

DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS MÓVILES (D-(+)-glucosa, D-(-)-fructosa, sacarosa), Y LIBRES TOTALES DE RESERVA (almidón) EN LAS DIFERENTES ETAPAS DE CRECIMIENTO Y DESARROLLO DEL FRUTO DE LA LIMA ÁCIDA TAHÍTI (*Citrus latifolia* Tanaka), Y SU RELACIÓN CON EL RENDIMIENTO Y LA CALIDAD DE LAS COSECHAS.

ÁNGELA MARÍA VÁSQUEZ CARDEÑO
Química

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2013

DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS MÓVILES (D-(+)-glucosa, D-(-)-fructosa, sacarosa), Y LIBRES TOTALES DE RESERVA (almidón) EN LAS DIFERENTES ETAPAS DE CRECIMIENTO Y DESARROLLO DEL FRUTO DE LA LIMA ÁCIDA TAHÍTI (*Citrus latifolia* Tanaka), Y SU RELACIÓN CON EL RENDIMIENTO Y LA CALIDAD DE LAS COSECHAS.

ÁNGELA MARÍA VÁSQUEZ CARDEÑO
Química

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de Magíster en Química

Dirigido por:

MARIANNY YAJAIRA COMBARIZA MONTAÑEZ
Química, Ph. D.
Universidad Industrial de Santander

ALEXANDER REBOLLEDO
Ingeniero Agrónomo, Ph. D.
Corporación Colombiana para la investigación Agropecuaria

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA

2013

AGREDECIMIENTOS

De manera muy especial quisiera agradecerle a la Dra Marianny Yajaira Combariza por la oportunidad de trabajar junto a ella y por todo el apoyo brindado durante el desarrollo de esta investigación.

A mi madre quien con su valioso apoyo lleno de amor y comprensión, me ha permitido alcanzar este logro en mi vida profesional.

A toda mi familia en general por su compañía y cariño, y por el buen ejemplo de vida que cada uno ha sabido darme.

A mis amigos por su compañía y todos los momentos de alegría y diversión que me brindaron, muy especialmente a Jeny, Johana, Jessica, Deisy, Jose Luis, Andres, Sergio, Emilio y Alex.

A Mónica Hernández y Freys Julio, por su apoyo y colaboración en las diferentes etapas del desarrollo de esta investigación.

Al Dr. Viatcheslav Kafarov de la Escuela de Ingeniería Química por haberme permitido trabajar con su equipo de Cromatografía líquida.

A los pasantes y tesistas de la Corporación Colombiana para la Investigación Agropecuaria (CORPOICA) por su compañía y colaboración durante la agotadora época de muestreo.

A compañeros y trabajadores del Centro de Estudios e Investigaciones Ambientales (CEIAM), por toda su amabilidad y colaboración.

A la Universidad Industrial de Santander, COLCIENCIAS y CORPOICA, por haberme brindado todos los recursos para el financiamiento de este trabajo de investigación.

ABREVIATURAS

AIC	<i>Akaike Information Criterion</i> , (Criterio de información de Akaiken).
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i> , (Asociación Oficial de Químicos Analíticos).
BIC	<i>Bayesian Information Criterion</i> , (Criterio de información Bayesiano).
CMerror	Cuadrados medios del error.
CNE	Carbohidratos no estructurales
CORPOICA	Corporación Colombiana para la Investigación Agropecuaria
DDA	Días después de antesis
EE	Estimación del error
ELSD	<i>Evaporative Light Scattering Detector</i> , (Detector de dispersion de Luz Evaporativo).
ESI - MS	<i>Electrospray Ionization Mass Spectrometry</i> , (Espectrometría de masas mediante ionización por electronebulización).
et.al.	<i>Et alii</i> (y otros)
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i> (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación).
FLD	<i>Fluorescence Detector</i> , (Detector de Fluorescencia)
HILIC	<i>Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography</i> , (Cromatografía líquida de interacción hidrofílica).
HPAEC	<i>High Performance Anion Exchange Chromatography</i> , (Cromatografía de intercambio catiónico).
HPCEC	<i>High Performance Cation Exchange Chromatography</i> , (Cromatografía de intercambio aniónico).
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> , (Cromatografía Líquida de Alta Resolución)

ICONTEC	Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación
IEC	<i>Ionic Exchange Chromatography</i> , (Cromatografía de intercambio iónico).
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> , (La union internacional de Química Pura y Aplicada).
k'	Factor de retención
LEC	<i>Ligand-Exchange Chromatography</i> , (Cromatografía de intercambio ligando).
LOD	<i>Limit of Detection</i> (Límite de detección).
LOQ	<i>Limit of quantitation</i> (Límite de cuantificación).
MMF	<i>Morgan – Mercer – Flodin</i> .
N	Número de platos teóricos
NP - HPLC	<i>Normal Phase High Performance Liquid Chromatography</i> , (Cromatografía Líquida de Alta Resolución en fase normal)
NTC	Norma Técnica Colombiana
Op. Cit.	<i>Opere citato</i> (en la obra citada)
PAD	<i>Pulsed Amperometric Detector</i> , (Detector amperométrico de pulso).
RID	<i>Refractive Index Detector</i> (Detector de índice de refracción)
RP - HPLC	<i>Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography</i> , (Cromatografía Líquida de Alta Resolución en fase reversa)
RSD	<i>Relative Estándar Deviation</i> (Desviación Estándar Relativa)
SST	Sólidos solubles totales
t_R	Tiempo de retención
UV	Ultravioleta
VB	Von Bertalanffy

TABLA DE CONTENIDO

	INTRODUCCIÓN	20
1.	ESTADO DEL ARTE	23
1.1	LIMA ÁCIDA TAHITÍ (<i>CITRUS LATIFOLIA TANAKA</i>)	23
1.1.2	Origen y distribución	23
1.1.2	Producción y comercialización	24
1.2.	CRECIMIENTO Y DESARROLLO DEL FRUTO	25
1.2.1	Estados de desarrollo del fruto	26
1.2.2	Parámetros de calidad de las cosechas	30
1.2.2.1	Parámetros internos	30
1.2.2.2	Parámetros externos	32
1.3	CUAJADO Y ABSCISIÓN DEL FRUTO	33
1.3.1	Cuajado	34
1.3.2	El proceso de la abscisión	34
1.4	FACTORES QUE AFECTAN EL RENDIMIENTO Y CALIDAD DE LA COSECHAS	34
1.4.1	Factores fisiológicos	35
1.4.2	Factores genéticos	36
1.4.3	Factores exógenos	37
1.5.	CARBOHIDRATOS EN PLANTAS	39
1.5.1	Influencia de carbohidratos no estructurales en plantas cítricas	41
1.5.2	Análisis de carbohidratos móviles	45
1.5.3	Análisis de carbohidratos de reserva	49
2.	DESARROLLO EXPERIMENTAL	53
2.1	REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS	53
2.2	IDENTIFICACIÓN DE LOS ÁRBOLES PARA MUESTREO	54
2.3	TOMA Y PREPARACION DE LAS MUESTRAS	55
2.4	ANÁLISIS DE CARBOHIDRATOS LIBRES [D-(+)-GLUCOSA, D-(-)-FRUCTOSA Y SACAROSA].	56
2.4.1.	Implementación de la metodología de análisis.	57
2.4.2.	Figuras analíticas de merito	57

2.4.3	Determinación y Cuantificación de carbohidratos libres	58
2.4.4	Identificación de carbohidratos libres por HPLC – ESI – MS	58
2.5	ANÁLISIS DE CARBOHIDRATOS DE RESERVA (ALMIDÓN).	59
2.5.1	Implementación de la metodología de análisis.	59
2.5.1.1	Método del fenol- ácido sulfúrico	59
2.5.1.2	Hidrólisis del almidón	60
2.5.2	Figuras analíticas de mérito.	60
2.5.3	Cuantificación de almidón	60
2.6	EXTRACCIÓN DE ANALITOS	61
2.6.1	Implementación de la metodología de extracción	61
2.6.2	Evaluación del porcentaje de extracción.	62
2.7	PARÁMETROS DE CALIDAD DE LAS COSECHAS	63
2.7.1	Diámetro ecuatorial y peso	63
2.7.2	Contenido de jugo	63
2.7.3	Sólidos solubles	63
2.7.4	Acidez titulable	64
2.7.5.	Índice de madurez	64
2.8	EVENTOS FISIOLÓGICOS RELACIONADOS CON EL RENDIMIENTO Y CALIDAD DE LA LIMA ÁCIDA TAHITÍ.	64
2.8.1.	Curva de crecimiento	64
2.8.2.	Abscisión	65
2.8.3	Porcentaje de cuajado y rendimiento	65
2.9	DATOS METEREOLÓGICOS	66
2.10	TRATAMIENTO DE DATOS	67
3.	RESULTADOS	67
3.1	DATOS METEOROLÓGICOS	67
3.2	EVENTOS FISIOLÓGICOS RELACIONADOS CON EL RENDIMIENTO Y CALIDAD DE LAS COSECHAS	68
3.2.1	Curva de crecimiento	68
3.2.2	Niveles de floración, abscisión y cuajado	73
3.2.2.1	Intensidad de floración y rendimiento del fruto	73
3.2.2.2	Abscisión y cuajado.	75

3.2.2.3	Cuajado y rendimiento de las cosechas	77
3.3	ANÁLISIS DE CARBOHIDRATOS MÓVILES	77
3.3.1	Implementación de la metodología de análisis.	77
3.4	ANÁLISIS DE CARBOHIDRATOS DE RESERVA	88
3.4.1	Implementación de la metodología de análisis	88
3.4.2	Figuras analíticas de mérito.	89
3.5	EXTRACCIÓN DE LOS ANALITOS	90
3.5.1	Implementación de la metodología de extracción.	90
3.5.2	Porcentaje de extracción.	92
3.6	IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE CARBOHIDRATOS EN LIMA ÁCIDA TAHITI.	93
3.6.1	Identificación de carbohidratos móviles por HPLC-ESI-MS	93
3.6.2	Cuantificación de carbohidratos móviles y de reserva	95
3.7	PARÁMETROS DE CALIDAD DE LAS COSECHAS	108
4.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	109
4.1	CONTENIDO DE CARBOHIDRATOS Y FLORACIÓN	109
4.2	CONTENIDO DE CARBOHIDRATOS Y CRECIMIENTO DEL FRUTO	111
4.2.1	Hojas viejas de brotes vegetativos	111
4.2.2	Hojas viejas de brotes vegetativos	113
4.2.3	Hojas jóvenes	115
4.2.4	Frutos	116
4.3	CONTENIDO DE CARBOHIDRATOS Y ABSCISIÓN DEL FRUTO	118
4.4	PARÁMETROS DE CALIDAD DE CALIDAD DE LOS FRUTOS COSECHADOS	121
5.	CONCLUSIONES	123
6.	RECOMENDACIONES	126
	BIBLIOGRAFÍA	127
	ANEXOS	154

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Lima ácida Tahití (<i>Citrus latifolia</i> Tanaka)	24
Figura 2.	Evolución a través del tiempo del crecimiento del fruto cítrico	28
Figura 3.	Carbohidratos móviles no estructurales	40
Figura 4.	Esquema de las reacciones químicas que permiten la cuantificación de carbohidratos insoluble por el método de <i>Dubois et al.</i>	51
Figura 5.	Cromatógrafo líquido <i>Shimadzu Prominence</i> UFLC (Tokio, Japón).	57
Figura 6.	Espectrómetro de masas, <i>Bruker Daltonics</i> (Bremen, Alemania).	59
Figura 7.	Diagrama de flujo representativo de la extracción y análisis de carbohidratos móviles y de reserva.	61
Figura 8.	Precipitación (mm), humedad relativa (%) y Temperatura máxima (°C) durante el desarrollo experimental de la investigación.	67
Figura 9.	Curvas de crecimiento del fruto de la lima ácida Tahití, para cada ciclo de producción evaluado, en frutos de árboles de A. alta carga y B. baja carga.	69
Figura 10.	Curvas de crecimiento para los dos ciclos de producción predichas por el modelo de regresión no lineal de Weibull.	72
Figura 11.	Tasa de crecimiento de los frutos de la lima ácida Tahití	73
Figura 12.	Relación entre el número de frutos cosechados y el número de flores por árbol durante los dos ciclos de producción evaluados.	74
Figura 13.	Relación entre el número de frutos cosechados y el número de flores por árbol durante los dos ciclos de producción evaluados.	74
Figura 14.	Curvas de abscisión absoluta para los frutos de la lima ácida Tahití, durante de ciclos de producción en árboles de A. alta carga y B. baja carga	74
Figura 15.	Curvas de abscisión relativa de frutos en árboles de A. alta	77

- carga, **B.** Baja carga.
- Figura 16.** Selección fase móvil para el análisis por HPLC- RI de **1.**D-(+)-fructosa, **2.** D-(-)-glucosa y **3.** sacarosa, analizados por HPLC – RI con la columna *Zorbax Carbohydrate*. a 25 °C, con fase móvil compuesta por: **A.** Agua- acetonitrilo, 80:20, **B.** Agua- acetonitrilo, 60:40, **C.** Agua- acetonitrilo, 50:50, **D.** Agua- acetonitrilo, 80:20. **79**
- Figura 17.** Efecto de la variación del flujo de la fase móvil sobre el perfil cromatográfico de los analitos, analizados por HPLC – RI con la columna *Zorbax Carbohydrates*. a 25 °C, con fase móvil compuesta por Acetonitrilo-agua (80:20) a un flujo de: **A.** 2.0 mL/min, **B.** 1.4 mL/min, **C.** 1.0 mL/min; **1.** D-(+)-fructosa, **2.** D-(-)-glucosa y **3.**sacarosa. **80**
- Figura 18.** Efecto del pH de la fase móvil sobre la separación de los analitos analizados con la columna *Alltech 700CH*, a 50°C, usando agua como fase móvil, a un flujo de 0.4 mL/min, variando el pH de **A.** 13.08, **B.** 9.63 **C.** 5.12, **D.** 7.02; **1.** D-(+)-fructosa, **2.** D-(-)-glucosa y **3.**sacarosa. **83**
- Figura 19.** Efecto de la temperatura de la columna en la separación de los analitos, analizados con la columna *Alltech 700CH*, usando agua a pH neutro como fase móvil, a un flujo de 0.5 mL/min, variando la temperatura de la columna: **A.** 25 °C, **B.** 80 °C **C.** 60 °C; **1.** D-(+)-fructosa, **2.** D-(-)-glucosa y **3.**sacarosa. **84**
- Figura 20.** Determinación de D-(+)-galactosa en las extracto en las hojas de lima ácida Tahití empleando baño ultrasonido. **A.** Perfil cromatográfico de la muestras de hojas las lima ácida Tahití con presencia de D-(+)-galactosa. **B.** Perfil cromatográficos de las sustancias de referencia; **1.**sacarosa. **2.** D-(+)-glucosa, **3.** D-(+)-galactosa, **4.**D-(-)-fructosa, **91**
- Figura 21.** Perfiles cromatográficos representativos de las muestras de lima ácida Tahití. **A.** Hojas. **B.** Frutos; **1.** D-(-)-fructosa, **2.** D-(+)-glucosa, **3.**sacarosa. **94**

- Figura 22.** Espectros de masas de los carbohidratos móviles presentes en las muestras de lima ácida Tahití; **A.** D-(+)-glucosa, **B.** D-(-)-fructosa, **C.** sacarosa. **95**
- Figura 23.** Evolución del contenido en carbohidratos (D-(+)-glucosa, D-(-)-fructosa y sacarosa) de hojas viejas de brotes generativos, durante dos ciclos de producción evaluados para los árboles de alta y baja carga; **A.** Primer ciclo – alta carga, **B.** Segundo ciclo – Alta carga, **C.** Primer ciclo– baja carga y **D.** Segundo ciclo – baja carga.. **97**
- Figura 24.** Concentración de almidón de hojas viejas de brotes generativos en los dos ciclos de producción evaluados; **A.** alta carga, **B.** baja carga. **98**
- Figura 25.** Cuantificación en hojas viejas de brotes vegetativos de D-(+)-glucosa, D-(-)-fructosa y sacarosa, durante los dos ciclos de producción evaluados para los árboles de alta y baja carga; **A.** Primer ciclo – alta carga, **B.** Segundo ciclo – Alta carga, **C.** Primer ciclo – baja carga y **D.** Segundo ciclo – baja carga. **100**
- Figura 26.** Concentración de almidón de hojas viejas de brotes vegetativos en los dos ciclos de producción evaluados; **A.** alta carga, **B.** baja carga. **101**
- Figura 27.** Cuantificación en hojas jóvenes de brotes generativos de D-(+)-glucosa, D-(-)-fructosa y sacarosa, durante los dos ciclos de producción evaluados para los árboles de alta y baja carga; **A.** Primer ciclo – alta carga, **B.** Segundo ciclo – Alta carga, **C.** Primer ciclo – baja carga y **D.** Segundo ciclo – baja carga. **102**
- Figura 28.** Concentración de almidón de hojas jóvenes de brotes generativos en los dos ciclos de producción evaluados; **A.** alta carga, **B.** baja carga. **103**
- Figura 29.** Cuantificación en hojas jóvenes de brotes vegetativos de D-(+)-glucosa, D-(-)-fructosa y sacarosa, durante los dos ciclos de producción evaluados para los árboles de alta y **104**

baja carga; **A.** Primer ciclo – alta carga, **B.** Segundo ciclo – Alta carga, **C.** Primer ciclo – baja carga y **D.** Segundo ciclo – baja carga.

Figura 30. Concentración de almidón de hojas jóvenes de brotes generativos en los dos ciclos de producción evaluados. **A.** alta carga. **B.** Baja carga. **104**

Figura 31. Cuantificación en frutos de D-(+)-glucosa, D-(-)-fructosa y sacarosa durante los dos ciclos de producción evaluados para los árboles de alta y baja carga; **A.** Primer ciclo – alta carga, **B.** Segundo ciclo – Alta carga, **C.** Primer ciclo – baja carga y **D.** Segundo ciclo – baja carga. **105**

Figura 32. Concentración de almidón de frutos en los dos ciclos de producción evaluados, **A.** Alta carga. **B.** Baja carga. **107**

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Estados evolutivos de la lima ácida Tahití (<i>Citrus latifolia</i> Tanaka).	25
Tabla 2	Modelos estadísticos para describir el crecimiento de los frutos cítricos	28
Tabla 3.	Calibres de la lima Tahití.	32
Tabla 4.	Técnicas para análisis de carbohidratos por HPLC.	47
Tabla 5.	Agentes reductores empleados en la cuantificación de carbohidratos por métodos colorimétricos	50
Tabla 6.	Reactivos, materiales y equipos empleados durante el desarrollo experimental.	53
Tabla 7	Época de recolección de las muestras	55
Tabla 8.	Variable y niveles empleados en el diseño de tratamientos realizado.	60
Tabla 9.	Criterios estadísticos empleados para seleccionar el modelo de regresión no lineal que mejor describe el crecimiento de la lima ácida Tahití	69
Tabla 10.	Parámetros estadísticos de los modelos de regresión no lineal que mejor describen el crecimiento de la lima ácida Tahití.	71
Tabla 11.	Cuajado y rendimiento de las cosechas de lima ácida Tahití	77
Tabla 12.	Condiciones cromatográficas para la columna Zorbax <i>Carbohydrate Analysis</i>	81
Tabla 13.	Condiciones de análisis empleadas con la columna <i>Alltech</i> 700CH	84
Tabla 14.	Tiempos de retención de los analitos	85
Tabla 15.	Figuras analíticas de mérito para las metodologías implementadas	87
Tabla 16.	Parámetros de eficiencia de cada una de las columnas cromatográficas empleadas	87

Tabla 17.	Condiciones de análisis para el método del fenol-ácido sulfúrico.	89
Tabla 18.	Figuras analíticas de mérito para el análisis de almidón	90
Tabla 19.	Porcentajes de recuperación de cada uno de los carbohidratos ene estudio.	92
Tabla 20.	Contenido de almidón en las raíces de la lima ácida Tahití	107
Tabla 21.	Parámetros de calidad de las cosechas producidas durante los ciclos de producción.	108

LISTA DE ANEXOS

- | | | |
|-----------------|--|------------|
| Anexo 1. | Residuales producto del análisis de regresión no lineal aplicado a las curvas de crecimiento de la lima ácida Tahití. | 154 |
| Anexo 2. | Posibles rutas de fragmentación de los carbohidratos móviles identificados por HPLC-ESI-MS en muestras de hojas y frutos de la lima ácida Tahití de los espectros mostrados en la figura 22. | 156 |

RESUMEN

TITULO: DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS MÓVILES Y LIBRES TOTALES DE RESERVA (D-(+)-glucosa, D-(-)-fructosa, sacarosa), EN LAS DIFERENTES ETAPAS DE CRECIMIENTO Y DESARROLLO DEL FRUTO DE LA LIMA ÁCIDA TAHÍTI (*Citrus latifolia tanaka*), Y SU RELACIÓN CON EL RENDIMIENTO Y LA CALIDAD DE LAS COSECHAS*.

Autor. ANGELA MARIA VASQUEZ CARDEÑO**.

Palabras claves: Lima Tahití, carbohidratos móviles, carbohidratos de reserva, calidad, crecimiento, cromatografía líquida.

La presente investigación se dividió en dos componentes experimentales, un primer componente relacionado con los análisis químicos necesarios para cuantificar la cantidad de carbohidratos móviles y de reserva en diferentes partes de la planta y para determinar los parámetros de calidad de la cosecha según la NTC 4087. Otro segundo componente relacionado con la medición de eventos fisiológicos (número de flores y frutos, crecimiento, abscisión, porcentaje de cuajado) relacionados con el rendimiento y calidad de las cosechas.

Para los análisis químicos se implementaron metodologías de análisis por Cromatografía líquida y espectrofotometría de UV-VIS para el análisis de carbohidratos móviles y de reserva respectivamente, en muestras de hojas, raíces y frutos de veinte árboles divididos en dos grupos de alta y baja carga, durante dos ciclos de producción caracterizados por sus diferencias climatológicas.

Una vez finalizada la etapa experimental de la investigación, se realizaron correlaciones entre los diferentes eventos fisiológicos de la planta durante sus fases de desarrollo productivo y las pautas de movilización de carbohidratos. Esto permitió comprobar, y en algunos casos establecer la influencia de la disponibilidad de carbohidratos sobre el rendimiento y calidad de las cosechas, durante las fases de desarrollo y la influencia de las condiciones ambientales sobre el cultivo de la Lima ácida Tahití.

* Trabajo de investigación de Maestría en Química

** Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ciencias, Escuela de Química.
Directores. Marianny Yajaira Combariza M., Alexander Rebolledo.

ABSTRACT

TITLE: DETERMINACIÓN DE MOBILE CARBOHYDRATES AND RESERVE CARBOHYDRATES (D-(+)-glucose, D-(-)-fructose, sucrose), IN SEASONAL GROWTH AND DEVELOPMENT OF TAHITI LIME (*Citrus latifolia tanaka*) FRUIT, AND THEIR RELATIONSHIP ON CROP QUALITY AND YIELD *.

Author: ANGELA MARIA VASQUEZ CARDEÑO**.

Keywords: Tahiti lime, mobile carbohydrates, reserve carbohydrates, quality, growth, liquid chromatography.

The present investigation was divided into two experimental components, a component was related to the necessary chemical analysis to quantify the reserve carbohydrates and mobile carbohydrates in different parts of the plant and to determine the quality parameters of the crop according to the NTC 4087. The another component was related to the measurement of physiological events (number of flowers and fruit, growth, abscission and fruit set) related to crop quality and yield.

Analytical methodologies based on high performance liquid chromatography and UV-VIS spectrophotometry were implemented for analysis of mobile carbohydrate and reserve carbohydrates respectively, in samples of leaves, roots and fruit from twenty trees divided into two groups with high and low load, during two production cycles characterized by climatic differences.

After the experimental development, correlations were found between different plant physiological events during their production development phases and carbohydrate mobilization patterns. This allowed concluding and in some cases to establish the influence of carbohydrate availability on the yield and quality of crops, during the development and the influence of environmental conditions on the cultivation of Tahiti liming.

* Trabajo de investigación de Maestría en Química

** Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ciencias, Escuela de Química.
Directores. Marianny Yajaira Combariza M., Alexander Rebolledo.

INTRODUCCIÓN

El género *Citrus*, abarca numerosas especies productoras de frutos de consumo masivo como naranjas, limones, mandarinas, limas, entre otros. En general estas plantas presentan un desarrollo determinado y el resultado de la cosecha final depende de cada una de las fase reproductivas que la componen: floración, cuajado, crecimiento, desarrollo y maduración del fruto. Numerosos estudios realizados sobre estas fases [1 - 5], demuestran que su eficiencia depende principalmente de factores ambientales y nutricionales. Como los factores ambientales no pueden ser controlados, las investigaciones han apuntado a dilucidar las relaciones nutricionales y su efecto sobre el rendimiento y calidad de los frutos, con lo cual ha sido posible determinar la importancia e influencia de la disponibilidad y movilización de carbohidratos no estructurales móviles o de reserva, sobre la productividad de diversas especies cítricas [6 - 9].

Colombia ocupa el cuarto lugar a nivel internacional en producción de cítricos, según estadísticas de la FAO para el año 2010 [10]; esto se debe principalmente a las condiciones geográficas favorables que presenta tales como la altitud, temperatura, luminosidad y niveles de precipitaciones. Sin embargo, para el caso concreto de la especie *Citrus latifolia* Tanaka, más conocida popularmente como lima ácida Tahití, las cifras no son alentadoras. A nivel mundial, la producción en Colombia ocupa el puesto veintiuno, debido a la marcada diferencia entre los rendimientos nacionales aproximados en 10.8 t/ha y el potencial de producción estimado en 21.8 t/ha. Este atraso está ocasionado principalmente por el escaso conocimiento sobre el manejo del cultivo de este cítrico.

Debido a la importancia comercial de la lima ácida Tahití y el potencial de producción en Colombia, la Corporación Colombiana para la investigación Agropecuaria (CORPOICA) desarrolló el macroproyecto titulado: "Desarrollo de

tecnología en ecofisiología y nutrición para incrementar el rendimiento y la calidad de la lima ácida Tahití (*Citrus latifolia* Tanaka) en Colombia”. La finalidad del proyecto era mejorar el rendimiento y calidad de la lima ácida Tahití en tres zonas productoras de Colombia mediante la generación de conocimiento básico que contribuya a la construcción de la plataforma de manejo del cultivo, en aspectos relacionados con el riego, nutrición y parámetros fisiológicos, que determinan su comportamiento productivo.

Enmarcado dentro de este macroproyecto se desarrolló este trabajo, cuyo objetivo principal fue la determinación de carbohidratos móviles [d-(+)-glucosa, d-(-)-fructosa, sacarosa] y libres totales de reserva, en las diferentes etapas de crecimiento y desarrollo del fruto de la lima ácida Tahití (*Citrus latifolia* Tanaka) y el establecimiento de correlaciones con el rendimiento y la calidad de las cosechas durante dos ciclos de producción. El proyecto se desarrolló en una plantación de cítricos del municipio de Lebrija, Santander, uno de los principales núcleos productivos de lima Tahití en nuestro país.

Para el desarrollo de esta investigación se marcaron 20 árboles de lima ácida Tahití (*Citrus latifolia* Tanaka), injertados sobre *Citrus volkameriana*, y se dividieron en dos grupos diferenciados por su nivel de producción. De cada árbol se seleccionaron 12 ramas, para marcar y contabilizarlas flores y frutos producidos, y para obtener las muestras de hojas y frutos necesarios para el análisis de carbohidratos, durante dos ciclos de producción.

Un primer componente experimental relacionado con los análisis químicos necesarios para cuantificar la cantidad de carbohidratos móviles y de reserva en diferentes partes de la planta y para determinarlos parámetros de calidad de la cosecha según la NTC 4087 [11], se desarrolló en el laboratorio del Centro de Estudios e Investigaciones Ambientales de la Universidad Industrial de Santander. Este primer componente se inició con el desarrollo de las metodologías analíticas de extracción y análisis de carbohidratos móviles y de reserva. A continuación, se procedió a realizar la cuantificación de los carbohidratos en las muestras de hojas y frutos de la lima ácida Tahití y

finalmente, se midieron las propiedades físico-químicas de los frutos cosechados durante los dos ciclos de producción mediante la NTC – 4087.

Por otra parte, el segundo componente experimental estuvo relacionado con la medición de eventos fisiológicos relacionados con el rendimiento y calidad de las cosechas. Durante los dos ciclos de producción se midieron el número de flores y frutos, lo cual permitió establecer las curvas de crecimiento y abscisión del fruto, y el porcentaje de cuajado y rendimiento de las cosechas.

Una vez finalizada ésta etapa experimental de la investigación, se realizaron correlaciones entre los diferentes eventos fisiológicos de la planta durante sus fases de desarrollo productivo y las pauta de movilización de carbohidratos. Esta actividad permitió comprobar, y en algunos casos establecer la influencia de la disponibilidad de carbohidratos sobre el rendimiento y calidad de las cosechas, durante las fases de desarrollo y la influencia de las condiciones ambientales sobre el cultivo de la lima ácida Tahití.

Se espera que los resultados obtenidos en esta investigación aporten al desarrollo de una plataforma de manejo del cultivo de la lima ácida Tahití mediante el conocimiento generado sobre la influencia de los carbohidratos móviles y de reserva en el rendimiento y calidad de las cosechas, de manera tal que esto le permita al agricultor implementar prácticas de manejo para la obtención de frutos de calidad con bajos costos de producción, haciendo del cultivo de este cítrico una alternativa productiva, que contribuya al desarrollo regional y nacional del agro.

1. ESTADADO DEL ARTE

1.1 LIMA ÁCIDA TAHITÍ (*Citrus latifolia* Tanaka)

1.1.2 Origen y distribución

La especie *Citrus latifolia* Tanaka, más conocida como lima ácida Tahití, es una especie perteneciente al género *Citrus* de la familia Rutáceae. El origen de la lima Tahití es desconocido, sin embargo, algunos autores atribuyen su origen a las regiones tropicales del archipiélago Malayo, mientras que, otros afirman que pudo ser introducido a América en el siglo XIX procedente de la isla Tahití, de donde proviene su nombre [12]. Esta especie es un híbrido triploide entre el limón común (*Citrus aurantifolia* Swingle) y otras especies de cítricos como la cidra o la lima ácida, razón por la cual carece de semillas [13].

La lima Tahití crece principalmente en climas tropicales y cálidos, desde el nivel del mar hasta los 2200 metros. Aunque puede ser cultivada en regiones con temperaturas que van desde los 13 a 30 °C, se ha comprobado que la temperatura óptima para su desarrollo en términos de rendimiento y calidad, oscila entre los 23 – 30 °C. Para el cultivo de esta fruta, se requiere una humedad promedio superior al 80% y entre 900 y 1200 mm de lluvia anual bien distribuidos, ya que esta especie es de desarrollo continuo, con picos de mayor producción entre los meses de mayo y julio, mientras que la época de menos producción abarca los meses de noviembre a marzo [14].

El árbol de la lima ácida Tahití se caracteriza por ser vigoroso, con tendencia a la verticalidad y alcanza alturas que van desde los 2 a 4 m. Las hojas son largas y elípticas, y sus flores se caracterizan por tener pétalos de color blanco violáceo. Los frutos de la lima Tahití son de color verde oscuro durante su desarrollo, y gradualmente van tornándose verde claro o amarillo cuando comienza la sobremaduración o envejecimiento (**Figura 1**). Como las flores de este árbol carecen de polen y sus frutos no contienen semillas, su forma de multiplicación es vegetativa, para lo cual es necesario injertar sus yemas o

esquejes en árboles denominados portainjertos¹ seleccionados por su compatibilidad [15].



Figura 1.Lima ácida Tahití (*Citrus latifolia* Tanaka)

En general, la lima Tahití es una fruta de consumo diario debido a sus propiedades organolépticas y medicinales; es utilizada comúnmente sin procesar para aderezar comidas, en la preparación de bebidas refrescantes y como acompañante en bebidas alcohólicas. En la industria, la pulpa y el jugo son utilizados principalmente como aditivos para darle sabor y color a bebidas preparadas, papillas y confituras. Adicionalmente, el aceite esencial proveniente de la cáscara se utiliza en la industria cosmética y perfumística [16].

1.1.2 Producción y Comercialización

La producción de limas y limones según las estadísticas anuales reportadas por la FAO para el 2010 [17], ascendió a 14.2 millones de toneladas, siendo India (21.77%), México (13.29%), China (7.38%), Argentina (7.82%) y Brasil (7.17%) los mayores productores respectivamente; en este listado Colombia ocupa el puesto número veintiuno con tan solo un 0.61% de la producción total. Esta baja participación en el mercado mundial se debe a la marcada diferencia entre los rendimientos nacionales aproximados en 10.8 t/ha y el potencial de producción estimado en 21.8 t/ha, ocasionado principalmente por el escaso conocimiento que se tiene en el manejo de este cítrico, lo cual ha generado una

¹Portainjerto: En agronomía, planta o árbol que recibe una porción de tejido procedente de otra especie, de tal modo que ambas especies crecen como un solo organismo.

gran brecha tecnológica que impide obtener mayor productividad de las cosechas, pese a que la geografía colombiana presenta condiciones favorables para su cultivo [18].

El cultivo de lima ácida Tahití en Colombia es permanente, y tiene un patrón estacional relativamente estable a lo largo del año, en el cual los meses de abril y junio muestran un aumento en la producción, con una disminución en el precio de las cosechas, mientras que, hacia agosto, septiembre y octubre existe un aumento en los precios causados por la reducción en la cosecha. Este patrón estacional es determinante en la comercialización de la fruta, y se ve reflejado en las cifras reportadas por la FAO para el año 2010, según las cuales Colombia registró exportaciones por 1563 t, siendo Francia y Estados Unidos los principales países de destino, mientras que, las importaciones alcanzaron las 4639 t, provenientes en su gran mayoría de Ecuador [19]. Esto significa que la producción en ciertas épocas del año llega a ser tan escasa, que resulta insuficiente para suplir la demanda nacional.

1.2 CRECIMIENTO Y DESARROLLO DEL FRUTO

1.2.1. Estados de desarrollo del fruto

Como en todas las especies cítricas, la lima ácida Tahití también presenta estados de crecimiento reconocidos y diferenciables, dentro de las cuales existen estados evolutivos que describen paso a paso los fenómenos que ocurren en la planta durante toda su ciclo (**Tabla 1**) [20].

Tabla 1. Estados evolutivos de la lima ácida Tahití (*Citrus latifolia* Tanaka) [20].

ESTADO	ESTADOS EVOLUTIVOS
Desarrollo de yemas	<ul style="list-style-type: none"> - Reposo: Las yemas vegetativas y de inflorescencias están indiferenciadas, cerradas y cubiertas por escamas. - Las yemas comienzan a hincharse. - Finaliza el hinchamiento de las yemas: las escamas verdes están ligeramente separadas. - Empieza la apertura de las yemas. - Los brotes de las hojas son visibles.

Tabla 1. Continuación

Desarrollo de hojas	<ul style="list-style-type: none"> - Las primeras hojas empiezan a separarse: las escamas verdes están ligeramente abiertas y las hojas emergiendo. - Las primeras hojas son visibles. - Se hacen visibles más hojas, pero sin alcanzar su tamaño final. - Las hojas alcanzan su tamaño final.
Desarrollo de brotes	<ul style="list-style-type: none"> - Empieza a crecer el brote: se hace visible su tallo. - Los brotes alcanzan alrededor del 20% de su tamaño final. - Los brotes alcanzan alrededor del 90% de su tamaño final.
Desarrollo de flores	<ul style="list-style-type: none"> - Las yemas se hinchan: están cerradas y se hacen visibles las escamas, ligeramente verdes. - Las yemas revientan: las escamas se separan y se hacen visibles los brotes florales. - Las flores se hacen visibles: están todavía cerradas (botón verde) y se distribuyen aisladas o en racimos en inflorescencias con o sin hojas. - Los pétalos crecen; los sépalos envuelven la mitad de la corola (botón blanco). - Los sépalos se abren: se hacen visibles los extremos de los pétalos, todavía cerrados, de color blanco o amarillado. - La mayoría de las flores, con los pétalos cerrados, adquieren la forma de una bola hueca y alargada.
Floración	<ul style="list-style-type: none"> - Primeras flores abiertas. - Comienza la floración: alrededor del 10% de las flores están abiertas - Plena floración: alrededor del 50% de las flores están abiertas. - Empiezan a caer los primeros pétalos. - Las flores se marchitan: la mayoría de los pétalos están cayendo. - Fin de la floración: han caído todos los pétalos.
Desarrollo del fruto	<ul style="list-style-type: none"> - Cuajado²: el ovario comienza a crecer; se inicia la caída de frutos jóvenes. - El fruto, verde, está rodeado por los sépalos a modo de corona. - Algunos frutos amarillean: se inicia la caída fisiológica de frutos. - El fruto alcanza alrededor del 40% del tamaño final. Adquieren un color verde oscuro. Finaliza la caída fisiológica de frutos. - El fruto alcanza alrededor del 90% de su tamaño final.

²Cuajado: Proceso en el cual el ovario se transforma en fruto, es el comienzo del crecimiento del fruto.

Tabla 1. Continuación

Maduración del fruto	<ul style="list-style-type: none"> - El fruto empieza a colorear (cambio de color). - El fruto está maduro para ser recolectado, aunque no ha adquirido todavía su color característico. - Maduración avanzada; se va incrementando el color característico de cada fruto. - Fruto maduro y apto para el consumo: tiene su sabor y firmeza naturales; comienza la senescencia³ y la abscisión⁴.
Senescencia y comienzo del reposo	<ul style="list-style-type: none"> - Los brotes han completado su desarrollo; las hojas adquieren su plena tonalidad verde. - Las hojas viejas inician la senescencia y comienzan a caer. - Reposo invernal.

La fase de desarrollo del fruto inicia con el proceso de “cuajado” en el cual se produce la transición del ovario de la flor a un fruto en formación para iniciar su crecimiento, y finaliza con la cosecha del fruto, momento en el cual ha alcanzado las propiedades físico-químicas que lo hacen apetecibles para el consumo [21].

Durante el desarrollo y maduración el fruto crece a una velocidad dependiente de aspectos fisiológicos y ecológicos, que dependen de la especie y la zona de cultivo. En 1958, Bain [22] describió el crecimiento de frutos cítricos con una curva sigmoideal simple para la variable peso fresco en frutos de *Citrus sinensis* L. Osbeck. Posteriormente, Goren y Monselise [23], confirmaron estos resultados en la misma especie y Guardiola y Lázaro [24] en frutos de mandarina Satsuma (*Citrus unshiu* Marc). Estudios recientes, han demostrado que también se observa una curva sigmoideal simple cuando el crecimiento se expresa como diámetro ecuatorial en función del tiempo [25 - 28]. En esta curva se diferencian tres fases (**Figura 2**): la división celular (I), el alargamiento celular (II) y la maduración y senescencia (III); además cada fase se caracteriza principalmente por la tasa de crecimiento del fruto y la competencia de nutrientes en los diferentes órganos de la planta [29].

³ Senescencia: Fenómeno en el cual el fruto comienza a perder sus propiedades físico-químicas tras la maduración.

⁴ Abscisión: Separación o caída de alguna parte de la planta.

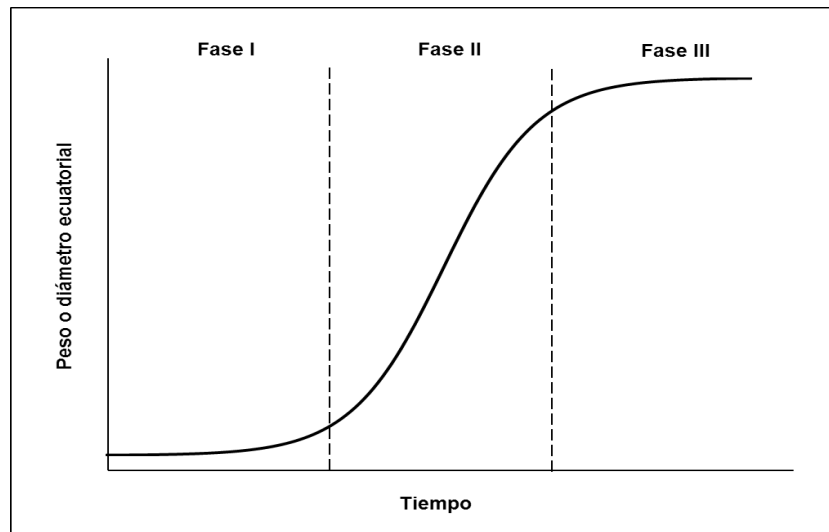


Figura 2. Evolución a través del tiempo del crecimiento de los frutos cítricos.

La división celular se inicia tras la antesis⁵, en esta etapa el fruto alcanza casi el número total de células que va a tener, pero aumenta muy poco de tamaño, y se caracteriza por ser una fase de crecimiento logarítmica. Durante esta etapa, los frutos para su crecimiento demandan carbohidratos y ácidos orgánicos, los cuales son transportados desde las hojas; además los frutos sintetizan también carbohidratos, a partir de dióxido de carbono (CO_2), reacción que es continua durante el crecimiento, disminuyendo su velocidad paulatinamente conforme va madurando el fruto, ya que en esta reacción intervienen fotosistemas conformados por pigmentos como la clorofila que se van perdiendo conforme crece el fruto [30].

Una vez termina la división celular, comienzan a acumularse en las células de los frutos, agua y fotosintatos como pigmentos y carbohidratos, lo que origina una expansión marcada de los tejidos y un rápido aumento de volumen y peso, dando lugar al alargamiento celular, por lo que se conoce como una fase de crecimiento lineal.

⁵Antesis: Fase del desarrollo floral, desde la aparición hasta su marchitez.

Finalmente, en la etapa de maduración, caracterizada por una baja tasa de crecimiento se producen una secuencia de cambios físico-químicos que determinan las propiedades organolépticas que hacen al fruto apetecible para el consumo. En general, en esta fase se pierde clorofila, se sintetizan carotenoides, y hay variaciones en la acidez, textura y consistencia del fruto. Esta etapa concluye con la senescencia y caída del fruto, que está acompañada por la disminución de la capacidad fotosintética, pérdidas en contenido de clorofila y cambios en la permeabilidad de membranas que favorecen las pérdidas de agua de células y tejidos y ocasionan el deterioro del fruto.

Para facilitar el estudio detallado de estas curvas de crecimiento, es posible encontrar una expresión matemática empleando métodos estadísticos como el análisis de regresión no lineal (**Tabla 2**). Este método se encarga de linealizar una función propuesta, y obtener los valores de parámetros que mejor se ajusten a los datos experimentales [31].

Tabla 2. Modelos estadísticos para describir el crecimiento de los frutos cítricos.

