

ESTUDIO DEL PERFIL DE SUSTANCIAS VOLÁTILES EN ARÁNDANOS SANOS E INFESTADOS POR LA MOSCA DE ALAS MANCHADAS, *Drosophila suzukii*



Tesis de grado para Licenciatura en Química

Bachiller Daniela Mato

TUTORES

Gerardo de la Vega, Laboratorio de Ecología Química

Andrés González Ritzel, Laboratorio de Ecología Química

Montevideo, julio de 2020

Estudio del perfil de sustancias volátiles en arándanos sanos e infestados por la mosca de alas manchadas, *Drosophila suzukii*.

Introducción y Antecedentes

Fruta fina y arándanos en Uruguay

En la agricultura, los cultivos frutales siempre han sido objeto de numerosos estudios de índole químico, biológico, bioquímico y medicinal, entre otros. Dentro de estos cultivos, existe un grupo llamado cultivos de fruta fina, los cuales poseen una fina epidermis y un alto valor agregado debido al tamaño, color, aroma y textura de sus frutos. Como ejemplos de estos frutos finos se pueden citar a las cherries (cerezas) y a las berries (mora, frambuesa, frutilla y arándano entre otros) como los más conocidos y extendidos a nivel mundial [1].

Todas estas frutas poseen un pericarpio (piel) muy delicada, que ante la eventualidad de cualquier agente externo, tanto biótico como abiótico, se daña y permite el ingreso de microorganismos que contribuyen a la descomposición de la fruta. Por lo tanto, la cadena productiva de fruta fina debe caracterizarse por un extremo cuidado, desde el crecimiento en la planta, pasando por el momento de cosecha y hasta la llegada a la mesa del consumidor [1].

La fruta objeto de estudio particular en el presente trabajo es el arándano (*Vaccinium corymbosum* L.; Ericaceae), considerada en el mundo como “la fruta del siglo XXI” por su sabor y beneficios a la salud humana [2].

En Uruguay, el desarrollo de la cultura de esta fruta es reciente, donde las primeras plantaciones se hicieron entre los años 2001 y 2002 y cuya primera exportación de fruta fresca se realizó en 2003 hacia los Estados Unidos [2].

El alcance de su área plantada es nacional, cuya presencia se encuentra en 17 de los 19 departamentos, prevaleciendo la región litoral norte en las cercanías de Salto y Paysandú; donde se encuentran las mejores condiciones para producir una fruta de alta calidad exportable. El área cultivada actualmente es de 850 hectáreas, de las cuales 80 empresas se encargan de su explotación, con un rendimiento de 10 a 15 toneladas por hectárea [3].

Económicamente logró posicionarse en segundo lugar, con respecto a las exportaciones donde los principales mercados son: Unión Europea, Estados Unidos, China y Canadá. Importancia por la cual el Estado ha tomado un papel relevante en la promoción y apoyo a esta actividad, a través de diferentes instituciones públicas como ser: Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP), Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU) y Ministerio de Industria, Energía y Minería (MIEM) [3].

Drosophila suzukii, plaga de fruta fina

En el 2008 se detectó una nueva plaga de fruta fina a nivel mundial que se ha convertido en un problema importante, la mosca conocida como mosca de alas manchadas, *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) (Figuras 1-2).

Originaria de Asia y descrita por primera vez en 1916 en Japón, su presencia se ha extendido a todo el mundo desde la primera década del siglo XXI, primeramente en Europa y Estados Unidos, y a partir de los años 2013-2014 en países de la región (Paraguay, Brasil, Argentina y Uruguay) [1,4]. Esta mosca es capaz de producir daños económicos muy importantes en el cultivo de fruta fina, con porcentajes en cultivos de cerezas que llegan al 90% de la producción [5].

La mosca *D. suzukii* se diferencia de *D. melanogaster*, organismo modelo clásico en diversas áreas de la Biología, ya que ovipone sobre frutas aún en proceso de maduración, previo a la cosecha, mientras las frutas aún poseen alto valor comercial. La hembra de esta mosca posee un aparato ovipositor aserrado, el cual es capaz de cortar la piel de los frutos, introduciendo así los huevos y desarrollando los estadios larvales dentro de la fruta [6].

Semioquímicos: Compuestos químicos como señales biológicas

La comunicación es un proceso fundamental que determinan las interacciones entre los organismos en la naturaleza. El canal de comunicación más antiguo y compartido por una gran diversidad de organismos es el químico. Estos mensajeros se los denominan semioquímicos y participan en muchos aspectos de la vida de los organismos y sus interacciones ecológicas, motivo de interés en la ecología química [7].

Los semioquímicos se pueden clasificar en dos categorías. La primera, son las feromonas y son interacciones intraespecíficas; donde la comunicación se da entre organismos de la misma especie. La segunda, son los aleloquímicos y se manifiestan entre organismos de especies diferentes y son objeto de este estudio [7].

Como ejemplos de estos químicos podemos citar: terpenos, compuestos aromáticos y derivados de ácidos grasos. Compuestos orgánicos volátiles que producen y emiten las plantas [8].

La infestación de la fruta, además del proceso de maduración, podría causar un cambio en el perfil de sustancias orgánicas volátiles características de las mismas, cambios que podrían ser reconocidos por otros organismos que viven en el hábitat de la planta. Se sabe que el ataque de *D. suzukii* permite el ingreso de otras moscas; sin embargo, no se conoce si los parasitoides enemigos naturales que parasitan larvas o pupas de estas moscas – pueden ser atraídos por el cambio en el perfil de volátiles. Conocer la relación entre los cambios en el perfil de volátiles de fruta infestada y los parasitoides de *D. suzukii* aportaría al estudio y desarrollo de estrategias de control biológico de esta plaga [8].

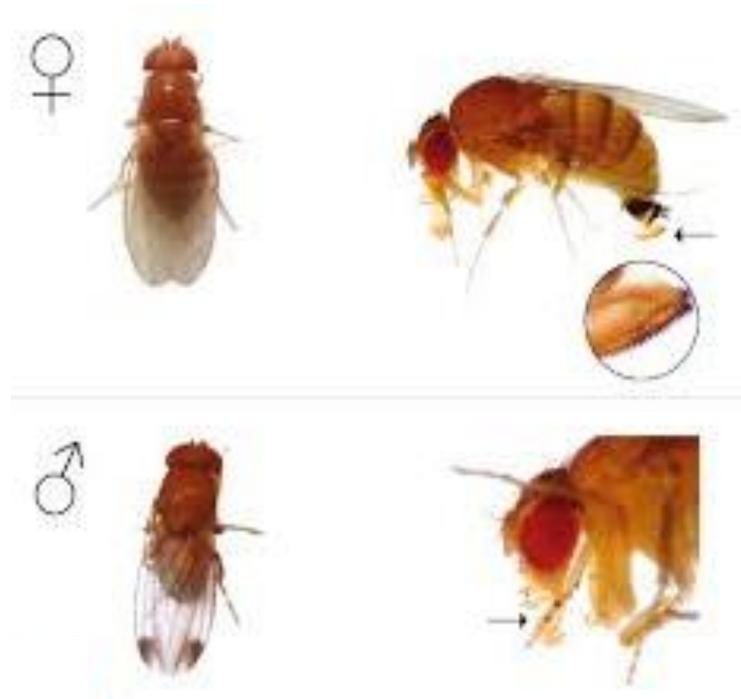


Figura 1. Vista panorámica y de perfil de una hembra (parte superior), y de un macho (parte inferior). Aquí se puede observar con detalle el aparato ovopositor de la hembra y las alas manchadas del macho. Fuente: Mc. Evey



Figura 2. Vista aumentada de perfil de un macho (izquierda) y de una hembra (derecha). Se muestra en la hembra el aparato ovopositor en un recuadro en la parte final de la cola. Fuente: Mc Evey

Objetivos:

Objetivo General:

Estudiar el perfil de compuestos orgánicos volátiles emitidos por frutos de arándano (*Vaccinium, corymbosum*. L.; Ericaceae), tanto en fruta sana como después de su infestación por *Drosophila suzukii*, como insumo para el eventual desarrollo de estrategias de control biológico de la plaga.

Objetivos específicos:

- 1) Optimizar las condiciones experimentales de infestación controlada de fruta en el laboratorio.
- 2) Optimizar las condiciones de obtención de compuestos orgánicos volátiles y su análisis por GC-MS.
- 3) Caracterizar los componentes mayoritarios y comparar los perfiles de compuestos orgánicos volátiles de arándanos sanos e infestados por *D. suzukii*.

Metodología

Insectos y frutos

Se mantuvo una cría ya establecida de *D. suzukii* bajo condiciones controladas de temperatura (21.0 ± 0.5) °C, humedad (65%) y fotoperíodo (luz: oscuridad) (12:12) contenidas en tubos sellados por un extremo con algodón para permitir el ingreso de aire colocando un medio sólido nutritivo a base de almidón y azúcares con conservantes alimentarios y se dispuso de adultos para la infestación de los frutos. Los arándanos fueron obtenidos en el mercado, procurando aquellos que hayan sido cosechados recientemente.

Muestras de arándanos (*Vaccinium corymbosum* L. Ericaceae) de dos regiones geográficas distintas del Uruguay constituidas por un primer grupo al cual se lo denominó “comerciales”, por tratarse de muestras adquiridas en comercios de plaza; la característica principal de estas muestras es que provienen de la región litoral norte del país, que como se mencionó en la introducción es el lugar donde se encuentran la mayor concentración de fruta de calidad exportable de esta especie debido a las características del microclima y la composición del suelo. Y por otro lado, un segundo grupo lo constituyen bayas provenientes de un productor orgánico del sur del país, donde no se favorece la obtención de un producto de calidad organoléptica como el primero descrito, a este conjunto de muestras se lo denominó “orgánicos”. Dichas muestras fueron sometidas a un lavado con agua destilada, escurridas y colocadas en recipientes de papel aluminio conteniendo 20 gramos cada uno.

Tratamientos de infestación de frutos

La infestación se realizó con ejemplares de moscas adultas, colocando 10 machos y 10 hembras en contacto con las frutas para la cópula y oviposición. Para determinar la efectividad de diversas estrategias de infestación controlada, se verificó la emergencia de pupas hacia la superficie del fruto, una vez culminado el desarrollo larval. Durante el desarrollo larval antes mencionado, y conociendo de antemano la duración del mismo en las condiciones de trabajo; el cual se observó la aparición de larvas al tercer día de ovoposición y la presencia de pupas al décimo día.

