

III. MATERIALES Y METODOS

3.1 CULTIVO Y MATERIAL VEGETAL ANALIZADO

En la formulación del proyecto inicial se planteo estudiar la variedad de tomate Trust y dos variedades comerciales utilizadas en Colombia, las cuales se cultivarían en el invernadero de la Universidad del Quindío. Sin embargo, dada la falta de personal especializado y permanente y las dificultades para el cuidado de las plantas desde la semilla hasta su recolección y aprovechando el ofrecimiento de poder realizar el estudio en las plantaciones de la finca “Chaparral”, incluyendo la siembra y cuidado técnico de la variedad Truts cuyas semillas poseía el grupo de investigación, se acepto el ofrecimiento.

Se sembró la variedad Truts y solamente prospero una semilla cuya planta se murió al poco tiempo, quizás por daño o vejez de las semillas según informe del agrónomo. Por lo tanto, sólo se pudo realizar la investigación con dos variedades comerciales que iniciaban la siembra en semillero y por lo tanto se podía realizar el seguimiento completo hasta madurez y senescencia. Las variedades o “híbridos” analizados fueron Rocío y Alcudia, dos materiales de larga vida comercializados por la finca “Chaparral”.

La finca “Chaparral” está ubicada en el municipio de La Tebaida (Quindío, Colombia) a una altura sobre el nivel medio del mar de 1320 m, con una humedad relativa promedio de 85% y una temperatura promedio de 25°C (Figuras 1 y 2).

El número de plantas marcadas por cada híbrido fue de 90, las cuales se encuentran distribuidas en surcos independientes, un surco por cada híbrido, y a una distancia entre surcos de un metro y de 80 cm entre plantas. La marcación de cada

Figura 1. Invernadero listo para iniciar siembra de híbridos de tomate Alcudia y Rocío. Finca “Chaparral”, La Tebaida, Quindío (Colombia).

planta se realizó después de antesis o fecundación del ovario, comúnmente denominado amarre de la flor, que corresponde al día uno. Se recolectaron muestras de cada uno de los híbridos en los siguientes días luego de antesis: 10, 17, 23, 40, 43, 49, 52, 55 y 57 días, correspondiendo éste último al inicio de la senescencia de los frutos.

3.2 DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño experimental fue un diseño factorial, con dos factores: 11 niveles (edad: 10, 17, 23, 40, 43, 44, 47, 49, 52, 55, 57 días) y 2 niveles (híbrido Rocío y Alcudia). Para la comparación de las medias se aplicó la prueba de rango múltiple de Tukey ($P < 0.05$).

Figura 2. Invernadero de híbridos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), Rocío y Alcudia, en plena producción. Finca “Chaparral”, La Tebaida (Quindío, Colombia)

3.2.1 Modelo matemático:

Se aplicó el modelo matemático que aparece en la ecuación (1):

$$Y_{ijk} = \mu + \tau_i + \beta_j + (\tau\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk} \quad (1)$$

3.2.2 Hipótesis:

$$H_0 : \tau_i = 0$$

$$H_A : \tau \neq 0$$

$$H_0 : \beta_j = 0$$

$$H_A : \beta_j \neq 0$$

$$H_0 : (\tau\beta)_{ij} = 0$$

$$H_A : (\tau\beta)_{ij} \neq 0$$

Para obtener las muestras de cada híbrido en cada uno de los días de desarrollo y maduración, se toman 3 frutos de manera aleatoria; los análisis se realizan por triplicado.

3.3 ANALISIS FISICOS

3.3.1 Peso de los frutos.

Luego de retirar el pedúnculo, el peso de los frutos de cada uno de los híbridos analizados en los diferentes estados de crecimiento y maduración se obtuvo utilizando una balanza mecánica de triple brazo marca OHAUS, Series 700 con $2610 \text{ g} \pm 0.1 \text{ g}$ de capacidad.

3.3.2 Diámetro ecuatorial y diámetro axial.

El diámetro ecuatorial se determinó colocando cada fruto en la posición de descanso y escogiendo la zona media (ecuatorial) de cada fruto, se midió dicha zona mediante el uso de un micrómetro o pie de rey marca ESSER, escala 0-1/20 mm. El diámetro polar o axial se determinó igualmente con un micrómetro, tomando la medida entre la zona apical y la zona peduncular del fruto. (Pinzón, 2000).

3.3.3 Color del fruto

La determinación visual de la evolución de la maduración de los frutos de los híbridos analizados se realizó por consenso, con base en la observación de los clones en los diferentes estados de crecimiento y maduración en postcosecha.

No se logró determinar el color objetivo de los frutos enteros de cada uno de los híbridos de tomate, por el método del espectrocolorímetro marca MINOLTA C-10, debido a que cuando fue adquirido por la Universidad, ya se había finalizado la parte correspondiente del trabajo experimental.

