



**Ciencia y Tecnología**

Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.  
Posgrado en Ciencias Biológicas

**ANÁLISIS METABOLÓMICO DEL PROCESO DE  
MADURACIÓN DEL ENDOSPERMO LÍQUIDO Y SÓLIDO  
DE DOS CULTIVARES DE COCOTERO  
(*Cocos nucifera* L.)**

Tesis que presenta  
JOSÉ RUFINO GÓMEZ TAH

En opción al título de  
DOCTOR EN CIENCIAS  
(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)

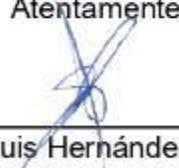
Mérida, Yucatán, México  
2025



### **RECONOCIMIENTO**

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de José Rufino Gómez Tah titulado **Análisis metabolómico del proceso de maduración del endospermo líquido y sólido de dos cultivares de cocotero (*Cocos nucifera* L.)**, fue realizado en la unidad de Biotecnología, en la línea de investigación de Agrobiotecnología en los laboratorios BTC09 y 06, del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., bajo la dirección de la Dra. Blondy Beatriz Canto Canché y la codirección del Dr. Ignacio Rodrigo Islas Flores, dentro de la opción Biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente



---

Dr. José Luis Hernández Stefanoni  
Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 27 de mayo de 2025

## DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de investigación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma: \_\_\_\_\_



M. en C. José Rufino Gómez Tah

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Biología Integrativa y en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y forma parte del proyecto titulado “Análisis de semillas de cocotero (*Cocos nucifera* L.) con diferente grado de madurez para determinar el efecto del proteoma y el metaboloma en la calidad del endospermo líquido y sólido” CB 2017-2018-A1-S-10298, cuyo responsable técnico es el Dr. Ignacio Rodrigo Islas Flores.

## AGRADECIMIENTOS

A la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI), por la beca No. 774047 para la realización de mis estudios de Doctorado, en el periodo 2020-2024.

A la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI), por el financiamiento al proyecto " Análisis de semillas de cocotero (*Cocos nucifera* L.) con diferente grado de madurez para determinar el efecto del proteoma y el metaboloma en la calidad del endospermo líquido y sólido ", clave CB 2017-2018-A1-S-10298.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C. (CICY), por la oportunidad de cursar el Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas y por permitirme el acceso a sus instalaciones, aulas, laboratorios y equipos, en particular a la Unidad de Biología integrativa y a la Unidad de Biotecnología.

A mi Directora de Tesis, la Dra. Blondy Beatriz Canto-Canché, gracias por la oportunidad de integrarme a su grupo de investigación en la Unidad de Biotecnología. Gracias por su guía académica, por creer en mí incluso cuando yo dudaba, por su dedicación constante, su confianza, paciencia y su amistad sincera. Su apoyo ha sido una fuente firme de motivación y crecimiento intelectual a lo largo de este camino y me llevo todo lo aprendido con profunda gratitud y admiración.

Al Dr. Ignacio Rodrigo Islas Flores, Co-Director de esta tesis, por permitirme formar parte de su grupo de investigación en la Unidad de Biología Integrativa, por facilitar las condiciones necesarias para el desarrollo de este trabajo, y por su apoyo académico, confianza, disposición constante y acompañamiento generoso a lo largo de este proceso formativo.

A todos los profesores investigadores que formaron parte de los distintos comités tutoriales, predoctorales y de revisión de tesis: Dr. Eliel Ruiz May, Dr. Luis Sáenz Carbonell, Dra. Marcela Gamboa Angulo, Dra. Ileana Echevarría Machado, Dr. Roberto Vázquez Euán, Dr. Sergio Peraza Sánchez, por sus comentarios, sugerencias y todas las aportaciones para el desarrollo y culminación de este proyecto de investigación.

Al Dr. Juan Luis Monribot Villanueva y al Dr. José Antonio Guerrero Analco, por su apoyo técnico y académico en el análisis e interpretación de los resultados del estudio metabolómico por cromatografía de líquidos y espectrometría de masas.

Al M. en C. Miguel Alonso Tzec-Simá, por su valiosa orientación en el laboratorio 06 de la Unidad de Biología Integrativa y en las salidas al campo. Gracias por su confianza, por la amistad sincera y por estar siempre dispuesto a ayudar, con generosidad y buena voluntad.

Al Dr. Cesar de los Santos Briones por su apoyo y orientación en los proyectos desarrollados en el laboratorio BTC09 de la Unidad de Biotecnología, además de su amistad y confianza.

A la Dra. Marcela Gamboa Angulo y a la M. en C. Leticia Medina Baizabal, por su valioso apoyo técnico, por facilitar el acceso a equipos y materiales necesarios para el procesamiento de material biológico, y por sus oportunas recomendaciones en el área de productos naturales, que enriquecieron significativamente este trabajo.

A la Dra. Rosa María Galaz Ávalos, por facilitar y brindar apoyo técnico en el uso de los equipos que estuvieron a su cargo en la Unidad de Biología Integrativa.

Al personal de Servicios de Posgrado y de la Coordinación de Docencia, por su gestión y acompañamiento en todos los trámites relacionados con exámenes, becas, constancias y control escolar. En especial, gracias a las Lcdas. Alejandra Arceo García, Landy Rodríguez Solís, Crystal Chuc Mex, Liligelia García Cano y Nancy Sulub Herrera. Su labor, muchas veces detrás de escenas, es fundamental para que el camino de los estudiantes sea posible.

A todas las valiosas amistades que tuve la dicha de cosechar durante todos los años de mi estancia en el CICY, y también a aquellas que desde fuera de la institución estuvieron conmigo, gracias por acompañarme hasta hoy, por su apoyo sincero y constante, en lo académico, en lo personal, por su calidez en los días grises, por las vivencias y las risas que rompieron rutinas, por los gestos pequeños que significaron tanto, por estar siempre presentes en el momento oportuno. A esas personas que hicieron mucho más llevadera y significativa esta etapa de formación, evito mencionar nombres para no cometer el error de olvidar a alguien, pero sé que quienes realmente fueron importantes se reconocerán en estas palabras. A ustedes, mi gratitud profunda, lealtad sincera y afecto siempre.

## **DEDICATORIAS**

Al creador, por el regalo de la vida.

A mis padres Teresa y Alfredo, por haberme brindado todo lo que he necesitado, por todo su amor, paciencia y confianza, por alentarme todos los días a luchar por mis sueños, por sus valores y enseñanzas depositadas en mí que me acompañan en cada paso.

A mis hermanos y hermanas, por el ejemplo que me transmiten al ser personas de bien, por el cariño, comprensión y gran ayuda en todos los aspectos. Gracias a Adriana, Tere, Alfredo, Carlos, Joel, Yuraí y también a la Tía Trinidad (†).

A mi gran amigo Bartolomé (Bart), por haber sido un apoyo incondicional en cada paso de mi formación en el CICY, hasta que su tiempo en este mundo llegó a su fin. Aunque ya no estás físicamente, tu compañía, afecto y lealtad siguen presentes y siempre serás recordado con gratitud y cariño.

## PRODUCTOS GENERADOS

### I. Artículos científicos

- Gómez-Tah, R., Islas-Flores, I., Félix, J. W., Granados-Alegría, M. I., Tzec-Simá, M., Guerrero-Analco, J. A., Monribo-Villanueva, J. L., y Canto-Canché, B. (2023). Untargeted metabolomics analysis of liquid endosperm of *Cocos nucifera* L. at three stages of maturation evidenced differences in metabolic regulation. *Horticulturae*, 9(8), 866.
- Félix, J. W., Granados-Alegría, M. I., Gómez-Tah, R., Tzec-Simá, M., Ruíz-May, E., Canto-Canché, B., e Islas-Flores, I. (2023). Proteome landscape during ripening of solid endosperm from two different Coconut cultivars reveals contrasting carbohydrate and fatty acid metabolic pathway modulation. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(13), 10431.
- Granados-Alegría, M. I., Canto-Canché, B., Gómez-Tah, R., Félix, J. W., Tzec-Simá, M., Ruiz-May, E., & Islas-Flores, I. (2024). Proteomic Profiling of *Cocos nucifera* L. Zygotic Embryos during Maturation of Dwarf and Tall Cultivars: The Dynamics of Carbohydrate and Fatty Acid Metabolism. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(15), 8507.
- Gómez-Tah, R., Carreón-Anguiano, K. G., Pech-Balan, E., Ek-Hernández, G. E., De los Santos-Briones, C., Islas-Flores, I., & Canto-Canché, B. (2023). *Pseudocercospora fijiensis* Conidial Germination Is Dominated by Pathogenicity Factors and Effectors. *Journal of Fungi*, 9(10), 970.

### II. Capítulos de libros

- Canto Canché, B. B., Chi Manzanero, B. H. & Gómez Tah, J. R. Los habitantes invisibles, ¿amigos o enemigos? Descubriendo mi Talento (1era. Ed., pp. 51-65). ISBN: 978-607-7823-46-9. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.
- De los Santos Briones, C., Gómez Tah, J. R., Vila Luna, S. E., Todd, J. N., & Carreón Anguiano, K. G. Biotecnología para todos y todas: usos cotidianos. Descubriendo mi Talento (1era. Ed., pp. 90-100). ISBN: 978-607-7823-57-5. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.
- Canto Canché, B. B., De los Santos Briones, C., Gómez Tah, J. R., Todd, J. N., & Carreón Anguiano, K. G. Proteínas, luces, cámara y acción. Descubriendo mi Talento (1era. Ed., pp. 76-84). ISBN: 978-607-7823-04-1. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

### III. Dirección de tesis

- Alcocer-Itzincab, M. (2024). Análisis de la expresión de genes de la ruta de biosíntesis de Yanutonas en conidios de *Pseudocercospora fijiensis*. Tesis de Licenciatura. Licenciatura en Biología. Instituto Tecnológico de Tizimín. Tecnológico Nacional de México Campus Tizimín. En codirección con la Dra. Blondy Beatriz Canto Canché.

### IV. Actividades de divulgación

- Taller “Los habitantes invisibles, ¿amigos o enemigos?”. Programa Talento CICY 2021. Centro de Investigación Científica de Yucatán A. C. Mérida, Yucatán, México. Septiembre del 2021.
- Taller “Biotecnología para todos y todas, usos cotidianos”. Programa Talento CICY 2023. Centro de Investigación Científica de Yucatán A. C. Mérida, Yucatán, México. Septiembre del 2023.
- Taller “Proteínas, luces, cámara y acción”. Programa Talento CICY 2024. Centro de Investigación Científica de Yucatán A. C. Mérida, Yucatán, México. Agosto del 2024.

### V. Congresos

- Gómez Tah, J. R., Islas Flores, I. R., Tzec Simá, M. A., Ruiz May, E., Guerrero Analco, J. A., Monribot Villanueva, J. L., y Canto Canché, B. B. Metabolomic analysis of liquid endosperm of *Cocos nucifera* L. in three stages of maturation. XXXIII Congreso Nacional de Bioquímica. Sociedad Mexicana de Bioquímica. 16-21 de octubre de 2022. Mérida, Yucatán, México.
- Gómez-Tah, J. R., Islas Flores, I., Tzec-Simá, M. A., Guerrero Analco, J. A., Monribot Villanueva, J. L., y Canto-Canché, B. Análisis metabólico dirigido y no dirigido del endospermo líquido de coco (*Cocos nucifera* L.) en tres estadios de maduración. II Congreso Internacional de Agroecosistemas. Tecnológico Nacional de México. 24-26 de abril de 2024. Conkal, Yucatán, México.

---

---

## ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO I</b> .....	<b>3</b>
<b>ANTECEDENTES</b> .....	<b>3</b>
1.1 Generalidades del cocotero .....	3
1.2 Características morfológicas del cocotero.....	4
1.3 Origen del cocotero.....	4
1.4 Variedades del cocotero .....	5
1.5 Producción mundial y nacional del coco .....	5
1.6 Características del coco.....	7
1.6.1 Características del endospermo.....	8
1.6.2 Biología del desarrollo del endospermo .....	10
1.6.3 Composición del endospermo.....	11
1.6.4 Fitohormonas en el endospermo líquido .....	13
1.6.5 Variación de compuestos durante la maduración de los frutos de coco .....	14
1.6.6 Cambios metabólicos en la maduración de los frutos .....	18
1.7 Metabolómica .....	21
1.7.1 Metabolómica y recursos de análisis.....	22
1.7.2 Metabolómica en cocotero .....	27
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>30</b>
<b>PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN</b> .....	<b>31</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>32</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>32</b>
<b>DIAGRAMA EXPERIMENTAL</b> .....	<b>33</b>

---

<b>CAPÍTULO II</b> .....	<b>34</b>
<b>UNTARGETED METABOLOMICS ANALYSIS OF LIQUID ENDOSPERM OF COCOS NUCIFERA L. AT THREE STAGES OF MATURATION EVIDENCED DIFFERENCES IN METABOLIC REGULATION</b> .....	<b>34</b>
2.1 INTRODUCTION .....	34
2.2 MATERIALS AND METHODS .....	37
2.2.1 Collection and storage of samples .....	37
2.2.2 Extraction and sample preparation for LC-MS analyses.....	37
2.2.3 Metabolomic analysis on UPLC-ESI-MS-QTOF .....	37
2.2.4. Data analysis .....	38
2.3 RESULTS .....	39
2.3.1 Cluster analysis and PCA .....	39
2.3.2 Enrichment of metabolic pathways during ripening .....	41
2.3.3 Annotated chemical classes.....	43
2.4 DISCUSSION .....	45
<b>CAPITULO III</b> .....	<b>51</b>
<b>COMPARACIÓN DE LAS RUTAS METABÓLICAS ENRIQUECIDAS DURANTE LA MADURACIÓN DEL ENDOSPERMO LÍQUIDO Y SÓLIDO DE COCOS NUCIFERA L. EN DOS VARIEDADES CONTRASTANTES; ALTO DEL PACÍFICO MEXICANO Y ENANO VERDE DE YUCATÁN</b> .....	<b>51</b>
<b>3.1 INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>51</b>
3.2.1 Colecta de material vegetal.....	53
3.2.2 Medición del volumen y pH .....	54
3.2.3 Extracción de metabolitos del endospermo sólido asistida por ultrasonificación .....	54
3.2.4 Extracción de metabolitos del endospermo líquido por partición líquido-líquido .....	55
3.2.5 Análisis metabolómico por UPLC-ESI-MS-QTOF.....	55
3.2.6 Análisis de datos.....	56
3.3 RESULTADOS .....	57

---

---

3.3.1 Obtención de material vegetal y preparación de las muestras .....	57
3.3.2 Medición de parámetros fisicoquímicos .....	60
3.3.3 Análisis metabolómico no dirigido .....	61
DISCUSIÓN.....	78
<b>CAPITULO IV .....</b>	<b>82</b>
<b>PERFIL DE COMPUESTOS FENÓLICOS DEL ENDOSPERMO LÍQUIDO Y SÓLIDO DE COCOS <i>NUCIFERA</i> L. EN TRES ESTADIOS DE MADURACIÓN DE LAS VARIEDADES ALTO DEL PACÍFICO MEXICANO Y ENANO VERDE DE YUCATÁN.....</b>	<b>82</b>
4.1 INTRODUCCION.....	82
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	84
4.2.1 Análisis del perfil de compuestos fenólicos por UPLC-MS/MS.....	84
4.3. RESULTADOS .....	85
4.4 DISCUSIÓN.....	89
<b>CAPITULO V. DISCUSIÓN GENERAL, CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....</b>	<b>91</b>
5.1 DISCUSIÓN GENERAL.....	91
5.2 CONCLUSION.....	96
5.3 PERSPECTIVAS .....	98
BIBLIOGRAFÍA.....	100

---

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.1.</b> Estructuras y tejidos de la fruta de cocotero en germinación (Tzec-Simá et al., 2023).....	8
<b>Figura 1.2.</b> Perfil de ácidos grasos contenidos en muestras de aceite extraído de semillas de <i>C. nucifera</i> en diferentes etapas de desarrollo. ....	16
<b>Figure 2.1.</b> Untargeted metabolomic analysis and physical appearance of fruits and liquid coconut endosperm.....	40
<b>Figure 2.2.</b> Comparison of pathway enrichment in immature vs. intermediate stages. (A) Metabolic pathways with over-accumulated metabolites.....	42
<b>Figure 2.3.</b> Comparison of pathways enrichment in intermediate vs. mature stages. (A) Metabolic pathways with over-accumulated metabolites.....	43
<b>Figure 2.4.</b> Classification of the accumulated metabolites in the liquid endosperm of <i>C. nucifera</i> L. during ripening. (A) Classes of over-accumulated compounds in the comparison of immature vs. intermediate stages.....	44
<b>Figura 3.1.</b> Inflorescencias y racimos de frutos de <i>Cocos nucifera</i> L.....	57
<b>Figura 3.2.</b> Agrupamiento de frutos de acuerdo a la variedad y el grado de maduración para la preparación de muestras compuestas. ....	58
<b>Figura 3.3.</b> Frutos de <i>Cocos nucifera</i> L. inmaduros, intermedios y maduros.....	59
<b>Figura 3.4.</b> Gráfico de barras de los parámetros fisicoquímicos medidos. ....	61
<b>Figura 3.5.</b> Análisis de componentes principales (PCA) de iones detectados por UPLC-MS-QTOF.....	62
<b>Figura 3.6.</b> Diagramas de Venn con el metaboloma central entre variedades y tipos de endospermo. ....	63
<b>Figura 3.7.</b> Diagramas de dispersión tipo volcán de la variedad alto del Pacífico mexicano. ....	64
<b>Figura 3.8.</b> Diagramas de dispersión tipo volcán de la variedad enano verde de Yucatán. A) Comparación entre el endospermo sólido intermedio/inmaduro. ....	65
<b>Figura 3.9.</b> Análisis de enriquecimiento de rutas en la variedad alto del Pacífico mexicano. Comparación de rutas metabólicas entre el endospermo sólido intermedio/inmaduro.....	67

---

<b>Figura 3.10.</b> Análisis de enriquecimiento de rutas en la variedad alto del Pacífico mexicano. Comparación de rutas metabólicas entre el endospermo sólido maduro/intermedio. ....	68
<b>Figura 3.11.</b> Análisis de enriquecimiento de rutas en la variedad alto del Pacífico mexicano. Comparación de rutas metabólicas entre el endospermo líquido intermedio/inmaduro. ....	69
<b>Figura 3.12.</b> Análisis de enriquecimiento de rutas en la variedad alto del Pacífico mexicano. Comparación de rutas metabólicas entre el endospermo líquido maduro/intermedio. ....	70
<b>Figura 3.13.</b> Análisis de enriquecimiento de rutas en la variedad enano verde de Yucatán. Comparación de rutas metabólicas entre el endospermo sólido intermedio/inmaduro.....	71
<b>Figura 3.14.</b> Análisis de enriquecimiento de rutas en la variedad enano verde de Yucatán. Comparación de rutas metabólicas entre el endospermo sólido maduro/intermedio. ....	72
<b>Figura 3.15.</b> Análisis de enriquecimiento de rutas en la variedad enano verde de Yucatán. Comparación de rutas metabólicas entre el endospermo líquido intermedio/inmaduro. ....	73
<b>Figura 3.16.</b> Análisis de enriquecimiento de rutas en la variedad enano verde de Yucatán. Comparación de rutas metabólicas entre el endospermo líquido maduro/intermedio. ....	74

---

---

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.1. Clasificación taxonómica del cocotero .....	3
Cuadro 1.2. Cronología del desarrollo de la fruta de <i>C. nucifera</i> . .....	9
Cuadro 1.3. Concentración porcentual de los ácidos grasos contenidos en varios aceites de semillas. ....	12
Cuadro 1.4. Fitohormonas identificadas en las muestras de endospermo líquido extraído de frutos en dos etapas de desarrollo de <i>Cocos nucifera</i> . ....	14
Cuadro 1.5. Plataformas tecnológicas más utilizadas para la identificación y cuantificación de metabolitos, ventajas y limitaciones.....	23
Cuadro 1.6. Lista de bases de datos de acceso abierto más usadas para la identificación de metabolitos en la metabolómica. ....	25
Cuadro 3.1. Claves de las palmeras y estadios de maduración de los frutos seleccionados para formar las muestras compuestas.....	59
Cuadro 3.2. Identificación de iones y características. ....	76
Cuadro 4.1. Compuestos fenólicos presentes en los extractos del endospermo líquido y sólido de la variedad alto del Pacífico mexicano en tres estadios de maduración.....	87
Cuadro 4.2. Compuestos fenólicos presentes en los extractos del endospermo líquido y sólido de la variedad enano verde de Yucatán en tres estadios de maduración. ....	88

---

## ABREVIATURAS

APM	Alto del Pacífico Mexicano
EVY	Enano Verde de Yucatán
GC-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
LC-MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
PCA	Análisis de componentes principales (Principal Component Analysis)
PLS-DA	Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (Partial Least Squares Discriminant Analysis)
VIP	Valor de importancia de la variable (Variable Importance in Projection)
UHPLC	Cromatografía líquida de ultra alta presión
ESI	Ionización por electrospray
TOF	Tiempo de vuelo (Time of Flight)
QC	Control de calidad
RT	Tiempo de retención
m/z	Relación masa/carga
KEGG	Base de datos de genes y genomas de Kyoto (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)
HMDB	Base de datos de metabolitos humanos (Human Metabolome Database)
FC	<i>Fold Change</i>
FDR	Tasa de descubrimiento falso (False Discovery Rate)
ANOVA	Análisis de varianza
MW	Peso molecular (Molecular Weight)
RSD	Desviación estándar relativa (Relative Standard Deviation)
R <sup>2</sup>	Coefficiente de determinación
Q <sup>2</sup>	Valor predictivo del modelo PLS-DA
TIC	Cromatograma de iones totales (Total Ion Chromatogram)
CV	Coefficiente de variación
ppm	Partes por millón
g	gramo
mg	miligramos
µg	microgramos
mL	mililitro

---

$\mu\text{L}$	microlitro
h	hora
min	minuto
s	segundo
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
FA	Ácidos grasos
AA	Aminoácidos
TCA	Ciclo del ácido tricarboxílico
MeOH	Metanol
EtOH	Etanol
H <sub>2</sub> O	Agua
CH <sub>3</sub> COOH	Ácido acético
HCl	Ácido clorhídrico
NaOH	Hidróxido de sodio
NaCl	Cloruro de sodio
TFA	Ácido trifluoroacético
BHT	Butilhidroxitolueno

---

## RESUMEN

*Cocos nucifera* L. es la palmera más cultivada en el mundo, debido a que se utiliza para obtener materias primas y alimentos. La mayoría de los estudios metabolómicos y de perfiles químicos realizados en el coco se han centrado en la determinación del contenido de ácidos grasos del aceite de coco y la vida útil del agua de coco. A pesar de la importancia económica de esta especie, la maduración del coco es un proceso biológico complejo, escasamente estudiado desde el punto de vista metabólico, y los cambios bioquímicos que ocurren durante la maduración del fruto son poco conocidos. El presente estudio integró un enfoque combinado de análisis metabolómicos dirigidos y no dirigidos para caracterizar los cambios en las rutas metabólicas del endospermo líquido y sólido de frutos de *C. nucifera*, de las variedades enano verde de Yucatán (EVY) y alto del Pacífico mexicano (APM), recolectados en tres etapas de maduración.

Los resultados revelaron diferencias metabólicas notables entre variedades, tejidos y estadios de maduración. La variedad APM mostró una mayor diversidad de rutas enriquecidas, destacando la activación temprana de la biosíntesis de flavonoides, esteroides y aminoácidos aromáticos, y una transición hacia rutas de metabolismo de lípidos y carbohidratos en etapas avanzadas. En contraste, la variedad EVY presentó una regulación más específica de rutas asociadas a la biosíntesis de carbohidratos, diterpenoides y carotenoides, lo que sugiere estrategias distintas en el balance entre defensa antioxidante y acumulación de reservas. Ambas variedades compartieron la activación de rutas relacionadas con la defensa, como el metabolismo del ácido araquidónico y rutas energéticas asociadas con la maduración.

Asimismo, se evidenció una reorganización progresiva del metabolismo durante la transformación del endospermo líquido a sólido, reflejada en la activación diferencial de rutas de biosíntesis de lípidos, remodelación de la pared celular, y rutas relacionadas con la senescencia y el almacenamiento. Las diferencias en la concentración de compuestos fenólicos y su reducción con la madurez también sugieren un cambio funcional desde la protección temprana hacia el almacenamiento energético.

Estos hallazgos subrayan la complejidad del metabolismo del coco durante la maduración y resaltan el valor de la metabolómica como herramienta para estudiar procesos fisiológicos en frutos tropicales no climatéricos. Además, aportan información relevante para la caracterización funcional de variedades locales y la exploración de aplicaciones biotecnológicas basadas en los perfiles metabólicos diferenciados.

## ABSTRACT

*Cocos nucifera* L. is the most widely cultivated palm species in the world, valued for its use in producing raw materials and food products. Most metabolomic studies and chemical profiles on coconut have focused on determining the fatty acid composition of coconut oil and the shelf life of coconut water. Despite the economic importance of this species, coconut maturation is a complex biological process that remains scarcely studied from a metabolic perspective, and the biochemical changes occurring during fruit maturation are still not well understood.

This study employed a combined approach of targeted and untargeted metabolomic analyses to characterize changes in metabolic pathways in the liquid and solid endosperm of *C. nucifera* fruits from two varieties: enano verde de Yucatán (EVY) and alto del Pacífico mexicano (APM), collected at three stages of maturation.

The results revealed significant metabolic differences between varieties, tissues, and maturation stages. The APM variety exhibited a broader diversity of enriched pathways, with early activation of flavonoid, steroid, and aromatic amino acid biosynthesis, followed by a shift toward lipid and carbohydrate metabolism in later stages. In contrast, the EVY variety showed a more specific regulation of pathways associated with carbohydrate, diterpenoid, and carotenoid biosynthesis, suggesting distinct strategies in balancing antioxidant defense and reserve accumulation. Both varieties shared the activation of defense-related pathways, such as arachidonic acid metabolism, and energy-related routes associated with maturation.

Additionally, a progressive metabolic reorganization was observed during the transition from liquid to solid endosperm, reflected in the differential activation of lipid biosynthesis, cell wall remodeling, and senescence- and storage-related pathways. Differences in phenolic compound concentrations and their decline during maturation also suggest a functional shift from early antioxidant protection to energy storage.

These findings underscore the metabolic complexity of coconut fruit maturation and highlight the value of metabolomics as a tool for studying physiological processes in non-climacteric tropical fruits. Moreover, they provide relevant insights for the functional characterization of local varieties and the exploration of biotechnological applications based on their distinct metabolic profiles.



## INTRODUCCIÓN

El cocotero (*Cocos nucifera* L.), es una especie perenne de gran importancia agroecológica, económica y sociocultural en las regiones tropicales del mundo. Su fruto, una drupa altamente especializada, constituye una estructura biológica particular que permite el estudio de procesos fisiológicos y bioquímicos relacionados con la diferenciación celular, la acumulación de reservas, la defensa vegetal y la transición entre fases de desarrollo. Uno de sus principales tejidos, el endospermo, derivado del proceso de doble fecundación, presenta una característica inusual: se origina como un líquido sincitial rico en metabolitos primarios y secundarios, que con el tiempo se transforma progresivamente en una matriz sólida de almacenamiento. Esta transformación implica una reorganización metabólica sustancial, en la que convergen múltiples rutas involucradas en el metabolismo primario y secundario, reflejando un sistema dinámico de adaptación y maduración (Foale, 2003; Rival y Divoux, 2003).

El coco es considerado un fruto no climatérico; por tanto, su maduración depende de mecanismos endógenos y ambientales que regulan la expresión génica, la actividad enzimática y la reconfiguración metabólica, sin estar mediada por etileno (Bapat et al., 2010). En este contexto, la metabolómica se ha consolidado como una herramienta clave para analizar los cambios dinámicos en el metabolismo vegetal. Esta disciplina permite estudiar de manera sistemática los perfiles de compuestos de bajo peso molecular, y a través de enfoques dirigidos y no dirigidos, proporciona una visión amplia del estado metabólico de los tejidos en distintos estados fisiológicos (Fiehn, 2002; Patti et al., 2012).

En México se cultivan diversas variedades de coco, generalmente enano verde de Yucatán (EVY) y alto del Pacífico mexicano (APM), las cuales presentan diferencias morfológicas, reproductivas, funcionales, adaptativas, así como de calidad del fruto. No obstante, la base bioquímica que sustenta estas diferencias aún no ha sido caracterizada de manera exhaustiva. En particular, se carece de estudios comparativos enfocados en las rutas metabólicas que se regulan diferencialmente durante la maduración del endospermo líquido y sólido en estas variedades. La limitada información interfiere con el aprovechamiento científico y tecnológico del recurso, así como su valorización agroindustrial y nutracéutica.

Además, la clasificación precisa de la madurez del fruto en campo representa un desafío metodológico persistente. Las características fenotípicas externas, como el color del exocarpo o el tamaño del fruto, no siempre reflejan con fidelidad el estado metabólico interno, lo que dificulta la estandarización de los análisis y la interpretación fisiológica de los datos (Javel et al., 2018).

En este sentido, el uso de enfoques metabolómicos orientadas al estudio de las rutas reguladas a lo largo del desarrollo permite una comprensión más objetiva del proceso de maduración, más allá de los indicadores morfológicos tradicionales.

El presente trabajo emplea una estrategia combinada de análisis metabolómicos dirigidos y no dirigidos para caracterizar los cambios en las rutas metabólicas del endospermo líquido y sólido de frutos de EVY y APM recolectados en tres etapas representativas de maduración. Se abordaron metabolitos pertenecientes a vías centrales del metabolismo primario (carbohidratos, aminoácidos, ácidos orgánicos) y secundario (compuestos fenólicos, lípidos bioactivos), considerando sus variaciones según tipo de tejido, variedad, y maduración, además de la metodología desarrollada.

Más allá de la mera presencia o ausencia de metabolitos, este estudio se enfocó en la identificación de rutas metabólicas diferencialmente reguladas, con el fin de dilucidar los patrones fisiológicos que subyacen a la transformación del endospermo líquido a sólido, así como a los mecanismos de acumulación de reservas, defensa antioxidante y adaptación al estrés durante la maduración. A través del análisis de enriquecimiento de rutas, se buscaron asociaciones funcionales entre grupos de metabolitos y procesos biológicos específicos, con el objetivo de construir una visión integradora del metabolismo del fruto.

Los resultados generados permitirán profundizar en el entendimiento de la fisiología del coco como fruto tropical no climatérico, aportar consideraciones relevantes para la valorización de variedades locales y sentar bases para aplicaciones futuras en biotecnología, manejo agronómico y desarrollo de productos derivados. De manera paralela, este estudio contribuye a fortalecer el uso de herramientas ómicas en especies tropicales de interés económico, promoviendo el conocimiento funcional de los recursos genéticos locales bajo un enfoque multiescala.

## CAPÍTULO I

## ANTECEDENTES

## 1.1 Generalidades del cocotero

*Cocos nucifera* L. es una especie de palmera conocida comúnmente como cocotero o palma de coco, es una de las plantas tropicales más representativas y con gran importancia económica. El cocotero también es llamado “el árbol de la vida”, “el árbol del cielo” o “el árbol de los mil usos” debido a que es una planta de gran porte, belleza y una excelente fuente de materias primas. Desde el inicio de las civilizaciones, la palma de coco ha sido utilizada como fuente de alimento, fibras y combustible. Actualmente, el aceite de coco tiene alta demanda, es útil en la industria alimentaria, en la industria cosmética, en la industria productora de biocombustibles y, en menor medida, en la producción de medicamentos. Diferentes partes del cocotero también son utilizadas para la obtención de azúcar y alcohol. Esta planta es una monocotiledónea, monoica y perenne (Briones y Barrera, 2016; Zizumbo-Villarreal et al., 2008).

*Cocos nucifera* es una especie diploide con 32 cromosomas ( $2n = 32$ ), con hibridación intraespecífica. Esta especie pertenece la familia Arecaceae, siendo una especie monotípica, la única del género *Cocos*, según el Sistema Integrado de Información Taxonómica (ITIS, por sus siglas en inglés) (Alonso-Esquivel et al., 2008; Santos et al., 1996) (Cuadro 1.1).

**Cuadro 1.1.** Clasificación taxonómica del cocotero (ITIS, 2020).

Jerarquía taxonómica		
<b>Reino</b>	Plantae	Plantas
<b>Subreino</b>	Viridiplantae	Plantas verdes
<b>Infrareino</b>	Streptofita	Plantas terrestres
<b>Superdivisión</b>	Embriofitas	Plantas gametofitas
<b>División</b>	Traqueofitas	Plantas vasculares
<b>Subdivisión</b>	Espermatofita	Plantas con semillas
<b>Clase</b>	Magnoliopsida	Plantas con embriones dicotiledóneos
<b>Superorden</b>	Lilianae	Plantas herbáceas con flores
<b>Orden</b>	Arecales	Palmas
<b>Familia</b>	Arecaceae	Palmeras
<b>Género</b>	<i>Cocos</i> L.	Palma de coco
<b>Especie</b>	<i>Cocos nucifera</i> L.	Cocotero

## **1.2 Características morfológicas del cocotero**

El cocotero es una palmera alta y erecta que puede medir hasta 25 m de altura, sin embargo, en condiciones favorables puede alcanzar hasta los 30 m. La palma de coco posee una corona de hojas dispuesta sobre el extremo superior del tallo, siendo éste el único punto de crecimiento. Las hojas son de gran tamaño, de forma pinnada, con un raquis principal del que surgen numerosos foliolos lanceolados dispuestos en un solo plano en ambos lados del raquis (Alonso-Esquivel et al., 2008). El tronco de las palmeras recibe el nombre de estipe o estípite, para diferenciarlo del de los árboles; este es delgado y tiende a curvarse por el peso de sus frutos o por acción del viento. Posee una corteza con coloración grisácea o parda, con ligeras rajaduras que le dan un aspecto áspero. El sistema radicular está formado por varias raíces primarias, con grandes cantidades de raicillas que fijan fuertemente a la planta en el suelo, brindando gran resistencia ante el embate de los fuertes vientos de la costa (Niral y Jerard, 2018).

Briones y Barrera (2016) mencionan que, en términos botánicos estrictos, la palmera de coco no es un árbol, pues no tiene ramas y posee un cambium vascular con crecimiento secundario.

## **1.3 Origen del cocotero**

El cocotero es considerado como una especie muy antigua, con una larga historia de domesticación. Se cree que los primeros humanos comenzaron a domesticar palmas de coco en los asentamientos costeros tropicales. Los nómadas de la edad de piedra influyeron en la distribución geográfica y diversificación fenotípica de la especie. Fijar un origen geográfico para esta especie es objeto de controversia; la mayoría de los investigadores y paleobotánicos proponen que esta planta es originaria del sur de Asia (Malasia, Indonesia y Filipinas), mientras que otros sostienen que el origen tuvo lugar en la costa oeste de Centroamérica y las islas adyacentes del Pacífico (Gunn et al., 2011; Baudouin y Lebrun, 2009; Harries et al., 2004). En la actualidad, la palma de coco tiene una amplia distribución en casi todas las regiones tropicales y subtropicales del mundo.