MODELO	ECUACIÓN
Logístico	$y = \frac{\alpha}{1 + \beta * e^{-\gamma * X}}$
Romperte	$y = \alpha * e^{-\beta * e^{-\gamma * X}}$
Mono molecular	$y = \alpha * (1 - \beta * e^{-\gamma * X})$
Von Bertalanffy (VB)	$y = \alpha * (1 + \beta * e^{-\gamma * X})^\delta$
Richards	$y = \frac{\alpha}{(1 + e^{(\beta - \gamma * X)})^\delta}$
Ceibal	$y = \alpha - \beta * e^{-\gamma * X^\delta}$
Morgan – Mercar – Florín (MMF)	$y = \frac{\beta * \gamma + \alpha * X^\delta}{\gamma + X^\delta}$

Los parámetros calculados están asociados variables biológicas que afectan el crecimiento de los frutos; por ejemplo, el parámetro alfa (α) representa el máximo valor del diámetro ecuatorial que alcanzará el fruto, el parámetro beta (β) se relaciona con el intercepto al eje de la abscisa, y gamma (γ) está relacionada con la tasa de crecimiento, siendo delta (δ) el único parámetro que se utiliza solo para un mejor ajuste de los datos a los modelos [32].

1.2.2 Parámetros de calidad de la cosecha

Los parámetros de calidad para frutas cítricas pueden ser de tipo externo o interno, que respectivamente se relacionan con las propiedades físicas y químicas. Los parámetros externos e internos permiten determinar el grado de madurez de la fruta y el tipo de mercado hacia el cual puede ser destinada, ya que si está destinada al procesamiento para alguna industria, las exigencias se centran en los parámetros de tipo interno, mientras que, si se destina para el mercado fresco la fruta debe pasar por una clasificación bastante exigente respecto a sus propiedades físicas.

Para el caso de lima ácida Tahití, a nivel nacional, el Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (ICONTEC) contempla en la Norma Técnica Colombiana (NTC) 4087 [33], los requisitos que debe cumplir para el consumo en fresco o como materia prima para procesamiento, en cuanto al diámetro ecuatorial, peso, color, apariencia, acidez y porcentaje de jugo. A nivel internacional, dependiendo del país, dos parámetros adicionales a los contemplados en la NTC-4087 son empleados para determinar la calidad de la lima Tahití: los sólidos solubles y el índice de madurez.

1.2.2.1 Parámetros internos.

Acidez titulable. Es el resultado del contenido de ácidos minerales y orgánicos, presentes en los jugos cítricos. Se considera un indicador de

madurez de la fruta pues la acidez disminuye progresivamente conforme aumenta el grado de maduración, hasta alcanzar niveles tan bajos que la fruta se torna insípida, perdiendo su valor comercial [34]. Ya que el ácido cítrico constituye entre el 85-95 % del total de los ácidos presentes, por convención la acidez titulable se expresa como porcentaje de ácido cítrico [35]. En general para control de calidad de la lima Tahití se aceptan valores de porcentaje de ácido cítrico máximos entre el 5 y 6% [36].

Sólidos solubles totales (SST). Los sólidos solubles se consideran como un parámetro de calidad, pues indican el grado de madurez de la fruta; en el caso de las frutas cítricas conforme avanza la maduración, se produce un incremento constante del contenido de sólidos solubles [37]. En los jugos cítricos, los principales sólidos solubles son los ácidos orgánicos como el ácido cítrico, ácido málico y ácido galacturónico, producto de la hidrólisis de la pectina y azúcares en menor proporción como: sacarosa, D-glucosa y D-Fructosa [38].

La concentración de sólidos solubles se expresa en grados Brix, ya que un grado corresponde a la densidad que tiene a 20°C una solución de sacarosa al 1% y a ésta concentración corresponde también un determinado índice de refracción; así pues, se considera que el jugo de un fruto tiene una concentración de sólidos solubles de un grado Brix, cuando su índice de refracción es igual al de una solución de sacarosa al 1 % (p/v) [39, 40].

Índice de madurez. Es la relación entre los sólidos solubles totales y la acidez titulable. Representa el resultado de dos procesos metabólicos simultáneos: el incremento de carbohidratos totales y el decremento del ácido cítrico, y, por tanto, se asocia al sabor característico de los jugos cítricos. Aunque la NTC para la lima Tahití no contempla este parámetro como requisito de calidad, es necesaria su determinación en las cosechas colombianas con fines de exportación, pues en un gran número de países estiman esta relación un criterio de aceptación o rechazo de los frutos [41].

Porcentaje de jugo. Es un indicador de madurez, ya que cuanto menos maduro el fruto, más difícil resulta la extracción de su jugo. A nivel mundial, para la lima Tahití, el porcentaje de jugo mínimo exigido para uso como materia prima oscila entre 20 – 27% [42], mientras que, para consumo fresco es aproximadamente del 42% [43].

1.2.2.2 Parámetros externos. Estos parámetros cobran especial importancia en las frutas destinadas al consumo fresco, ya que este mercado es más exigente al respecto [42, 43].

Diámetro ecuatorial y peso. Estos parámetros indican el grado de madurez de la fruta y a su vez permiten clasificar los frutos en diferentes categorías para facilitar su comercialización (**Tabla 3**). En general, a nivel mundial la lima Tahití se comercializa aproximadamente a partir de los 42 mm de diámetro ecuatorial y 42 gramos de peso.

Tabla 3. Calibres de la lima Tahití.

CALIBRE	Diámetro ecuatorial (mm)	Peso promedio (g)
A	≥	179
B	67 – 60	132
C	59 – 50	90
D	49 – 43	61
E	≤ 42	42

Apariencia. Hace referencia a características como: la sanidad de la fruta (ataque de insectos o enfermedades), ausencia de olores o materiales extraños, humedad, firmeza y presencia de cáliz. Es un criterio de evaluación, que determina la calidad de la fruta, siendo el grado de tolerancia diferente para cada país.

Color. El color es un parámetro de calidad de tipo externo por lo cual se considera una característica muy importante en las frutas destinadas al consumo fresco; aunque no es un criterio de aceptación o rechazo, pues depende específicamente del gusto del consumidor, se emplea como un indicador de la madurez de la fruta, ya que estudios realizados al respecto, indican que a menor intensidad del color verde, mayor grado de madurez.

1.3 CUAJADO Y ABSCISIÓN DEL FRUTO

1.3.1. Cuajado

El cuajado se define como la fase del desarrollo que marca la transición de una flor (ovario) a un frutito que se desarrollara hasta la madurez [44]. En cítricos, se observan dos tipos de cuajado, uno inicial, que corresponde al porcentaje de ovarios que continúan creciendo después de la antesis, y el cuajado final, que se mide como el porcentaje del número de flores que forman finalmente los frutos [45].

Entre los factores más importantes que influyen en el cuajado de frutos, se encuentra la competencia que se establece por carbohidratos entre flores y frutos. En la mayor parte de las variedades de cítricos, el déficit de cuajado solo se presenta cuando la planta florece mucho, debido a que es incapaz de suplir la demanda de carbohidratos para nutrir a los ovarios que inician el desarrollo, por lo cual se desprenden del árbol, reduciéndose el cuajado de frutos [46].

Aunque se han demostrado que el número de flores producidos por la planta llega a estar inversamente relacionado con el porcentaje de frutos finalmente cuajados [46], también se han encontrado cosechas con bajos porcentajes de cuajado que florecen muy poco, esto se debe a que un número elevado de frutos son cosechados en la cosecha inmediatamente anterior, fenómeno que se conoce como alternancia; este fenómeno ocurre porque durante la fase final de crecimiento el fruto, este consume grandes cantidades de carbohidratos,

generando un déficit de las reservas, lo cual ocasiona una baja diferenciación floral en la nueva cosecha [47].

1.3.2. El proceso de abscisión

La abscisión es un proceso selectivo que consiste en la caída de una parte de la planta; en cítricos, la abscisión de flores y frutos, es determinante para el rendimiento y calidad de las cosechas, pues está relacionada con el número de frutos que finalmente cuajan y con las propiedades físicas del fruto [48].

En general, para las plantas cítricas se distinguen dos ondas de abscisión sucesivas que afectan la floración y el desarrollo de los frutitos [49]. La primera onda, induce masivamente la abscisión de flores y ovarios, mientras que la segunda, reduce el número de frutos que ya presentan un crecimiento significativo, en la fase de alargamiento celular [50]. Esta última onda de abscisión está determinada principalmente por factores nutricionales entre los que se incluye la competencia de los frutos por carbohidratos [51].

Durante este periodo, la velocidad de acumulación de materia del fruto excede la capacidad fotosintética de las hojas, por lo cual la planta recurre al agotamiento de sus reservas [52]. Una vez esto ocurre, se limita el suministro de carbohidratos al fruto, ocasionando la caída de un buen número de ellos, posiblemente, porque los cítricos poseen un mecanismo interno que ajusta el número de frutos que se desarrollan a la disponibilidad de carbohidratos [53],

1.4 FACTORES QUE AFECTAN EL RENDIMIENTO Y CALIDAD DE LAS COSECHAS

En los cítricos, el número de frutos que llegan a cosecha y sus propiedades organolépticas, son consecuencia de factores endógenos y exógenos inherentes a la planta. Conocer la relación entre estos factores y su influencia en términos de rendimiento y calidad para cada especie, ha permitido entender

el comportamiento de la planta y así el desarrollo de plataformas de manejo de cultivo, con el objetivo de mejorar la productividad de las cosechas.

Los factores endógenos incluyen factores genéticos y fisiológicos propios de cada especie y variedad. Los factores exógenos incluyen las condiciones del medio y cultivo, el tipo de suelo, clima y ubicación geográfica. Claramente, los factores genéticos y las condiciones del medio y el clima, no pueden ser controlados mientras los factores fisiológicos si pueden ser modificados para mejorar la productividad de las cosechas. Por esta razón actualmente son la principal área de estudio en el desarrollo de este tipo plantas [54].

1.4.1 Factores fisiológicos

Los factores fisiológicos de todas las plantas se dividen en nutricionales y hormonales. Los primeros hacen referencia, prioritariamente, a la disponibilidad de carbohidratos, mientras que, los segundos se relacionan con señales que determinan la capacidad sumidero del fruto, es decir, con la capacidad de la planta para retenerlos carbohidratos en forma de almidón como reserva. En cuanto a los carbohidratos, actúan como insumo para la construcción de tejido y aportan la energía necesaria para el desarrollo de las diferentes fases de crecimiento del fruto, actuando en conjunto con las hormonas que garantizan su acción y distribución donde sean necesarios.

Cuando hay deficiencias en alguno de estos dos factores la producción y el desarrollo del fruto se reducen de acuerdo con el estado de desarrollo en que se produzca el déficit. Así pues, si el déficit nutricional u hormonal se produce durante la etapa de división celular, los frutos reducen su tasa de crecimiento y por tanto su capacidad de sumidero, de modo que todos aquellos que reciben una nutrición deficiente se desprenden de la planta. Por otra parte, si el déficit se produce durante la fase de alargamiento celular, los frutos no caen pero reducen su tasa de crecimiento y, consecuentemente, su tamaño final. Así se explica por qué es posible encontrar cosechas muy bajas de frutos pequeños y, viceversa, cosechas muy elevadas de frutos de buen tamaño [55].

El déficit de carbohidratos puede ocasionar bajos niveles de floración y en consecuencia, bajo número de frutos. Éste fenómeno se conoce como alternancia en las cosechas, y sucede cuando al producirse una cosecha con elevado número de frutos, se reducen las reservas de carbohidratos necesarias para que se produzca la floración en la siguiente cosecha. En algunos casos esto puede ser positivo, ya que al presentarse un menor número de frutos, la capacidad del árbol para nutrirlos es menos limitada y existe una menor probabilidad de caída [56].

Por otra parte, el déficit hormonal promueve la floración una vez se haya realizado la cosecha de los frutos. En la actualidad, se han implementado tratamientos a base de hormonas para el control de la floración con excelentes resultados, ya que la reducción de la floración, ocasiona una mejor distribución de carbohidratos con lo cual se aumenta el número de frutos que llegan a cosecharse [57].

1.4.2 Factores genéticos

Son factores que determinan tanto el comportamiento y desarrollo de la planta, como las características de su fruto. Dichos factores no pueden manipularse en condiciones de cultivo, pues dependen de la especie, género o familia a la cual pertenezca la planta. Para el caso de especies híbridas, los factores genéticos que influyen en ellas, son una combinación de los genes transmitidos de cada especie de origen.

Los factores genéticos en cítricos han sido estudiados debido a su influencia sobre la calidad del fruto, especialmente los relacionados con: el tamaño del fruto, el grosor de la corteza, la producción de zumo, la capacidad de almacenamiento de nutrientes, entre otros [58]. En general, la manipulación de estos factores es difícil pues, frecuentemente, son modificados espontáneamente (mutaciones) y dan lugar a características diferenciales que, persisten en el tiempo, dando lugar a una nueva variedad, sin que pueda controlarse de alguna manera [59].

Entre las modificaciones genéticas más destacadas que se conocen en especies cítricas, se encuentra la obtención de híbridos por modificaciones genéticas como la mandarina *Fortune*, mandarina *Nova*, con características físico-químicas de amplia aceptación comercial y el uso de ciertos portainjertos para combatir diferentes enfermedades que aquejan a los cítricos [60].

En el caso particular de la lima ácida Tahití, diversos estudios sobre posibles portainjertos han sido realizados con el objetivo de mejorar la productividad de las cosechas; entre los más destacados se encuentra el realizado por Campbell [61], en el cual se evaluaron veintidós especies cítricas como posibles portainjertos, siendo la especie *Citrus volkameriana*, aquella que mostró los mejores resultados en cuanto a calidad de los frutos, en climas tropicales húmedos, característicos de algunos territorios Colombianos.

Otras modificaciones genéticas reportadas para el mejoramiento del rendimiento y calidad de la lima ácida Tahití, ha sido el uso de portainjertos híbridos; estos además de mejorar las propiedades organolépticas de los frutos, también lo hacen más resistente ante el ataque de plagas y menos susceptible a los cambios de clima. Dentro de los híbridos reportados con mejores resultados se encuentra el producto entre las especies *Citrus limonita* *Os Beck* y *Poncidres trifoliada* Rif, probado por Cantuarías *et al* [62] en suelos brasileros, con el cual se obtuvieron frutos de alta calidad, cuyas características lo convierten en una alternativa viable, para la propagación del cultivo de la lima Tahití.

1.4.3 Factores exógenos

Se refiere a las condiciones del medio y el cultivo, especialmente a la temperatura, luminosidad, pluviometría y cuidados del cultivo como el riego y la poda. En cuanto a la temperatura, estudios realizados por Sinclair *et al.* [63] demuestran que influencia principalmente en la acumulación de metabolitos en el fruto y, por tanto, su crecimiento. El fruto llega a ser altamente susceptible a las altas temperaturas en la fase inicial de división celular, lo cual puede llegar

a desencadenar la caída masiva de frutos y hasta una reducción de su tasa de crecimiento a lo largo del ciclo de desarrollo.

La susceptibilidad a la temperatura se ve demostrada al comparar las tasas de crecimiento de frutos provenientes de áreas subtropicales y tropicales. En las zonas subtropicales, la temperatura varía constantemente, contrario a lo ocurrido en las zonas tropicales, donde es más uniforme durante todo el año; esto genera que bajo condiciones tropicales, el fruto crezca casi ininterrumpidamente durante todo su ciclo de desarrollo, y se reduzca el tiempo necesario para que alcance la maduración. En cambio, bajo condiciones subtropicales, el ritmo de crecimiento es más lento y depende de los cambios térmicos estacionales [64].

Otro efecto de la temperatura es su influencia sobre la calidad del fruto, reflejada en la relación inversa con el porcentaje de ácidos libres acumulado en el zumo; es así, como en zonas de elevadas temperaturas, los frutos se caracterizan por tener bajos porcentajes de acidez, haciéndoles menos apetecible en el mercado. También se ha demostrado que la elevada luminosidad y las temperaturas altas, producen condiciones favorables para aumentar la actividad fotosintética y, por tanto, una mayor síntesis y acumulación de carbohidratos solubles en el fruto, previniendo su caída y garantizando el suministro de energía necesario para su desarrollo [65].

En cuanto a la pluviometría, en general, tanto en climas tropicales como subtropicales se ha comprobado que, las épocas húmedas y frescas inducen períodos de semireposo de los árboles, con bajas tasas de crecimiento en los frutos [66]. Por otra parte, en época de lluvias los frutos aumentan en tamaño, y en de contenido en zumo y reducen su concentración de azúcares y ácidos libres. Por el contrario, las épocas secas y calurosas se asocian con períodos de crecimiento y desarrollo activo de los órganos de la planta, pero bajo crecimiento del fruto, por lo cual el riego juega un papel muy importante, ya que el déficit hídrico durante estas épocas, pueden provocar retrasos irrecuperables en el tamaño final del fruto [67].

Con respecto a la lima Tahití, Southwick *et al* [68] demostró que el estrés hídrico, promueve la floración a bajas temperaturas, y que este fenómeno puede ser controlado mediante el uso de complejos hormonales. En cuanto a la calidad de limas y limones, Davis *et al* [69], afirman que los climas tropicales medios, ubicados entre los 900 – 1800 m a nivel del mar, son los territorios más propicios para el cultivo de estas frutas. En estos territorios, donde las épocas secas y lluviosas se alternan durante el año, los frutos presentan bajos contenidos de sólidos solubles y ácidos orgánicos, y buena coloración en la cáscara. Este último efecto es debido a que las a las temperaturas medias, incrementan los procesos metabólicos de la plantas, sin promover la síntesis de carotenoides responsables del color amarillo indeseado a estas frutas.

1.5 CARBOHIDRATOS EN PLANTAS

Los carbohidratos de las plantas se dividen en dos grupos: estructurales y no estructurales (CNE). Los primeros forman parte de la pared celular y entre éstos se encuentran la celulosa, la hemicelulosa y la pectina. Estos, son causantes de la fibrosidad del alimento, no están disponibles para el metabolismo energético de la planta y son insolubles en agua. Por otra parte, los CNE se almacenan en órganos vegetativos como hojas, raíces, rizomas, estolones, coronas y parte inferiores del tallo. Los principales CNE en las plantas son monosacáridos como D-(+)-glucosa y D-(-)-fructosa, disacáridos como sacarosa y maltosa, y polisacáridos como almidones y fructosanos. La principal función de los CNE es proporcionar la energía para el rebrote de las plantas que pueden ser cosechadas varias veces en una misma temporada [70].

Dentro de los CNE existen dos distinciones, los llamados carbohidratos móviles y los de reserva. Los CNE móviles son aquellos que están disponibles durante todo el metabolismo y se encuentran en las hojas de las plantas, como producto directo de la fotosíntesis, están constituidos principalmente por glucosa, fructosa y sacarosa (**Figura 3**). La glucosa y la fructosa son monosacáridos quirales que presentan actividad óptica; en las plantas siempre

se encuentran como D-(+)-glucosa y D-(-)-fructosa, respectivamente, y en sus formas cíclicas como α -D-Glucopiranososa y α -D-Fructofuranosil. Por otra parte, la sacarosa es un disacárido formado por una molécula de α -D-glucosa condensada con otra β -D-fructosa, en sus formas cíclicas. En la unión intervienen los grupos reductores de ambos azúcares, por lo que la sacarosa no presenta poder reductor [71].

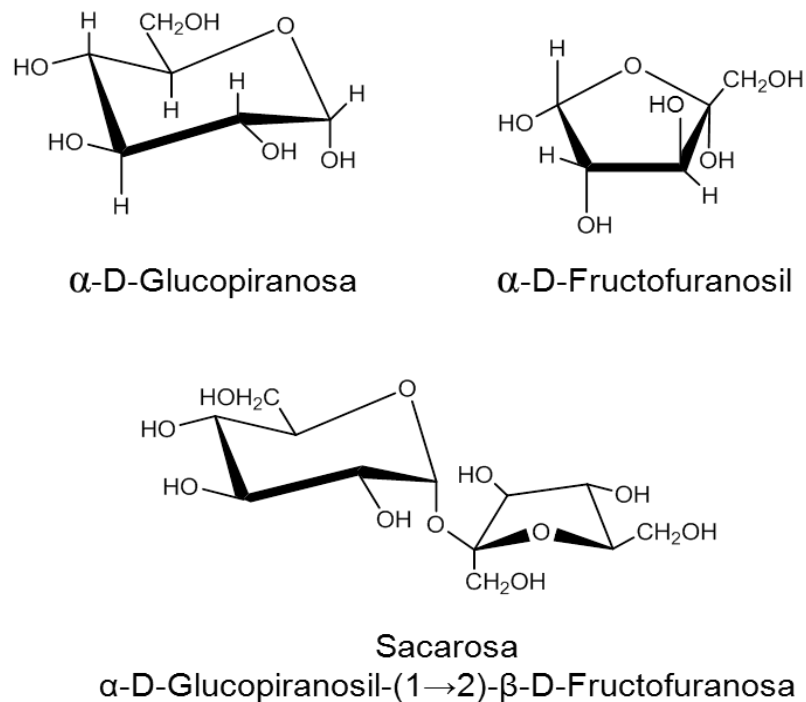


Figura 3. Carbohidratos móviles no estructurales

Otro tipo de CNE son los de reserva, que en el transcurso del metabolismo, se acumulan en diversas partes de la planta, aunque más tarde pueden ser reconvertidos en formas más sencillas y así, desaparecer de nuevo. Los CNE de reserva solo pasan a desempeñar un papel activo cuando se han terminado los CNE móviles de mayor disponibilidad [72].

En las plantas, el principal CNE de reserva es el almidón, polisacárido formado por dos polisacáridos llamados amilosa y amilopectina. A ambos polisacáridos están compuestos por miles de unidades de D-glucosa unidas por enlaces glicosídicos α (1,4), siendo las ramificaciones de la amilopectina su única

diferencia [73].

En las plantas, el almidón se acumula fácilmente en las raíces y partes inferiores debido a su alta insolubilidad. La acumulación del almidón depende de la velocidad de la fotosíntesis, debido a que la D-glucosa se convierte en almidón sin pasar por intermediarios. A mayor velocidad de fotosíntesis, mayor, concentración de D-glucosa en el medio y aumento en la velocidad de síntesis de almidón. Si se somete a la hoja de la planta a una iluminación continua, el almidón continuara acumulándose indefinidamente [74].

Por otra parte, la hidrólisis del almidón a D-glucosa es una reacción simultánea, y si la fotosíntesis se detiene y la concentración de D-glucosa disminuye por transporte, la síntesis del almidón se retarda hasta que se hace más lenta que el proceso inverso de hidrólisis. En estas condiciones, el almidón precipitado va volviendo lentamente a la solución y comienza a desaparecer inicialmente de las hojas hasta las partes más bajas de la planta, al ser transportado en forma de azúcares [75].

Adicionalmente, la sacarosa por ser soluble, también resulta ser un carbohidrato de reserva, ya que se acumula con facilidad, aunque no puede condensarse en otras sustancias más complejas, puede ser hidrolizada o consumida posteriormente [76].

1.5.1 Influencia de carbohidratos no estructurales en plantas cítricas

En diversas especies de plantas cítricas se han realizado estudios para entender la influencia que ejercen los carbohidratos en las diferentes fases de crecimiento y desarrollo de la planta, y su posible relación con el rendimiento y la calidad de las cosechas, revelando interesantes resultados, en especial en tres etapas determinantes del cultivo: la floración, la abscisión del fruto y la fructificación [76, 77].

En la etapa de floración y postfloración se ha determinado que los

carbohidratos de reserva se hidrolizan y posteriormente se movilizan hasta alcanzar un valor mínimo al final de la primera abscisión en general en todas las especies cítricas. Sin embargo la velocidad de dicha movilización varía de una especie a otra, por ejemplo se ha señalado que es más rápida en la variedad de naranjo Navelate que en Washington navel [78].

Otro trabajo al respecto, realizado por Goldschmidt y Golomb [79], muestra que en especies de mandarinas, las cosechas que mostraban altos niveles de floración y elevadas concentraciones de almidón, presentaban un nivel muy bajo de desarrollo del fruto.

La abscisión del fruto, es una fase determinante en el rendimiento y la calidad de las cosechas, pues si se produce cuando el fruto no ha alcanzado la madurez suficiente, el producto resultante no solo carecerá de las propiedades organolépticas adecuadas, sino también se, reducirá el número de frutos aptos para el consumo y comercialización y por tanto el rendimiento de la cosecha. Además, la abscisión del fruto se considera como un mecanismo de ajuste del número de frutos que un árbol es capaz de soportar y se relaciona con la tasa de crecimiento de los frutos jóvenes y la disponibilidad de carbohidratos [80 - 82].

En especies cítricas es común encontrar dos máximos de abscisión durante el desarrollo inicial del fruto. El primer máximo se debe a la separación de flores o de ovarios que han crecido muy poco y tiene lugar por el pedicelo. El segundo máximo de abscisión ocurre aproximadamente a las 8 semanas después de la floración con el desprendimiento, por su base, de frutos en desarrollo [83]. La abscisión inicial, es decir en el primer máximo, que tiene lugar durante las cuatro-seis semanas tras la floración, no guarda relación con los niveles de azúcares libres en el fruto y por consiguiente no se relaciona con el suministro de azúcares [84, 85]. Por el contrario, los últimos frutos que se desprenden presentan un menor contenido en azúcares libres que los frutos que continúan su desarrollo, por lo que su abscisión se atribuye a una limitación en el suministro de carbohidratos [86].

La abscisión final del fruto es principalmente determinada por factores nutricionales [87 - 90]. En esta etapa se establece una competencia por los carbohidratos disponibles en el resto de la planta, con un consiguiente agotamiento de las reservas. El nivel de sacarosa en las hojas cae a valores bajos, demostrando una limitación en el suministro de carbohidratos [86 - 88]. La disminución en la abscisión de frutos, cuando la disponibilidad de carbohidratos se incrementa por un aumento en la fotosíntesis [89], refuerza la hipótesis de que la abscisión final está relacionada con la competencia entre frutos por carbohidratos.

En general para plantas cítricas se ha demostrado que la disponibilidad de carbohidratos es proporcional a la cantidad de frutos formados, ya que durante la formación de estos se produce una mayor hidrólisis de los carbohidratos de reserva. Dentro de los estudios más relevantes que respaldan esta afirmación, se puede encontrar el realizado por Sanz *et al.* [89]. Estos autores, determinaron que el contenido en carbohidratos de reserva, fundamentalmente almidón, alcanza en las hojas adultas un valor máximo al principio de la floración, cuando no hay presencia aun de frutos; una vez iniciada la etapa de fructificación se observa una disminución gradual en la reserva de carbohidratos.

El consumo de carbohidratos por el fruto durante el proceso de post-floración, aumenta inicialmente alcanzando un valor máximo a mediados de la abscisión final. El aumento en la tasa de crecimiento de los frutos se compensa con la abscisión de algunos, de tal modo que el consumo se mantiene constante [91, 92].

Una importante relación de los carbohidratos con la calidad de la cosecha se ha comprobado para numerosas especies cítricas. Diversos autores demostraron que el cuajado final del fruto está limitado por la disponibilidad de carbohidratos, y que un suministro insuficiente determina la abscisión de los frutitos en desarrollo durante la post-floración e impide su madurez y la

adquisición de las propiedades organolépticas adecuadas para su consumo y comercialización [93 - 96].

En cuanto al crecimiento y desarrollo del fruto y su relación con la disponibilidad de carbohidratos, los trabajos de Guardiola y Goldschmidt *et al.* [97, 98], demuestran que el estado de desarrollo del fruto determina los factores limitantes para su crecimiento. El peso individual en la etapa de madurez, esta inversamente relacionado con la cantidad de frutos por árbol. Otro estudio al respecto, evaluando la translocación de metabolitos mediante marcaje, indica que el incremento en el cuajado y crecimiento inicial en naranja Valencia está relacionado con una atmósfera enriquecida con CO₂, confirmando el efecto de la disponibilidad de carbohidratos en el desarrollo del fruto [90, 99].

En conclusión estos trabajos permiten afirmar que el cuajado y el desarrollo del fruto dependen del suministro de carbohidratos. Estos proceden de la movilización de las reservas acumuladas en la planta, y de la fotosíntesis.

Por otra parte, en el naranjo Valencia, la acumulación de almidón en las hojas al final del invierno está relacionada inversamente con la cosecha [100]. En la variedad precoz de mandarina Owari Satsuma, la acumulación de carbohidratos en las hojas no se inicia hasta después de la recolección [101]. Además de las hojas adultas, otras partes de la planta, en particular las raíces, acumulan cantidades elevadas de almidón [102]. La acumulación de carbohidratos en las raíces es estimulada por las bajas temperaturas [103].

Otros trabajos interesantes relacionados con carbohidratos en plantas, se han enfocado en el estudio de la incidencia de algunas prácticas de manejo del cultivo con los niveles de carbohidratos. Entre estos trabajos se destacan el realizado por Mehouchi *et al* [104], quienes estudiaron la relación entre la disponibilidad de carbohidratos y la defoliación; estos autores también observaron que para especies de mandarinas, la defoliación reduce la disponibilidad de carbohidratos, además del cuajado y por tanto la

productividad de los cultivos.

Adicionalmente, en árboles de *Citrus unshiu*, la defoliación total o parcial en la floración no reduce los niveles de carbohidratos en frutos en desarrollo pero si incrementa significativamente la primera onda de abscisión. Estas observaciones son respaldadas por las expuestas por Agustí *et al* [105] quienes plantean que en la mandarina Satsuma y la Kits, una reducción en la disponibilidad de carbohidratos inducida por defoliación, provoca la abscisión de frutos durante la etapa de crecimiento.

En el caso del anillado⁶ como práctica común en el manejo del cultivo de especies cítricas, los estudios realizados por Ruiz *et al* y Duarte *et al*, [106, 107], acerca de la influencia de este durante la post-floración, demuestran que el anillado impide la competencia de la raíz y aumenta la cantidad de carbohidratos metabolizables disponibles para los frutos, sin modificar la pauta de abscisión durante 6-7 semanas después de la floración, pero sí el cuajado final.

Trabajos realizados por Iglesias *et al*. [108], con anillado en mandarina Satsuma, plantean la existencia de una correlación entre el contenido en carbohidratos y la abscisión del fruto. Estos autores sugieren que las condiciones que determinan niveles altos de carbohidratos (anillado de ramas) incrementan el contenido en carbohidratos, disminuyendo la velocidad de abscisión y que una condición opuesta (anillado del pedicelo), reduce la disponibilidad de carbohidratos e incrementa la abscisión.

1.5.2 Análisis de carbohidrato móviles

Los carbohidratos son compuestos muy abundantes en la naturaleza, y de gran interés en diferentes industrias, por lo cual numerosos estudios han sido enfocados hacia la evaluación de diversas técnicas cromatográficas para su separación y análisis; las primeras técnicas empleadas fueron la cromatografía

⁶ Anillado: Es una práctica agrícola que consiste en interrumpir el floema, removiendo una pequeña porción de corteza o simplemente haciendo una incisión al tallo.

en capa fina y en papel, pero la separación estaba limitada a analitos conocidos, además presentaban baja resolución y no podían ser empleadas en algunos casos para cuantificación [109].

Las cromatografías de gas – sólido y gas – líquido, acopladas a diferentes detectores también han sido bastante utilizadas para el análisis de carbohidratos [110 - 112], especialmente para la elucidación de estructuras; sin embargo, son cada vez menos empleadas gracias al desarrollo de nuevas técnicas, para las cuales no es necesario someter las muestras a reacciones de reprivatización como la formación de los respectivos alquil-éteres o alquil-ésteres, o la trimetil-sililación, no requieren de altos costos de instrumentación, y emplean tiempos de análisis mucho más cortos.

En los últimos años la electroforesis capilar (EC) ha sido empleada para el análisis de carbohidratos por la sencillez de su instrumentación y la baja cantidad de muestra necesaria, a pesar de esto, la baja reproducibilidad de los análisis y la dificultad para realizar la separación y detección, debido a los altos valores de pH requeridos para la ionización de los analitos, limitan sus aplicaciones [113, 114].

Por otra parte la cromatografía líquida (HPLC), con la gran cantidad de variantes que presentan, en cuanto a selección de columnas y detectores, han permitido el análisis de carbohidratos en numerosas matrices (**Tabla 4**). En general, la preparación de la muestra consiste en la extracción metabólica de los carbohidratos, seguida de procedimientos de limpieza del extracto y su posterior disolución en agua, para así obtener muestras libres de lípidos, pigmentos, taninos, terpenos u otros compuestos que podrían interferir en los análisis de carbohidratos [115 - 116].

Para el análisis de carbohidratos por HPLC, se destacan principalmente la cromatografía en fase reversa (NP - HPLC) y la cromatografía de intercambio iónico (IEC - HPLC), ya sea de intercambio aniónico (HPAEC) o catiónico (HPCEC). En el caso de la NP – HPLC, se utilizan columnas de sílice ligadas

con grupos amino, empleando como fases móviles mezclas de solventes como acetonitrilo: agua o metanol: agua; la separación se da por las interacciones hidrofóbicas entre la sílice modificada y los carbohidratos [117, 118]. Por otra parte, en la IEC – HPLC se emplean columnas de resinas sulfatadas o grupos amonios cuaternarios; la separación está dada por la reacción reversible entre los analitos y los grupos cargados de la fase estacionaria, lo cual a su vez determina el orden de salida de los carbohidratos [117, 118].

Tabla 4. Técnicas para análisis de carbohidratos por HPLC.

Tipo de cromatografía	Detector	Matriz	Ref.
HPAEC			
- Fase estacionaria: Resinas poliméricas funcionalizadas con grupos amonios cuaternarios o aminas terciarias.	PAD	Pasto, madera, plantas	118-123
- Fases móviles: Soluciones de acetato de sodio e Hidróxido de sodio, a pH básico.	RID	Plantas	124
	MS	Plantas	125
	ELSD	Bebidas	126
HPCEC			
- Fase estacionaria: Resinas poliméricas funcionalizadas con grupos sulfónicos o ácidos orgánicos.	RID	Alimento, bebidas, vinos,	127-130
- Fases móviles: Soluciones acuosas de acetonitrilo, ácido acético, sulfúrico o fosfórico, a pH ácido.	MS	Plantas	131,132
NP-HPLC			
- Fase estacionaria: Sílice funcionalizada con grupos propilamino.	RID	Plantas	133-136
	FLD	Bebidas	137
- Fase móvil: Soluciones de acetonitrilo o metanol, menos polares que la fase estacionaria.	ELSD	Plantas, vegetales	138-141
	MS	Inulina	142,143
RP - HPLC			
- Fase estacionaria: Sílice funcionalizada con octadecilsiloxano (ODS) u octilsiloxano.	UV	Plantas, bebidas.	144-146
	FLD	Alimentos	147
- Fase móvil: Mezclas de solventes hidrofóbicos, sales y soluciones tampón.	RID	Plantas	148
	MS	Alimentos	149

Tabla 4. Continuación

HILIC			
- Fase estacionaria: Sílice funcionalizada con sulfobetaína que le confiere propiedades hidrofílicas.	ELSD	Alimentos	150-151
- Fase móvil: Mezclas de agua grado HPLC y modificadores orgánicos para mejorar la selectividad del proceso de separación.	MS	Bebidas	152
LEC			
- Fase estacionaria; Resinas poliméricas sulfonadas cargadas con diferentes iones metálicos (Ca ²⁺ , Pb ²⁺).	ELSD	Flores	153
- Fase estacionaria: Agua grado HPLC.	RID	Plantas	154

En cuanto al tipo de detectores empleados para el análisis de carbohidratos, cada uno de ellos presenta ventaja y desventajas que determinan su utilización de acuerdo al tiempo y los recursos disponibles y al tipo de análisis requeridos. Así por ejemplo, los detectores de arreglo de diodos [144 - 146] y fluorescencia [147] empleados en diferentes tipos de cromatografía líquida, son especialmente útiles para análisis simultáneo de un gran número de carbohidratos. Sin embargo, el uso de estos detectores requiere de una previa derivatización de la muestra, por lo cual resultan poco útiles para análisis rutinarios en gran número.

Por otra parte, algunos tipos de detectores en LC no requieren derivatizaciones de la muestra, y ofrecen buena resolución y sensibilidad, como el detector amperométrico de pulso (PAD) y el detector evaporativo de dispersión de luz (ELSD), pero presentan ciertas desventajas. En el caso del PAD, su uso es limitado ya que la posibilidad de epimerización de los analitos, y el cambio de condiciones entre la separación y la detección amperométrica, dificultan la realización de los análisis [118 - 123]. A su vez, el ELSD, aunque es un detector universal, su uso aun es bastante limitado ya que la fase móvil empleada debe ser volátil puesto que es evaporada, lo cual restringe el uso de modificadores orgánicos que facilitan la separación de los carbohidratos [138 - 141].

El detector de índice de refracción (IR) constituye una alternativa viable y es ampliamente utilizado en el análisis de carbohidratos debido a su facilidad de adaptación a los diferentes tipos de cromatografía. El detector IR es muy versátil pues no requiere derivatizar la muestra, se puede utilizar en un amplio rango de analitos, es compatible con todo tipo de fases móviles y, puede adaptarse en línea junto con otros detectores para el análisis simultáneo de diferentes tipos de analitos en una misma muestra. Las principales desventajas del detector IR son la baja sensibilidad, la dependencia de la señal con la temperatura y el uso exclusivo de eluciones isocráticas para su operación [133 – 136].

En cuanto a la identificación y elucidación de nueva estructuras, HPLC – MS es la técnica más empleada, ya que gracias al desarrollo de nuevas interfaces para su acoplamiento, ha sido posible realizar simultáneamente la separación y detección de carbohidratos. Para llevar a cabo los análisis por HPLC – MS se han reportado principalmente el empleo de la ionización por *electrospray* (ESI) como fuente de iones para el análisis de monosacáridos, disacáridos y oligosacáridos, y la ionización por desorción laser asistida por una matriz (MALDI) para la detección e identificación de polisacáridos, ya que su análisis directo no requiere previa hidrólisis. Respecto a los analizadores empleados, se han reportado principalmente los analizadores de trampa iónica (IT) y los analizadores de tiempo de vuelo (TOF), empleados de acuerdo con el tipo de muestra y carbohidratos que se requieran analizar [131, 132, 142, 143].

1.5.3 Análisis de carbohidratos de reserva

Los carbohidratos y sustancias relacionadas pueden ser cuantificados por métodos espectrofotométricos gracias a los grupos reductores presentes en sus estructuras, que al ser tratados con agentes reductores, reaccionan para dar lugar a soluciones color amarillo – naranja muy estables. La cuantificación se realiza aprovechando que la absorbancia de la solución a determinada longitud de onda es proporcional a la cantidad total de carbohidratos presentes (**Tabla 5**).

Tabla 5. Agentes reductores empleados en la cuantificación de carbohidratos por métodos colorimétricos.

Tipo de carbohidrato	Agente reductor	Referencia
Todo tipo	Fenol	[155]
	1 – naftol	[156]
Pentosas	Benzidina	[157]
Ácidos urónicos	Resorcinol	[158]
Cetosas	Naftoresorcinol	[159]
Oligosacáridos, polisacáridos y sacarosa	Diazouracil	[160]

La reacción se lleva a cabo en medio ácido y generalmente el agente reductor depende del tipo de carbohidrato que se vaya a cuantificar. La concentración de carbohidratos puede medirse entonces utilizando una curva de calibración elaborada con una sustancia de referencia, generalmente D-glucosa [161].

1.5.3.1 Método de fenol-sulfúrico

Este método colorimétrico propuesto por *Dubois et al* [155] en 1956 permite la cuantificación de carbohidratos, basado en la reacción entre el fenol y los monosacáridos, en condiciones acidas y de alta temperatura. Bajo dichas condiciones, una serie de reacciones complejas toman lugar, empezando con una deshidratación simple del monosacárido, con la cual se obtienen productos derivados del furano, los cuales a su vez reaccionan con el fenol sulfonado, para dar lugar a un complejo color naranja, cuya absorbancia medida a 490 nm es proporcional a la cantidad del azúcar presente en la reacción (**Figura 4**). Ya que la reacción general no es estequiométrica, pues depende de la estructura del azúcar, es necesario realizar una curva de calibración con un carbohidrato de referencia [162].

El método del fenol – ácido sulfúrico ha sido ampliamente utilizado para el análisis de carbohidratos en diferentes matrices por ser rápido, económico y sensible; además, ya que la presencia de sales y proteínas, características de muestras biológicas o vegetales, no representan interferencias en este método,

se considera altamente específico y preciso [163 - 165]. Adicionalmente, diversos estudios sobre este método han permitido establecer que puede ser utilizado para cuantificar toda clase de azúcares, reductores y no reductores, incluyendo oligosacáridos y polisacáridos.

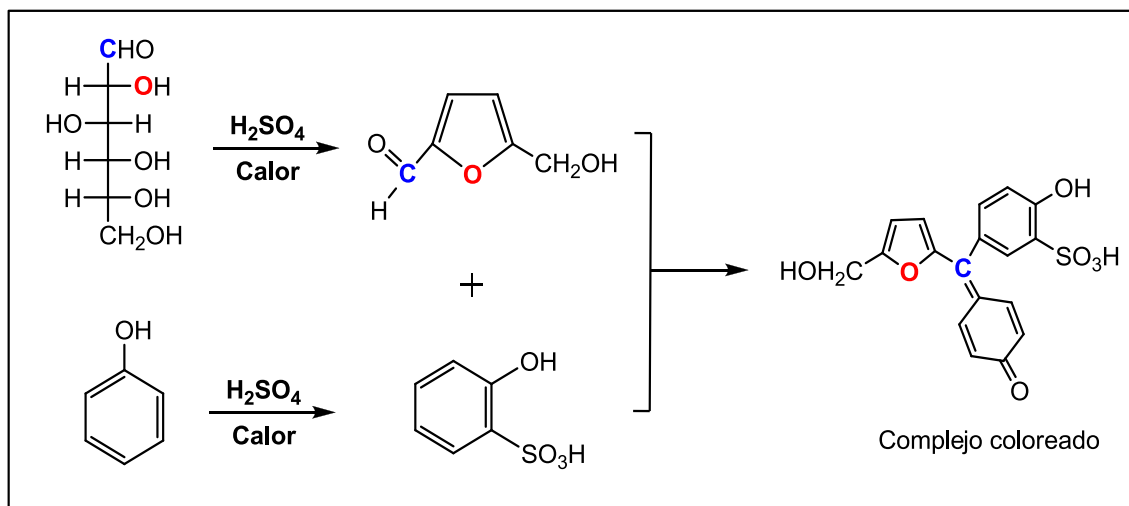


Figura 4. Esquema de las reacciones químicas que permiten la cuantificación de carbohidratos insoluble por el método de *Dubois et al* [165].

Para determinar el contenido de polisacáridos mediante el método del fenol – ácido sulfúrico, es necesario realizar la hidrólisis a sus correspondientes monosacáridos. Dentro de los tipos de hidrólisis más empleados se encuentra: la hidrólisis con ácido perclórico, la digestión enzimática y la hidrólisis con ácido sulfúrico, siendo esta última la más utilizada pues es un método simple, muy rápido, económico y eficiente, además es compatible con el método del fenol – ácido sulfúrico, con lo cual se elimina procedimientos adicionales de preparación de la muestra, necesarios con otros tipos de hidrólisis [166].