3.3.4 Textura.

Se determinó con un texturómetro marca KOHELER con divisiones 1/10 y rango de 0 a 390 mm, émbolo de 475 g y dos pesas de 50 y 100 g. Cada pesa se utilizó de acuerdo con el estado de desarrollo del fruto.

3.4 ANALISIS FISICOQUIMICOS

3.4.1 Obtención del zumo.

Para realizar los análisis fisicoquímicos a los frutos de cada uno de los híbridos en cada una de las épocas analizadas fue necesario cortar cada una de las unidades en trozos, homogenizarlos en un equipo tipo ultraturrax, marca BASIC, sometiendo la pulpa a 16000 r.p.m. por espacio de 30 seg manteniendo todo el tiempo la muestra en un baño de hielo a 0°C. Luego, la muestra monogenizada se pasa a través de un tamiz plástico; el residuo se elimina y el filtrado constituye la muestra que se utilizará para cada uno de los análisis fisicoquímicos.

3.4.2 Sólidos solubles (°Brix).

Al filtrado obtenido según 3.4.1, se le determina el % de sólidos solubles o °Brix, para lo cual se utilizó un refractómetro portátil marca ATAGO ATC 1 E, de un rango de lectura de 0 a 32°Brix, las lecturas se realizaron por triplicado y la temperatura promedio del zumo fue de $\pm 20^{\circ}\text{C}$.

3.4.3 pH.

La lectura del pH de cada muestra se realizó al zumo extraído según numeral 3.4.1. Se utilizó un potenciómetro digital marca METROHM Pt/1000/B/2/3M KCl. Se registraron la lectura del pH y de la temperatura del zumo.

3.4.4 Acidez titulable.

La determinación del % de acidez titulable se realizó utilizando el método número 3 de Quality Control Manual for Citrus Processing Plant vol 1. (Reed, 1986). Se determinó al zumo de cada muestra por valoración potenciométrica con NaOH (JT Baker) 0.1 N y utilizando un pHmetro marca METROHM 704. El punto final de la valoración se estableció en pH de 8,2, pH de viraje de la fenolftaleína utilizada como indicador. El NaOH fue estandarizado previamente con ftalato ácido de potasio (JT Baker) como estandar primario. Los resultados se expresan como % de ácido cítrico, por ser éste el ácido orgánico no volátil mayoritario en los frutos de tomate.

3.4.5 Contenido de ácido ascórbico.

Para determinar el contenido de ácido ascórbico presente en cada una de las muestras de los híbridos de tomate se realizaron numerosos ensayos preliminares para estandarizar la técnica de preparación de la muestra para su identificación y cuantificación por HPLC, mediante adaptación de diferentes métodos consultados en la literatura especializada (Ashoor et al., 1984; Pérez et al., 1987; Behrens y Madére, 1989; Glensler et al., 1995; Behrens y Madére1997; Moretty et al., 1998).

Las variables analizadas en el proceso de estandarización de la técnica de preparación de la muestra para la elución por HPLC fueron:

- Solución buffer para inactivación de enzimas y extracción del zumo
- Velocidad y tiempo de homogenización en el ultraturrax
- Centrifugación de la pulpa para retirar los sólidos

- Condiciones de centrifugación: Temperatura, r.p.m., tiempo de centrifugación.
- Uso de cartuchos Sep-Pack para eliminar componentes que puedan causar interferencias en HPLC.
- Tiempo de almacenamiento bajo condiciones de congelación, de las muestras procesadas .

El protocolo estandarizado del tratamiento de la muestra para análisis por HPLC se estableció por evaluación y comparación de los cromatogramas obtenidos para cada una de las variables analizadas, teniendo en cuenta el ancho de pico, la presencia de interferencias, la reproducibilidad de los tiempos de retención de cada pico, y por comparación con los cromatogramas de patrones. Los cromatogramas tanto de muestras como de patrones se eluyeron bajo las mismas condiciones cromatográficas de volumen de inyección, temperatura de la columna, concentración del eluyente, velocidad de flujo.

3.4.5.1 Preparación de la muestra.

Una muestra de 10 g de tomate se pesó en una balanza marca PRECISA, modelo 40SM – 200 A, ± 0.00001 g, sobre una solución extractora que contiene H₂SO₄ 0.4N-EDTA 0,05% y se extrae el zumo de acuerdo al procedimiento mencionado en 3.4.1. El zumo se centrifuga a 13.000 r.p.m., durante 10 minutos a 0°C (Centrifuga de mesa programable refrigerada, marca INTERNATIONAL EQUIPMENT COMPANY, modelo Centra MP4R). Una alícuota de 1 ml del sobrenadante se diluye a 25 ml con agua grado 1. Finalmente, una alícuota de 2ml de esta solución se filtra a través de una membrana de 0.45 μ m. El filtrado se inyecta inmediatamente en el equipo de HPLC o se almacena a –15°C hasta el momento del análisis cromatográfico.