#### **1.4 Variedades del cocotero**

Dentro de la especie *C. nucifera* L. se distinguen dos variedades principales; la variedad alta y la variedad enana. Las palmeras altas son el resultado de la polinización cruzada natural (alógamas, heterocigotas) y tienen mayor valor económico, pueden crecer hasta 30 m con un tallo robusto; comienzan a florecer a los 5 años después de la siembra y continúan produciendo hasta la edad de 80 a 100 años. Los frutos son de tamaño mediano a grande y producen copra en mayor cantidad y de buena calidad, con alto contenido de aceite (Ramanandam et al., 2017). En cuanto a las palmeras enanas, éstas son resultado de la autopolinización (autógamas, menos heterocigotas que las variedades altas), son de baja estatura (de 8 a 10 m), floración temprana a los 3 o 4 años después de la siembra, y tienen una vida productiva de unos 40 a 50 años. Producen frutos que generalmente son de tamaño pequeño a mediano. Las variedades altas y enanas se han utilizado para el desarrollo de híbridos, que combinan la característica de floración temprana de los enanos y la resistencia a las enfermedades y la cualidad de alto rendimiento de los altos (Rajesh et al., 2015).

Además de las variedades ampliamente reconocidas existen numerosos cultivares y ecotipos que reflejan una adaptación local a condiciones agroecológicas específicas. Estos cultivares y ecotipos, resultado tanto de procesos de domesticación como de selección natural, presentan diferencias morfológicas, fisiológicas y bioquímicas que pueden influir en características clave del fruto, como el contenido de agua, el perfil lipídico, la composición de metabolitos secundarios y el tiempo de maduración (Batugal et al., 2005; Perera et al., 2009). El estudio de esta diversidad intraespecífica resulta esencial para comprender la plasticidad metabólica del coco y para aprovechar su potencial en programas de mejoramiento genético, conservación de germoplasma y desarrollo de productos con valor agregado (Lebrun et al., 2021).

#### **1.5 Producción mundial y nacional del coco**

Los productos principales del coco son el endospermo sólido y líquido. Desde tiempos antiguos el hombre ha sabido aprovechar este importante recurso mediante aplicaciones muy variadas, basadas en creencias culturales o tradicionales. El agua de coco es consumida como una bebida refrescante y nutritiva con importantes efectos benéficos para la salud (Janick y Larkins, 2008). Se propone que el agua de coco podría utilizarse como una alternativa importante para la rehidratación oral e incluso para la hidratación intravenosa de pacientes (Campbell-Falck et al., 2000). Otros estudios sugieren que el agua de coco puede ofrecer protección contra el infarto de

miocardio y como alternativa en el control de la hipertensión (Anurag y Rajamohan, 2003; Alleyne y Shirley, 2005).

Se calcula que en 2018 la producción mundial de cocos fue de aproximadamente 61 millones de toneladas, dejando una derrama económica de 36.3 billones de dólares. En ese año, los principales productores de coco fueron Indonesia (19 millones de toneladas), Filipinas (14 millones de toneladas) e India (12 millones de toneladas); estos tres países suman el 73% de la producción mundial. Malasia, Tailandia, Sri Lanka, Brasil, Vietnam, Papúa Nueva Guinea y México son los países que siguen en la lista de productores de coco (World Atlas, 2018).

Según datos recientes de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, 2023), la producción mundial de cocos en 2022 superó los 62 millones de toneladas, mostrando un incremento moderado respecto a los 61 millones de toneladas reportados en 2018. Este crecimiento se atribuye a la expansión de áreas cultivadas y mejoras en la productividad en regiones clave. Los principales productores continúan siendo Indonesia (18.5 millones de toneladas), Filipinas (14.7 millones de toneladas) e India (12.5 millones de toneladas), que en conjunto representan aproximadamente el 72% de la producción global. Otros países como Vietnam, Sri Lanka, Brasil y México también contribuyen significativamente, con producciones que oscilan entre 1.2 y 2.5 millones de toneladas. El valor económico del mercado global del coco se estimó en más de 40 mil millones de dólares en 2022, impulsado por la creciente demanda de productos derivados como aceite, agua y harina de coco, especialmente en mercados de Norteamérica y Europa (Statista, 2023).

México ocupa el lugar número ocho a nivel internacional desde el 2018, produciendo poco más de 1 millón de toneladas de frutos. Los estados productores de coco en México son Campeche, Colima, Chiapas, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Oaxaca, Quintana Roo, Sinaloa, Tabasco, Veracruz y Yucatán. El estado de Guerrero es el principal productor nacional, cuya producción representa el 80% de lo obtenido en el año (SADER, 2020).

En el estado de Yucatán el cultivo y aprovechamiento del cocotero se ha desarrollado desde el inicio del siglo XX, en los puertos de la costa y en algunos municipios al interior del estado. Los principales municipios productores de coco son Sinanché, Ticul y Sacalum, seguidos de Tzucacab, Oxkutzcab, Peto, Progreso, Muna, Telchac Puerto, San Felipe y Rio Lagartos. La producción de Yucatán representa el 9% de la producción nacional (Benítez-Arellano y Sosa-Alcaraz, 2017).

## 1.6 Características del coco

Botánicamente, el fruto de *C. nucifera* es descrito como una drupa fibrosa. Este fruto comienza a desarrollarse a partir de una flor femenina polinizada. Los frutos inicialmente son pequeños, crecen primero desarrollando longitud y posteriormente anchura, tienen forma elíptica y en su madurez pueden pesar hasta 8 kilogramos. La fruta del cocotero contiene un endospermo sólido con un embrión incrustado en él y una fracción líquida; estas estructuras son cubiertas y protegidas por el pericarpio (Tzec-Simá et al., 2023; Niral y Jerard, 2018).

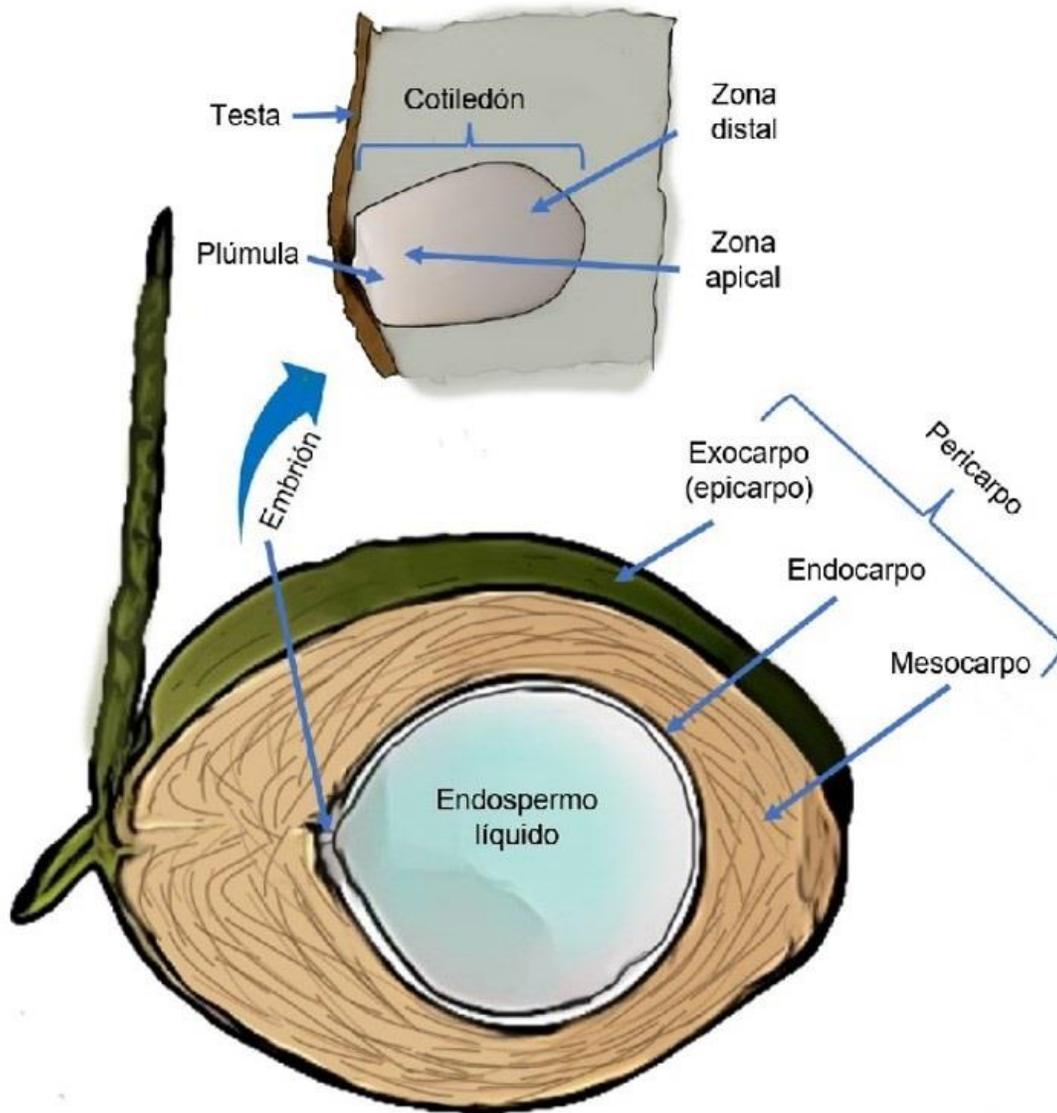
El pericarpio se divide en tres secciones bien diferenciadas (Figura 1.1):

**Exocarpio:** también llamado epicarpio, esta es la parte más externa que presenta diferentes coloraciones según la variedad y madurez.

**Mesocarpio:** corresponde a la sección intermedia del pericarpio, está inmediatamente debajo del exocarpio, tiene una consistencia fibrosa y representa más del 60% del volumen total de la fruta. El grosor de esta sección varía de 2 a 15 cm, dependiendo de la variedad y etapa de maduración.

**Endocarpio:** es la parte más dura que protege al embrión y al endospermo de la semilla. Está compuesto por celulosa, hemicelulosa y lignina. En la región distal pueden identificarse tres poros (ojos) que representan a los carpelos del ovario.

Entre el endocarpio y el endospermo sólido hay una delgada capa llamada testa, que constituye la cubierta de la semilla.



**Figura 1.1.** Estructuras y tejidos de la fruta de cocotero en germinación (Tzec-Simá et al., 2023).

### 1.6.1 Características del endospermo

El endospermo de los frutos sirve como reserva de nutrientes para el embrión durante germinación en las plantas fanerógamas. El coco tiene una característica peculiar, pues es la única fruta con nuez que desarrolla tanto endospermo sólido como líquido. Los frutos inmaduros de *C. nucifera* tienen la cavidad central llena de líquido que se reduce gradualmente durante el desarrollo del fruto, incluso en el almacenamiento postcosecha. La fracción líquida constituye una importante reserva de agua, macronutrientes y fitohormonas con importante función en el inicio

de la germinación y en el desarrollo del embrión. Si el agua de la semilla se agota por completo, la fruta pierde su capacidad de germinación. En las semillas maduras de *C. nucifera* el endospermo puede representar el 50% del peso de la semilla y la parte sólida puede alcanzar entre 0.8 y 2 cm de grosor, dependiendo de la variedad (Foale et al., 2020).

Tammes (1955) y Child (1974) fueron los primeros que describieron y midieron el tiempo de desarrollo de la fruta de coco (Cuadro 1.2). El desarrollo comienza con la etapa de floración mensual al término de cinco años después de la siembra, en intervalos mensuales. A medida que la fruta madura, el saco embrionario aumenta de tamaño, dejando una gran vacuola en el centro. Durante los primeros seis meses del desarrollo, la fruta aumenta su volumen a medida que el saco embrionario permanece lleno con endospermo líquido. Al fin de este periodo, el endospermo sólido comienza a formarse desde el extremo opuesto al tallo, extendiéndose gradualmente sobre el endocarpio. El endospermo sólido se vuelve visible a los 6-7 meses posteriores a la fertilización, visualizándose como una fina capa gelatinosa en la periferia de la cavidad del saco embrionario. A partir de esta capa gelatinosa se desarrollará rápidamente una capa interna firme y crujiente, desde el séptimo mes hasta el noveno mes (Abraham y Mateo, 1963). El endospermo sólido es una pulpa blanca que se endurece a lo largo de la maduración, debido a la deposición intracelular de lípidos y por la metilación de la pectina (Ángeles et al., 2018; Kohli y Gupta, 2015).

**Cuadro 1.2.** Cronología del desarrollo de la fruta de *C. nucifera*. (Ángeles et al., 2018; Tammes, 1955).

	Meses posteriores a la polinización																
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Floración de la flor masculina	x																
Floración de la flor femenina	x	x	x														
Fertilización y desarrollo inicial				x	x	x											
Formación del endospermo							x	x	x	x	x	x	x				
Desarrollo del embrión									x	x	x	x	x	x	x	x	x
Secado de la cáscara												x	x	x	x		
Maduración de la fruta											x	x	x	x	x	x	x
Caída de la fruta															x	x	x
Cosecha															x	x	x

En cuanto a las especies filogenéticamente cercanas a *C. nucifera*, se pueden mencionar a palmas de la familia Arecaceae. Entre estas, *Phoenix dactylifera* (palma datilera) presenta endospermo sólido de pequeño tamaño, que representa el 30% del peso del fruto, compuesto principalmente por lípidos, proteínas y minerales (Baliga et al., 2011). Los frutos de la palma datilera son una rica fuente de azúcares, acumulados principalmente en el mesocarpio, durante la maduración de los frutos. Por cada 100 g de peso seco de los frutos se pueden recuperar hasta 80 g de glucosa y fructosa. El mesocarpio también se compone de lignina, arabinoxilano, galactomanano y pectina, moléculas que se correlacionan significativamente con la dureza de la fruta y los parámetros de gomosidad y masticabilidad (Kamal et al., 2020).

Otra especie filogenéticamente cercana a *C. nucifera* es *Elaeis guineensis* (palma aceitera africana; familia Arecaceae). Esta especie ha sido ampliamente explotada debido a que acumula alto contenido de lípidos en el pericarpio. Los frutos son usados para la extracción de aceite, pues tienen el mejor rendimiento en la extracción, comparado con los frutos de otras palmeras (Onoja et al., 2019).

### **1.6.2 Biología del desarrollo del endospermo**

Durante el desarrollo de semillas en angiospermas, el endospermo frecuentemente inicia como un tejido sincitial, caracterizado por divisiones nucleares sucesivas sin citocinesis, lo que da lugar a una estructura multinucleada compartiendo un único citoplasma. Este tipo de organización se observa predominantemente en el tipo nuclear de desarrollo del endospermo, el cual es el más común entre las angiospermas, especialmente en monocotiledóneas como los cereales (Olsen, 2004; Sabelli y Larkins, 2009). El endospermo sincitial cumple funciones cruciales en el almacenamiento y transferencia de nutrientes hacia el embrión en desarrollo, y en muchas especies termina por celularizarse en etapas posteriores, aunque esta transición puede variar considerablemente entre especies (Berger, 2003; Li y Berger, 2012). En el caso del coco, el desarrollo del endospermo exhibe características particulares: el tejido inicialmente se desarrolla como un sincitio líquido que ocupa la cavidad seminal, conocido como líquido endospérmico, el cual se enriquece progresivamente con metabolitos y nutrientes (Batugal et al., 2009; Foale, 2003). A medida que la semilla madura, ocurre una progresiva celularización desde la periferia hacia el centro, originando el endospermo sólido, lo que representa una transición dinámica entre estados sincitiales y celulares (Perera et al., 2010; Arias-Merino et al., 2022). Este patrón también ha sido reportado en otras Arecáceas como *Elaeis guineensis* y *Phoenix dactylifera*, aunque con

variaciones en la velocidad y extensión del proceso de celularización (Chaudhury et al., 2020; Teixeira et al., 2018). Estas particularidades del endospermo en palmas reflejan adaptaciones fisiológicas a su entorno y estrategias específicas de almacenamiento y dispersión, subrayando la relevancia del estudio de este tejido en contextos evolutivos, agronómicos y bioquímicos.

### 1.6.3 Composición del endospermo

La germinación del embrión comienza cuando la semilla madura entra en contacto con la humedad durante tiempo suficiente. El endospermo sólido y líquido contienen todos los nutrientes esenciales (carbohidratos, lípidos, aminoácidos, vitaminas y minerales) y fitohormonas necesarias para la germinación y desarrollo del embrión. El endospermo del coco se compone principalmente de lípidos (68-70%), azúcares (6-7%) y proteínas (6-9%). Los lípidos son la principal reserva energética y son las primeras moléculas en solubilizarse por acción de las lipasas al inicio de la germinación (Kumar et al., 2018).

El endospermo sólido de *C. nucifera* contiene en promedio 46% de aceite, compuesto principalmente por ácido láurico (ácido graso C12) y ácido mirístico (C14), en proporciones similares a las reportadas en el aceite de palma (Cuadro 1.3). Los frutos con maduración intermedia producen altos niveles de ácidos láurico, oleico y linoleico, pero la concentración de estos aceites disminuye a medida que los frutos maduran (Ángeles et al., 2018; Padua y Banzon, 1979).

El aceite de coco se utiliza en productos alimenticios, cosméticos, detergentes, tensoactivos, biocombustibles y otros fines industriales. El punto de fusión varía entre 20 y 27 °C, posee una baja concentración de ácidos grasos insaturados y un índice de yodo de 7.7, de los más bajos entre los aceites vegetales disponibles comercialmente (Kumar, 2011). Ángeles et al. (2018) presentaron una revisión de los diferentes ácidos grasos contenidos en el endospermo de *C. nucifera*, comparándolo con los valores de los ácidos grasos contenidos en aceites de otras semillas de origen vegetal (Cuadro 1.3).

Existen ácidos grasos saturados de cadena larga que no se habían reportado en el endospermo, tal es el caso del ácido behénico (C22) y lignocérico (C24) (Kumar et al., 2011).

**Cuadro 1.3.** Concentración porcentual de los ácidos grasos contenidos en varios aceites de semillas. Los números en negritas resaltan el ácido graso con mayor concentración en cada aceite vegetal (Ángeles et al., 2018).

	Coco	Canola	Maíz	Algodón	Lino	Oliva	Palma aceitera	Maní	Soja	Girasol
Á. caproico (C6)	0.083	0	0	0	0	0	0	0	0	0.26
Á. caprílico (C8)	5.19	0	4	0	0	0	3.72	0	0	0.13
Á. cáprico (C10)	5.84	0	7	0	0	0	4.12	0	0	0.34
Á. láurico (C12)	<b>48.04</b>	0	0	0	0	0	<b>43.57</b>	0	0	0.07
Á. mirístico (C14)	19.04	0.06	0.6	0.69	0	0.35	16.09	0.03	0.21	5.57
Á. palmítico (C16)	9.42	6.48	10.94	21.76	5.5	8.34	8.33	8.45	10.05	0.13
Á. palmitoleico (C16:1)	0	0	1.47	1.84	0		0	0	0	0.05
Á. margárico (C17)	0	3.78	0.08	0.08	0	0.11	0	0.12	0.11	3.714
Á. esteárico (C18)	3.06	1.87	2.42	2.35	3.5	2.83	2.14	3.58	4.04	29.56
Á. oleico (C18:1)	7.92	<b>41.35</b>	29.39	33.69	22.1	<b>78.4</b>	22.5	<b>58.5</b>	26.63	<b>59.55</b>
Á. linoleico (C18:2)	1.38	17	<b>48.49</b>	<b>46.91</b>	20.5	7	1.25	20	<b>51.83</b>	0.24
Á. linolénico (C18:3)	0.067	27.95	0.76	0.35	<b>47.5</b>	0	0	0	6.58	0.64
Á. araquidónico (C20)	0.14	0.64	0.50	0.34	0.65	0.29	0.15	2.19	0.38	0.65
Á. behénico (C22)	0	0.35	0.49	0.35	0	0.13	0	3.14	0.58	0.6
Á. erúcico (C22:1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.21
Á. lignocérico (C24)	0.03	0.27	0.29	0.22	0	0.03	0.3	1.66	0.23	0

Los carbohidratos contenidos en el endospermo principalmente son mananos, glúcidos de tipo manano-oligosacáridos (MOS). Los galactomananos y galactoglucomananos son degradados por  $\beta$ -manosidasas, en la degradación de estos MOS se generan azúcares solubles y reductores que más adelante serán hidrolizados por amilasas e invertasas. El endospermo sólido constituye la reserva de almidón del fruto, mientras que el endospermo líquido contiene en su mayoría monosacáridos como glucosa, fructosa y sacarosa. También se ha reportado que el endospermo líquido contiene trazas de rafinosa (trisacárido) y arabinogalactano, xilosa, manosa y arabinosa (polisacáridos) (Kumar et al., 2018).

#### 1.6.4 Fitohormonas en el endospermo líquido

En el endospermo líquido se encuentra una importante fracción de fitohormonas disueltas. Inicialmente, se identificaron las auxinas, después las giberelinas, seguido de las citocininas y, finalmente, el ácido abscísico (Tuyekar et al., 2021). Yong et al. (2009) realizaron una revisión de las fitohormonas identificadas en el endospermo de *C. nucifera*. En el Cuadro 1.4 se presentan los resultados de un análisis cualitativo y cuantitativo de dicho estudio, se observa que las auxinas son las principales fitohormonas presentes, pudiéndose cuantificar hasta 3.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en el endospermo líquido de frutos inmaduros.

El ácido indol-3-acético (AIA) es la principal auxina de las plantas; esta molécula no sólo se presenta en forma libre, también se conjuga con aminoácidos, péptidos o carbohidratos. Las auxinas responden a señales físicas como la luz y la gravedad, interviniendo en procesos de ramificación de brotes y raíces, así mismo, en la diferenciación de células meristemáticas y de órganos inmaduros (Ma et al., 2008; Berleth et al., 2004).

Las citocininas son fitohormonas que ejercen diversas funciones en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Intervienen en la división celular, formación de meristemas de brotes, inducción de la expresión de genes relacionados con la fotosíntesis, senescencia de las hojas, transporte de nutrientes, germinación de semillas, crecimiento de raíces y respuesta al estrés (Haberer y Kieber, 2002).

Otro grupo de fitohormonas son las giberelinas (ácidos giberélicos) y se conocen aproximadamente 136 giberelinas diferentes. Estas moléculas son responsables de la regulación del crecimiento y desarrollo de la planta, intervienen en la germinación de semillas, elongación de las células epidérmicas, extensión de las hojas y el desarrollo de las flores (Ge et al., 2008).

**Cuadro 1.4.** Fitohormonas identificadas en las muestras de endospermo líquido extraído de frutos en dos etapas de desarrollo de *Cocos nucifera* (Yong et al., 2009).

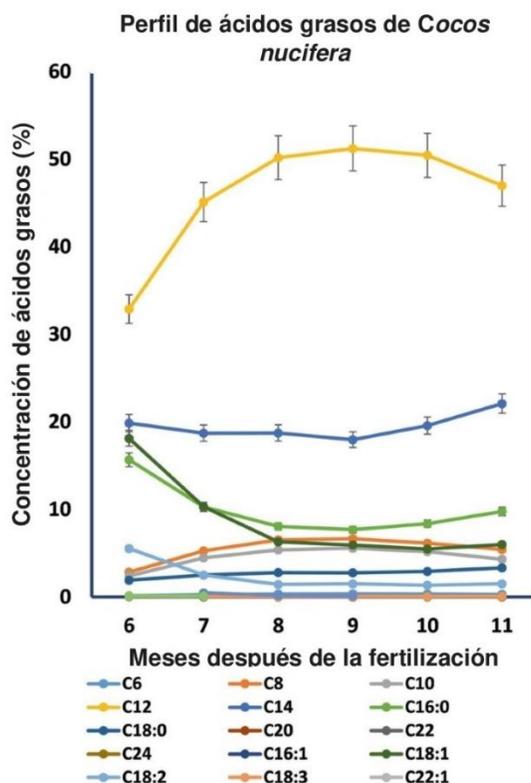
	Inmaduro verde (e. líquido) µg/mL	Maduro (e. sólido) µg/mL
<b>Auxinas</b>		
Ácido indol-3-acético (AIA)	3.6	1.46
<b>Citocininas</b>		
N <sup>6</sup> - Isopenteniladenina	0.02	---
Dihidrozeatina	0.02	---
<i>trans</i> - Zeatina	0.01	---
Kinetina	0.03	---
<i>orto</i> -Topolina	0.72	---
Dihidrozeatina-O-glucósido	1.06	---
<i>trans</i> -Zeatin-O-glucósido	4.07	---
<i>trans</i> - Zeatina ribósido	0.76	---
Kinetina ribósido	0.03	---
<i>trans</i> -Zeatina ribósido-5'-monofosfato	0.21	---
<b>Giberelinas</b>		
Giberelina 1	0.43	---
Giberelina 3	0.87	---
<b>Ácido abscísico</b>	0.03	0.7
<b>Ácido salicílico</b>	---	1.79

### 1.6.5 Variación de compuestos durante la maduración de los frutos de coco

En el endospermo líquido de los frutos inmaduros, los azúcares reductores son los principales compuestos presentes. En esta etapa, la sacarosa que proviene de la savia del floema ingresa al fruto y se convierte en glucosa y fructosa por acción de invertasas presentes en el tallo. Con el inicio de la formación del endospermo sólido, a partir del séptimo mes, se liberan los azúcares no reductores y aumentan su concentración hasta el mes nueve en el endospermo líquido. Al inicio de la formación del endospermo sólido también se sintetizan polisacáridos y se detiene cuando el endospermo se endurece cerca del décimo mes; los polisacáridos se depositan en las paredes celulares. La sacarosa es precursora de diversos polisacáridos, como la celulosa del pericarpio y de

aproximadamente el 20% de los lípidos que se almacenan en el endospermo (Kumar y Balakrishnan, 2009; Richter et al., 2005; Balasubramaniam y Atukorala 1973).

Se ha reportado que la biosíntesis de ácidos grasos comienza en los frutos inmaduros en el quinto mes, alcanzando las máximas concentraciones en los frutos maduros en el mes 12. Por esta razón, este estadio de maduración es el ideal para obtener la copra, de la que se extraerá el aceite de coco. En la comparación cualitativa de los ácidos grasos contenidos en el endospermo sólido y líquido de *C. nucifera* se observó similitud, pero es notable la variación respecto a la acumulación de los ácidos grasos durante el desarrollo del fruto, es decir, los cambios son cuantitativos. Kumar y Balakrishna (2009) analizaron la concentración de los ácidos grasos en el endospermo sólido de *C. nucifera* en diferentes etapas del desarrollo y se observó que la concentración del ácido láurico (C12) aumentó gradualmente a partir de los seis meses posteriores a la fertilización, y continuó hasta su maduración, mientras que los ácidos palmítico (C16) y oleico (C18:1) disminuyeron gradualmente desde el sexto mes, hasta la maduración del fruto (Figura 1.2). Por otra parte, en el endospermo líquido de los frutos inmaduros hay cuatro ácidos grasos presentes (C14:1, C15, C16:1 y C17), pero desaparecen a medida que madura el fruto. Por otro lado, los ácidos grasos de cadena corta (C6, C8 y C10), que inicialmente están en menor proporción, aumentan con la maduración, tanto en el endospermo líquido como en el sólido. Los ácidos grasos de cadena larga ácido linolénico (C18:3) y ácido behénico (C22) se encuentran disueltos en el endospermo líquido en todas las etapas del desarrollo de la fruta, pero no se han detectado en el endospermo sólido. La concentración de ácidos grasos de cadena larga es mayor en los frutos inmaduros, mientras que en los frutos maduros la concentración de ácidos grasos de cadena corta y media es mayor.



**Figura 1.2.** Perfil de ácidos grasos contenidos en muestras de aceite extraído de semillas de *C. nucifera* en diferentes etapas de desarrollo (Kumar y Balakrishna, 2009).

En el endospermo líquido también se encuentran compuestos nitrogenados, entre los cuales los aminoácidos libres constituyen una parte importante. Durante la maduración, el nitrógeno total y el nitrógeno no proteico aumentan progresivamente. De manera similar, el contenido de aminoácidos libres en el endospermo líquido aumenta de 4 a 16 mg por cada 100 mL. Se estima que, en el endospermo líquido de frutos inmaduros, el 70% de los aminoácidos contenidos son glutamina, arginina, asparagina, prolina, alanina y ácido aspártico. En el endospermo líquido de frutos maduros el 75% de los aminoácidos libres son alanina, ácido  $\alpha$ -aminobutírico, ácido glutámico, ácido aspártico y ácido glutámico; los más abundantes son los dos últimos. En cuanto al endospermo sólido de los frutos maduros, los aminoácidos metionina, tirosina, triptófano y fenilalanina son los más abundantes. En cuanto al contenido de proteínas, se ha reportado que el endospermo líquido de frutos inmaduros contiene cerca del 0.13%, lo cual aumentará a 0.29% en frutos

maduros. Por el contrario, la concentración de proteínas en el endospermo sólido disminuye conforme avanza la maduración, de 8.3 a 6.2% (Ángeles et al., 2018; Yong et al., 2009).

Los fitorreguladores juegan un papel importante en la regulación de los procesos fisiológicos de la planta; tienen un importante papel en la síntesis y acumulación de moléculas de reserva. La concentración de fitohormonas varía en el endospermo según el estadio de maduración. En el estadio inmaduro, la concentración de citocininas es elevada y se concentra principalmente en el endospermo líquido, pues éstos son importantes promotores de la división celular del embrión. Las giberelinas son las principales fitohormonas que influyen en el proceso germinativo, pues rompen la latencia de las semillas e inducen la expresión de los genes de  $\alpha$ -amilasas y otras enzimas hidrolíticas que degradan las reservas de almidón y lípidos (Arana-Paredes et al., 2015). En el endospermo líquido de frutos maduros, la concentración de citocininas es casi indetectable, mientras que las concentraciones del ácido abscísico y giberelinas son muy altas (Moreno et al., 2013). Otros reguladores de crecimiento, como 1,3-difenilurea, mioinositol, esciloinositol y sorbitol se han descrito en el endospermo líquido de todos los estadios. Otros más, como zeatina y ribósidos de zeatina, se han reportado tanto en el endospermo sólido como en el líquido de frutos maduros. Moléculas similares a purinas y 9-D-ribofuranosil zeatina sólo se han identificado en el endospermo líquido de frutos maduros (Tan et al., 2014).

de fruto, su estado de maduración y las condiciones ambientales (Kader et al., 2002).

Por otro lado, se ha reportado que un fruto de 2 kg respira aproximadamente 50 mg de CO<sub>2</sub> por hora a 25 °C. Además, se estima que por cada kilogramo de fruto se produce 0.2 µL de etileno por hora, con un aumento progresivo después de siete días de almacenamiento (DebMandal y Mandal, 2011). Sin embargo, a diferencia de los frutos climatéricos, no se ha demostrado que el etileno tenga algún efecto sobre la maduración y calidad del coco. No se conoce si la producción de etileno está vinculada con algún proceso biológico fundamental o es subproducto de la respiración celular, pues los frutos de coco realizan naturalmente respiración celular durante su desarrollo y maduración. Durante la respiración celular, los compuestos orgánicos, como los azúcares, se degradan para producir ATP, aunque la tasa de respiración varía según el tipo de fruto. Este intercambio gaseoso ocurre a través de las lenticelas, que son poros en la superficie del fruto que facilitan la comunicación con la atmósfera (Taiz et al., 2015).

### 1.6.6 Cambios metabólicos en la maduración de los frutos

El desarrollo y la maduración de los frutos son procesos complejos, programados genéticamente, que actúan de manera específica en cada especie. Los cambios fisiológicos que ocurren durante la maduración impactan en la calidad del fruto y, en consecuencia, su aceptación en el mercado (Hussein et al., 2018). Dentro de los cambios fisiológicos se menciona el ablandamiento o endurecimiento de los frutos, debido al metabolismo dinámico de la pared celular, por la degradación de la pectina y celulosa; cambios en la textura debido a la acumulación de azúcares simples y otros polisacáridos, además de los cambios en la acumulación de los metabolitos secundarios responsables de las propiedades organolépticas de los frutos (Claudius y Ludivine, 2017).

A pesar de la complejidad del desarrollo y maduración de los frutos, éstos se clasifican en climatéricos y no climatéricos; los climatéricos son frutos que continúan su maduración después de ser cosechados y responden a estímulos del etileno, mientras que los no climatéricos son frutos que necesitan alcanzar la maduración óptima en la planta y no responden al etileno (Chen et al., 2018).

*Cocos nucifera* es un fruto no climatérico, cuyo proceso de maduración es complejo y poco estudiado desde el enfoque bioquímico. En este fruto se conoce poco respecto a las vías metabólicas que se regulan durante la maduración y que se relacionan con la síntesis y acumulación de metabolitos importantes como los ácidos grasos, carbohidratos, fitohormonas y compuestos fenólicos.

Felix et al. (2023), realizaron un estudio proteómico del endospermo sólido de los cultivares contrastantes de cocotero; enano verde de Yucatán (EVY) y el alto del Pacífico mexicano (APM). Se utilizó tecnología de proteómica cuantitativa para identificar y comparar los perfiles de proteínas entre los dos cultivares. A lo largo de la maduración, el cultivar EVY mostró una mayor acumulación de proteínas relacionadas con el metabolismo de carbohidratos, incluyendo aquellas involucradas en la gluconeogénesis y el ciclo del ácido cítrico. Por otro lado, el cultivar APM presentó una mayor acumulación de proteínas clave asociadas con la biosíntesis de lípidos y la beta-oxidación de ácidos grasos, se identificaron proteínas más abundantemente relacionadas con la síntesis de triacilgliceroles y almacenamiento de ácidos grasos, como las aciltransferasas y las desaturasas de ácidos grasos. Los resultados mostraron que las rutas metabólicas relacionadas con la síntesis de ácidos grasos y el metabolismo de carbohidratos estaban moduladas de manera distinta en cada cultivar, lo que sugiere que las diferencias en la composición final del aceite y los

azúcares del endospermo sólido podrían estar influenciadas por una regulación diferencial en estas rutas metabólicas.

Los procesos metabólicos regulados durante la maduración de la semilla están controlados en gran medida en el embrión cigótico, quien es clave para controlar el balance entre la acumulación de carbohidratos y lípidos como reservas energéticas esenciales para la germinación (Khanday y Sundaresan, 2021). En este contexto, Granados-Alegría et al. (2023) analizaron los cambios proteómicos que ocurren durante la maduración de embriones cigóticos de dos cultivares de coco (EVY y APM). Los embriones del cultivar alto mostraron una mayor actividad de proteínas relacionadas con la glucólisis y el ciclo del ácido cítrico, lo que sugiere una mayor movilización de carbohidratos para la producción de energía durante la maduración. En el cultivar enano, se observó una regulación más prominente de la gluconeogénesis, implicando una mayor acumulación de reservas de carbohidratos. Los resultados reflejaron dinámicas metabólicas divergentes en los dos cultivares para adaptarse a sus diferentes entornos ecológicos. Se concluyó que en el embrión del cultivar enano se prioriza la acumulación de lípidos como fuente de energía, mientras que en el embrión del cultivar alto se optimiza el uso de carbohidratos para el desarrollo estructural. Una observación importante en este estudio es que el embrión cigótico tiene el proteoma más complejo debido a los múltiples procesos metabólicos que coordina, esenciales para la acumulación de reservas energéticas y la preparación de la semilla para la germinación. Esto resalta su papel como un tejido metabólicamente activo y clave en el desarrollo de los cocoteros.