En el caso particular de la cuantificación de almidón, el método del fenol – ácido sulfúrico ha demostrado ser útil en la cuantificación de almidón en diferentes matrices vegetales y biológicas tales como: hojas, madera, frutas, aguas marinas y residuales, etc. [167 - 169]. En diversos estudios se han comparado los métodos de hidrólisis de almidón, con lo cual se ha establecido que la hidrólisis por digestión enzimática con amiloglucosidasa y α -amilasa

presenta desventajas como: mayores tiempos de reacción, menores rendimientos de la hidrólisis y mayor costo de reactivos, comparada con la hidrólisis con ácido sulfúrico [170].

Una vez realizada la hidrólisis del almidón, este se hace reaccionar con fenol para la formación del complejo coloreado. Como se obtienen los resultados en términos de la cantidad de D-glucosa es necesario aplicar un factor de conversión (0.9) que se obtiene de relacionar la masa molecular de la D-glucosa (180 u.m.a) y la masa molecular de la D-glucosa en el almidón (162 u.m.a), para calcularla cantidad de almidón en la muestra [171].

2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

Durante el desarrollo de esta investigación se analizaron dos componentes fundamentales que influyen en el rendimiento y calidad de las cosechas de la lima ácida Tahití (*Citrus latifolia* Tanaka) y que adicionalmente están interrelacionados. En primer lugar están los análisis químicos necesarios para cuantificar la cantidad de carbohidratos móviles y de reserva en diferentes partes de la planta y para determinarlos parámetros de calidad de la cosecha según la NTC 4087 [172]. En segundo está el seguimiento de fenómenos fisiológicos como la floración, el cuajado, la abscisión y el crecimiento del fruto de la lima ácida Tahití y su asociación con los datos químicos obtenidos en el paso anterior.

2.1 REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

En la **Tabla 6** se describen los reactivos, materiales y equipos empleados en el desarrollo experimental de esta investigación:

Tabla 6. Reactivos, materiales y equipos empleados durante el desarrollo experimental.

OBJETO	DESCRIPCIÓN
Reactivos	
Acetato de etilo	Grado Analítico, 99.9%, <i>J. T Baker</i> (México D.F, México)
Acetonitrilo	Grado HPLC, 99.9%; <i>J. T Baker</i> (México D.F, México)
Ácido sulfúrico	Grado Analítico, 98%, <i>Carlo Erba</i> (Sabadell, España)
Ácido acético	Grado ACS, 98%, <i>Merck</i> (Darmstadt, Alemania)
Ácido clorhídrico	Grado ACS, 37%, <i>Merck</i> (Darmstadt, Alemania)
Fenol	Grado síntesis, <i>Merck</i> (Darmstadt, Alemania)
Sustancias de referencia	
Almidón soluble	Grado ACS, 99.9%, <i>Panreac</i> (Barcelona, España)
D-(+)-glucosa	Grado ACS, 98%, <i>Sigma</i> (Buch, Suiza)
D-(-)-fructosa	Grado ACS, 98%, <i>Pfaltz& Bauer</i> (Waterbury, Reino Unido)
Sacarosa	Grado ACS, 99.5% , <i>Sigma</i> (Seetze, Alemania)

Tabla 6.Continuación

Materiales

Tubos de vidrio	5, 15 mL, <i>Pyrex</i> (Chicago, Estados Unidos)
Tubos para centrifuga	Tubos Falcon de 14 mL, BD (New Jersey, Estados Unidos)
Pipetas Pasteur	Brand (Werteim, Alemania)
Balones aforados	5, 100, 1000 mL. Scott duran (Texas, Estados Unidos)
Micropipetas	<i>Eppendorf</i> (Hamburg, Alemania)
Cartuchos para SPE	Filtros de acetato de celulosa 0.45 μ m, 13 mm.
Filtros de membrana	<i>Tecnokroma</i> , (Barcelona, España)
Viales para HPLC	Viales con tapa y <i>septum</i> de 1.5 mL, <i>Agilent</i> .
Frasco de vidrio	Frasco para solventes 1 L, Schott Duran (Elmsford, Estados Unidos)
Jeringas	Plásticas de 3mL, RYMCO (Ciudad de Panamá, Panamá)

Equipos

Rotoevaporador	RV 19 digital, IKA (Wilmington, Estados Unidos)
Colector de vacío	24 puestos, 27250-U, Supelco (Pensilvania, Estados Unidos)
Balanza analítica	Pioneer, Ohaus (New Jersey, Estados Unidos)
Centrífuga	Thermo Scientific IEC Medlite (Pittsburgh, Estados Unidos)
Estufa de secado	<i>Memmert</i> , (Western, Alemania)
Baño ultrasonido	Branson 3510, (Danbury, Estados Unidos)
Refractómetro	RD-10, <i>Blaser Swisslube</i> (Ruegsau, Suiza)

2.2 IDENTIFICACIÓN DE LOS ÁRBOLES PARA MUESTREO

En la finca “La Esmeralda”, ubicada en la vereda la Esmeralda (Lebrija, Santander), propiedad del Ing. Agrónomo Hernando Ortiz Parra afiliado a la Asociación de Productores de Hortalizas y Frutales de Lebrija (ASOHOFRUTAL), fueron identificados y debidamente marcados dos grupos

de diez árboles de lima ácida Tahití (*Citrus latifolia* Tanaka). Estos grupos se diferencian por su alto y bajo nivel de producción, de acuerdo con estudios previamente realizados por CORPOICA [173]. El cultivo contó con fertilización y controles fitosanitarios constantes, que garantizaron la sanidad de los árboles.

2.3 TOMA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

De los árboles identificados para el estudio se tomaron semanalmente del tercio medio, para garantizar la misma exposición solar, muestras de hojas jóvenes y viejas, pertenecientes a brotes generativos⁷ y vegetativos⁸, ramas con brotes vegetativos y generativos, y frutos en crecimiento. Adicionalmente, al inicio y al final de cada ciclo productivo, se tomaron muestras de raíces de los cuatro puntos cardinales y en el límite del dosel del árbol a dos profundidades (0 – 10, 10 – 30 cm).

La toma de muestras se llevó a cabo durante dos ciclos de producción y uno de reposo en el año 2010 (**Tabla 7**), durante épocas del año caracterizadas por la variabilidad climática ocasionada por los fenómenos climatológicos de “El Niño” y “La Niña” según el Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales de Colombia (IDEAM) [174].

Tabla 7. Época de recolección de las muestras

Ciclo	Fecha	Clima
Primer	Abril 8 – Agosto 18	Periodo seco – Fenómeno del Niño
Reposo	Agosto 18 – Septiembre 1	Periodo frío – Fenómeno de la Niña
Segundo	Septiembre 1 – Diciembre 16	

Las muestras tomadas fueron debidamente marcadas, selladas y depositadas en bolsas plásticas, antes de ser llevadas a una nevera portátil para evitar la

⁷Brote generativo: Brote que produce floración.

⁸Brote vegetativo: Brote que no produce floración.

degradación de los analitos. Todas las muestras fueron secadas en estufa a 70°C durante 72 horas, tiempo necesario para que las muestras alcanzaran peso constante. Finalmente, las muestras fueron finamente picadas y almacenadas en bolsa plásticas debidamente marcadas para su posterior análisis.

2.4 ANÁLISIS DE CARBOHIDRATOS LIBRES [D-(+)-GLUCOSA, D-(-)-FRUCTOSA Y SACAROSA].

2.4.1 Implementación de la metodología de análisis. Los análisis cromatográficos se realizaron en un equipo *Shimadzu Prominence* UFLC, con bomba binaria LC – 20AD, inyector automático *Prominence* SIL – 20A y detector de índice de refracción RID –10 (**Figura 5**). El procesamiento de los datos se llevó a cabo a través del sistema de datos *LCsolution–Shimadzu*.

Columna cromatográfica: Para la implementación de la metodología de análisis se evaluaron dos tipos de columnas cromatográficas en las que se aplican dos principios de separación diferentes:

- ZORBAX *Carbohydrates Analysis* (150 X 4.6 mm, 70µm), de sílice funcionalizada con grupos aminopropilo.
- *Alltech700CH* (300 x 6.5 mm, 10µm), de resina polimérica funcionalizada con grupos sulfónicos.

Fase móvil. Como fase móvil, se emplearon diferentes porciones de mezcla entre acetonitrilo grado HPLC y agua grado HPLC con adición de ácido acético para ajustar el pH.

Temperatura de análisis. Las temperaturas de la columna y el detector se variaron, para evaluar su efecto sobre la separación de los analitos.



Figura 5. Cromatógrafo líquido *Shimadzu Prominence* UFLC (Tokio, Japón).

2.4.2 Figuras analíticas de mérito. Las figuras analíticas de mérito se calcularon según lo recomendado por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) [175].

Linealidad y la sensibilidad del método. La linealidad y sensibilidad del método se evaluaron empleando las curvas de calibración realizadas para cada analito. La linealidad se determinó evaluando el rango de concentraciones en que la respuesta del detector es lineal, y se reportó como el cuadrado del coeficiente de determinación. La sensibilidad se reportó como la pendiente de la curva a un nivel de confianza del 95%.

Repetibilidad del método para tiempos de retención (t_R) y áreas. La repetibilidad del método se evaluó en términos del coeficiente de variación, los tiempos de retención y del área, para 10 mediciones de una solución 50 mg/L de D-(+)-glucosa, D-(-)-fructosa y sacarosa.

Límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ). Los límites de detección y cuantificación se calcularon haciendo uso de la curva de calibración de cada patrón, según lo recomendado por la IUPAC [175,176] (**Ecuaciones 1 y 2**).

$$\text{LOD} = \frac{Y_{bl} + 3S_{bl}}{b} \times \frac{1}{\sqrt{n}} \quad \text{Ecuación 1.}$$

$$\text{LOD} = \frac{Y_{bl} + 10S_{bl}}{b} \times \frac{1}{\sqrt{n}} \quad \text{Ecuación 2.}$$

Donde,

Y_{bl} = Señal del blanco

S_{bl} = Desviación estándar del blanco

b = Pendiente de la curva de calibración

n = Número de mediciones realizadas

2.4.3 Determinación y Cuantificación de carbohidratos libres. La determinación de los carbohidratos libres [D-(+)-glucosa, D-(-)-fructosa y sacarosa] en las muestras, se realizó por comparación de los tiempos de retención (t_R) de cada uno de los estándares, analizados bajo las mismas condiciones. La cuantificación se llevó a cabo mediante el método de estándar externo, haciendo uso de curvas de calibración, a partir de las cuales se interpolaron las concentraciones de cada analito en las muestras analizadas.

2.4.4 Identificación de carbohidratos libres por HPLC – ESI – MS. La identificación de carbohidratos se llevó a cabo empleando un cromatógrafo líquido *Elite LaChrom*, con bomba HTA-2130, automuestreador L-2200, divisor de flujo (*Micro-splitter, Sigma – Aldrich*), acoplado a un espectrómetro de masas (*Bruker – Daltonics*) con analizador de trampa iónica, y una fuente de

ionización por *electrospray* (**Figura 6**). El procesamiento de los datos se realizó con el *software HyStar 3.2*.

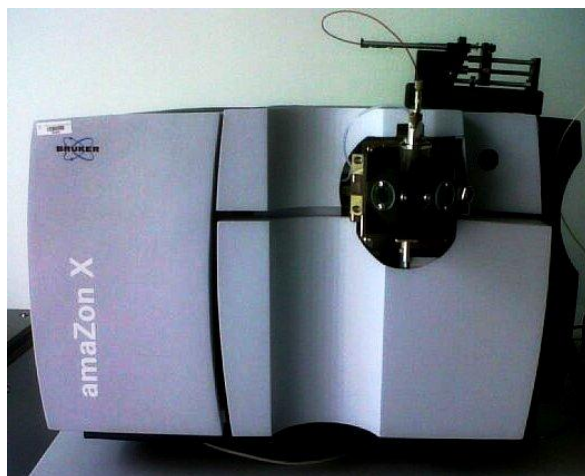


Figura 6. Espectrómetro de masas, *Bruker Daltonics*(Bremen, Alemania).

En el análisis cromatográfico se empleó una columna ZORBAX *Carbohydrates Analysis* (150 X 4.6 mm, 70 μ m) a temperatura ambiente, empleando como fase móvil una solución de acetonitrilo- agua (80:20) a un flujo de 0.3 mL/min. Para el análisis por espectrometría de masas, se empleó una fuente de ionización por *electrospray* en modo negativo a 300 °C de temperatura y 4000 V de voltaje en el capilar, empleando nitrógeno como gas nebulizador con flujo de 8L/min y presión de 30 psi.

2.5 ANÁLISIS DE CARBOHIDRATOS DE RESERVA (ALMIDÓN).

2.5.1 Implementación de la metodología de análisis

2.5.1.1 Método del fenol – ácido sulfúrico. Los análisis se llevaron a cabo en un espectrofotómetro *Pharo 100Spectroquant*[®], con celdas de cuarzo de 10 mm de camino óptico. Para establecer las mejores condiciones de reacción del método propuesto por *Dubois et al* [177], se empleó una solución patrón de D-(+)-glucosa (50 mg/L), y se realizó un diseño de tratamientos completamente al azar de tres factores: concentración de fenol adicionada, cantidad de ácido sulfúrico en solución y temperatura de reacción (**Tabla 8**). La

variable de respuesta empleada fue la absorbancia a 490 nm del complejo formado (**Figura 4.**). El tratamiento de datos se realizó con el software *Statistical Analysis System (SAS)*.

Tabla 8. Variable y niveles empleados en el diseño de tratamientos realizado.

VARIABLE	NIVELES
Fenol (%p/v)	4, 5
Ácido sulfúrico (mL)	2.5, 3
Temperatura de reacción (°C)	25, 50, 90

1.5.1.2 Hidrólisis del almidón. Las condiciones de reacción para realizar la hidrólisis ácida del almidón, se establecieron según lo recomendado por Faithfull *et al.* [178]. Para las mediciones iniciales se empleó una solución de almidón estándar (45 mg/L), a la cual se le adicionaron 2 mL de una solución 5% v/v de ácido sulfúrico, la mezcla resultante se sometió a diferentes tiempos de calentamiento (0, 10, 20, 30, 40 min). A continuación, se tomó una alícuota de 1 mL de cada muestra para cuantificar la D-(+)-glucosa obtenida (método de *Dubois*). El mismo tratamiento fue aplicado a una solución de D-(+)-glucosa de concentración equivalente (50 mg/L), para comparar la eficiencia de la hidrólisis. El análisis de los datos se realizó con el software *Statistical Analysis Sistema (SAS)*.

2.5.2 Figuras analíticas de mérito. Una vez determinadas las condiciones óptimas de análisis de D-(+)-glucosa por el método del fenol – ácido sulfúrico, se procedió a determinar las figuras analíticas de mérito, según lo recomendado por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) [138]. Estos valores fueron calculados como se indicó previamente (**sección 2.4.2**), empleando como sustancia patrón D-(+)-glucosa.

2.5.3. Cuantificación de almidón. La cuantificación de almidón se llevó a cabo mediante el método de estándar externo, haciendo uso de la curva de calibración para la D-(+)-glucosa. Los resultados obtenidos en términos de

cantidad de D-(+)-glucosa presente en la muestra se multiplicaron por el factor de conversión para expresar los datos en cantidad de almidón [179].

2.6. EXTRACCIÓN DE ANALITOS

2.6.1 Implementación de la metodología de extracción. La extracción de carbohidratos libres y de reserva, se llevó a cabo según reportes bibliográficos [180, 181]. A 100 mg de material vegetal previamente picado, se adicionó 1 mL de etanol 80%, ésta mezcla se agitó durante 3 min en un vórtex y se calentó en un baño maría a 80 °C durante 10 min. Los extractos se recolectaron y se centrifugaron a 2500 rpm durante 15 min. Por una parte el precipitado se recolectó para el análisis de carbohidratos de reserva (almidón), mientras, la fracción acuosa se pasó a través de un cartucho C-18 de extracción en fase solida (SPE). El eluyente proveniente del cartucho fue recolectado para el posterior análisis de D-(+)-glucosa, D-(-)-fructosa y sacarosa por HPLC– RI (**Figura 7**).

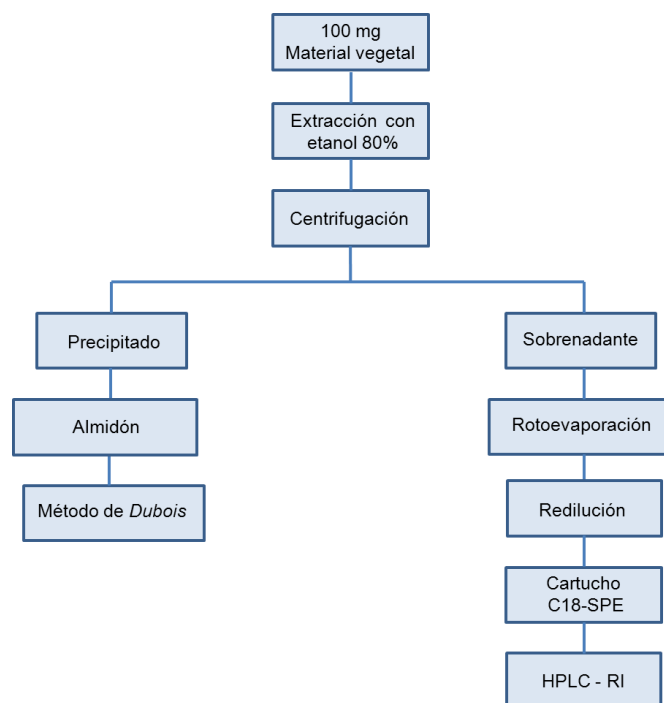


Figura 7. Diagrama de flujo representativo de la extracción y análisis de carbohidratos móviles y de reserva.

Para optimizar la extracción de los analitos se evaluaron el número de extracciones líquido – líquido y el uso del baño ultrasonido.

Extracciones con solvente. Para establecer las mejores condiciones de extracción y determinar el número de extracciones necesarias para recuperar la mayor cantidad de analito, las extracciones con solvente realizadas se repitieron hasta que los extractos obtenidos registraron señales de las sustancias analizadas por debajo del límite de detección determinado para la respectiva técnica de análisis.

Uso del baño ultrasonido. Los extractos se sometieron a diferentes tiempos de exposición al baño de ultrasonido (0, 5, 10, 15 min) con el objetivo de evaluar el uso de radiación ultrasónica para mejorar la extracción de los carbohidratos no estructurales.

2.6.2 Evaluación del porcentaje de recuperación. Para evaluar el porcentaje de recuperación se enriquecieron muestras de hojas y frutos frescos, con una concentración conocida de cada uno de los analitos analizados (almidón, D-(+)-glucosa, D-(-)-fructosa y sacarosa), y para su extracción se les realizó el mismo procedimiento descrito anteriormente. Una vez cuantificados cada uno de los analitos, se aplicó la fórmula propuesta por la AOAC [182] para determinar el porcentaje de recuperación de un analito en una muestra (**Ecuación 3**).

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{CF - CU}{CA} \times 100 \quad \text{Ecuación 3.}$$

CF = Concentración del analito medida en la muestra enriquecida

CU = Concentración de analito en la muestra sin enriquecer

CA = Concentración del analito adicionada

2.7 PARÁMETROS DE CALIDAD DE LAS COSECHAS

De cada una de las cosechas obtenidas de los árboles objeto de estudio, se tomaron muestras representativas de los frutos para la determinación de los parámetros de calidad según la NTC-4087 [183].

2.7.1 Diámetro ecuatorial y peso. A cada uno de los frutos cosechados durante los dos ciclos de producción se les midió el diámetro de la sección ecuatorial con un calibrador y el peso con una balanza analítica.

2.7.2 Contenido de jugo. El jugo de los frutos cosechados se extrajo manualmente con la ayuda de un exprimidor para cítricos, y su peso se relacionó con el del fruto. El resultado se expresó como porcentaje (**Ecuación 4**).

$$\text{Contenido de jugo} = \frac{\text{Peso del jugo (gramo)}}{\text{Peso del fruto (gramo)}} \times 100 \quad \text{Ecuación 4.}$$

2.7.3 Sólidos solubles. Los sólidos solubles se midieron con un refractómetro manual marca *Blaser Swissslube*, con escala en % de grados Brix. Para ello, se agregó una gota del jugo en la lámina del refractor y donde se observó el cambio de color se procedió a realizar la medida.

2.7.4 Acidez titulable. Se determinó por el método de titulación potenciométrica y se expresó como porcentaje de ácido cítrico, mediante la **Ecuación 5**:

$$\% \text{ Ácido cítrico} = \frac{V_1 \times N}{V_2} \times K \times 100 \quad \text{Ecuación 5.}$$

Dónde:

V_1 = Volumen de NaOH consumido (mL)

V_2 = Volumen de la muestra (mL)

K = Peso equivalente del ácido cítrico (0,064 g/meq)

N = Normalidad del NaOH (0,1 meq/mL)

2.7.5 Índice de madurez: Fue calculado como la relación entre el contenido de sólidos solubles y el contenido de jugo (**Ecuación 6.**).

$$\text{Índice de madurez} = \frac{\text{Sólidos solubles}}{\text{Acidez titulable}} \quad \text{Ecuación 6.}$$

2.8. EVENTOS FISIOLÓGICOS RELACIONADOS CON EL RENDIMIENTO Y CALIDAD DE LA LIMA ÁCIDA TAHITÍ.

Se seleccionaron 20 árboles con alta y baja carga de cosecha, y en cada uno de ellos se marcaron 12 inflorescencias multiflorales para un total de 120 inflorescencias en árboles de alta producción y 120 inflorescencias en árboles de baja producción. Sobre las inflorescencias etiquetadas se hizo el seguimiento al diámetro ecuatorial de los frutos. Al mismo tiempo, se determinó el porcentaje de abscisión y de cuajado global y por inflorescencia.

2.8.1 Curva de crecimiento. Desde la etapa de antesis hasta la cosecha se midió, semanalmente con un calibrador manual, el diámetro ecuatorial de los frutos provenientes de las inflorescencias etiquetadas. Para la selección y construcción de las curvas de crecimiento se emplearon modelos de regresión no lineal sigmoideales para crecimiento de frutos, utilizando como criterios de selección el cuadrado medio de error, el coeficiente de regresión, y los criterios de Aikaiken y Bayesiano.

2.8.2 Abscisión. Semanalmente se contaron y registraron el total de los frutos marcados. La abscisión relativa y absoluta se determinaron aplicando las formulas expresadas en las **Ecuaciones 7 y 8**, respectivamente:

$$\% \text{ Abscisión relativa} = \frac{N_i - N_t}{N_i} \times 100 \quad \text{Ecuación 7.}$$

Donde:

N_i : Número de frutos al inicio del periodo (semana).

N_t : Número de frutos al final del periodo (semana).

d : Número de días del periodo

$$\text{Abscisión absoluta} = \frac{\text{Total de frutos caídos}}{\text{Total de frutos etiquetados}} \times 100 \quad \text{Ecuación 8.}$$

2.8.3 Porcentaje de cuajado y rendimiento. Los porcentajes de cuajado inicial y final, y rendimiento para los dos ciclos de producción fueron calculados como lo indican las ecuaciones 9, 10 y 11, respectivamente:

$$\% \text{ Cuajado inicial} = \frac{F_E}{N_F} \times 100 \quad \text{Ecuación 9.}$$

$$\% \text{ Cuajado final} = \frac{F_C}{N_F} \times 100 \quad \text{Ecuación 10.}$$

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{F_C}{F_E} \times 100 \quad \text{Ecuación 11.}$$

Donde:

NF: Número de flores contabilizadas

FC: Número de frutos cosechados

FE: Número de frutos etiquetados

2.9 DATOS METEREOLÓGICOS

Los datos meteorológicos de precipitación⁹, humedad relativa y temperatura empleados para la investigación, corresponden a los reportes de la estación meteorológica del aeropuerto de Palo Negro, ubicada en el municipio de Lebrija, departamento de Santander, suministrados por el IDEAM para el año de 2010.

2.10 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE DATOS

La obtención del modelo de regresión no lineal de las curvas de crecimiento del fruto en cada uno de los ciclos evaluados se realizó empleando el *software Infostat* 2011, versión libre. La grafica de tasa de crecimiento se obtuvo mediante el cálculo de la derivada de la curva de crecimiento. Para los análisis de varianza (ANOVA) y la obtención de las matrices de correlación, se empleó el *software Statistical analysis System (SAS)* 9.1, versión 2002 – 2003.

⁹ Precipitación: Cualquier tipo de agua meteórica que cae del cielo hacia la superficie de la tierra, incluye lluvia, rocío, nieve y granizo.

3. RESULTADOS

3.1 DATOS METEOROLOGICOS

En la **Figura 8** se observan los datos de precipitación (mm), humedad (%) y Temperatura máxima (°C) del año 2010, registrados por la estación meteorológica de Palo Negro, durante el periodo de recolección de muestras.

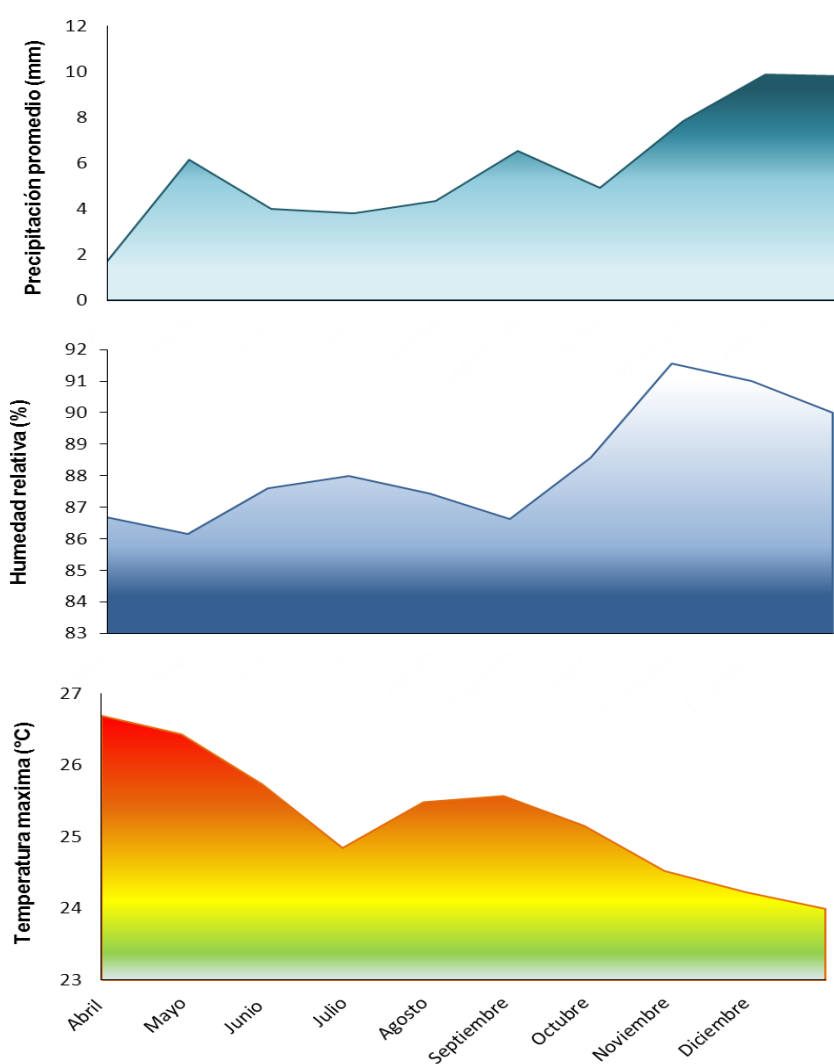


Figura 8. Precipitación (mm), humedad relativa (%) y temperatura máxima (°C) del año 2010 durante el desarrollo experimental de la investigación.

En general, se observan diferencias en los tres parámetros climatológicos, durante los dos ciclos de producción evaluados. El primer ciclo transcurrido entre el periodo de abril – julio de 2010, se caracterizó por presentar menores precipitaciones y temperaturas más altas. Por el contrario el periodo de agosto – diciembre de 2010, correspondiente al segundo ciclo de producción, se caracterizó por presentar altas precipitaciones y temperaturas bajas, ocasionadas por el fenómeno de “la Niña”, de acuerdo con los reportes suministrados por el Instituto Colombiano de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales de Colombia (IDEAM) [174].

3.2 EVENTOS FISIOLÓGICOS RELACIONADOS CON EL RENDIMIENTO Y CALIDAD DE LAS COSECHAS

3.2.1 Curva de crecimiento

Las curvas de crecimiento para la lima ácida Tahití durante los dos ciclos de producción, para árboles de alta y baja producción, expresadas como la evolución semanal en su diámetro ecuatorial (mm) se muestran en la **Figura 9**. Las curvas obtenidas durante los dos ciclos mostraron un crecimiento de tipo sigmoideal simple, característico de los frutos cítricos. En las curvas de crecimiento de los frutos provenientes de árboles de alta carga, tanto para el primer como para el segundo ciclo, se pueden diferenciar las tres fases de crecimiento: Fase I [0 – 14 días después de anthesis (DDA)] de división celular, Fase II (14 – 84 DDA) de elongación celular y la Fase III (84 – 126 DDA) de maduración.

Los criterios de selección del modelo de regresión no lineal para el análisis detallado del crecimiento de los frutos se muestran en la **Tabla 9**. Considerando que el análisis de varianza mostró un efecto significativo ($p > 0.05$) del ciclo producción sobre el ajuste de los modelos, cada ciclo se evaluó por separado. Adicionalmente, para el modelamiento y análisis de la curva de crecimiento de los frutos de lima ácida Tahití se descartaron los frutos

provenientes de árboles de baja producción, debido a que estos no alcanzaron a llegar a la etapa de cosecha.

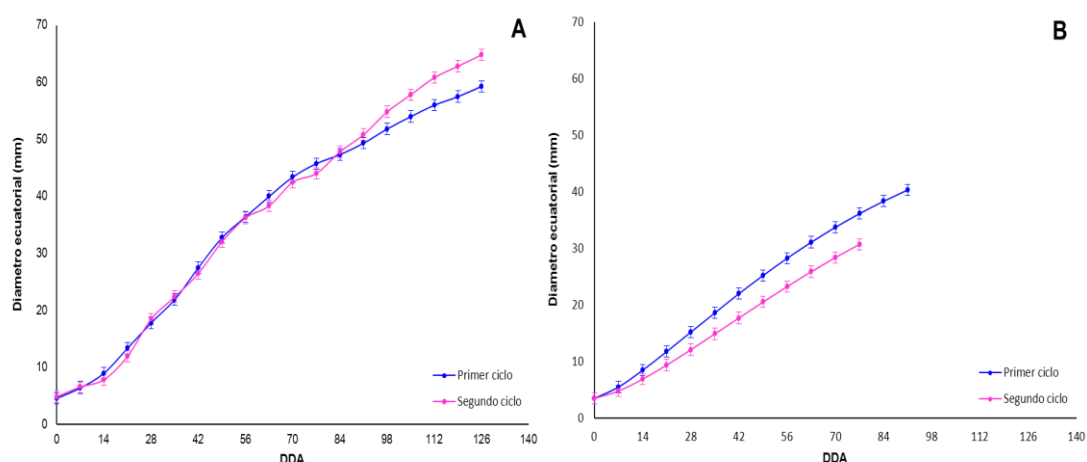


Figura 9. Crecimiento del fruto de la lima ácida Tahití, para cada ciclo de producción evaluado, en frutos de árboles de **A.** Alta carga y **B.** Baja carga.

Tabla 9. Criterios estadísticos empleados para seleccionar el modelo de regresión no lineal que mejor describe el crecimiento de la lima ácida Tahití.

Modelo	CMError		R ²		AIC		BIC	
Logístico	5.62	5.57	0.988	0.990	-32.08	11.88	-23.50	19.35
Gompertz	2.14	2.87	0.995	0.995	-156.73	-47.04	-148.15	-39.58
Monomolecular	3.66	4.77	0.992	0.995	-87.42	-1.86	-78.84	5.60
VB	2.12	2.88	0.995	0.990	-155.82	-44.88	-144.38	-34.93
Richards	2.25	5.63	0.995	0.995	-148.49	14.92	-137.05	24.88
Weibull	1.65	2.45	0.996	0.996	-187.95	-59.18	-176.51	-49.23
MMF	1.40	2.31	0.997	0.996	-209.72	-64.41	-198.28	-54.46

De los modelos evaluados para los dos ciclos de producción, en general, los de Weibull y Morgan – Mercen – Foldin (MMF) presentan la menor varianza residual, expresada como la suma de los cuadrados medios del error (CMError), y los valores del coeficiente de regresión (R²) más altos; criterios que indican la mayor capacidad de ajuste a los datos experimentales. Por el contrario, el modelo logístico presenta los valores de CMError más altos, y

R^2 más bajos, siendo por tanto, el modelo con menor ajuste a los datos experimentales, de acuerdo con estos criterios.

Adicionalmente, en las gráficas de los residuales de cada modelo (**Anexos 1**), se observa que los modelos logísticos, Weibull y MMF muestran las mejores distribuciones residuales. En las gráficas del Anexo 1, las distribuciones residuales se acercan a cero, lo que indica menor varianza entre los datos experimentales y los estimados por el modelo. Por otra parte, los modelos Richards y Von Bertalanffy (VB), presentaron los residuales de mayor magnitud, lo cual demuestra que estos modelos tienden a sobreestimar o subestimar el diámetro ecuatorial del fruto.

Por otra parte, los criterios de Aikaiken (AIC) y Bayesiano (BIC), también indican que los modelos Weibull y MMF, presentan el mejor ajuste a los datos experimentales. Para los modelos Weibull y MMF los criterios AIC y BIC exhiben valores bajos para los dos ciclos de producción; Así mismo los modelos Richards y logístico presentan los valores más altos de los criterios AIC y BIC, lo cual confirma un ajuste pobre de los datos. Tanto el AIC como el BIC, evalúan el mejor ajuste de los datos, penalizando el número de parámetros que aumentan la complejidad del modelo, sin embargo, aunque los modelos MMF y Weibull posee un mayor número de parámetros, son los modelos que mejor se ajustan, para los dos ciclos de producción evaluados.

Teniendo en cuenta todos los criterios estudiados para la selección del modelo que mejor describe el crecimiento de la lima acida Tahití, la **Tabla 10** muestra los modelos de Weibull y MMF con sus respectivos parámetros, los cuales mostraron el mejor ajuste para los datos experimentales.

El error estándar (EE) de las estimaciones de los parámetros para cada modelo resultan significativas ($p < 0.0001$), excepto para el parámetro β del modelo MMF, lo cual indica que los parámetros son necesarios o aportan explicación en cada modelo [184]. Aunque los EE de las estimaciones de los parámetros para los dos modelos son bajas, se destaca que el modelo Weibull muestra

mínimas magnitudes del EE para todos sus parámetros, y por tanto se considera el modelo más apropiado para describir el crecimiento de la lima Tahití en ambos ciclos de producción.

Además de los criterios estadísticos para la escogencia de un modelo de crecimiento, es necesario que los parámetros del modelo tengan interpretación biológica y sean coherentes con los datos experimentales. Por esta razón se puede afirmar que el modelo Weibull, resulta más apropiado para describir el crecimiento de la lima Tahití en ambos ciclos, ya que los valores asintóticos α , que representa el tamaño final del fruto se acercan al tamaño final experimental.

Tabla 10. Parámetros estadísticos de los modelos de regresión no lineal que mejor describen el crecimiento de la lima ácida Tahití.

Modelo	Parámetro	Primer ciclo	EE	Segundo ciclo	EE
Weibull	α	70.22	0.29	78.77	0.42
	β	66.35	0.99	74.59	2.64
	γ	$2.90 * 10^{-3}$	$3.2 * 10^{-4}$	$1.70 * 10^{-3}$	$3.2 * 10^{-4}$
	δ	1.35	0.03	1.42	0.05
MMF	α	87.50	0.83	99.59	2.43
	β	3.78	82.98	4.47	278.53
	γ	612.24	1.88	1248.88	4.57
	δ	1.47	0.04	1.58	0.07

En la **Figura 10** se observan las curvas de crecimiento predichas por el modelo Weibull, para los dos ciclos de producción de la lima ácida Tahití. En estas curvas se pueden apreciar las tres fases de crecimiento observadas en la lima ácida Tahití, que características de los frutos cítricos [185, 186].

En las dos primeras semanas, es decir, en la etapa de división celular (Fase I), el fruto aumenta de tamaño lentamente hasta que inicia la etapa de elongación

celular (Fase II). En esta última, se observa un incremento notable de su tasa de crecimiento, hasta que alcanza la etapa de maduración (Fase III) aproximadamente en la semana 12, al inicio del mes de agosto, en donde nuevamente disminuye su tasa de crecimiento, hasta alcanzar el diámetro final.

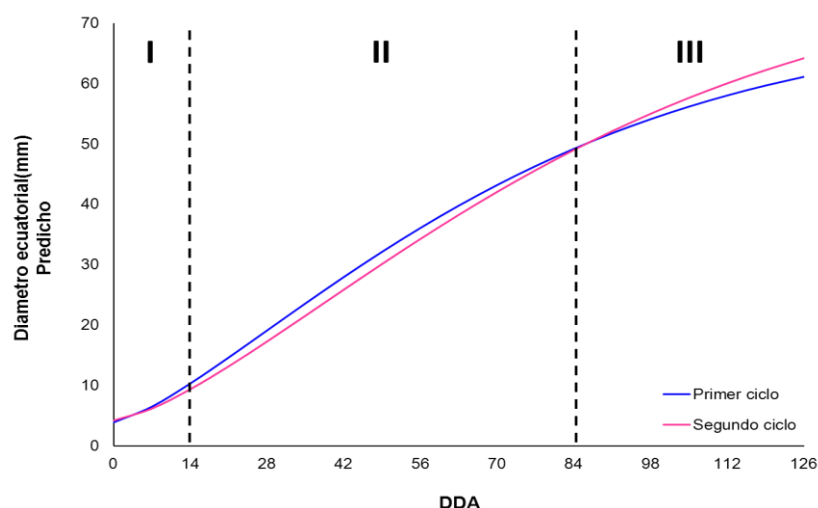


Figura 10. Curvas de crecimiento para los dos ciclos de producción predichas por el modelo de regresión no lineal de Weibull.

La variación en la tasa de crecimiento del fruto en los dos ciclos de producción, representadas por la primera derivada de los modelos de crecimiento, se atribuye a las diferencias climáticas en cada periodo de tiempo. En la primera fase de crecimiento, los frutos del primer ciclo aumentan de tamaño con una tasa de 0.12 mm/día, mientras que, los frutos del segundo ciclo crecen con una tasa de 0.10 mm/día. Esto se debe posiblemente a que la temperatura durante el primer ciclo (abril) fue mayor que en el segundo ciclo (septiembre). Se ha establecido que un aumento de temperatura, favoreciendo favorece las reacciones de división celular propias de la etapa de crecimiento [186].

Por otra parte, en la segunda fase, la tasa de crecimiento aumenta con rapidez similar entre los 14 – 42 DDA, alcanzando un máximo de 0.64 mm/día para el primer ciclo, y de 0.60 mm/día para el segundo ciclo. Esta etapa coincide con periodos de tiempo de los dos ciclos durante los cuales los niveles de precipitaciones promedio fueron muy similares, entre 6 – 4 mm (mayo - junio,

septiembre-octubre). Una vez finalizado este periodo, se observa como la tasa de crecimiento para el primer ciclo desciende gradualmente, mientras para el segundo ciclo aumenta hasta alcanzar el mismo valor (0.61 mm/día) el día 84.

En la etapa de maduración (días 85 – 126), se observa que para el segundo ciclo de producción los frutos aumentan de tamaño más rápidamente, alcanzando una diferencia aproximada de 3.5 cm en el tamaño final, con respecto a los frutos del primer ciclo. Este comportamiento coincide con el aumento en las precipitaciones durante esta etapa, es decir, mediados de noviembre y diciembre (**Figura 11**), cuando al país entró de lleno el fenómeno climatológico denominado “la Niña”, caracterizado por bajas temperaturas y un aumento de precipitaciones.

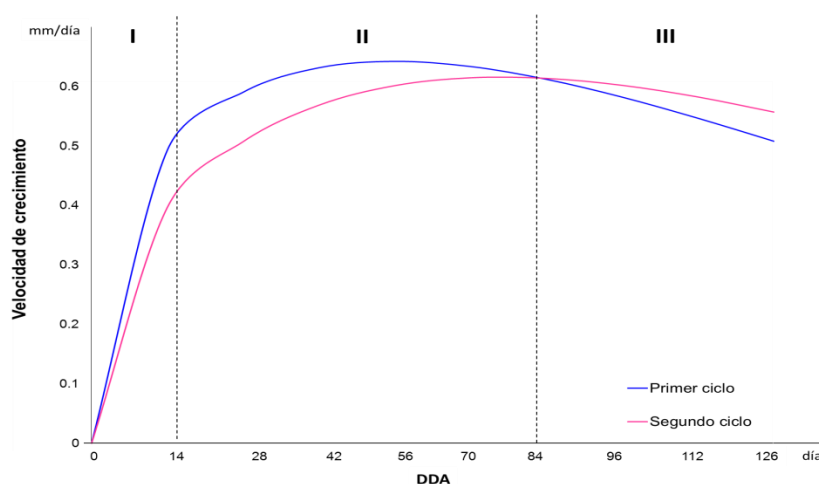


Figura 11. Tasa de crecimiento de los frutos de la lima ácida Tahití durante los dos ciclos de producción evaluados.

3.2.2 Niveles de floración, abscisión y cuajado

3.2.2.1 Intensidad de floración y rendimiento del fruto. En las **Figuras 12 y 13** se muestra la relación entre el número de flores y el número de frutos cuajados y cosechados por árbol, durante los dos ciclos de producción estudiados. En las figuras se observa como la variación en el número de flores por árbol afecta el número de frutos cuajados y cosechados durante los dos ciclos de producción. En ambos casos, la relación que existe

entre las variables es lineal inversa ($p < 0.005$) de acuerdo con los coeficientes de correlación (R^2) estimados.