Se realizaron muestreos de volátiles a tres tiempos diferentes (T0, T1, T2) (Figura 3). T0 correspondió a la medida inicial; donde la totalidad de las réplicas correspondieron a fruta sana. T1 se refirió al tercer día luego de T0. Aquí algunas muestras de T0 fueron sometidas a 24 horas de ataque por *D. suzukii* y otras a un ataque físico-mecánico a través de perforaciones con un microcapilar con el objetivo de controlar el efecto del corte en la piel comparado con su homólogo realizado por un ataque biológico. Por último, T2 es el análisis transcurridos diez días de T0, y correspondió a las mismas réplicas (atacadas y no atacadas) en T1.

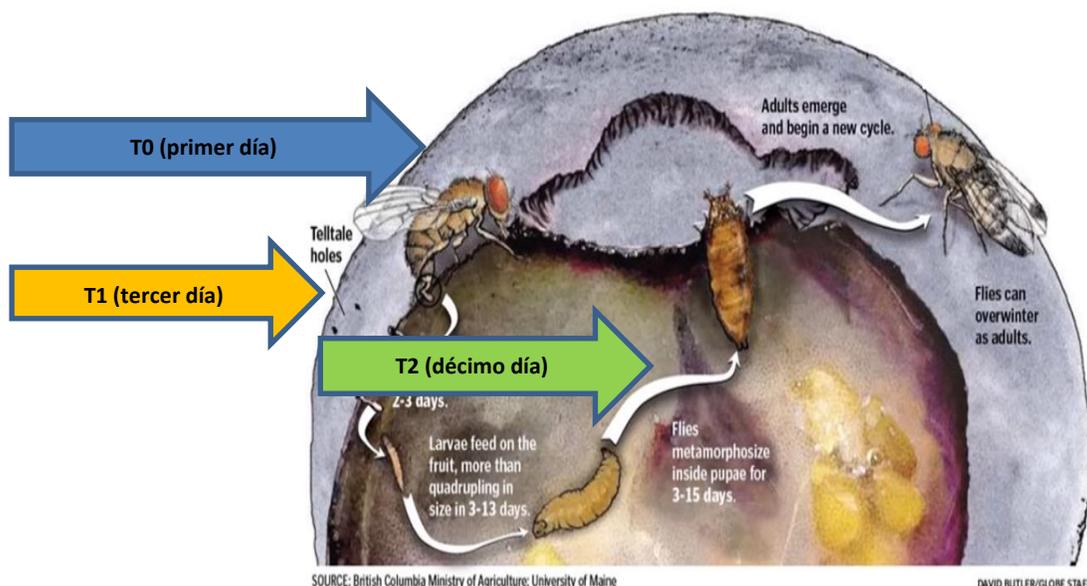


Figura 3. Se observa el ciclo de vida de *D. suzukii* dentro de una baya de arándano. Las flechas indican los tiempos (T0, T1 y T2) en los que se hicieron las colectas y la relación con el ciclo de vida de la mosca. Fuente: British Columbia Ministry of Agriculture, University of Maine. Foto: David Butler staff

Muestreo y análisis de compuestos volátiles

Se utilizó una metodología no destructiva de muestreo, a través de la aireación dinámica de frutos en condiciones ambientales de temperatura, obteniendo los compuestos en adsorbentes sólidos para su posterior desorción con hexano. Los extractos se analizaron por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) [9]. Los principales componentes se identificaron por comparación de sus espectros de masa con las bases de datos disponibles, y por sus tiempos de retención.

Los recipientes conteniendo las muestras de fruta se introdujeron en tubos de vidrio con extremos abiertos conectados por un lado a un compresor de aire con filtro de sílica gel para retener la humedad, donde este circula hasta un regulador de flujo seteado en 500 ml por minuto en cada tubo; culminando la conexión en un extremo del tubo. Por el otro extremo, se colocó una pipeta de vidrio empacada con material adsorbente de marca comercial HAYESEP® -Q, en base física de lana de vidrio [10], [11], [12] (Figuras 4,5). Este material adsorbente se compone de divinil benceno (vinil estireno), el cual es muy adecuado para la captura de compuestos orgánicos volátiles de bajo peso molecular, por ejemplo ácidos, alcoholes, ésteres, como también moléculas apolares como hidrocarburos.

Para obtener los compuestos volátiles (colecta), se expuso la fruta durante 24 horas en una habitación con fotoperíodo (luz: oscuridad) de (12:12) en el sistema anteriormente descrito; luego de transcurrido ese tiempo se retiraron las pipetas y se eluyeron en viales de 2 ml de capacidad con 1 ml de hexano de alta calidad. Posteriormente se concentró ese eluido bajo corriente de nitrógeno para lograr un volumen final de 150 μ l, los que fueron transferidos a un inserto de vidrio dentro de un nuevo vial de 2 ml. Las pipetas luego de ser eluidas, se volvieron a reactivar para posteriores colectas por un proceso de elución de gradiente de polaridad en la cual se las lavó con 5 ml de metanol, luego diclorometano y culminando dos porciones de diferentes calidades de hexano. Como último paso del análisis, se las introdujo en un cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS) [9]. Cabe destacar que para cada tanda de muestras analizadas, también se incluyó un blanco.

El análisis de las muestras consistió en primer lugar por la separación de la muestra a través de cromatógrafo de gases con detector de espectrómetro de masas (GC-MS) Shimadzu GC-MS QP 2010 PLUS, con una temperatura de inyección de 250°C en modo splitless, utilizando helio como fase móvil de flujo 34.1 ml/min. Y presión de 49.7 KPa. La columna es de material DB-5, capilar de 30m de largo, 0.25mm de diámetro y 0.25 μ m de diámetro de partícula. Programa de temperatura: [40°C(4 min)-5°C/min-150°C-10°C/min-250°C(1 min)]. Por último el detector, de tipo cuadrupolo, en modo de adquisición scan con temperaturas de ionización e interfase de 200°C y 250°C respectivamente.

Los resultados obtenidos para cada grupo de muestra (comerciales y orgánicos), para cada estadio de estudio (T0, T1 y T2) y para cada tipo de tratamiento (control, ataque físico y ataque suzukii) se organizaron en tablas donde se muestra la concentración de los diferentes compuestos volátiles hallados expresados como promedios relativos porcentuales, acompañadas de su correspondiente error estándar porcentual, cuya magnitud se define como el cociente entre la desviación estándar y la raíz cuadrada del número de muestras del conjunto del grupo multiplicado por cien. ($[s.e=s.d/\sqrt{n}] *100$). Para cada estadio de estudio se expresan los resultados también por grupo químico con su error estándar porcentual.



Figura 4. Sistema utilizado para la captura de compuestos orgánicos volátiles.



Figura 5. (izq) Vista en detalle del sistema utilizado para la captura de compuestos orgánicos volátiles. (der) Arándanos dispuestos sobre papel de aluminio para muestreos de compuestos volátiles.

Resultados y discusión

Se analizaron un total de 92 muestras de volátiles de arándanos distribuidas en dos grupos denominados comerciales y orgánicos, de los cuales 40 muestras corresponden al primer grupo y 52 al segundo. En la totalidad del universo muestral descrito, se detectaron e identificaron tentativamente por medio del tiempo de retención y del patrón de fragmentación del espectro de masas, 34 compuestos químicos volátiles, estos se detallan en las siguientes secciones y en el Anexo de este informe.

Arándanos comerciales

Se analizaron un total de 40 muestras en tres tiempos (T0, T1 y T2), encontrándose 30 compuestos químicos (Tabla 1). En particular, se puede observar: el análisis de 17 muestras en T0, encontrándose 17 compuestos. Para T1, se trabajó con 4 muestras control y se hallaron 3 compuestos, 3 muestras correspondientes al tratamiento ataque físico reportando 2 compuestos y 2 muestras de tratamiento ataque suzukii en donde se encontraron 2 compuestos. Por último, para tiempo T2, se analizaron 4 muestras control reportando 5 compuestos, 3 muestras de tratamiento físico hallándose 5 compuestos y 7 muestras tratamiento suzukii con 20 compuestos.

Efecto de la maduración: Lo primero que se debe analizar es, la comparación entre el estado inicial T0 contra el estado intermedio T1 y estado final T2 sobre los conjuntos de muestras control; lo cual permitió evaluar químicamente la evolución natural de la fruta, es decir, en ausencia de manipulación. En el conjunto de los tres tiempos en estudio, se hallaron tres grupos químicos, reportándose: ésteres, hidrocarburos y terpenos (Tabla 1), en los cuales se encontraron los tres citados anteriormente en los tiempos T0 y T2, y solamente ésteres y terpenos en T1.

Se observa que hay una variación relativamente menor, con los terpenos aumentando y los ésteres disminuyendo a través del tiempo (Tabla 2, Figura 6). A su vez, para cada uno de estos grupos químicos, cualitativamente los compuestos hallados en los tiempos intermedio y final, comparados con el inicial, disminuyeron en su diversidad, ya que para el tiempo T0 se encontraron 17 compuestos, para tiempo T1 se encontraron 3 compuestos y para tiempo T2; 5 compuestos (Tabla 1, Figura A1).