### **1.6.7 Procesos moleculares involucrados en la maduración del coco**

*Cocos nucifera* es considerado tanto un fruto como una semilla debido a su estructura y función: botánicamente es un fruto seco drupáceo con tres capas y su interior contiene la semilla, que incluye al embrión y tejidos de reserva (endospermo sólido y líquido) (Beveridge *et al.*, 2022). Clasificado como una semilla recalcitrante, no tolera la deshidratación ni el almacenamiento prolongado, ya que depende de condiciones húmedas y cálidas para mantener la viabilidad del embrión (Chin, 2020). Las semillas recalcitrantes, como el coco no experimentan deshidratación final ni dormancia, lo que las hace adaptas en ambientes tropicales donde germinan rápidamente tras madurar. Este mecanismo, junto con su método de dispersión, permite su colonización eficiente en ecosistemas costeros (Yang et al., 2028). Las semillas ortodoxas experimentan deshidratación final durante la

maduración, donde su contenido de agua se reduce entre 5-10%. Este proceso es fundamental para inducir el estado de dormancia y garantizar su viabilidad en condiciones ambientales adversas (Klupczyńska y Pawłowski, 2021). A nivel molecular, las proteínas relacionadas con la tolerancia al estrés, como las LEA (Late Embryogenesis Abundant), se acumulan durante esta fase al ser reguladas por señales del ácido abscísico. Estas proteínas estabilizan estructuras celulares y previenen la desnaturalización de macromoléculas en condiciones de deshidratación extrema. Además, se sintetizan azúcares no reductores, como la trehalosa y la rafinosa, que protegen a las membranas y las proteínas minimizando el daño oxidativo. Las semillas ortodoxas también activan sistemas que involucran enzimas antioxidantes, como la superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT), quienes controlan los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Zhang et al., 2021). Las ROS desempeñan un papel dual: a niveles moderados actúan como señales para la maduración y la dormancia, mientras que a niveles altos pueden causar daño celular. Este balance entre deshidratación controlada, protección bioquímica contra el estrés y regulación molecular permite a las semillas ortodoxas sobrevivir largos períodos en condiciones ambientales adversas (Farooq et al., 2021).

A diferencia de las semillas ortodoxas, las recalcitrantes no presentan desecación final y retienen agua por encima del 30% al final de su desarrollo. Esto permite que el metabolismo celular permanezca activo, aunque las hace vulnerables a la pérdida de viabilidad en condiciones de sequía. Estas semillas acumulan proteínas LEA y azúcares no reductores de manera limitada, lo que reduce su capacidad para estabilizar estructuras celulares durante el estrés hídrico (Lah et al., 2023). Adicionalmente, las semillas recalcitrantes muestran baja capacidad para regular los niveles de ROS, lo que las hace más susceptibles al daño oxidativo al ser expuestas a la desecación. Se sugiere que en la mayoría de estas semillas persiste un metabolismo activo asociado con la germinación temprana, lo que incluye la síntesis de proteínas de reserva, actividad enzimática constante y divisiones celulares iniciales en el embrión (Paganos et al., 2022). Esta actividad metabólica impide la entrada en dormancia y limita su almacenamiento a largo plazo (Farnsworth, 2000).

En resumen, las principales diferencias entre las semillas ortodoxas y las recalcitrantes están relacionadas con la regulación de genes involucrados en la respuesta al estrés, la acumulación de compuestos protectores y la respuesta ante el estrés oxidativo. Los estudios transcriptómicos y proteómicos en semillas ortodoxas han revelado que se activan vías asociadas con la síntesis de compuestos protectores (como azúcares y proteínas LEA)

durante la maduración, mientras que estas vías están inactivas o poco expresadas en semillas recalcitrantes (Holdsworth et al., 2008). Por otro lado, se ha observado que las semillas recalcitrantes dependen en mayor medida de la actividad mitocondrial para mantener su metabolismo, lo que incrementa la producción de ROS y dificulta su viabilidad bajo deshidratación. La comprensión de estas diferencias es crucial para desarrollar estrategias que permitan conservar semillas recalcitrantes, como las del coco.

## 1.7 Metabolómica

La metabolómica es una de las disciplinas enfocadas en el estudio de los metabolitos primarios y secundarios producidos por las plantas, hongos y otros organismos. Consiste en el estudio y elucidación de los perfiles de metabolitos totales contenidos en una muestra bajo determinadas condiciones fisiológicas. La metabolómica es concebida como una disciplina ómica, que tiene como objetivo detectar, cuantificar y elucidar la estructura de los metabolitos de una manera holística desde diferentes vertientes (Fiehn, 2002).

En la última década, la metabolómica se ha consolidado como una herramienta fundamental en la biología de sistemas, permitiendo la caracterización a gran escala del conjunto de metabolitos presentes en matrices biológicas complejas mediante plataformas como la espectrometría de masas acoplada a cromatografía (LC-MS, GC-MS) y la resonancia magnética nuclear (NMR) (Dunn et al., 2005). Este enfoque, enmarcado dentro de las ciencias *ómicas*, adopta una perspectiva holística orientada al descubrimiento, priorizando la cobertura metabolómica y la comparación estadística entre condiciones experimentales sobre la identificación exhaustiva de cada metabolito. La metabolómica permite así generar hipótesis sobre procesos biológicos, identificar biomarcadores y estudiar la dinámica metabólica en distintos contextos fisiológicos o ambientales (Patti et al., 2012).

Al comparar a la metabolómica (*ómica*), con la química analítica clásica, se resalta que el enfoque de la segunda se dirige hacia la elucidación estructural precisa de compuestos individuales mediante técnicas como la RMN multidimensional, la espectrometría de masas de alta resolución, la cristalografía de rayos X y la síntesis química (Silverstein et al., 2014). Esta aproximación busca una caracterización rigurosa, reproducible y validada de los metabolitos, muchas veces con fines farmacológicos, ecológicos o estructurales. En este paradigma, la confiabilidad de los datos recae en la identificación inequívoca del compuesto, lo cual contrasta con la frecuencia con la que los estudios metabolómicos

reportan entidades no identificadas o con niveles bajos de anotación (Schrimpe-Rutledge et al., 2016).

Este contraste metodológico ha generado una tensión epistemológica entre ambas escuelas. Mientras que desde la química tradicional se critica la falta de validación estructural y la excesiva dependencia en el análisis multivariado como criterio de significancia en la metabolómica, desde el enfoque *ómico*, se argumenta que la química clásica resulta insuficiente para abordar la complejidad y la dinámica global de los sistemas biológicos, debido a su enfoque centrado en lo individual. Esta divergencia no implica necesariamente una incompatibilidad, sino una diferencia en objetivos, escalas y niveles de resolución (Kind y Fiehn, 2007).

Una integración sinérgica entre ambas aproximaciones es deseable. La metabolómica puede generar perfiles globales útiles para identificar patrones biológicos relevantes, mientras que la química tradicional proporciona la validación estructural necesaria para consolidar hallazgos y avanzar en la comprensión de los procesos metabólicos. Esta complementariedad es esencial en disciplinas como la metabolómica vegetal, la farmacognosia moderna y la ecología química, donde la amplitud del perfil metabólico y la identificación estructural profunda son igualmente valiosas (Wolfender et al., 2015).

### **1.7.1 Metabolómica y recursos de análisis**

En la diversidad de moléculas orgánicas se encuentran los aminoácidos, los ácidos orgánicos, ácidos nucleicos, ácidos grasos, azúcares, vitaminas, cofactores, pigmentos, hormonas, compuestos antimicrobianos, etc (Yanes, 2015). Todos los anteriores son conocidos como metabolitos endógenos, pues son aquellos que naturalmente se producen en un organismo (Cevallos-Cevallos et al., 2009).

La gran diversidad de moléculas contenidas en una muestra refleja una amplia gama de propiedades físico-químicas como las polaridades de los compuestos, el peso molecular, la presencia de grupos funcionales, estabilidad y reactividad química, entre otras características. Para analizar la diversidad de las moléculas es necesario integrar diferentes plataformas y configuraciones analíticas que mejoren la calidad de los resultados de un metaboloma (Patti et al., 2012; Klein et al., 2010).

Las dos plataformas más utilizadas para identificar y cuantificar metabolitos son la resonancia magnética nuclear (RMN) y espectrometría de masas (MS) (Cuadro 1.5). La MS

es una técnica que la mayoría de las veces está acoplada a técnicas cromatográficas como la cromatografía líquida (LC-MS) o la cromatografía de gases (GC-MS) (Yanes (2015)).

**Cuadro 1.5.** Plataformas tecnológicas más utilizadas para la identificación y cuantificación de metabolitos, ventajas y limitaciones (Yanes, 2015).

Plataforma	Fundamento	Ventajas	Limitaciones
<b>LC-MS</b> (Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas)	Separación de metabolitos en fase líquida según su polaridad, seguida de ionización e identificación por la relación masa/carga (m/z) en el analizador de masas.	-Alta sensibilidad y especificidad analítica. -Amplia cobertura del metaboloma, incluyendo compuestos polares y no polares. -Adecuada para análisis dirigidos y no dirigidos. -Permite análisis cualitativos y semicuantitativos.	-Dependencia de bibliotecas espectrales limitadas para identificación. -Alta complejidad instrumental y operativa. -Requiere preparación de rigurosa de muestra. -Alto costo de adquisición y mantenimiento.
<b>GC-MS</b> (Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas)	Separación de metabolitos volátiles o derivatizados en fase gaseosa, con posterior identificación por espectrometría de masas.	-Alta resolución cromatográfica. -Excelente reproducibilidad. -Bases de datos bien establecidas (NIST). -Alta sensibilidad para metabolitos volátiles.	-Limitado a compuestos volátiles o que puedan ser derivatizados. -El proceso de derivatización puede inducir artefactos. -No apto para compuestos no termoestables. -Alto costo de adquisición y mantenimiento.
<b>RMN</b> (Resonancia magnética nuclear)	Detección de metabolitos basada en la interacción de núcleos atómicos con campos magnéticos intensos, generando espectros característicos de una estructura química.	-Cuantificación absoluta sin necesidad de estándares. -Técnica no destructiva. -Alta reproducibilidad instrumental. -Requiere mínima preparación de muestra.	-Baja sensibilidad comparada con técnicas basadas en MS. -Limitado a metabolitos en alta concentración. -Equipamiento costoso y demanda de operadores especializados.

<b>FT-IR</b> (Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier)	Medición de la absorción de radiación infrarroja por enlaces moleculares, generando espectros vibracionales representativos de grupos funcionales.	-Técnica rápida y no destructiva. -Bajo requerimiento de preparación de muestra. -Costo operativo reducido. -Útil para clasificación química general.	-Baja especificidad molecular. -Superposición espectral entre compuestos similares. -Capacidad limitada para análisis cuantitativo.
<b>HPLC</b> (Cromatografía líquida de alta resolución)	Separación de metabolitos mediante interacciones con una fase estacionaria bajo presión, sin acoplamiento obligatorio a MS.	-Alta resolución de compuestos complejos. -Compatible con múltiples detectores (UV, fluorescencia, electroquímico). -Comparativamente accesible en costos.	-Sensibilidad limitada sin acoplamiento a espectrometría de masas. -Menor aplicabilidad para análisis no dirigidos.
<b>MALDI-TOF MS</b> (Desorción/Ionización por láser asistida por matriz - tiempo de vuelo)	Ionización de analitos co-cristalizados con una matriz mediante pulsos de láser; análisis del tiempo de vuelo de los iones generados.	-Ionización suave, ideal para biomoléculas de alto peso molecular. -Alta velocidad de adquisición de datos. -Baja preparación de muestra. -Compatible con análisis por imágenes (MALDI-IMS).	-Interferencia espectral por la matriz. -Menor precisión en la cuantificación. -Eficiencia reducida para compuestos pequeños y altamente polares.
<b>CE-MS</b> (Electroforesis capilar acoplada a espectrometría de masas)	Separación de metabolitos cargados en un capilar mediante un campo eléctrico, seguida de ionización y detección por MS.	-Alta eficiencia de separación para compuestos polares y cargados. -Bajo consumo de muestra y solventes. -Capacidad para análisis de isómeros y metabolitos iónicos.	-Acoplamiento técnico complejo con espectrometría de masas. -Menor robustez operativa comparada con LC-MS. -Limitada disponibilidad de bases de datos CE específicas.

En la década de los noventa, los estudios metabolómicos cobraron importancia debido a sus múltiples aplicaciones en las ciencias y disciplinas medioambientales, farmacológicas y las relacionadas con la agricultura (Klassen et al., 2017).

Al comparar la metabolómica con la proteómica (ómica basada en la identificación de proteínas mediante espectrometría de masas), la diferencia radica en el hecho de que los metabolitos, al ser ionizados, pueden arrojar espectros de fragmentación tan variados que son impredecibles en su mayoría, contrario a los aminoácidos, péptidos y proteínas. La

metabolómica ha surgido como una herramienta indispensable para el análisis de los miles de compuestos que puede contener una muestra, pero realizar la identificación de metabolitos es una tarea desafiante, pues sólo cerca del 5% de los metabolitos primarios y secundarios están anotados en las bases de datos con información espectral (Go, 2010). En la práctica, la identificación se realiza comparando la similitud de los valores espectrales experimentales (masa/carga; m/z) con los de un estándar puro, anotado en las bases de datos de resultados espectrales que pueden ser públicas o de pago. Otra dificultad en la identificación de metabolitos es que se tiene una baja disponibilidad comercial de compuestos que pueden usarse como estándares puros. En este sentido, contribuir con la obtención de perfiles metabolómicos, en el enriquecimiento de las bases de datos existentes (Cuadro 1.6) y en la identificación de nuevos compuestos que puedan usarse como biomarcadores, brindará un mejor sustento en la práctica de la identificación de metabolitos por MS y a la metabolómica en sí (Salem et al., 2020; Mark et al., 2020; Yanes, 2015).

Cuadro 1.6. Lista de bases de datos de acceso abierto más usadas para la identificación de metabolitos en la metabolómica.

<b>Base de datos</b>	<b>Características</b>
<b>HMDB</b> (Human Metabolome Database)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Acceso abierto.</li> <li>- Base de datos de metabolitos humanos ampliamente utilizada.</li> <li>- Contiene información estructural, espectral (MS y NMR), biológica y clínica.</li> <li>- Anotaciones de vías metabólicas, biofluidos, enfermedades asociadas.</li> <li>- Compatible con LC-MS, GC-MS, NMR.</li> <li>- Incluye datos experimentales y predichos.</li> </ul>
<b>METLIN</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Acceso gratuito con registro; versión comercial disponible (MetlinGen2).</li> <li>- Una de las bibliotecas espectrales MS/MS más extensas (&gt;850,000 compuestos).</li> <li>- Compatible con múltiples plataformas de MS (LC-MS/MS).</li> <li>- Herramientas de búsqueda por masa exacta, fragmentación, similitud estructural.</li> <li>- Incluye lípidos, drogas, metabolitos endógenos y exógenos.</li> </ul>
<b>MassBank</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Acceso abierto.</li> <li>- Repositorio de espectros de masas de alta calidad.</li> <li>- Incluye metabolitos, productos naturales, contaminantes.</li> <li>- Espectros por LC-MS y GC-MS.</li> <li>- Permite búsqueda por nombre, fórmula molecular o m/z.</li> </ul>

<b>LIPID MAPS</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Acceso abierto.</li> <li>- Base de datos especializada en lípidos.</li> <li>- Información estructural, espectros, rutas biosintéticas.</li> <li>- Compatible con LC-MS, MS/MS y NMR.</li> <li>- Herramientas para anotación por clase y masa.</li> </ul>
<b>mzCloud</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Acceso gratuito con cuenta (por Thermo Fisher).</li> <li>- Biblioteca de espectros MS/MS de alta resolución.</li> <li>- Integración con plataformas Thermo (Orbitrap).</li> <li>- Datos detallados: energía de colisión, condiciones espectrales.</li> </ul>
<b>GNPS</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Acceso abierto.</li> <li>- Plataforma colaborativa de espectros MS/MS.</li> <li>- Redes moleculares para agrupación estructural.</li> <li>- Enfocada en productos naturales y compuestos secundarios.</li> <li>- Compatible con LC-MS/MS.</li> </ul>
<b>KEGG</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Acceso abierto parcial; algunas herramientas requieren suscripción.</li> <li>- Contiene rutas metabólicas, compuestos, reacciones, enzimas.</li> <li>- Integración genómica y metabólica.</li> <li>- Ideal para análisis funcional de metabolitos.</li> </ul>
<b>NIST Mass Spectral Library</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Base de datos comercial.</li> <li>- Biblioteca curada de espectros (principalmente GC-MS).</li> <li>- Alta calidad de datos.</li> <li>- Compatible con software comercial y académico.</li> </ul>
<b>BMRB</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Acceso abierto.</li> <li>- Base de datos centrada en espectros NMR.</li> <li>- Incluye metabolitos, péptidos y proteínas pequeñas.</li> <li>- Datos espectrales completos (1D, 2D, J-coupling, chemical shifts).</li> </ul>
<b>ChemSpider</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Acceso abierto.</li> <li>- Agregado de múltiples bases químicas.</li> <li>- Estructuras, propiedades químicas, espectros, referencias.</li> <li>- Búsqueda por nombre, fórmula, estructura, m/z.</li> </ul>
<b>BioCyc / MetaCyc</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Acceso abierto parcial; versión completa bajo licencia.</li> <li>- Datos de vías metabólicas de múltiples organismos.</li> <li>- Incluye metabolitos, enzimas, reacciones, regulación.</li> <li>- Útil para anotación funcional de metabolitos.</li> </ul>

La metabolómica tiene dos enfoques de análisis y esto depende del tipo de investigación que se pretende desarrollar. En algunos casos puede ser de interés realizar el escrutinio de un conjunto definido de compuestos, en otros casos, el objetivo puede dirigirse a medir y comparar entre muestras tantos metabolitos como sea posible. Cuando la búsqueda de metabolitos está dirigida hacia un grupo en específico, por ejemplo, carbohidratos, lípidos, hormonas, fenoles, alcaloides, terpenoides, etc., se dice que se realizó un análisis *metabolómico dirigido*; por el contrario, cuando la búsqueda no se dirige hacia un grupo en particular se refiere a un análisis *metabolómico no dirigido*. En el último enfoque se requiere un equipo de alta resolución, lo cual, es ideal para la búsqueda de marcadores químicos, posterior a esto será necesario realizar un análisis dirigido para confirmar su identidad (Calavia et al., 2012; Roberts, 2012).

### 1.7.2 Metabolómica en cocotero

Los avances en la metabolómica han permitido el desarrollo de diferentes estudios enfocados en frutas, tubérculos y granos, como la naranja (*Citrus sinensis*) (Guo et al., 2016), arroz (*Oryza sativa*) (Redestig et al., 2011), mango (*Mangifera indica*) (Koda et al., 2012), tomate (*Solanum lycopersicum*) (Luengwilai et al., 2012), uva (*Vitis vinifera*) (Bonghi et al., 2012), maíz (*Zea mays*) (Frank et al., 2012), papa (*Solanum tuberosum*) (Plischke et al., 2012), zanahoria (*Daucus carota*) (Cubero-León et al., 2015), piña (*Ananas comosus*) (Roda et al., 2017), papaya (*Carica papaya*) (Gogna et al., 2015) y banana (*Musa paradisiaca*) (Nieman et al., 2019) entre otros.

En lo que respecta al fruto de *C. nucifera*, Dey et al. (2005) analizaron mediante HPLC/UV el perfil metabolómico de los compuestos fenólicos contenidos en el mesocarpio y tejido foliar. Se observó que el ácido 4-hidroxibenzoico es el principal compuesto encontrado en estos tejidos. No se observaron diferencias al comparar cualitativamente los fenoles contenidos en los tejidos, pero sí en cuanto a la cantidad de los fenoles en la hoja y mesocarpio.

Kumar et al. (2011) analizaron el perfil de ácidos grasos contenidos en el aceite de coco. El aceite fue extraído del endospermo sólido de frutos de las variedades alta, enana e híbrido y las muestras se analizaron mediante GC-FID (Flame Ionization Detector, por sus siglas en inglés). Se observaron diferencias entre la concentración de los ácidos grasos de las variedades, por ejemplo, en la variedad híbrida los ácidos grasos de importancia comercial,

como los ácidos grasos insaturados y el ácido láurico, se estimaron en bajas concentraciones, comparado con las variedades alta y enana. Este fue el trabajo donde se reportó por primera vez el ácido behénico (C22) y lignocérico (C24), como se mencionó previamente.

Chen et al. (2018) analizaron el perfil de los compuestos presentes en el endospermo líquido de coco con el enfoque de la metabolómica no dirigida. Los frutos maduros (12 meses) se cosecharon y se almacenaron, al momento de la cosecha se tomó la primera muestra y en cada mes se tomaron otras muestras hasta el quinto mes. En el análisis PLS-DA se observó que las muestras de los meses 0-3 se agruparon, mientras que las muestras de los meses 4 y 5 formaron otro grupo. El análisis de enriquecimiento de rutas indicó que la vía del ácido tricarbóxico y las vías relacionadas con la hidrólisis de proteínas se enriquecieron debido al almacenamiento postcosecha.

Zhang et al. (2020), mediante UPLC-MS/MS, analizaron el endospermo líquido obtenido de frutos inmaduros de *C. nucifera*, variedad alta, éste se colectó de diferentes días posteriores a la cosecha y se resguardaron las nueces a 4 °C. En este trabajo se analizó el deterioro del agua de coco, pues ésta tiene una vida útil muy corta, incluso en refrigeración y esto ha sido difícil de explicar. Se analizó el perfil de metabolitos contenidos en las diferentes muestras y se identificaron 72 metabolitos con acumulación relativa diferencial. Con base en el análisis de vías metabólicas por KEGG y MetPA se concluyó que el metabolismo de los aminoácidos es una de las principales causas del deterioro de la calidad del agua de coco.

Cunha et al. (2020) combinaron diferentes plataformas analíticas como UPLC-HRMS, GC-MS y RMN para analizar la composición química del endospermo líquido de coco procesado térmicamente. El procesamiento térmico tiene la finalidad de esterilizar el producto, previo a su envasado y comercialización, pero el agua de coco se vuelve color rosa y se modifican sus propiedades organolépticas. Al realizar la comparación química de la muestra tratada térmicamente con la que no se trató, se observó que la cantidad de ácidos grasos de cadena corta y carbohidratos simples se redujeron con el calor. También fue notorio el aumento en los ácidos grasos de cadena larga, aunado a esto, se detectó gran cantidad de procianidinas, con esto se explica el color rosa del agua de coco tratada térmicamente, pues estos compuestos son precursores de antocianinas.

Kumar et al. (2021) analizaron el endospermo líquido de frutos obtenidos de dos cultivares comunes en India, Chowghat Orange Dwarf y Malayan Yellow Dwarf; ambos pertenecen a la variedad enana. Mediante metabolómica dirigida analizaron por GC-MS y UPLC-MS el

perfil de metabolitos de cada variedad, durante el proceso de maduración. Los resultados metabolómicos en ambas variedades fueron muy similares, sin notarse cambios significativos en el metabolismo de aminoácidos, proteínas, carbohidratos y ácidos orgánicos. Se observó la acumulación de compuestos a lo largo de la maduración, identificando ocho metabolitos que podrían ser utilizados como biomarcadores para distinguir las etapas de maduración del fruto; estos compuestos son principalmente ácidos orgánicos.

En resumen, estos son los reportes sobre la metabolómica del coco. Debido a los intereses comerciales, los primeros estudios se enfocaron en la composición de ácidos grasos del aceite obtenido de su copra, o en entender la razón biológica del deterioro acelerado del agua de coco, aun en frío, y porqué cambia el sabor y se pone rosa con el tratamiento térmico al que se somete, intentado preservarlo en anaquel.

Hasta el momento, no se han reportado estudios que analicen de manera integral los perfiles metabolómicos del endospermo sólido y líquido de *Cocos nucifera* durante su maduración, empleando enfoques complementarios de metabolómica dirigida y no dirigida. En este trabajo se plantea dicha aproximación a través del análisis de frutos en diferentes estadios de maduración, pertenecientes a dos variedades contrastantes: la variedad alta del Pacífico mexicano y la variedad Enano verde local. Estas variedades difieren notablemente en sus características fenotípicas; mientras que la primera presenta una mayor proporción de endospermo sólido en la etapa madura, la segunda se distingue por su mayor contenido de agua. Los resultados obtenidos permitirán sentar las bases para una comprensión más profunda de la regulación metabólica asociada al proceso de maduración de los frutos de cocotero.

## JUSTIFICACIÓN

El cocotero (*Cocos nucifera* L.) es una especie de gran relevancia económica y social en las regiones tropicales, especialmente en países en desarrollo, donde se cultiva extensamente para la obtención de alimentos y materias primas. Los principales productos derivados del fruto son el endospermo sólido y el líquido, comúnmente conocidos como pulpa y agua de coco, respectivamente. Ambos presentan propiedades funcionales y aplicaciones diversas en la alimentación, la medicina y la industria. A pesar de su importancia, el conocimiento sobre los cambios bioquímicos que ocurren durante el proceso de maduración del fruto es aún limitado, especialmente desde una perspectiva metabolómica integral.

El agua de coco ha sido utilizada como suplemento alimenticio, medio de cultivo vegetal e incluso como solución de rehidratación vía intravenosa, debido a su alto contenido en compuestos orgánicos, reguladores del crecimiento y antioxidantes. Sin embargo, los estudios que abordan la dinámica de estos compuestos durante la maduración son escasos, y aún más limitada es la información sobre el perfil metabolómico del endospermo sólido. No se han reportado análisis integrales del metaboloma del fruto (endospermo sólido y líquido) bajo enfoques complementarios de metabolómica dirigida y no dirigida, ni comparaciones entre variedades con características fenotípicas contrastantes.

Este trabajo propone caracterizar y comparar los perfiles metabolómicos globales del endospermo sólido y líquido durante la maduración del fruto de dos variedades de *C. nucifera*: la variedad alta del Pacífico mexicano y variedad la enano verde de Yucatán. Ambas son económicamente importantes y presentan diferencias en la proporción de pulpa y agua en la etapa madura. La integración de herramientas de metabolómica avanzada permitirá identificar compuestos clave y rutas metabólicas reguladas, lo cual representa un aporte significativo al conocimiento ontogénico del fruto y una base útil para aplicaciones en la biotecnología vegetal, como la optimización de cultivos, selección de genotipos y desarrollo de productos funcionales o bioestimulantes.

## **PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN**

¿Cómo varían los perfiles metabolómicos del endospermo sólido y líquido durante la maduración del fruto de *Cocos nucifera* L. en dos variedades fenotípicamente contrastantes?

¿Qué compuestos o rutas metabólicas están asociadas al desarrollo de la maduración?

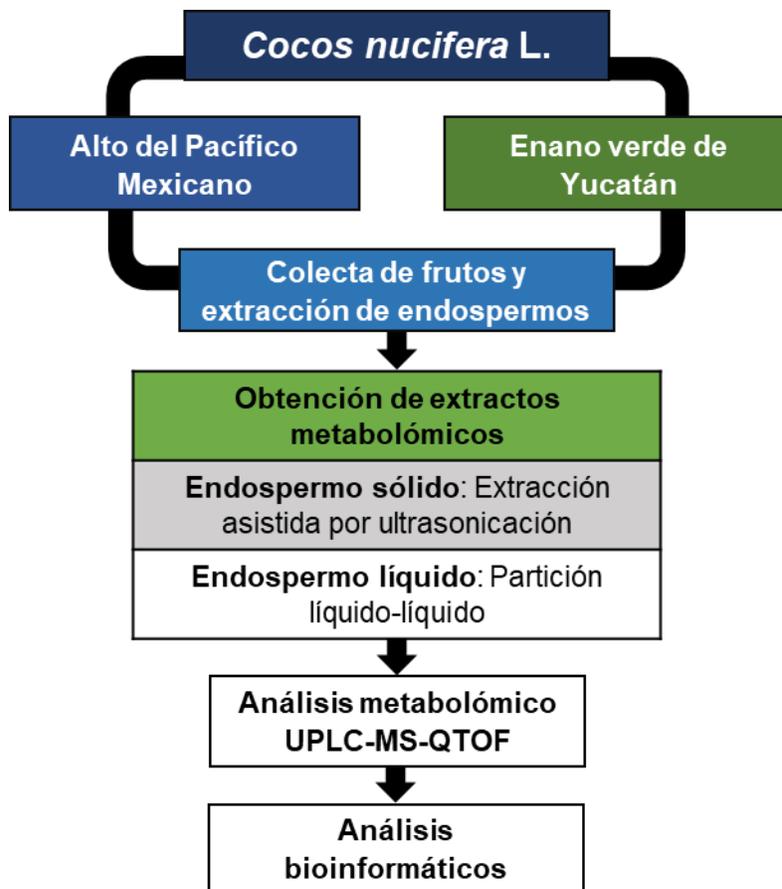
**OBJETIVO GENERAL**

Caracterizar y comparar los perfiles metabolómicos del endospermo sólido y líquido de *Cocos nucifera* L., durante tres etapas de maduración, de los cultivares alto del Pacífico mexicano y enano verde de Yucatán.

**OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Obtener extractos metabolómicos del endospermo sólido y líquido en diferentes etapas de maduración de las variedades alta del Pacífico mexicano y enano verde de Yucatán.
2. Analizar los perfiles metabolómicos mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (UPLC-MS) bajo enfoques dirigidos y no dirigidos.
3. Comparar los metabolomas del endospermo sólido y líquido entre etapas de maduración y entre variedades.
4. 4. Identificar rutas metabólicas reguladas y metabolitos clave durante la maduración del fruto.

## DIAGRAMA EXPERIMENTAL



## CAPÍTULO II

### UNTARGETED METABOLOMICS ANALYSIS OF LIQUID ENDOSPERM OF *COCOS NUCIFERA* L. AT THREE STAGES OF MATURATION EVIDENCED DIFFERENCES IN METABOLIC REGULATION

#### Artículo publicado:

Gómez-Tah, R., Islas-Flores, I., Félix, J. W., Granados-Alegría, M. I., Tzec-Simá, M., Guerrero-Analco, J. A., Monribot Villanueva J. L. y Canto-Canché, B. (2023). Untargeted metabolomics analysis of liquid endosperm of *Cocos nucifera* L. at three stages of maturation evidenced differences in metabolic regulation. *Horticulturae*, 9(8), 866.

#### 2.1 INTRODUCTION

The coconut palm (*Cocos nucifera* L.), the only species in the genus *Cocos*, is one of the most widely cultivated palms in the world; it is a source of vegetable oil, foods and drinks, construction materials, household products, etc.; practically, every part of the plant is useful (Beveridge et al., 2022; Sankararaman et al., 2018). This species is intensively cultivated in the tropical regions of the world; the estimated cultivation area is about 12 million ha with a world production of approximately 61 million tons annually. The main coconut producers are Indonesia, the Philippines and India; in Latin America, Brazil and Mexico lead the export market and rank fourth and eighth, respectively (Tzec-Simá et al., 2022). Within this species, two main groups of coconut varieties are described: tall and dwarf. Dwarf varieties are self-pollinating and early flowering. They are precocious plants, producing numerous fruits four years after planting compared to tall varieties that produce fruits six to ten years after planting (Kumar et al., 2021; Rajesh et al., 2015). Additionally, dwarf varieties are resistant to lethal yellowing, one of the most devastating diseases of coconut crops (Gurr et al., 2016). The most valuable products of the two varieties of coconut palm are the solid and liquid endosperms; the former is mainly composed of highly methyl-esterified pectin and medium-chain fatty acids such as lauric acid (C:12) and myristic acid (C:14). The solid endosperm is also the source of coconut oil (Roongsattham et al., 2016). The liquid endosperm is a reservoir of water, sugars and phytohormones with important functions in the germination

and development of the coconut embryo (Kaur et al., 2019). Glucose, sucrose and fructose constitute 80% of the sugars contained in the liquid endosperm; the dwarf varieties tend to have a highest sugar content than tall varieties, making them ideal for coconut water consumption (Angeles et al., 2018). Other components of the liquid endosperm are fatty acids, amino acids, organic acids, enzymes, phenolic compounds, vitamins and minerals. Altogether, these molecules confer great nutritional and functional value to coconut water (Rajesh et al., 2015; Ramanandam et al., 2017), which generates significant income for the economies of several countries, mainly in Southeast Asia (Mardesci et al., 2021). Among the other uses of liquid coconut endosperm, it can be used as a component in plant tissue culture media (Arana-Paredes et al., 2015); as an alternative to intravenous rehydration in critical situations (Reddy et al., 2018); as a dietary supplement (Astikasari et al., 2017); and has recently been promoted as an important source of molecules with nutraceutical potential (Valli et al., 2020; Patel et al., 2018). However, despite the nutraceutical and economic importance of coconut fruit, very few studies have been conducted to understand the biochemical and molecular basis of the ripening process.

Fruit development and ripening are complex, genetically programmed processes that occur in a species-specific manner (Hussein et al., 2018). Seed development involves a series of metabolic processes aimed at the accumulation of nutrients, mainly carbohydrates, lipids, amino acids, storage proteins and secondary metabolites, and many metabolic pathways are involved, e.g., amino acid metabolism, starch and sucrose metabolisms, fatty acid and flavonoid biosynthesis (Wu et al., 2020; Chen et al., 2019). The ripening of the coconut is a complex biological process scarcely studied from the biochemical point of view; it is a non-climacteric fruit and they are unique in the fact that they contain solid and liquid endosperms throughout development (Gopalakrishna et al., 2010). In this era of omics, the emergence of metabolomics is presented as an alternative to help understand the physiological processes and biochemical changes that occur during the development of fruits and seeds (White et al., 2017). Untargeted metabolomics is based on the comparison of patterns of compounds obtained from different biological samples, using univariate and multivariate statistical tools. This approach allows us to understand the complexity of these matrices, and contributes to the identification of metabolites that could have a more relevant role in various processes, such as postharvest storage, ripening or stress (García et al., 2016).

Regarding coconut metabolomics studies, Kumar et al. (2011), used Gas Chromatography-Flame Ionization Detector (GC-FID) to analyze the fatty acid profile in the coconut oil extracted from fruits of tall, dwarf and hybrid varieties. They found differences among the

fruits of the varieties analyzed, the fruits of the hybrids have less unsaturated fatty acids and lauric acid than in the tall and dwarf varieties. Chen et al. (2018), reported that the analysis of pathway enrichment showed that the tricarboxylic acid pathway and protein hydrolysis were enriched probably responding to taurine metabolism. More recently, Zhang et al. (2020), studied the deterioration process of coconut water since coconut water has a short shelf life, and their analysis led them to conclude that cysteine, methionine, glycine, serine and threonine metabolisms are the main metabolic pathways whose changes may be responsible for the deterioration of the organoleptic properties of coconut water. Kumar et al. (2021), analyzed the liquid endosperm of Chowghat Orange Dwarf (COD) and Malayan Yellow Dwarf (MYD) by targeted metabolomics using GC-MS and UPLC-MS to characterize the nutrients present at four maturity stages and to gain a brief understanding of the chemical profiles. They found great similarity in the profiles of amino acids, proteins, carbohydrates and organic acids, but differences in the mineral composition of the liquid endosperm of both varieties. On the other hand, they found eight metabolites, mainly organic acids, with ripening stage-specific accumulation, and they proposed them as biomarkers for distinguishing the ripening stages in coconut fruit.

Overall, most chemical composition and metabolomics studies currently conducted in coconut have focused on determining the nutrients and fatty acid content of coconut oil and shelf life of coconut water as well as other postharvest aspects. Therefore, in light of the lack of biochemical information on the coconut fruit ripening process, we addressed this gap by investigating the metabolic pathways that are regulated during ripening using an untargeted metabolomic approach by ultra performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization and quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-ESI-QTOF-MS). The liquid endosperm of coconut fruits during different stages of maturity of the Yucatan green dwarf cultivar was analyzed. The objective of this report was to identify the metabolic pathways that accumulate (up-accumulated and down-accumulated) during maturation of Yucatan green dwarf coconut. Principal component analysis (PCA) grouped, with little dispersion, samples according their stage of maturation, supporting that fruits were well classified. In addition, the over-accumulated and down-accumulated metabolic pathways were identified to better understand the ripening processes in coconut fruit. This is the first report of biochemical changes in the ripening of coconut fruit with a cultivar of economic importance for Mexico and the Caribbean, contributing to the existing basic knowledge of the coconut maturation process. Moreover, it is a worthwhile contribution to the field of metabolomics and the ontogenetic knowledge of this species.