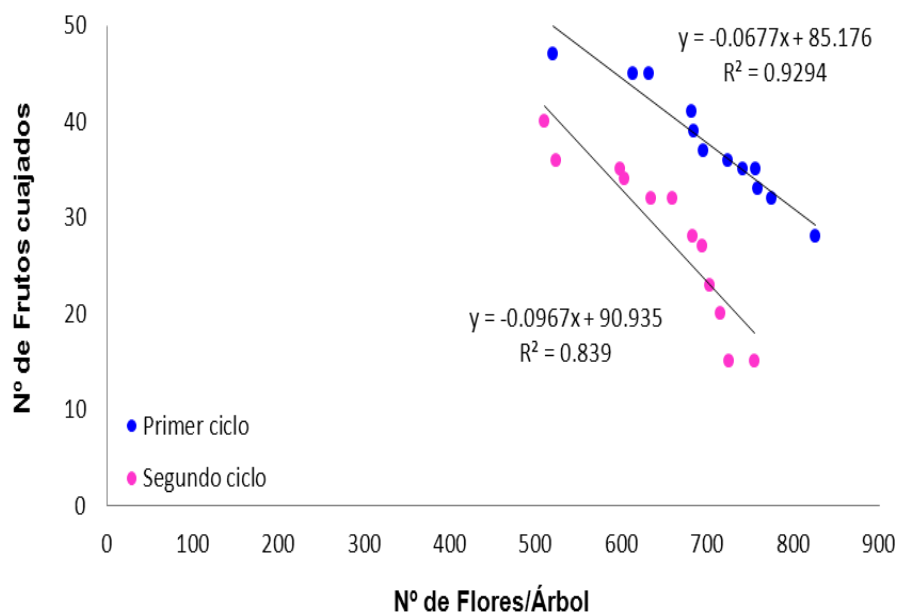


Figura 12. Relación entre el número de frutos cosechados y el número de flores por árbol durante los dos ciclos de producción evaluados.

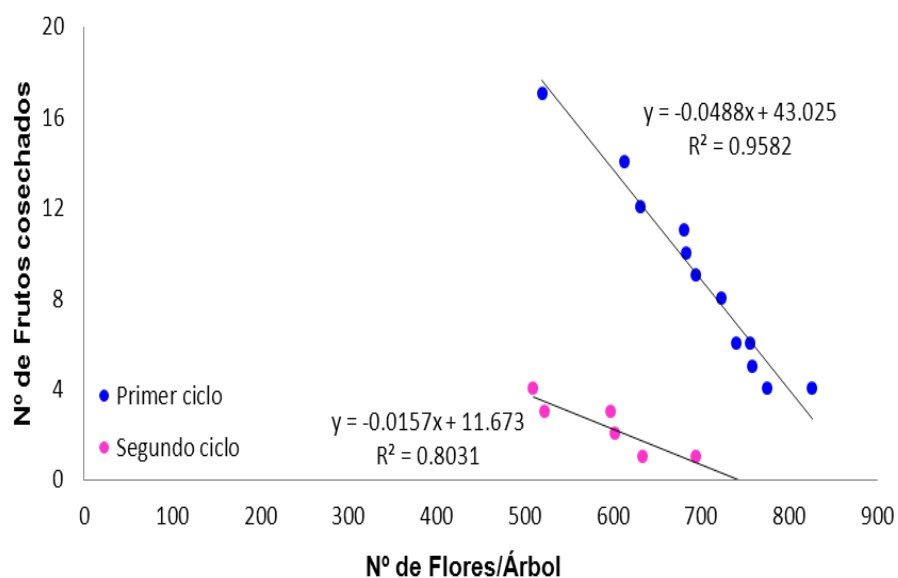


Figura 13. Relación entre el número de frutos cosechados y el número de flores por árbol durante los dos ciclos de producción evaluados.

3.2.2.2 Abcisión y cuajado

En las **Figuras 14** y **15** se muestran respectivamente las curvas de abscisión acumulada y relativa, obtenidas durante los dos ciclos de producción evaluados, para los frutos de árboles de alta y baja producción.

En cuanto la abscisión acumulada, la **Figura 14 A** permite observar que la abscisión de frutos en los dos ciclos de producción evaluados se detiene a partir del día 77. Además, se observa también que la abscisión fue superior durante el segundo ciclo de producción, durante todas las etapas de crecimiento del fruto. El comportamiento observado indica que posiblemente se trata de una variedad alternante con variación en la carga de cosecha.

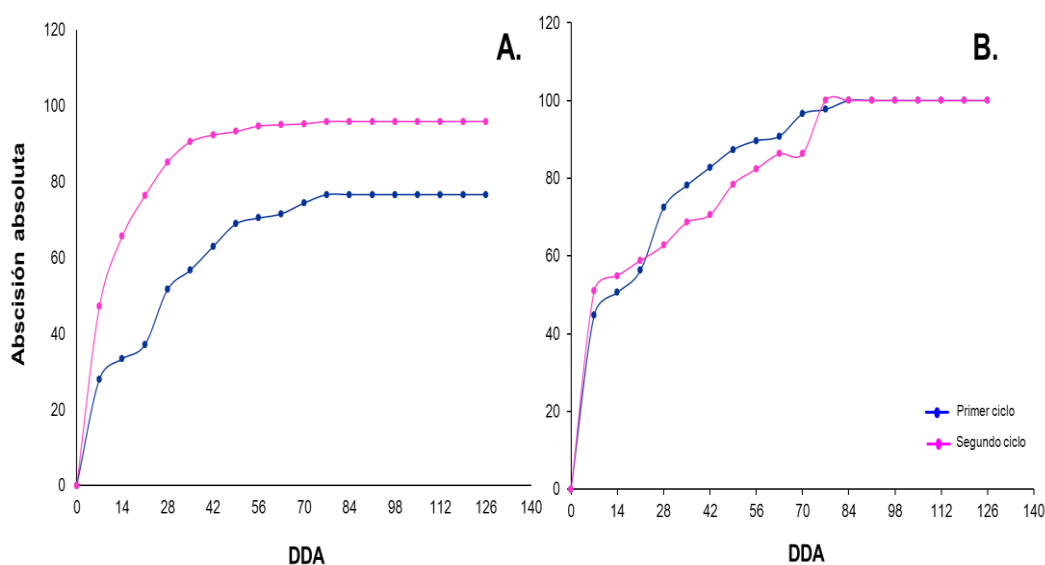


Figura 14. Curvas de abscisión acumulada para los frutos de la lima acida Tahití, durante dos ciclos de producción en árboles de **A.** Alta carga y **B.** Baja carga.

En cuanto a la abscisión absoluta de frutos de árboles de baja carga, durante todo el periodo de medición en el primer ciclo de producción, la abscisión absoluta de frutos proveniente de árboles de baja carga fue superior, mientras que, durante el segundo ciclo de producción los árboles de baja carga mostraron menores valores de abscisión absoluta (**Figura 14 B**), hasta el día 70, en el cual se registró la caída de todos los frutos restante de los árboles de baja carga, con lo cual la abscisión absoluta alcanzo su máximo.

Al considerar la abscisión relativa, para ambos ciclos, se observaron dos picos de abscisión de alta intensidad, siendo más elevados durante el segundo ciclo. Se observó un primer máximo el día 7, que representa la caída del 4% y 7% de los frutos del primer y segundo ciclo respectivamente, en árboles de alta carga (**Figura 15**); un segundo pico de gran intensidad se observa para ambos ciclos el día 28, que corresponden al 3,5 y 5% de los frutos, del primer y segundo ciclo, respectivamente.

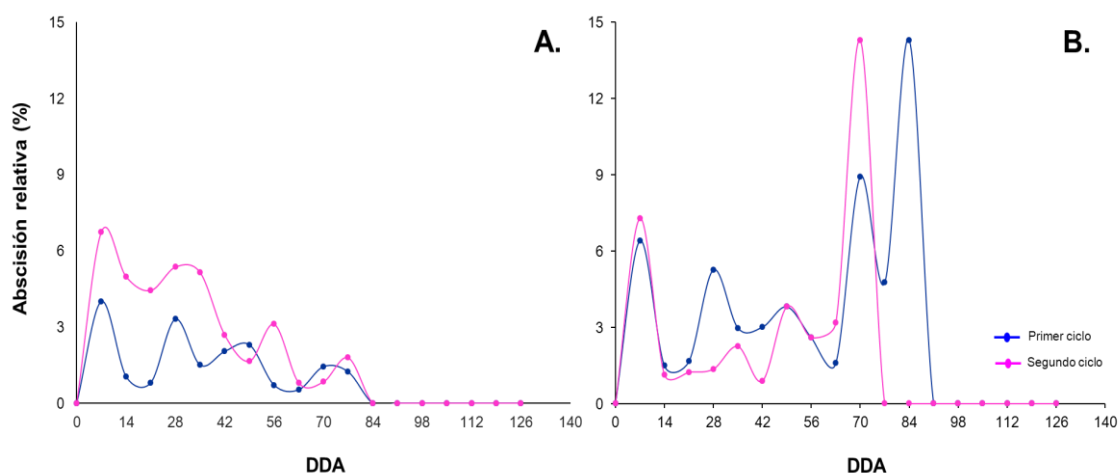


Figura 15. Curvas de abscisión relativa de frutos en árboles de **A.** Alta carga, **B.** Baja carga, de la lima ácida Tahití.

A partir del día 28 DDA, aunque se observa cierta variación en cuanto al tiempo de aparición de cada máximo, la dinámica de abscisión relativa de los frutos se mantiene constante, observándose dos picos de abscisión hasta el día 84, a partir del cual finaliza la abscisión de frutos por completo en ambos ciclos.

Por otra parte, la abscisión relativa de frutos provenientes de árboles de baja producción (**Figura 15 B**) muestra un máximo cercano a la época de cosecha a los 70 días después de antesis, y el porcentaje de abscisión es mayor para los frutos del primer ciclo, contrario a lo ocurrido con los frutos de árboles de alta producción.

3.2.2.3 Cuajado y rendimiento de las cosechas

En la **Tabla 11**, se muestran los datos de cuajado y rendimientos de las cosechas evaluadas. De acuerdo con los análisis de varianza realizados, existen diferencias significativas entre un ciclo y otro tanto en el cuajado de los frutos como en el rendimiento de la cosecha. El rendimiento y cuajado determinado para el segundo ciclo de producción fue mucho menor, lo cual confirma el fenómeno de alternancia en las cosechas que se produce en los cultivos de cítricos [187, 188]; dicho fenómeno consiste en que tras un ciclo de elevada producción, le sigue un ciclo con muy baja presencia de flores, baja presencia de frutos, y por tanto bajo rendimiento.

Tabla 11. Cuajado y rendimiento de las cosechas de lima ácida Tahití.

Ciclo	Flores	Frutos etiquetados	Frutos cosechados	Cuajado (%)		Rendimiento (%)
				Inicial	Final	
Primero	8404	453	106	5.39	1.26	23.40
Segundo	7801	337	14	4.32	0.18	4.15

Adicionalmente, el bajo porcentaje de rendimiento del segundo ciclo es consecuente con que los frutos de este ciclo hayan alcanzado mayor tamaño durante la fase de maduración, ya que, entre menos frutos, menor competencia entre ellos por los nutrientes, lo cual les permitirá un mejor desarrollo, reflejado en su tamaño final.

En la **Tabla 10** no se incluyeron los valores de cuajado y rendimiento de los frutos provenientes de árboles de baja carga, ya que ninguno de ellos se mantuvo en el árbol hasta la época de la cosecha.

3.3 ANÁLISIS DE CARBOHIDRATOS MÓVILES

3.3.1 Implementación de la metodología de análisis. Se realizó la selección de la columna cromatográfica y las condiciones de análisis, empleando como criterios de discriminación la resolución de los analitos, el

tiempo de análisis, el número de platos teóricos y las características de la fase móvil.

Columna ZORBAX Carbohydrates Analysis (150 X 4.6 mm, 70 μ m).

Para la selección de las condiciones de análisis empleando esta columna, se emplearon mezclas de acetonitrilo: agua en diferentes proporciones (**Figura 16**). Los cromatogramas muestran que conforme aumenta la concentración de solvente orgánico en la fase móvil, aumenta el tiempo de retención de los azúcares, y mejora la resolución entre ellos. En esta columna el orden de elución de los analitos [D-(+)-glucosa, D-(-)-fructosa y sacarosa] está gobernado por el peso molecular y las interacciones de los grupos hidroxilo de los azúcares y con los grupos aminos de la fase estacionaria.

Por otra parte, en relación con la variación del flujo de la fase móvil se observa que su aumento, además de disminuir los tiempos de retención de los analitos, también disminuye el ensanchamiento de los picos (**Figura 17**). Este ensanchamiento es propio de los perfiles cromatográficos de carbohidratos, debido a las distintas formas en que pueden presentarse (formas acíclicas o cíclicas, hemiacetales α y β), ya que aunque eluyen simultáneamente, generan curvas gaussianas muy amplias [189]. Sin embargo, a flujos muy altos, además de observarse el solapamiento de los picos, y la consecuente pérdida de resolución entre estos, también aumenta el consumo de solventes, lo que afecta el costo por análisis. Por estas razones se consideró emplear para los análisis cromatográficos un flujo de 1.4 mL/min.

En cuanto a la temperatura, no se observó ningún efecto sobre la resolución de los picos o sobre la eficiencia de separación expresada como el número de platos teóricos para cada señal. Este hallazgo va en contravía al comportamiento típico de una separación por HPLC cuando con aumento la temperatura, se incrementa el número de platos teóricos, debido a la disminución de la viscosidad de la fase móvil. Sin embargo, en el caso de los carbohidratos el aumento de temperatura puede promover la formación de bases de Schiff (iminas) entre los grupos hidroxilo del azúcar y los aminopropilo

de la columna, lo cual efectivamente afecta su tiempo de retención en la fase estacionaria disminuyendo su recuperación, con un impacto notable en el número de platos teóricos de cada señal [190]. Debido a este efecto los análisis cromatográficos se realizaron a una temperatura de 22 °C.

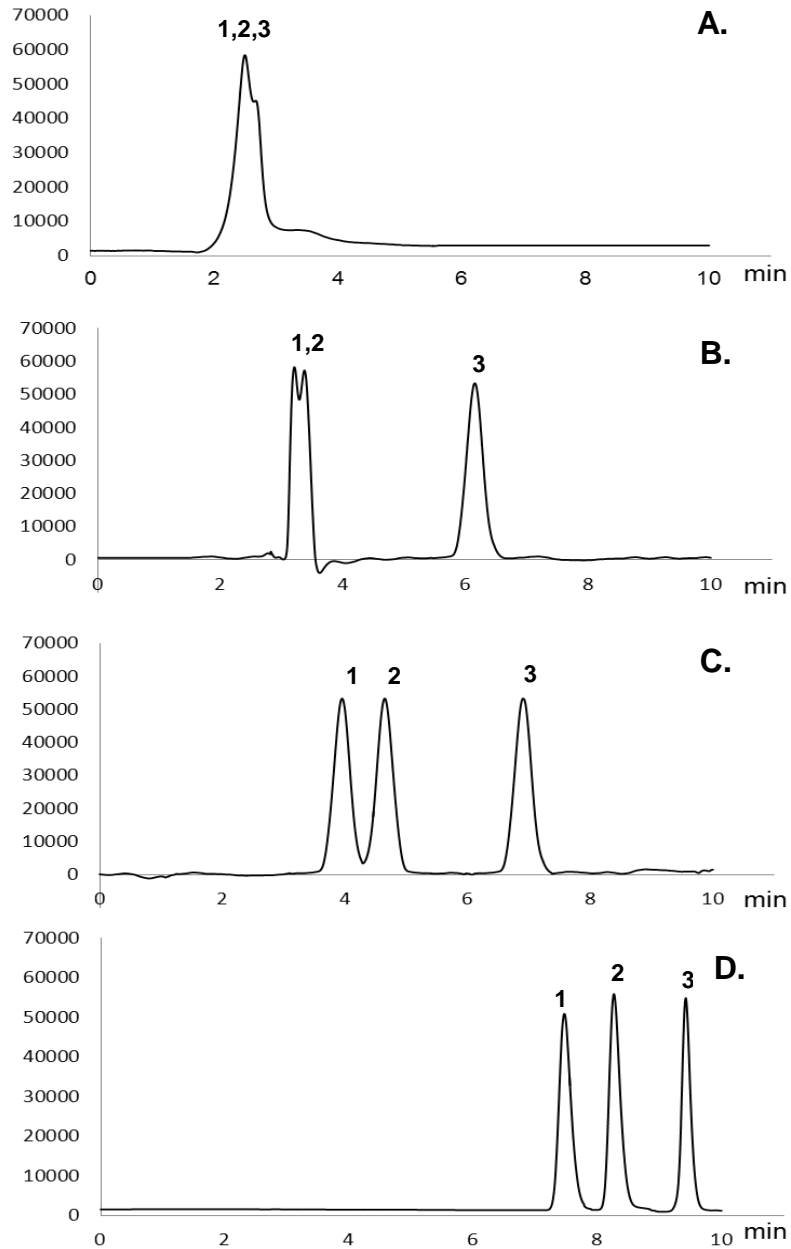


Figura 16. Selección fase móvil para el análisis por HPLC- RI de **1.**D-(+)-fructosa, **2.** D-(-)-glucosa y **3.** sacarosa, analizados por HPLC – RI con la columna *Zorbax Carbohydrates*. a 25 °C, con fase móvil compuesta por: **A.** Agua- acetonitrilo, 80:20, **B.** Agua- acetonitrilo, 60:40, **C.** Agua- acetonitrilo, 50:50, **D.** Agua- acetonitrilo, 80:20.

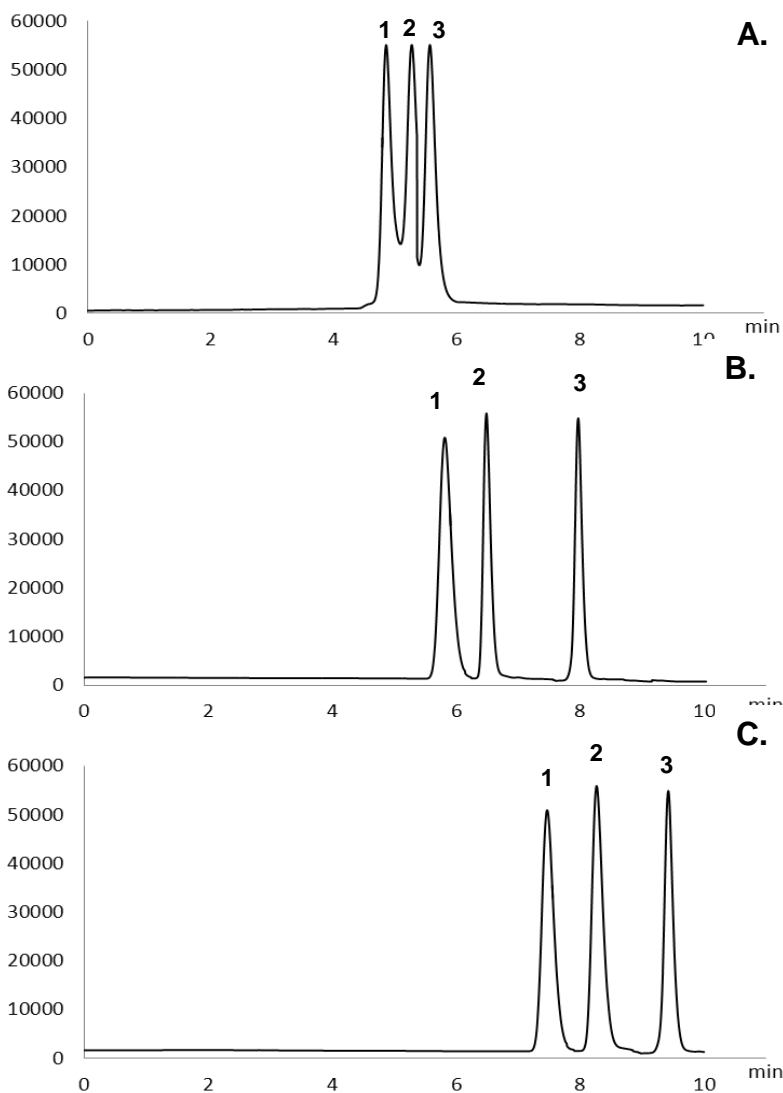


Figura 17. Efecto de la variación del flujo de la fase móvil sobre el perfil cromatográfico de los analitos, analizados por HPLC – RI con la columna *Zorbax Carbohydrates* a 22 °C, con fase móvil compuesta por Acetonitrilo-agua (80:20) a un flujo de: **A.** 2.0 mL/min, **B.** 1.4 mL/min, **C.** 1.0 mL/min; **1.**D-(+)-fructosa, **2.**D-(-)-glucosa y **3.**sacarosa.

Finalmente, en la **Tabla 12.** se resumen las condiciones establecidas para el análisis simultáneo de D-(+)-glucosa, D-(-)-fructosa y sacarosa, empleando la columna *ZORBAX Carbohydrates Analysis* (150 X 4.6 mm, 70µm).

Tabla 12. Condiciones cromatográficas para la columna *Zorbax Carbohydrates Analysis* (150 X 4.6 mm, 70 μ m).

Parámetro	Condición
Fase móvil	Acetonitrilo: Agua (80:20)
Flujo	1.4 mL/min
Temperatura de la columna	22 °C
Temperatura del detector	27°C
Tiempo de análisis	9 min

Columna Alltech 700CH (300 x 6.5 mm, 10 μ m). Debido a que la fase estacionaria está compuesta por una resina polimérica de divinil benceno funcionalizada con grupos sulfónicos, la fase móvil se limita a agua grado HPLC como único eluyente, según recomendaciones del fabricante. En esta columna el orden de elución está gobernado principalmente por el número de grupo hidroxilos presentes en la estructura del carbohidrato, su disposición en el espacio y las fuerzas de atracción que se presentan entre los grupos sulfónicos cargados negativamente de la fase estacionaria y los grupos hidroxilos de los carbohidratos. Consecuentemente eluyen primero los polisacáridos, seguidos de los disacáridos y, finalmente, los monosacáridos (aldosas, pentosa, treosas etc.)

Para evaluar el efecto del pH de la fase móvil sobre la separación de los carbohidratos, se adicionaron diferentes proporciones de ácido sulfúrico (0.5 mM) para acidificar e hidróxido de sodio (0.01 N) para disminuir su acidez. En la **Figura 18** se observa que a pH básico (pH=13.08), superior al pK_a de los carbohidratos analizados¹⁰ no hay separación entre la D-(+)-glucosa y la D-(-)-fructosa; esto podría deberse a que estos carbohidratos a pH superiores a su pK_a se encuentran cargados negativamente y con magnitud de carga muy similar, lo que ocasiona que la columna los retenga de forma similar y no haya

¹⁰pKa D-(+)-glucosa = 12.28, pKa D-(-)-fructosa= 12.03, pKa sacarosa= 12.62

separación. Además de no mejorar la separación de los analitos, la adición de una base al medio puede catalizar un equilibrio tautomérico ceto – enol para ambos carbohidratos, que da por resultado su conversión a otras hexosas, lo cual alteraría la concentración de cada carbohidrato en la muestra [191].

Por otra parte, los pHs ácidos aunque se observa la separación de todos los analitos, los picos correspondientes a la D-(+)-glucosa y la D-(-)-fructosa presentan cierto grado de asimetría, esto se explica porque a pH bajos el fenómeno de mutarrotación que se da entre las formas anoméricas de los carbohidratos es más lento, ocasionando que dichas formas anoméricas eluyen con pequeñas diferencias de tiempo, generando la asimetría de los picos observada.

En cuanto a los tiempos de retención, a pH básicos disminuyen notablemente debido a las fuerzas de repulsión que se produce entre los grupos sulfónicos cargados negativamente de la fase estacionaria y los grupos hidroxilos de los carbohidratos. A pH ácido los tiempos de retención aumentan debido a que la ausencia de carga en los carbohidratos, favorece las interacciones hidrofóbicas entre estos y los anillos de benceno de la fase estacionaria. Finalmente, se decidió trabajar a pH neutro, ya que según lo observado permite obtener picos representados por curvas gaussianas más simétricas, bien resueltos, con tiempos de análisis cortos.

El efecto de la temperatura sobre la separación de los analitos también fue evaluado (**Figura 19**). A temperatura ambiente, se observan picos más anchos, y se pierde resolución entre D-(+)-glucosa y la D-(-)-fructosa ($R=1.58$); mientras que, a temperaturas superiores a 70 °C, los tiempos de retención disminuyen, y la ventana de elución de los picos entre la D-(+)-glucosa y la D-(-)-fructosa se reduce, con menor resolución entre estos picos ($R=1.48$).

En cuanto al flujo de la fase móvil, se decidió trabajar con un flujo de 0.5 mL/min, ya que aflujos menores, aumentan los tiempos de retención y se produce el ensanchamiento de los picos; por otra parte, flujos demasiados altos

incrementan la presión de trabajo del sistema, alcanzando presiones no recomendadas para este tipo de columnas.

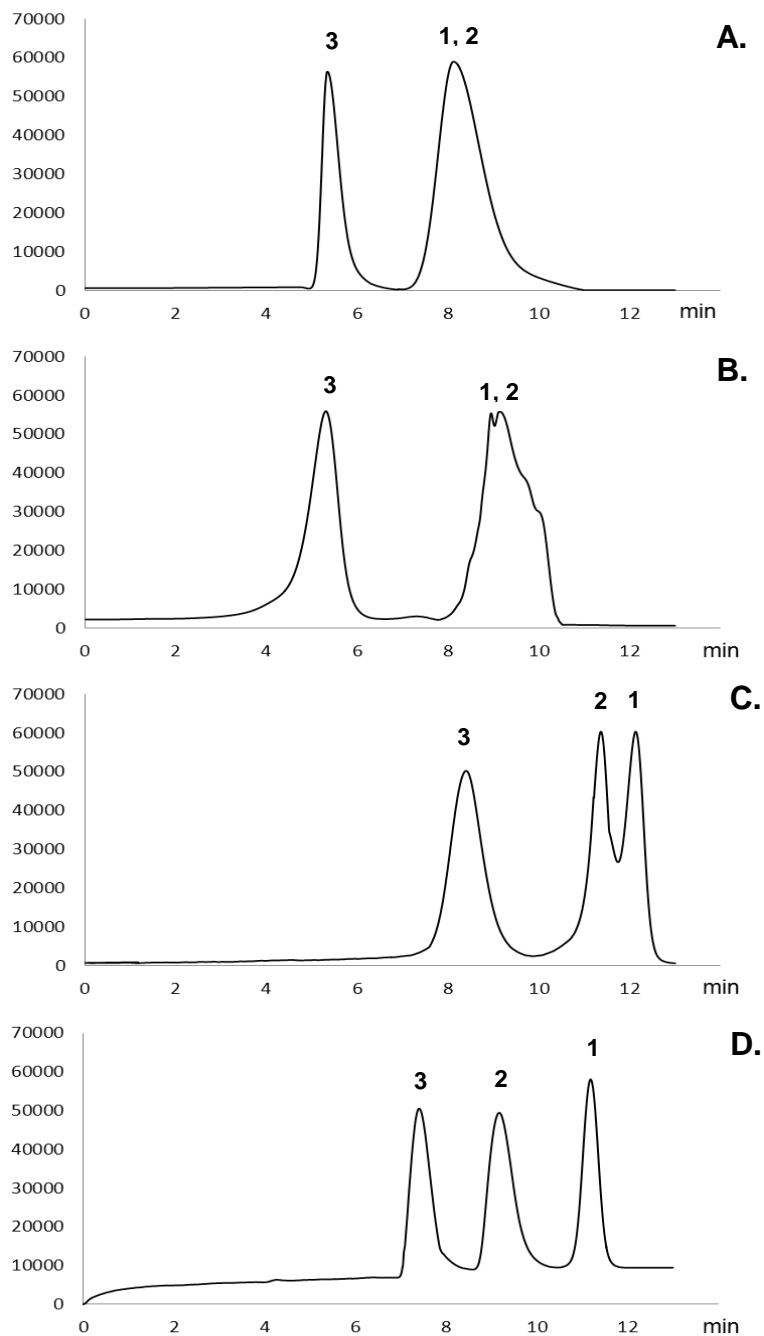


Figura 18. Efecto del pH de la fase móvil sobre la separación de los analitos analizados con la columna *Alltech 700CH*, a 50°C, usando agua como fase móvil, aun flujo de 0.4 mL/min, variando el pH de **A.** 13.08, **B.** 9.63 **C.** 5.12, **D.** 7.02; **1.** D-(+)-fructosa, **2.** D-(-)-glucosa y **3.** Sacarosa.

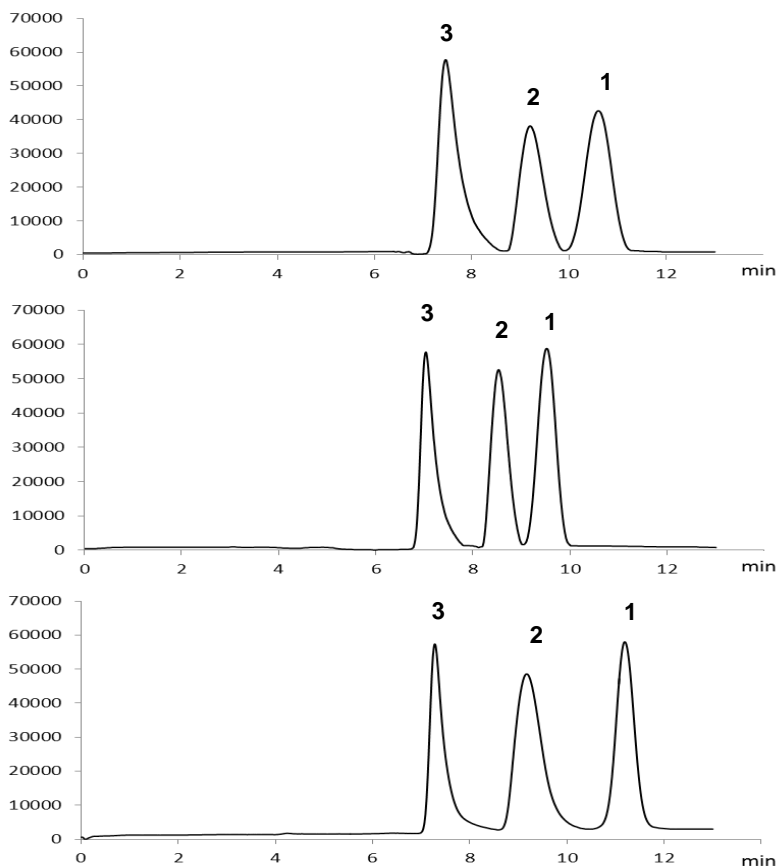


Figura 19. Efecto de la temperatura de la columna en la separación de los analitos, analizados con la columna *Alltech 700CH*, usando agua a pH neutro como fase móvil, a un flujo de 0.5 mL/min, variando la temperatura de la columna **A.** 25 °C, **B.** 80 °C **C.** 60 °C; **1.** D-(+)-fructosa, **2.** D-(-)-glucosa y **3.** sacarosa.

Tabla 13. Condiciones de análisis empleadas con la columna *Alltech700CH* (300 x 6.5 mm, 10 μ m).

Parámetro	Condición
Fase móvil:	Agua grado HPLC
Flujo:	0.5 mL/min
T Columna:	60 °C
T detector:	65 °C
Tiempo de análisis	12 min

En la **Tabla 14** se observan los tiempos de retención para la D-(+)-glucosa, D-(-)-fructosa y sacarosa, determinados empleando cada una de las metodologías implementadas. Los tiempos de retención permiten observar la diferencia en el orden de elución debido a las diferentes características de la fase estacionaria de cada columna.

Tabla 14. Tiempos de retención de los analitos.

Nº Pico	Analito	Tiempo de retención (t_R), min	
		Zorbax	Alltech 700CH
1	D-(-)-fructosa	3.998 ± 0.012	11.183 ± 0.041
2	D-(+)-glucosa	4.561 ± 0.031	9.165 ± 0.019
3	Sacarosa	6.650 ± 0.023	7.275 ± 0.024

Una vez se establecieron las condiciones de análisis para cada una de las columnas a evaluar, se procedió a determinar las figuras analíticas de mérito (**Tabla 14**), según se indicó en el Numeral 2.4.2.

Los resultados reportados en la **Tabla 15**, muestran que para el rango de 30 – 1000 mg/L, las metodologías implementadas presentan una buena linealidad, representada por el cuadrado del coeficiente de correlación (R^2). En cuanto a la sensibilidad, las pendientes de las curvas de calibración, demuestran que el detector empleado es sensible a pequeños cambios en la concentración de todos los analitos, en el rango de concentración evaluado. Respecto a la repetibilidad para cada una de las metodologías implementadas son aceptables, ya que el porcentaje del coeficiente de variación (%CV) de los tiempos de retención, y las áreas de cada analito son inferiores al 2 y 10% respectivamente.

Respecto a los límites de detección y cuantificación (LOD, LOQ), los valores determinados para cada uno de los analitos, son similares a los reportados por otros autores [192 - 194], en la implementación de metodologías por HPLC para el análisis de carbohidratos con el detector de índice de refracción;

adicionalmente, teniendo en cuenta que las concentraciones de carbohidratos en plantas cítricas reportados [195 - 198], son superiores a los límites de cuantificación de todos los analitos, puede afirmarse que ambas metodologías son útiles para la determinación y cuantificación de D-(+)-glucosa, D-(-)-fructosa y sacarosa.

En cuanto a los parámetros cromatográficos, en la **Tabla 16** se muestra que ambas metodologías permiten la separación de los analitos con valores de resolución (R_s) superiores a 1.5, valor recomendado ampliamente en la literatura [199, 200]. En cuanto al factor de retención, para las dos columnas los valores están en el rango entre 0,5 – 0.8, valores que se encuentran entre el rango recomendado para mezclas de múltiples componentes, como el caso de extractos etanólicos de plantas cítricas [200]. Por otra parte, el factor de simetría para todos los picos es inferior a 1.5, máximo valor aceptable para un método de separación [199]. En cuanto al factor de simetría (α), los valores calculados están en el rango de 0.714 – 1.95, lo cual indica que los picos cromatográficos no se encuentran demasiado alejados de su forma gaussiana, y son aptos para ser usados en la cuantificación de sustancias [200].

Aunque en las dos columnas se determinó que el número de platos teóricos (N) para todos los analitos fue superior a 2000, valor recomendado para un valor de $R_s > 1.5$, para la columna *Alltech 700CH* en general, los valores de N fueron mayores debido a que presenta mayor longitud y menor tamaño de partícula, además el flujo de la fase móvil empleada es mucho menor, principales factores que aumentan N, y, por tanto la eficiencia de la separación.

Tabla 15. Figuras analíticas de mérito para las dos metodologías implementadas.

Columna	Analito	Ecuación	R ²	b ± t	% CV (n=6)		LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
					t _R	Área		
Zorbax	D-(-)-fructosa	y = 198.21x	0.9978	198.21 ± 0.76	1.02	2.31	8.1	27.1
	D-(+)-glucosa	y = 164.25x	0.9965	164.25 ± 0.98	0.95	3.94	6.0	20.1
	Sacarosa	y = 93.12x	0.9951	93.12 ± 0.52	0.87	3.01	7.2	24.1
Alltech 700CH	D-(-)-fructosa	y = 147.02x	0.9921	147.02 ± 0.65	1.05	4.22	5.5	18.4
	D-(+)-glucosa	y = 139.54x	0.9968	139.54 ± 0.52	0.72	3.35	7.7	25.8
	Sacarosa	y = 89.16x	0.9937	89.16 ± 0.48	0.63	4.05	6.6	22.0

Tabla 16. Parámetros de eficiencia de cada una de las columnas empleadas (Columna Zorbax Carbohydrates Analysis, Columna Alltech 700CH).

Nº	Analito	Resolución, R _s		Factor de retención, k'		Factor de selectividad, α		Factor de simetría		Número de platos teóricos, N	
		-	R ₁₋₂ : 2.28	0.58	0.74	-	α ₁₋₂ : 1.16	0.71	0.96	3322	4214
2	D-(+)-glucosa	R ₂₋₁ : 1.60	R ₂₋₃ : 2.55	0.64	0.66	α ₂₋₁ : 1.11	α ₂₋₃ : 1.12	0.76	1.06	2544	3395
3	Sacarosa	R ₃₋₂ : 4.58	-	0.76	0.57	α ₃₋₂ : 1.20	-	0.80	1.10	3519	3415

Ante los resultados anteriormente expuestos sobre las dos metodologías por HPLC para el análisis de D-(+)-glucosa, D-(-)-fructosa y sacarosa, se puede indicar que las dos metodologías son válidas y pueden aplicarse en el rango de concentraciones evaluado, sin embargo, teniendo en cuenta el costo que implica el uso de acetonitrilo como solvente y las implicaciones económicas y ambientales, relacionadas con su disposición final, se descartó el uso de la columna *Zorbax Carbohydrates*, y por tanto, la determinación y cuantificación de D-(+)-glucosa, D-(-)-fructosa y sacarosa en las muestras de lima ácida Tahití se realizaron empleando la columna *Alltech 700CH* y la metodología implementada descrita anteriormente.

3.4 ANÁLISIS DE CARBOHIDRATOS DE RESERVA

3.4.1 Implementación de la metodología de análisis. El análisis de varianza realizado a los resultados de los experimentos realizados para evaluar el efecto de la temperatura, el contenido de fenol y ácido sulfúrico sobre la determinación de almidón, permitió determinar que solo la temperatura tiene un efecto significativo ($p < 0.05$) sobre la reacción. Según Mecozzi [201], esto puede explicarse porque tanto a temperaturas altas o bajas no se lleva a cabo de manera eficiente la deshidratación de la glucosa para dar lugar a la formación del hidroximetilfurfural en medio ácido, primer paso para la formación del complejo coloreado (**Figura 4**). De acuerdo con los resultados, se estableció que 50 °C es la temperatura óptima de análisis, pues a dicha temperatura el complejo formado por la reacción de la D-(+)-glucosa con ácido sulfúrico y fenol alcanzó la máxima absorbancia.

Por otra parte, el análisis de varianza realizado a los resultados de los experimentos para determinar las condiciones de la hidrólisis de almidón, permitió establecer que tanto la temperatura como la concentración de ácido sulfúrico, tienen un efecto significativo ($p < 0.05$) sobre la reacción, mientras que el tiempo no tiene efecto alguno sobre la reacción ($p = 0.912$).

Una vez se establecieron las mejores condiciones de hidrólisis de almidón, se procedió a comparar su efecto en la cuantificación de la glucosa por el método del fenol – ácido sulfúrico, empleando una solución de almidón de concentración equivalente a una solución de glucosa. El análisis de varianza correspondiente demostró que el proceso de hidrólisis no afecta significativamente la cuantificación de glucosa ($p < 0.05$). Los resultados obtenidos son similares a los reportados por Saha *et al.* [202], para el análisis de polisacáridos, almidón y otros polisacáridos como celulosa y materiales lignocelulósicos, en muestras vegetales. Lo anterior implica que la metodología empleada es capaz de hidrolizar carbohidratos estructurales, por tanto debe prestársele especial atención a la extracción de los analitos, pues esta puede conducir a la sobreestimación de carbohidratos de reserva, si se llegan a hidrolizar carbohidratos estructurales como la celulosa.

Las condiciones de trabajo para el análisis de almidón en las muestras de lima ácida Tahití se resumen en la **Tabla 17**.

Tabla 17. Condiciones de análisis para el almidón por el método del fenol – ácido sulfúrico.

PROCESO	CONDICIONES
Hidrólisis	5 mg de muestra
	1 mL de agua destilada
	2 mL H ₂ SO ₄ al 75%
	30 min a 90 °C
Reacción fenol-ácido sulfúrico	0.5 mL muestra hidrolizada
	2.5 mL H ₂ SO ₄ al 98.8%
	0.5 mL fenol al 4%
	30 min a 50 °C

3.4.2 Figuras analíticas de mérito. Las figuras analíticas de mérito fueron estimadas de acuerdo con lo descrito en el numeral 2.4.2. para la metodología de análisis de almidón, que comprendió el proceso de hidrólisis y la reacción del fenol – ácido sulfúrico, en un rango de concentraciones

comprendido entre 1 – 100 mg/L. Los resultados obtenidos se resumen en la **Tabla 18**.

Tabla 18. Figuras analíticas de mérito para el análisis de almidón.

Ecuación	R²	b ± tSb	% CV (n = 6)	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
y = 0.0105x + 0.093	0.9935	0.0105 ± 0.0005	1.32	1.03	3.55

De acuerdo con los resultados observados en la **Tabla 17**, se puede indicar que el método presenta buena linealidad y sensibilidad para el rango de concentraciones evaluadas, ya que la linealidad expresa como el cuadrado del coeficiente de determinación (R²) es cercano a 1, mientras que, la sensibilidad del método, representada como la pendiente de la curva de la calibración (b), indica que el cambio de la respuesta del equipo (incertidumbre ± 0.001 Abs) es sensible a diferencias de concentración de ± 0.10 mg/L.

Por otra parte, puede indicarse que el método es repetible, ya que el porcentaje del coeficiente de variación (%CV) es inferior al 10%. Los límites de detección y cuantificación (LOD y LOQ), son adecuados, ya que se esperan concentraciones superiores a 4 mg/L en la muestras, según los antecedentes reportados en plantas cítricas [203 - 207]; por lo anteriormente expuesto, se concluye que el método implementado es válido para el análisis de almidón, en las muestras de lima ácida Tahití.

3.5 EXTRACCIÓN DE LOS ANALITOS

3.5.1 Implementación de la metodología de extracción. Para la extracción de D-(+)-glucosa, D-(-)-fructosa, sacarosa, y almidón, se empleó el procedimiento recomendado en la literatura [208, 209], descrito en el Numeral 2.6.1. Se evaluó el número de extracciones necesarias hasta registrarse la menor señal en cada una de las técnicas empleadas para la cuantificación de los analitos. Para el caso de los carbohidratos, se determinó que en la quinta

extracción con etanol al 80%, la cantidad de analitos remanente es inferior al límite de detección de la metodología implementada por HPLC-IR; por tanto, se estableció que cuatro extracciones son suficientes.