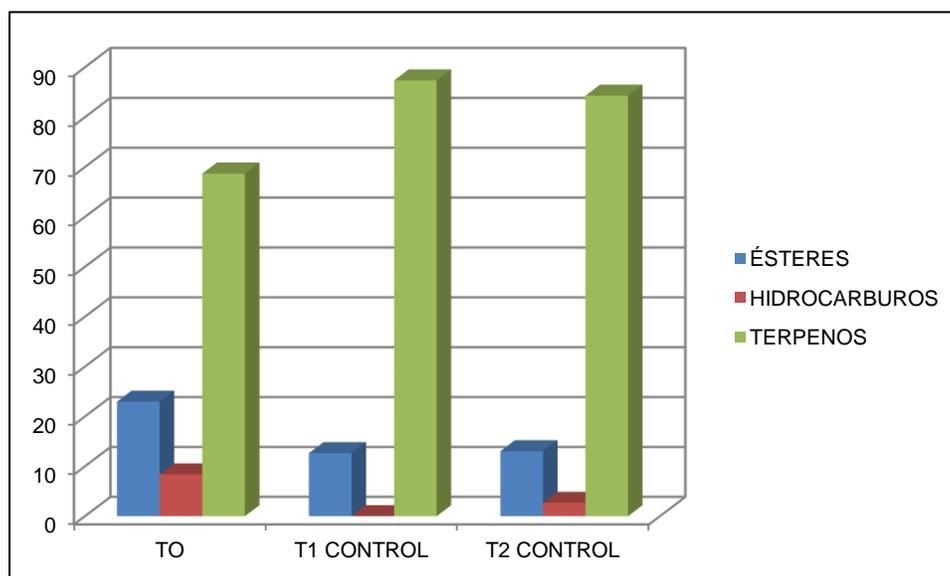
Específicamente para el grupo de los ésteres, cuantitativamente la tendencia esperada obedece a un aumento de la cantidad en función del tiempo; debido a la esterificación de los ácidos presentes en la fruta a medida que avanza la maduración. Aquí, se observó una disminución; lo cual probablemente esté ligado aspectos metodológicos o a variabilidad debida a las bajas cantidades de volátiles encontradas en general. Esta disminución es del orden del 50 % para los tiempos T1 y T2 en comparación con el inicial T0 (12.6% y 13.0% en T1 y T2 respectivamente contra 23.0% de T0).

Tabla 1. Identificación tentativa y cantidades relativas de los compuestos volátiles hallados en el grupo de muestras comerciales de arándanos para los tiempos T0, T1 y T2 y tratamientos aplicados: control (C), ataque físico (AF) y ataque de *D. suzukii* (ADs). La concentración se expresa como concentración relativa porcentual y el error corresponde al error relativo porcentual.

Compuesto	Tiempo	T0	T1	T1	T1	T2	T2	T2
	Trat.		C	AF	ADs	C	AF	ADs
ácido isovalérico								3.2 ± 3.0
n-hexanol								1.4 ± 1.4
linalol								0.3 ± 0.3
feniletil alcohol								19.0 ± 5.3
n-decanal								0.2 ± 0.1
2-metilpropanoato de etilo		5.5 ± 3.3						1.6 ± 1.4
acetato de isobutilo								8.1 ± 7.9
3-metilbutanoato de metilo		1.3 ± 1.2	12 ± 12				1.0 ± 1.0	0.1 ± 0.0
2-metilbutanoato de etilo		1.4 ± 0.8		11.3 ± 0.7			3.4 ± 3.3	0.2 ± 0.1
3-metilbutanoato de etilo		14.8 ± 5.9		88.7 ± 0.7		13.0 ± 5.0	30 ± 30	16.5 ± 7.5
acetato isoamílico								39.0 ± 6.1
propionato isoamílico								0.4 ± 0.4
acetato de bencilo								0.1 ± 0.1
etilacetato de fenilo								4.9 ± 2.0
oxirano,2-(hexin-1-il)-3-metoximetileno								0.2 ± 0.2
2,2,5-trimetilhexano		1.1 ± 1.1						
4,5-dimetilundecano		0.9 ± 0.9						
n-tetradecano		6.4 ± 2.9				2.7 ± 1.6	0	0.1 ± 0.1
anuleno		0.5 ± 0.5						
alfa-pineno		1.3 ± 0.6	18 ± 18					
beta-terpineno		0.1 ± 0.1						
alfa-terpineno		0.2 ± 0.2						
para-cimeno		0.6 ± 0.6						
silvestreno		0.2 ± 0.2						
limoneno		53 ± 10	69 ± 18		98.9 ± 0.8	79.8 ± 7.1	56 ± 28	2.8 ± 1.7
eucaliptol								1.5 ± 1.3
gama-terpineno		0.5 ± 0.5						
terpinoleno		1.9 ± 0.9				4.3 ± 2.5	9.6 ± 4.8	
cariofileno		9.7 ± 4.0			1.1 ± 0.8	0.3 ± 0.3		0.2 ± 0.1
cis-tujopseno								0.3 ± 0.2

Tabla 2 / Figura 6. Descripción cuantitativa de los grupos químicos hallados en los volátiles de arándanos comerciales para los tiempos T0, T1 y T2, sin aplicación de daño. La concentración se expresa como concentración relativa porcentual y el error corresponde al error relativo porcentual.

Tipo de Compuesto	Tiempo Trat.	T0	T1 C	T2 C
Ésteres		23 ± 11	12 ± 12	13 ± 5
Hydrocarb.		8.4 ± 4.9	0	3 ± 2
Terpenos		68 ± 18	87 ± 36	84 ± 10



En el grupo de los hidrocarburos, la situación esperada sería la disminución al avanzar la maduración; debido a la oxidación natural a causa del envejecimiento celular. Aquí se verificó para el recorrido de T0 a T2, (de 8.4% a 2.7%). No se hallaron en T1, tal vez debido a la variabilidad del método empleado y/o a la variabilidad natural de la fruta, debido a la interacción de las moléculas aromáticas con carbohidratos, lípidos y proteínas; los cuales afectan a la retención de los aromas en el alimento [13], y en consecuencia a la tasa de volátiles en la fase gaseosa. Estas interacciones repercuten en la intensidad y calidad del aroma de los alimentos [14, 15]. Sin embargo, consultando bibliografía sobre el efecto de la variabilidad natural de las frutas en los análisis se encontró de que las interacciones entre compuestos volátiles y macromoléculas en un alimento es muy difícil de comprobar en el propio alimento, y por este motivo; su estudio se ha realizado habitualmente en sistemas modelo que pretenden ser un reflejo de lo que puede ocurrir en el alimento [16].

Por último, para el grupo de los terpenos también es esperable una tendencia similar a la referida a los hidrocarburos debido a su similitud con respecto a su reactividad química. Esta es: una disminución en función del tiempo también debido a la oxidación. En el

presente trabajo, se reportó un leve aumento a lo largo del tiempo (68.6% en T0 a 87.4% en T1 y finalizando en 84.3% en T2). Como se mencionó anteriormente, esa irregularidad puede ser debida a los múltiples factores de variabilidad. En este sentido, Voilley et al. [17] indicó que las macromoléculas como los polisacáridos y en particular las pectinas presentes en la pulpa de las frutas pueden actuar como soporte de pequeñas moléculas como las volátiles de forma reversible o irreversible. Estas interacciones incluyen trampas hidrofóbicas o uniones covalentes irreversibles [18]. Por último, de esta discusión puedo estimar que la concentración de terpenos se mantuvo invariada en todo el tiempo de estudio.

Como conclusión de este análisis (Tabla 2, Figura 6), puedo decir que de forma cuantitativa, considerando los errores inherentes que aportan variabilidad; la concentración relativa de ésteres y terpenos no varió de forma importante y la de hidrocarburos disminuyó levemente. Con lo cual el efecto natural de maduración de la fruta no reportó alteraciones importantes en su composición centesimal.

El efecto del ataque físico o biológico en los volátiles de arándanos comerciales fue medido en dos tiempos, T1 t T2. En forma inmediata (T1), se observaron cambios importantes en los volátiles, pero en todos los casos cantidades muy pequeñas de compuestos volátiles, lo que relativiza la precisión de los resultados.

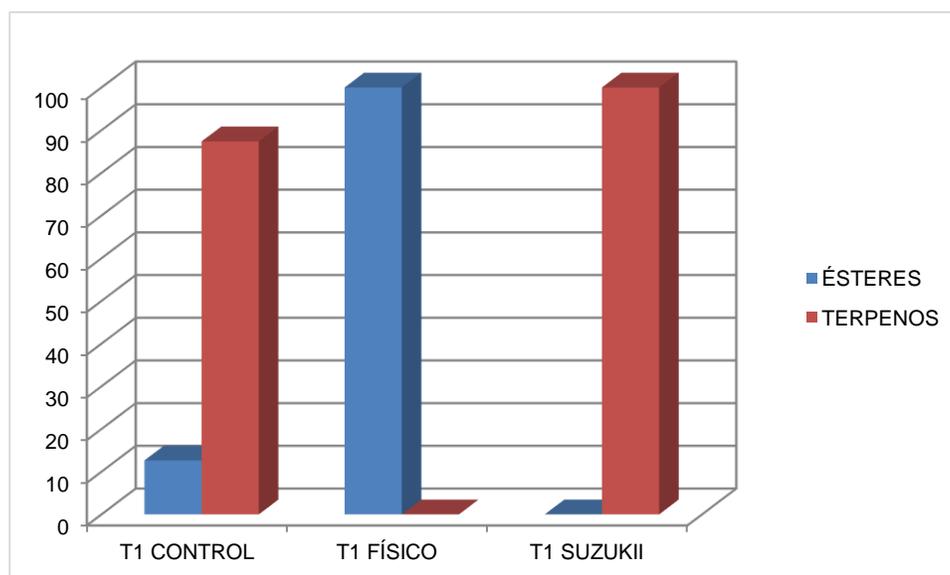
Efecto del daño: Al evaluar la incidencia de los distintos tratamientos (ataque físico y ataque de *D. suzukii*) en comparación con una fruta control; para el tiempo intermedio T1, se observa para muestras control, muestras ataque físico y muestras ataque de mosca; la poca variabilidad cualitativa de compuestos volátiles; en la cual se hallaron solamente 3, 2 y 2 compuestos respectivamente (Tabla 1). También se verificó la poca variedad de grupos químicos, reportándose solamente ésteres y terpenos (Tabla 3).

Con respecto a los ésteres, se observa un fuerte aumento en el grupo de muestras de ataque físico (100.0 %) contra los 12.6% encontrados en el grupo control (Tabla 3, Figura 7). Esta tendencia es esperable, ya que la fruta sufrió daño mecánico; con lo cual aumenta la probabilidad de oxidación. Por el contrario, para el grupo de muestras de ataque suzukii no se encontraron ésteres, quizás debido a errores experimentales o a las variabilidades naturales de la fruta y comentadas anteriormente en la presente discusión a través de bibliografías encontradas.

Para el grupo de los terpenos, se reportó una ausencia en el grupo ataque físico, respecto al grupo control (87.4%) (Tabla 3), hecho asociado a la rotura de la piel de la fruta. En esta oportunidad para el grupo de muestras ataque suzukii, se compuso íntegramente de terpenos.