## 2.2 MATERIALS AND METHODS

### 2.2.1 Collection and storage of samples

Coconut fruits cultivar Yucatan green dwarf were collected in a plantation located in San Crisanto, Yucatan, Mexico (21°20'53.5" N 89°12'08.6" W). Maturity stages were classified according to bibliography (Perera et al., 2010; Islas-Flores et al., 1998). This method consists of identifying the unopened inflorescence of the plant, to be considered as stage zero. The next open inflorescences (from top to bottom) are designated as stage 1, 2, 3, etc. Fruits at each stage of ripening have particular phenotypical characteristics. In this study, we selected three stages of fruit ripening: immature stages (6–8 inflorescence), intermediate stages (9–10 inflorescence) and mature stages (11–14 inflorescence). For each stage, liquid endosperm for 4 fruits were pooled and then 200 mL of the composite samples were stored at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . For each stage, four biological replicates were prepared, with a total of 16 fruits per stage.

### 2.2.2 Extraction and sample preparation for LC-MS analyses

Pooled samples were thawed at room temperature ( $25 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Per composite sample, 200  $\mu\text{L}$  was transferred to a 2 mL Eppendorf tube containing 600  $\mu\text{L}$  of methanol HPLC grade (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), ultrasonicated for 15 min at  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  and centrifuged at  $10,500\times g$  at  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 15 min. The supernatant was transferred to a new 1.5 mL centrifuge tube, and excess solvent was removed in a Centrivap Concentrator system (LABCONCO, Kansas City MO, USA). Then, samples were lyophilized to obtain the dry extracts. For each pool sample, 50 mg of dry extract were recovered, e.g., four replicates with 50 mg each were obtained per stage. The samples were sent to the Metabolomics core facility of the Instituto de Ecología A. C. (Xalapa, Veracruz, Mexico) for UPLC-HRMS analyses. Samples were resuspended in 1 mL of 0.1% formic acid in methanol, filtered through a  $0.22\text{ }\mu\text{m}$  PTFE membrane, and the concentration was adjusted to 50 mg/mL.

### 2.2.3 Metabolomic analysis on UPLC-ESI-MS-QTOF

A chromatographic system UPLC Class I coupled to a Synapt G2Si-HDMi mass spectrometer (Waters™, Milford, MA, USA), was used in this study. Chromatography was performed out on an Acquity BEH column ( $1.7\text{ }\mu\text{m}$ ,  $2.1 \times 50\text{ mm}$ ), with column and sample temperatures of  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  and  $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ , respectively. The mobile phases comprised of water (A) and acetonitrile (B), both with 0.1% of formic acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The

gradient condition of the mobile phase was 0–20 min linear gradient 1–99% B, 20–24 min 99% B isocratic, 24–25 min linear gradient 90–1% B (total run time 30 min); 5  $\mu$ L of extract was injected and the flow rate was 0.3 mL/min. Mass spectrometric analysis was performed with an electrospray ionization (ESI) source in negative and positive mode with a capillary, sampling cone and source offset voltages were 3000, 40 and 80 V, respectively. The source temperature was 120 °C and the desolvation temperature was 20 °C. The desolvation gas flow was 600 L/h and the nebulizer pressure was 6.5 Bar. Leucine-enkephalin was used as the lock mass (556.2771, [M+H]<sup>+</sup>; 554.2615, [M-H]<sup>-</sup>). The conditions used for MS analysis were in the mass range 50–1200 Da; Function 1 CE of 6 V; function 2 CER of 10–30 V; scan time 0.5 s.

#### 2.2.4. Data analysis

Data were acquired and processed with MassLynx (version 4.1, Waters, Milford, MA, USA) and MarkerLynx (version 4.1, Waters, Milford, MA, USA) software. The retention times and the protonated masses were generated at a noise threshold of 1000 counts and peak smoothing was applied. The raw data were exported to Excel (Microsoft Software) tables for statistical analysis; MetaboAnalyst platform (V. 5.0; (Xia et al., 2016); <https://www.metaboanalyst.ca/>), through its different modules, was used for the functional analysis of untargeted metabolomics data. Using the statistical analysis module, multivariate methods were used to compare the samples. Principal component analysis (PCA) was performed to determine samples similarity based on their chemical composition and fold changes analyses were performed to identify over-accumulated and down-accumulated metabolites [Fold Change (FC) values  $\geq 1.50$  or  $\leq 0.67$ , respectively] in the samples; for each set of differentially accumulated metabolites, both ionization modes were linked. The spectrometric features [retention time-mass/charge (rt-m/z)] signals were tentatively identified using the functional analysis module and analyzed using the pathway analysis module and pathway analysis modules considering the *Arabidopsis* metabolome as reference. The ClassyFire platform was used to classify the identified molecular ions (Djombou Feunang et al., 2016); <http://classyfire.wishartlab.com/>). This application is powered by SMILES identifiers and uses a chemotaxonomic rule-based approach, providing a hierarchical chemical classification of chemical entities.

For the processing and visualization of metabolomics data, multivariate methods were used, such as the unsupervised method principal component analysis (PCA), and volcano plot (univariate method) was constructed to identify potentially discriminatory variables. PCA,

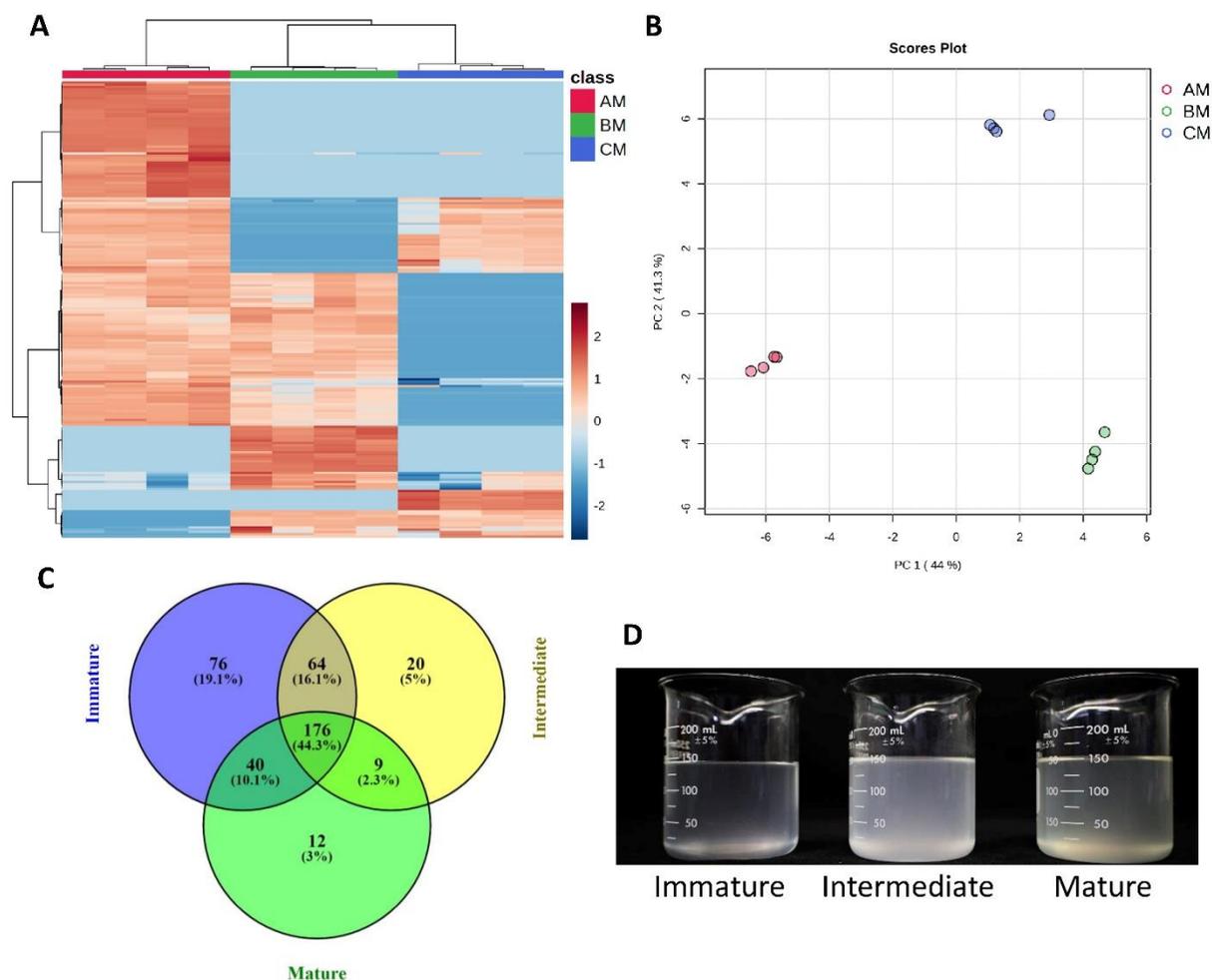
---

Volcano plot, heatmap and hierarchical clustering (HCA) were generated with the Statistical Analysis of MetaboAnalyst. The Venn diagram was generated with the Venny Platform (V. 2.1; <https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>).

## 2.3 RESULTS

### 2.3.1 Cluster analysis and PCA

Liquid endosperm samples from immature, intermediate and mature fruits were analyzed from four biological replicates (pooled samples), each one by UPLC-HRMS. Mass spectrometry analysis detected 238 m/z signals in positive ionization mode, and 353 m/z signals in the negative ionization mode. The intensity of the rt m/z signals was transformed (Log10) and normalized by Pareto scale. The heatmap with hierarchical clustering (HCA) and the principal component analysis (PCA) were carried out by combining the dataset matrix of both ionization modes (ESI+ and ESI-). The heatmap-HCA shows three specific clusters (Figure 2.1 A), corresponding to each maturity stage; this indicates that the liquid endosperm at each stage of maturity has particular chemical profiles. In the heatmap, the intensity of each rt m/z signal is indicated by the z-score using a red/blue scale. In most cases, a trend of decreasing intensities is observed from the immature to the mature fruits. For example, the ions (m/z) 272.9824, 344.9143 and 464.8038 had high intensities in the immature stage, medium intensities in the intermediate stage and lower intensities in the mature stage. This trend suggests that in the immature stage there was a greater presence of these compounds, which may be transforming into more complex molecules to supply the physiological requirements of the fruit. In some cases, an opposite trend is observed, e.g., the intensity of ions (m/z) 302.3057, 348.0608 and 146.1170 increased throughout maturity. The changes in the intensity of the detected signals reflected the dynamic accumulation of the compounds due to the activation and inactivation of various metabolic pathways. The PCA score plot (Figure 2.1 B) shows that each biological replicate was grouped according to the stage of maturity, but with separation between clusters of the maturity stages, supporting the previous observation of chemical differences between the different stages of maturity. The principal components (PCs) explained 85.3% of the total variance. In summary, PCA and HCA showed that the overall profile of the UPLC-MS analysis was affected by the stage of fruit maturity.



**Figure 2.1.** Untargeted metabolomic analysis and physical appearance of fruits and liquid coconut endosperm. (A) Heatmap with hierarchical ordering of the total ions detected by UPLC-MS-QTOF (ESI+ and ESI-). (B) Principal component analysis (PCA) of ions detected by UPLC-MS-QTOF (ESI+ and ESI-). (C) Venn diagram with the core metabolome of the liquid endosperm at three stages of maturity. (D) Physical appearance of liquid endosperm in three stages of maturity. AM/red dots (liquid endosperm from immature fruits), BM/green dots (liquid endosperm from intermediate fruits), CM/red dots (liquid endosperm from mature fruits).

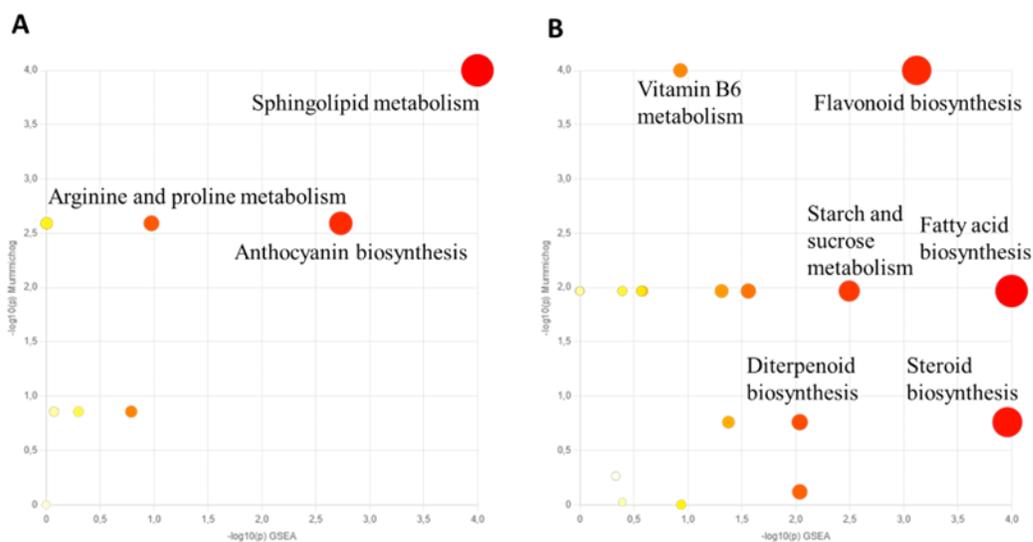
A Venn diagram was created to depict the number of statistically significant  $rt$   $m/z$  signals that were shared/unshared between the maturity stages (Figure 2. 1. C). The core metabolome consists of 176  $rt$   $m/z$  signals; the immature stage contained the highest number of unique  $rt$   $m/z$  signals (76), while the stage with the lowest number of unique  $rt$   $m/z$  signals was the mature stage (12). Signals unique to the intermediate stage numbered 20. Between the immature and intermediate stages 64  $rt$   $m/z$  signals are shared, 9  $rt$   $m/z$

signals were shared between the intermediate and mature stages, and 40 rt m/z signals between the immature and mature stages. Figure 2.1 D shows how the liquid endosperms are observed at different stages of maturity. Although the metabolomic profile is more complex in the water of immature fruits, the liquid endosperm was less turbid at this stage.

### **2.3.2 Enrichment of metabolic pathways during ripening**

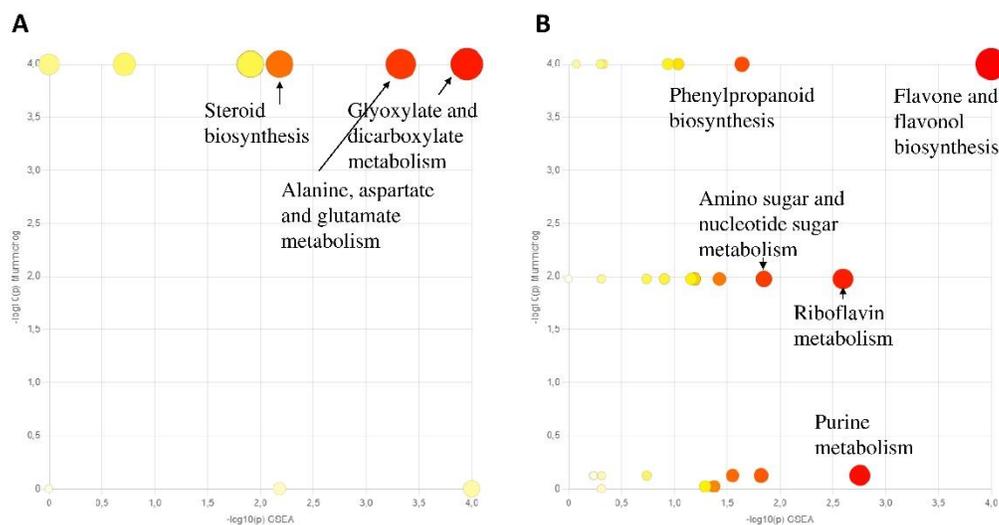
Statistical analysis of the signals detected at the different stages of ripening was performed and the results were presented by plotting p-values against the log (10) of the fold-change value on a volcano plot for each signal detected as statistically differential for each stage of maturation (e.g., immature vs. intermediate or mature). No similar distribution was observed between liquid endosperms of the fruits in different stages of ripening. The comparison of liquid endosperms from immature fruits vs. intermediate stage fruits revealed 79 signals were down-accumulated, 11 over-accumulated, and 88 did not show any change. In the immature stage vs. mature stage, 56 signals were down-accumulated, 34 over-accumulated, and 105 had no significant changes. Based on the differential ion intensities at each maturity stage, pathway enrichment analysis was performed.

First, the enrichment of metabolic pathways between the immature and intermediate stages was compared using the Mummichog and GSEA algorithm of MetaboAnalyst platform. In total, 11 metabolic pathways were over-accumulated, mainly sphingolipid metabolism, anthocyanin biosynthesis and arginine and proline metabolism (Figure 2.2 A), while 25 metabolic pathways were down-accumulated, mainly the biosynthesis of fatty acids, steroids and flavonoids (Figure 2.2 B) during the transition from the immature to the intermediate stage.



**Figure 2.2.** Comparison of pathway enrichment in immature vs. intermediate stages. (A) Metabolic pathways with over-accumulated metabolites. (B) Metabolic pathways with down-accumulated metabolites. The dots represent the enrichment factor of each metabolic pathway; the size of the circles indicate the pathway impact score and yellow-red color range describes the significance of the  $rt$   $m/z$  signal in the corresponding pathway.

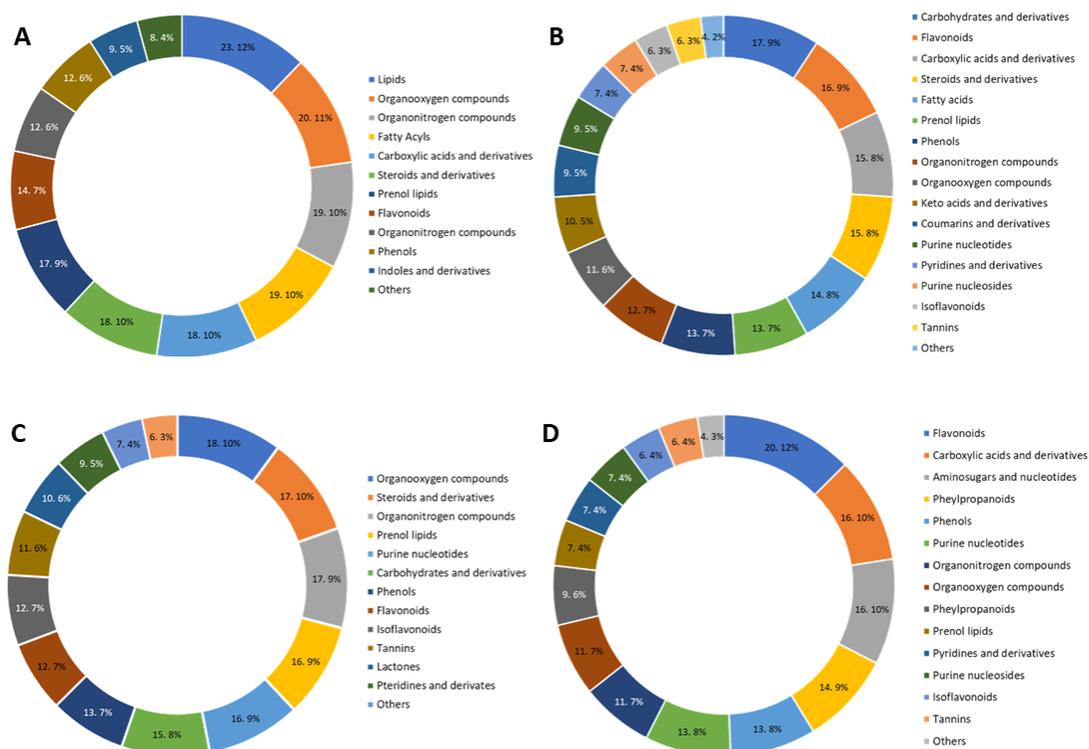
In the comparison of the intermediate and mature stages, 17 metabolic pathways were over-accumulated; the main ones were: glyoxylate and dicarboxylate metabolism, alanine, aspartate and glutamate metabolism and steroid biosynthesis (Figure 2.3 A). Conversely, 32 metabolic pathways were down-accumulated, the main ones being flavone and flavonol biosynthesis, purine metabolism, riboflavin metabolism and amino sugar and nucleotide sugar metabolism (Figure 2.3 B).



**Figure 2.3.** Comparison of pathways enrichment in intermediate vs. mature stages. (A) Metabolic pathways with over-accumulated metabolites. (B) Metabolic pathways with down-accumulated metabolites. The dots represent the enrichment factor of each metabolic pathway; the size of the circles indicate the pathway impact score and yellow–red color range describes the significance of the rt m/z signal in the corresponding pathway.

### 2.3.3 Annotated chemical classes

The most abundant chemical classes were identified based on *in silico* annotation, using Classyfire. In total 24 classes were annotated according to their chemical classes. Figure 2.4 A y B show the over-accumulated and down-accumulated chemical classes in the comparison of immature liquid endosperm vs. intermediate liquid endosperm, respectively. Figure 2.4 C D show the over-accumulated and down-accumulated chemical classes in the comparison of intermediate liquid endosperm vs. mature liquid endosperm, respectively. The main groups were carbohydrates and derivatives, lipids, flavonoids and organooxygen compounds.



**Figure 2.4.** Classification of the accumulated metabolites in the liquid endosperm of *C. nucifera* L. during ripening. (A) Classes of over-accumulated compounds in the comparison of immature vs. intermediate stages. (B) Classes of down-accumulated compounds in the comparison of immature vs. intermediate stages. (C) Classes of over-accumulated compounds in the comparison of intermediate vs. mature stages. (D) Classes of down-accumulated compounds in the comparison of intermediate vs. mature stages. Numbers within the colored spaces indicate the percentage of m/z signals classified in each category.

## 2.4 DISCUSSION

Fruit development and ripening are complex genetically-programmed processes, that occur in a species-specific manner; the physiological changes that occur during ripening have an impact on organoleptic properties and fruit quality (Hussein et al., 2018). During fruit ripening, a dynamic and complex series of metabolic processes occur that are reflected in the production of metabolites (Murthy et al., 2014; Li et al., 2020). Primary and secondary metabolites are the end products resulting from different cellular regulatory mechanisms (Umer et al., 2020). In the development of most seeds, nutrients such as amino acids, soluble proteins, lipids, soluble sugars and starch are transported to the endosperm and stored as nutritional components (Venskutonis et al., 2013). Despite the complexity of fruit development and ripening, fruits are classified simply as climacteric and non-climacteric (Chen et al., 2018). *Cocos nucifera* is a non-climacteric fruit that during early development presents mainly liquid endosperm (coconut water), and as it matures, the formation of solid endosperm (meat) occurs, reaching up to 30% of the total endosperm volume in mature fruits (Kumar et al., 2022). Coconut is the only fruit with well-differentiated liquid and solid endosperm in the intermediate and mature stages of ripening (Angeles et al., 2018).

Untargeted metabolomics permits functional analyses of positively or negatively regulated pathways based on metabolite annotations (Li et al., 2019). Here, PCAs for both modes of ionization grouped the samples according to the state of maturation (immature, intermediate or mature). This supports an acceptable classification of the fruits according to their phenotypic characteristics, and fosters reproducibility in the extractions of metabolites and the LC-MS analyses. Similar results were reported by Kumar et al. (2021), whose study found that the metabolome of the coconut liquid endosperm could be grouped according to the stage of physiological maturity, which is based on phenotypic characteristics and months after pollination. The volcano plot is a powerful graphical tool for high-throughput analyses which aids in the identification of significantly differentially expressed genes or signals across two or more conditions (Pan et al., 2021). The volcano plot supported (statistically with p-values) the significance of the fold-change values of the differentially accumulated signals in the liquid endosperm during coconut ripening (e.g., immature vs. intermediate stages). The volcano plots showed that the liquid endosperm was largely different among the different stages during fruit maturation, meaning that the composition and abundance of specific molecules or compounds vary while the fruit is ripening (blue and red dots). Variation in the chemical composition of fruits during ripening is congruent with existing literature;

there are similar reports for several fruits such as *Fragaria × ananassa* (Wang et al., 2023), *Citrus reticulata* (Wang et al., 2020) and *Rosa roxburghii* (Xu et al., 2019).

Due to the nutraceutical potential of coconut water, the nutrient profile has been analyzed by targeted metabolomics in fruits with different degrees of maturity. A study carried out on COD and MYD cultivars (common cultivars in India) found significant differences in the regulation of the metabolic pathways between the different maturation stages in each variety, but there were no significant differences when comparing both varieties (Kumar 2021). In the Yucatan green dwarf coconut cultivar, starch and sucrose are among the main metabolic pathways regulated in the immature stage, and they showed similar regulation to that previously reported in COD and MYD cultivars. This pathway is more active in intermediate fruits since a higher accumulation of the compounds involved in this metabolic pathway is observed at this stage. Some annotations of compounds in the Yucatan green dwarf cultivar, based on their m/z ratios consulted in databases such as MassBank, match with compounds identified most of them coincide in the carbohydrate profile, for example, fructose, glucose, sucrose and mannitol.

During ripening of the Yucatan green dwarf coconut cultivar, changes in over-accumulation were observed for flavonoid biosynthesis, steroid biosynthesis, diterpenoid biosynthesis, anthocyanin biosynthesis, metabolism of ascorbate and aldarate, and metabolism of the amino acids: alanine, aspartate and glutamate. Although it cannot be ruled out that these results reflect biochemical differences between these cultivars, the differences are most probably due to methodological factors (Yanes et al., 2021; Alseekh and Fermie, 2023). In the cultivars COD and MYD, up-regulation in the metabolism of phenylalanine, tyrosine and tryptophan was observed. This could be because the chemical precursors of these amino acids have an affinity for the ethyl acetate used (Tang et al., 2022). Conversely, the chemical precursors of alanine, aspartate and glutamate are polar with an affinity for methanol, which was used in this present study.

The classification of fruits in different stages of maturity is based on phenotypic characteristics; although this classification has worked quite well overall, some scatter in the PCA analyses show that there is some bias in the classification of the samples (Kumar et al 2021; Felix et al., 2023). Kumar et al. (2021) proposed eight biomarkers for the different stages of maturity which were identified when they conducted targeted nutritional metabolomics. Here, the untargeted method employed was able to identify sucrose, succinic acid and fumaric acid, in semi-quantitative analysis. The advantages of our procedure include a significantly shorter analysis time in the preparation of the samples, since a small

volume of solvent was used (200  $\mu$ L methanol vs. 200 mL ethyl acetate in the literature). Furthermore, concentration by rotary evaporator was not required; there was no derivatization of compounds in our case. Consequently, the lower cost of analysis of our method may be more attractive for routine applications in the classification of samples for research or industry.

Sucrose and starch play key roles in photosynthesis and are synthesized from triose-phosphate during plant CO<sub>2</sub> fixation in the cytosol and the chloroplasts, respectively (Henry et al., 2020; Quin et al., 2020). In the endosperm of the fruits in the intermediate ripening stage, intermediate precursors and end-products of these pathways were highly accumulated. Sucrose 6-phosphate, trehalose 6-phosphate, D-fructose and others were identified in the liquid endosperms, which are also intermediates of glycolysis, the pentose phosphate cycle and the tricarboxylic acid cycle (TCA), all of which are related to carbon metabolism (Toleco et al., 2020). In the seed of *Styrax tonkinensis*, these metabolites are accumulated in fruits in the intermediate stages of maturation as a preliminary step for lipid synthesis (Wu et al., 2020). These major sugars confer the sweet flavor of coconut water, mainly in the immature stage of ripening, supported by results from Kumar et al. (2021). Total soluble sugars in coconut liquid endosperm changes throughout ripening; in the intermediate stage, they are in high concentration and then decrease in the mature stage (Kumar et al., 2021; Jackson et al., 2004). Reducing sugars also participate in the metabolism of reactive oxygen species (ROS), contributing to the generation of energy through the oxidative pentose phosphate pathway (Durán-Soria et al., 2020). Additionally, they play a key role in osmoprotection and cell membrane stabilization (Ghaffari et al., 2019). Seed germination requires a great reserve of energy; the glyoxylate cycle, the TCA cycle and gluconeogenesis are key processes which provide the energy needed for germination (Zhao et al., 2021). Glyoxylate and dicarboxylate metabolisms are over-accumulated during the ripening of coconut fruits in the mature stage. A key enzyme in the glyoxylate cycle is isocitrate lyase (ICL), which catalyzes the cleavage of isocitrate into glyoxylate and succinate; succinate enters the mitochondria for subsequent reactions (Chew et al., 2019). Félix et al. (2023) recently demonstrated that glyoxylate is significantly regulated during the ripening of coconut fruits, following an inverted bell curve, in agreement with the regulation of glycolysis. Glyoxylate and dicarboxylate metabolisms are also related to abiotic stress, providing a balance in metabolic changes to improve tolerance to drought stress (Li et al., 2020). The metabolism of ascorbate and aldarate was found here to be one of the most over-accumulated, suggesting an important role of this metabolism in the detoxification of

glyoxal and methylglyoxal in coconut, to overcome the oxidative stress imposed by highly active glycolysis.

Organic acids are involved in various metabolic pathways such as the synthesis of amino acids, auxins, gibberellins, salicylic acid, fatty acids, phenolic compounds and cell wall compounds (Walker et al., 2018). The high concentration of aconitic acid, malic acid and succinic acid, and the low concentration of sugars in coconut water from immature fruits are determinants of its flavor (Limbad et al., 2023). Unexpectedly, a high accumulation of some ions related to organic acids in coconut water was also observed in mature fruit, and this may be related to metabolic activity in the tricarboxylic acid cycle, as well as gluconeogenesis and amino acid interconversion, prior to embryo germination and haustorium development (Zhang et al., 2020).

The metabolism of alanine, aspartate and glutamate is a short catabolic pathway, where alanine is converted to pyruvate (Hildebrandt et al., 2015). This metabolic pathway is intricately connected to various biochemical processes, and also influences cellular energy balance and signal transduction (Han et al., 2021). In the mitochondria, different multi-enzyme complexes are involved in various metabolic branches, such as for the synthesis of isoleucine, methionine or threonine, which are important nutrients and precursors for the synthesis of essential amino acids (Zhang et al., 2019).

Other metabolic pathways that may play critical roles in the biochemical transformation of coconut fruit during ripening are: sphingolipid metabolism, anthocyanin biosynthesis, flavone and flavonol biosynthesis, riboflavin metabolism and amino sugar and nucleotide sugar metabolism. (A) Sphingolipid metabolism: Coconut liquid endosperm is described as a fat-free drink, however, in immature and intermediate stages of the green dwarf coconut water, the presence of sphingolipids was detected. They are likely to be involved in the transition from the immature to the intermediate stage, since these lipids are key elements in many cellular processes, including cell signaling, membrane structure, and apoptosis (Liu et al., 2021) and fruit maturity processes (Luttgeharm et al., 2015). Likewise, Fonseca et al. (2009) and Cunha et al. (2020) reported in green dwarf coconut water the presence of long-chain fatty acids such as palmitic, myristic and stearic acids. In line with these reports, the biosynthesis of fatty acids was found to be up-regulated in our study. Fatty acids play critical roles in energy storage and membrane structure. Over-representation of this pathway is congruent with the need for lipid-building blocks during fruit growth and maturation (Serra et al., 2019). Another lipid metabolism that was found to be important was steroid biosynthesis. Steroids contribute to the synthesis of hormones, structural components of membranes, and

signaling molecules. Changes in steroid biosynthesis are related with a shift in hormonal regulation (Rogowska et al., 2022), which is expected during fruit development. The content of these lipids, although important for fruit physiology, may be lower in coconut water compared with oily fruits, classifying this drink as a low-caloric product, suitable for hyperglycaemic, hyperlipidemic and nephropathy patients (Alatawi and Alshubaily, 2021). (B) Anthocyanin biosynthesis: anthocyanins are pigments responsible for the red, purple and blue colors in many fruits, flowers, and leaves (Zhang et al., 2014), and they have been previously reported in coconut water (Karouw et al., 2020; Wei et al., 2022). For this reason, coconut water is considered to be useful for human health, against cancer and heart diseases. The coconut kernel may contain 10 times more anthocyanin compared with coconut water (Karouw et al 2020), and the over-accumulation of these products contribute to the change of color in the exocarp during fruit maturation. (C) Flavone and flavonol biosynthesis: Flavonoids are a group of plant secondary metabolites involved in pigmentation, UV protection, defense against pathogens, and as signaling molecules (Liu et al., 2021). Changes in flavonoid biosynthesis during fruit ripening can affect fruit color and nutritional quality. Flavonoids are important antioxidants against reactive oxygen species (ROS), oxidases (e.g., xanthine oxidase [XO], and phosphoinositide 3-kinase [PI3K]), and they also activate antioxidant enzymes (Shen et al., 2022). (D) Riboflavin metabolism: Riboflavin (vitamin B2) is a vital coenzyme involved in various redox reactions and energy metabolism. It is essential for plant growth, development, and stress response (Tian et al., 2022); therefore, regulation of riboflavin metabolism is consistent with the expected biochemistry of coconut ripening. (E) Amino sugar and nucleotide sugar metabolism: these pathways are crucial for the synthesis of glycoproteins, glycolipids, and other important cellular components. Changes in these pathways can influence cell wall composition and other aspects of fruit development (Guo et al., 2022).

The identification of all these metabolisms have been related with other oilseeds such as cashew nut (*Anacardium occidentale* L.) (Zhao et al., 2023) and sesame (*Sesamum indicum* L.) (Dossou et al., 2021), showing similar metabolic profiles associated with simple and complex sugars, organo-oxygenated compounds, flavonoids and phenolic compounds, amino acids, nucleosides, nucleotides and organic acids during maturation. These compounds are an important fraction of the nutrients in most oilseeds, and they are directly associated with appearance, texture and flavor (Arrutia et al., 2020).

Although the liquid endosperm metabolomes of yellow dwarf and orange dwarf cultivars were previously reported, here we present, for the first time, information on the liquid

endosperm metabolome of the Yucatan green dwarf; these three dwarf cultivars are the predominant cultivars used to obtain coconut water worldwide. Differences in sample preparation and analytical platforms make metabolomics results complementary (Zhou et al., 2022; Ribbenstedt et al., 2018); therefore, the information obtained for Yucatan green dwarf coconut expands the knowledge of the metabolome of dwarf coconut cultivars.

The metabolome of the Yucatan green dwarf coconut is highly conserved with metabolomes reported for COD and MYD dwarf varieties from India, with respect to sugars, organic acids, and amino acid accumulation (Kumar et al 2021), and is consistent with the recently reported proteomics study for green dwarf coconut (Felix et al., 2023), although some discrepancies were also noted.

## CAPITULO III

### COMPARACIÓN DE LAS RUTAS METABÓLICAS ENRIQUECIDAS DURANTE LA MADURACIÓN DEL ENDOSPERMO LÍQUIDO Y SÓLIDO DE *COCOS NUCIFERA* L. EN DOS VARIEDADES CONTRASTANTES: ALTO DEL PACÍFICO MEXICANO Y ENANO VERDE DE YUCATÁN

#### 3.1 INTRODUCCIÓN

Existe una regulación compleja y dinámica que involucra múltiples niveles de regulación biológica, molecular y bioquímica en la maduración de frutos y semillas. Estos procesos no sólo aseguran la acumulación de reservas energéticas esenciales para el desarrollo del embrión y la germinación, sino que también se optimizan las propiedades fisiológicas y estructurales del fruto para su dispersión (Bareke et al., 2018). En *C. nucifera* L., la maduración del endospermo sólido y líquido representa un modelo único para estudiar las interacciones moleculares y metabólicas que ocurren en este proceso. A través de tecnologías ómicas, como la metabolómica y la proteómica, ha sido posible conocer cuáles son las rutas metabólicas y los compuestos específicos que podrían repercutir en los cambios fisiológicos y fenotípicos en los diferentes estadios de maduración, proporcionando una visión integral del desarrollo de los frutos en esta y otras especies (Mazlan et al., 2018). Se propone que, en el caso del coco, el endospermo líquido y sólido presentan cambios metabólicos distintivos que cubren las necesidades específicas de cada tejido en diferentes etapas de maduración. Durante el estadio inmaduro, el endospermo líquido actúa como un tejido altamente activo metabólicamente, promoviendo el crecimiento celular y el almacenamiento inicial de reservas (Granados-Alegría et al., 2024; Gómez-Tah et al., 2023). La metabolómica ha sido una herramienta clave para identificar compuestos y rutas metabólicas específicas asociadas con procesos fisiológicos en diversos sistemas biológicos (Tang et al., 2020). Los hallazgos en *C. nucifera* revelan adaptaciones únicas que destacan la versatilidad metabólica de esta especie. Por ejemplo, el enriquecimiento de rutas metabólicas relacionadas con el metabolismo del ácido araquidónico en el endospermo líquido de frutos maduros sugiere un papel activo en la señalización hormonal y la regulación del desarrollo final del fruto (Ortutu y Aremu, 2017).