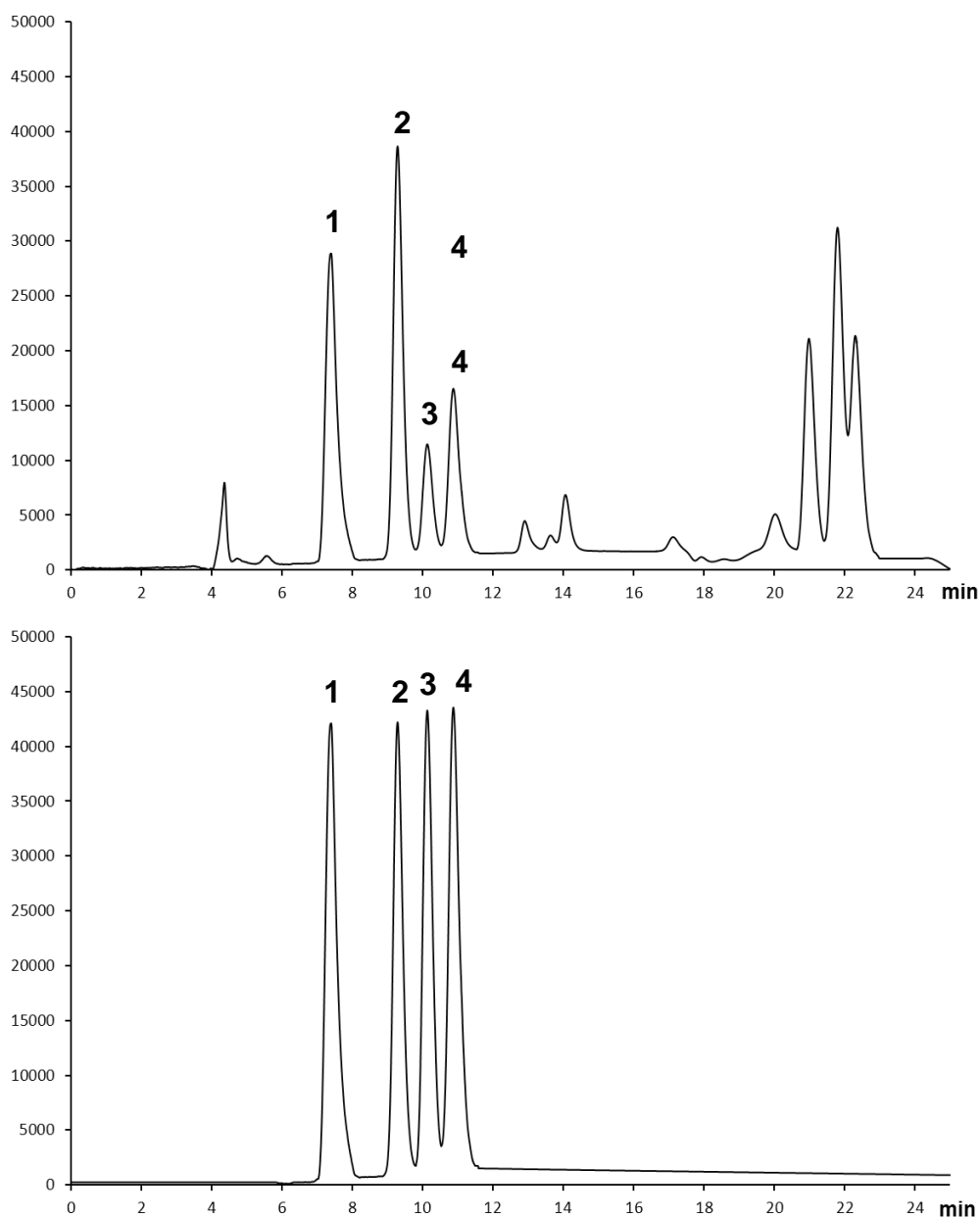


Figura 20. Determinación de D-(+)-galactosa en las hojas de lima ácida Tahití empleando ondas de ultrasonido; **A.** Perfil cromatográfico de las muestras de hojas de lima ácida Tahití con presencia de D-(+)-galactosa. **B.** Perfil cromatográfico de las sustancias de referencia; **1.** sacarosa. **2.** D-(+)-glucosa, **3.** D-(+)-galactosa, **4.** D-(-)-fructosa,

Adicionalmente, se evaluó también el uso del baño ultrasonido como técnica para mejorar la recuperación de los analitos. Sin embargo, para el caso de los carbohidratos el uso de esta técnica produjo cambio de color en los extractos, que pasaron de verde a naranja. La coloración naranja indica la presencia de furfurales en la solución, causada posiblemente por la deshidratación de los carbohidratos no estructurales como consecuencia de la energía suministrada por el baño ultrasónico.

Adicionalmente, los perfiles cromatográficos de los extractos de hojas sometido a baño ultrasónico, presentan una señal correspondiente a la D-(+)-galactosa, un monosacárido de tipo estructural en las plantas. Consecuentemente la señal de la D-(+)-galactosa indica que las ondas de ultrasonido confieren energía suficiente al sistema como para hidrolizar polisacáridos [210]. Esta observación lleva a concluir que el uso de ultrasonido en el proceso de extracción podría resultar no solo en una sobreestimación de D-(+)-glucosa y D-(-)-fructosa sino también en la hidrólisis anticipada del almidón, lo cual impediría su cuantificación (**Figura 20**).

3.5.2 Porcentaje de extracción. En la **Tabla 19**, se reportan los porcentajes de recuperación (%R) de cada uno de los analitos extraídos en las diferentes matrices, calculados como se indicó en el numeral 2.6.2.

Tabla 19. Porcentajes de recuperación de cada uno de los carbohidratos en estudio.

Sustancia	%R \pm DS (n=5)		
	Hojas	Frutos	Raíces
Sacarosa	89.1 \pm 3.2	91.2 \pm 2.9	ND*
D-(+)-glucosa	91.3 \pm 4.5	88.5 \pm 3.8	ND
D-(-)-Fructosa	87.1 \pm 4.3	89.4 \pm 3.7	ND
Almidón	90.1 \pm 3.9	92.4 \pm 3.4	92.9 \pm 4.5

ND*: No detectado

3.6 IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE CARBOHIDRATOS EN LIMA ÁCIDA TAHITI.

3.6.1 Identificación de carbohidratos móviles por HPLC-ESI-MS

La identificación de carbohidratos móviles (D-(+)-glucosa, D-(-)-fructosa y sacarosa) se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento descrito en el numeral 2.4.4. La identificación de los carbohidratos en las muestras de hojas y frutos de lima ácida Tahití se realizó por comparación de los tiempos de retención de los analitos, con los tiempos de retención de las respectivas sustancias de referencia, y por comparación de los espectros de masas y el patrón de fragmentación observados, con los espectros reportados en la literatura obtenidos bajo condiciones de análisis similares [211].

En la **Figura 21** se muestran los perfiles cromatográficos representativos de las muestras de hojas y frutos de la lima ácida Tahití, obtenidos empleando la columna *Alltech 700CH*, y las condiciones de análisis descritas en la **Tabla 13**. En dicha figura se observa que los tiempos de retención de los picos 1, 2 y 3, observados en los extractos de las muestras de hojas y frutos, coinciden con los tiempos de retención de las sustancias de referencias (**Tabla 14**). La adición de una concentración conocida de los carbohidratos de referencia a los extractos, produce un aumento en la señal del detector en estos mismos picos, lo cual permite suponer que corresponde de las mismas sustancias.

En la **Figura 22** se presentan los espectros de masas de los carbohidratos móviles identificados por cromatografía líquida acoplada a un detector de espectrometría de masas con ionización por *electrospray*, en las muestras de lima ácida Tahití. En general, las relaciones m/z observadas en los espectros corresponden al patrón de fragmentación de los carbohidratos reportados en la literatura [212 – 214], que se caracteriza por la pérdida sucesiva de agua y/o unidades de CH_2O ($[\text{M}-n\text{H}_2\text{O}]^+$, $[\text{M}-n\text{CH}_2\text{O}]^+$, donde n corresponde al número de moléculas de agua o unidades de CH_2O eliminadas);

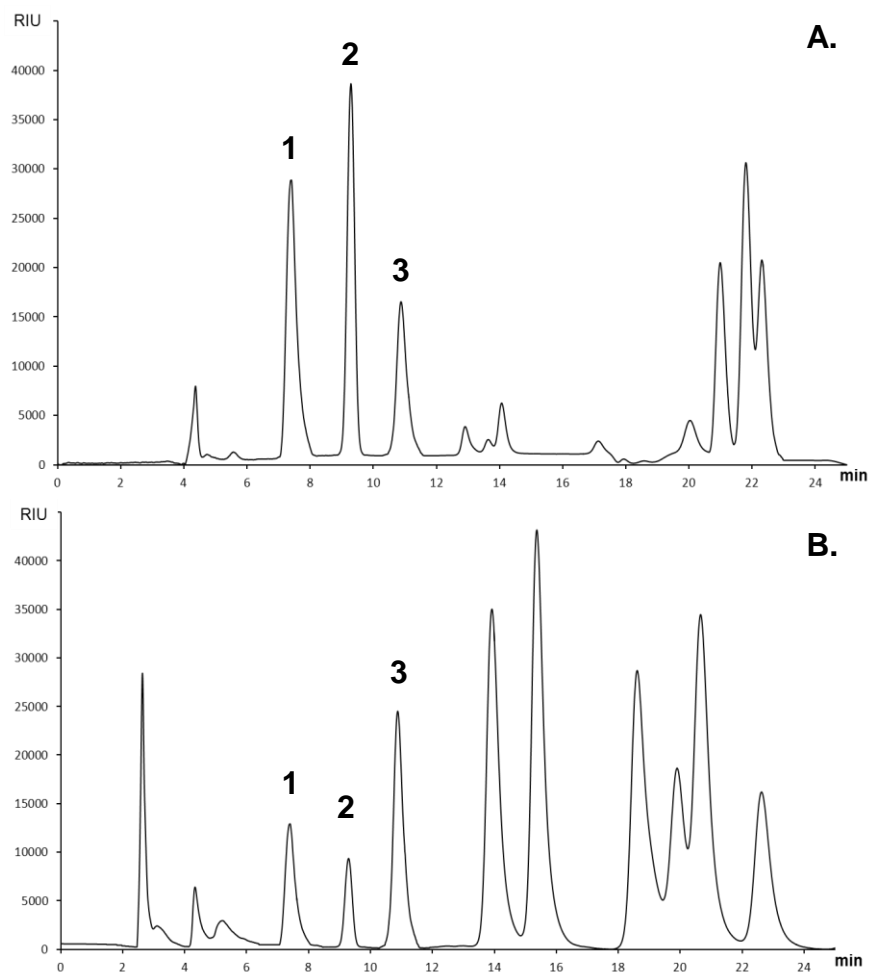


Figura 21.Perfiles cromatográficos representativos de las muestras de lima ácida Tahití; **A.** Hojas. **B.** Frutos; **1.** D-(-)-fructosa, **2.** D-(+)-glucosa, **3.**Sacarosa.

En el **Anexo 2**.se incluyen las posibles rutas de fragmentación de los iones moleculares que daría lugar a las señales observadas en los espectros de masas de los analitos evaluados.

En los tres casos, la señal más intensa corresponde a la relación m/z 179, que para el caso de las hexosas [D-(+)-glucosa, D-(-)-fructosa] corresponde al ion molecular $[M-H]^-$. Para el caso de la sacarosa este ión se genera tras la ruptura del enlace glicosídico formado entre la D-(+)-glucosa y D-(-)-fructosa, que da lugar a los iones en m/z 179 y m/z 161.

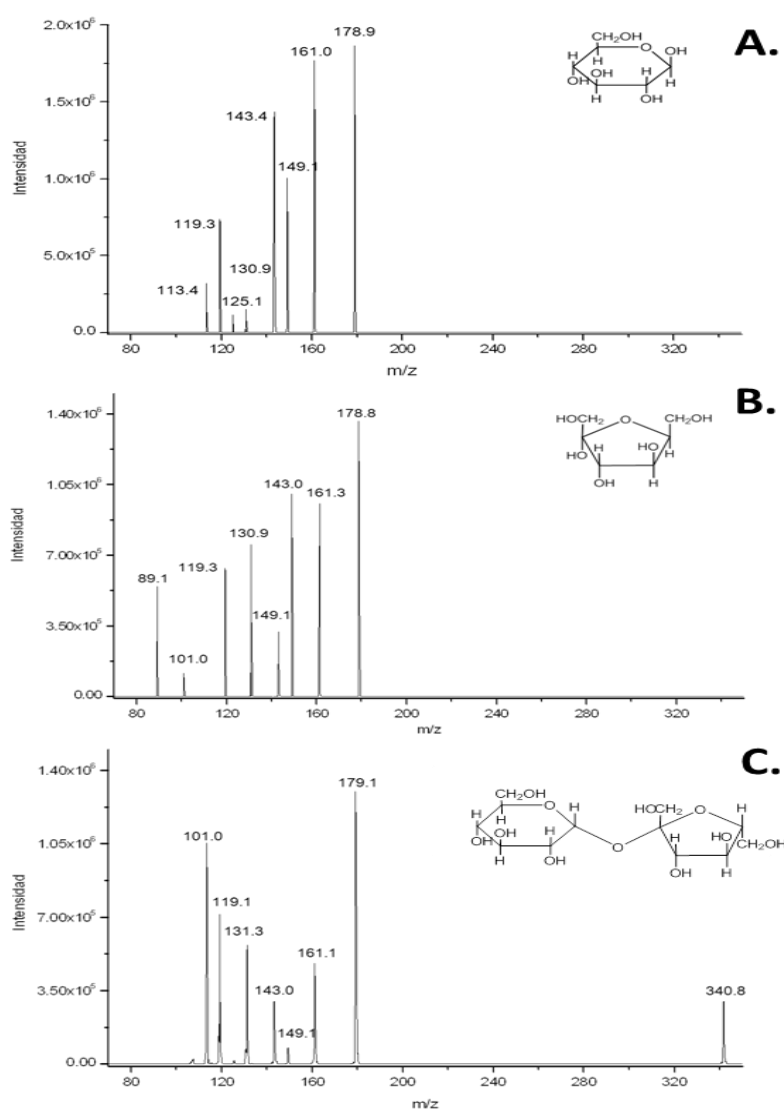


Figura 22. Espectros de masas de los carbohidratos móviles presentes en las muestras de lima ácida Tahití; **A.** D-(+)-glucosa, **B.** D-(-)-fructosa, **C.** sacarosa.

3.6.2 Contenido de carbohidratos móviles y de reserva

La cuantificación de los carbohidratos móviles y de reserva se llevó a cabo según lo descrito en los Numerales 2.4.3 y 2.5.3, respectivamente. Esta información permite establecer correlaciones entre las concentraciones de carbohidratos (móviles y de reserva) con los eventos propios de desarrollo del fruto y con las condiciones climáticas y temporales del cultivo. Estas correlaciones, en su turno, son fundamentales para el desarrollo de prácticas

de cultivo eficientes y eficaces que permitan el aumento de los rendimientos y la calidad de los frutos de lima ácida Tahití en el departamento de Santander.

Hojas viejas de brotes generativos

La variación en la concentración de D-(+)-glucosa, D-(-)-fructosa y sacarosa durante los dos ciclos de producción evaluados en hojas viejas de brotes generativos (HVG) de la lima ácida Tahití, se muestran en la **Figura 23**.

En general, la dinámica de concentración de cada hexosa (D-(+)-glucosa, D-(-)-fructosa) y de sacarosa no varió significativamente durante los dos ciclos de producción para los árboles de alta carga (**Figura 23, A-B**).

En este tipo de brotes, durante el desarrollo de los botones florales hasta la antesis (-14 – 0 días), la concentración de D-(+)-glucosa y D-(-)-fructosa aumenta y alcanza valores de 123 y 221 mg/100g, respectivamente, hasta el momento de la antesis (día 0). A partir de este día, una vez se inicia la fase de crecimiento celular, la concentración de hexosas decae a niveles apenas detectables en medio de la fase de alargamiento celular. Respecto a la concentración de D-(+)-glucosa, entre los días 42 – 56 días previos a la fase de maduración, se presenta un notable incremento que precede un paulatino decaimiento en la concentración durante toda la fase de maduración, hasta finalizar la cosecha. La concentración de D-(-)-fructosa permanece en niveles cercanos al límite de detección hasta el día 56, momento en el que empieza su incremento hasta finalizar la fase de maduración.

Por otra parte, la concentración de sacarosa en las hojas aumenta levemente, durante el desarrollo de los brotes florales hasta la antesis (-14 – 0 días), hasta alcanzar valores de 101 y 82 mg/100 g en los dos ciclos de producción. Una vez se produce la antesis e inicia la fase de crecimiento celular, su concentración desciende hasta 11 y 6 mg /100 g en el día 42. En el periodo comprendido entre los días 42 y 70, se observa un descenso y aumento en la concentración. Después de este periodo, época de transición entre la finalización de la fase de

alargamiento celular y la maduración, la concentración de sacarosa aumento paulatinamente en ambos ciclos hasta alcanzar valores de 79 y 91 mg/100 g, respectivamente, hasta la finalizar la cosecha (día 126).

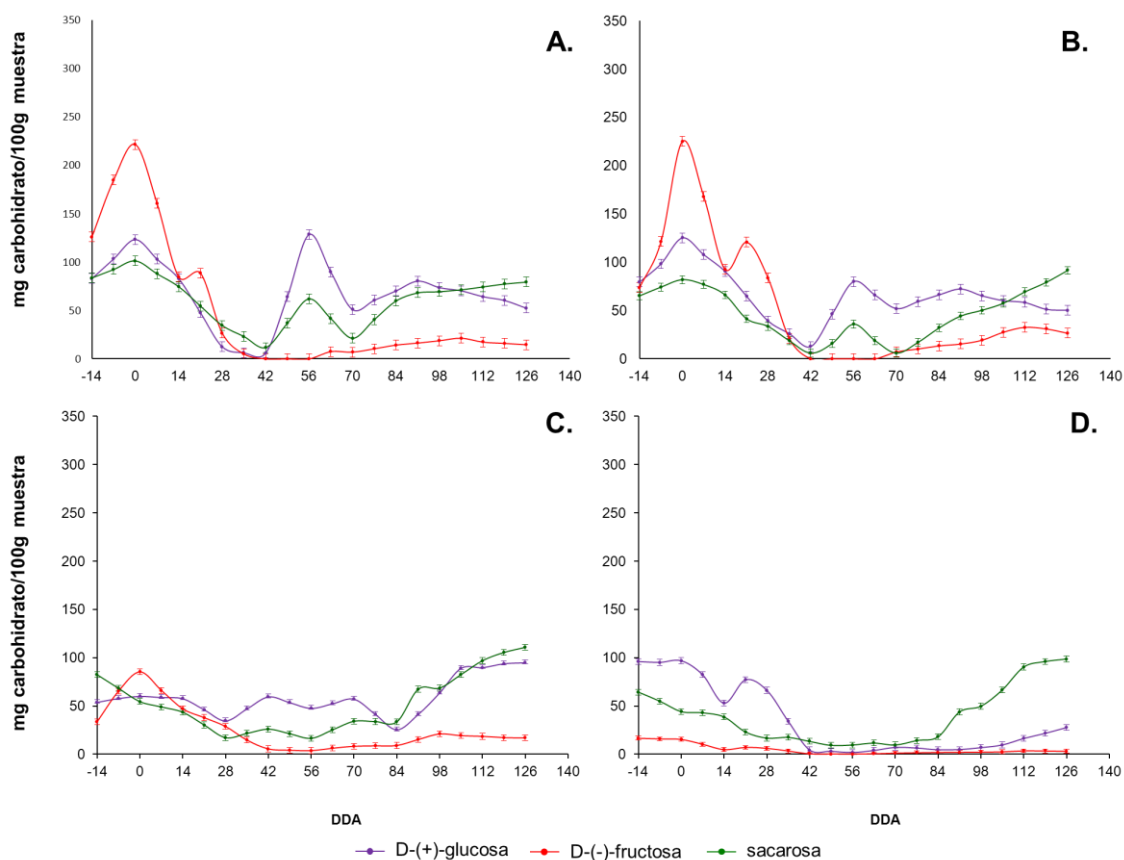


Figura 23. Evolución del contenido en carbohidratos (D-(+)-glucosa, D-(-)-fructosa y sacarosa) de hojas viejas de brotes generativos, durante dos ciclos de producción evaluados para los árboles de alta y baja carga; **A.** Primer ciclo – alta carga, **B.** Segundo ciclo – Alta carga, **C.** Primer ciclo– baja carga y **D.** Segundo ciclo – baja carga.

Por el contrario, en las hojas viejas de brotes generativos de los árboles de baja carga (**Figura 23, C-D**), la dinámica de concentración de hexosas y sacarosa, sí varía de un ciclo a otro. Se destaca que la concentración de carbohidratos en los dos ciclos permanece bastante baja respecto a los árboles de alta carga.

Por otra parte la concentración de almidón en este tipo de hojas, durante el periodo de floración y la fase de división celular (-14 – 14), disminuye paulatinamente para los dos ciclos. Una vez inicia la fase de división celular, la dinámica de concentración de almidón varía notablemente de un ciclo a otro.

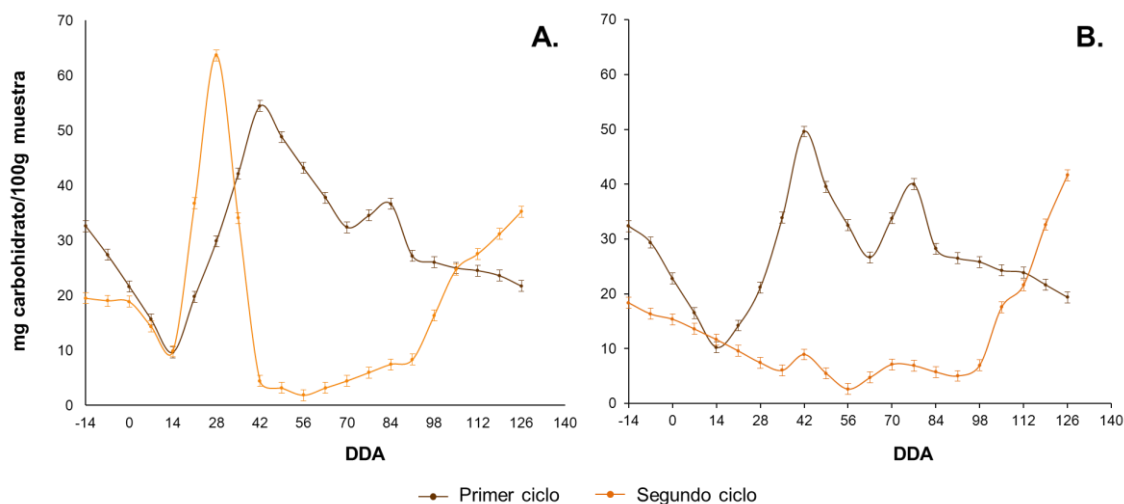


Figura 24. Concentración de almidón de hojas viejas de brotes generativos en los dos ciclos de producción evaluados; **A.** Alta carga, **B.** Baja carga.

En el primer ciclo, desde el día 14 la concentración se incrementa hasta alcanzar un valor de 54 mg/ 100 g el día 42, y nuevamente desciende hasta 32 mg/100 g, en los días previos al inicio de la fase de maduración (día 70). A continuación se registra un leve incremento a 37 mg/ 100 g, hasta finalizar la fase de alargamiento celular, que antecede un descenso en la concentración hasta finalizar la cosecha. Por otra parte, durante el segundo ciclo, una vez finalizada la fase de división celular la concentración de almidón se incrementa a 64 mg/ 100g, durante dos semanas (días 14 – 28), y desciende rápidamente hasta niveles apenas detectables (día 56); a partir de este día la concentración de almidón comienza a incrementarse hasta final de la cosecha cuando alcanza un valor de 35 mg/ 100g.

En cuanto a los árboles de baja carga (**Figura 24, B**), durante el primer ciclo de producción, los niveles y dinámica de concentración son similares a los observados para los árboles de alta carga, opuesto a lo que ocurre durante el

segundo ciclo, lo cual sugiere que la variación de las condiciones climáticas puede ser el responsable de este efecto.

Hojas viejas de brotes vegetativos

De manera similar a las hojas viejas de brotes generativos, este tipo de hojas presentan dinámicas y niveles en la concentración de hexosas y sacarosa muy similares durante los dos ciclos de producción (**Figura 25, A – B**). En cuanto a la concentración de D-(+)-glucosa y D-(-)-fructosa, durante los dos ciclos de producción presentan un máximo de 125 y 225 mg/100 g, respectivamente, al inicio de la etapa de división celular (día 0), y otro, días previos al inicio de la fase de maduración del fruto (día 56). Esta dinámica observada para las hexosas, varía notablemente para los árboles de baja carga, en los cuales se observa diferencias significativas entre un ciclo y otro (**Figura 25, C-D**).

Por otra parte, la dinámica de la concentración de sacarosa durante los dos ciclos de producción presenta dos picos máximos; el primero máximo con un valor de 120 y 71 mg/100 g, respectivamente, para cada ciclo, en los días previos a la antesis (día 7). El segundo máximo se observó en la fase de alargamiento celular (día 56), con un valor de 54 y 23 mg/ 100 g, tanto en el primer y segundo ciclo de producción. Al igual que en los brotes generativos, la concentración de sacarosa fue superior durante el primer ciclo de producción hasta que se inició la fase de maduración, una vez iniciada esta fase, la concentración de sacarosa se incrementa hasta alcanzar valores 23 y 29 mg/100 g, superiores en el segundo ciclo de producción (día 84).

En la **Figura 25** se presenta la cuantificación de carbohidratos móviles en hojas viejas de brotes vegetativos, durante los dos ciclos de producción, para árboles de alta y baja carga.

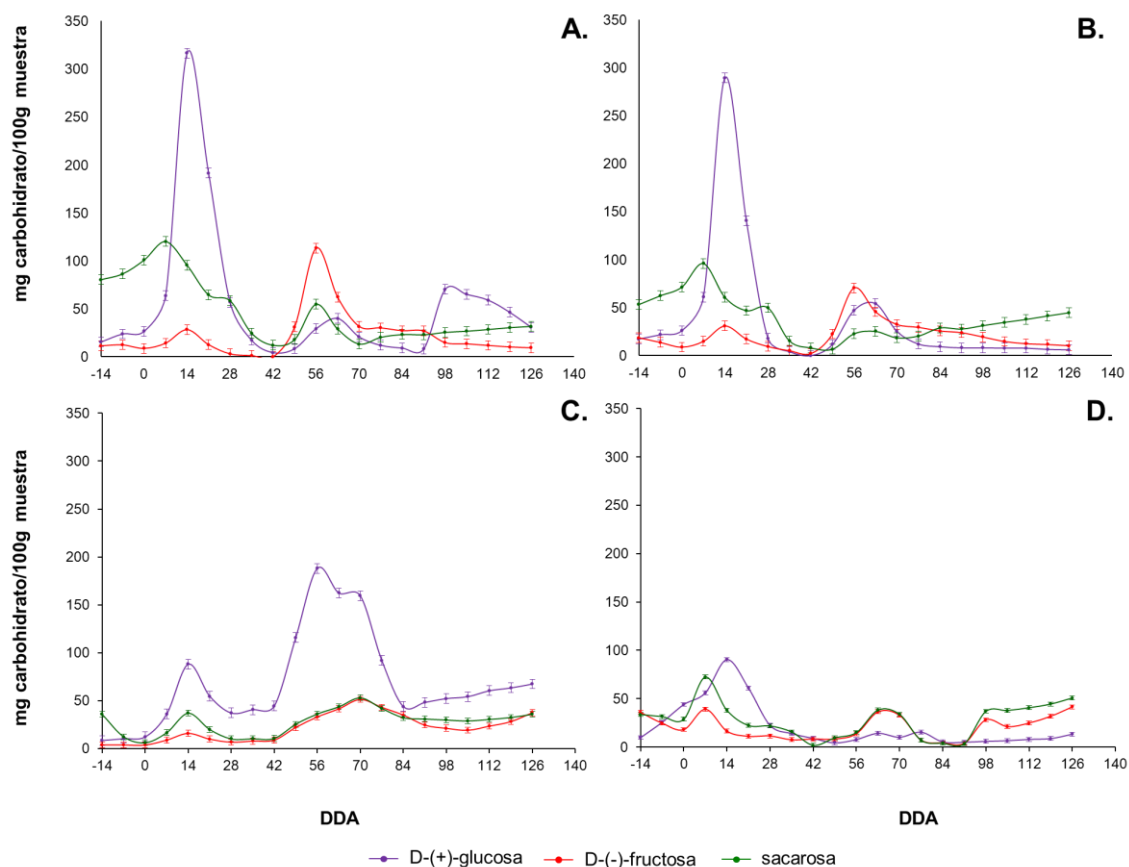


Figura 25. Cuantificación en hojas viejas de brotes vegetativos de D-(+)-glucosa, D-(-)-fructosa y sacarosa, durante los dos ciclos de producción evaluados para los árboles de alta y baja carga; **A.** Primer ciclo – alta carga, **B.** Segundo ciclo – Alta carga, **C.** Primer ciclo – baja carga y **D.** Segundo ciclo – baja carga.

De manera similar, en las hojas viejas de brotes vegetativos, la dinámica en la concentración de almidón de un ciclo a otro varió notablemente (**Figura 26, A**). Durante el primer ciclo, la concentración de almidón desde la floración hasta el día 56 en la fase de elongación celular, aumentó hasta alcanzar un valor de 38 mg/ 100 g. A continuación, se observó un descenso paulatino hasta finalizar la cosecha, momento en el cual se registró una concentración de 5 mg/ 100 g. En el segundo ciclo de producción, la concentración de almidón permanece en niveles muy bajos, entre 3 – 5 mg/ 100 g, hasta el inicio de la antesis (día 0), es decir, cuando inicia la división celular. Una vez inicia esta fase y hasta los días previos a la maduración, se observan dos máximos en la concentración de almidón, el primero, de 58 mg/ 100 g a los 21 días y el segundo, de 23 mg/ 100 g, a los 63 días después de antesis. Finalmente, con el inicio de la fase de

maduración la concentración de almidón aumenta rápidamente, hasta el final de la cosecha, cuando alcanza un valor de 34 mg/ 100 g.

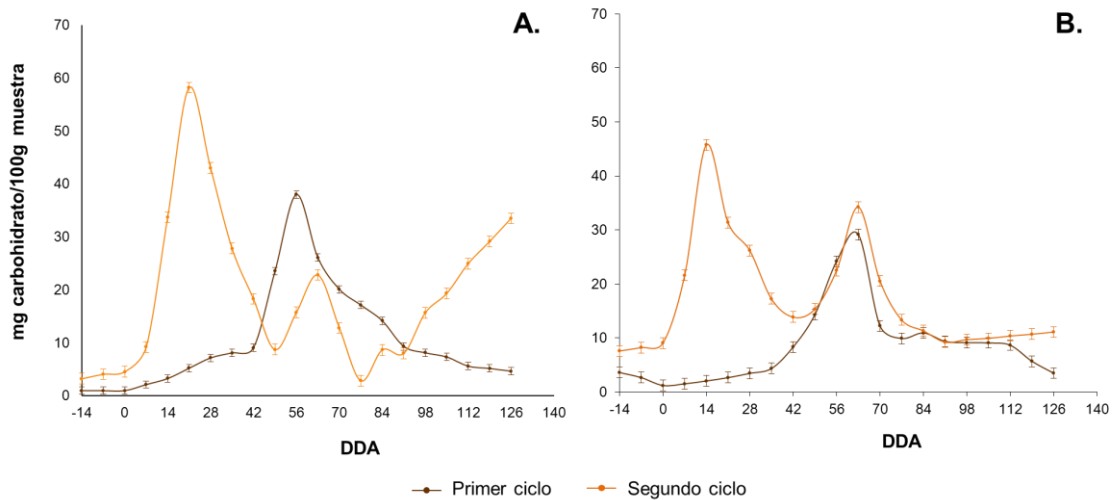


Figura 26. Concentración de almidón de hojas viejas de brotes vegetativos en los dos ciclos de producción evaluados; **A.** alta carga, **B.** baja carga.

Hojas jóvenes

En la **Figura 27** se presenta la cuantificación de carbohidratos móviles en hojas jóvenes de brotes generativos, durante los dos ciclos de producción, para árboles de alta y baja carga.

Por otra parte, la dinámica en la concentración de hexosas y sacarosa en hojas jóvenes de brotes generativos en árboles de alta carga, es muy similar durante los dos ciclos de producción, observándose solo diferencias en los niveles de concentración (**Figura 27, A-B**). Desde el periodo de floración hasta finales de la fase de división celular (-14 – 14 día) se observó un incremento continuo de la concentración, que alcanzó un valor máximo de 259 mg/ 100 g de D-(+)-glucosa, 29 mg/100 g de D-(-)-fructosa y 24 mg/ 100 g de sacarosa, durante el primer ciclo de producción. Una vez inicio la fase de elongación celular la concentración de azúcares móviles descendió hasta los límites de detección (día 42). A partir de este día, se observó un notable incremento en la concentración de D-(+)-glucosa (183 mg/100 g) hasta los días previos a la etapa de maduración, que antecedió su disminución paulatina hasta alcanzar

los 56 mg/ 100 g, a finales de la cosecha (día 126). Durante esta misma etapa, los niveles de sacarosa y D-(-)-fructosa, presentaron una dinámica de movilización similar hasta finalizar la etapa de cosecha, cuando se alcanzaron valores de 30 y 88 mg/ 100 g. En cuanto a los árboles de baja carga, durante los dos ciclos de producción, tanto las hexosas como la sacarosa, se mantuvieron en niveles muy bajos, apenas cuantificable (**Figura 27, C-D**).

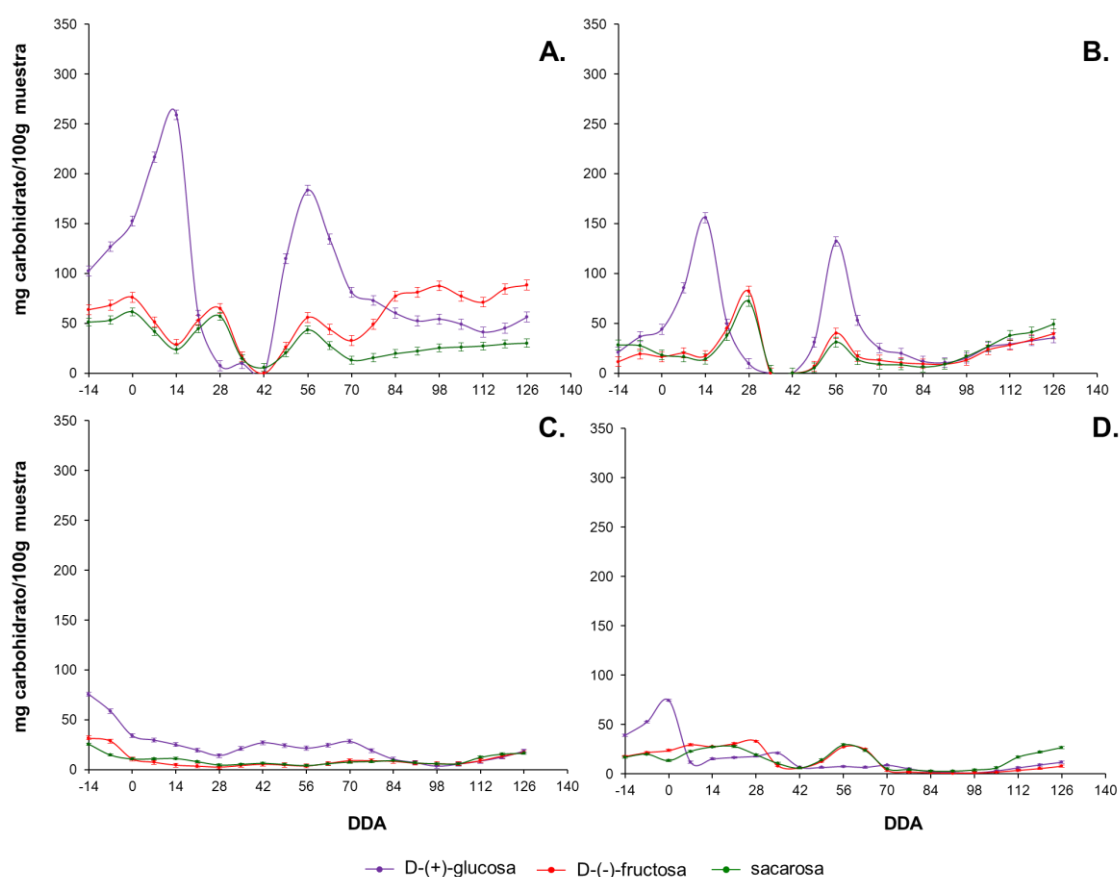


Figura 27. Cuantificación en hojas jóvenes de brotes generativos de D-(+)-glucosa, D-(-)-fructosa y sacarosa, durante los dos ciclos de producción evaluados para los árboles de alta y baja carga; **A.** Primer ciclo – alta carga, **B.** Segundo ciclo – Alta carga, **C.** Primer ciclo – baja carga y **D.** Segundo ciclo – baja carga.

De acuerdo con la **Figura 28** la concentración y dinámica de almidón varía entre ciclos de producción, pero no se observan diferencias entre árboles de alta (**Figura 28, A**) y baja carga (**Figura 28, B**). Mientras que en las hojas del primer ciclo, el almidón disminuye paulatinamente, en el segundo ciclo, algunos

máximos de concentración se observan durante la fase de alargamiento celular (día 28 y día 56).

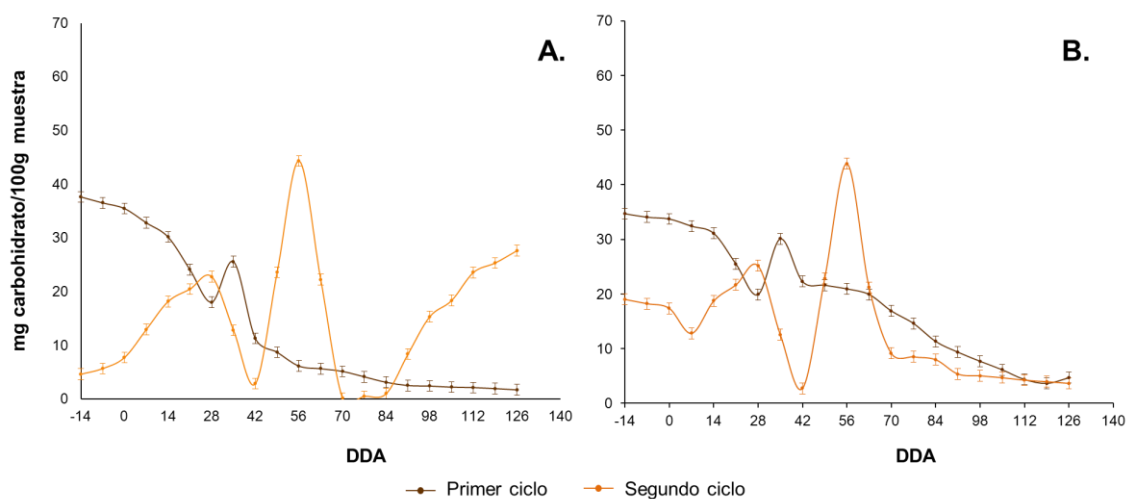


Figura 28. Concentración de almidón de hojas jóvenes de brotes generativos en los dos ciclos de producción evaluados; **A.** alta carga, **B.** baja carga.

En el caso de la hojas jóvenes de brotes vegetativos, los niveles de carbohidratos se mantienen muy bajos durante los dos ciclos de producción, tanto para árboles de alta y baja carga (**Figura 29**). En general no se observan variaciones en la dinámica, ni en la concentración para los árboles de alta carga entre ciclos (**Figura 29, A**), contrario a lo observado para los árboles de baja carga (**Figura 29, B**).

En cuanto a la dinámica y concentración de almidón, al igual que en hojas jóvenes de brote generativas, varía entre ciclos, pero no se observaron diferencias significativas ($p < 0.005$) entre árboles de alta y baja carga (**Figura 30**).

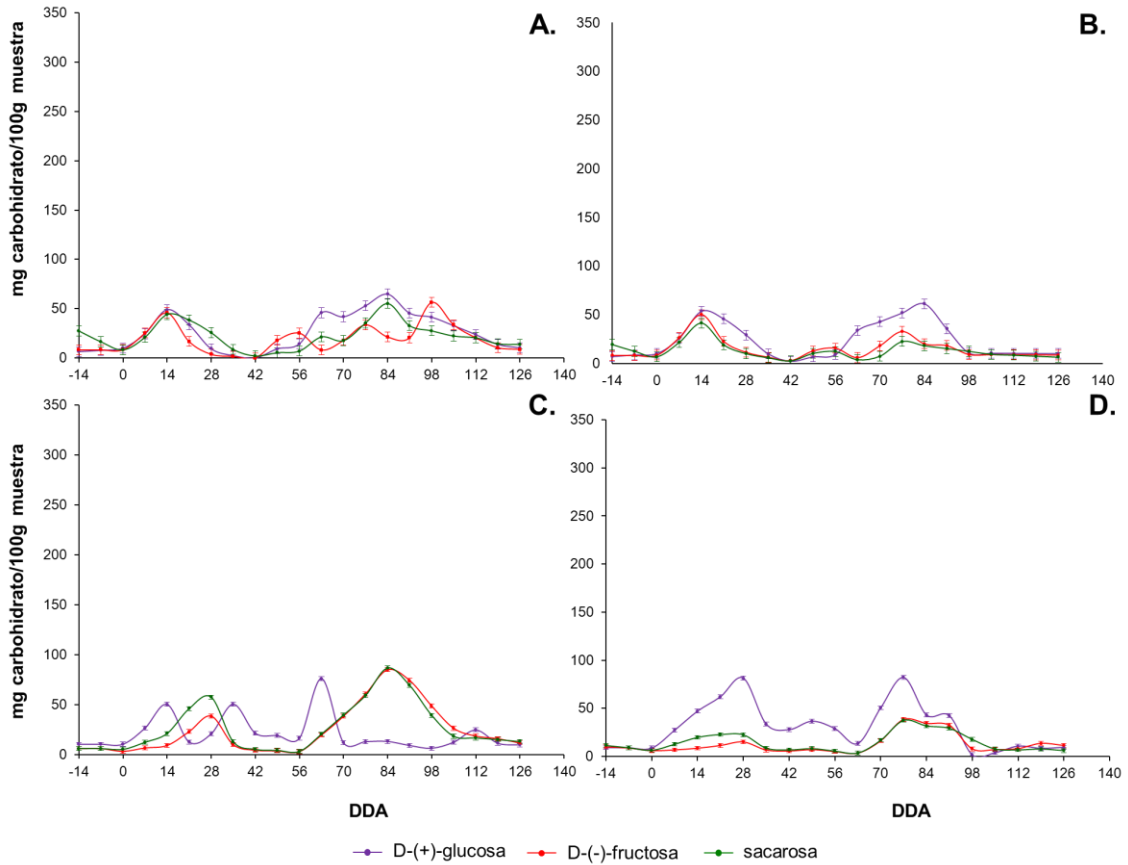


Figura 29. Cuantificación en hojas jóvenes de brotes vegetativos de D-(+)-glucosa, D-(-)-fructosa y sacarosa, durante los dos ciclos de producción evaluados para los árboles de alta y baja carga; **A.** Primer ciclo – alta carga, **B.** Segundo ciclo – Alta carga, **C.** Primer ciclo – baja carga y **D.** Segundo ciclo – baja carga.