Tabla 3 / Figura 7. Descripción cuantitativa de los grupos químicos hallados en los volátiles de arándanos comerciales para el tiempo T1, según el tratamiento sometido a las frutas. La concentración se expresa como concentración relativa porcentual y el error corresponde al error relativo porcentual.

Tipo de Compuesto	Tiempo Trat.	T1 C	T1 AF	T1 ADs
Ésteres		12 ± 12	100 ± 2	0
Hidrocarb.		0	0	0
Terpenos		87 ± 37	0	100 ± 2



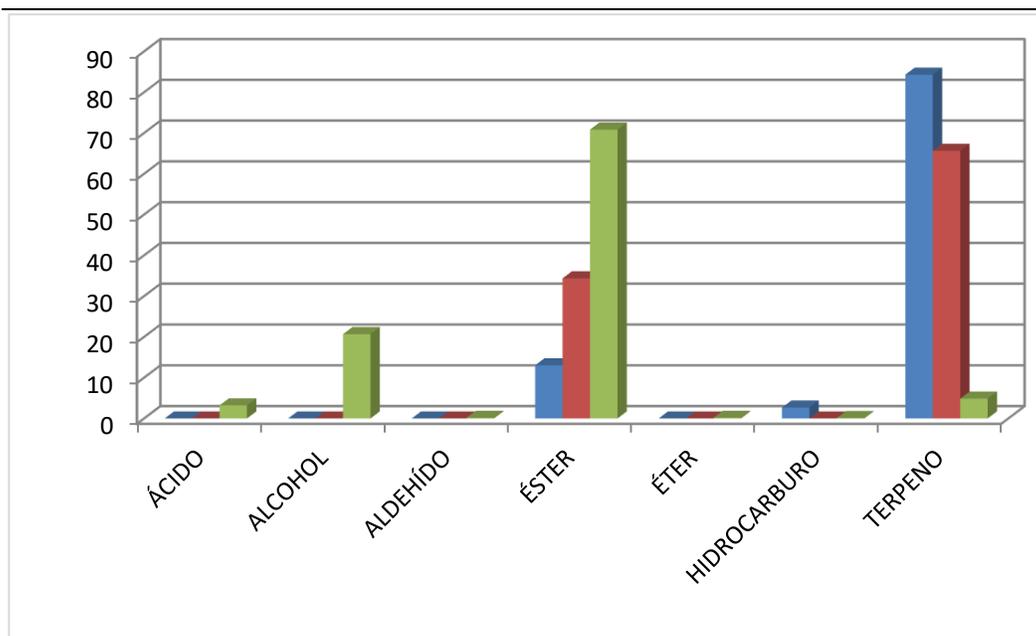
En la Figura A2 se muestra el perfil cromatográfico en tiempo T1 de tres muestras distintas según su origen (control, ataque físico y ataque de mosca), donde se aprecia la similitud entre los perfiles de muestras control y tratamiento físico; y un perfil heterogéneo para el grupo de tratamiento ataque de D. sukukii. A pesar de que el método utilizado posee gran porcentaje de variabilidad que aportan incertidumbre a los resultados, en el promedio para los grupos de estudio no se encontró gran variación cualitativa; como se explicó anteriormente en este análisis temporal tal variación.

Con la información arrojada en el análisis de las Figuras 7 y A2, puedo concluir para el tiempo T1 que los diferentes tratamientos ensayados en la fruta arrojaron diferencias significativas en el perfil de compuestos volátiles en el promedio de muestras. Sin embargo, la poca cantidad y diversidad de compuestos encontrados impone cautela en la interpretación de estos datos.

El efecto del daño en T2, con las frutas más maduras, permite observar una mayor variedad de compuestos, reportándose 5 en el grupo de muestras con ataque físico y 20 en el grupo ataque de mosca, grupo en el cual se hallaron en exclusividad 13 compuestos (Tabla A1). Se encontraron de forma exclusiva en el grupo de ataque *suzukii* los siguientes grupos químicos: ácidos (3.2%), alcoholes (20.7%), aldehídos (0.2%) y éteres (0.2%). Para el grupo de los ésteres, la tendencia fue en aumento tanto en muestras pertenecientes al ataque físico como a las pertenecientes al ataque de *D. suzukii*, comparadas con el grupo control (34.4%, 70.8% y 13.0% respectivamente). Es importante destacar según se desprende de la lectura de la Tabla 4, que las muestras tratadas con ataque de mosca mostraron un fuerte incremento de volátiles tanto cuantitativo como cualitativo. Con respecto a los hidrocarburos, se observó un decrecimiento tanto en ataque físico (ausencia), como en ataque de *D. suzukii* (0.1 %), comparado con el grupo control (2.7 %). Por último, en el grupo de los terpenos, la disminución en ambos tratamientos fue muy marcada; observándose un 65.6% para el grupo de ataque físico y un 4.9% para las muestras tratadas con ataque *suzukii* frente a 84.3% presentes en muestras control.

Tabla 4 / Figura 8. Descripción cuantitativa de los grupos químicos hallados en los volátiles de arándanos comerciales para el tiempo T2, según el tratamiento sometido a las frutas. La concentración se expresa como concentración relativa porcentual y el error corresponde al error relativo porcentual.

Tipo de Compuesto	Tiempo	T2	T2	T2
	Trat.	C (azul)	AF (rojo)	ADs (verde)
Ácidos		0	0	3.2 ± 3.0
Alcoholes		0	0	20.7 ± 7.0
Aldehídos		0	0	0.2 ± 0.1
Ésteres		13 ± 5	34 ± 34	70.8 ± 25.1
Éteres		0	0	0.2 ± 0.2
Hidrocarburos		2.7 ± 1.6	0	0.1 ± 0.1
Terpenos		84 ± 10	65 ± 32	4.9 ± 3.3



En la Figura A3 se muestra el perfil cromatográfico de tres muestras de diferentes tratamientos para el tiempo T2, donde se observa poca diferencia entre los perfiles para el grupo de muestras control y el grupo ataque físico. En contraposición, el perfil para la muestra de ataque por *D. suzukii* es notoriamente diferente a estos dos.

Arándanos orgánicos

Los arándanos orgánicos se cosecharon en un estado de madurez temprano respecto a la maduración de arándanos comerciales. Los muestreos de volátiles en T0 fueron realizados antes de 24 h posteriores a su cosecha. Estas diferencias, además de la variedad distinta a los arándanos comerciales, ameritan su tratamiento por separado.

Se analizaron un total de 52 muestras en dos tiempos (T0 y T2), las cuales se detallan en la Tabla A4. En T0, de un total de 25 muestras se encontraron 5 compuestos cuyas cantidades relativas se muestran en la Tabla 5. La distribución porcentual por clase de compuesto fue: ésteres: (20 ± 65) %, hidrocarburos: (5 ± 40) %, terpenos: (75 ± 70) %. En T2, de un total de 11 muestras se encontraron 7 compuestos, los cuales se detallan a continuación, con sus concentraciones relativas promedio (expresadas en porcentaje) y desviaciones estándares correspondientes. Por grupo químico los resultados mostraron únicamente ésteres: (92 ± 150) % y terpenos: (8 ± 45) %.

Las muestras de arándanos comerciales en T2 con daño físico mostraron, de un total de 6 muestras, 6 compuestos que se detallan en la Tabla 5 con sus concentraciones relativas promedio (expresadas en porcentaje) y desviaciones estándares correspondientes. Por grupo químico estas muestras mostraron ésteres (83 ± 82) % y terpenos: (17 ± 54) %. Finalmente, las 10 muestras atacadas por *D. suzukii* mostraron más compuestos (9) y en mayor cantidad general (Tabla 5), mayormente ésteres (99 ± 165) % (terpenos: 1.0 ± 3.2 %).

Al analizar el efecto del pasaje de tiempo desde T0 a T2 en muestras no dañadas (Figura 9), puede observarse la fruta al madurar naturalmente aumenta la producción de ésteres y en términos relativos disminuye la producción de terpenos.

Para el conjunto de muestras orgánicas se decidió no estudiar T1, ya que al evaluar el grupo de muestras comerciales el perfil de volátiles no presentó grandes diferencias con el correspondiente al tiempo inicial T0. Los perfiles de una misma muestra evaluada a tiempos inicial y final fueron similares, aunque se observa el importante aumento de los ésteres mayoritarios en T2 (Figura A4). Al analizar, por su parte, el efecto del daño en el perfil de volátiles en T2, no se observa un efecto en las proporciones de ésteres y terpenos (Tabla 5, Figura 10). Analizando los perfiles cromatográficos en T2 (Figura A5), se observa que los perfiles para las muestras control y ataque físico presentan gran similitud, en contraposición con el perfil de la muestra ataque suzukii en la cual se pueden observar las heterogeneidades entre estos.

Tabla 5. Identificación tentativa y cantidades relativas de los compuestos volátiles hallados en el grupo de muestras orgánicas de arándanos para los tiempos T0 y T2 y tratamientos aplicados: control (C), ataque físico (AF) y ataque de *D. suzukii* (ADs). La concentración se expresa como concentración relativa porcentual y el error corresponde al error relativo porcentual.