Los estudios basados en tecnologías ómicas han proporcionado una base sólida para comprender las dinámicas metabólicas subyacentes a la maduración, revelando tanto similitudes como diferencias con otras especies vegetales. Estas investigaciones no sólo amplían el conocimiento fundamental sobre la biología del coco, sino que también tienen implicaciones prácticas para el manejo agronómico y el mejoramiento genético de esta especie de importancia mundial. Este trabajo busca integrar y analizar los resultados obtenidos, conceptualizándolos en el marco más amplio de la maduración de frutos y semillas desde una perspectiva molecular y bioquímica.

## 3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.2.1 Colecta de material vegetal

Se utilizaron frutos de *C. nucifera* de las variedades alto del Pacífico mexicano y enano verde de Yucatán. Los frutos fueron recolectados en una plantación ubicada en el puerto de San Crisanto, comisaría de Sinanché, Yucatán, México (21°20'53.5"N, 89°12'08.6"W). Se recolectaron frutos en tres estadios de maduración: inmaduro, intermedio y maduro. La determinación del estadio de maduración se realizó siguiendo el método descrito por Islas-Flores et al. (1998), Perera et al. (2010) y Mahayothee et al. (2016), basado en el conteo de las inflorescencias de la planta. Este método considera como estadio 0 a la inflorescencia más joven y aún cubierta por la espata, cuya aparición se estima menor a 30 días. A partir de ésta, las inflorescencias y los racimos de frutos ubicados en posiciones sucesivas hacia abajo se designan como estadios 1, 2, 3, y así sucesivamente, asumiendo que cada estadio representa un intervalo aproximado de 30 días. Bajo este criterio, las inflorescencias/racimos correspondientes a los estadios 6 a 8 se consideraron como portadoras de frutos inmaduros; los frutos de maduración intermedia se obtuvieron de las inflorescencias 9 y 10; y los frutos completamente maduros se recolectaron de las inflorescencias a partir del estadio 11 en adelante.

Este método de clasificación es más práctico y preciso para determinar la maduración de los frutos, pues las diferentes variedades de coco tienen diferentes períodos de maduración. Además, la selección basada en el número de inflorescencias permite obtener resultados más consistentes en términos de maduración del coco, ya que la mayoría de los productores de coco no tienen un sistema de registro adecuado para las etapas de maduración (Hailim et al., 2023).

Se extrajo el endospermo líquido y sólido y se prepararon muestras compuestas para reducir la desviación estándar. Cada muestra compuesta se elaboró a partir de cuatro frutos de la misma variedad y con el mismo grado de maduración. Para cada muestra compuesta se recuperaron 20 g de endospermo sólido (5 g por fruto) y 200 mL de endospermo líquido (50 mL por fruto).

Las muestras del endospermo líquido fueron colectadas en envases de PET de 500 mL y el endospermo sólido en tubos de centrifuga de 50 mL. Las muestras se almacenaron en ultracongelación a - 80 °C, hasta su procesamiento.

### 3.2.2 Medición del volumen y pH

El endospermo líquido se midió de manera individual con una probeta graduada de 500 mL, posteriormente se midió el pH con un potenciómetro de la marca OHAUS STARTER 5000.

### 3.2.3 Extracción de metabolitos del endospermo sólido asistida por ultrasonificación

Se aplicó la metodología propuesta por Zhang *et al.* (2020) con modificaciones. Las muestras resguardadas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  se descongelaron a  $24\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 2$ ). El endospermo sólido se trituró con nitrógeno líquido, mortero y pistilo. En tubos de microcentrifuga de 2 mL se añadieron 200 mg de endospermo sólido o 200  $\mu\text{L}$  de endospermo líquido, por separado. Cada muestra se mezcló con 600  $\mu\text{L}$  de acetato de etilo (AcOEt) grado HPLC (Sigma-Aldrich). Se agitó ligeramente la mezcla y se colocó en un baño ultrasónico (Branson 3800) durante 15 minutos a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente la muestra se centrifugó a  $10,500\times g$  durante 10 min a  $24\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 2$ ). El sobrenadante se recuperó transfiriéndolo en un tubo nuevo, esta fracción se colocó en el concentrador CentriVap (LABCONCO) por 4.5 h a  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$  a presión reducida.

El resultado del paso anterior se almacenó a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 12 h, previo al paso de liofilización. Las muestras congeladas se liofilizaron por 48 h. Por cada muestra se realizaron 40 repeticiones con el fin de recuperar 50 mg de extracto seco total para una réplica técnica (4 por muestra).

El extracto seco se recuperó y se depositaron 50 mg de la muestra en cuatro tubos de 1.5 mL estériles. Las muestras fueron enviadas para su análisis al laboratorio de metabolómica de la Red de Estudios Moleculares Avanzados del Instituto de Ecología (INECOL. A. C., Xalapa, Veracruz, México). Al llegar a su destino se resuspendieron con metanol acidificado con ácido fórmico al 0.1% grado HPLC y se filtraron para el análisis del perfilado metabolómico mediante UPLC-MS-QTOF. Se utilizaron dos modos de ionización con electrospray: positivo y negativo (ESI+ y ESI-). El rango de búsqueda de masas por MS fue de 50-1200 Da.

### 3.2.4 Extracción de metabolitos del endospermo líquido por partición líquido-líquido

Se liofilizó el endospermo líquido de los frutos en diferente estadio de maduración para reducir el volumen; se realizaron tres particiones líquido-líquido con acetato de etilo. Las fracciones obtenidas en cada partición se reunieron en un matraz de 500 mL y se añadió 5 g de sulfato de sodio anhidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), posteriormente se filtró con papel filtro Whatman No. 1. El exceso de disolvente se eliminó a presión reducida hasta obtener ~ 5 mL de extracto; de este extracto se tomaron alícuotas de 1 mL y se transfirieron a tubos de 1.5 mL y se colocaron en el concentrador CentriVap (LABCONCO) por 2.5 h a 35 °C a presión reducida para facilitar la recuperación del extracto seco. El extracto seco se recuperó y se depositaron 50 mg de la muestra en cuatro tubos de 1.5 mL estériles. Las muestras se enviaron para su análisis al laboratorio de metabolómica de la Red de Estudios Moleculares Avanzados del Instituto de Ecología (INECOL. A. C., Xalapa, Veracruz, México).

### 3.2.5 Análisis metabolómico por UPLC-ESI-MS-QTOF

Se utilizó un sistema cromatográfico UPLC Clase I acoplado a un espectrómetro de masas Synapt G2Si-HDMi (Waters™, Milford, MA, EE. UU.). La cromatografía se realizó en una columna Acquity BEH (1.7  $\mu\text{m}$ , 2.1 × 50 mm), con temperaturas de columna y muestra de 40 °C y 15 °C, respectivamente. Las fases móviles fueron agua (A) y acetonitrilo (B), ambas con 0.1% de ácido fórmico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.). La condición de gradiente de la fase móvil fue de 0-20 min gradiente lineal 1-99% B, 20-24 min 99% B isocrático, 24-25 min gradiente lineal 90-1% B (tiempo total de ejecución 30 min); se inyectaron 5  $\mu\text{L}$  de extracto y el caudal fue de 0.3 mL/min. El análisis espectrométrico de masas se realizó con una fuente de ionización por electrospray (ESI) en modo negativo y positivo con un capilar, cono de muestreo y voltajes de compensación de fuente de 3000, 40 y 80 V, respectivamente. La temperatura de la fuente fue de 120 °C y la temperatura de desolvatación fue de 20 °C. El flujo de gas de desolvatación fue de 600 L/h y la presión del nebulizador fue de 6.5 Bar. Se utilizó leucina-encefalina como masa de control (556.2771,  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ; 554.2615,  $[\text{M}-\text{H}]^-$ ). Las condiciones utilizadas para el análisis MS estuvieron en el rango de masas de 50 a 1200 Da; función 1 CE de 6 V; función 2 CER de 10 a 30 V; tiempo de barrido 0.5 s.

### 3.2.6 Análisis de datos

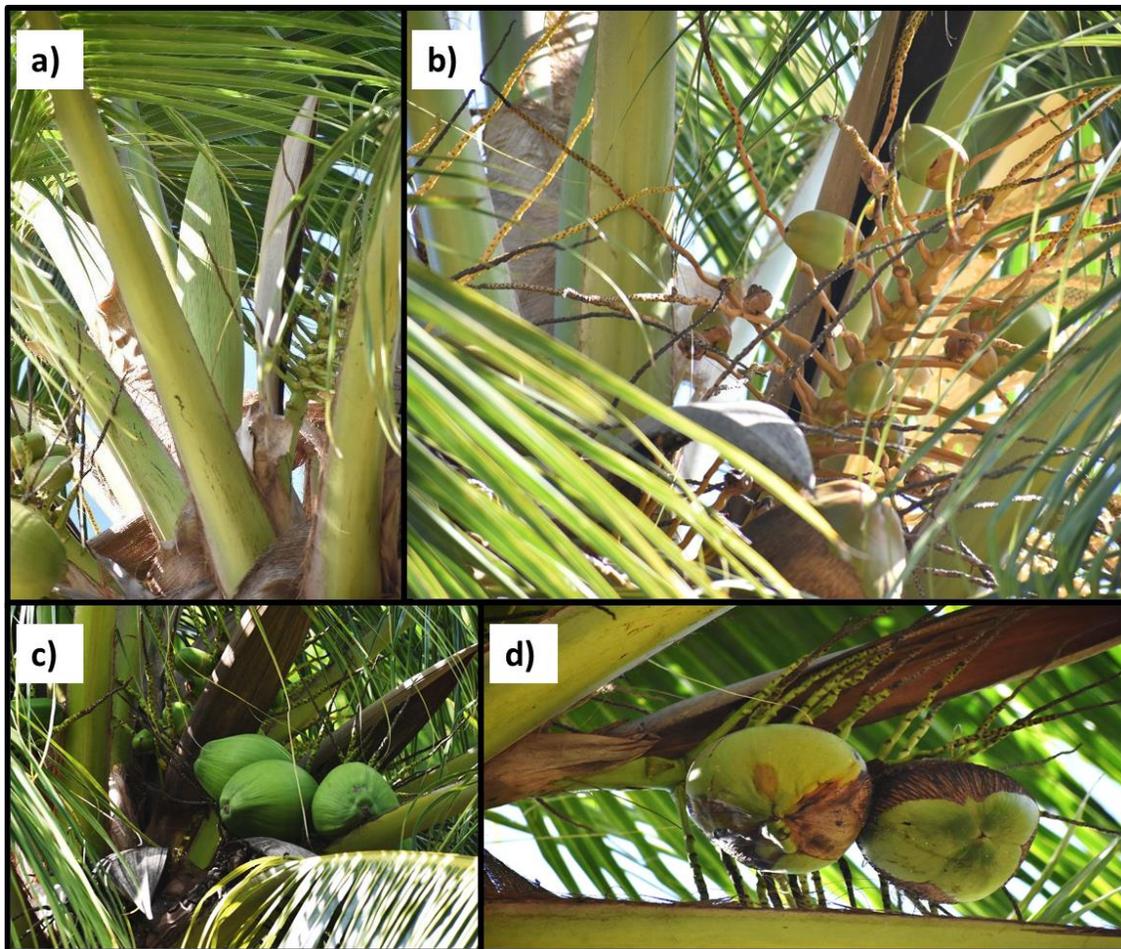
Los datos fueron adquiridos y procesados con el software MassLynx (versión 4.1, Waters, Milford, MA, EE. UU.) y MarkerLynx (versión 4.1, Waters, Milford, MA, EE. UU.). Los tiempos de retención y las masas protonadas se generaron en un umbral de ruido de 1000 cuentas y se aplicó suavizado de picos. Las matrices de datos sin procesar se exportaron a tablas de Excel (Microsoft Software) para el análisis estadístico; la plataforma MetaboAnalyst (V. 6.0; (Pang, 2024), a través de sus diferentes módulos. Utilizando el módulo de análisis estadístico, se utilizaron métodos multivariados para comparar los resultados por muestra analizada. Se realizó un análisis de componentes principales (PCA) para determinar la similitud de las muestras en función de su composición química y se realizaron análisis de cambios (Log<sub>2</sub> fold change) para identificar en cada conjunto las señales m/z diferenciales, se combinaron ambos modos de ionización. Las señales de características espectrométricas [tiempo de retención-masa/carga (rt-m/z)] se identificaron tentativamente utilizando el módulo de análisis funcional y se analizaron utilizando el módulo de análisis de rutas y los módulos de análisis de vías considerando el metaboloma de *Arabidopsis* como referencia. Para el procesamiento y visualización de los datos metabolómicos se emplearon métodos multivariantes, como el método no supervisado de análisis de componentes principales (PCA), y se construyó un diagrama de volcanes (método univariante) para identificar variables potencialmente discriminantes. El PCA, el diagrama de volcanes, el mapa de calor y el clustering jerárquico (HCA) se generaron con el Análisis Estadístico de MetaboAnalyst. El diagrama de Venn se generó con la Plataforma Venny (V. 2.1; <https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>).

Para sustentar la interpretación se consultaron bases de datos de acceso abierto, con el fin de comparar los patrones de fragmentación obtenidos con los ya reportados. Por mencionar algunas bases contempladas: MassBank (Horai et al., 2010); FOOdB (Delgado et al., 2021) y COCONUT COLleCtion of Open Natural ProdUcTs (Sorokina et al., 2021), entre otras.

### 3.3 RESULTADOS

#### 3.3.1 Obtención de material vegetal y preparación de las muestras

La colecta de frutos de *C. nucifera* se realizó en la plantación “Guadalupe”, ubicada en San Crisanto, Sinanché, Yucatán, México. Esta plantación contiene individuos de las variedades alto del Pacífico mexicano y enano verde local. Se consideró la inflorescencia con espata sin abrir como el estadio cero (Figura 3.1 A). A partir de la inflorescencia cero (estadio cero) se estimaron los meses de maduración de las inflorescencias y racimos anteriores.

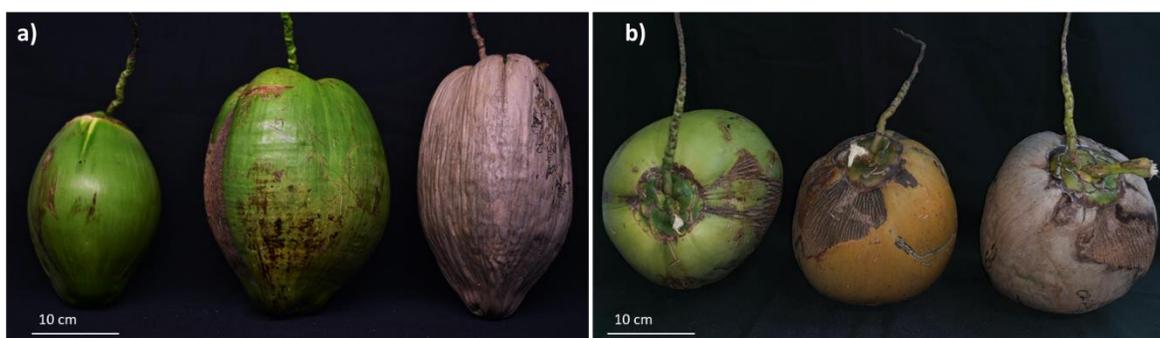


**Figura 3.1.** Inflorescencias y racimos de frutos de *Cocos nucifera* L. A) Inflorescencia sin abrir cubierta con espata (estadio 0). B) Inflorescencia con frutos en el estadio 4. C) Racimo de frutos inmaduros del estadio 6. D) racimo con frutos intermedios del estadio 8.

Posterior a la colecta, se agruparon los frutos de coco según la variedad y el grado de maduración (Figura 3.2), y fue posible hacer una diferenciación entre variedades y estadios de maduración, por ejemplo, los frutos de la variedad enano verde de Yucatán son más pequeños y ovals, comparados con la variedad alta de Pacífico Mexicano que son ligeramente más grandes y circulares. Respecto a la maduración, se pueden distinguir cambios en la coloración del exocarpio para cada estadio de maduración (Figura 3.3). Se tomaron cuatro frutos con el mismo grado de maduración, provenientes de al menos dos diferentes plantas de la misma variedad.



**Figura 3.2.** Agrupamiento de frutos de acuerdo a la variedad y el grado de maduración para la preparación de muestras compuestas.



**Figura 3.3.** Frutos de *Cocos nucifera* L. inmaduros, intermedios y maduros. a) Frutos de la variedad enano verde. b) Frutos de la variedad alto del Pacífico mexicano.

Las palmeras de la plantación tenían una clave que permitió identificar a los individuos de las variedades enano verde y alto del pacífico. En el Cuadro 3.1 se presentan las claves de las palmeras de las que se colectaron los frutos para la preparación de las muestras compuestas. En paréntesis se indica el estadio de la maduración del fruto. Inmaduro (6-8), intermedio (9 y 10) y maduro (a partir de la inflorescencia 11).

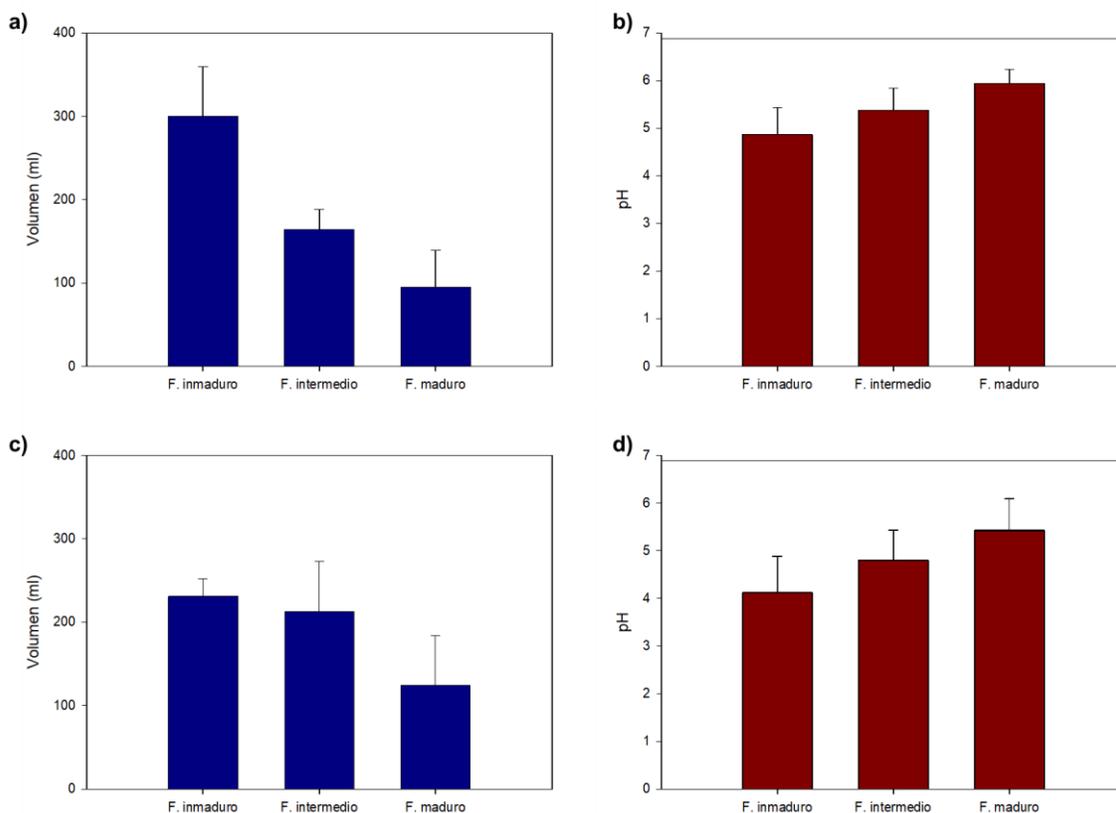
**Cuadro 3.1.** Claves de las palmeras y estadios de maduración de los frutos seleccionados para formar las muestras compuestas.

<b>Enano verde</b>		<b>Alto del Pacífico</b>	
Muestra de inmaduros		Muestra de inmaduros	
G2-117 (7)	J2-66 (6)	R1-280521 (7)	R1-280521 (7)
J1-81 (7)	G2-117 (7)	N1-103 (7)	N1-103 (7)
Muestra de intermedios		Muestra de intermedios	
G2-177 (10)	J2-66 (9)	R1-280521 (9)	R1-280521 (9)
J1-81 (9)	G2-117 (9)	N1-103 (9)	N1-103 (9)
Muestra de maduros		Muestra de maduros	
M2-65 (13)	M2-65 (14)	C2-35 (12)	N1-103 (12)
G2-117 (12)	M2-65 (12)	M3-88 (12)	N1-103 (13)

Se realizó la extracción con acetato de etilo; lo obtenido se liofilizó y se preparó para ser enviado al servicio de análisis de UPLC-MS-QTOF.

### 3.3.2 Medición de parámetros fisicoquímicos

En los parámetros fisicoquímicos se observaron diferencias significativas entre los distintos estadios de maduración analizados, aunque los valores fueron similares entre ambas variedades. Se analizaron 15 frutos de la variedad enano verde de Yucatán y 15 frutos de la variedad alto del Pacífico mexicano; a partir del endospermo líquido de cada fruto se obtuvieron los valores correspondientes y se realizó el análisis estadístico. En ambas variedades, el volumen del endospermo líquido disminuyó de forma gradual conforme avanzó la maduración (Figuras 3.4 A y 3.4 C). En promedio, los frutos inmaduros de la variedad enano verde de Yucatán presentaron un volumen de 300.3 mL, los intermedios 164 mL y los maduros 95.2 mL. Por su parte, la variedad alta del Pacífico mexicano mostró un volumen promedio de 260 mL en los frutos inmaduros, 200 mL en los intermedios y 140 mL en los maduros. El pH del endospermo líquido también mostró una tendencia al alza conforme avanzó la maduración en ambas variedades (Figuras 3.4 B y 3.4 D). En la variedad enano verde de Yucatán, el pH promedio fue de 4.87 en frutos inmaduros, 5.38 en intermedios y 5.94 en maduros. En la variedad alta del Pacífico mexicano, los valores fueron de 4.79, 5.22 y 6.03 para los estadios inmaduro, intermedio y maduro, respectivamente.

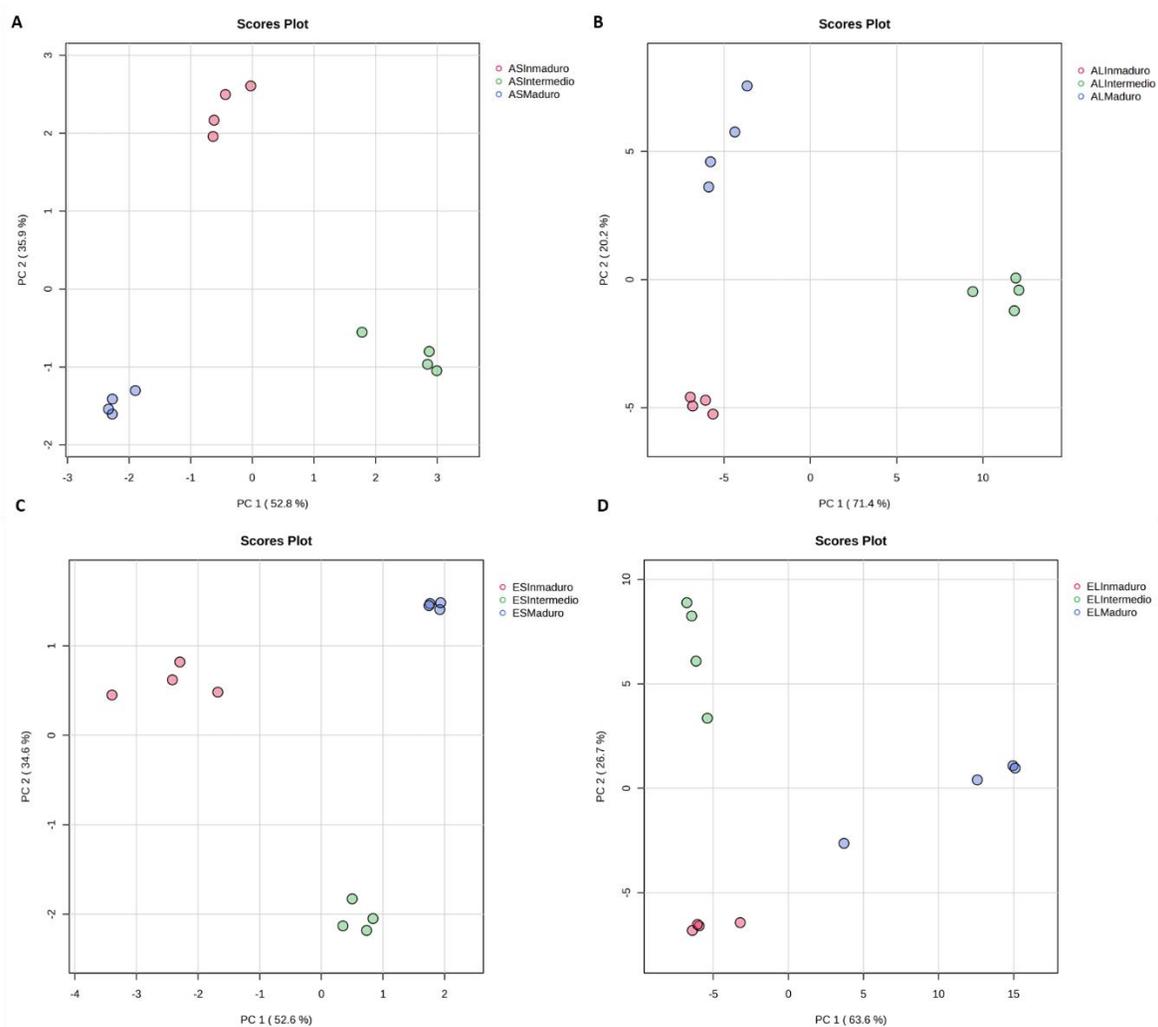


**Figura 3.4.** Gráfico de barras de los parámetros fisicoquímicos medidos. A) Volumen del endospermo líquido extraído de los frutos de la variedad enano verde de Yucatán. B) Valores de pH del endospermo líquido extraído de los frutos de la variedad enano verde de Yucatán. C) Volumen del endospermo líquido extraído de los frutos de la variedad alto del Pacífico mexicano. D) Valores de pH del endospermo líquido extraído de los frutos de la variedad alto del Pacífico mexicano.

### 3.3.3 Análisis metabolómico no dirigido

Se analizaron las muestras por variedad y tipo de endospermo en frutos inmaduros, intermedios y maduros a partir de cuatro réplicas biológicas (muestras agrupadas), mediante UPLC-HRMS. En el análisis de espectrometría de masas se detectaron 1574 señales iónicas ( $m/z$ ), la intensidad de estas señales se transformó ( $\text{Log}_{10}$ ) y se normalizó mediante la escala de Pareto. Los análisis de componentes principales (PCA) se realizaron combinando el conjunto de datos de ambos modos de ionización ( $\text{ESI}^+$  y  $\text{ESI}^-$ ) comparando la variedad y el tipo de endospermo. Los componentes principales (CP) explicaron el 88.7% y el 91.6% de la varianza total en los PCA del endospermo sólido y líquido de la variedad alta, respectivamente (Figura 3.5 A y B). En la variedad enano verde se explicó el 87.2%

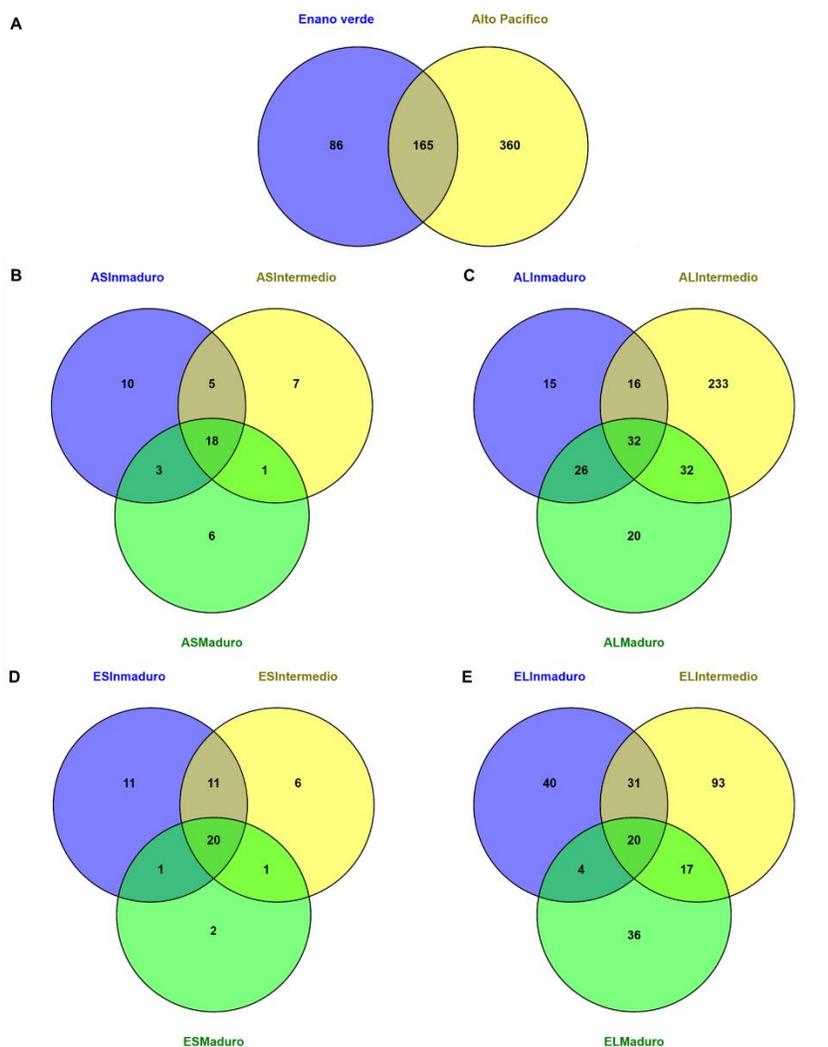
de la varianza total en el endospermo sólido y el 90.3 en el endospermo líquido (Figura 3.5 C y D). Los resultados mostraron agrupamientos específicos correspondientes a cada etapa de maduración de acuerdo a la variedad y tipo de endospermo analizado, esto indicó que los perfiles químicos son particulares en cada muestra analizada.



**Figura 3.5.** Análisis de componentes principales (PCA) de iones detectados por UPLC-MS-QTOF. A) PCA del endospermo sólido de la variedad alto del Pacífico mexicano. B) PCA del endospermo líquido de la variedad alto del Pacífico mexicano. C) PCA del endospermo sólido de la variedad enano verde. D) PCA del endospermo líquido de la variedad enano verde.

Se realizaron diagramas de Venn para representar el número de señales  $m/z$  estadísticamente significativas compartidas o no compartidas entre las etapas de maduración de cada variedad. El metaboloma central (core metabolome) entre variedades consta de 165 señales (27%) (Figura 3.6 A). Las etapas intermedias del endospermo líquido

de ambas variedades mostraron el mayor número de señales, mientras que las maduras mostraron el menor.

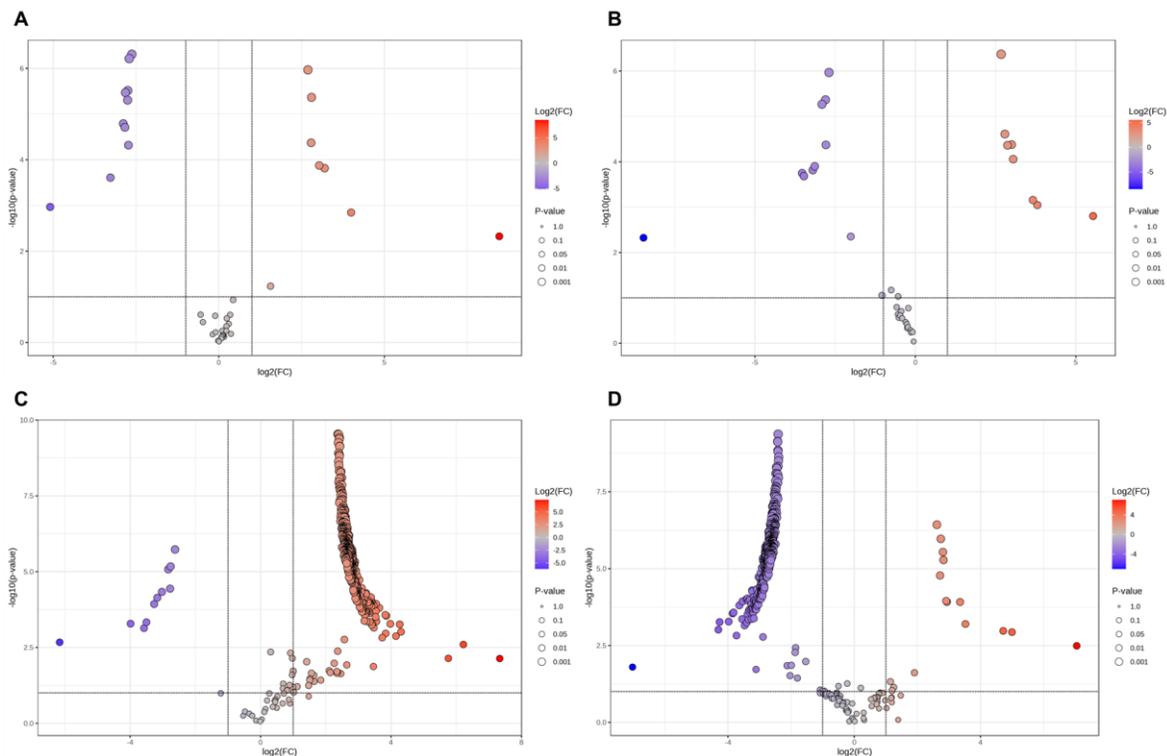


**Figura 3.6.** Diagramas de Venn con el metaboloma central entre variedades y tipos de endospermo. A) Diagrama de Venn del metaboloma central entre las dos variedades combinando los tipos de endospermo. B) Diagrama de Venn con señales compartidas y únicas en el endospermo sólido de la variedad alto del Pacífico Mexicano. C) Diagrama de Venn con señales compartidas y únicas en el endospermo líquido de la variedad alta. D) Diagrama de Venn con señales compartidas y únicas en el endospermo sólido de la variedad enano verde de Yucatán. e) Diagrama de Venn con señales compartidas y únicas en el endospermo líquido de la variedad enano verde de Yucatán.

En la variedad alto del Pacífico mexicano, la etapa intermedia del endospermo líquido fue la que tuvo el mayor número de señales (233) (Figura 3.6 C), mientras que el menor número de señales se identificó en la etapa madura del endospermo sólido (6) (Figura 3.6 B). En la

variedad enano verde de Yucatán, se observó mayor número de señales en la etapa intermedia de endospermo líquido (93) (Figura 3.6 E) y el menor número en la etapa madura (2) (Figura 3.6 D).

