °C, respectively. After 4 min at 50 °C the oven temperature was increased at a rate of 4 °C/min to 250 °C (FFAP) and 300 °C (RTX-5). Using a Shimadzu QP 5050.

MSdata were recorded in a mass range of 30-350 u, with electron energy of 70 eV and processed by Class 5K Shimadzu software. Semiquantitative data were collected from FID area counts using butyl butanoate as reference substance without considering calibration factors.

Results

In order to monitor the changes in the odor-active compounds of gulupa during ripening, at first the fruits were grouped according to the color of the peel into three different stages of maturity, which were further characterized by pH, soluble solids (SS), and titratable acidity (TA) of the pulp (**Table 1**). These results showed that each stage could be clearly differentiated.

Table 1. Physicochemical characterization of gulupa fruits at three different stages of maturity

Property	Stage I	Stage II	Stage III
Color of peel	green (100%)	green (40-50%)	purple (100%)
SS (°Brix)	11.5 ± 0.3	14.0 ± 0.1	18.1 ± 0.3
pH	2.89	3.10	3.45
TA (g/100 g; calculated as citric acid)	4.48 ± 0.04	4.01 ± 0.02	3.65 ± 0.01
SS/TA	2.46	3.49	4.93

Data are given as average ± standard deviation (n = 3).

Samples of each of the three maturity stages were then analyzed by HS-SPME-GC-O. Sixteen odor-active compounds were detected (**Table 2**). Their structures were assigned by comparison of their sensory (odor quality as perceived during GC-O), chromatographic (retention indices on FFAP and RTX-5) and mass spectral properties (as obtained by HS-SPME-GC-MS) with authentic reference standards. By using the HS-SPME technique, the majority of odorants were different esters with fruity odor notes. Three compounds, namely linalool, benzyl acetate and β-ionone exhibited a floral smell. Green and grassy notes were associated with hexyl acetate, whereas C_6 aldehydes, usually responsible for the green odor note in unripe fruits [3], where not detected among the odor-active compounds in gulupa. Obviously, in gulupa the lipoxygenase pathway is less relevant for flavor formation as compared to other fruits.

Generally C_4 and C_6 fatty acyl esters dominate the ester profile of different Passifloraceaen species [4]. Our results are particularly in agreement with the results obtained for the related species purple passion fruit (*Passiflora edulis* var. *edulis*). For this variety, ethyl butanoate, ethyl hexanoate, 2-heptyl hexanoate, ethyl acetate, and hexyl butanoate were identified as major constituents [5, 6]. In addition to esters, other volatile constituents of purple passion fruit are the C_{13}-norisoprenoids, which

have been considered key aroma compounds of this species [7]. This type of compounds was detected in gulupa, but under the conditions of the analysis, they did not show any relevance for the aroma of this fruit.

The concentration changes during ripening were assessed semiquantitatively on the basis of the area counts obtained by HS-SPME-GC-FID (cf. **Table 2**). In general, there were no significant changes between stages. Some compounds such as hexyl hexanoate, linalool, and β-ionone remained constant. However, several esters including hexyl acetate, hexyl butanoate, ethyl hexanoate, and ethyl butanoate slightly increased during the ripening process.

The results presented here suggest that the C_4, C_6, and C_8 fatty acyl esters are important aroma compounds of gulupa and that their biogenesis is activated during ripening. Experiments to confirm their role for the overall flavor of this fruit are in progress.

Table 2. Odor-active volatiles identified by HS-SPME in gulupa fruits at three stages of maturity

No.	Compound	RI[a]		Amount[b]			Odor quality[c]
		FFAP	RTX-5	Stage I	Stage II	Stage III	
1	ethyl acetate	889	623	++	++	++	fruity, fresh
2	ethyl butanoate	1024	801	++	+++	+++	Fruity
3	butyl acetate	1086	-	-	+	+	Pineapple
4	N.I	1199	-	+	+	+	Green
5	ethyl hexanoate	1226	1001	++	++++	++++	Fruity
6	N.I	1240	1050	-	++	++	Fruity
7	hexyl acetate	1264	1016	++	+++	+++	Grassy
8	*cis*-3-hexenyl acetate	1308	1002	+	++	+	Fruity
9	hexyl butanoate	1405	1194	++	+++	+++	Fruity
10	ethyl octanoate	1425	1199	++++	++++	+++	Fruity
11	*cis*-3-hexenyl butanoate	1449	1188	++	++	+	Fruity
12	Linalool	1543	-	+	+	+	Floral
13	N.I	1584	-	+	++	++	Moldy
14	hexyl hexanoate	1597	1388	++	++	++	Apple
15	benzyl acetate	1713	1163	+	+++	+	Floral
16	β-ionone	1933	1489	+	+	+	violet, floral

[a] RI = retention index.
[b] Amount: – not detected, + < 50 µg/kg, ++ 50-200 µg/kg, +++ 200-400 µg/kg, +++ > 400 µg/kg (referred to 1 kg of fruit).
[c] Odor quality as perceived at the sniffing port during GC-O.
N.I = Not identified.

Acknowledgements

This work was supported by the Ministry of Agriculture of Colombia (contract 057-2008L3569-3126). OCATI (Colombia) is thanked for providing the fruits.

References

1. Proexport Colombia (the user has to previously be registered). http://www.proexport.com.co/SIICExterno/IntelExport/Producto/Importaciones.aspx?Tipo=Bieneses&Menu=IntelExportProductos&seleccion=Importaciones_Realizadas&Header=IntelExport. Consulted in July 2010
2. Carasek E, Pawliszyn J (2006) J Agric Food Chem 54:8688-8696
3. Aubert C, Günata Z, Ambid C, Baumes R (2003) J Agric Food Chem 51: 3083-3091
4. Butler I (2004) In. State-of-the-Art in Flavour Chemistry and Biology. Proceedings of the 7th Wartburg Symposium (Hofmann T, Rothe M, Schieberle P, eds) Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie: Garching (Germany) pp 475-478
5. Chen C, Kuo M, Hwang J, Swi-Bea J, Wu C (1982) J Agric Food Chem 30:1211-1215
6. Brat P, Brillouet J, Reynes M, Cogat P, Ollé D (2000) J Agric Food Chem 48:6210-6214
7. Winter M, Schulte-Elte KH, Velluz A, Limacher J, Pickenhagen W, Ohloff G (1979) Helv Chim Acta 62:131-134