Compuesto	Tiempo	T0	T2	T2	T2
	Trat.		C	AF	ADs
2-metilpropanoato de etilo			0.2 ± 0.5		0.1 ± 0.1
3-metilbutanoato de metilo		2.8 ± 6.2	12 ± 29	6 ± 12	12 ± 17
2-metilbutanoato de etilo			6 ± 6	5.8 ± 5.6	14 ± 30
3-metilbutanoato de etilo		17 ± 26	73 ± 34	71 ± 23	69 ± 27
acetato isoamílico					1.2 ± 2.0
valerato de n-hexilo			1.3 ± 4.4	0.5 ± 1.2	0.8 ± 1.6
2,2,3-trimetilnonano		5 ± 20			
valerato isoamílico					2.2 ± 3.7
terpinoleno			1.4 ± 3.9	1.1 ± 2.8	0.1 ± 0.3
limoneno		70 ± 28	7 ± 19	16 ± 24	0.9 ± 1.3

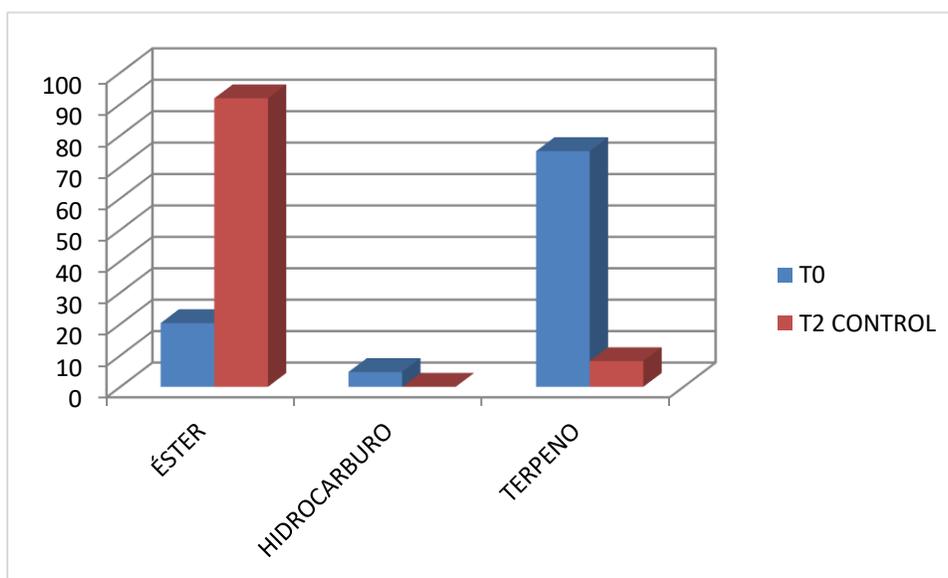


Figura 9. Concentraciones relativas (%) de los diferentes tipos de grupos químicos en los tiempos T0 y T2 control en muestras orgánicas, mostrando el efecto del pasaje del tiempo en muestras sin daño físico o biológico.

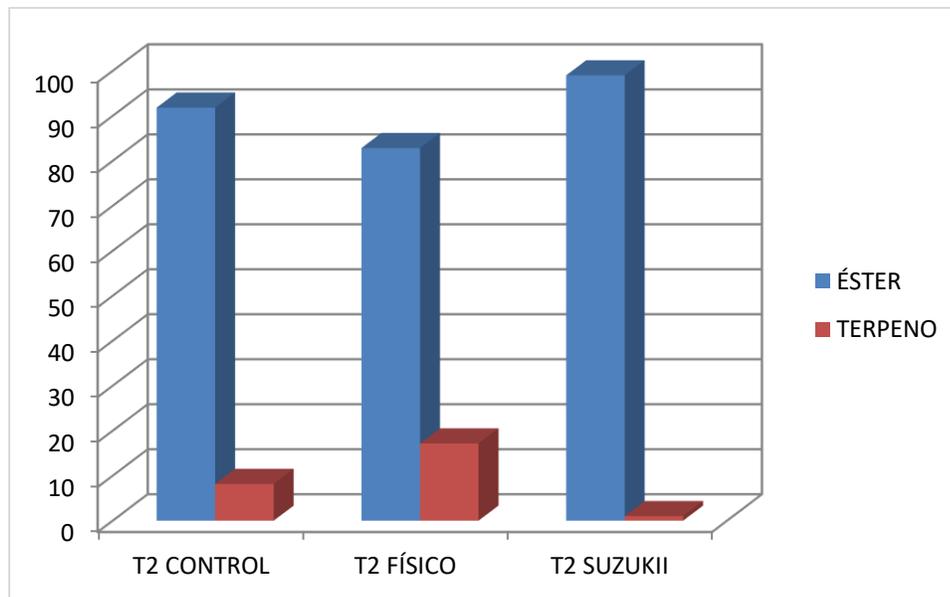


Figura 10. Concentraciones de los diferentes tipos de grupos químicos hallados en el tiempo T2 para grupos control y tratamientos de ataque físico y ataque de mosca en muestras orgánicas

Conclusiones:

Como conclusiones generales del estudio de compuestos volátiles en muestras comerciales se puede informar:

- 1) Hubo una variación cualitativa de compuestos volátiles para el grupo de muestras control en función del tiempo.
- 2) No se encontró una variación importante de grupos químicos en muestras control para los diferentes tiempos de estudio.
- 3) A tiempo intermedio T1, no se denotaron aún cambios significativos para ambos grupos de muestras tratadas en comparación con el grupo control, en lo que respecta a su composición porcentual.
- 4) A tiempo T2, se observó una gran complejidad de compuestos en el tratamiento con ataque por *D. suzukii*, con respecto al tratamiento con ataque físico y al grupo de muestras control.
- 5) Cuantitativamente para el tiempo T2, las diferencias encontradas con respecto a los diferentes grupos químicos en los distintos tratamientos fue máxima para el grupo de ataque por mosca.

Como conclusión para el grupo de muestras orgánicas se puede afirmar:

- 1) Se encontró un aumento significativo de la concentración de ésteres al final de la experiencia en fruta sin tratar, en detrimento de los terpenos.
- 2) No se observó a nivel cualitativo en la fruta control cambios importantes en los perfiles de volátiles a lo largo de la experiencia.
- 3) A tiempo T2, el perfil de volátiles para las muestras de ataque físico no difirió de forma significativa al de su homólogo sin tratamiento.
- 4) A tiempo T2, se encontraron diferencias significativas en relación a la composición relativa para las muestras de ataque por *D. suzukii*, en comparación con muestras de los grupos ataque físico y control.
- 5) A tiempo T2, se hallaron cambios cualitativos en el perfil de compuestos volátiles para el grupo de tratamiento ataque por mosca. Estos cambios son menos pronunciados que en el grupo de muestras comerciales, donde se encontraron en exclusividad 13 compuestos, y tan solo 2 compuestos para el grupo de muestras orgánicas.

Globalmente, se observaron diferencias importantes en los perfiles de compuestos orgánicos volátiles, como así su variación de concentración, en muestras de arándanos (*Vaccinium corymbosum* L. *Ericaceae*) atacadas por *Drosophila suzukii*.

Referencias:

[1] Funes, Claudia F., Kirschbaum, Daniel S., Escobar, Lorena I., Heredia, Ana M. “La mosca de las alas manchadas, *Drosophila Suzukii* (Matsamura) nueva plaga de las frutas finas en Argentina”, INTA, Argentina, 2018.

[2] “China abrió el mercado a los arándanos uruguayos”, Diario El Observador.
<https://www.elobservador.com.uy/nota/china-abrio-el-mercado-a-los-arandanos-uruguayos-2016812500> Página consultada el 12 de mayo de 2020.

[3] “La producción de arándano en Uruguay”.
<https://www.diarioelpueblo.com.uy/especiales-del-ano/suplemento-regional-norte/la-produccion-de-arandanos-en-el-uruguay-sus-caracteristicas.html> Página consultada el 12 de mayo de 2020.

[4] “*Drosophila suzukii* (Matsamura)” Dirección General de la Producción Agrícola y Ganadera. Servicio de sanidad Vegetal. Consejería de Agricultura, Pesca y medio Ambiente de la Junta de Andalucía, España, 2013.

[5] Guerrero, Sergio P., Molina Rodríguez, José M., “*Drosophila Suzukii* en fresa: Revisión de técnicas aplicadas para el control y manejo de la plaga”, Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera, Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural de la Junta de Andalucía, España, 2015.

[6] “*Drosophila suzukii*”, Publicado en Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de plagas. <https://www.sinavimo.gov.ar/plaga/drosophila-suzukii>. Consultado el 24 de julio de 2019.

[7] Sellanes, María Carolina, González, Andrés “Aspectos químicos y biológicos de la comunicación química en *Cryptoblabes gnidiella* (Lepidoptera: Pyralidae)” Laboratorio de Ecología Química, Facultad de Química, UdelaR, 2011.

[8] Cantuá, Jesús, Flores, Alberto “Compuestos orgánicos volátiles de plantas inducidos por insectos: situación actual en México” Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas volumen 10 número 3, México, 2019.

- [9] Stashenko, Elena E., Martínez Jairo R. “Algunos aspectos de la detección en cromatografía de gases y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Selectividad e identificación”, Colombia, 2009.
- [10] Barbosa, R., Cantor, F., Barrera, E., Rodriguez, D., “Tools in the investigation of volatile semiochemicals on insects: from sampling to statistical analysis”, Colombia, 2019.
- [11] “Products for gas chromatography ”, Valco Instruments Co. Inc. Vici AG International [http:// www.vici.com](http://www.vici.com)
- [12] <http://www.merckmillipore.com>
- [13] Seuvre, A.M.; Philippe, E.; Rochard, S.; Voilley, A. Retention of aroma compounds in food matrices of similar rheological behaviour and different compositions. Food Chem. 2005, In Press.
- [14] Godshall, M.A. How carbohydrates influence food flavor. Food Technol. 1997, 51, 63-66.
- [15] Rabe, S.; Krings, U.; Berger, R.G. Influence of oil-in-water emulsion characteristics on initial dynamic flavour release. J. Food Sci. Agric. 2003, 83, 1124-1133.
- [16] Voilley, A.; Beghin, V.; Charpentier, C.; Peyron, P. Interactions between aroma substances and macromolecules in a model wine. Lebesm. -Wiss. u. -Technol. 1991, 24, 469-472.
- [17] Voilley, A.; Lamer, C.; Dubois, P.; Feuillat, M. Influence of macromolecules and treatments on the behaviour of aroma compounds in a model wine. J. Agric. Food Chem. 1990, 38, 248-251.
- [18] Charles-Bernard, M.; Roberts, D.D.; Kraehenbuehl, K. Interactions between volatile and nonvolatile coffee components.2. Mechanistic study focused on volatile thiols. J. Agric. Food Chem. 2005b, 53, 4426-4433.

ANEXO

A continuación, se detallan los resultados correspondientes a las muestras individuales analizadas en cada tiempo experimental. Estos resultados fueron promediados en el cuerpo central de la tesis.

Arándanos comerciales:

Se analizaron un total de 40 muestras en tres tiempos (T0, T1 y T2). Las muestras analizadas en T1 y T2 se diferencian en los tratamientos (control / ataque físico / ataque de *D. suzukii*).