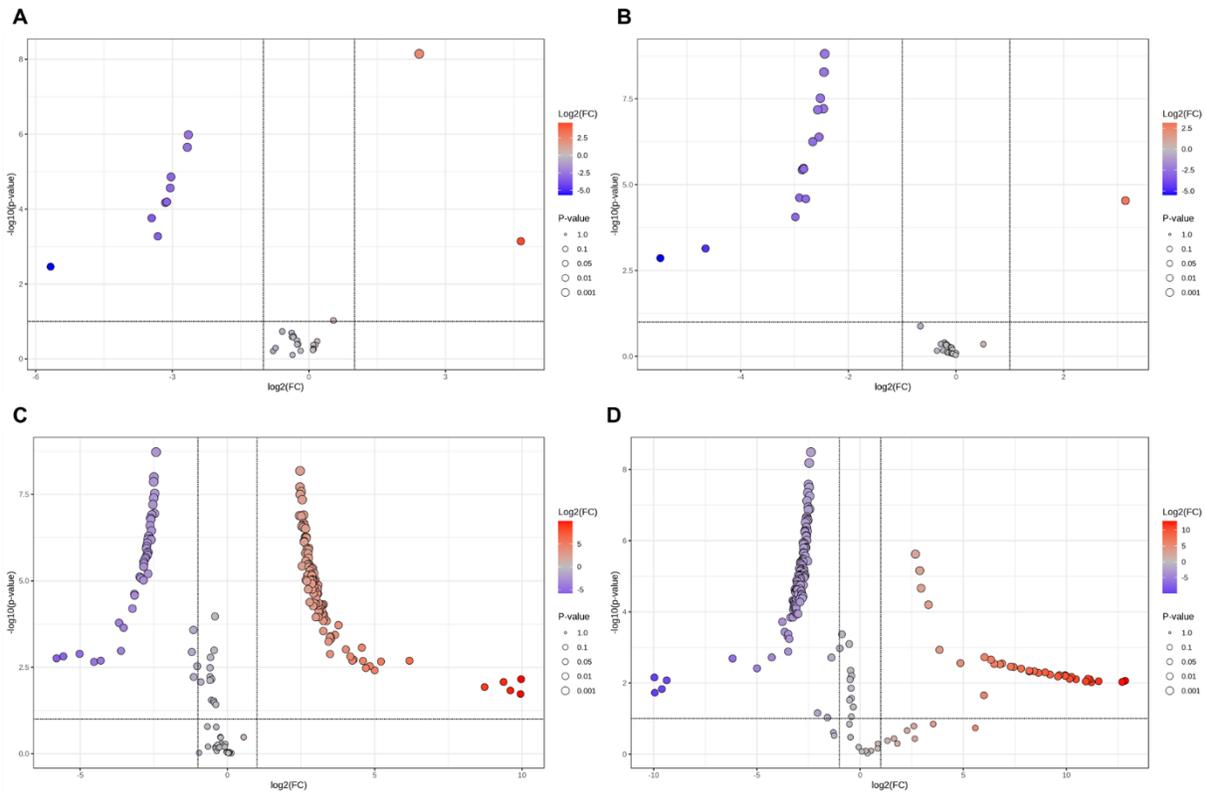
Se analizó, por variedad y el tipo de endospermo, la tendencia de acumulación de señales durante la maduración del coco según el log<sub>2</sub>-fold change (log<sub>2</sub>FC). En la variedad alto del Pacífico mexicano, al comparar el endospermo sólido de frutos inmaduros e intermedios se identificaron ocho señales sobreacumuladas (Figura 3.7 A), y entre frutos intermedios y maduros se detectaron nueve señales sobreacumuladas (Figura 3.7 B). En el endospermo líquido, la comparación entre frutos inmaduros e intermedios reveló 187 señales sobreacumuladas (Figura 3.7 C), mientras que entre frutos intermedios y maduros se encontraron 16 señales sobreacumuladas (Figura 3.7 D).



**Figura 3.7.** Diagramas de dispersión tipo volcán de la variedad alto del Pacífico mexicano. A) Comparación entre el endospermo sólido intermedio/inmaduro. B) Comparación entre el endospermo sólido maduro/intermedio. C) Comparación entre el endospermo líquido intermedio/inmaduro. D) Comparación entre el endospermo líquido maduro/intermedio.

En la variedad enano verde de Yucatán, la comparación del endospermo sólido entre frutos inmaduros e intermedios reveló nueve señales sobreacumuladas (Figura 3.8 A), mientras que entre frutos intermedios y maduros se observó una única señal sobreacumulada (Figura

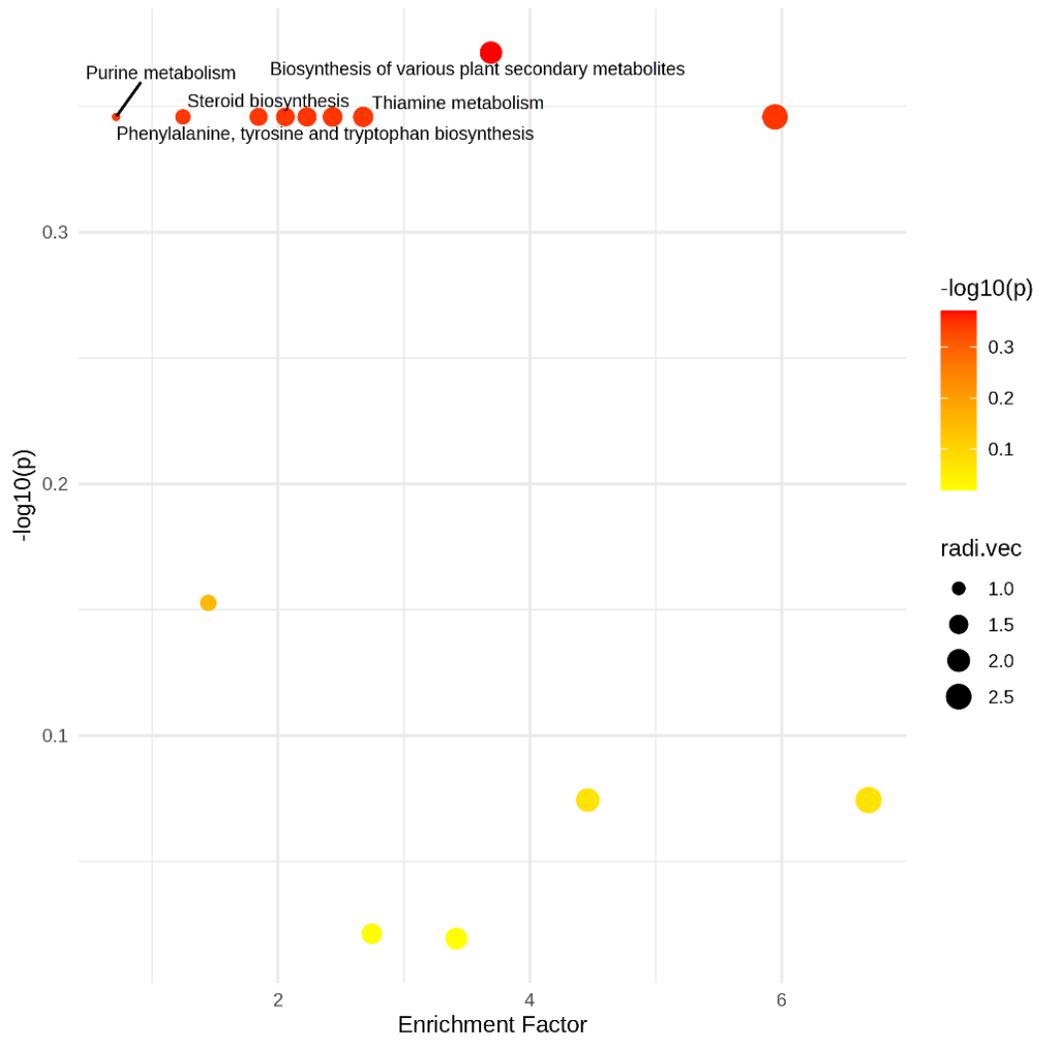
3.8 B). Por otro lado, en el endospermo líquido de esta variedad, la comparación entre frutos inmaduros e intermedios mostró 102 señales sobreacumuladas (Figura 3.8 C), mientras que entre frutos intermedios y maduros se detectaron 35 señales sobreacumuladas (Figura 3.8 D).



**Figura 3.8.** Diagramas de dispersión tipo volcán de la variedad enano verde de Yucatán. A) Comparación entre el endospermo sólido intermedio/inmaduro. B) Comparación entre el endospermo sólido maduro/intermedio. C) Comparación entre el endospermo líquido intermedio/inmaduro. D) Comparación entre el endospermo líquido maduro/intermedio.

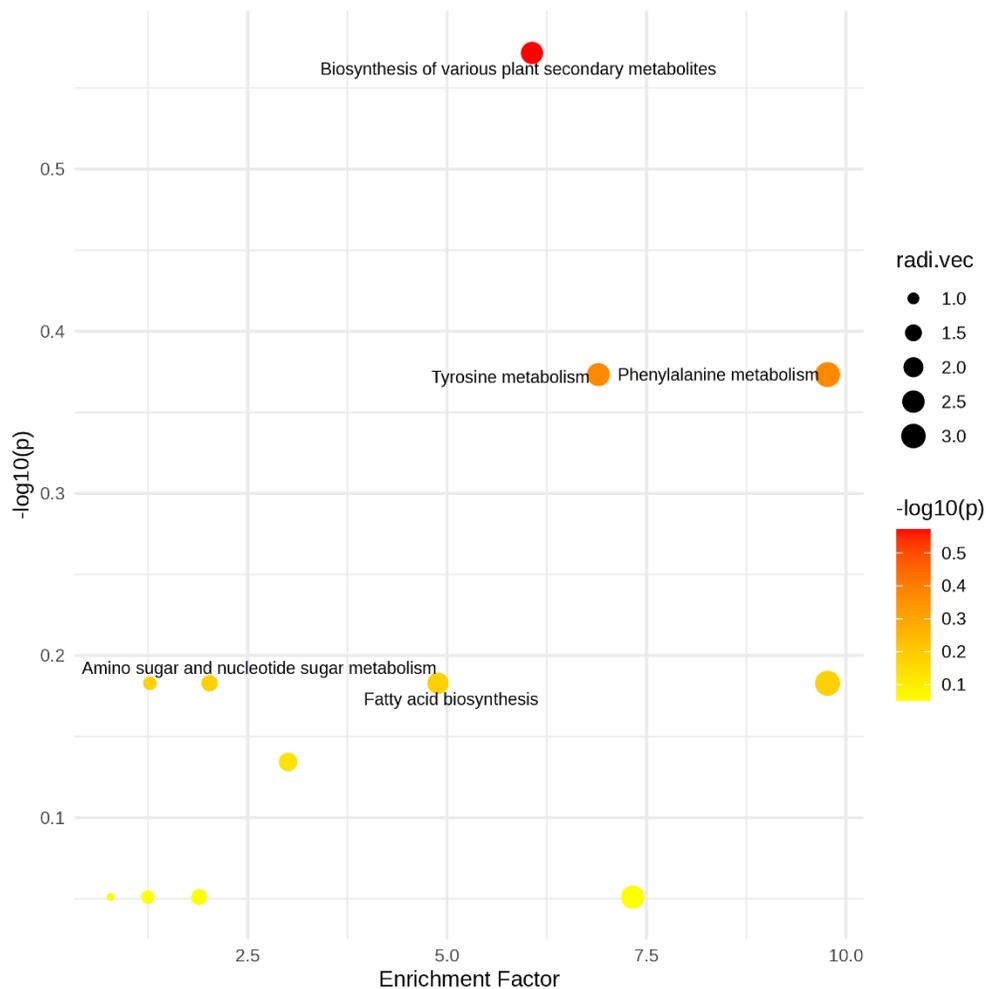
Con base en las intensidades iónicas diferenciales identificadas en cada etapa de maduración, se realizó un análisis de enriquecimiento de rutas metabólicas utilizando los algoritmos Mummichog y GSEA de la plataforma MetaboAnalyst 6.0. Este enfoque permitió explorar los cambios metabólicos asociados con el desarrollo del coco en la variedad alto del Pacífico mexicano y enano verde de Yucatán, tanto en el endospermo sólido como en el líquido, proporcionando una visión amplia de los procesos bioquímicos involucrados en la maduración.

En el endospermo sólido de los frutos de la variedad alto del Pacífico Mexicano, la comparación entre frutos inmaduros e intermedios reveló 14 rutas metabólicas enriquecidas, entre las cuales destacan la biosíntesis de flavonoides, esteroides y las rutas relacionadas con los aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano) (Figura 3.9). Estas rutas sugieren una activa síntesis de compuestos secundarios y precursores hormonales durante las primeras etapas de maduración. Las señales más relevantes en esta comparación incluyen el ácido clorogénico, la epicatequina y el difosfato de farnesilo. El ácido clorogénico y la epicatequina, ambos compuestos fenólicos, están asociados con señalización celular y la defensa antioxidante, mientras que el difosfato de farnesilo es un precursor clave en la biosíntesis de esteroides y terpenoides, lo que sugiere un papel en la regulación del crecimiento y desarrollo del fruto.



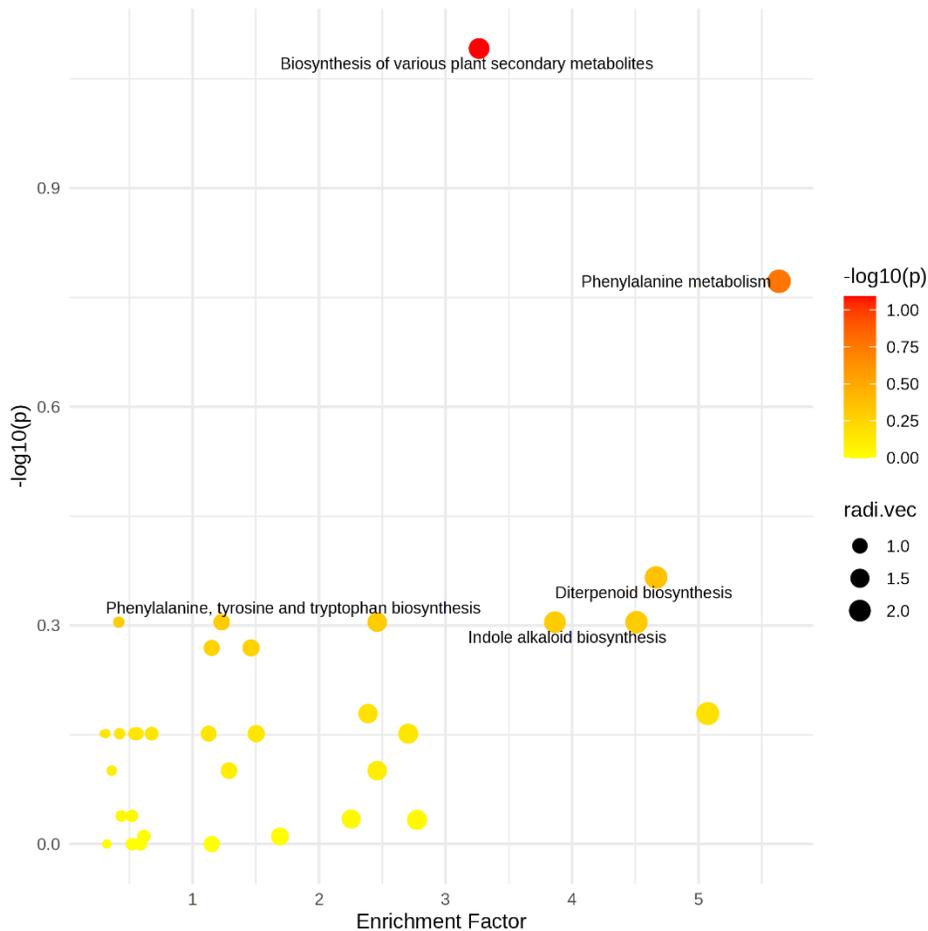
**Figura 3.9.** Análisis de enriquecimiento de rutas en la variedad alto del Pacífico mexicano. Comparación de rutas metabólicas entre el endospermo sólido intermedio/inmaduro.

Por otro lado, en la comparación entre frutos intermedios y maduros, se observaron 12 rutas metabólicas enriquecidas, entre las que resaltan el metabolismo de fenilalanina, tirosina, la biosíntesis de ácidos grasos y el metabolismo de aminoazúcares y nucleótidos (Figura 3.10). Estas rutas indican un cambio hacia procesos relacionados con la acumulación de reservas energéticas y la síntesis de componentes estructurales en etapas avanzadas de maduración. Las señales más reguladas en esta comparación incluyen el ácido láurico, un ácido graso de cadena media abundante en el coco, y la diacetilquitobiosa, un compuesto relacionado con el metabolismo de carbohidratos. La presencia de ácido láurico sugiere una acumulación de lípidos en el endospermo sólido, mientras que la diacetilquitobiosa podría estar asociada con la modificación de polisacáridos durante la maduración.



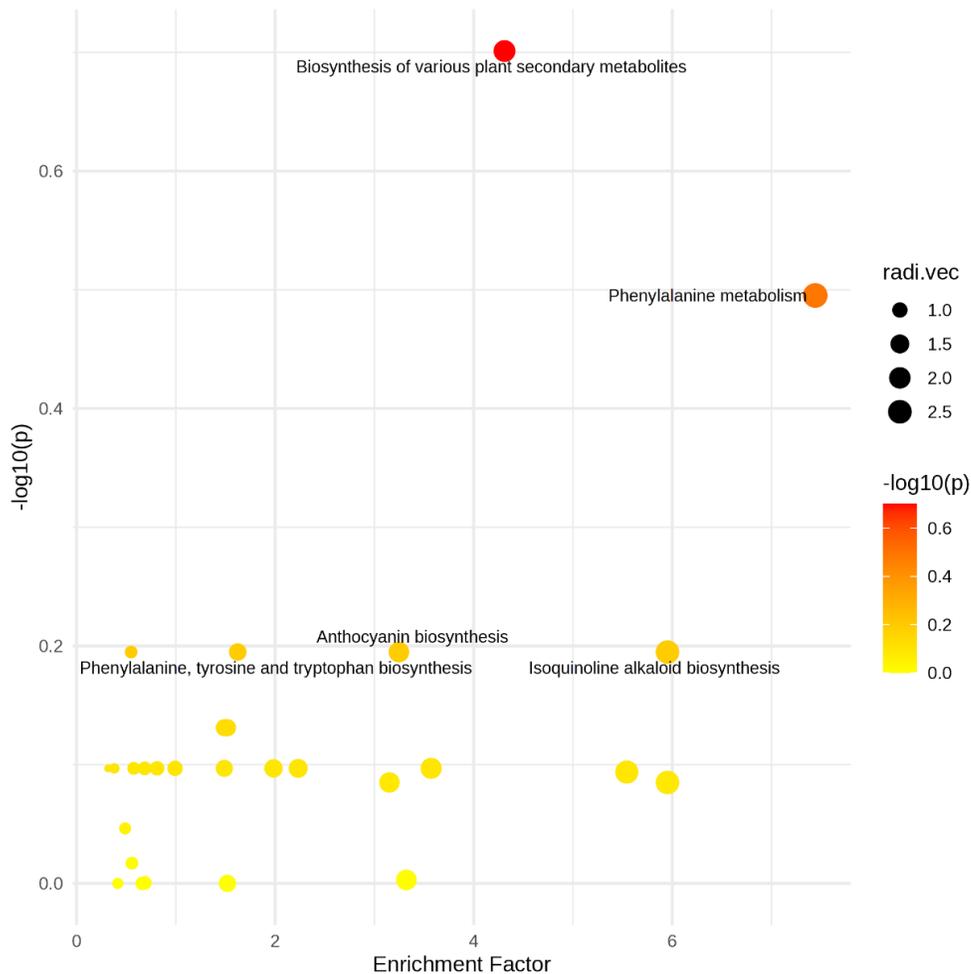
**Figura 3.10.** Análisis de enriquecimiento de rutas en la variedad alto del Pacífico mexicano. Comparación de rutas metabólicas entre el endospermo sólido maduro/intermedio.

En el endospermo líquido, la comparación entre frutos inmaduros e intermedios mostró 34 rutas metabólicas enriquecidas, entre las que destacan el metabolismo de fenilalanina, la biosíntesis de diterpenoides, antocianinas, el metabolismo del ácido araquidónico y la biosíntesis de cutina, suberina y cera (Figura 3.11). Estas rutas sugieren una intensa actividad metabólica dirigida hacia la síntesis de compuestos de defensa, pigmentos y componentes estructurales de la pared celular. Las señales más relevantes incluyen el diácido de giberelina A44, relacionado con la regulación del crecimiento, y la astaxantina, un carotenoide con importante actividad antioxidante. Los compuestos identificados sugieren un papel importante en la regulación del desarrollo del fruto y la protección contra el estrés oxidativo.



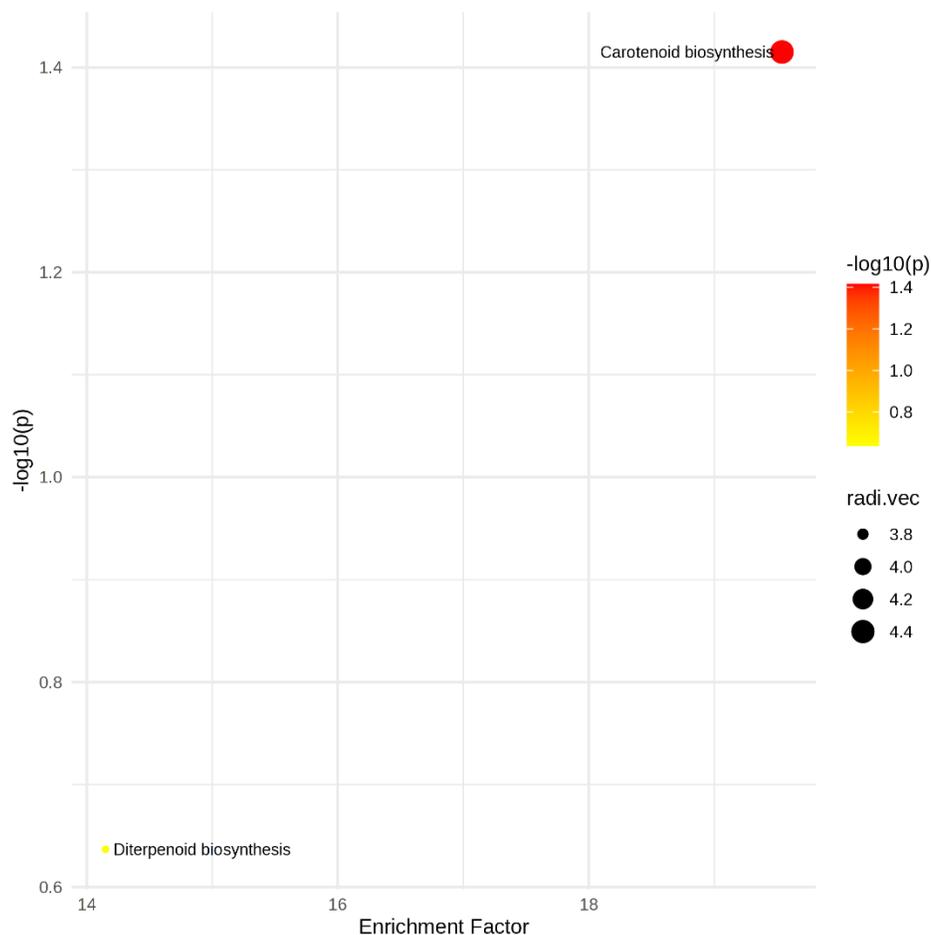
**Figura 3.11.** Análisis de enriquecimiento de rutas en la variedad alto del Pacífico mexicano. Comparación de rutas metabólicas entre el endospermo líquido intermedio/inmaduro.

En la comparación entre frutos intermedios y maduros en el endospermo líquido, se identificaron 30 rutas metabólicas enriquecidas, entre las que resaltan el metabolismo de fenilalanina, la biosíntesis de alcaloides indólicos y la biosíntesis de flavonoides (Figura 3.12). Estas rutas indican una continuidad en la síntesis de metabolitos secundarios, posiblemente relacionados con la defensa y la acumulación de compuestos bioactivos en el endospermo líquido. Las señales más reguladas incluyen la brucina, un alcaloide indólico, y el 4-coumaroilshikimato, un intermediario en la biosíntesis de fenilpropanoides. La presencia de estos compuestos sugiere una activación de rutas de defensa y la acumulación de metabolitos especializados en etapas avanzadas de maduración.



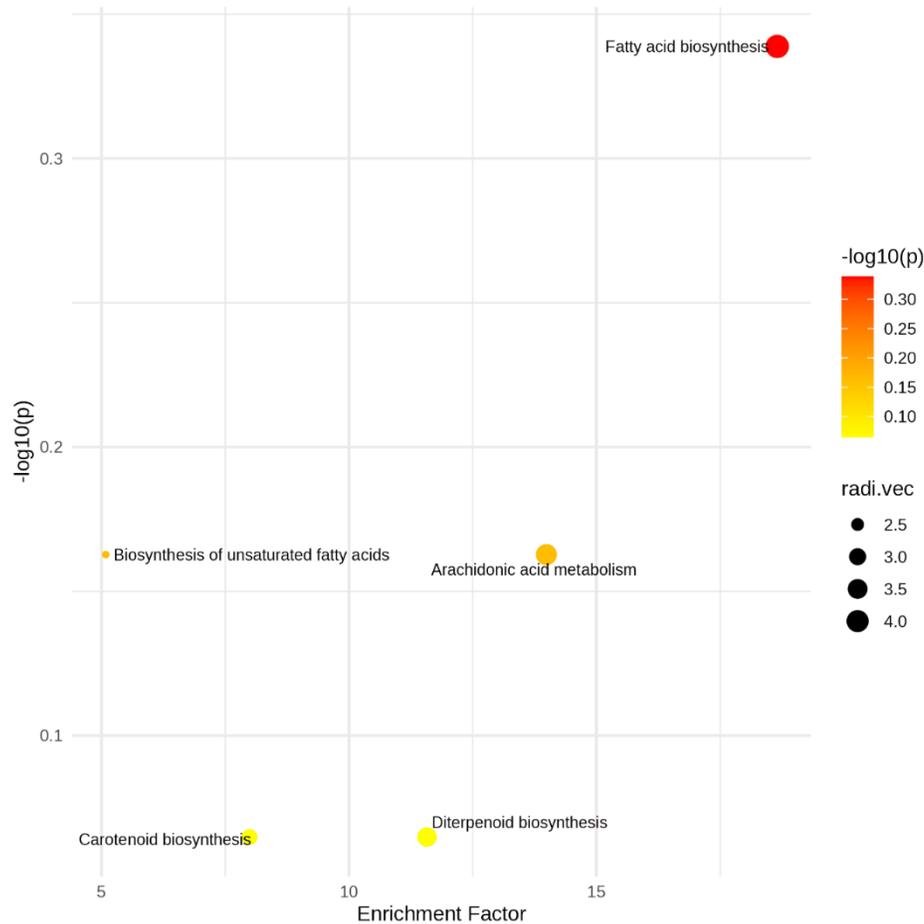
**Figura 3.12.** Análisis de enriquecimiento de rutas en la variedad alto del Pacífico mexicano. Comparación de rutas metabólicas entre el endospermo líquido maduro/intermedio.

En la variedad enano verde de Yucatán, el análisis del endospermo sólido reveló cambios metabólicos significativos durante las diferentes etapas de maduración. Al comparar frutos inmaduros con intermedios, se observaron dos rutas metabólicas enriquecidas: la biosíntesis de diterpenoides y la biosíntesis de carotenoides (Figura 3.13). Estas rutas sugieren que, en las primeras etapas de maduración, el fruto está acumulando compuestos relacionados con la defensa y la protección contra el estrés oxidativo. Los diterpenoides, por ejemplo, son metabolitos secundarios conocidos por su papel en la defensa vegetal, mientras que los carotenoides, como la zeaxantina y la astaxantina, actúan como pigmentos y antioxidantes, protegiendo al fruto del daño causado por la luz y otros factores ambientales.



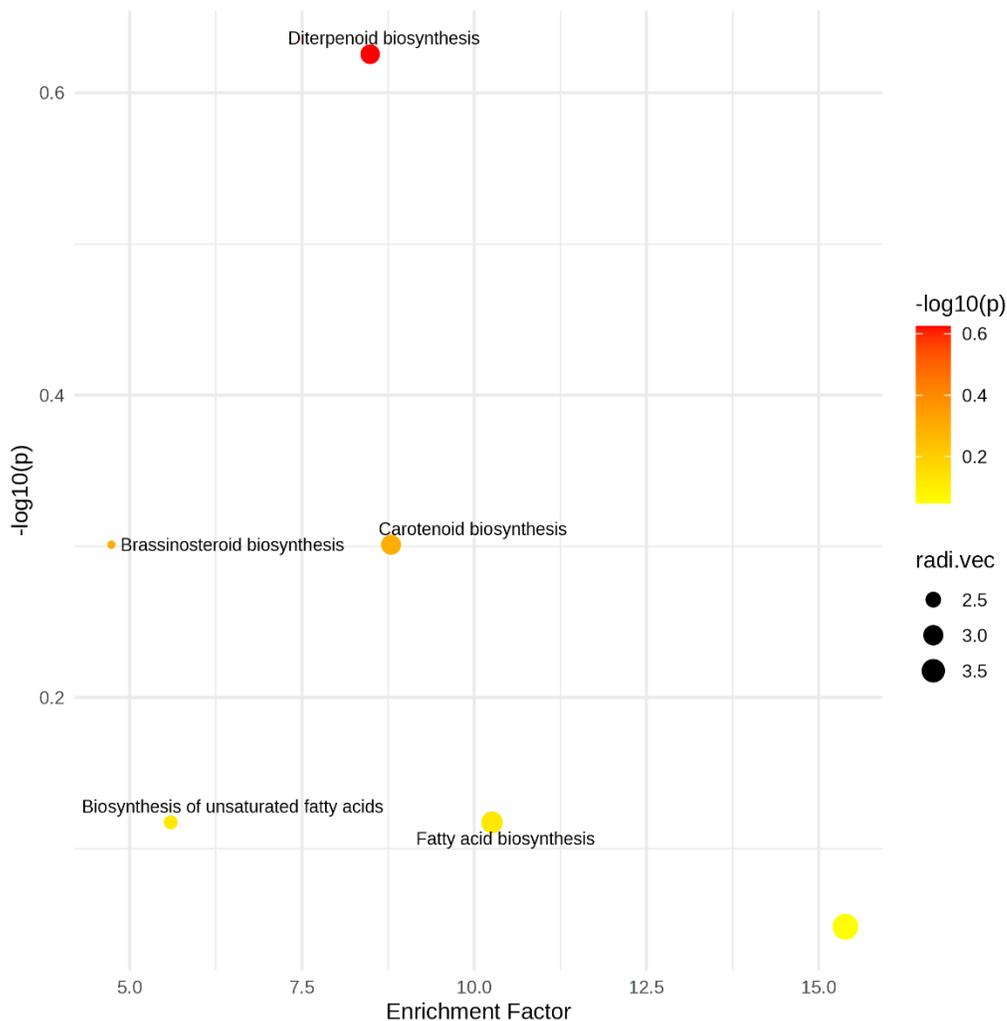
**Figura 3.13.** Análisis de enriquecimiento de rutas en la variedad enano verde de Yucatán. Comparación de rutas metabólicas entre el endospermo sólido intermedio/inmaduro.

Al comparar frutos intermedios con maduros, se identificaron cinco rutas metabólicas enriquecidas, entre las cuales destacan la biosíntesis de ácidos grasos, la biosíntesis de diterpenoides y el metabolismo del ácido araquidónico (Figura 3.14). Estas rutas indican un cambio hacia la acumulación de reservas energéticas y la transformación de lípidos, lo que podría estar relacionado con la preparación del fruto para la dispersión de semillas. Las señales tentativas identificadas en estas rutas incluyen el ácido láurico, un ácido graso de cadena media abundante en el coco, la acetil coenzima A, un intermediario clave en el metabolismo de lípidos, y el diácido de giberelina A44, un metabolito relacionado con las hormonas vegetales que regulan el crecimiento. La presencia de estas señales sugiere que, en etapas avanzadas de maduración, en el endospermo sólido se están transformando lípidos y otros compuestos esenciales para el desarrollo del fruto y su futura germinación.



**Figura 3.14.** Análisis de enriquecimiento de rutas en la variedad enano verde de Yucatán. Comparación de rutas metabólicas entre el endospermo sólido maduro/intermedio.

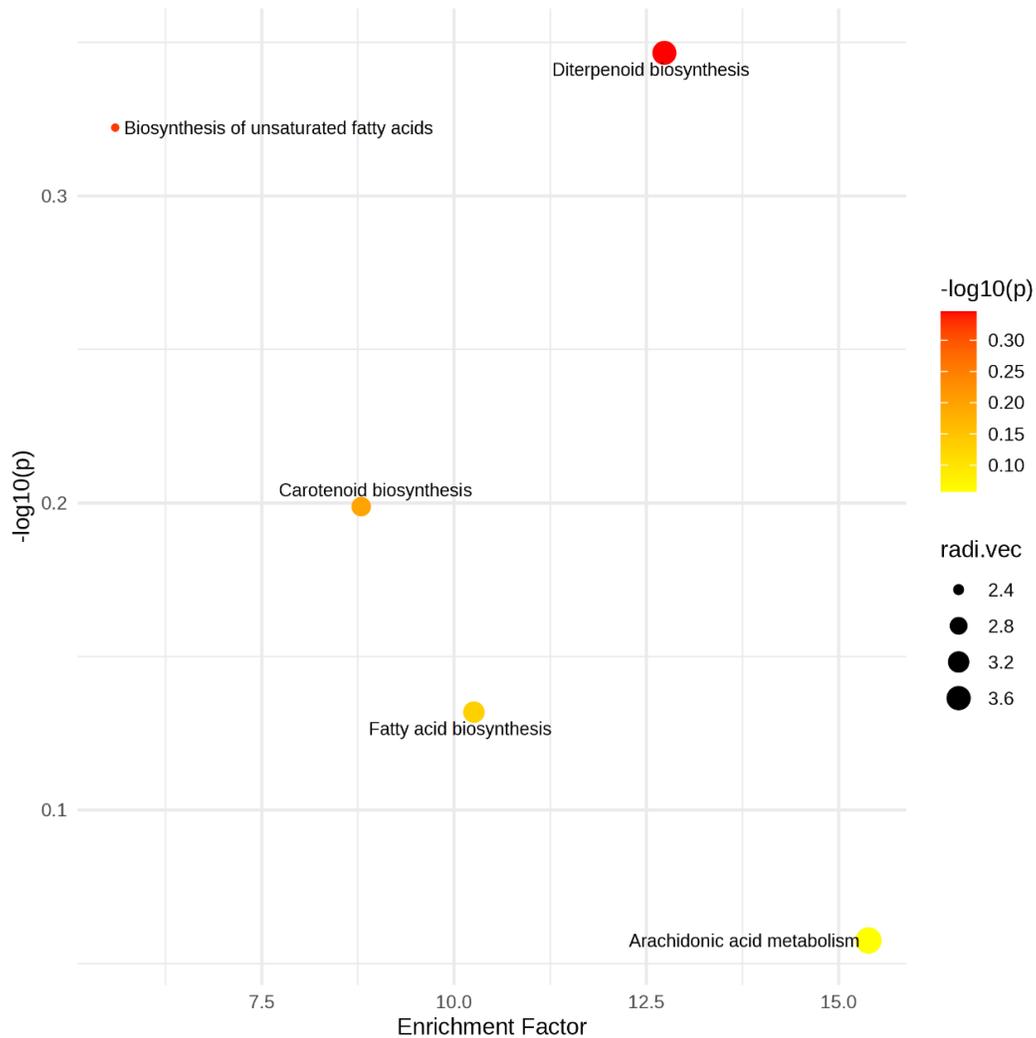
En el endospermo líquido de esta variedad, la comparación entre frutos inmaduros e intermedios mostró seis rutas metabólicas enriquecidas, entre las que destacan la biosíntesis de diterpenoides, la biosíntesis de ácidos grasos y la biosíntesis de brasinoesteroides (Figura 3.15). Estas rutas reflejan una intensa actividad metabólica dirigida hacia la síntesis de compuestos de defensa y reguladores del crecimiento. Los brasinoesteroides, por ejemplo, son hormonas vegetales que juegan un papel crucial en el desarrollo del fruto y la respuesta al estrés. La presencia de estas rutas sugiere que el endospermo líquido está activamente involucrado en la protección y el desarrollo del fruto durante las etapas iniciales de maduración.