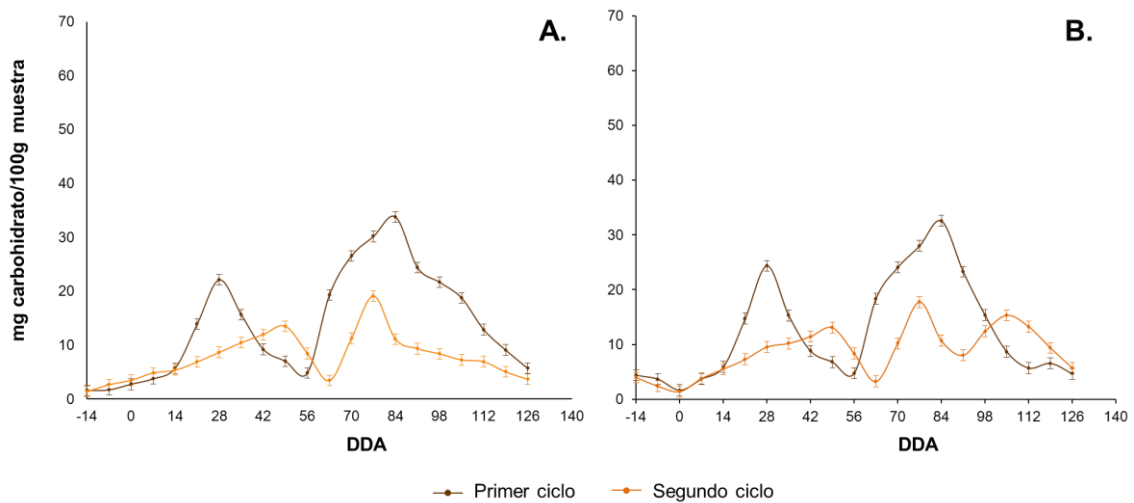


Figura 30. Concentración de almidón de hojas jóvenes de brotes generativos en los dos ciclos de producción evaluados; **A.** Alta carga. **B.** Baja carga.

Frutos

El contenido de carbohidratos móviles en los frutos de lima ácida Tahití durante los dos ciclos de producción evaluados para árboles de alta y baja producción, se muestra en la **Figura 31**.

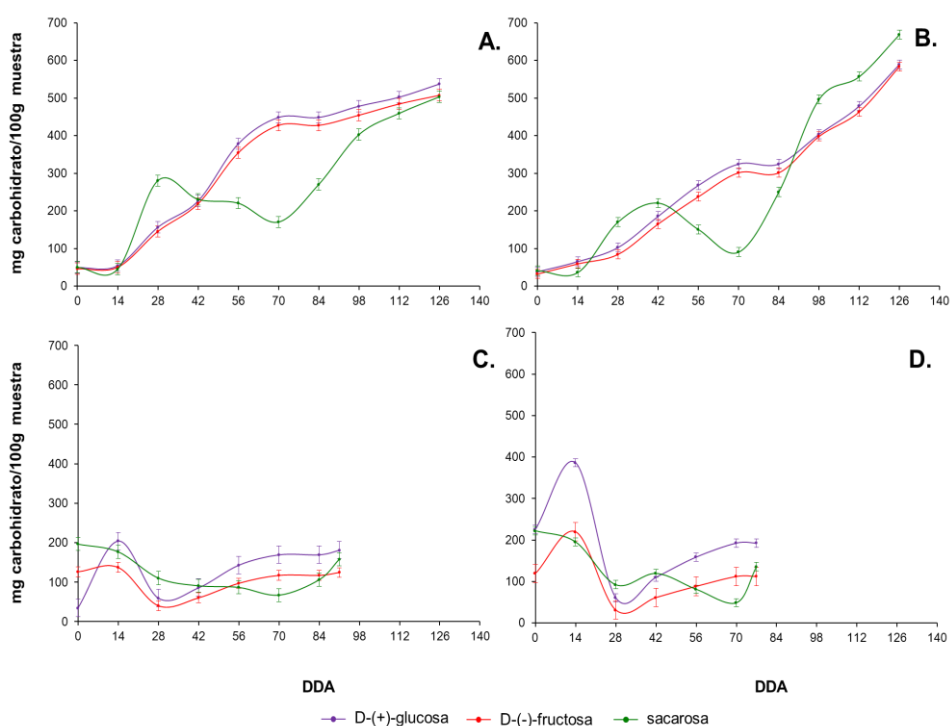


Figura 31. Cuantificación en frutos de D-(+)-glucosa, D-(-)-fructosa y sacarosa durante los dos ciclos de producción evaluados para los árboles de alta y baja carga; **A.** Primer ciclo – alta carga, **B.** Segundo ciclo – Alta carga, **C.** Primer ciclo – baja carga y **D.** Segundo ciclo – baja carga.

La concentración de D-(+)-glucosa y D-(-)-fructosa, durante los dos ciclos se caracterizó por presentar un leve aumento durante la fase de división celular (0 – 14 días), hasta alcanzar valores de 54 y 50 mg/100 g, respectivamente, y un marcado aumento durante el alargamiento celular (14 – 28 días), hasta 156 y 145 mg/ 100 g; a partir de esta época, la concentración de ambas hexosas aumentó gradualmente hasta el inicio de la fase de maduración (día 84), y así llegar 448 y 427 mg/ 100 g, respectivamente. Una vez inició dicha fase, aunque el aumento en la concentración de D-(+)-glucosa y D-(-)-fructosa continuó hasta el final de la cosecha (día 126), hasta alcanzar valores de 537 y 507 mg/ 100g, respectivamente, se observó también que para los frutos del primer ciclo

de producción, la concentración aumentó en proporciones menores a las observadas por los frutos del segundo ciclo, ya que los frutos del segundo ciclo presentaron una concentración de D-(+)-glucosa de 589 mg/ 100 g, y de D-(-)-fructosa de 584 mg/ 100 g (**Figura 31,A-B**).

Los resultados del contenido de sacarosa muestran que durante el primer ciclo de producción, en la primera fase de crecimiento del fruto, es decir durante la división celular (día 14) la sacarosa presenta una concentración de 45 mg/ 100g, posteriormente, la sacarosa aumenta rápidamente hasta alcanzar un valor de 280 mg/ 100 g, al inicio de la fase de alargamiento celular (día 28); a partir de este día los niveles de sacarosa en el fruto se mantienen bajos (entre 230 y 220 mg/ 100 g), hasta que inicia la fase de maduración (día 84) y continúan incrementándose hasta que finaliza la cosecha (día 126) hasta alcanzar un valor de 503 mg/ 100 g. Con respecto al segundo ciclo de producción, la dinámica del contenido de sacarosa en los frutos se mantiene constante, pero los niveles de concentración varían de un ciclo a otro, especialmente al finalizar la fase de maduración, durante la cual la concentración de sacarosa alcanza un valor de 668 mg/ 100 g (**Figura 31, A-B**).

Infortunadamente, el contenido de carbohidratos móviles en los frutos de árboles de baja carga solo pudo ser cuantificado hasta los día 91 y 77, durante el primer y segundo ciclo, respectivamente, pues todos los frutos se desprendieron; sin embargo, durante el tiempo evaluado, se observó que las hexosas y la sacarosa mantuvieron la misma dinámica de concentración que los frutos de árboles de alta carga, aunque en proporciones más bajas (**Figura 31, C-D**).

En cuanto al contenido de almidón (**Figura 32**), la dinámica durante los dos ciclos es similar, para árboles de alta carga. Durante la fase inicial de división se observa niveles bajo en la concentración de almidón en frutos, hasta una semana después del inicio de la fase de alargamiento celular (día 28). Una vez inicia la fase de maduración (día 84), la concentración de almidón se

incrementa gradualmente hasta el final de la cosecha, siendo este incremento mucho más notable durante el segundo ciclo de producción evaluado.

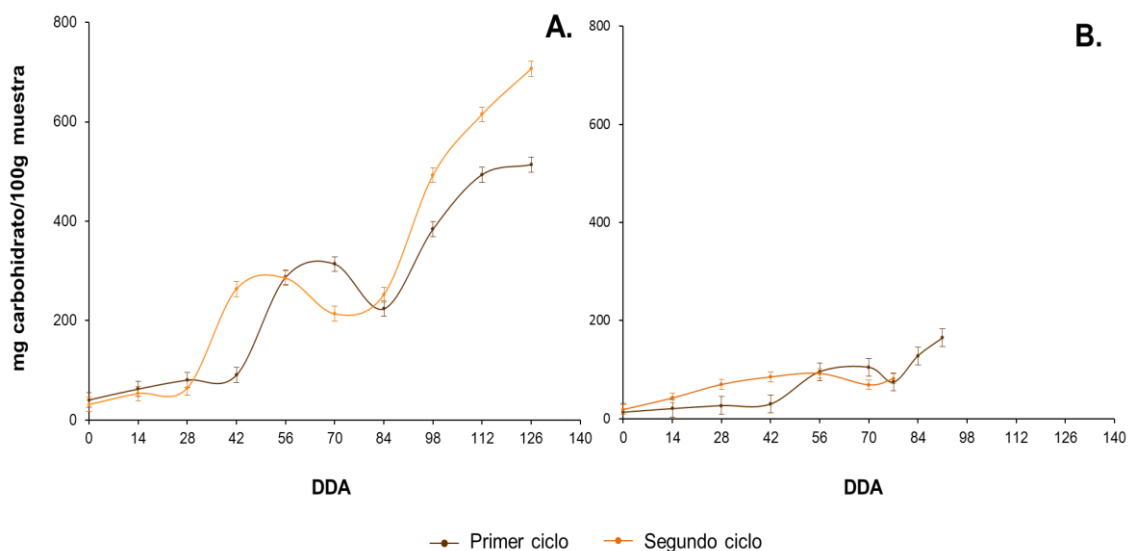


Figura 32. Concentración de almidón de frutos en los dos ciclos de producción evaluados, **A.** alta carga. **B.** baja carga.

Raíces

La cuantificación de almidón durante los dos ciclos de producción evaluados se presenta en la **Tabla 20**. Para el primer ciclo, la concentración de almidón durante la etapa de floración es bastante elevada respecto al segundo ciclo; por el contrario, al finalizar la cosecha la concentración de almidón en el primer ciclo es más baja. Estadísticamente, entre un ciclo y otro, las diferencias en el contenido de almidón durante la floración y la cosecha son significativas ($p > 0.05$).

Tabla 20. Contenido de almidón en las raíces de la lima ácida Tahití.

Periodo	Almidón (mg/L), n=3	
	Primer ciclo	Segundo ciclo
Floración	123.6 ± 1.5	63.5 ± 0.9
Cosecha	38.6 ± 0.7	81.2 ± 0.7

3.7 PARÁMETROS DE CALIDAD DE LAS COSECHAS

En la **Tabla 21** se muestran los parámetros de calidad de las cosechas correspondiente a cada ciclo de producción evaluado. En general, los frutos de ambos ciclos de producción cumplieron con las especificaciones de calidad establecidos en la NTC-4087 [215]. Sin embargo, en términos de contenido de jugo y acidez titulable, todas las categorías de los frutos recolectadas durante el primer ciclo de producción muestran valores superiores, lo cual indica que dichos frutos son de mejor calidad y podrían satisfacer mejor las necesidades del consumidor.

En cuanto al índice de madurez, los frutos recolectados durante el segundo ciclo de producción presentan valores más altos, lo cual podría indicar que estos maduran más rápidamente; este hecho es consistente con las curvas de crecimiento determinadas para ambos ciclos (**Figura 12**), ya que en ellas se observa que los frutos del segundo ciclo alcanzan el tamaño para ser cosechados en menos tiempo, ya que su tasa de crecimiento durante la etapa de maduración es más elevada (**Figura 13**).

Tabla 21. Parámetros de calidad de las cosechas producidas durante los dos ciclos.

PARÁMETRO	CATEGORIA (n=15)							
	Primer ciclo				Segundo ciclo			
	A	B	C	D	A	B	C	D
Diámetro ecuatorial (mm)	68.4 ± 0.5	64.2 ± 0.5	54.9 ± 0.6	45.5 ± 0.4	70.0 ± 0.7	63.2 ± 0.6	53.4 ± 0.4	45.9 ± 0.4
Peso (mg)	188.4 ± 1.7	133.6 ± 1.2	91.2 ± 0.8	63.3 ± 0.6	199.8 ± 1.7	151.1 ± 0.9	92.4 ± 0.9	66.9 ± 0.7
Contenido de jugo (%)	37.1 ± 0.3	39.2 ± 0.4	30.9 ± 0.3	32.9 ± 0.3	32.0 ± 0.3	32.4 ± 0.3	24.1 ± 0.2	23.2 ± 0.2
Sólidos solubles(° Brix)	7.0 ± 0.1	6.6 ± 0.1	6.4 ± 0.1	6.0 ± 0.1	6.0 ± 0.1	6.1 ± 0.1	6.1 ± 0.1	6.1 ± 0.1
Acidez titulable (% AC)	4.01 ± 0.04	4.24 ± 0.03	4.32 ± 0.04	4.65 ± 0.04	3.25 ± 0.03	3.97 ± 0.04	4.05 ± 0.04	4.25 ± 0.03
Índice de madurez (IM)	1.8 ± 0.1	1.6 ± 0.1	1.5 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.9 ± 0.1	1.5 ± 0.1	1.5 ± 0.1	1.4 ± 0.1

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1 CONTENIDO DE CARBOHIDRATOS Y FLORACIÓN

De acuerdo con los resultados obtenidos en la presente investigación la etapa de floración para la lima ácida Tahití dura dos semanas, durante las cuales las yemas brotan y florecen. Según numerosos autores [216 - 218] los carbohidratos son los encargados de suministrar la energía para que se produzca la frotación y la inducción floral, que en su turno determinan el número de frutos que llegan a ser cosechados. Se considera que la disponibilidad de carbohidratos durante la floración es un factor limitante en el rendimiento de las cosechas [219].

En el primer ciclo de producción durante la floración, en hojas viejas de brotes generativos la concentración de carbohidratos móviles aumentó hasta alcanzar un máximo el día que finaliza (día 0) (**Figura 23, A**). Posiblemente, en esta etapa la planta aumenta su actividad fotosintética para poder satisfacer la demanda de energía que la planta requiere para llevar a cabo los procesos asociados con la floración, lo cual conduce a un aumento en la concentración de hexosas (D-(+)-glucosa y D-(-)-fructosa) y sacarosa. Simultáneamente, la concentración de almidón disminuye paulatinamente, lo cual sugiere que la planta también debe usar sus reservas para satisfacer las necesidades energéticas durante esta etapa.

La pauta de movilización durante la floración en este tipo de hojas es similar a la registrada por Almeida [220] en *Citrus sinensis* "Salustiana". De acuerdo con el autor, la floración dependería tanto de la actividad fotosintética de la planta, como de la reserva de carbohidratos.

Resultados similares se observaron en hojas viejas de brotes generativos durante el segundo ciclo de producción (**Figura 23, B**). Aunque la concentración de carbohidratos móviles no varía de un ciclo a otro, si se

observó que la concentración de almidón para este segundo ciclo de producción es más baja, lo cual podría ser una de las causas de la menor producción de flores observadas durante este ciclo (**Tabla 10**) como consecuencia de la disminución en la disponibilidad de carbohidratos esenciales para el desarrollo de la brotación y la inducción floral.

En árboles de alta carga la ausencia de carbohidratos de reserva durante la floración en el segundo ciclo de producción (**Figura 24, A**) puede estar asociada al fenómeno de alternancia de los cítricos. Este fenómeno consiste en que tras un ciclo caracterizado por amplia presencia de flores y frutos, le sigue un ciclo con escasa floración y escaso número de frutos. Martínez-Fuentes *et al.* [221] señalan que en árboles de mandarina Clementina (*Citrus reticulata*), se presenta el fenómeno de alternancia y está relacionado con la baja disponibilidad de carbohidratos de reservas debido al elevado número de frutos cosechados en el primer ciclo.

Por otra parte, cabe mencionar que la floración de las plantas es consecuencia de un conjunto de factores promotores e inhibidores, en particular para que un cítrico florezca es necesario que estén presentes los factores promotores y al mismo tiempo estén ausentes los factores inhibidores. En este caso los carbohidratos actúan como promotores de la floración, y son antagonistas de hormonas vegetales como las giberelinas, que actúan como inhibidores [222].

Otro factor importante que pudo ser determinante en la baja floración de un ciclo a otro fue la temperatura. Estudios realizados por Deiddad *et al.* [223], demostraron en épocas de bajas temperaturas el número de flores producido por árbol disminuye en la mandarina clementina. Adicionalmente Hall *et al.* [224] determinaron que el aumento en la temperatura del suelo incrementa el porcentaje de brotes, al modificar el balance y el transporte de hormonas hacia la raíz. De acuerdo con los estudios mencionados, las bajas temperaturas que caracterizaron el segundo ciclo debido al fenómeno de la Niña podrían ser la causa de la disminución en la floración de un ciclo a otro.

Respecto a los árboles de baja carga, la escasa producción de flores durante ambos ciclos de producción podría estar relacionada con la baja concentración de carbohidratos móviles que fue observada (**Figura 23, C-D**), y que en su turno podría estar relacionada con problemas de estos árboles para movilizar sus reservas (**Figura 24, B**). Esta conclusión es soportada también por el hecho de que la concentración de almidón en estos árboles es similar a la concentración de almidón en árboles de alta carga, lo cual indica que aunque se sintetizan carbohidratos y se almacenen como reserva, no son debidamente movilizados y utilizados para el desarrollo reproductivo de la planta, como se ha comprobado en otras especies de frutales [225].

4.2 CONTENIDO DE CARBOHIDRATOS Y CRECIMIENTO DEL FRUTO

4.2.1 Hojas viejas de brotes vegetativos

Al igual que en la etapa de floración, durante el crecimiento del fruto la concentración de carbohidratos móviles y de reservas en brotes están estrechamente relacionados, debido a que las hojas viejas de este tipo de brotes son las responsables de exportar productos fotoasimilables a todas las partes de la planta [226].

En las hojas generativas viejas durante la primera fase de crecimiento del fruto (0 – 14 días), la matriz de correlación de Pearson entre los carbohidratos móviles y de reserva, y la tasa de crecimiento del fruto, mostró que existe un alto grado de correlación negativa entre ellos. Es decir, conforme disminuye la concentración de carbohidratos durante esta fase aumenta, el crecimiento y tasa de crecimiento del fruto. Esto sugiere que a medida que avanza el proceso de división celular del fruto, y los frutos aumentan de tamaño, va disminuyendo la cantidad de carbohidratos, debido a la gran cantidad de energía que la planta requiere para llevar a cabo estos procesos y otros, como la construcción de tejidos que se realiza paralelamente.

Según Moss *et al* [227], la competencia por carbohidratos entre frutos en desarrollo de inflorescencias con hojas, se establece varias semanas después de la floración, debido a que la demanda del fruto excede la capacidad fotosintética de las hojas. Debido al elevado número de frutos que se producen, aumenta la competencia por fotoasimilados ocasionando el agotamiento de las reservas (**Figura 26**). De acuerdo con Guardiola y García-Luis [228], la disminución en la concentración de carbohidratos móviles y de reserva y la activación del crecimiento tras la antesis, ocurre de manera habitual en los frutos cítricos.

Por otra parte, en la fase de alargamiento celular (14 – 84 días) el coeficiente de Pearson indica que no hay una correlación lineal entre los carbohidratos móviles y la tasa de crecimiento del fruto, esto posiblemente se deba a que el crecimiento del fruto cítrico depende de la expansión de las vesículas¹¹ que se llenan de carbohidratos, ácidos y agua. Consecuentemente, la tasa de crecimiento en esta fase estaría afectada también por la capacidad de acumulación de agua y ácidos en el fruto [229].

En cuanto a las reservas de carbohidratos (**Figura 24, A**), durante la fase de alargamiento celular la concentración de almidón aumenta y disminuye, por lo cual no es posible encontrar una relación directa con la tasa de crecimiento del fruto, ya que en esta fase el crecimiento es lineal. Sin embargo, la variación de la concentración de almidón podría explicarse, teniendo en cuenta que durante el alargamiento celular, el fruto acumula la mayor cantidad de azúcares antes de alcanzar el 50% de su tamaño final [230] (días 14 – 42). Este hecho coincide con un aumento en la concentración de almidón, lo que indica una disminución en la demanda de carbohidratos. A partir del día 42 y hasta finalizar la fase de alargamiento celular (día 84), la concentración de almidón disminuye, lo cual podría deberse a que los frutos aumentan su capacidad de sumidero y son capaces de acumular mayor cantidad de carbohidratos, disminuyendo la concentración de almidón en las hojas viejas de brotes generativos, principales órganos proveedores de carbohidratos [231].

¹¹Vesículas: Bolsa ubicadas dentro de los frutos, destinadas a la acumulación de nutrientes y líquidos durante el desarrollo.

Finalmente, en la etapa de maduración (días 84 – 126), el coeficiente de Pearson muestra una correlación positiva entre la concentración de D-(+)-glucosa y almidón, y la tasa de crecimiento del fruto; ya que la demanda durante esta fase no excede la capacidad de síntesis de la planta, pues solo necesita energía para el desarrollo de las características organolépticas del fruto. Esta correlación positiva indica que la planta continúa sintetizando carbohidratos, pero no los consume en su totalidad, por lo cual puede acumularlos como preparación previa a la floración de la nueva cosecha, debido a la alta demanda energética que este evento fisiológico genera en la planta [232, 233].

En cuanto al segundo ciclo de producción, los valores del coeficiente de correlación de Pearson para las tres fases de crecimiento son similares, esto debido a que la pauta de movilización de carbohidratos móviles es semejante al primer ciclo, aunque los valores de concentración varíen de un ciclo a otro (**Figura 23, A-B**). Dicha variación de concentración en los carbohidratos móviles durante los dos ciclos de producción coincide con la tasa de crecimiento de los frutos (**Figura 13**), lo que permite indicar que la concentración de carbohidratos de está relacionada con la tasa de crecimiento del fruto. Así, durante las dos primeras fases de crecimiento, se observa que tanto la tasa de crecimiento de como la concentración de carbohidratos móviles para los frutos del primer ciclo son superiores con respecto a los frutos del segundo ciclo, mientras que, durante la tercera fase, correspondiente a la maduración, la tasa de crecimiento para los frutos del segundo ciclo de producción llega mayor, al igual que su concentración de carbohidratos móviles.

La diferencia en la tasa de crecimiento del fruto durante la tercera fase de crecimiento podría estar relacionada con el mecanismo interno que presentan los cítricos para ajustar el desarrollo del fruto de acuerdo con la disponibilidad de carbohidratos, descrito por Domingo *et al* [234]. Considerando que durante el segundo ciclo de producción el rendimiento de la cosecha fue tan solo del 0.18% comparado con un 1.26% del primer ciclo, la competencia entre frutos

por fotoasimilados es menor y por tanto, la planta tendría mayor disponibilidad de carbohidratos destinados al crecimiento del fruto. Por esta razón, se observa que los frutos del segundo ciclo de producción alcanzan más rápidamente el tamaño final para ser cosechados (**Figura 12**).

Adicionalmente, la diferencia en el tamaño final del fruto de un ciclo a otro, corrobora las relaciones establecidas por Goldschmidt y Monselisse [235], respecto a la relación inversa entre el tamaño individual del fruto y su número, y las observaciones de Agustí [236] con respecto a la relación inversa entre el tamaño del fruto también y el número de flores producido por el árbol.

Por otra parte, respecto a los carbohidratos de reserva, a diferencia del primer ciclo, no hay relación entre la concentración de almidón y la tasa de crecimiento del fruto. Esto podría explicarse teniendo en cuenta que durante el segundo ciclo el nivel de luz solar fue muy bajo, debido al fenómeno de la niña, lo cual disminuyó la actividad fotosintética del árbol. Por esta razón la planta debió acudir a sus reservas para mantener el flujo de carbohidratos necesarios para realizar el proceso de alargamiento celular en el fruto [237].

En cuanto a los árboles de baja carga, no se encontraron correlaciones entre la concentración de carbohidratos móviles y de reserva y la tasa de crecimiento. Teniendo en cuenta que todos los árboles escogidos para el experimento están ubicados en la misma región, lo cual garantiza las mismas condiciones ambientales y de cultivo, no es posible explicar el escaso crecimiento de sus frutos (**Figura 27**) utilizando un patrón de movilización de carbohidratos móviles de la planta. Adicionalmente, no se encontró reporte en la literatura patrones similares (**Figura 28**) para efectos de comparación.

4.2.2 Hojas viejas de brotes vegetativos

En las hojas viejas de brotes vegetativos, no se encontró ninguna correlación durante las tres fases de crecimiento, entre la tasa del crecimiento del fruto y la concentración de carbohidratos móviles y de reserva. Esto puede explicarse

debido a que las hojas de brotes vegetativos destinan los carbohidratos que sintetizan tanto al crecimiento reproductivo (Flores y frutos) como al crecimiento vegetativo de la planta (hojas, raíces, tallos). Aunque el crecimiento reproductivo tiene prioridad, algunas ocasiones la competencia por fotoasimilados entre las diversas partes de la planta, pueden retrasarlo dándole prioridad al crecimiento vegetativo [238].

A diferencia de las hojas viejas de brotes generativos, la concentración de carbohidratos móviles se mantuvo muy similar de un ciclo a otro, es decir, no hay diferencias significativas entre ciclos. Como habría de esperarse, durante el segundo ciclo de producción tampoco existe correlación entre la tasa de crecimiento del fruto y la concentración de carbohidratos en este tipo de brotes.

Por otra parte, sí se observan grandes variaciones en la concentración de almidón de un ciclo a otro. Mientras que durante el primer ciclo, las reservas aumentaron en la época previa a la maduración como preparación para la fase del desarrollo de las propiedades del fruto, durante el segundo ciclo la concentración de almidón aumenta y disminuye a lo largo del ciclo, posiblemente por las variaciones climatológicas propias de esa temporada, que obligan al árbol a acudir a sus reservas para mantener el nivel de carbohidratos móviles y suplir los requerimientos energéticos del fruto, mediante un mecanismo interno en la planta similar al planteado por Iglesias *et al* [239] para el ajuste de frutos de acuerdo con la disponibilidad de carbohidratos.

En cuanto a los árboles de baja carga, la concentración de carbohidratos móviles varía notablemente de un ciclo a otro, y las variaciones en concentraciones de carbohidratos son diferentes con respecto a los árboles de alta carga. Sin embargo, tanto los valores de concentración, como la dinámica de carbohidratos de reserva de un ciclo a otro, son muy similares con respecto a los árboles de alta carga, indicando que posiblemente la deficiencia de los árboles de baja carga está en la movilización de los carbohidratos hacia el fruto, dado la baja tasa de crecimiento que mostraron (**Figura 29**).

4.2.3 Hojas jóvenes

En las hojas jóvenes tanto de brotes generativos, como vegetativos, no hay correlación entre la tasa de crecimiento del fruto y los carbohidratos móviles y de reserva. Esta observación coincide con reportes de diversos autores relacionados con la necesidad de las hojas jóvenes de sintetizar y consumir carbohidratos para su crecimiento y desarrollo, sin permitir la movilización de carbohidratos hacia los frutos, lo que las convierte en competencia para el crecimiento y desarrollo de frutos [240].

De acuerdo con Moss *et al.* [241] en el proceso de desarrollo del fruto, las hojas jóvenes juegan un papel esencial como fuente de productos fotosintéticos, sobre todo carbohidratos. Sin embargo, durante un mes, aproximadamente, después de la antesis, actúan como órganos competidores de los frutos ya que mientras crecen actúan como sumidero y solo en su transición a hojas maduras actúan como fuente de carbohidratos.

Lo anteriormente expuesto coincide con lo observado en la especie *Citrus unshiu* por Mehouchi *et al* [242]. En esta especie se demostró que los frutos en desarrollo importan asimilados de hojas viejas y que las hojas jóvenes no exportan fotoasimilados hasta que su crecimiento se completa al inicio del periodo de elongación celular.

4.2.4 Frutos

La pauta de movilización de carbohidratos móviles en frutos de lima Tahití durante los dos ciclos de producción es semejante, y la concentración de hexosas coincide con el crecimiento del fruto (**Figuras 27 y 28**). En la fase de división de celular, durante la cual el fruto crece lentamente, la concentración de hexosas es baja, mientras que, durante la fase de alargamiento celular en la cual los frutos crecen rápidamente, la concentración de hexosas aumenta

gradualmente debido a que, entre otras razones, el fruto acumula carbohidratos en las vesículas [243].

Según Laskowki [244], el aumento en la concentración de hexosas en el fruto, indica una alta actividad metabólica favorecida por la continua hidrólisis de sacarosa, que se refleja en la disminución de este disacárido entre los días 42 – 70 (**Figura 28**).

Por último durante la fase de maduración la pauta en la concentración de hexosas varía entre un ciclo y otro. En el primer ciclo de producción durante esta fase la concentración de hexosas se mantiene casi constante, y los frutos crecen lentamente, mientras que durante el segundo ciclo la concentración de hexosa continua aumentando gradualmente, al igual que el tamaño del fruto, hasta alcanzar un tamaño superior promedio al tamaño de los frutos del primer ciclo (**Figura 30**). Esta observación, refuerza el planteamiento sobre la relación entre el crecimiento del fruto y la acumulación de carbohidratos solubles, realizado por numerosos autores para frutos cítricos [245 - 247].

En cuanto a la pauta de carbohidratos de reserva, ésta también contribuye al crecimiento del fruto y está relacionada con su capacidad de sumidero, de acuerdo con lo propuesto por algunos autores [248, 249]. Durante la fase de división del fruto (días 0 – 14), la acumulación de almidones baja debido a la escasa capacidad de sumidero del fruto y al elevado número de frutos que compiten por los carbohidratos de la planta. Una vez inicia la fase de alargamiento celular, al igual que su tamaño, su capacidad de sumidero aumenta, aunque persiste la competencia por carbohidratos. Por último, a medida que avanza la fase de maduración, el fruto acumula carbohidratos relacionados con propiedades organolépticas y la concentración de almidón alcanza su máximo (513 mg/100 g), gracias a la capacidad de sumidero desarrollada a lo largo de su crecimiento (**Figura 32**).

La variación en la concentración de almidón entre los frutos del primer y segundo ciclo confirman las observaciones realizadas por Agustí [250], en las que se establece que en cosechas de baja floración la capacidad de sumidero

es alta y el tamaño del fruto es adecuado. En el caso de la lima ácida Tahití, durante el segundo ciclo de producción el nivel de floración fue menor (**Tabla 10**), al igual que el número de frutos que llegaron a cosecha; por tanto hay mayor capacidad de sumidero reflejada en la acumulación de almidón durante todo el segundo ciclo, lo cual finalmente generó que los frutos de este ciclo alcanzaran un mayor tamaño.

Respecto a la capacidad de sumidero del fruto, cabe aclarar que depende mucho de la actividad hormonal y que el aumento de la capacidad de sumidero del fruto, aumenta la disponibilidad de carbohidratos, y no al contrario. Es decir, la mayor disponibilidad de carbohidratos no aumenta la capacidad de sumidero [251, 252].

Por otra parte, la pauta de movilización de carbohidratos para frutos de árboles de baja carga, difiere de la pauta observada en árboles de alta carga, y no corresponde a otra especie consultada en la literatura. Por esta razón, no es posible proponer alguna explicación sobre sus efectos sobre el crecimiento y desarrollo de los frutos de la lima ácida Tahití.

4.3 CONTENIDO DE CARBOHIDRATOS Y ABSCISIÓN DEL FRUTO

Los dos máximos de abscisión relativa (**Figura 30**) en árboles de alta carga observados durante los dos ciclos de producción (día 7 y 28) corresponden a las dos ondas de abscisión que se presentan para los frutos cítricos en general [253]. Cada una presenta diferentes características y está asociada a diferentes factores endógenos de la planta [254]. Estudios realizados al respecto demuestran que la primera abscisión se caracteriza por la caída de frutitos u ovarios durante la fase de división celular del fruto y está relacionada con factores hormonales del fruto [255 - 257]. En contraste, la segunda abscisión se caracteriza por la caída de frutos que ya han iniciado su crecimiento y se produce principalmente por factores nutricionales, especialmente por la disponibilidad o déficit de carbohidratos [256, 257].

En la presente investigación, la pauta de abscisión determinada presenta dos máximos de abscisión bien definidos, que coinciden con los resultados obtenidos por diversos autores para diferentes especies de cítricos [258 – 262].

En el primer ciclo de producción, la concentración de carbohidratos móviles en hojas viejas de brotes generativos, alcanza un valor alto (**Figura 29**), mientras las reservas de carbohidrato permanecen bajas (**Figura 30**), justo en el primer máximo de abscisión relativa (día 7). A su vez, en el fruto la concentración tanto de carbohidratos móviles como de reserva permanece en niveles muy bajos (**Figura 31**). Estas observaciones coinciden con los resultados obtenidos por Gomez-Cardenas *et al.* [263], quienes desarrollaron diferentes experimentos para modificar la relación fuente-sumidero, con los cuales lograron establecer que una concentración hormonal alta en los frutos, disminuye su capacidad de sumidero generando la abscisión de los frutitos, aunque haya disponibilidad de carbohidratos por parte de las hojas viejas de brotes generativas, principal fuente de carbohidratos en el desarrollo reproductivo de la planta.

El planteamiento anterior se aplica al segundo ciclo de producción, ya que la concentración de carbohidratos móviles y de reserva en frutos y hojas viejas de brotes generativos, no varió de forma significativa con respecto al primer ciclo de producción, en el primer máximo de abscisión. Sin embargo, ya que el porcentaje de abscisión relativa de un ciclo a otro paso de 4,01 a 6,74%, es posible inferir que las diferencias climáticas entre un ciclo a otro tengan efecto la abscisión de los fruto en el árbol. En este caso, el aumento de las precipitaciones, las bajas temperaturas y la baja luminosidad que caracterizaron el segundo ciclo de producción, pudieron contribuir al desprendimiento de frutos, y al retraso de las reacciones químicas que favorecen la permanencia del fruto en el árbol. Observaciones similares fueron descritas por Pérez y Jiménez [264] para el crecimiento y abscisión de la naranja “Valencia” (*Citrus sinensis* L. Osbeck.) durante dos años continuos de producción.

Por otra parte, el segundo máximo de abscisión relativa (día 28) durante el primer ciclo de producción, se caracterizó por la baja concentración de carbohidratos móviles y de reservas, en las hojas viejas de brotes generativos (**Figura 31**). Durante esta fase de alargamiento celular, el fruto demanda gran cantidad de carbohidratos, ya que su velocidad respiratoria decrece y comienza a acumular carbohidratos [265], por tanto, la planta acude a sus reservas y ajusta el número de frutos, mediante un mecanismo autoregulatorio mediante el cual solo permanecen los frutos cuya demanda la planta es capaz de suplir [266].

De manera similar, durante el segundo ciclo de producción la concentración de carbohidratos móviles y de reserva es baja, durante el segundo máximo de abscisión. Esta observación soporta la idea de que esta segunda onda de abscisión está relacionada con la disponibilidad de carbohidratos. Al igual que la primera abscisión, el porcentaje de abscisión relativa de un ciclo a otro aumenta de 3.31 a 5.36%, en una proporción similar a la primera abscisión, lo que sugiere que las condiciones climáticas afectan de igual modo a la planta de una abscisión a otra.

Otros pequeños máximos de abscisión relativa se observan durante la fase de alargamiento celular. Esta observación resulta razonable si se considera que durante toda esta fase la demanda de carbohidratos es bastante alta pues además de proporcionar energía para su desarrollo, los carbohidratos también se acumulan en el fruto, luego la abscisión continúa debido a que la planta ajusta el número de frutos a la disponibilidad de carbohidratos [267].

En contraste a lo ocurrido con los árboles de alta carga respecto a la curva de abscisión relativa, los árboles de baja carga durante los dos ciclos de producción mostraron los máximos de abscisión relativa finalizando la etapa de alargamiento celular, justo cuando todos los frutos se caen antes de poder ser cosechados. Este fenómeno puede estar asociado a la falta de nutrientes o la

presencia de alguna enfermedad, que a su vez podría explicar la baja carga en las cosechas [268].

En cuanto a la abscisión absoluta, se observa que para el segundo ciclo la abscisión fue más elevada respecto al primer ciclo (**Figura 28**). Teniendo en cuenta que la pauta y niveles de carbohidratos móviles no varió de un ciclo a otro, es posible suponer que la planta requiere una concentración umbral de carbohidratos, y para mantenerla recurre a las reservas de almidón [269]. Considerando que durante el segundo ciclo la luminosidad fue muy baja resulta obvio, que la actividad fotosintética se vio reducida y por ende la concentración de carbohidratos móviles. Entonces para alcanzar la concentración umbral de carbohidratos la planta hidroliza almidón lo que se refleja en la baja concentración observada en la fase de alargamiento celular (**Figura 29**). Aún así es posible que la planta no pueda suplir la demanda de carbohidratos y por tanto ajuste el número de frutos mediante un proceso de abscisión.

4.4 PARÁMETROS DE CALIDAD DE LOS FRUTOS COSECHADOS

Los resultados mostrados en la **Tabla 21** coinciden con las observaciones realizadas con diversos autores [270 - 272] respecto a los parámetros de calidad de los frutos, durante los dos ciclos de producción evaluados. A medida que el proceso de maduración avanza la concentración de ácidos disminuye, mientras aumenta la concentración de azúcares, por lo cual a medida que transcurre el periodo de maduración, el porcentaje de acidez disminuye, los sólidos solubles aumentan, y en consecuencia el índice de maduración también aumenta.

Los resultados obtenidos durante los dos ciclos de producción, son coherentes también con las curvas de crecimiento de los frutos, ya que estadísticamente se observa que para todas las categorías, los frutos del segundo ciclo alcanzan un índice de madurez más alto. Los frutos de este ciclo alcanzan un tamaño mayor en el mismo periodo de tiempo; esto podría deberse a que el exceso de precipitaciones que caracterizaron el segundo ciclo de producción, provocó que

el fruto asimilara mayor cantidad de agua, por lo cual aumenta su crecimiento y diluye más rápidamente los ácidos sintetizados y almacenados en el fruto. Esto ocasiona un aumento en el índice de madurez, pese a que tanto la concentración de sólidos solubles como los carbohidratos móviles (**Figura 31**) son menores en el segundo ciclo de producción.

5. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en el desarrollo de esta investigación se puede concluir:

- En cuanto a las metodologías de análisis por HPLC – RI de carbohidratos móviles en la muestras de hojas y frutos de lima ácida Tahití, es posible indicar que las dos metodologías implementadas pueden ser empleadas, ya que son repetibles, rápidas y son sensibles en los rangos de concentración de carbohidratos en el tipo de matrices evaluadas. Sin embargo, la metodología que incluyó la columna *Alltech 700CH*, solo empleó agua como fase móvil a un flujo de 0.5 mL/min y la fase estacionaria que la constituye es más versátil de acuerdo con lo reportado por la bibliografía [273], por tanto, para efectos prácticos resulta más útil y ofrece más ventajas su implementación que la metodología que emplea la columna *Zorbax Carbohydrates*.
- La metodología implementada para el análisis de almidón, por el método de Dubouis *et al.* cumplió con requisitos establecidos por la buenas prácticas de laboratorio, en términos de la figuras analíticas de mérito calculadas. Por tanto, puede afirmarse que los resultados obtenidos haciendo uso de ella son confiables y útiles en la determinación de la concentración de almidón en las muestras de hojas y frutos de la lima ácida Tahití.
- Se confirmó la relación directa entre el número de frutos cuajados y el tamaño final del fruto. Al igual que en otros cítricos, los frutos provenientes de árboles con menor número de frutos cuajados alcanzaron mayor tamaño de fruto al final de la cosecha. Esto se explica el porque a mayor número de frutos, mayor competencia por fotoasimilados, menor disponibilidad del árbol por carbohidratos destinados al crecimiento del fruto. Esto a su vez confirma la relación entre la disponibilidad de carbohidratos y el tamaño final del fruto, lo cual

se vio reflejado, en que los frutos del segundo ciclo de producción alcanzaran más rápidamente el tamaño final para ser cosechados.

- Se confirmó que el crecimiento del fruto de la lima ácida Tahití, está relacionado con la disponibilidad de carbohidratos de la planta. Esto puede afirmarse teniendo en cuenta que durante la fase de alargamiento celular, durante la cual el fruto adquiere la mayor parte de su tamaño, la tasa de crecimiento de los frutos del primer ciclo de producción fue más elevada, cuando se comparan con los frutos del segundo ciclo de producción. Lo cual coincidió con la baja concentración de almidón en las hojas viejas de brotes generativos, durante el segundo ciclo, respecto al primero.
- La abscisión de frutos durante el desarrollo productivo de la lima Tahití, presenta las características de la abscisión reconocidas en numerosas especies de cítricos. Así, durante un primer máximo de abscisión relativa que se presenta comúnmente en la fase de división celular, esta no guarda relación con la disponibilidad de carbohidratos, ya que ocurre pese a que los carbohidratos móviles se encuentran en altas concentraciones. Por otra parte, el segundo máximo de abscisión se presentó una vez iniciada la fase de alargamiento celular, la cual sí estuvo relacionada con la disponibilidad de carbohidratos; esto se pudo evidenciar ya que coincidió con una disminución en las reservas de almidón durante el primer ciclo, y fue aún más elevada durante el segundo ciclo de producción, cuando la concentración de almidón decayó aún más que durante el primer ciclo.
- Al igual que el común de los frutos cítricos, la curva de crecimiento del fruto de la lima ácida Tahití, también sigue una curva sigmoideal simple, que pudo ser descrita matemáticamente mediante el uso de análisis de regresión no lineal. El modelo matemático permitió confirmar las observaciones realizadas experimentalmente respecto al efecto de las diferencias climáticas sobre el crecimiento del fruto. Los modelos

matemáticos calculados para cada ciclo evidencian como los frutos del segundo ciclo presentan una mayor tasa de crecimiento durante la fase de maduración, lo cual les permitió alcanzar más rápidamente su tamaño final.

- En cuanto al efecto de las condiciones climatológicas sobre el rendimiento y calidad de las cosechas, además de tener efecto sobre el crecimiento y la abscisión del fruto como se manifestó anteriormente, también se observa que tiene un efecto significativo en las propiedades organolépticas del fruto.
- Los carbohidratos de reserva (almidón) en árboles de baja carga fueron muy similares durante los dos ciclos de producción.

6. RECOMENDACIONES

- Ante las evidencias de la influencia de la concentración de carbohidratos sobre el crecimiento, la abscisión, el nivel de floración y las propiedades organolépticas del fruto de la Lima ácida Tahití, se recomienda realizar estudios sobre la implementación de técnicas agronómicas como la defoliación y anillado de árboles, y el rayado y raleo de frutos, en la lima Tahití, relacionadas con la translocación y disponibilidad de carbohidratos durante el ciclo productivo, para corroborar las conclusiones obtenidas en el desarrollo de esta investigación.
- Ampliar el rango de evaluación de ciclos de producción para validar y confirmar los resultados obtenidos, especialmente en árboles de baja carga.
- Dada la relación reportada [274 - 276] entre las hormonas vegetales denominadas giberelinas, con los eventos fisiológicos de especies cítricas, se recomienda para posteriores investigaciones estudiar su efecto sobre el rendimiento y calidad de las cosechas de lima Tahití. Aunque en este trabajo se adelantó parte de dicha investigación, por decisión unilateral de CORPOICA, los resultados no fueron mostrados.
- Para la identificación de carbohidratos móviles por ESI-MS, se recomienda realizar reacciones de acomplejamiento selectivo o formación de aductos para mejorar la intensidad de las señales, y diferenciar diastereoisómeros de la D-glucosa y la D-fructosa.