Tiempo T0: En un total de 17 muestras se encontraron 17 compuestos, los cuales se detallan en la Tabla A1, con sus concentraciones relativas expresadas en porcentaje. Por tipo de compuesto, los resultados mostraron ésteres: (23 ± 93) %, hidrocarburos: (8 ± 40) % y terpenos (69±148) %.

Tiempo T1 / muestras control: De un total de 4 muestras se encontraron 3 compuestos, los cuales se detallan en la Tabla A2 con sus concentraciones relativas (expresadas en porcentaje). Por grupo químico los resultados son los siguientes: ésteres: (13 ± 50) % y terpenos: (87 ± 147)%.

Tiempo T1 / muestras con ataque físico: De un total de 3 muestras, se encontraron 2 compuestos, los cuales se detallan en la Tabla A2, con sus concentraciones relativas (expresadas en porcentaje). Todos los compuestos fueron ésteres.

Tiempo T1 / muestras con ataque de *D. suzukii*: De un total de 2 muestras, se encontraron 2 compuestos, los cuales se detallan en la Tabla A2, con sus concentraciones relativas (expresadas en porcentaje). Nuevamente todos los compuestos fueron ésteres.

Tiempo T2 / muestras control: De un total de 4 muestras se encontraron 5 compuestos, los cuales se detallan en la Tabla A3 con sus concentraciones relativas (expresadas en porcentaje). Por grupo químico los resultados son los siguientes: ésteres: (13 ± 20) %, hidrocarburos: (3 ± 6) %, terpenos: (84 ± 39) %.

Tiempo T2 / muestras con ataque físico: De un total de 3 muestras, se encontraron 5 compuestos, los cuales se detallan en la Tabla A3 con sus concentraciones relativas (expresadas en porcentaje). Por grupo químico los resultados son los siguientes: ésteres: (34 ± 119) %, terpenos: (66 ±114) %.

Tiempo T2 / muestras con ataque de *D. suzukii*: De un total de 7 muestras, se encontraron 20 compuestos, los cuales se detallan en la Tabla A3 con sus concentraciones relativas (expresadas en porcentaje). En cuanto a los tipos de compuestos, éstos fueron: ácidos: (3 ±16) %, alcoholes (21 ± 37) %, aldehídos (0.2 ± 0.4) %, ésteres (71 ± 135) %, éteres (0.2 ± 0.9) %, hidrocarburos: (0.1 ± 0.5) %, terpenos: (5 ±17) %.

Arándanos orgánicos:

Se analizaron un total de 52 muestras en dos tiempos (T0 y T2). Las muestras analizadas en T2 se diferencian en los tratamientos (control / ataque físico / ataque de *D. suzukii*).

Tiempo T0: En un total de 25 muestras se encontraron 5 compuestos, los cuales se detallan en la Tabla A4, con sus concentraciones relativas expresadas en porcentaje. Por tipo de compuesto, los resultados fueron: ésteres (20 ± 65) %, hidrocarburos (5 ± 40) %, terpenos (75 ± 70) %.

Tiempo T2 / muestras control: De un total de 11 muestras se encontraron 7 compuestos, los cuales se detallan en la Tabla A5 con sus concentraciones relativas (expresadas en porcentaje). Por grupo químico los resultados son los siguientes: ésteres (92 ± 150) %, terpenos (8 ± 45) %.

Tiempo T2 / muestras con ataque físico: De un total de 6 muestras se encontraron 6 compuestos, los cuales se detallan en la Tabla A5 con sus concentraciones relativas (expresadas en porcentaje). Por grupo químico los resultados son los siguientes: ésteres (83 ± 83) %, terpenos: (17 ± 54) %.

Tiempo T2 / muestras con ataque por *D. suzukii*: De un total de 10 muestras se encontraron 9 compuestos, los cuales se detallan en la Tabla A5 con sus concentraciones relativas (expresadas en porcentaje). Por grupo químico los resultados son los siguientes: ésteres (99 ± 165) % y terpenos (1 ± 3) %.

Tabla A1: Composición porcentual de T0 en arándanos comerciales, por muestra individual.

Compuesto	Tipo	Número de muestra																
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
metil 3- metilbutanoato	éster					20.8				0.5								
etil 2-metilbutanoato	éster										9.4	10.8	3.4					
etil 3-metilbutanoato	éster			37.1		32.8				3.3	69.3	59.1	49.3					
metil 2-propanoato de etilo	éster										16.9	30.1	47.3					
2,2,5-trimetilhexano	hidroc.																	19.0
4,5- dimetilundecano	hidroc.																	14.8
n- tetradecano	hidroc.			27.7	41.9	14.5	12.9	5.6	5.4	0.6								
Anuleno	terpeno									0.9								
alfa-pineno	terpeno	0.6	1.2				5.7	5.6	7.1	1.4								
beta- terpineno	terpeno										1.4							
alfa- terpineno	terpeno									3.6								
para- cimeno	terpeno									9.4								
Silvestreno	terpeno										3.1							
Limoneno	terpeno	95.2	90.4				65.2	74.3	69.1	52.2				100	100	66.2	100	100
gama- terpineno	terpeno									9.1								
Terpinoleno	terpeno						10.4	6.4	6.6	9								
Cariofileno	terpeno	4.1	8.4	35.2	58.1	32	5.8	8.1	11.8	1.9								

Tabla A2: Composición porcentual de T1 en arándanos comerciales, por muestra individual y por tratamiento.

Número de muestra y tratamiento (C: control; AF: ataque físico; ADs: ataque por <i>D. suzukii</i>)										
Compuesto	Tipo	1C	2C	3C	4C	1AF	2AF	3AF	1ADs	2ADs
metil 3- metilbutanoato	éster	50.5								
etil 2-metilbutanoato	éster					10.5	12.9	10.5		
etil 3-metilbutanoato	éster					89.5	87.1	89.5		
alfa-pineno	terpeno				73.3					
Limoneno	terpeno	49.5	100	100	26.7				97.9	100
Cariofileno	terpeno								2.1	

Tabla A3: Composición porcentual de T2 en arándanos comerciales, por muestra individual y por tratamiento.

Número de muestra y tratamiento (C: control; AF: ataque físico; ADs: ataque por D. suzukii)															
Compuesto	Tipo	1C	2C	3C	4C	1AF	2AF	3AF	1ADs	2ADs	3ADs	4ADs	5ADs	6ADs	7ADs
metil 3- metilbutanoato	éster						3.1					0.3	0.2		
etil 2-metilbutanoato	éster					10.1			0.5	0.1		0.3	0.2	0.5	
etil 3-metilbutanoato	éster		11.7	17	23.4				18.2	3.7	0.3	8.3	4.2	23.2	57.6
n- tetradecano	hidroc.		5.6	5.1											
Limoneno	terpeno	100	73.1	77.8	68.1										
Terpinoleno	terpeno		8.5		8.6										
Cariofileno	terpeno		1.1												
ácido isovalérico *	ácido										21.1	0.2	1.2		
n-hexanol *	alcohol													10.0	
linalol *	alcohol													2.0	
fenil etil alcohol *	alcohol									36.1	22.6	28.0	26.2	19.9	
n-decanal *	aldehído										0.4	0.3	0.4		
acetato de isobutilo *	éster								55.8	0.8		0.2	0.2		
acetato isoamílico *	éster								13.6	48.6	42.7	53.3	54.4	40.3	20.2
propionato isoamílico *	éster									2.6					
bencil acetato *	éster										0.4				
fenil etil acetato *	éster									3.3	10.9	8.6	11.3		

(*) solo se encontraron en este estadio.

Tabla A4: Composición porcentual de T0 en arándanos orgánicos, por muestra individual.

Compuesto	Tipo	Número de muestra											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
metil 3- metilbutanoato	éster	4.1	5	25.3	0	12.9	0	14.4	8.8	0	0	0	0
etil 3-metilbutanoato	éster	14.0	34.4	0	0	0	0	46.3	15.2	0	0	71.2	0
2,2,3-trimetilnonano	hidroc.	0	0	0	0	0	0	0	0	14.5	0	3.2	100
Limoneno	terpeno	71.8	54.2	67.0	86.0	74.8	100	39.3	76.1	85.6	100	25.6	0
Terpinoleno	terpeno	10.0	6.5	7.7	14.0	12.3	0	0	0	0	0	0	0

Tabla A4: Continuación.

Compuesto	Tipo	Número de muestra												
		13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
metil 3- metilbutanoato	éster	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
etil 3-metilbutanoato	éster	0	0	0	0	0	0	39.7	0	43.5	20.1	34.5	17.6	100
2,2,3-trimetilnonano	hidroc.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Limoneno	terpeno	85.9	83.7	84.4	100	87.2	100	60.3	100	56.5	79.9	65.5	82.4	0
Terpinoleno	terpeno	14.1	16.3	15.6	0	12.8	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla A5: Composición porcentual de T2 en arándanos orgánicos, por muestra individual y tratamiento.

		Número de muestra y tratamiento (C: control; AF: ataque físico; ADs: ataque por D. suzukii)																	
Compuesto	Tipo	1C	2C	3C	4C	5C	6C	7C	8C	9C	10C	11C	1AF	2AF	3AF	4AF	5AF	6AF	
etil 2- metilpropanoato	éster											1.7							
metil 3- metilbutanoato	éster	100	12.6	5.9	7.6	4.4						1.0	5.5	0	28.8	0	0	0	
etil 3-metilbutanoato	éster		87.4	94.1	89.3	92.9	9.7	75.2	88.9	88.4	88.9	82.3	94.5	88.4	66.7	48.3	40.2	86.9	
etil 2-metilbutanoato	éster					2.8		13.5	11.1	11.6	11.1	15.0	0	11.6	0	5.5	4.4	13.1	
hexil n-valerato	éster						14.6						0	0	0	3.0	0	0	
Limoneno	terpeno			3.1			62.9	8.3					0	0	4.5	36.3	55.4	0	
Terpinoleno	terpeno						12.8	3.0					0	0	0	6.8	0	0	

Tabla A5: Continuación.