**Figura 3.15.** Análisis de enriquecimiento de rutas en la variedad enano verde de Yucatán. Comparación de rutas metabólicas entre el endospermo líquido intermedio/inmaduro.

Finalmente, en la comparación entre frutos intermedios y maduros en el endospermo líquido, se encontraron cinco rutas metabólicas enriquecidas, similares a las observadas en

la comparación anterior, lo que indica una continuidad en los procesos metabólicos (Figura 3.16). Entre las señales identificadas destacan la zeaxantina y la astaxantina, ambos carotenoides con importante actividad antioxidante. Estos compuestos sugieren que, incluso en etapas avanzadas de maduración, el endospermo líquido mantiene una fuerte actividad antioxidante, posiblemente para proteger al fruto de los efectos del estrés oxidativo y garantizar su viabilidad hasta la dispersión de semillas.



**Figura 3.16.** Análisis de enriquecimiento de rutas en la variedad enano verde de Yucatán. Comparación de rutas metabólicas entre el endospermo líquido maduro/intermedio.

En la identificación de posibles compuestos se analizaron las señales que tuvieron mayor impacto sobre las rutas que fueron reguladas. En el Cuadro 3.2 se presentan los compuestos con la descripción de sus características químicas e información estadística.

Cuadro 3.2. Identificación de iones y características.

#	m/Z	t <sub>R</sub>	Fórmula molecular	eppm	Compuesto	Aducto	MSI	KEGG id	Ruta metabólica relacionada
1	283.2633	13.8	C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> O <sub>7</sub>	2.65E-07	4-Coumaroylshikimato	M-H[-]	2	C02947	
2	559.1305	18.2	C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub>	2.84E-07	Ácido 5-O-cafeoilshikímico	M-H[-]	2	C10434	Biosíntesis de flavonoides
3	515.0801	19.2	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	3.10E-07	Ácido clorogénico	M-H[-]	2	C00852	
4	149.0965	14.9	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	4.21E-07	Epicatequina	M-H[-]	2	C09727	
5	583.1628	3.68	C <sub>15</sub> H <sub>28</sub> O <sub>7</sub> P <sub>2</sub>	5.22E-07	Difosfato de farnesilo	M-H[-]	2	C00448	Biosíntesis de esteroides
6	473.3611	19.7	C <sub>29</sub> H <sub>48</sub> O	5.40E-07	14- $\alpha$ -Metilfecosterol	M-H[-]	2	C15776	
7	633.1495	19.7	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	5.45E-07	Ácido fenilpirúvico	M+H[+]	2	C00166	Biosíntesis de diversos metabolitos secundarios
8	747.1924	15.3	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	5.78E-07	Ácido transcinámico	M+H[+]	2	C00423	
9	453.1673	11.2	C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	7.27E-07	Ácido láurico	M-H <sub>2</sub> O-H[-]	2	C02679	Biosíntesis de ácidos grasos
10	473.1037	19.2	C <sub>24</sub> H <sub>38</sub> N <sub>7</sub> O <sub>19</sub> P <sub>3</sub> S	7.55E-07	Malonil coenzima A	M-H <sub>2</sub> O-H[-]	2	C00083	
11	815.334	18.3	C <sub>23</sub> H <sub>38</sub> N <sub>7</sub> O <sub>17</sub> P <sub>3</sub> S	9.79E-07	Acetil coenzima A	M-H <sub>2</sub> O-H[-]	2	C00024	
12	406.3282	18.3	C <sub>16</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>11</sub>	1.13E-06	Diacetilquitobiosa	M-H <sub>2</sub> O-H[-]	2	C01674	Metabolismo de amino azúcares y nucleótidos
13	311.2005	14.9	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> O <sub>9</sub> P	1.20E-06	Galactosa-1-fosfato	M+H[+]	2	C00446	
14	551.355	14.9	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>12</sub>	1.27E-06	Mirtalina	M+H[+]	2	C12138	Biosíntesis de antocianinas
15	299.2005	14.9	C <sub>36</sub> H <sub>37</sub> O <sub>18</sub>	1.56E-06	Cianidina	M+H[+]	2	C12096	
16	518.3446	18.9	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>4</sub>	1.60E-06	9,10-Epoxi-18-hidroxiestearato	M-H[-]	2	C19620	Biosíntesis de cutina, suberina y cera

---

<b>17</b>	781.5442	19.5	C <sub>46</sub> H <sub>56</sub> N <sub>4</sub> O <sub>8</sub>	1.61E-06	3',4'-Anhidrovinblastina	M-H[-]	2	C11641	
<b>18</b>	717.1995	19.6	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>6</sub>	2.27E-06	Diácido de giberelina A44	M-H[-]	2	C06095	Biosíntesis de diterpenoides
<b>19</b>	543.183	18.8	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub>	2.39E-06	Ácido 7β-dihidroxikaurenico	M-H[-]	2	C11876	
<b>20</b>	759.2102	15.3	C <sub>40</sub> H <sub>52</sub> O <sub>3</sub>	2.70E-06	Adonirrubina	M-H[-]	2	C15967	Biosíntesis de carotenoides
<b>21</b>	485.1136	13.8	C <sub>40</sub> H <sub>52</sub> O <sub>4</sub>	3.34E-06	Astaxantina	M-H[-]	2	C08580	

---

## DISCUSIÓN

Durante la maduración de los frutos y semillas se produce una serie dinámica y compleja de procesos metabólicos que se reflejan en la producción de metabolitos (Li *et al.*, 2020). Los metabolitos primarios y secundarios son los productos finales resultantes de diferentes mecanismos de regulación celular, su clasificación y acumulación dependen de los procesos fisiológicos de los sistemas biológicos, que pueden ser regulados por cambios genéticos del desarrollo o por estímulos externos, como las condiciones de estrés (Murthy *et al.*, 2014; Umer *et al.*, 2020). En el desarrollo de la mayoría de las semillas, los nutrientes como aminoácidos, proteínas solubles, lípidos, azúcares solubles y almidón son transportados al endospermo y almacenados como componentes nutricionales (Venskutonis y Kraujalis, 2013).

A pesar de la complejidad del desarrollo y maduración de los frutos, estos se clasifican en climatéricos y no climatéricos (Chen *et al.*, 2018). *Cocos nucifera* es un fruto no climatérico que en su desarrollo temprano presenta endospermo líquido (agua de coco), posteriormente comienza la formación gradual del endospermo sólido (pulpa) que puede alcanzar hasta el 30 % del volumen total del endospermo, siendo el único fruto con endospermo líquido y sólido bien diferenciado en los estadios intermedio y maduro (Ángeles *et al.*, 2018). En la medición de parámetros fisiológicos del endospermo líquido de *C. nucifera* se observaron cambios entre cada estadio de maduración, indicando actividad fisiológica y metabólica dinámica. En el estadio inmaduro, el promedio del volumen del endospermo líquido fue de 300 mL, el cual disminuyó gradualmente hasta la etapa madura. Estos cambios en el volumen de agua concuerdan con lo reportado por Appaiah *et al.* (2014), quienes midieron el volumen del endospermo líquido de frutos obtenidos en el mercado local de Mysore, India. La disminución del volumen se debe a que a partir del estadio intermedio comienza la transformación del endospermo líquido a endospermo sólido (Kumar *et al.*, 2021), en la que ocurre deposición intracelular de lípidos en la superficie interna del endocarpio (Ángeles *et al.*, 2018) y la remodelación de la pared celular (Zhu *et al.*, 2017). El pH del endospermo líquido aumentó a medida que el coco maduró, los valores fueron similares a lo reportado por Mahayothee *et al.* (2016), lo que podría correlacionarse con la disminución de los ácidos orgánicos a lo largo de la maduración, principalmente el ácido ascórbico y el ácido málico (Ding *et al.*, 2018). Otra posibilidad es

la interconversión de aminoácidos para la síntesis de fitohormonas y proteínas de reserva (Famiani *et al.*, 2005).

La espectrometría de masas es una técnica analítica que utiliza dos modos de exploración y de generación de iones: ionización positiva y negativa (De Hoffmann y Stroobant, 2007). Cuando la muestra se ioniza por la fuente ESI, se generan al mismo tiempo iones cargados positivamente (M+H, M+Na, M+NH<sub>4</sub>, etc.) y negativamente (M-H, M+Cl, M+CH<sub>3</sub>COO, etc.); esto dependerá de la naturaleza química de las moléculas, pues algunas pueden ionizarse positivamente, negativamente o con ambas maneras (Zhang *et al.*, 2020).

La metabolómica no dirigida permite realizar análisis funcionales de rutas metabólicas con base en las anotaciones de señales iónicas que corresponden a metabolitos detectados en un tiempo de retención específico; la información de la acumulación diferencial se puede usar para tratar de explicar los complejos procesos biológicos como la biosíntesis de biomasa vegetal durante el desarrollo de la maduración de los frutos (Li *et al.*, 2017). En el presente estudio metabolómico no dirigido se generaron matrices de datos que naturalmente son muy extensas y complejas; por esta razón fue necesario reducir la dimensionalidad de los datos en función del número de variables aleatorias para interpretar y comprender óptimamente la información generada (Vaswani y Narayanamurthy, 2018). Los análisis multivariados no supervisados como el análisis de componentes principales (PCA), son usados para condensar matrices de datos de muestras complejas y con ello explorar las variaciones y relaciones entre muestras o tratamientos (Cunha *et al.*, 2021; Sucupira *et al.*, 2017). En este estudio, los PCA agruparon las muestras según el estado de maduración (inmadura, intermedia o madura) lo que fundamenta una aceptable clasificación de los frutos de acuerdo a su grado de maduración y apoya la reproducibilidad de los protocolos de extracción y los análisis LC-MS desarrollados (Kumar *et al.*, 2021).

La integración de datos metabolómicos y proteómicos permite comprender con mayor profundidad los mecanismos subyacentes en la maduración del endospermo de *C. nucifera* y cómo las diferencias genóticas y ecológicas influyen en los perfiles metabólicos. La comparación entre dos variedades de coco, alto del Pacífico mexicano y enano verde de Yucatán, revela un panorama complejo y dinámico de la regulación metabólica, que incluye no sólo el metabolismo primario sino también rutas secundarias asociadas con la adaptación, el almacenamiento energético y la defensa frente a factores de estrés.

En el análisis de las rutas metabólicas en la variedad alto del Pacífico mexicano se observó que la maduración del endospermo sólido implica un enriquecimiento de rutas relacionadas con la biosíntesis de flavonoides, esteroides y aminoácidos aromáticos en etapas

tempranas. La presencia de estas rutas coincide con estudios previos que han destacado el papel de los metabolitos secundarios, como los flavonoides y los compuestos fenólicos, en la protección antioxidante y la señalización molecular durante el desarrollo de tejidos (Zhang et al., 2018; Li et al., 2021). La biosíntesis de esteroides puede estar asociada con el ajuste de la homeostasis hormonal, especialmente con brassinosteroides y otros reguladores clave que controlan el crecimiento celular y la acumulación de biomasa, como se ha observado en otros cultivos tropicales (Nayyar et al., 2017).

En etapas posteriores al desarrollo temprano, dominan las rutas metabólicas relacionadas con ácidos grasos y aminoazúcares, destacando la transición hacia la acumulación de reservas energéticas y estructurales. Los ácidos grasos, esenciales para la síntesis de triacilgliceroles (TAGs) y lípidos de membrana, son elementos clave del endospermo de coco, como lo demuestran estudios proteómicos previos en los que se identificaron proteínas clave relacionadas con el metabolismo lipídico, como la acetil-CoA carboxilasa y la sintasa de ácidos grasos (Peñaloza et al., 2019). Esta acumulación de lípidos tiene una relevancia biológica directa para el desarrollo del embrión y la germinación, dado que es la reserva de energía y provee compuestos estructurales para las primeras etapas del desarrollo postembrionario.

El endospermo líquido de la variedad alto del Pacífico presentó mayor diversidad de rutas metabólicas enriquecidas, lo que podría reflejar una estrategia adaptativa para proteger este tejido más expuesto a factores externos, como el ataque de patógenos y respuesta ante cambios ambientales. La presencia de rutas relacionadas con diterpenoides, antocianinas y el metabolismo del ácido araquidónico es particularmente relevante. Los diterpenoides, ampliamente estudiados por su actividad antifúngica y antimicrobiana (Wang et al., 2020), podrían desempeñar un papel en la protección del endospermo líquido frente a infecciones durante las etapas tempranas de desarrollo. Por otro lado, el ácido araquidónico, conocido por su papel en la señalización celular y la respuesta a estrés, podría estar involucrado en mecanismos de defensa y en la modulación del metabolismo lipídico.

La variedad enano verde de Yucatán mostró un patrón metabólico más restringido en comparación con la variedad alto del Pacífico, lo que puede estar relacionado con diferencias genéticas entre ambas variedades, como se ha reportado en estudios genómicos que comparan cultivares altos y enanos (Yang et al., 2021). En el endospermo sólido, las rutas metabólicas asociadas con diterpenoides y carotenoides en etapas tempranas sugieren que éstos se destinan para la protección antioxidante, mientras que,

en etapas avanzadas, la acumulación de ácidos grasos y compuestos lipídicos indica una estrategia similar de almacenamiento energético. Cabe destacar que los carotenoides, además de su papel antioxidante, pueden estar implicados en la señalización molecular durante la maduración del fruto, regulando procesos clave como la expresión de genes asociados con el desarrollo (Yuan et al., 2015).

En el endospermo líquido, el enriquecimiento de rutas relacionadas con brasinoesteroides y diterpenoides es congruente con la importancia de las fitohormonas y metabolitos secundarios en la regulación del desarrollo del tejido. Los brasinoesteroides, en particular, han sido identificados como moduladores esenciales del metabolismo energético y del crecimiento celular en etapas críticas de desarrollo (Vriet et al., 2015).

Desde un punto de vista fisiológico, la acumulación de metabolitos secundarios, lípidos y compuestos antioxidantes asegura no sólo la protección del embrión, sino también la provisión de energía y compuestos estructurales para el desarrollo inicial de la planta. Estas dinámicas metabólicas tienen implicaciones importantes para la agricultura, ya que comprenderlas puede facilitar el diseño de estrategias para mejorar la calidad de los frutos y su resistencia a factores de estrés.

En conjunto, estos hallazgos demuestran el valor de los enfoques metabolómicos para el estudio integral del desarrollo de *C. nucifera*, permitiendo: (1) la identificación de metabolitos marcadores asociados al tipo de tejido, estadio de madurez y origen varietal, y (2) la inferencia de sus funciones biológicas y rutas metabólicas subyacentes. Los resultados obtenidos proporcionan una base sólida para futuras investigaciones orientadas a: (a) el aprovechamiento biotecnológico del endospermo en diferentes estados de maduración, particularmente para la producción de compuestos bioactivos con aplicaciones farmacéuticas; (b) la optimización de cultivares comerciales mediante el mejoramiento de la eficiencia en acumulación de reservas; y (c) la elucidación de los mecanismos celulares que regulan la diferenciación y actividad metabólica durante el desarrollo del fruto.

## CAPÍTULO IV

### PERFIL DE COMPUESTOS FENÓLICOS DEL ENDOSPERMO LÍQUIDO Y SÓLIDO DE *COCOS NUCIFERA* L. EN TRES ESTADIOS DE MADURACIÓN DE LAS VARIETADES ALTO DEL PACÍFICO MEXICANO Y ENANO VERDE DE YUCATÁN

#### 4.1 INTRODUCCIÓN

Los compuestos fenólicos desempeñan un papel crucial en la maduración de frutos y semillas, donde su acumulación, transformación y degradación responden a diversas funciones biológicas que van desde la protección antioxidante hasta la regulación del metabolismo secundario. Estos compuestos, que incluyen fenoles simples, flavonoides y ácidos hidroxicinámicos, son ampliamente reconocidos por su capacidad para contrarrestar el daño oxidativo, estabilizar membranas celulares y activar mecanismos de defensa frente a patógenos y condiciones ambientales adversas (Lattanzio et al., 2006).

Durante la maduración de los frutos, los fenoles contribuyen a la formación de barreras químicas y estructurales que protegen los tejidos vegetales. Por ejemplo, los ácidos hidroxicinámicos, como el ácido ferúlico, desempeñan un papel en el entrecruzamiento de componentes de la pared celular, lo que refuerza la resistencia mecánica del fruto (Paradossi et al., 1999). Asimismo, el ácido clorogénico actúa como un antioxidante que protege al tejido vegetal de especies reactivas de oxígeno generadas durante procesos metabólicos críticos (Clifford, 2000).

Los flavonoides, como la catequina y la epicatequina, son otros fenoles relevantes cuya concentración suele disminuir conforme el fruto madura. Esto sugiere una reducción progresiva de lo requerido en la protección antioxidante, debido a que en las primeras etapas del desarrollo el metabolismo del fruto es más activo y, por tanto, genera más radicales libres (Prior y Gu, 2005). Además de su rol antioxidante, estos compuestos también contribuyen al color y sabor del fruto, lo que tiene implicaciones tanto para la ecología de la dispersión como para la aceptabilidad del fruto en el consumo humano (Gu et al., 2003).

En el contexto de las semillas, los compuestos fenólicos también desempeñan funciones cruciales en la protección contra el deterioro y en la regulación del estado latente. Los ácidos protocatéquico y sinápico, por ejemplo, han sido implicados en la protección

antioxidante de tejidos en desarrollo y en la modulación de procesos fisiológicos asociados a la germinación (Scalbert et al., 2005). En algunas especies, la acumulación de procianidinas en las semillas contribuye a la formación de una capa protectora que limita la entrada de agua y oxígeno, retrasando así el inicio de la germinación (Dixon y Paiva, 1995). La regulación de la biosíntesis de compuestos fenólicos durante la maduración está influenciada por factores genéticos y ambientales. En particular, la fenilalanina, un aminoácido aromático precursor en la ruta de los fenilpropanoides, clave para la síntesis de fenoles estructurales y antioxidantes, se ve afectada por la expresión diferencial de enzimas como la fenilalanina amonio liasa (PAL), cuya actividad varía según el estadio de maduración, el tejido específico y las condiciones ambientales, modulando así la cantidad y el tipo de compuestos fenólicos que se acumulan en el fruto (Vogt, 2010). En este sentido, la concentración de cada grupo de compuestos varía significativamente durante las etapas de desarrollo del fruto, reflejando cambios en la actividad biosintética y en la demanda metabólica del tejido en crecimiento (Lopes et al., 2019).

En general, los compuestos fenólicos no solo son determinantes para la protección y estabilidad de los frutos y semillas, sino que también tienen implicaciones ecológicas y agronómicas. Su estudio permite entender de mejor forma los mecanismos de defensa vegetal, mejorar la calidad nutracéutica de los productos agrícolas y desarrollar estrategias para optimizar su producción y conservación (Lattanzio et al., 2006; Scalbert et al., 2005).

## 4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.2.1 Análisis del perfil de compuestos fenólicos por UPLC-MS/MS

Los extractos obtenidos del endospermo sólido y líquido en los tres estadios de maduración de las dos variedades fueron analizados mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (UPLC-MS/MS) utilizando un sistema Agilent 1290, equipado con un espectrómetro de masas QqQ (modelo 6460, Agilent Technologies, Santa Clara, California, EE. UU.). Para la identificación y cuantificación de hasta 60 compuestos, se empleó un método de monitoreo dinámico de reacciones múltiples (dMRM) (Juárez-Trujillo et al., 2018).

Para el sistema UPLC-MS/MS se usó una columna ZORBAX SB-C18 (1.8  $\mu\text{m}$ , 2.1  $\times$  50 mm; Agilent Technologies, Santa Clara, California, EE. UU.). Las temperaturas para la columna y las muestras fueron establecidas en 40 y 15  $^{\circ}\text{C}$ , respectivamente. La fase móvil estuvo compuesta por agua (fase A) y acetonitrilo (fase B), ambos con 0.1% de ácido fórmico. El perfil del gradiente incluyó las siguientes etapas: inicio con 1% de fase B (0 min), gradiente lineal de 1% a 40% B entre 0.1 y 40 minutos, seguido por un incremento a 90% B en el periodo de 40.1 a 42 minutos. Posteriormente, se mantuvo isocrático al 90% de fase B durante dos minutos (42.1 a 44 min) antes de descender gradualmente al 1% en dos minutos (44.1 a 46 min), concluyendo con un mantenimiento isocrático al 1% de fase B durante el minuto final. El tiempo total de ejecución fue de 47 minutos, con un caudal de 0.3 mL/min y un volumen de inyección de 5  $\mu\text{L}$ .

La fuente de ionización por electropulverización (ESI) operó en modos positivo y negativo. Las condiciones incluyeron una temperatura de desolvatación de 300  $^{\circ}\text{C}$ , flujo de gas del cono de 5 mL/min, presión del nebulizador de 45 psi, temperatura del gas de revestimiento de 250  $^{\circ}\text{C}$ , y flujo de gas de revestimiento de 11 mL/min. Los voltajes del capilar fueron de 3,500 V, mientras que el de la boquilla fue de 500 V, tanto en modo positivo como negativo. El voltaje del fragmentador se fijó en 100 V y el del acelerador de celda en 7 V para todos los compuestos.

La identificación de los compuestos se realizó mediante la coelución con estándares auténticos bajo las mismas condiciones analíticas descritas. Para cuantificar cada compuesto fenólico, se generaron curvas de calibración en un rango de concentración de 1 a 19  $\mu\text{M}$ , considerando valores de  $r^2 \geq 0.97$  para asegurar la linealidad del método. Los

---

datos se procesaron utilizando el software MassHunter Workstation v. B.06.00 (Agilent Technologies, Santa Clara, California, EE. UU.). Los resultados se expresaron como  $\mu\text{g/g}$  de muestra (peso seco del extracto).

### 4.3. RESULTADOS

En los Cuadros 4.1 y 4.2 se presentan las concentraciones estimadas de los compuestos fenólicos presentes en dos variedades de coco: alto del Pacífico mexicano y enano verde de Yucatán, respectivamente, durante tres etapas de maduración: inmaduro, intermedio y maduro. Los compuestos fenólicos se cuantificaron tanto en el endospermo sólido como en el endospermo líquido, lo que permite analizar los cambios metabólicos asociados con el desarrollo del fruto.

En la variedad Alto del Pacífico mexicano, el endospermo sólido muestra una disminución general en la concentración de compuestos fenólicos a medida que el fruto madura. Por ejemplo, la (+)-catequina disminuye drásticamente desde  $23.538 \mu\text{g/g}$  en la etapa inmadura hasta  $0.8519 \mu\text{g/g}$  en la madura, y la (-)-epicatequina sigue un patrón similar, reduciéndose de  $5.9502$  a  $0.3758 \mu\text{g/g}$ . Esta tendencia sugiere que estos flavonoides, conocidos por su actividad antioxidante, son más abundantes en las etapas tempranas, donde protegen al fruto del estrés oxidativo y los daños ambientales. En el endospermo líquido, se observa un comportamiento similar, en compuestos como el ácido protocatéquico y la (+)-catequina alcanzando concentraciones máximas en la etapa inmadura ( $135.535$  y  $2694.2 \mu\text{g/g}$ , respectivamente) y disminuyendo significativamente en la madura ( $8.6474$  y  $97.906 \mu\text{g/g}$ ). Estos resultados son consistentes, pues el endospermo líquido actúa como un reservorio de metabolitos secundarios durante las primeras etapas de desarrollo, pero su concentración disminuye a medida que el fruto madura.

En la variedad enano verde de Yucatán, se observaron patrones similares, aunque en concentraciones generalmente más bajas que en la variedad alto del Pacífico. En el endospermo sólido, la (+)-catequina disminuye de  $10.4892 \mu\text{g/g}$  en la etapa inmadura a  $0.2336 \mu\text{g/g}$  en la madura, y la (-)-epicatequina sigue una tendencia comparable, reduciéndose de  $2.4243$  a  $0.2134 \mu\text{g/g}$ . En el endospermo líquido, compuestos como el ácido protocatéquico y la (+)-catequina también muestran una disminución significativa con la maduración, lo que refuerza la idea de que estos compuestos son cruciales en las etapas tempranas, pero menos necesarios en las etapas avanzadas. La procianidina B2, por

ejemplo, disminuye de 230.1 en la etapa inmadura a 1.7203  $\mu\text{g/g}$  en la madura, lo que sugiere una degradación o transformación de este compuesto durante la maduración.

**Cuadro 4.1.** Compuestos fenólicos presentes en los extractos del endospermo líquido y sólido de la variedad alto del Pacífico mexicano en tres estadios de maduración. Los valores se expresan en µg/g, “-“ no detectado.

<b>Alto del Pacífico mexicano</b>						
	Endospermo sólido			Endospermo líquido		
	Inmaduro	Intermedio	Maduro	Inmaduro	Intermedio	Maduro
<b>Fenilalanina</b>	0.0361	-	-	8.5695	14.5778	5.6095
<b>Ácido gálico</b>	-	-	-	1.9327	4.6338	0.1858
<b>Ácido protocatéquico</b>	-	-	-	135.535	53.1	8.6474
<b>(+)-Catequina</b>	23.538	1.7469	0.8519	2694.2	687.53	97.906
<b>Ácido vainílico</b>	0.5564	-	-	543.5	129.779	49.067
<b>Procianidina B2</b>	2.0895	-	-	168.096	99.195	5.611
<b>(-)-Epicatequina</b>	5.9502	0.0617	0.3758	629.89	189.014	51.401
<b>Vainillina</b>	0.2115	0.1304	0.233	8.9154	17.7134	9.3376
<b>Ácido 4-cumárico</b>	0.4243	-	-	2.4187	1.664	1.0919
<b>Ácido ferúlico</b>	1.6183	0.1299	0.1692	383.7	86.882	54.238
<b>Ácido sinápico</b>	4.242	4.9328	1.1812	134.802	37.842	24.09
<b>Ácido salicílico</b>	-	-	-	15.8846	4.3471	3.1893
<b>Kaempferol-3-O-glucósido</b>	-	-	-	0.9217	0.2543	0.1345
<b>Secoisolariciresinol</b>	-	-	-	9.8737	4.2935	7.4496
<b>Ácido transcinámico</b>	-	-	-	1.8333	2.0817	16.3569
<b>Apigenina</b>	0.274	0.0912	-	-	-	-
<b>Ácido clorogénico</b>	-	-	-	2.2347	1.6844	0.0185
<b>Ácido cafeico</b>	-	-	-	10.8294	8.1437	9.68

**Cuadro 4.2.** Compuestos fenólicos presentes en los extractos del endospermo líquido y sólido de la variedad enano verde de Yucatán en tres estadios de maduración. Los valores se expresan en  $\mu\text{g/g}$ , “-“ no detectado.

	Enano verde de Yucatán					
	Endospermo sólido			Endospermo líquido		
	Inmaduro	Intermedio	Maduro	Inmaduro	Intermedio	Maduro
<b>Fenilalanina</b>	0.1545	0.016	0.0169	27.558	12.7449	0.0825
<b>Ácido gálico</b>	-	-	-	0.598	0.9454	-
<b>Ácido protocatéquico</b>	-	-	-	8.8136	18.8425	5.6364
<b>(+)-Catequina</b>	10.4892	0.6506	0.2336	1379.36	561.68	48.794
<b>Ácido vainílico</b>	73.035	73.72	31.334	0.6763	0.2161	-
<b>Procianidina B2</b>	0.7274	-	-	230.1	89.652	1.7203
<b>(-)-Epicatequina</b>	2.4243	0.0126	0.2134	336.76	158.753	12.9217
<b>Vainillina</b>	0.3005	0.4098	0.3031	10.4486	9.0704	8.1163
<b>Ácido 4-cumárico</b>	-	-	-	0.6365	1.0543	2.4347
<b>Ácido ferúlico</b>	0.7964	0.6213	0.2308	72.741	110.909	50.197
<b>Ácido sinápico</b>	3.5239	1.0719	0.1232	6.2101	14.38	5.9366
<b>Ácido salicílico</b>	-	-	-	0.9354	2.6456	1.7001
<b>Kaempferol-3-O-glucósido</b>	0.9217	0.2543	0.1345	0.0524	0.2058	-
<b>Secoisolariciresinol</b>	-	-	-	3.1287	7.0133	16.6221
<b>Ácido transcinámico</b>	-	-	-	0.7827	2.6128	1.4332
<b>Apigenina</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Ácido clorogénico</b>	-	-	-	9.7976	3.9279	-
<b>Ácido cafeico</b>	-	-	-	4.4143	7.8726	6.6144

#### 4.4 DISCUSIÓN

Los resultados presentados en los Cuadros 4.1 y 4.2 muestran las concentraciones de compuestos fenólicos en dos variedades de coco (Alto del Pacífico mexicano y enano verde de Yucatán) durante tres etapas de maduración (inmaduro, intermedio y maduro), tanto en el endospermo sólido como en el endospermo líquido. Los compuestos fenólicos, como la (+)-catequina, (-)-epicatequina, ácido protocatéquico y ácido ferúlico, son más abundantes en las etapas tempranas de desarrollo, lo que sugiere que desempeñan un papel crucial en la protección del fruto contra el estrés oxidativo y los daños ambientales. Esta tendencia es consistente con lo reportado en otras especies vegetales, como *Vitis vinifera* (uva) y *Camellia sinensis* (té), donde los flavonoides y ácidos fenólicos son más abundantes en etapas tempranas, protegiendo al fruto de patógenos y radicales libres (Agati et al., 2012; Dixon y Pasinetti, 2010). A medida que el fruto madura, se observó una disminución general en la concentración de estos compuestos, lo que sugiere una transición metabólica desde la protección antioxidante hacia la acumulación de reservas energéticas, como lípidos y carbohidratos, en el endospermo sólido. Este patrón es similar al observado en *Solanum lycopersicum* y en semillas oleaginosas como *Glycine max*, donde la maduración implica una reducción en la síntesis de metabolitos secundarios y un aumento en la acumulación de reservas (Klee y Giovannoni, 2011; Baud y Lepiniec, 2010).

Las diferencias entre el endospermo sólido y el endospermo líquido son notables. En el líquido, las concentraciones de compuestos fenólicos son más altas en etapas tempranas, lo que demuestra que este tejido actúa como un reservorio de antioxidantes durante el desarrollo inicial. Por ejemplo, en la variedad alto del Pacífico, el ácido protocatéquico y la (+)-catequina alcanzan concentraciones máximas en la etapa inmadura (135.535 y 2694.2 µg/g, respectivamente) y disminuyen drásticamente en la madura. En contraste, en el endospermo sólido, las concentraciones son más bajas y disminuyen más rápidamente, lo que podría estar relacionado con la acumulación de lípidos y carbohidratos, esenciales para la germinación y el desarrollo de la semilla (Dayrit, 2015). Estas diferencias resaltan la complejidad metabólica del coco y su adaptación a diferentes funciones durante el desarrollo del fruto.

Además, se observan diferencias significativas entre las dos variedades de coco. La variedad Alto del Pacífico presenta concentraciones más altas de compuestos fenólicos en comparación con la variedad enano verde de Yucatán, especialmente en el endospermo líquido. Esto podría deberse a factores genéticos o adaptaciones específicas a las

condiciones ambientales. Por ejemplo, la mayor acumulación de antioxidantes en la variedad Alto del Pacífico podría conferirle mayor resistencia al estrés oxidativo y al ataque de patógenos, lo que es consistente con estudios en otras especies donde las variedades con mayor contenido de antioxidantes muestran una mayor tolerancia a condiciones adversas (Nisar et al., 2015). A pesar de estas diferencias, ambas variedades comparten un patrón similar de disminución de compuestos fenólicos con la maduración, lo que sugiere que los mecanismos metabólicos subyacentes son conservados.

En resumen, los resultados indican que los compuestos fenólicos desempeñan un papel crucial en las etapas tempranas de desarrollo del coco, protegiendo al fruto del estrés oxidativo y los daños ambientales. A medida que el fruto madura, la concentración de estos compuestos disminuye, lo que sugiere una transición hacia la acumulación de reservas energéticas y la preparación para la dispersión de semillas. Las diferencias entre las concentraciones estimadas en las variedades y los tejidos (sólido vs. líquido) resaltan nuevamente la complejidad metabólica del coco y su adaptación a diferentes condiciones ambientales. Estos hallazgos tienen implicaciones para la selección de variedades con mayor contenido de antioxidantes y para futuros estudios sobre la regulación de estos procesos metabólicos.

## CAPITULO V. DISCUSIÓN GENERAL, CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

### 5.1 DISCUSIÓN GENERAL

El análisis metabolómico del endospermo sólido y líquido de cocos de las variedades enano verde de Yucatán (EVY) y alto del Pacífico mexicano (APM), en diferentes etapas de maduración, permitió identificar patrones de regulación metabólica que reflejan tanto la naturaleza del tejido como los procesos fisiológicos relacionados con el desarrollo del fruto. En este estudio se generaron dos metabolomas complementarios del endospermo líquido de coco, uno a partir de la extracción con metanol y otro con acetato de etilo, lo que permitió explorar diferentes familias químicas presentes en los tejidos en distintos estados de maduración. Aunque no se utilizaron mezclas de disolventes para la extracción, esta elección metodológica es válida dentro del enfoque exploratorio de este trabajo y responde a los objetivos planteados, que buscan caracterizar de forma comparativa el perfil metabolómico del endospermo en dos variedades contrastantes de *Cocos nucifera* a lo largo de su desarrollo (Creydt y Fischer, 2017).

El uso de disolventes con polaridades contrastantes, como el metanol (polaridad relativa: 0.762) y el acetato de etilo (0.228), permitió una separación selectiva de metabolitos con base en su afinidad polar, de acuerdo al principio de partición diferencial ampliamente documentado en estudios metabolómicos (Yang et al., 2022; Creydt y Fischer, 2017). El metanol, debido a su alta polaridad (constante dieléctrica  $\epsilon = 32.7$ ), favoreció la extracción de compuestos altamente polares, como azúcares simples, aminoácidos libres y ácidos orgánicos de cadena corta, detectando 591 señales iónicas. Por su parte, el acetato de etilo ( $\epsilon = 6.02$ ), con mayor afinidad por moléculas menos polares, permitió recuperar una fracción química más diversa, con un total de 1,574 señales vinculadas principalmente a lípidos neutros, esteroides y compuestos fenólicos de naturaleza lipofílica.