3.4.5.2 Definición del método para la elución de las muestras por HPLC.

Equipo

El equipo utilizado para el análisis de ácido ascórbico presente en cada una de las muestras fue un cromatógrafo líquido de alta eficiencia, marca Hewlett Packard serie 1050 provisto de una bomba cuaternaria, un desgasificador al vacío en línea, un automuestreador para 32 viales, un horno para la columna, un detector de longitud de onda variable (VWD), un computador provisto de un programa “Asterix” para la captura y análisis de datos y una impresora. La columna utilizada es de marca Biorad Aminex HPX-87H de exclusión iónica para la separación e identificación de ácidos orgánicos no volátiles, entre ellos, el ácido ascórbico. Para la preparación de las muestras, los solventes de elución y los estándares de ácido ascórbico se utilizó agua grado I suministrada por un sistema Milli-Ro Milli-Q,

Condiciones de operación

Las condiciones de operación utilizadas en la separación y cuantificación de ácido ascórbico fueron las siguientes:

Columna Bio-Rad Aminez HPX-87H (7.8 x 300 mm)

Volumen de inyección: 20 μ l

Temperatura de la columna: 35°C

Solvente de elución: H₂SO₄ 0.09N

Velocidad de flujo: 0.6 ml/min

Detector: UV-VIS con arreglo de diodos (λ :254 nm)

Tiempo de elución-lavado: 18 min.

3.4.6 Determinación de la actividad ascorbato peroxidasa (POX).

Para la extracción de la enzima se pesaron 15 g de tomate en una microbalanza electrónica, (doble rango marca Precisa, modelo 40sm – 200 A, sensibilidad ± 0.00001 g), sobre 10 mL de citrato de sodio 0.1 M pH 6.0; posteriormente se homogenizó (numeral 4.4.1) y finalmente se centrifuga a 11.500 r.p.m por 20 minutos a 0 °C (Centrífuga de mesa programable refrigerada marca Internacional Equipment Company, modelo Centra MP4R).

Para la reacción, se adiciona 400 μ L solución buffer fosfato pH 6.1, 250 μ L ácido ascórbico 0.001 M, 500 μ L de muestra, 2000 μ L de agua grado 1 y finalmente para iniciar la reacción se agrega 40 μ L de H₂O₂ 0.01 M. La lectura de la absorbancia se realiza a una longitud de onda de 300 nm, a intervalos de 3 segundos por espacio de 4 minutos en un espectrofotómetro UV-VIS con arreglo de diodos marca Hewlett Packard HP 8453, serie 52400609.

3.4.7. Determinación de la enzima ascorbato oxidasa (AOX).

Para la extracción de la enzima se pesan 3.0 g de tomate en una microbalanza electrónica (doble rango marca Precisa, modelo 40sm – 200 A, sensibilidad ± 0.0001 g), sobre 10 mL de citrato de sodio 0.1 M pH 6.0; posteriormente se homogeniza (numeral 4.4.1.) y finalmente se centrifuga a 10.000 r.p.m. por 20 minutos a 4 °C (Centrífuga de mesa programable refrigerada marca Internacional Equipment Company, modelo Centra MP4R).

Para la reacción, se adiciona 2000 μ L de extracto y 1000 μ L de solución de ácido metafosfórico 0.002 % en buffer fosfato 0.05 M pH 6. La lectura de la absorbancia se realiza a una longitud de onda de 295 nm, a intervalos de 3 segundos por espacio de 4 minutos en un espectrofotómetro UV-VIS con arreglo de diodos marca Hewlett Packard HP 8453, serie 52400609.

3.4.8. Determinación de proteína total por el método de Bradford:

La extracción de la proteína se realiza pesando 4.0 g de tomate (Microbalanza electrónica, doble rango marca Precisa, modelo 40sm – 200 A, sensibilidad ± 0.00001 g), sobre una solución de NaCl 0.1 M pH 6.0, 4.0 g polivinil pirrolidona (PVP) y 100 μ L Triton; inmediatamente se homogeniza (numeral 4.4.1.) y se centrifuga a 12.500 r.p.m. por 15 minutos a 0 °C (Centrífuga de mesa programable refrigerada marca Internacional Equipment Company, modelo Centra MP4R).

Para la lectura de la concentración de la proteína, se toman 40 μ L de sobrenadante y se adicionan 3000 μ L azul de Comassie recientemente preparado; se agita y se deja en reposo por espacio de 10 minutos. La lectura de la absorbancia se registra a una longitud de onda de 595 nm en un espectrofotómetro UV-VIS con arreglo de diodos marca Hewlett Packard HP 8453, serie 52400609. (Peterson, 1983).