		Número de muestra y tratamiento									
Compuesto	Tipo	1ADs	2ADs	3ADs	4ADs	5ADs	6ADs	7ADs	8ADs	9ADs	10ADs
etil 2-metilpropanoato	éster	0	0	0.4	0	0	0	0	0	0	0
metil 3-metilbutanoato	éster	22.4	55.1	19.1	10.3	13.8	0	0.8	0.2	0.4	0
etil 2-metilbutanoato	éster	0	0	0	4.2	3.8	100	6.8	6.5	6.6	9.2
etil 3-metilbutanoato	éster	77.6	44.9	80.5	85.0	81.1	0	81.3	77.2	71.4	90.8
hexil n-valerato	éster	0	0	0	0	0	0	2.6	5.4	3.4	0
valerato de isoamilo	éster	0	0	0	0	0	0	0	3.1	4.4	0
Limoneno	terpeno	0	0	0	0	0	0	4.9	6.7	10.1	0
Terpinoleno	terpeno	0	0	0	0.6	1.2	0	3.6	0.5	2.9	0

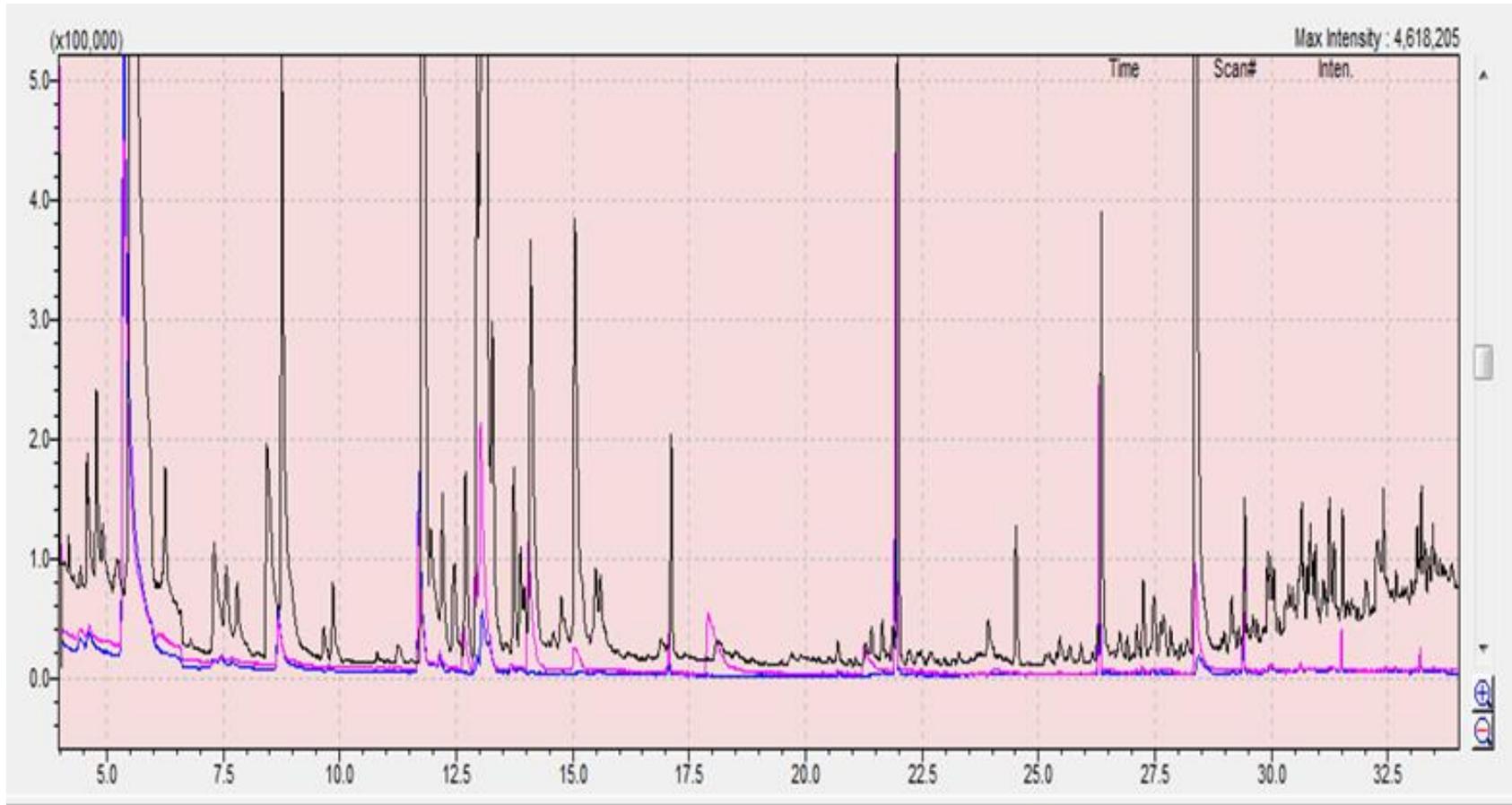


Figura A1. Cromatograma comparativo de una misma muestra evaluada a tiempo T0 (negro), T1 control (rosado) y T2 control (azul).

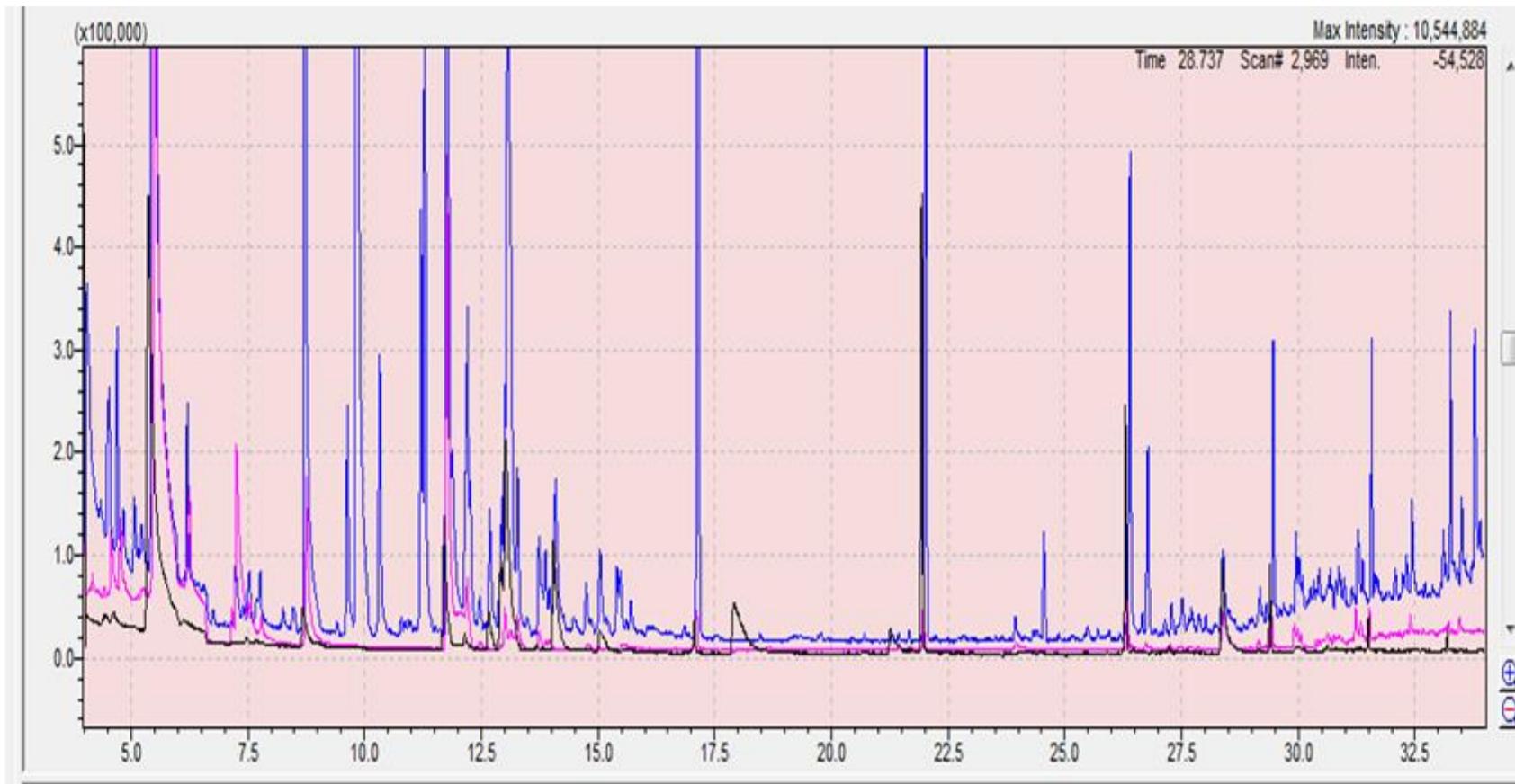


Figura A2. Cromatograma de tres muestras distintas para tiempo T1. Control (negro), ataque físico (rosado) y ataque por *D. suzukii* (azul).