BIBLIOGRAFÍA

1. LEBON, G.; DUCHÊNE, E.; BRUN, O.; MAGNÉ, C.; CLÉMENT, C.; Flower abscission and inflorescence carbohydrates in sensitive and non-sensitive cultivar of grapevine, *Sex Plant Reprod.*, **2004**, 17, pp. 71 – 79.
2. GOMEZ-CADENAS, A.; MEHOUACHI, J.; TADEO, F.; PRIMO-MILLO, E.; TALON, M.; Hormonal regulation of fruitlet abscission induced by carbohydrate shortage in citrus, *Planta*, **2000**, 210, pp. 633 – 643.
3. TORRES, J; GARCIA -LUIS, A; LASKOWSKI, L; Desarrollo del fruto de *Citrus sinensis* cv. Salustiana, *Bioagro*, **2006**, 18(1), pp. 15 – 23.
4. VASCONCELOS, R.; ALVES, F.; CARUSO, E.; Valencia' sweet orange tree flowering evaluation under field conditions, *Sci. Agric.*, **2008**, 65(4), pp.389-396.
5. AMASINO, R.; Control of flowering time in plants, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **1996**, 6(4), pp. 480 – 487.
6. BEAN, R.C.; Carbohydrate metabolism of *Citrus* fruits I. Mechanisms of sucrose synthesis in oranges and lemons, *Plant Physiol.*, **1960**, 35, pp. 429 – 434.
7. IGLESIAS, D; TADEO, F; PRIMO-MILLO, E; TALON, M; Fruit set dependence on carbohydrate availability in citrus trees; *Tree Physiol.*, **2003**, 23, pp. 199–204.
8. MEHOUACHI, J.; SERNAA, D.; ZARAGOZAA, S.; AGUSTIB, M. ; TALON, M.; PRIMO-MILLO, E.; Defoliation increases fruit abscission and reduces carbohydrate levels in developing fruits and woody tissues of Citrus unshiu, *Plant Sci.*, **1995**, 107, pp. 189 – 197.
9. EISSENSTAT, D.M.; DUNCAN, L.W.; Root growth and carbohydrate responses in bearing citrus trees following partial canopy removal, *Tree Physiol.*, **1992**, 10, pp. 245 – 257.
10. FAO STAT, Producción de frutas cítricas, [En línea]. 2010. [Citado Mayo 29 de 2012]. Disponible en Internet: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>
11. INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS ICONTEC. NTC-4087. Frutas Frescas. Lima Tahití. Especificaciones. Bogotá: ICONTEC, 2008.

12. CASTLE, W.S; GMITTER, F.G. Rootstock and scion selection. En: Citrus health management. 1era ed. University of Florida, APS Press, Florida, Estados Unidos, 1999. p. 21-35.
13. MORTON, J. Fruits of warm climates. [En línea]. 1987. [Citado Noviembre 15 de 2011]. Disponible en internet: http://www.hort.purdue.edu/newcrop/morton/tahiti_lime.html
14. ORDUZ, J.O. Estudios ecofisiológicos y caracterización morfológica y molecular de la mandarina Arrayana (*Citrus reticulata* Blanco) en el piedemonte llanero de Colombia. Tesis doctoral. Bogotá. Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, 2007, 130 p.
15. AGUSTI, M. Citricultura. 2da ed. Multi-prensa. 2003, Madrid, España. p. 60-62.
16. CYTED, Los recursos aromáticos vegetales en Latinoamérica, Editado por Arnaldo Bladoni, 1era ed, La Plata, Argentina. 2002, pp. 55-56.
17. FAOSTAT, Producción, Limas y limones. [En línea]. 2010. [Citado Enero 5 de 2012]. Disponible en internet: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>
18. Ministerio de Agricultura e Instituto Internacional de Cooperación para la Agricultura, 2005. Cadena de Cítricos. En: La competitividad de las cadenas agro productivas en Colombia. Análisis de su estructura y dinámica (1991-2004). Observatorio de Agro cadenas. Anuario 2004. Bogotá, Colombia. pp. 613-670.
19. FAOSTAT, Comercio, Limas y limones. [En línea]. 2010. [Citado Enero 5 de 2012]. Disponible en internet: <http://faostat.fao.org/site/535/DesktopDefault.aspx?PageID=535#ancor>
20. AGUSTI, M. Codificación BBCH de los estadios fenológicos del desarrollo de los agrios. [En línea]. 2003. [Citado Noviembre 20 de 2011]. Disponible en Internet: <http://www.ivia.es/sdta/pdf/fichas/citricultura/citricultura6.pdf>
21. COLETO, J.M; Crecimiento y desarrollo de las especies frutales. 2da ed. Acibia S.A. Madrid, España, 1994, pp. 123 – 130.

22. BAIN, J.M.; Morphological anatomical and physiological changes in the developing fruit of the Valencia orange *Citrus sinensis* L. Osbeck., *Aust. J. Bot.*, **1958**, 6, pp. 1 – 24.
23. GOREN, R.; MONSELISE, S.P.; Morphological features and changes in nitrogen content in developing shamouti orange fruits. *J. Agric. Res.*, **1964**, 14(2), pp. 562 – 564.
24. GUARDIOLA, J.L.; LÁZARO, E.; The effect of synthetic auxins on fruit growth and anatomical development in Satsuma mandarin, *Sci. Hortic.*, **1987**, 34, pp. 228 – 237.
25. PEREZ, M.; JIMENEZ, A.; Crecimiento y abscisión del fruto de naranja “valencia” (*Citrus sinensis* L. Osbeck) en un huerto del estado portuguesa, Venezuela, *Bioagro*, **2009**, 21(2), pp. 133 – 137.
26. AVANZA, M.; GIMÉNEZ, L.; MAZZA, S.; RODRIGUEZ, V.; Descripción del crecimiento de frutos de naranjo dulce mediante el uso de modelos no lineales, IX Reunión Científica del Grupo Argentino de Biometría, Octubre, 2004, La Rioja, Argentina.
27. AVANZA, M. M.; BRAMARDI, S. J.; MAZZA, S. M.; Statistical models to describe the fruit growth pattern in sweet orange ‘Valencia late’, *Spanish J. Agric. Res.*, **2008**, 6(4), pp. 577-585.
28. AKBAR, A.; PASHA, G.R.; ASLAM, M.; ARSLAM, A.; Statistical modeling for Citrus yield in Pakistan, *Eur. J. Sci. Res.*, **2009**, 31(1), pp. 52 – 58.
29. LADANIYA, M.S.; *Citrus Fruit – Biology, technology and evaluation*. 1era, ed. San Diego: Academic Press, Elsevier, 2008, pp. 193 – 195.
30. AZCÓN-BIETO J.; TALÓN M.; Fundamentos de Fisiología Vegetal. 3 era ed. Ed Mc Grawhill, Barcelona, España. 2000. pp. 430 – 432.
31. AVANZA, M. M.; BRAMARDI, S. J.; MAZZA, S. M.; Statistical models to describe the fruit growth pattern in sweet orange ‘Valencia late’, *Spanish J. Agric. Res.*, **2008**, 6(4), Op. cit., pp. 577-585.
32. AKBAR, A.; PASHA, G.R.; ASLAM, M.; ARSLAN, A.; Statistical modeling for Citrus Yield in Pakistan, *Eur. J. Sci. Res.*, **2009**, 31(1), Op. cit., pp. 52 – 58.
33. INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS ICONTEC. NTC 4087. Frutas Frescas. Lima Tahití. Especificaciones. Bogotá: ICONTEC, 2008. Op. cit.

34. ALVAREZ, A.; JORRAT, S.; GENTA, M.; Caracterización físico-química de jugo de limón de Tucumán, *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, **2005**, 34(2), pp. 49 – 56.
35. ALBERTINI, M.; CARCOUET, E.; PAILLY, O.; GAMBOTTI, C.; LURO, F.; BERTI, L.; Changes in Organic Acids and Sugars during Early Stages of Development of Acidic and Acidless Citrus Fruit, *J. Agric. Food. Chem.*, **2006**, 54(21), pp 8335–8339.
36. NORMA DEL CODEX PARA LA LIMA-LIMÓN. Codex Stan 213-1999. [En línea]. 1999. [Citado Noviembre 20 de 2011]. Disponible en internet: http://www.codexalimentarius.net/web/more_info.jsp?id_sta=339
37. MORÍN, C; Cultivo de cítricos. 2da ed.: Editorial Lica. Lima, Perú. 1980. P. 454 – 467.
38. PRIMO, E; Química de los alimentos. 2da ed. Editorial Síntesis. Zaragoza, España. 1997. P. 361 – 368.
39. BRÜCKNER, B; S. G. WILLIE; Fruit and vegetable Analysis: Recent advances and future prospects. 1era ed., Ed. Wood head publishing limited. Boca Ratón, Estados Unidos. 2008, pp. 12 – 13
40. PALTRINIERI, G. Procesamiento de frutas y hortalizas mediante métodos artesanales y de pequeña escala. Oficina regional de la oficina regional de la organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación para América latina y el Caribe. [En línea]. 1993.[Citado Diciembre 5 de 2011]. Disponible en internet: [http://www.fao.org/docrep/x5062s/x5062S09.htm#La calidad.](http://www.fao.org/docrep/x5062s/x5062S09.htm#La%20calidad)
41. KLUGE, R. *et al.* Intermittent warming of ‘Tahiti’ lime to prevent chilling injury during cold storage. *Scientia agricola. (Piracicaba, Braz.)* [En línea]. 2003, 60(4). P. 729-734. Disponible en internet : <http://www.scielo.br/pdf/sa/v60n4/a18v60n4.pdf>
42. NORMA DEL CODEX PARA LA LIMA-LIMÓN. Codex Stan 213-1999. [En línea]. 1999. [Citado Noviembre 20 de 2011]. Disponible en internet: http://www.codexalimentarius.net/web/more_info.jsp?id_sta=339
43. INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS ICONTEC. NTC-4087. Frutas Frescas. Lima Tahití. Especificaciones. Bogotá: ICONTEC, 2008. Op. cit.

44. LEOPOLD, A.C.; KRIEDMAN, P.E.; Plant growth and development, 2da ed. Mc-Graw Hill Book Company, New York, Estados Unidos, 1975, 78p.
45. AGUSTÍ, M.; GARCIA – MARI, F.; GUARDIOLA, J.L.; The influence of flowering intensity on the shedding of reproductiv structures in sweet orange, *Sci. Hort.*, **1982**, 17, pp. 343 – 352.
46. AGUSTÍ, M. Cuajado y desarrollo de los frutos cítricos. 1era ed. Generalitat Valenciana. Valencia, España. 25p.
47. GOLDSCHMIDT, E.E.; MONSELISE, S.P.; Physiological assumptions toward the development of a citrus fruiting model. *Proc. Int. Soc. Citriculture*, **1977**, 2, pp. 669 – 672.
48. TAIZ, L.; ZEIGER, E.; Fisiología vegetal, 2 da ed, Universitat Jaume, Cataluña, España, 2002, 681 p.
49. DUARTE, A.M.; GUARDIOLA, J.L.; Flowering and fruit set on fortune hybrid mandarin: effect of girdling and growth regulators, *Proc. Int. Soc. Citriculture*, **1996**, 1, pp 1069 – 1071.
50. GOLDSCHMIDT, E.E.; Carbohydrate supply as a critical factor for citrus fruit development and productivity, *Hortscience*, **1999**, 34, pp. 1020 – 1024.
51. IGLESIAS, D.J.; TADEO, F.R.; PRIMO-MILLO, E.; Carbohydrate and ethylene levels related to fruitlet drop through abscission zone A in citrus. *Trees*, **2006**, 20, pp. 348 – 355.
52. RUIZ, R.; GARCIA – LUIS, A.; MOERRI, C.; GUARDIOLA, J.L.; Carbohydrate availability in relation to fruitlet abscission in citrus, *Ann. Bot.*, **2001**, 87, pp. 805 – 812.
53. MEHOUACHI, J.; SERNAA, D.; ZARAGOZAA, S.; AGUSTIB, M. ; TALON, M.; PRIMO-MILLO, E.; Defoliation increases fruit abscission and reduces carbohydrate level in developing fruits and woody tissues of citrus unshiu, *Plant Sci.*, **1995**, 107, Op. cit., pp. 189 – 197.
54. AGUSTÍ, M. Cuajado y desarrollo de los frutos cítricos. 1era ed. Generalitat Valenciana. Valencia, España. Op. cit., p. 23 – 68.
55. IGLESIAS, D; TADEO, F; PRIMO-MILLO, E; TALON, M; Fruit set dependence on carbohydrate availability in citrus trees; *Tree Physiol.*, **2003**, 23, Op. cit., pp. 199–204.

-
56. AMASINO, R.; Control of flowering time in plants, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **1996**, 6(4), Op. cit., pp. 480 – 487.
57. AGUSTI, M.; TALON, M.; Delay of early fruitlet abscission by branch girdling in citrus coincides with previous increases in carbohydrate and gibberellin concentrations, *J. Plant Growth Regul.*, **2009**, 58, pp. 15–23.
58. AGUSTI, M. Citricultura. 2da ed. Multi-prensa. 2003, Madrid, España. Op. cit., 157p.
59. SOLER, J.; SOLER, G.; Cítricos: variedades y técnicas de cultivo. Multi-prensa libros S.A, Madrid, España, 2006, pp. 211 – 213.
60. AMOROS, M.; Producción de Agrios, 3era ed. Mundi-prensa México S.A, 2003, México D.F., México, 175 p.
61. CAMPBELL, C. W.; Rootstocks for the “Tahiti” lime. *Proc. Florida State Hort. Soc.*, **1991**, 104, pp. 28 – 30.
62. CANTUARIAS, T.; SANCHES, E.; GERALDO, A.; RODAS, R.; Fruit quality of ‘Tahiti’ lime (*Citrus latifolia* Tanaka) grafted on twelve different rootstocks, *Rev. Bras. Frutic.*, **2009**, 31(2), pp. 454-460.
63. SINCLAIR, W.B.; The biochemistry and physiology of the lemon and other citrus fruits. Agriculture & Natural Resources, Universidad de California. California, Estados Unidos, 1984, pp. 156 – 158.
64. LADANIYA, M.S.; Citrus Fruit – Biology, technology and evaluation. 1era, ed. San Diego: Academic Press, Elsevier, 2008. Op. cit., pp. 97 – 98.
65. TUBIELLO, F.N.; ROSENZWEIG, C.; GOLDBERG, R.A.; JAGTAP, S.; JONES, J.W.; Effects of climate change on US crop production: simulation results using two different GCM scenarios. Part I: Wheat, potato, maize, and citrus *Climate Research*, **2002**, 20, pp. 259–270.
66. GAT, Z.; ERNER, Y.; GOLDSCHMIDT, E.E.; The effect of temperature on the citrus crop. WMO, Geneva. Geneva, Switzerland. **1997**, p. 198.
67. REUTHER, W.; Climate and fruit quality, Citrus Flowering & Fruiting Short Course, [En línea], 1967, [Citado Noviembre 15 de 2011]. Disponible en internet: http://irrec.ifas.ufl.edu/flcitrus/short_course_and_workshop/04_09_1997.shtml

-
68. SOUTHWICK, S.; DAVENPORT, T.; Characterization of water stress and low temperature effects on flower induction in citrus, *Plant Physiol.*, **1986**, 81, pp. 26-29.
69. DAVES, F. S.; An overview of climatic effects on citrus flowering and fruit quality in various parts of the world, Citrus Flowering & Fruiting Short Course, [En línea], 2011, [Citado Noviembre 15 de 2011]. Disponible: internet:http://irrec.ifas.ufl.edu/flcitrus/pdfs/short_course_and_workshop/citrus_flowering_97/Davies-Overview_of_Climatic_Effects.pdf
70. TAIZ, L.; ZEIGER, E.; Fisiología vegetal, ed, Universitat Jaume, Cataluña, España, 2 da ed. 2002, Op. cit., pp. 125 – 131.
71. CAREY, F.; Química orgánica. 3era ed. McGraw Hill. Aravaca, España, 1996, 914p.
72. LIRA, R.H.; Fisiología vegetal. 3ra ed. Trillas S.A., México D.F, México, 2000, 134p.
73. SALISBURY, F.; Fisiología de las plantas, Paraninfo, Madrid, España, 2006, 205p.
74. JAMES, W.O.; Introducción a la fisiología vegetal. 1era ed. Omega, Barcelona, España, 1967, 97p.
75. IGLESIAS, D.; Physiology of citrus fruiting, *Bras. J. Plant Physiol.*, **2007**, 19(4), pp. 333-362.
76. GARCÍA-LUIS A., DIDEHVAR F., GUARDIOLA J. L.; BAKER D. A.; The transport of sugars in developing fruits of Satsuma mandarin. *Ann. Bot.*, **1991**, 68, pp. 349 – 357.
77. DUARTE, A.M.; GUARDIOLA, J.L.; Flowering and fruit set on Fortune hybrid mandarin: Effect of girdling and growth regulators. *Proc. Int. Soc. Citriculture*, **1996**, 1, Op. cit., pp. 1069-1071
78. GÓMEZ-CADENAS A.; MEHOUACHI J.; TADEO F.R.; PRIMO-MILLO E, TALÓN M. 2000. Hormonal regulation of fruitlet abscission induced by carbohydrate shortage in Citrus. *Planta*, **1984**, 210, Op. cit., pp. 636 – 643.
79. GOLDSCHMIDT E. E.; GOLOMB A.; The carbohydrate balance of alternative bearing Citrus trees and the significance of reserves for flowering and fruiting. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, **1982**. 107, pp. 206 – 208.

-
80. GARCÍA-LUIS, A., FORNÉS F; GUARDIOLA, J.L.; Leaf carbohydrates and flower formation in Citrus, *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, **1995**, 120(2), pp. 222-227.
81. GUARDIOLA J. L.; GARCÍA-LUIS, A.; Increasing fruit size in Citrus. Thinning and stimulation of fruit growth, *Plant Growth Regul.*, **2000**, 31, pp. 121-132.
82. GOLDSCHMIDT, E.E.; Carbohydrate supply as a critical factor for Citrus fruit development and productivity, *Hortic. Sci.*, **1999**, 34, Op. cit., pp. 1020-1024.
83. RUIZ, R.; GARCÍA-LUIS, A.; MONERRI, C.; GUARDIOLA, J.L.; Carbohydrate Analyzing in relation to fruitlet abscission in citrus. *Ann. Bot.*, **2001**, 87, Op. cit., pp. 805-812.
84. RUIZ, R. GUARDIOLA J.L.; Carbohydrate and mineral nutrition of orange fruitlets in relation to growth and abscission, *Physiol. Plant.*, **1994**, 90, pp. 27-36.
85. RUIZ, R.; GUARDIOLA, J.L.; Carbohydrate and mineral nutrition of orange fruitlets in relation to growth and abscission. *Physiol. Plant.*, **1994**, 90, Op. cit., pp. 27-36.
86. MEHOUACHI J, SERNA D, ZARAGOZA S, AGUSTÍ M, TALON M, PRIMO-MILLO E. Defoliation increases fruit abscission and reduces carbohydrate levels in developing fruits and woody tissues of Citrus unshiu, *Plant Sci.*, **1995**, 107, Op. cit., pp. 189-197.
87. IGLESIAS DJ, TADEO FR, PRIMO-MILLO, E; Fruit set dependence on carbohydrate availability in citrus trees, *Tree Physiol.*, **2003**, 23, Op. cit., pp. 199-204.
88. DOWNTON W, GRANT W, LOVEYS B. Carbon dioxide enrichment increases yield of Valencia orange, *J. Plant Physiol.*, **1987**, 14, pp 493 – 501.
89. SANZ, A.; MONERRI, C.; GONZALEZ-FERRER, J.; GUARDIOLA, J.L.; Changes in carbohydrates and mineral elements in citrus leaves during flowering and fruit set. *Physiol. Plant.*, **1987**, 69, pp. 93-98.

-
90. GUARDIOLA J.L.; GARCÍA-MARI, F.; AGUSTÍ, M.; Competition and fruit set in the Washington navel orange. *Physiol. Plant.*, **1984**, 62, pp. 297-302.
91. GARCÍA-LUIS, A.; OLIVEIRA, M. E.; BORDÓN, Y.; SIQUIERA, D.L.; TOMINAGA, S.; GUARDIOLA J. L.; Dry matter accumulation in Citrus fruit is not limited by transport capacity of the pedicel, *Ann. Bot.*, **2002**, 90, pp. 755-764.
92. GONZALEZ-SICILIA E. Anatomical physiological and hormonal aspects of abscission in Citrus, *Hortic. Rev.*, **1993**, 15, pp. 145-232.
93. GARCÍA-LUIS A.; DIDEHVAR F.; GUARDIOLA J.L.; BAKER D.A.; The transport of sugars in developing fruits of Satsuma mandarin. *Ann. Bot.*, **1991**, 68, Op. cit., pp. 349 – 357.
94. GUARDIOLA, J.L.; Regulation of flowering and fruit development: Endogenous factors and exogenous manipulation. *Proc. Int. Soc. Citriculture*, **2000**, 9, pp. 342-346.
95. GOLDSCHMIDT, E.E; MONSELISE, S.P; Physiological assumptions toward the development of a citrus fruiting model. *Proc. Int. Soc. Citriculture*, **1977**, 2, Op. cit., pp. 668-672.
96. SHUANG, H.; NING, T.; HUAN-XIN, J.; LIN-TONG, Y.; YAN, LI.; LI-SONG, C.; CO₂ assimilation, photosystem II photochemistry, carbohydrate metabolism and antioxidant system of citrus leaves in response to boron stress, *Plant Sci.*, **2009**, 176, pp. 143–153.
97. GUARDIOLA, J.L.; Factors limiting productivity in Citrus. A physiological approach. *Proc. Int. Soc. Citriculture*, **1988**, 2, pp. 381-394.
98. GOLDSCHMIDT, E.E.; GOLOMB, A.; The carbohydrate balance of alternative bearing Citrus trees and the significance of reserves for flowering and fruiting. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, **1982**, 107, Op. cit., pp. 206 – 208.
99. JONES, W.; EMBLETON. T. Soils, soil management, and craver crops. In: The Citrus Industry, *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, **1973**, 3, pp. 98-100.
100. GARCÍA-LUIS, A.; FORNÉS, F.; SANZ A, GUARDIOLA, J.L.; The regulation of flowering and fruit set in Citrus: Relationship with carbohydrate levels. *J. Bot.*, **1988**, 37, pp. 189-201.

101. GOLDSCHMIDT, E.E.; GOLOMB, A.; The carbohydrate balance of alternative bearing Citrus trees and the significance of reserves for flowering and fruiting. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, **1982**, 107, Op. cit., pp. 206 – 208.
102. GARCÍA-LUIS A., DIDEHVAR F., GUARDIOLA J. L.; BAKER D. A.; The transport of sugars in developing fruits of Satsuma mandarin. *Ann. Bot.*, **1991**, 68, Op. cit., pp. 349 – 357.
103. BAR, Y.; APELBAUM, A.; KAFKAFI, U.; GOREN,R.; Ethylene association with chloride stress in citrus plants, *Sci. Hortic.*, **1998**, 73(2-3), pp. 99-109.
104. MEHOUACHI, J.; SERNA, D.; ZARAGOZA, S.; AGUSTÍ, M.; TALON, M.; PRIMO-MILLO, E.; Defoliation increases fruit abscission and reduces carbohydrate levels in developing fruits and woody tissues of Citrus unshiu, *Plant Sci.*, **1995**, 107, Op. cit., pp. 189-197.
105. AGUSTI, M.; ZARAGOZA, S.; IGLESIAS, D.J.; ALMELA, V.; PRIMO-MILLO, E.; The synthetic auxin 3,5,6-TPA stimulates carbohydrate accumulation and growth in citrus fruit. *Plant Growth Regul.*, **2002**, 36(2), pp. 141-147.
106. RUIZ, R.; GUARDIOLA, J.L.; Carbohydrate and mineral nutrition of orange fruitlets in relation to growth and abscission. *Physiol. Plant.*, **1994**, 90, Op. cit., pp. 27-36.
107. DUARTE, A.M.; GUARDIOLA, J.L.; Flowering and fruit set on Fortune hybrid mandarin: Effect of girdling and growth regulators. *Proc. Int. Soc. Citriculture*, **1996**, 1, Op. cit., pp. 1069-1071.
108. IGLESIAS, D.J.; TADEO, F.R.; PRIMO-MILLO, E.; Carbohydrate and ethylene levels related to fruitlet drop through abscission zone A in citrus. *Trees*, **2006**, 20, Op. cit., pp. 348 – 355.
109. GLEGG, R.E.; EIDINGER, D.; Hydrolysis of Polysaccharides by a Cation Exchange Resin and Identification of Monosaccharide Components by Paper Chromatography, *Anal. Chem.*, **1954**, 26(8), pp. 1365 – 1367.

-
110. KOIVULA, N.; HÄNNINEN, K.; Concentrations of monosaccharides in humic substances in the early stages of humification, *Chemosphere*, **2001**, 44, pp. 271 – 279.
111. CORNELIA, R.; MARIE-FRANCE, D.; Gas chromatographic analysis of monosaccharides in a forest soil profile: Analysis by gas chromatography after trifluoroacetic acid hydrolysis and reduction–acetylation, *Soil Biol. Biochem.*, **2006**, 38, pp. 1478–1481.
112. MICHAEL, Q.; GEOFFREY, H.; ENGLYS, H.; Determination of resistant short-chain carbohydrates (non-digestible oligosaccharides) using gas – liquid chromatography, *Food Chem.*, **1999**, 65, pp. 381- 390.
113. RUIZ-CALERO, V.; PUIGNOU, L.; GALCERAN, M.T.; Analysis of glycosaminoglycan monosaccharides by capillary electrophoresis using indirect laser-induced fluorescence detection, *J. Chromatogr. A.*, **2000**, 873, pp. 269–282.
114. RUIZ-CALERO, V.; PUIGNOU, L.; GALCERAN, M.T.; Determination of glycosaminoglycan monosaccharides by capillary electrophoresis using laser-induced fluorescence detection, *J. Chromatogr. B.*, **2003**, 791, pp. 193–202.
115. TRETHERWEY, J.A.; ROLSTON, M.P.; Carbohydrate dynamics during reproductive growth and seed yield limits in perennial ryegrass Field, *Field Crops Res.*, **2009**, 112, pp. 182–188.
116. GAUCHER, C.; GOUGEON, S.; MAUFFETTE, Y.; MESSIER, C.; Seasonal variation in biomass and carbohydrate partitioning of understorey sugar maple (*Acer saccharum*) and yellow birch (*Betula alleghaniensis*) seedlings. *Tree Physiol.*, **2010**, 25, pp. 93–100.
117. RAESSLER, M.; Sample preparation and current applications of liquid chromatography for the determination of non-structural carbohydrates in plants, *Trends Anal. Chem.*, **2011**, 30(11), pp. 1833-1843.
118. RAESSLER, M.; WISSUWA, B.; BREUL, A.; UNGER, W.; GRIMM, T.; Determination of water-extractable nonstructural carbohydrates, including inulin, in grass samples with high-performance

- anion exchange chromatography and pulsed amperometric detection. *J. Agric. Food Chem.*, **2008**, 56, pp. 7649 – 7654.
- 119.** LEE, Y.C.; Carbohydrate analyses with high-performance anion-exchange chromatography, *J. Chromatogr. A*, **1996**, 720, pp. 137-149.
- 120.** WISSUWA, B.; BREUL, A.; UNGER, W.; GRIMM, T.; Chromatographic analysis of major non-structural carbohydrates in several wood species – an analytical approach for higher accuracy of data, *Anal. Meth.*, **2010**, 2, pp. 532–538.
- 121.** ANDERSEN, R.; SØRENSEN, A.; Separation and determination of alditols and sugars by high-pH anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection, *J. Chromatogr. A.*, **2009**, 897(1), pp. 195-204.
- 122.** ZOOK, C.; LACOURSE, W.; Pulsed Amperometric Detection of Carbohydrates in Fruit Juices Following High Performance Anion Exchange Chromatography, *Curr. Sep.*, **1995**, 14(2), pp. 48 – 52.
- 123.** FEINBERG, M.; SAN-REDON, J.; ASSIÉ, A.; Determination of complex polysaccharides by HPAE-PAD in foods: Validation using accuracy profile. *J. Chromatogr. B*, **2009**, 877(23), pp. 2388-2395.
- 124.** GLYAD, V. M.; Determination of Monosaccharides, Disaccharides, and Oligosaccharides in the Same Plant Sample by High-Performance Liquid Chromatography, *Russian J. Plant Physiol.* , **2002**, 49(2), pp. 277–282.
- 125.** JANSSEN, H.; SWINDELLS, C.; GUNNING, P.; WANG, W.; GRÜN, W.; MAHABIR, K.; MAHARAJ, V.; APPS, P.; Quantification of appetite suppressing steroid glycosides from *Hoodia gordonii* in dried plant material, purified extracts and food products using HPLC-UV and HPLC-MS methods. *Anal. Chim. Acta*, **2008**, 617(1–2), pp. 200-207.
- 126.** WEI, Y.; DING, M.; Analysis of carbohydrates in drinks by high-performance liquid chromatography with a dynamically modified amino column and evaporative light scattering detection, *J. Chromatogr. A*, **2000**, 904, pp. 113–117.

-
- 127.** YUAN, J.; CHEN, F.; Simultaneous separation and determination of sugars, ascorbic acid and furanic compounds by HPLC dual detection, *Food Chem.*, **1999**, 64(3), pp. 423-427.
- 128.** VÉRETTE, E.; QUIAN, F.; MANGANI, F.; On-line dialysis with high-performance liquid chromatography for the automated preparation and analysis of sugars and organic acids in foods and beverages, *J. Chromatogr. A*, **1995**, 705(2), pp. 195-203.
- 129.** CALULL, M.; LÓPEZ, E.; MARCÉ, R.M.; OLUCHA, J.C.; BORRULL, F.M.; Optimization of an ion-exchange high-performance liquid chromatographic method for the determination of carboxylic acids, sugars, glycerol and ethanol in wines, *J. Chromatogr. A*, **1992**, 589(1), pp. 151-158.
- 130.** CALULL, M.; MARCÉ, R.M.; BORRULL, F.; Determination of carboxylic acids, sugars, glycerol and ethanol in wine and grape must by ion-exchange high-performance liquid chromatography with refractive index detection, *J. Chromatogr. A*, **1992**, 590(2), pp. 215-222.
- 131.** SZPUNAR, J.; PELLERIN, P.; MAKAROV, A.; DOCO, T.; WILLIAMS, P.; LOBIŃSKI, R.; Speciation of metal-carbohydrate complexes in fruit and vegetable samples by size-exclusion HPLC-ICP-MS, *J. Anal. At. Spectrom.*, **1999**, 14, pp. 639-644.
- 132.** OVALLE, R.; SOLL, C.; LIM, F.; FLANAGAN, C.; ROTUNDA, T.; LIPKE, P.; Systematic analysis of oxidative degradation of polysaccharides using PAGE and HPLC-MS, *Carbohydr. Res.*, **2001**, 330(1), pp. 131-139.
- 133.** CABÁLKOVA, J.; WAHLUND, K.; CHMELÍK, J.; Complex analytical approach to characterization of the influence of carbon dioxide concentration on carbohydrate composition in Norway spruce needles, *J. Chromatogr. A*, **2007**, 1148(2), pp. 189-199.
- 134.** MAHOUACHI, J.; IGLESIAS, D.; AGUSTÍ, M.; TALON, M.; Delay of early fruitlet abscission by branch girdling in citrus coincides with previous increases in carbohydrate and gibberellin concentrations, *Plant Growth Regul.*, **2009**, 58, Op. cit., pp. 15-23.

-
- 135.** FERREIRA, I.; GOMES, A.; FERREIRA, M.; Determination of sugars, and some other compounds in infant formulae, follow-up milks and human milk by HPLC- RI, *Carbohydr. Polym.*, **1998**, 37, pp. 225–229.
- 136.** WEI, Y.; DING, M.; Analysis of carbohydrates in drinks by high-performance liquid chromatography with a dynamically modified amino column and refraction index detection, *J. Chromatogr. A*, **2000**, 904(1), Op. cit., pp. 113-117
- 137.** KAKITA, S.; KAMISHIMAA, H.; KATOB, Y.; Simultaneous analysis of monosaccharides and oligosaccharides by high-performance liquid chromatography with postcolumn fluorescence derivatization, *J. Chromatogr. A*, **2002**, 961, pp. 77–82.
- 138.** BHANDARI, P.; KUMAR, N.; SINGH, B.; KAUL, V.; Simultaneous determination of sugars and picrosides in *Picrorhiza* species using ultrasonic extraction and high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection, *J. Chromatogr. A*, **2008**, 1194(2), pp. 257-261.
- 139.** DOWNES, K.; TERRY, L.; A new acetonitrile-free mobile phase method for LC–ELSD quantification of fructooligosaccharides in onion (*Allium cepa* L.), *Talanta*, **2010**, 82(1), pp. 118-124.
- 140.** WANG, S.; YANG, F.; FENG, K.; LI, D.; ZHAO, J.; LI, S.; Simultaneous determination of nucleosides, myriocin, and carbohydrates in *Cordyceps* by HPLC coupled with diode array detection and evaporative light scattering detection. *J. Sep. Sci.*, **2009**, 32(23), pp. 4069–4076.
- 141.** WEI, Y.; DING, M.; Analysis of carbohydrates in drinks by high-performance liquid chromatography with a dynamically modified amino column and evaporative light scattering detection. *J. Chromatogr. A*, 2011, 904(1), Op. cit., pp. 113-117.
- 142.** RONKART, S.; BLECKER, C.; FOURMANOIR, H.; FOUGNIES, C.; DEROANNE, C.; VAN HERCK, J.; PAQUOT, M.; Isolation and identification of inulooligosaccharides resulting from inulin hydrolysis, *Anal. Chim. Acta.*, 2007, 604(1), pp. 81-87.

-
143. MASLEN, S.; GOUBET, F.; ADAM, A.; DUPREE, P.; STEPHENS, E.; Structure elucidation of arabinoxylan isomers by normal phase HPLC–MALDI-TOF/TOF-MS/MS, *Carbohydr. Res.*, **2007**, 342(5), pp. 724-735.
144. LV, Y.; YANG, X.; ZHAO, Y.; RUAN, Y.; YANG, Y.; WANG, Z.; Separation and quantification of component monosaccharides of the tea polysaccharides from *Gynostemma pentaphyllum* by HPLC with indirect UV detection, *Food Chem.*, **2009**, 112, pp. 742–746.
145. BLANCO, D.; MURO, D.; MANGAS, J.; Determination of monosaccharides in cider by reversed-phase liquid chromatography, *Anal. Chim. Acta*, **2001**, 436, pp. 173–180.
146. MOMENBEIK, F.; KHORASANI, J.; Separation and determination of sugars by reversed-phase high-performance liquid chromatography after pre-column microwave-assisted derivatization, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2006**, 384, pp. 844–850.
147. KAKITA, H.; KAMISHIMA, H.; KOMIYA, K.; KATO, Y.; Simultaneous analysis of monosaccharides and oligosaccharides by high-performance liquid chromatography with postcolumn fluorescence derivatization, *J. Chromatogr. A*, **2002**, 961(1), Op. cit., pp. 77-82.
148. PALLA, G.; C18 Reversed-Phase Liquid Chromatographic Determination of invert sugar, sucrose, and raffinose, *Anal. Chem.*, **1981**, 53, pp.1966-1967.
149. KANIE, Y.; ENOMOTO, A.; GOTO, S.; KANIE, O.; Comparative RP-HPLC for rapid identification of glycopeptides and application in off-line LC-MALDI-MS analysis, *Carbohydr. Res.*, **2008**, 343(4), pp. 758-768.
150. IKEGAMI, T.; HORI, K.; SAAD, N.; HOSOYA, K.; FIEHN, O.; TANAKA, N.; Highly efficient analysis of underivatized carbohydrates using monolithic-silica-based capillary hydrophilic interaction (HILIC) HPLC, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2008**, 391(7), pp. 2533 – 2542.
151. KIMBALL, B.; ARJO, W.; JOHNSTON, J.; Single-Point Calibration with a Non-linear Detector: Carbohydrate analysis of conifer needles by hydrophobic interaction chromatography – evaporative light – scattering

- detection (HIC-ELSD). *J. Liq. Chromatogr. Related. Technol.*, **2004**, 27(12), pp. 1835 -1848.
- 152.** ICHIMURA, K.; SUTO, K.; Effects of the time of sucrose treatment on vase life, soluble carbohydrate concentrations and ethylene production in cut sweet pea flowers, *Plant Growth Regul.*, **1999**, 28, pp. 117–122.
- 153.** KARLSSON, G.; WINGE, S.; SANDBERG, H.; Separation of monosaccharides by hydrophilic interaction chromatography with evaporative light scattering detection, *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1092, pp. 246–249.
- 154.** MARTÍNEZ, C.; RODRÍGUEZ, M.C.; GUILLÉN, D.A.; BARROSO, C.G.; Analysis of Low Molecular Weight carbohydrates in Food and Beverages, *Chromatographia*, **2004**, 59, pp. 15 – 29.
- 155.** DUBOIS M, GILES K, HAMILTON JK, REBES PA, SMITH F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem.*, **1956**, 28, pp. 350-356.
- 156.** DENG, S.P.; TABATABAI, M.A.; Colorimetric determination of reducing sugars in soils, *Soil Biol. Biochem.*, **1994**, 26(4), pp. 473-477.
- 157.** ABBOTT, T.; NELSEN, T.; KLEIMAN, R.; Seed surface gums content using the Dubois carbohydrate analysis, *Ind. Crops Prod.*, **1995**, 4(3), Op. cit., pp. 185-192.
- 158.** MICHEL MONSIGNY, CLAIRE PETIT, ANNIE-CLAUDE ROCHE, Colorimetric determination of neutral sugars by a resorcinol sulfuric acid micromethod, *Anal. Biochem.*, **1988**, 175(2), pp. 525-530.
- 159.** HOSOMI, T.; MIZOGUCHI, T.; MORII, K.; Methods for enzymatic and colorimetric determinations of D-erythrulose (D-tetrolulose). *Analytical Biochemistry*, **1985**, 151(1), pp 188-191.
- 160.** CHI, L.; MUÑOZ, E.; SEOK, H.; WAN HA, Y.; SHIK KIM, Y.; TOIDA, T.; LINHARDT, R.; Preparation and structural determination of large oligosaccharides derived from acharan sulfate, *Carbohydr. Res.*, **2006**, 341(7), pp. 864-869.
- 161.** NIELSEN, S; Food Analysis. Ed. Springer. New York, Estados Unidos. 4ta ed. 2010. pp. 152 – 153.

-
- 162.** MIKKELSEN, S; CORTON, E; Spectroscopic methods for matrix characterization in bioanalytical chemistry, Ed. John Willey & Sons, Inc. New Jersey, Estados Unidos, 2004. Pp. 11 – 12.
- 163.** FOURNIER, E; Colorimetric Quantification of Carbohydrates. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, Ed. John Willey & Sons, Inc. New Jersey, Estados Unidos.2001. E1.1.2.
- 164.** XI, X; WEI, X; WANG, Y; CHU, Q; XIAO, J; Determination of tea polysaccharides in *Camellia sinensis* by a modified phenol-sulfuric acid method, *Archives Biol. Sci.*, **2010**, 62(2), pp. 671 – 678.
- 165.** LEE, J; SHIM, J.S; LEE, J.S; KIM, J.K; YANG, I.S; CHUNG, M; KIM, K.H; Inhibition of pathogenic bacterial adhesion by acidic polysaccharide from green tea (*Camellia sinensis*), *J. Agric. Food. Chem.*, **2006**, 54, pp. 8717-8723.
- 166.** CHOW, P.; LANDHÄUSSER, S.; A method for routine measurements of total sugar and starch content in woody plant tissues, *Tree Physiol.* , **2004**, 24, pp. 1129 –1136.
- 167.** MECOZZI, M; Estimation of total carbohydrate amount in environmental samples by the phenol–sulphuric acid method assisted by multivariate calibration. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, **2005**, 79, pp. 84 – 90.
- 168.** CUESTA, G; SUAREZ, N; BESSIO, M; FERREIRA, F; MASSALDI, H; Quantitative determination of pneumococcal capsular polysaccharide serotype 14 using a modification of phenol–sulfuric acid method, *J. Microbiol. Meth.*,**2003**, 52, pp. 69– 73.
- 169.** MANGALIKA, H.A.; TAKIGAWA, S.; MATSUURA-ENDO, C.; YAMAUCHI, H.; NODA, T.; Comparative analysis of starch properties of different root and tuber crops of Sri Lanka, *Food. Chem.*, **2009**, 112(1), pp. 98-103.
- 170.** FAITHFULL, N.T.; Acid hydrolysis prior to automatic analysis for starch, *J. Sci. Food. Agric.*, **1990**, 50(3),pp. 419–421.
- 171.** WROLSTA, R.E.; Food Carbohydrate Chemistry, 1era ed. Wiley, 2012, Blackwell. Iowa, Estados Unidos, pp. 95 – 96.