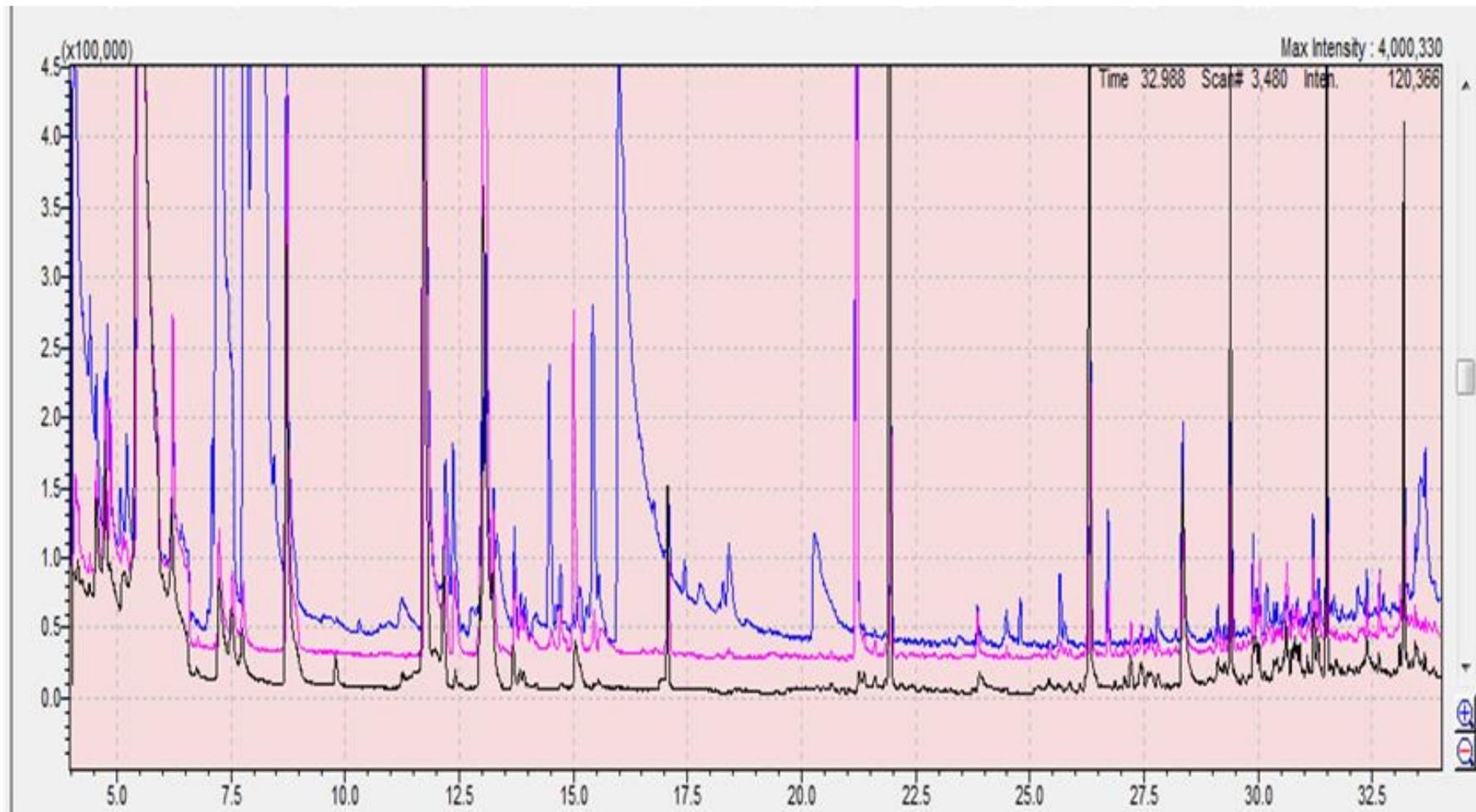


Figura A3. Cromatograma de tres muestras distintas para tiempo T2. Control (negro), ataque físico (rosado) y ataque suzukii (azul).

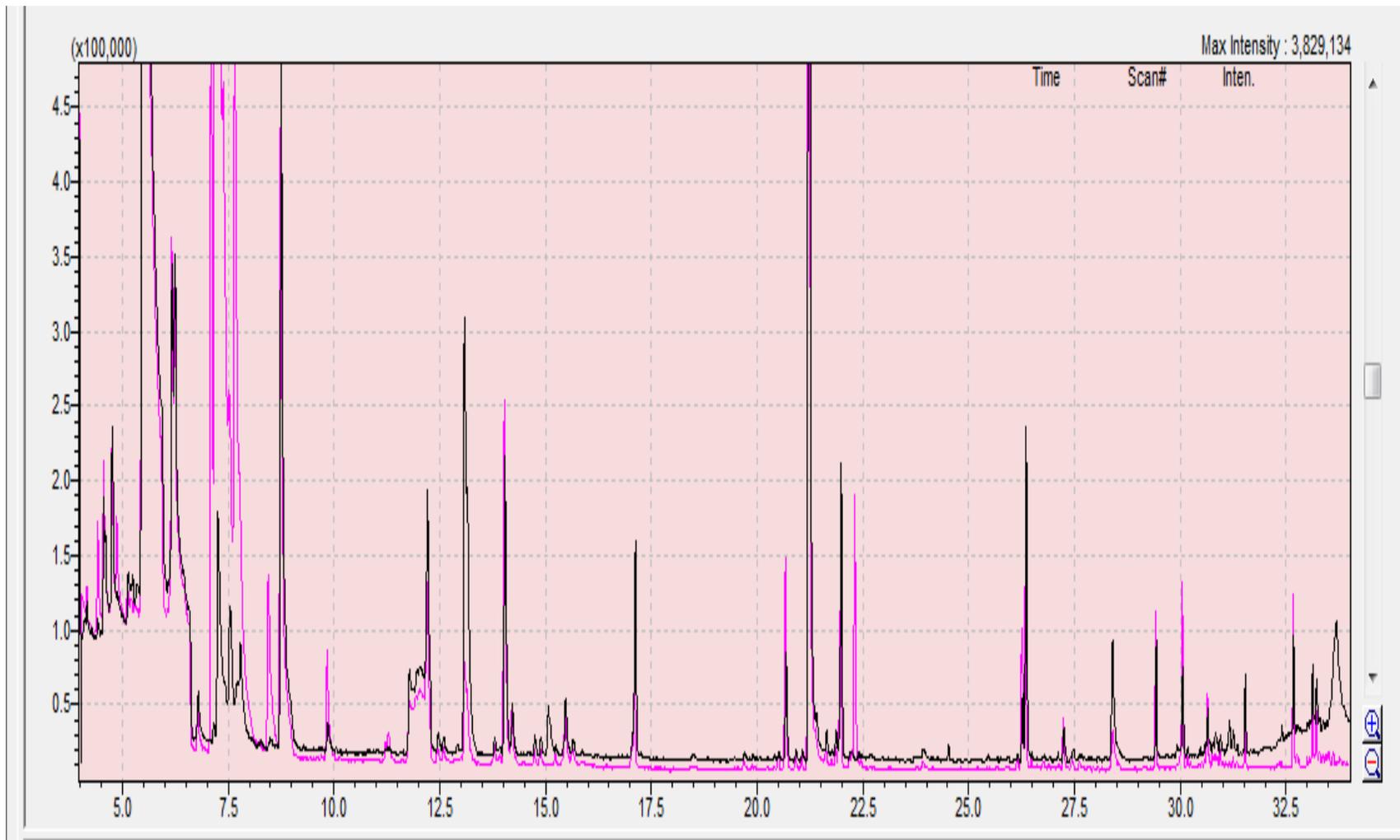


Figura A4. Cromatogramas de una misma muestra evaluada a tiempo T0 (negro) y T2 control (rosado).

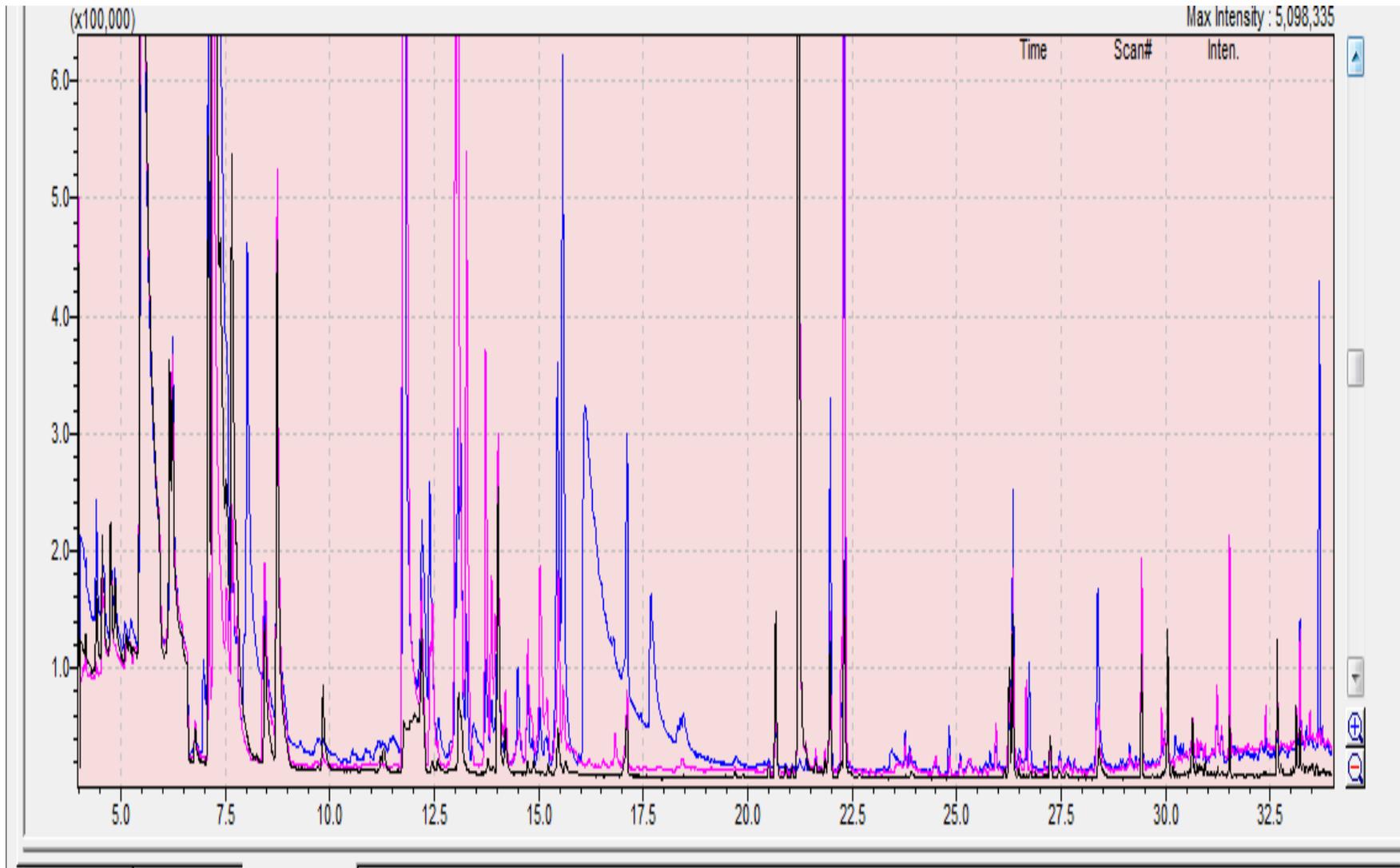


Figura A5. Cromatograma de tres muestras distintas para tiempo T2. Control (negro), ataque físico (rosado) y ataque por *D. sukukii* (azul).