-
- 172.** INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS ICONTEC. NTC 4087. Frutas Frescas. Lima Tahití. Especificaciones. Bogotá: ICONTEC, 2008, Op. cit.
- 173.** MANRIQUE, I.I.; Factores eco fisiológicos que determinan la calidad y el rendimiento de la lima ácida Tahití en Colombia, Informe 4, CORPOICA, 2009, pp. 1 – 5.
- 174.** LOZANO, R.; Cambio climático – Fenómenos “el Niño – la Niña”. Memorias del Seminario Internacional de Medio ambiente y desarrollo Sostenible, Bucaramanga, Colombia. 2011.
- 175.** INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY (IUPAC). Nomenclature in Evaluation of Analytical Methods including detection a quantification capabilities – IUPAC recommendations 1995, *Pure Appl. Chem.*, 1995, 67(10), pp.1699-1723.
- 176.** CURIE, L.; Detection and quantification limits: origins and historical overview. *Anal. Chim. Acta*, **1999**, 391, pp. 121 – 134.
- 177.** DUBOIS M, GILES K, HAMILTON JK, REBES PA, SMITH F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem.*, **1956**, 28, Op. cit., pp. 350-356.
- 178.** FAITHFULL, N.; Acid hydrolysis prior to automatic analysis for starch, *J. Sci. Food. Agric.*, **1990**, 50(3), Op. cit., pp. 419–421.
- 179.** WROLSTA, R.E.; Food Carbohydrate Chemistry, 1era ed. Wiley, 2012, Blackwell. Iowa, Estados Unidos. Op. cit., pp. 95 – 96.
- 180.** TRETHERWEY J.A.; ROLSTON, M.P.; Carbohydrate dynamics during reproductive growth and seed yield limits in perennial ryegrass, *Field Crops Res.*, **2009**, 112, Op. cit., pp. 182–188.
- 181.** DEJONG, T.M.; WALTON, E.F.; Carbohydrate requirements of peach fruit growth and respiration, *Tree Physiol.*, **1989**, 5, pp. 329-335.
- 182.** ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC), Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals, [En línea], 2009, [Citado el 20 de enero de 2012] Disponible en internet: http://www.aoac.org/Official_Methods/slv_guidelines.pdf

-
- 183.** INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS ICONTEC. NTC 4087. Frutas Frescas. Lima Tahití. Especificaciones. Bogotá: ICONTEC, 2008, Op. cit.
- 184.** AKBAR, A.; PASHA, M.; ARSLAN, W.; Statistical Modeling for Citrus Yield in Pakistan, *Eur. J. Sci. Res.*, **2009**, 31(1), Op. cit., pp. 52-58.
- 185.** AGUSTI, M. Citricultura. 2da ed. Multi-prensa. Madrid, España. Op. cit., 2003, p. 89-93.
- 186.** TAIZ, L.; ZEIGER, E.; Fisiología Vegetal, ed, Universitat Jaume, Cataluña, España, 2 da ed. 2002, Op. cit., pp. 221 –224.
- 187.** AGUSTÍ, M. Cuajado y desarrollo de los frutos cítricos. 1era ed. Generalitat Valenciana. Valencia, España. Op. cit., 2005, pp. 23 – 68.
- 188.** SINGH, S.; RAJAM, M.; Citrus biotechnology: Achievements, limitations and future directions. *Physiol. Mol. Biol. Plants*, **2009**, 15(1), pp. 3 -22.
- 189.** ROBYT, J.; Essentials of carbohydrate chemistry. Ed. Springer. Boston, Estados Unidos. 1997. 345 p.
- 190.** QUATTROCCHI, O.; ABELAIRA, S.; LABA, F.; Introducción a la HPLC, aplicación y práctica. Ed. Artes Gráficas Farro S.A., Buenos Aires, Argentina. **1992**. p. 145 – 146.
- 191.** BELLO, J.; Ciencia bromatológica: Principios generales de los alimentos. Ed. Díaz Santos S.A. Madrid, España. 2000. 86p.
- 192.** HARADA, A.; YONEYAMA, S.; DOI, S.; AOYAMA, M.; Changes in contents of free amino acids and soluble carbohydrates during fruit-body development of *Hypsizygus marmoreus*. *Food Chem.*, **2003**, 83(3), pp. 343-347.
- 193.** SEVCIK, R.; MOWERY, R.; BECKER, C.; CHAMBLISS, K.; Rapid analysis of carbohydrates in aqueous extracts and hydrolysates of biomass using a carbonate-modified anion-exchange column. *J. Chromatogr. A*, **2011**, 1218, pp.1236 –1243.
- 194.** WÜRTH, M.; PELAÉZ-RIEDL, R.; WRIGHT, J.; KÖRNER, R.; Non-structural carbohydrate pools in a tropical forest, *Ecologia*, **2005**, 143, pp.11–24.

-
- 195.** GOLDSCHMIDT, E.; Carbohydrate supply as a critical factor for citrus fruit development and productivity, *Hortscience*, **1999**, 34(6), Op. cit., pp. 1020 – 1024.
- 196.** IGLESIAS, D.; Carbohydrate depletion in roots and leaves of salt-stressed potted, *Citrus clementina* L., *Plant Growth Regul.*, **2005**, 46, pp.153–160.
- 197.** MESEJO, C.; MARTINEZ – FUENTES, A.; AGUSTÍ, M.; Citrus fruit quality, physiological basis and techniques of improvement. *Agrociencia*, **2002**, 6(2), pp. 1 – 16.
- 198.** GUARDIOLA, J.L.; GARCÍA-LUIS, A.; Increasing fruit size in Citrus. Thinning and stimulation of fruit growth, *Plant Growth Regul.*, **2000**, 31, Op. cit., pp.121–132.
- 199.** QUATTROCCHI, O.; ABELAIRA, S.; LABA, F.; Introducción a la HPLC, aplicación y práctica. Ed. Artes Gráficas Farro S.A., Buenos Aires, Argentina. 1992. Op. cit., 206 p.
- 200.** SOGORB, M.A.; VILANOVA, E.; Técnicas analíticas de contaminantes químicos. Ed. Díaz Santos S.A. Madrid, España, 2004, 177 p.
- 201.** MECOZZI, M.; Estimation of total carbohydrate amount in environmental samples by the phenol–sulphuric acid method assisted by multivariate calibration, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 2005, 79, Op. cit., pp.84 – 90.
- 202.** SAHA, A.; BREWER, C.; Determination of the concentrations of oligosaccharides, complex type carbohydrates, and glycoproteins using the phenol-sulfuric acid method. *Carbohydr. Res.*, **2004**, 254, pp. 157 – 167.
- 203.** KELEBEK, H.; Sugars, organic acids, phenolic compositions and antioxidant activity of Grapefruit (*Citrus paradisi*) cultivars grown in Turkey. *Ind. Crop. Prod.*, **2010**, 32(3), pp. 269-274.
- 204.** GOLDSCHMIDT, E.; Carbohydrate supply as a critical factor for citrus fruit development and productivity, *Hortsci.*, **1999**, 34(6), Op. cit., pp. 1020 – 1024.

-
205. IGLESIAS, D.; Carbohydrate depletion in roots and leaves of salt-stressed potted, *Citrus clementina* L., *Plant Growth Regul.*, **2005**, 46, Op. cit., pp.153–160.
206. MESEJO, C.; MARTINEZ – FUENTES, A.; AGUSTÍ, M.; Citrus fruit quality, physiological basis and techniques of improvement. *Agrociencia*, **2002**, 6(2), Op. cit., pp. 1 – 16.
207. GUARDIOLA, J.L.; GARCÍA-LUIS, A.; Increasing fruit size in Citrus. Thinning and stimulation of fruit growth, *Plant Growth Regul.*, **2000**, 31, Op. cit., pp.121–132.
208. TRETHERWEY J.A.; ROLSTON, M.P.; Carbohydrate dynamics during reproductive growth and seed yield limits in perennial ryegrass, *Field Crops Res.*, **2009**, 112, Op. cit., pp.182–188.
209. DEJONG, T.M.; WALTON, E.F.; Carbohydrate requirements of peach fruit growth and respiration, *Tree Physiol.*, **1989**, 5, Op. cit., pp. 329-335.
210. RAESSLER, M.; Sample preparation and current applications of liquid chromatography for the determination of non-structural carbohydrates in plants, *Trends Anal. Chem.*, **2011**, 30(11), Op. cit., pp.1833 – 1843.
211. MONTOYA, G.; RENDÓN, A.; ARANGO, G.; Identificación y diferenciación de monosacáridos y disacáridos diastereoméricos no derivatizados por ESI-IT-MS/MS, *Vitae*, **2010**, 17(1), pp. 37-44.
212. MULRONEY B, TRAEGER J, STONE B. Determination of both linkage position and anomeric configuration in underivatized glucopyranosyl disaccharides by electrospray mass spectrometry. *J Mass Spectrom*, **1995**, 30(9), pp. 1277-1283.
213. MADHUSUDANAN, K. P.; Tandem mass spectra of ammonium adducts of monosaccharides: Differentiation of diastereomers, *J. Mass Spectrom.*, **2006**, 41, pp. 1096–1104.
214. ZHU, J.; COLE, R.B.; Ranking of Gas-Phase Acidities and Chloride Affinities of Monosaccharides and Linkage Specificity in Collision-Induced Decompositions of Negative Ion Electrospray-

- Generated Chloride Adducts of Oligosaccharides. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2001**, 12, pp. 1193–1204.
- 215.** INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS ICONTEC. NTC 4087. Frutas Frescas. Lima Tahití. Especificaciones. Bogotá: ICONTEC, 2008, Op. cit.
- 216.** GOLDSCHMIDT, E.E.; GOLOMB, A.; The carbohydrate balance of alternative bearing Citrus trees and the significance of reserves for flowering and fruiting. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, **1982**, 107, Op. cit., pp 206 – 208.
- 217.** GOLDSCHMIDT, E.E.; ASCHKENAZI, N.; HERZANO, Y.; SCHAFFER, A.A.; MONSELISE, S.P.; A role for carbohydrate levels in the control of flowering in citrus. *Sci. Hortic.*, **2003**, 26(2), pp. 159 – 166.
- 218.** AGUSTI, M.; Fruticultura, 1era ed. Mundi Prensa Libros S.A., Madrid, España, 2004, 128p.
- 219.** SPIEGEL-ROY, P.; GOLDSCHMIDT, E.E. Biology of Citrus, Cambridge University Press, London, Inglaterra, 1996, 230p.
- 220.** ALMEIDA, A.F.; Acumulación y movilización de carbohidratos durante el cuajado del fruto en el naranjo dulce salustiana (*Citrus sinensis* (L) Osbeck. 2002, Universidad Politécnica de Valencia, España, 169 p.
- 221.** MARTINEZ – FLOREZ, A.; MESEJO, C.; ALMELA, J.M.; AGUSTI, M.; Restrictions on the exogenous control of flowering in citrus. *Acta Hortic.*, **2004**, 632, Op. cit., pp 91 – 98.
- 222.** AGUSTÍ, M. Cuajado y desarrollo de los frutos cítricos. 1era ed. Generalitat Valenciana. Valencia, España. Op. cit., 2003, 25p.
- 223.** DEIDDAD, P.; AGABBIO, M.; Some factors influencing flowering and fruit – set of clementine mandarin. *Studi Sassaressi*, **1980**, 23(3), pp. 3 -14.
- 224.** HALL, A.E.; KHAIRI, M.M.A.; ASBELL, C.W.; Air and soil temperature effects on flowering of citrus, *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, **1977**, 102, pp. 261 – 263.
- 225.** DELGADO, G.; CASTILLO, A.M.; AVITIA, E.; ARRIAGA, M.; Contenido de carbohidratos en hojas e inflorescencias de tres cultivares de aguacate. Universidad Autónoma de Chapingo, 1997, Citado [Mayo

- 31 de 2012]. Disponible en internet: www.avocadosource.com/Journal/CICTAMEX/CICTAMEX_1997/eda_1_97.pdf.
- 226.** Universidad Politecnica de Valencia, Tema 13: Transporte en el floema, [En línea], 2012, [Consultado el 27 de mayo de 2012]. Disponible en internet: www.etsmre.upv.es/varios/biología/Temas/tema_13.htm
- 227.** MOSS, G.I.; STEER, B.T.; KRIEDEMANN, P.E.; The regulatory role of inflorescence leaves in fruit-setting by sweet orange (*Citrus sinensis*). *Physiol. plant.*, **1972**, 27, pp.432 - 438.
- 228.** GUARDIOLA, J.L.; GARCIA-LUIS, A.; Increasing fruit size in Citrus. Thinning and stimulation of fruit growth. *Plant Growth Regul.* **2000**, 31, Op. cit., pp. 121 - 132.
- 229.** KOCH, K.E. Translocation of photosynthetic products from source leaves to aligned juice segments in citrus fruits. *Hortscience*. 1984. 19. pp. 260 - 261.
- 230.** ERICKSON, L.C.; The general physiology of citrus, the citrus industry, 2001, vol 2, University of California, Oakland, Estados Unidos, pp 86 – 95.
- 231.** AZCÓN-BIETO J.; TALÓN M.; Fundamentos de Fisiología Vegetal. 3era ed, Ed Mc Grawhill, Barcelona, España.. 2000. Op. cit., pp. 426 – 430.
- 232.** GOLDSCHIMDT, E.; GOLOMB, A.; The carbohydrate balance of alternate bearing citrus trees and the significance of reserves for flowering and fruiting. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, **1982**, 107, pp. 206 – 208.
- 233.** SIMTH, G.S.; CLARK, C.J.; BOLDINGH, H.L.; Seasonal accumulation of starch by components of the kiwifruit vine. *Annals of Botanical*, **1992**, pp. 19 – 25.
- 234.** IGLESIAS, D.; TADEO, F.; PRIMO-MILLO, E.; TALON, M.; Carbohydrate and ethylene levels related to fruitlet drop through abscission zone A in citrus. *Trees*, **2006**, 20, Op. cit., pp. 348–355.
- 235.** GOLDSCHMIDT E.E.; MONSELISSE, S.P.; Physiological assumptions toward the development of citrus fruiting model. *Pro. Int. Soc. Citriculture*, **1977**, 2, Op. cit., pp. 668 – 672.

236. AGUSTI, M. Citricultura. 2da ed. Multi-prensa. Madrid, España. Op. cit., 2003, 107 p.
237. MATAA, M.; TOMINAGA, S.; KOZAKI, I.; Seasonal changes of Carbohydrates constituensts in Pokan (*Citrus reticulata* Blanco). *J. Soc. Hortic. Sci*, **1996**, 65(3), 99. 513 – 523.
238. DELGADO, G.; CASTILLO, A.M.; AVITIA, E.; ARRIAGA, M.; Contenido de carbohidratos en hojas e inflorescencias de tres cultivares de aguacate. Universidad Autónoma de Chapingo, 1997, Citado [Mayo 31 de 2012]. Disponible en internet: www.avocadosource.com/Journal/CICTAMEX/CICTAMEX_1997/eda_1_97.pdf.
239. IGLESIAS, D.; TADEO, F.; PRIMO-MILLO, E.; TALON, M.; Carbohydrate and ethylene levels related to fruitlet drop through abscission zone A in citrus. *Trees*, **2006**, 20, Op. cit., pp. 348–355.
240. Universidad Politécnica de Valencia, Tema 13: Transporte en el floema, [En línea], 2012, [Consultado el 27 de mayo de 2012]. Disponible en internet: www.etsmre.upv.es/varios/biología/Temas/tema_13.htm
241. MOSS, G.I.; STEER, B.T.; KRIEDEMANN, P.E.; The regulatory role of inflorescence leaves in fruit-setting by sweet orange (*Citrus sinensis*). *Physiol. Plant*, **1972**, Op. cit., pp. 432 – 438.
242. MEHOUACHI", J.; SERNA, D.; ZARAGOZAA, S.; AGUSTIB, M. ; TALON, M.; PRIMO-MILLO, E.; Defoliation increases fruit abscission and reduces carbohydrate levels in developing fruits and woody tissues of citrus unshiu, *Plant Sci.*, **1995**, 107, Op. cit., pp. 189 – 197.
243. KOCH, K.E. Translocation of photosynthetic products from source leaves to aligned juice segments in citrus fruits. *Hortscience*. **1984**. 19. Op. cit., pp. 260 - 261.
244. LASKOWSKI, L. Determinación de carbohidratos solubles en pedicelo y fruto de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck durante el crecimiento inicial, *Interciencia*, **2010**, 35(5), pp. 388 – 392.
245. BORRAS, R.; TADEO, J.L.; PRIMO – MILLO, E.; Seasonal carbohydrate changes in two sweet orange varieties of the navel group. *Sci. Hortic.*, **1984**, 24, pp. 143 – 149.

246. GARCIA – LUIS, A.; DIDEHVAR, F.; GUARDIOLA, J.L, BAKER, D.; The transport of sugars in developing fruits of satsuma mandarin. *Ann. Bot.*, **1991**, 68, Op. cit., pp. 349 – 357.
247. GARCIA – LUIS, A.; OLIVEIRA M.E.; BORDON, Y.; SIQUIERA, D.L.; TOMINAGA, S.; GUARDIOLA, J.L.; Dry matter accumulation in Citrus fruits is not limited by transport capacity of the pedicel. *Ann. Bot.*, **2002**, 90, pp 775 – 764.
248. GUARDIOLA, J.L.; GARCIA – LUIS, A.; Increasing fruit size in Citrus. Thinning and stimulation of growth. *Plant Growth Regul.*, **2000**, 31, pp. 121 – 132.
249. GUARDIOLA, J.L.; LÁZARO, E.; The effect of synthetic auxins on fruit growth and anatomical development in Satsuma mandarin. *Sci. Hort. Cultural.* **1987**. 34. Op. cit., pp. 228 – 237.
250. AGUSTÍ, M. Cuajado y desarrollo de los frutos cítricos. 1era ed. Generalitat Valenciana. 2003, Valencia, España. Op. cit., 13p.
251. EL - OTMANI, M.; COGGINS, C.W.; AGUSTÍ M.; LOVATT, C.L.; Plant Growth Regulators in Citriculture: World Current Uses. *Critical Rev. Plant Sci.*, **2000**, 19, pp. 395-447.
252. EL- OTMANI M, LOVATT CL, COGGINS C W JR, Y AGUSTÍ M. Plant Growth Regulators in Citriculture: Factors Regulating Endogenous Levels in Citrus Tissues. *Crit. Rev. Plant Sci.*, **1995**, 15(5), pp. 367-412.
253. LADANIYA, M.S.; *Citrus Fruit – Biology, technology and evaluation*. 1era, ed. San Diego: Academic Press, Elsevier, 2008. Op. cit., pp. 193 – 195.
254. BAIN, J.M.; Morphological, anatomical and physiological changes in the developing fruit of the Valencia orange, *Citrus sinensis* (L) Osbeck. *Aust. J. Bot.*, **1958**, 6, pp. 1 – 24.
255. SINCLAIR, W.B.; The biochemistry and physiology of the lemon and other Citrus Fruits, University of California Press, Oakland, Estados Unidos, Op. cit., 1984, 129p.
256. TALON, M.; ZACARÍAS, L.; PRIMO-MILLO, E.; Hormonal changes associated with fruit set and development in mandarins differing in their parthenocarpic ability. *Physiol. Plant*, **1990**, 79, pp. 400 – 406

257. TALON, M.; ZACARÍAS, L.; PRIMO-MILLO, E.; Gibberellins and parthenocarpic ability in developing ovaries of seedless mandarins. *Plant Physiol.*, **1992**, 99, 1575 – 1581.
258. GOMEZ-CADENAS, A.; MEHOUACHI, J.; TADEO, F.; PRIMO-MILLO, E.; TALON, M.; Hormonal regulation of fruitlet abscission induced by carbohydrate shortage in citrus, *Planta*, **2000**, 210, Op. cit., pp. 636 – 643.
259. PÉREZ, M.; JIMÉNEZ, A.; Crecimiento y abscisión del fruto de naranja “valencia” (*Citrus sinensis* L. Osbeck) en un huerto del estado portuguesa, Venezuela. *Bioagro*, **2009**. 21(2), Op. cit., pp. 133 – 137.
260. BAIN, J.M.; Morphological, anatomical and physiological changes in the developing fruit of the Valencia orange, *Citrus sinensis* (L) Osbeck. *Aust. J. Bot.*, **1958**, 6, Op. cit., pp. 1 – 24.
261. MOSS, G.I.; STEER, B.T., KRIEDEMANN, P.E.; The regulatory role of inflorescence leaves in fruit-setting by sweet orange (*Citrus sinensis*). *Physiol. Plant.*, **1972**, 27, Op. cit., pp.432-438.
262. MEHOUACHI, J.; SERNAA, D.; ZARAGOZAA, S.; AGUSTIB, M. ; TALON, M.; PRIMO-MILLO, E.; Defoliation increases fruit abscission and reduces carbohydrate level in developing fruits and woody tissues of *citrus unshiu*, *Plant Sci.*, **1995**, 107, Op. cit., pp. 189 – 197.
263. GOMEZ-CADENAS, A.; MEHOUACHI, J.; TADEO, F.; PRIMO-MILLO, E.; TALON, M.; Hormonal regulation of fruitlet abscission induced by carbohydrates shortage in citrus, *Planta*, **2000**, 210, Op. cit., pp. 636 – 643.
264. PEREZ, M.; JIMENEZ, A.; Crecimiento y abscisión del fruto de naranja “valencia” (*Citrus sinensis* L. Osbeck) en un huerto del estado portuguesa, Venezuela. *Bioagro*, **2009**. 21(2), Op. cit., pp. 133 – 137.
265. AGUSTI, M. Citricultura. 2da ed. Multi-prensa. Madrid, España. 2003, Op. cit., 114p.
266. RUIZ, R.; GARCÍA-LUIS, A.; MONERRI, C.; GUARDIOLA, J. L.; Carbohydrate Availability in Relation to Fruitlet Abscission in Citrus. *Ann. Bot.*, **2001**, 87, Op. cit., pp. 805 – 812.

-
- 267.** IGLESIAS, D.; TADEO, F.; PRIMO-MILLO, E.; TALON, M.; Carbohydrate and ethylene levels related to fruitlet drop through abscission zone A in citrus. *Trees*, 2006, 20, Op. cit., 348–355.
- 268.** RIVERO, J.M.; La enfermedad de la caída de la fruta en cítricos. *Bol. San. Veg. Plagas*, **1990**, 16, pp. 723 – 731.
- 269.** GOLDSCHMIDT, E.; Basic and practical aspects of citrus trees. Carbohydrate economy, The Hebrew University of Jerusalem, Rehovot, Israel, **1998**, pp. 62-72.
- 270.** BAIN, J.M.; Morphological, anatomical and physiological changes in the developing fruit of the Valencia orange, *Citrus sinensis* (L) Osbeck. *Aust. J. Bot.*, **1958**, 6, Op. cit., pp. 1 – 24.
- 271.** ERICKSON, L.C.; The general physiology of citrus, The citrus industry, vol 2. 1era ed. Universidad de California, Oakland, California, Op. cit., pp. 86 – 91.
- 272.** LADANIYA, M.S.; *Citrus Fruit – Biology, technology and evaluation*. 1era, ed. San Diego: Academic Press, Elsevier, 2008. Op. cit., 201p.
- 273.** LEE, Y.C.; Carbohydrate analyses with high-performance anion-exchange chromatography, *J. Chromatogr. A*, **1996**, 720, Op. cit., pp. 137-149.
- 274.** IQBAL, N.; NAZAR, R.; M. KHAN, I.; MASOOD, K.; KHAN, N.; Role of gibberellins in regulation of source–sink relations under optimal and limiting environmental conditions. *Cur. sci.*, **2001**, 100 (7), p. 998 – 1007.
- 275.** KOZŁOWSKA, M., RYBUS-ZAJĄC, M., STACHOWIAK, J., JANOWSKA, B., Changes in carbohydrate contents of *Zantedeschia* leaves under gibberellin-stimulated flowering. *Acta Physiol. Plant*, **2007**, 29, 27–32.
- 276.** COGGINS, C.; EL-OTMANI, M.; Growth regulator effects on retention of quality of stored citrus fruits , *Scientia Horticulturae*, **1991**, 45(3,4), pp. 261-272.

ANEXOS

ANEXO 1. RESIDUALES PRODUCTO DEL ANÁLISIS DE REGRESIÓN NO LINEAL APLICADO A LAS CURVAS DE CRECIMIENTO DE LA LIMA ÁCIDA TAHITÍ.

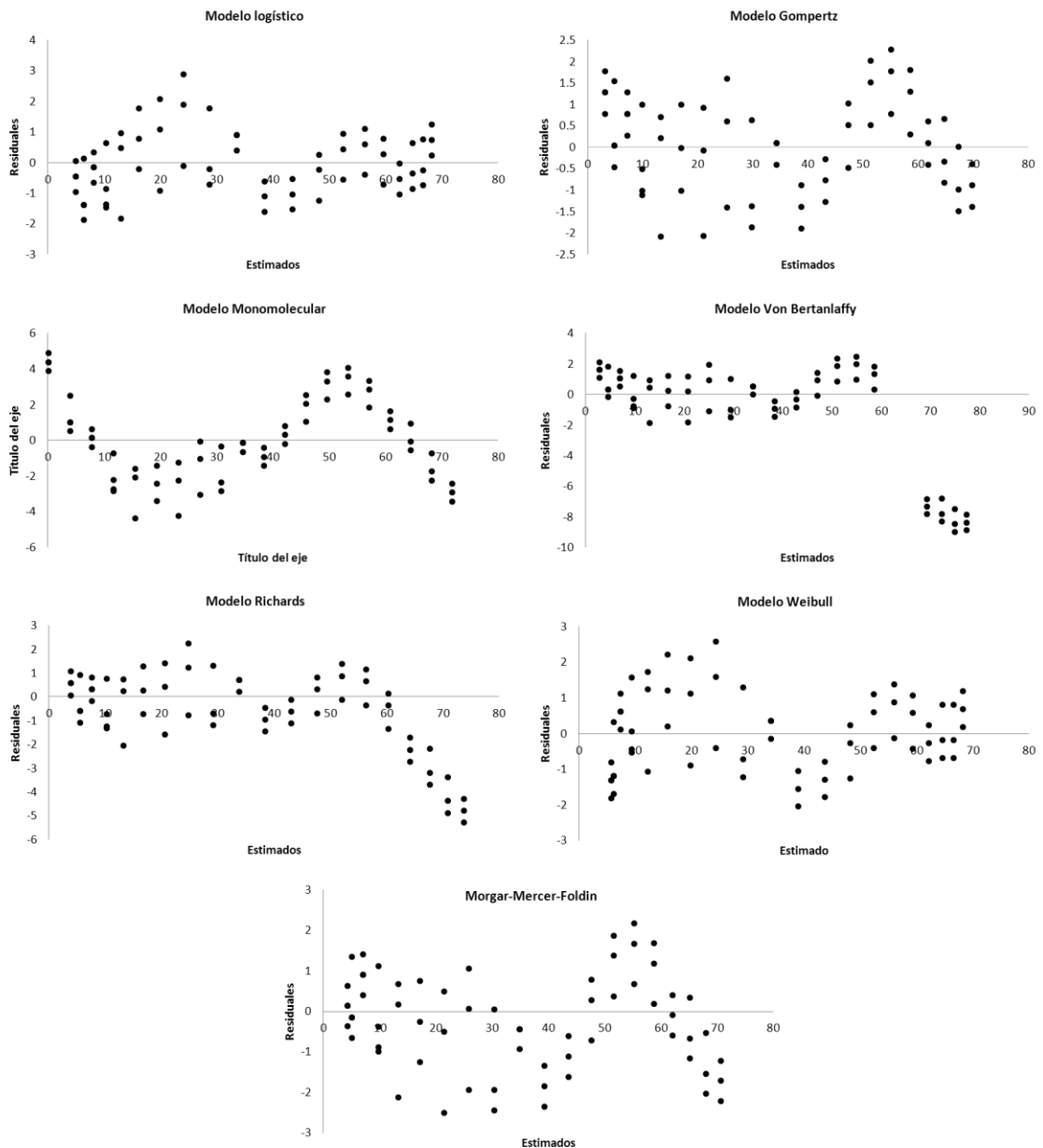


Figura 1. Residuales de los análisis de regresión no lineal aplicado a las curvas de crecimiento de la lima ácida Tahití, durante el primer ciclo de producción.

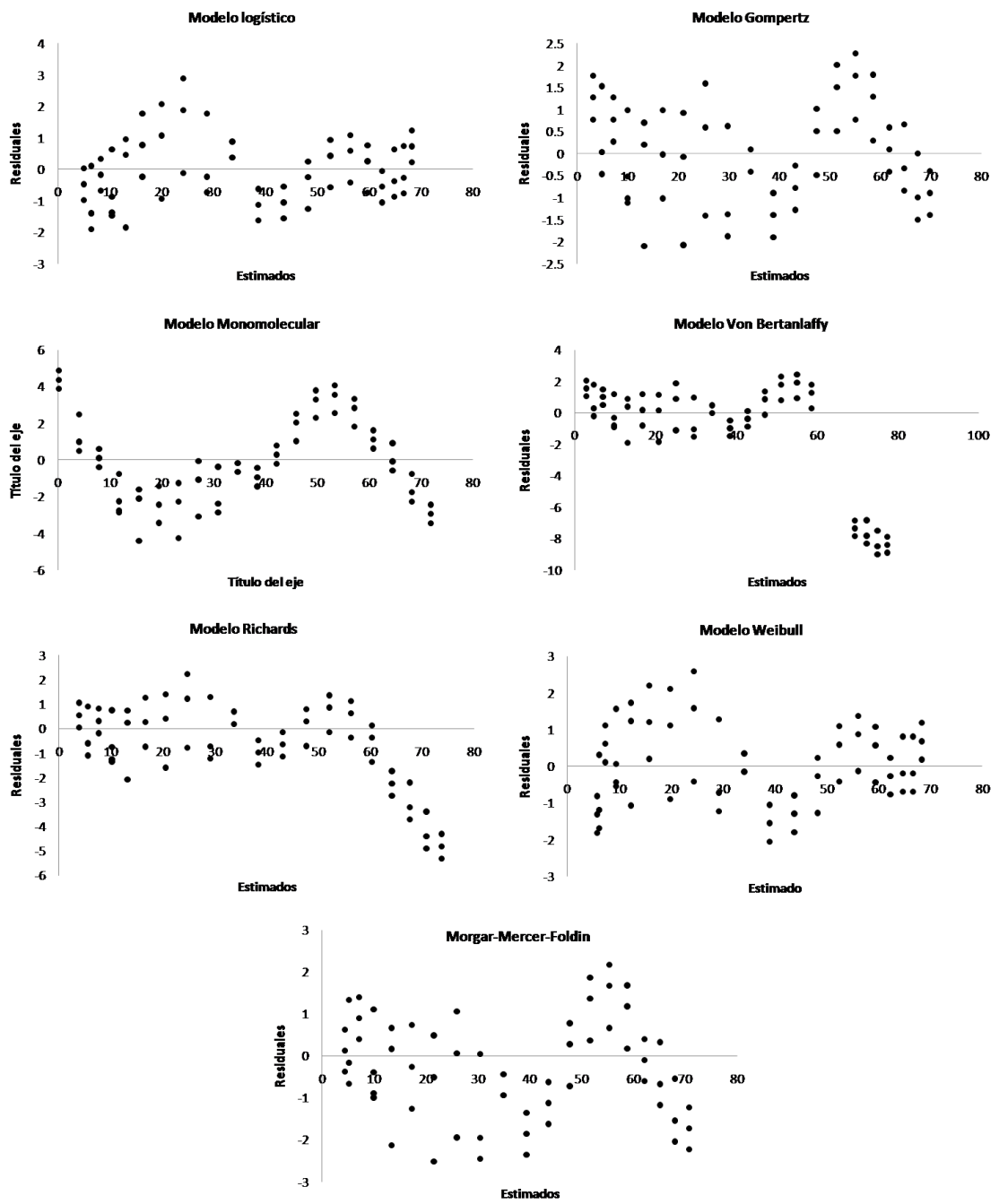


Figura 2. Residuales de los análisis de regresión no lineal aplicado a las curvas de crecimiento de la lima ácida Tahití, durante el segundo ciclo de producción.

ANEXO 2. POSIBLES RUTAS DE FRAGMENTACIÓN DE LOS CARBOHIDRATOS MÓVILES IDENTIFICADOS POR HPLC-ESI-MS EN MUESTRAS DE HOJAS Y FRUTOS DE LA LIMA ÁCIDA TAHITÍ DE LOS ESPECTROS MOSTRADOS EN LA FIGURA 22.

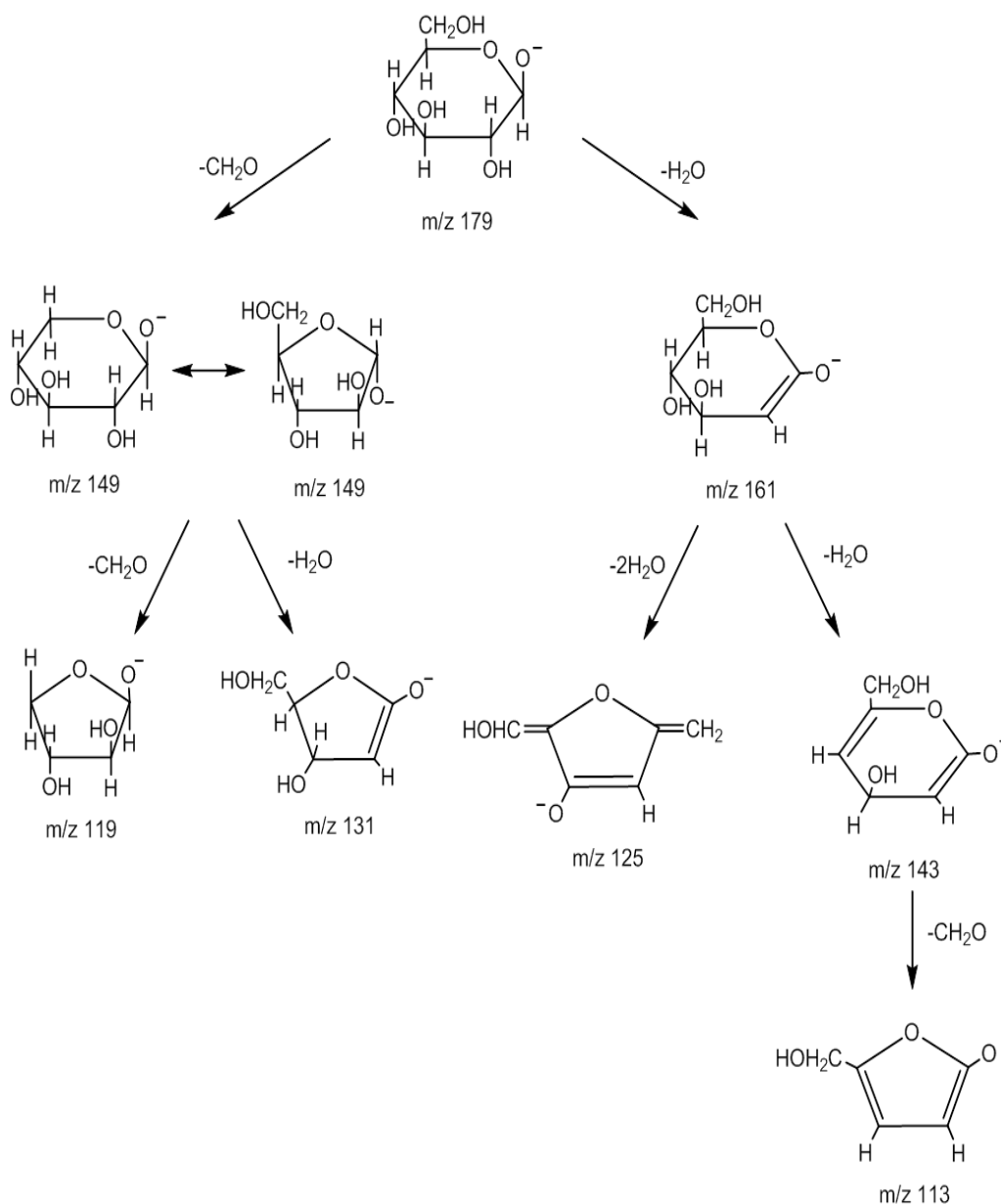


Figura 3. Posible ruta de fragmentación de la D-(+)-glucosa, empleando un espectrómetro de masas Amazon X (Bruker) con ionización por *electrospray* en modo negativo a 300 °C de temperatura y 4000 V del voltaje en el capilar,

empleando nitrógeno como gas nebulizador con flujo de 8 L/min y presión de 30 psi.

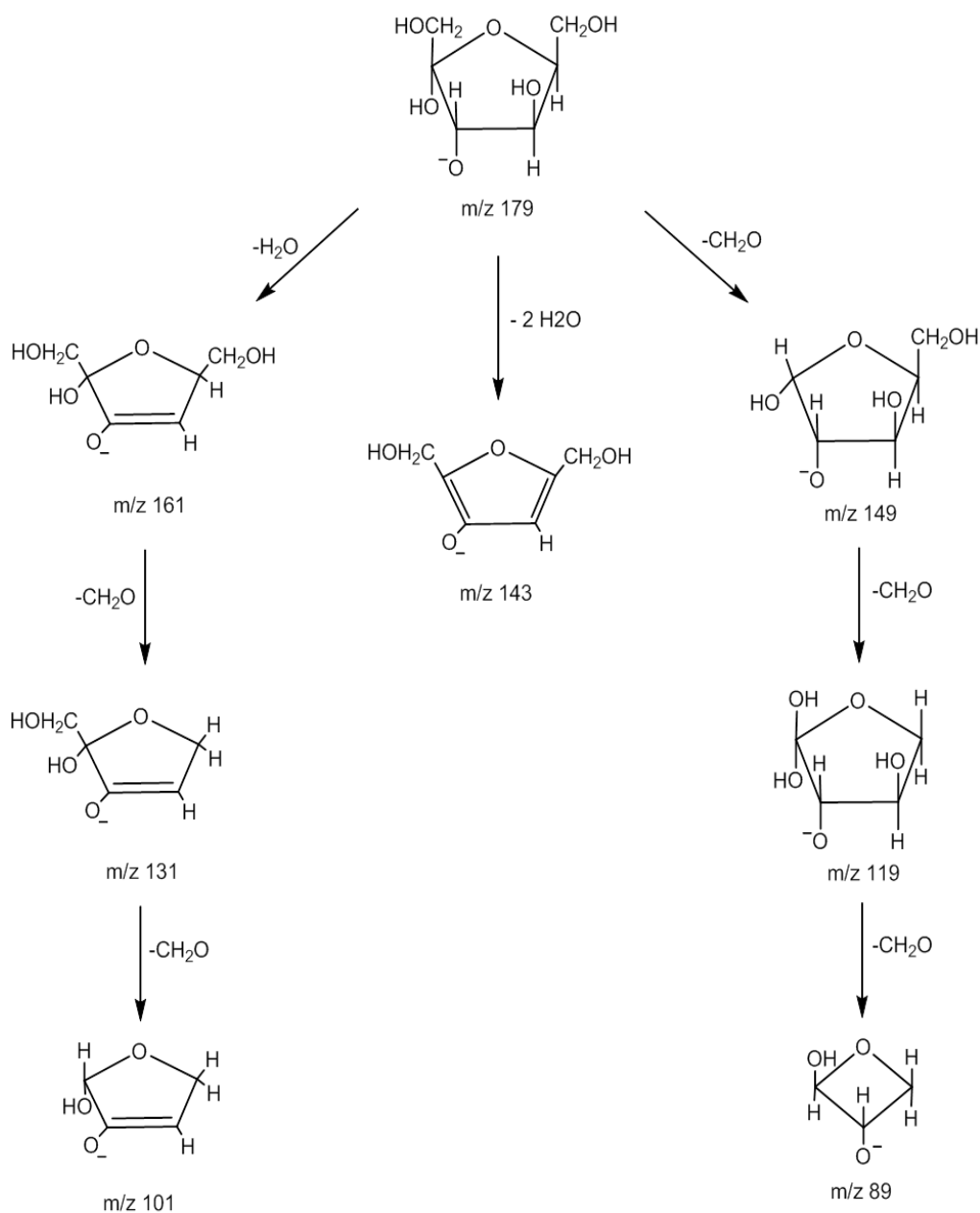


Figura 4. Posible ruta de fragmentación de la D-(-)-fructosa, empleando un espectrómetro de masas Amazon X (Bruker) con ionización por *electrospray* en modo negativo a 300 °C de temperatura y 4000 V del voltaje en el capilar, empleando nitrógeno como gas nebulizador con flujo de 8 L/min y presión de 30 psi.

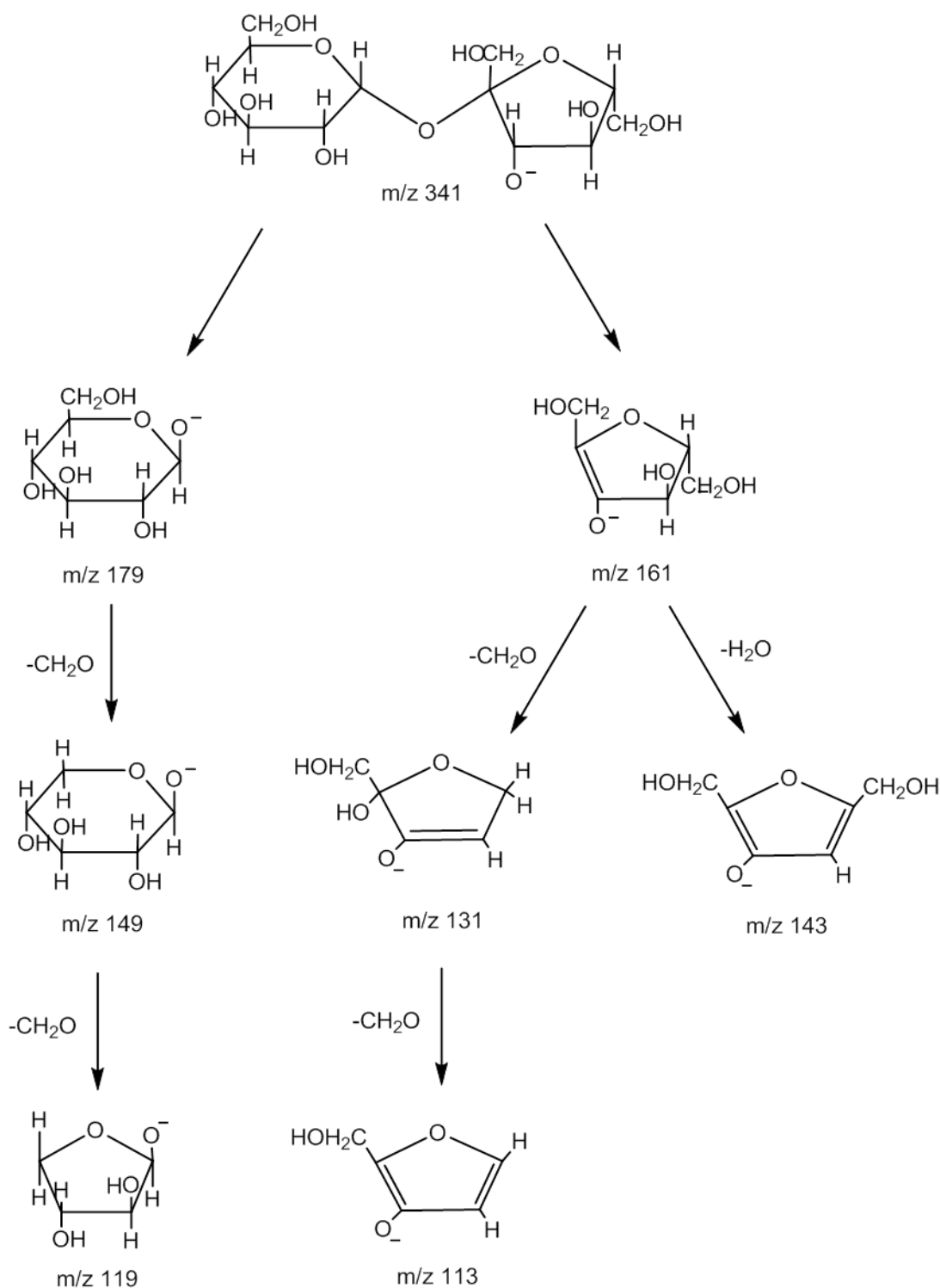


Figura 5. Posible ruta de fragmentación de la sacarosa, empleando un espectrómetro de masas Amazon X (Bruker) con ionización por *electrospray* en modo negativo a 300 °C de temperatura y 4000 V del voltaje en el capilar, empleando nitrógeno como gas nebulizador con flujo de 8 L/min y presión de 30 psi.