Esta estrategia no solo permitió recuperar fracciones químicas diferenciadas, sino que también arrojó una proporción señal/disolvente de 2.7:1 a favor del acetato de etilo, consistente con hallazgos en tejidos vegetales ricos en lípidos como *Elaeis guineensis*. La diversidad obtenida supera los 834 metabolitos previamente reportados en el endospermo de *Elaeis guineensis* (Tahir et al., 2022), lo que subraya la relevancia de adaptar el sistema de extracción a la naturaleza bioquímica del tejido, especialmente en matrices recalcitrantes como el endospermo de coco. Sin embargo, la no detección de ciertos compuestos como ácidos grasos y alcaloides volátiles, en ambos disolventes, refleja las limitaciones de los sistemas de extracción unipolares y apunta a la necesidad de incorporar en estudios futuros

mezclas ternarias (por ejemplo, metanol:acetato de etilo:agua, 4:4:2), además de la inclusión de métodos asistidos por ultrasonido o microondas para lograr una mejor cobertura química (Gika et al., 2014).

La integración de resultados obtenidos mediante análisis dirigidos y no dirigidos por espectrometría de masas de alta resolución reveló diferencias significativas en la composición y abundancia relativa de metabolitos primarios y secundarios, cuyas distribuciones se ven moduladas por el tipo de endospermo, el estadio de maduración y, en menor medida, por la variedad. Estos patrones reflejan procesos fisiológicos diferenciados y fueron respaldados por el análisis funcional de rutas metabólicas mediante MetaboAnalyst 6.0 (Xia et al., 2009; Pang et al., 2021), que evidenció una representación estadísticamente significativa de rutas como el ciclo del ácido cítrico (TCA), la biosíntesis de aminoácidos esenciales y el metabolismo de ácidos grasos, especialmente durante etapas de transición de maduración.

Una de las observaciones más consistentes fue la clara diferenciación metabólica entre el endospermo líquido y el sólido. El análisis de componentes principales (PCA) reveló agrupamientos definidos por tipo de tejido, independientemente de la variedad. El endospermo líquido estuvo enriquecido con metabolitos solubles como azúcares simples, aminoácidos y ácidos orgánicos, mientras que el sólido presentó un perfil dominado por lípidos estructurales, compuestos fenólicos y metabolitos de alto peso molecular, en concordancia con su papel como tejido de almacenamiento (Prades et al., 2012; Yong et al., 2009). Esta diferenciación funcional también se evidenció en el análisis de enriquecimiento de rutas metabólicas: en el endospermo líquido predominó la glucólisis/gluconeogénesis y la biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada, mientras que en el sólido destacaron rutas asociadas con la biosíntesis de ácidos grasos y compuestos fenólicos.

Respecto a la maduración, se identificaron cambios dinámicos en la acumulación de metabolitos y regulación de rutas. En etapas tempranas del endospermo líquido se observó mayor actividad de rutas energéticas, coherente con su papel de soporte metabólico al embrión en desarrollo (Foale, 2003; Perera et al., 2010). En fases tardías, especialmente en el endospermo sólido, se intensificaron las rutas anabólicas de almacenamiento, como la síntesis de triacilglicéridos y de ácidos grasos de cadena larga, reflejando una transición funcional hacia la acumulación de reservas. En APM se destacó un mayor enriquecimiento en rutas como la biosíntesis de fenilpropanoides y flavonoides, lo que sugiere una estrategia

adaptativa frente a condiciones ambientales adversas como alta radiación y salinidad edáfica (Batugal et al., 2009; Baudouin y Lebrun, 2009).

Estas diferencias tienen una base celular y funcional clara, pues reflejan los roles y funcionales divergentes de cada tipo endospermo. El endospermo líquido, en etapas tempranas, constituye un entorno altamente dinámico, fluido y metabólicamente activo que nutre al embrión en desarrollo. En esta fase, se ha propuesto que las células del endospermo líquido presentan características sincitiales, es decir, contienen múltiples núcleos dentro de una misma masa citoplasmática sin divisiones celulares completas (Batygina y Vinogradova, 2007). Esta organización podría ser la responsable de la alta eficiencia en la síntesis y distribución de metabolitos, lo cual puede explicar la presencia de compuestos altamente solubles y bioquímicamente activos, como ácidos orgánicos, nucleósidos, y ciertos aminoácidos esenciales.

Las diferencias metabolómicas observadas entre variedades también podrían estar estrechamente ligadas a las divergencias entre la arquitectura genética de cada una, lo que podría explicar su capacidad de adaptación en diversos ambientes. En particular, la variedad APM, originaria de zonas costeras del Pacífico, mostró una regulación más activa de rutas vinculadas al estrés oxidativo y la biosíntesis de compuestos fenólicos, lo cual podría conferirle una ventaja adaptativa en ecosistemas con alta exposición solar, salinidad edáfica y limitación hídrica. Este tipo de plasticidad bioquímica, observada también en otras especies vegetales, lo que sugiere que el metaboloma puede servir como un marcador funcional del potencial adaptativo de diferentes genotipos en programas de selección o mejoramiento enfocados en tolerancia a estrés abiótico. Por ejemplo, estudios en *Oryza sativa* han demostrado que la diversidad en perfiles metabolómicos entre variedades tolerantes y susceptibles al estrés salino está estrechamente relacionada con mecanismos genéticos de osmorregulación, detoxificación y producción de osmoprotectores como prolina y azúcares solubles (Kusano et al., 2015).

En el caso del coco, la integración del metaboloma con datos genómicos constituye una estrategia viable para identificar variedades con mayor aptitud para prosperar en ambientes costeros sujetos a condiciones extremas. El reciente ensamblaje del genoma del coco (Xiao et al., 2021), representa un avance significativo en la comprensión de los factores genéticos que subyacen a la diversidad morfológica, fisiológica y adaptativa de esta especie. En dicho estudio, se compararon dos variedades contrastantes: una variedad alta, adaptada a condiciones costeras exigentes, y una variedad enana, seleccionada por sus características agronómicas como la precocidad y menor porte. La comparación reveló diferencias

sustanciales en la arquitectura genómica, particularmente en genes implicados en la señalización hormonal, el desarrollo reproductivo, la tolerancia al estrés salino y el metabolismo secundario. Una de las observaciones más destacadas fue la mutación en el gen que codifica para la giberelina 2-oxidasa (GA2ox) en la variedad enana, la cual promueve la inactivación de giberelinas bioactivas. Esta mutación está directamente asociada con el fenotipo enano y se alinea con otros casos reportados en especies como arroz y maíz, donde la pérdida de función en GA2ox produce plantas de menor tamaño y floración temprana (Sakamoto et al., 2004; Zhang et al., 2020). Esta modificación hormonal tiene implicaciones metabólicas importantes, ya que una menor concentración de giberelinas puede modificar el balance de carbono y nitrógeno, favoreciendo la acumulación de ciertos aminoácidos y compuestos fenólicos como estrategia de defensa (Schäfer et al., 2015).

Además, el estudio genómico identificó la duplicación de genes involucrados en rutas de señalización de estrés salino en la variedad alta. Entre ellos se destacan genes codificantes para receptores de ácido abscísico (PYR/PYL/RCAR), canales de transporte de iones como HKT1 y NHX1, y componentes de la señalización por calcio (CIPKs y CBLs), los cuales permiten una regulación más precisa del balance osmótico y la homeostasis iónica bajo condiciones salinas (Zhu, 2016). Esta expansión génica se correlaciona con los hallazgos metabólicos del presente estudio, en el que la variedad APM mostró una mayor representación de rutas metabólicas asociadas con el metabolismo de compuestos fenólicos, ácidos orgánicos de cadena larga y lípidos estructurales. Estas rutas son ampliamente reconocidas por su papel en la protección antioxidante, estabilización de membranas y mitigación del daño oxidativo en condiciones de estrés abiótico (Obata y Fernie, 2012; Arbona et al., 2013). La biosíntesis de fenilpropanoides y flavonoides, por ejemplo, mostró una mayor intensidad en APM, lo cual puede estar directamente influenciado por la regulación génica diferencial de enzimas como la fenilalanina amonoliasa (PAL) y chalcona sintasa (CHS), cuya expresión ha sido reportada como inducible por salinidad y luz UV en especies adaptadas a climas costeros (Dixon y Paiva, 1995; Nakabayashi et al., 2014).

Asimismo, el genoma de la variedad enana mostró una regulación diferencial de genes asociados a la maduración reproductiva y al metabolismo del almidón, lo cual puede explicar el enriquecimiento observado en el endospermo líquido de EVY para rutas como la glucólisis/gluconeogénesis y el metabolismo de aminoácidos de cadena ramificada. Esto sugiere una estrategia metabólica orientada a un desarrollo más rápido del embrión, en

consonancia con una maduración acelerada y ciclos reproductivos más cortos. La coordinación entre estos aspectos genómicos y metabolómicos refuerza la hipótesis de que la especialización adaptativa de las variedades de coco se manifiesta tanto en su regulación genética como en su firma química, especialmente en tejidos clave como el endospermo. En conjunto, estos hallazgos refuerzan la utilidad del enfoque multiómico para comprender la base molecular de la adaptación en *Cocos nucifera*, aunado al estudio de los procesos de maduración del fruto. La integración de información genómica y metabolómica permitiría revelar asociaciones funcionales entre variación genética y acumulación de metabolitos, aportando herramientas para la selección de variedades resilientes en programas de mejoramiento genético (Fernie y Tohge, 2017; Kusano et al., 2015). Así, el perfil metabolómico de variedades de coco no solo refleja procesos fisiológicos del desarrollo, sino también trayectorias evolutivas divergentes influenciadas por presiones ambientales y selección artificial.

## 5.2 CONCLUSIONES

El análisis metabolómico de los frutos de *Cocos nucifera L.* evidenció diferencias significativas en las rutas metabólicas entre las variedades alto del Pacífico mexicano (APM) y enano verde de Yucatán (EVY), así como entre los tejidos de endospermo líquido y sólido. En ambas variedades se observaron cambios metabólicos clave a lo largo del proceso de maduración, aunque con trayectorias bioquímicas distintas. La variedad APM mostró una mayor diversidad de rutas enriquecidas, destacando la biosíntesis de flavonoides, esteroides y aminoácidos aromáticos en etapas tempranas, y el metabolismo de lípidos y carbohidratos en fases avanzadas. En contraste, EVY presentó un enfoque más específico hacia la biosíntesis de diterpenoides y carotenoides, con posibles implicaciones en la protección antioxidante y en una estrategia de maduración acelerada.

Ambas variedades coincidieron en la activación de rutas relacionadas con la defensa, como el metabolismo del ácido araquidónico y la acumulación de reservas energéticas, sugiriendo adaptaciones metabólicas compartidas para garantizar el desarrollo del fruto. No obstante, es importante considerar que las diferencias en la complejidad, especificidad y abundancia relativa de los metabolitos podrían estar influenciados por la divergencia genética y fisiológica entre ambas variedades, posiblemente como resultado de su historia evolutiva y procesos de domesticación.

Los resultados refuerzan la comprensión de que la transformación del endospermo líquido a sólido es un proceso altamente dinámico, que involucra la deposición intracelular de lípidos, la remodelación de la pared celular y una reprogramación de rutas metabólicas primarias y secundarias. Además, la variedad APM mostró una mayor capacidad para la acumulación de compuestos fenólicos, especialmente en el endospermo líquido, lo cual podría representar una ventaja adaptativa relacionada con su mayor exposición a condiciones ambientales adversas. En general, la disminución de estos compuestos con la maduración sugiere una transición metabólica desde funciones protectoras hacia la acumulación de reservas.

Este enfoque integrado resalta el papel esencial de las rutas reguladas y los metabolitos primarios y secundarios en el desarrollo y protección del fruto, y demuestra el valor de la metabolómica, complementada con otras técnicas ómicas, para desentrañar los mecanismos moleculares subyacentes al desarrollo de frutos no climatéricos como el coco. Asimismo, al integrar información genómica, se refuerzan las correlaciones entre

variaciones genómicas y la regulación de rutas metabólicas, lo cual, amplía nuestra comprensión de la base molecular de la diversidad fenotípica en *C. nucifera*.

### 5.3 PERSPECTIVAS

- Integración multiómica funcional: La combinación de datos genómicos, transcriptómicos, proteómicos y metabolómicos permitirá identificar genes y proteínas reguladores clave en rutas metabólicas involucradas en la maduración del endospermo, aportando una visión holística de los mecanismos moleculares implicados.
- Mejoramiento genético y conservación: La identificación de metabolitos diferenciales de interés (como flavonoides, diterpenoides y lípidos específicos) puede incorporarse en programas de selección varietal orientados a mejorar la resiliencia al estrés abiótico y la calidad nutracéutica del fruto, contribuyendo al manejo sostenible y la conservación de los recursos genéticos del coco.
- Evaluación ambiental y geográfica: Explorar cómo las condiciones ambientales locales influyen en los perfiles metabólicos en otras variedades cultivadas internacionalmente permitirá identificar factores críticos para la adaptación y ofrecer herramientas para el manejo agronómico en diferentes contextos agroecológicos.
- Transición germinativa: Investigar la movilización de reservas del endospermo durante la germinación proporcionará una comprensión más completa del metabolismo integral del fruto, además de establecer vínculos funcionales entre etapas reproductivas y postreproductivas.
- Innovación biotecnológica: Los metabolitos identificados poseen alto potencial para aplicaciones en los sectores nutracéutico, cosmético y agrícola, y podrían ser explotados mediante estrategias de bioprospección, fermentación dirigida o síntesis biosustentable.
- Estandarización del estado de maduración: El desarrollo de biomarcadores metabólicos específicos para la clasificación de la madurez en campo puede optimizar la cosecha, el procesamiento y la valorización industrial del coco.

En conjunto, estos hallazgos y proyecciones destacan la relevancia de continuar investigando el metabolismo del coco desde una perspectiva integrativa, tanto para profundizar en su biología como para potenciar su aprovechamiento sostenible en contextos locales y globales.

**BIBLIOGRAFÍA**

Abraham A., y Mathew P.M. (1963). Cytology of coconut endosperm. *Ann Bot* 3:505–512.

Alleyne, T., Roache, S., Thomas, C., y Shirley, A. (2005). The control of hypertension by use of coconut water y mauby: two tropical food drinks. *West Indian Medical Journal*, 54(1), 3-8.

Alonso-Esquivel, M., Cueto-Rodríguez, J. R., Llauger-Riverón, R., Rodríguez, M., Santos-Rodríguez, Y., y Rohde, W. (2008). Genetics variability estimation among coconut ecotypes in Cuba by ISTR. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 10(2), 6-13.

Ángeles, J. G., Lado, J. P., Pascual, E. D., Cueto, C. A., Laurena, A. C., y Laude, R. P. (2018). Towards the Understanding of Important Coconut Endosperm Phenotypes: Is there an Epigenetic Control? *Agronomy*, 8(10), 225.

Anurag, P., y Rajamohan, T. (2003). Cardioprotective effect of tender coconut water in experimental myocardial infarction. *Plant Foods for Human Nutrition*, 58(3), 1-12.

Appaiah, P., Sunil, L., Prasanth Kumar, P. K., y Gopala Krishna, A. G. (2014). Composition of coconut testa, coconut kernel y its oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 91(6), 917-924.

Aramaki, T., Blanc-Mathieu, R., Endo, H., Ohkubo, K., Kanehisa, M., Goto, S., y Ogata, H. (2020). KofamKOALA: KEGG ortholog assignment based on profile HMM y adaptive score threshold. *Bioinformatics*, 36(7), 2251-2252.

Arana-Paredes, M., del Aguila, S. R., y Ruíz, J. R. C. (2015). Germinación in vitro de *Dianthus caryophyllus* en diferentes medios de cultivo. *Sagasteguiana*, 3(1), 55-66.

Arrutia, F., Binner, E., Williams, P., y Waldron, K. W. (2020). Oilseeds beyond oil: Press cakes and meals supplying global protein requirements. *Trends in Food Science y Technology*, 100, 88-102.

Astikasari, N. D. (2017). The Effect of Coconut Water Against Decreasing Dehydration Degrees in Children Ages 5-10 Years with Diare. *Health Notions*, 1(2), 126-129.

Asuquo, E. G., y Udobi, C. E. (2016). Antibacterial and toxicity studies of the ethanol extract of *Musa paradisiaca* leaf. *Cogent Biology*, 2(1), 1219248.

Balasubramaniam, K., Atukorala, T. M. S., Wijesundera, S., Hoover, A. A., y De Silva, M. A. T. (1973). Biochemical changes during germination of the coconut (*Cocos nucifera*). *Annals of Botany*, 37(3), 439-445.

Baliga, M. S., Baliga, B. R. V., Kandathil, S. M., Bhat, H. P., y Vayalil, P. K. (2011). A review of the chemistry and pharmacology of the date fruits (*Phoenix dactylifera* L.). *Food research international*, 44(7), 1812-1822.

Baudouin, L., y Lebrun, P. (2009). Coconut (*Cocos nucifera* L.) DNA studies support the hypothesis of an ancient Austronesian migration from Southeast Asia to America. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 56(2), 257-262.

Beveridge, F.C.; Kalaipandian, S.; Yang, C.; Adkins, S.W. Fruit Biology of Coconut (*Cocos Nucifera* L.). *Plants* 2022, 11, 3293, doi:10.3390/plants11233293.

Benítez-Arellano, M., y Sosa-Alcaraz, M. (2017). Situación actual del sistema producto coco en Yucatán, desde una perspectiva de la sustentabilidad. *Tópicos selectos de Turismo, Gastronomía y Sustentabilidad empresarial*. ©ECORFAN. (1), 93-105.

Berleth, T., Krogan, N. T., y Scarpella, E. (2004). Auxin signals—turning genes on and turning cells around. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(5), 553-563.

Bonghi, C., Rizzini, F. M., Gambuti, A., Moio, L., Chkaiban, L. y Tonutti, P. (2012). Phenol compound metabolism and gene expression in the skin of wine grape (*Vitis vinifera* L.) berries subjected to partial postharvest dehydration. *Postharvest Biology and Technology*, 67, 102-109.

Briones, V. L., y Barrera, M. A. F. (2016). El cocotero: “El árbol de la vida”. Desde el herbario CICY. Recuperado de . 14072016.

Bruce Fife, N. D. (2017). Coconut water for health and healing. Piccadilly Books, Ltd.

Calavia, R., Annanouch, F. E., Correig, X., y Yanes, O. (2012). Nanostructure initiator mass spectrometry for tissue imaging in metabolomics: future prospects and perspectives. *Journal of Proteomics*, 75(16), 5061-5068.

Campbell-Falck, D., Thomas, T., Falck, T. M., Tutuo, N., y Clem, K. (2000). The intravenous use of coconut water. *The American Journal of Emergency Medicine*, 18(1), 108-111.

Cao, H., Zhou, Y., Chang, Y., Zhang, X., Li, C., y Ren, D. (2019). Comparative phosphoproteomic analysis of developing maize seeds suggests a pivotal role for enolase in promoting starch synthesis. *Plant Science*, 289, 110243.

Cevallos-Cevallos, J. M., Reyes-De-Corcuera, J. I., Etxeberria, E., Danyluk, M. D., y Rodrick, G. E. (2009). Metabolomic analysis in food science: a review. *Trends in Food Science y Technology*, 20(11-12), 557-566.

Chen, F., Ma, R., y Chen, X. L. (2019). Advances of metabolomics in fungal pathogen–plant interactions. *Metabolites*, 9(8), 169.

Chen, W., Zhang, G., Chen, W., Zhong, Q., y Chen, H. (2018). Metabolomic profiling of matured coconut water during post-harvest storage revealed discrimination and distinct changes in metabolites. *RSC advances*, 8(55), 31396-31405.

Chen, Y., Grimplet, J., David, K., Castellarin, S. D., Terol, J., Wong, D. C., and Chervin, C. (2018). Ethylene receptors and related proteins in climacteric and non-climacteric fruits. *Plant science*, 276, 63-72.

Chew, S. Y., Chee, W. J. Y., y Than, L. T. L. (2019). The glyoxylate cycle and alternative carbon metabolism as metabolic adaptation strategies of *Candida glabrata*: perspectives from *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of biomedical science*, 26(1), 1-10.

Child, R. (1972). Coconuts a world-wide review. In Conference on Cocoa and Coconuts, Kuala Lumpur, 1971. 1972. Journal Article Proceedings, 275-281.

Claudius, M., y Ludivine, T. (2017). Proteomic as a tool to study fruit ripening. In Proteomics in Food Science. 127-141.

Creydt, M., y Fischer, M. (2017). Plant metabolomics: maximizing metabolome coverage by optimizing mobile phase additives for nontargeted mass spectrometry in positive and negative electrospray ionization mode. Analytical chemistry, 89(19), 10474-10486.

Cubero-Leon, E., De Rudder, O. y Maquet, A. (2018). Metabolomics for organic food authentication: Results from a long-term field study in carrots. Food Chemistry, 239, 760-770.

Cunha, A. G., Alves Filho, E. G., Silva, L. M. A., Ribeiro, P. R. V., Rodrigues, T. H. S., de Brito, E. S., y de Miranda, M. R. A. (2020). Chemical composition of thermally processed coconut water evaluated by GC-MS, UPLC-HRMS, and NMR. Food Chemistry, 126874.

DebMandal, M., y Mandal, S. (2011). Coconut (*Cocos nucifera* L.: Arecaceae): in health promotion and disease prevention. Asian Pacific journal of tropical medicine, 4(3), 241-247.

Dey, G., Chakraborty, M. y Mitra, A. (2005). Profiling C6–C3 and C6–C1 phenolic metabolites in *Cocos nucifera*. Journal of plant physiology, 162(4), 375-381.

Dietmair, S., Timmins, N. E., Gray, P. P., Nielsen, L. K., y Krömer, J. O. (2010). Towards quantitative metabolomics of mammalian cells: development of a metabolite extraction protocol. Analytical biochemistry, 404(2), 155-164.

Djombou Feunang, Y., Eisner, R., Knox, C., Chepelev, L., Hastings, J., Owen, G., y Wishart, D. S. (2016). ClassyFire: automated chemical classification with a comprehensive, computable taxonomy. Journal of cheminformatics, 8, 1-20.

Dossou, S. S. K., Xu, F., Cui, X., Sheng, C., Zhou, R., You, J., y Wang, L. (2021). Comparative metabolomics analysis of different sesame (*Sesamum indicum* L.) tissues reveals a tissue-specific accumulation of metabolites. BMC Plant Biology, 21(1), 1-14.

Dunn, W. B., Bailey, N. J. C., y Johnson, H. E. (2005). Measuring the metabolome: current analytical technologies. *Analyst*, 130, 606–625.

Durán-Soria, S., Pott, D. M., Osorio, S., y Vallarino, J. G. (2020). Sugar signaling during fruit ripening. *Frontiers in Plant Science*, 11, 564917.

Ezhilan, B. P., and Neelamegam, R. (2012). GC-MS analysis of phytocomponents in the ethanol extract of *Polygonum chinense* L. *Pharmacognosy Research*, 4(1), 11.

Foale, M., Biddle, J., Bazrafshan, A., y Adkins, S. (2020). Biology, ecology, and evolution of coconut. *Coconut Biotechnology: Towards the Sustainability of the 'Tree of Life'*, 17-27.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2023). Coconut production statistics. FAO. Statista. (2023). Global coconut market report. Statista Research Department.

Fiehn, O. (2002). Metabolomics the link between genotypes and phenotypes. *Plant Molecular Biology*, 48, 155–171

Frank, T., Röhlig, R. M., Davies, H. V., Barros, E. y Engel, K. H. (2012). Metabolite profiling of maize kernels-genetic modification versus environmental influence. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(12), 3005-3012.

Ge, L., Yong, J. W. H., Tan, S. N., Hua, L., y Ong, E. S. (2008). Analyses of gibberellins in coconut (*Cocos nucifera* L.) water by partial filling-micellar electrokinetic chromatography-mass spectrometry with reversal of electroosmotic flow. *Electrophoresis*, 29(10), 2126-2134.

Ge, G., Jiao, W., Cui, C., Liao, G., Sun, J., y Hou, R. (2019). Thiamethoxam metabolism and metabolic effects in cell suspension culture of tea (*Camellia sinensis* L.). *Journal of agricultural and food chemistry*, 67(26), 7538-7546.

Ghaffari, H., Tadayon, M. R., Nadeem, M., Cheema, M., y Razmjoo, J. (2019). Proline-mediated changes in antioxidant enzymatic activities and the physiology of sugar beet under drought stress. *Acta physiologiae plantarum*, 41(2), 1-13.

Go, E. P. (2010). Database resources in metabolomics: an overview. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 5, 18-30.

Gogna, N., Hamid, N. and Dorai, K. (2015). Metabolomic profiling of the phytomedicinal constituents of *Carica papaya* L. leaves and seeds by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy and multivariate statistical analysis. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 115, 74-85.

Gunn, B. F., Baudouin, L., and Olsen, K. M. (2011). Independent origins of cultivated coconut (*Cocos nucifera* L.) in the old world tropics. *Plos One*, 6(6), e21143.

Guo, L. X., Shi, C. Y., Liu, X., Ning, D. Y., Jing, L. F., Yang, H., and Liu, Y. Z. (2016). Citrate accumulation-related gene expression and/or enzyme activity analysis combined with metabolomics provide a novel insight for an orange mutant. *Scientific Reports*, 6(1), 1-12.

Haberer, G., and Kieber, J. J. (2002). Cytokinins. New insights into a classic phytohormone. *Plant Physiology*, 128(2), 354-362.

Harries, H., Baudouin, L., and Cardeña, R. (2004). Floating, boating and introgression: molecular techniques and the ancestry of coconut palm populations on Pacific Islands. *Ethnobotany Research and Applications*, 2, 037-053.

Halim, H. H., Dek, M. S. P., Hamid, A. A., Saari, N., Lazim, M. I. M., Abas, F., and Jaafar, A. H. (2023). Novel sources of bioactive compounds in coconut (*Cocos nucifera* L.) water from different maturity levels and varieties as potent skin anti-aging strategies and anti-fatigue agents. *Food Bioscience*, 51, 102326.

Hussein, Z., Fawole, O. A., and Opara, U. L. (2018). Preharvest factors influencing bruise damage of fresh fruits—a review. *Scientia horticulturae*, 229, 45-58.

Islas-Flores, I., Oropeza, C., and Hernández-Sotomayor, S. T. (1998). Protein phosphorylation during coconut zygotic embryo development. *Plant Physiology*, 118(1), 257-263.

ITIS, 2020. Integrated Taxonomic Information System (ITIS). Recuperado de <https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt#null>

Jackson, J. C., Gordon, A., Wizzard, G., McCook, K., y Rolle, R. (2004). Changes in chemical composition of coconut (*Cocos nucifera*) water during maturation of the fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(9), 1049-1052.

Janick, J., and Paull, R. E. (2008). *The encyclopedia of fruit and nuts. Uses and Applications*. CABI. 2-4.

Javel, I. M., Bandala, A. A., Salvador, R. C., Bedruz, R. A. R., Dadios, E. P., & Vicerra, R. R. P. (2018, November). Coconut fruit maturity classification using fuzzy logic. In 2018 IEEE 10th International Conference on Humanoid, Nanotechnology, Information Technology, Communication and Control, Environment and Management (HNICEM) (pp. 1-6). IEEE.

Kader, A. A. (2002). *Postharvest Technology of Horticultural Crops* (3rd ed.). University of California, Agriculture and Natural Resources.

Kamal-Eldin, A., George, N., Sobti, B., AlRashidi, N., Ghnimi, S., Ali, A. A., and Hamed, F. (2020). Dietary fiber components, microstructure, and texture of date fruits (*Phoenix dactylifera* L.). *Scientific Reports*, 10(1), 1-11.

Kanehisa, M., and Goto, S. (2000). KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic acids research*, 28(1), 27-30.

Kim, R. H., Lee, S. J., Lee, K., Hwang, K. T., y Kim, J. (2023). Profiling of phenolic acids, flavonoids, terpenoids, and steroid derivatives in coconut (*Cocos nucifera* L.) haustorium. *Food Science and Biotechnology*, 1-10.

Kind, T., y Fiehn, O. (2007). Metabolomic database annotations via query of elemental compositions: Mass accuracy is insufficient even at less than 1 ppm. *BMC Bioinformatics*, 8, 105.

---

Klassen, A., Faccio, A. T., Canuto, G. A. B., da Cruz, P. L. R., Ribeiro, H. C., Tavares, M. F. M., y Sussulini, A. (2017). Metabolomics: definitions and significance in systems biology. *Metabolomics: from fundamentals to clinical applications*, 3-17.

Klein, M. S., Almstetter, M. F., Schlamberger, G., Nürnberger, N., Dettmer, K., Oefner, P. J., Meyer, H., Wiedemann, S. and Gronwald, W. (2010). Nuclear magnetic resonance and mass spectrometry-based milk metabolomics in dairy cows during early and late lactation. *Journal of Dairy Science*, 93(4), 1539-1550.

Koda, M., Furihata, K., Wei, F., Miyakawa, T. and Tanokura, M. (2012). Metabolic discrimination of mango juice from various cultivars by band-selective NMR spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(5), 1158-1166.

Kohli, P., Kalia, M., and Gupta, R. (2015). Pectin methylesterases: a review. *Journal of Bioprocessing y Biotechniques*, 5(5), 1.

Kumar, N. S., and Balakrishna, A. (2009). Seasonal variations in fatty acid composition of oil in developing coconut. *Journal of Food Quality*, 32(3), 410-410.

Kumar, S. N. (2011). Variability in coconut (*Cocos nucifera* L.) germplasm and hybrids for fatty acid profile of oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(24), 13050-13058.

Kumar, S. N., Hebbar, K. B., Bai, K. K., and Rajagopal, V. (2018). Physiology and Biochemistry. In *The Coconut Palm (Cocos nucifera L.) Research and Development Perspectives* (pp. 443-488).

La Nasa, J., Degano, I., Brandolini, L., Modugno, F., and Bonaduce, I. (2018). A novel HPLC-ESI-Q-ToF approach for the determination of fatty acids and acylglycerols in food samples. *Analytica chimica acta*, 1013, 98-109.

Li, X., Pei, G., Liu, L., Chen, L., y Zhang, W. (2017). Metabolomic analysis and lipid accumulation in a glucose tolerant *Cryptocodium* strain obtained by adaptive laboratory evolution. *Bioresource technology*, 235, 87-95.

Li, M., Li, Y., Zhang, W., Li, S., Gao, Y., Ai, X., y Li, Q. (2018). Metabolomics analysis reveals that elevated atmospheric CO<sub>2</sub> alleviates drought stress in cucumber seedling leaves. *Analytical Biochemistry*, 559, 71-85.

Luengwilai, K., Saltveit, M. and Beckles, D. M. (2012). Metabolite content of harvested Micro-Tom tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit is altered by chilling and protective heat-shock treatments as shown by GC-MS metabolic profiling. *Postharvest biology and Technology*, 63(1), 116-122.

Ma, Z., Ge, L., Lee, A. S., Yong, J. W. H., Tan, S. N., and Ong, E. S. (2008). Simultaneous analysis of different classes of phytohormones in coconut (*Cocos nucifera* L.) water using high-performance liquid chromatography and liquid chromatography-tandem mass spectrometry after solid-phase extraction. *Analytica Chimica Acta*, 610(2), 274-281.

Mahayothee, B., Koomyart, I., Khuwijtjaru, P., Siriwongwilaichat, P., Nagle, M., y Müller, J. (2016). Phenolic compounds, antioxidant activity, and medium chain fatty acids profiles of coconut water and meat at different maturity stages. *International Journal of Food Properties*, 19(9), 2041-2051.

Mak, T. D., Goudarzi, M., Laiakis, E. C., and Stein, S. E. (2020). Disparate metabolomics data reassembler: A novel algorithm for agglomerating incongruent LC-MS metabolomics datasets. *Analytical chemistry*, 92(7), 5231-5239.

Manaf, F. A., Lawler, N. G., Peiffer, J. J., Maker, G. L., Boyce, M. C., Fairchild, T. J., y Broadhurst, D. (2018). Characterizing the plasma metabolome during and following a maximal exercise cycling test. *Journal of Applied Physiology*, 125(4), 1193-1203.

Majsiak, E., Choina, M., Miśkiewicz, K., Doniec, Z., y Kurzawa, R. (2020). Oleosins: A Short Allergy Review. *Medical Research and Innovation*, 51-55.

Menon, K. P. V., and Pandalai, K. M. (1960). The coconut palm. A monograph. Indian Coconut Committee, Ernakulum, p 384.

Moreno, N., D. Miranda y F. Martinez. 2013. La zeatina fomenta la germinación de semillas de anón (*Annona squamosa* L.). Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas, 7 (1): 9-19.

Murthy, H. N., Lee, E. J., y Paek, K. Y. (2014). Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 118(1), 1-16.

Nicholson, J. K., Lindon, J. C., y Holmes, E. (1999). 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR data. Xenobiotica, 29, 1181–1189.

Nieman, D. C., Gillitt, N. D., Sha, W., Meaney, M. P., John, C., Pappan, K. L. and Kinchen, J. M. (2015). Metabolomics-based analysis of banana and pear ingestion on exercise performance and recovery. Journal of Proteome Research, 14(12), 5367-5377.

Niral, V., and Jerard, B. A. (2018). Botany, Origin and Genetic Resources of Coconut. In The Coconut Palm (*Cocos nucifera* L.)-Research and Development Perspectives (pp. 57-111).

Onoja, E., Chandren, S., Razak, F. I. A., Mahat, N. A., and Wahab, R. A. (2019). Oil palm (*Elaeis guineensis*) biomass in Malaysia: the present and future prospects. Waste and Biomass Valorization, 10(8), 2099-2117.

Padua-Resurreccion, A. B., and Banzon, J. A. (1979). Fatty acid composition of the oil from progressively maturing bunches of coconuts. Philippine Journal of Coconut Studies. 4. 1-16.

Patel, R. M., Jiang, P., Asplin, J., Granja, I., Capretz, T., Osann, K., and Clayman, R. V. (2018). Coconut water: An unexpected source of urinary citrate. BioMed research international, 2018.

Patti, G. J., Yanes, O., and Siuzdak, G. (2012). Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 13(4), 263-269.

Perera, P. I., Hocher, V., Weerakoon, L. K., Yakandawala, D. M. D., Fernando, S. C., and Verdeil, J. L. (2010). Early inflorescence and floral development in *Cocos nucifera* L. (Arecaceae: Arecoideae). *South African Journal of Botany*, 76(3), 482-492.

Plischke, A., Choi, Y. H., Brakefield, P. M., Klinkhamer, P. G. and Bruinsma, M. (2012). Metabolomic plasticity in GM and non-GM potato leaves in response to aphid herbivory and virus infection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(6), 1488-1493.

Prando, M. S., Chiavazza, P., Faggio, A., and Contessa, C. (2014). Effect of coconut water and growth regulator supplements on in vitro propagation of *Corylus avellana* L. *Scientia horticulturae*, 171, 91-94.

Qin, X., Li, P., Lu, S., Sun, Y., Meng, L., Hao, J., y Fan, S. (2020). Phosphoproteomic analysis of lettuce (*Lactuca sativa* L.) reveals starch and sucrose metabolism functions during bolting induced by high temperature. *PLoS One*, 15(12), e0244198.

Ramamurthy, V., and Sathiyadevi, M. (2017). Preliminary phytochemical screening of methanol extract of *Indigofera tinctoria* Linn. *Journal of Plant Biochemistry and Physiology*, 5(184), 2.

Ramanandam, G., Ravindra Kumar, K., Padma, E., Kalpana, M., y Maheswarappa, H. P. (2017). Potential coconut (*Cocos nucifera*) hybrids for yield and quality for coastal region of Andhra Pradesh (India).

Rajesh, M. K., Sabana, A. A., Rachana, K. E., Rahman, S., Jerard, B. A., and Karun, A. (2015). Genetic relationship and diversity among coconut (*Cocos nucifera* L.) accessions revealed through SCoT analysis. *Biotech*, 5(6), 999-1006.

Razzaq, A., Sadia, B., Raza, A., Khalid Hameed, M., y Saleem, F. (2019). Metabolomics: A way forward for crop improvement. *Metabolites*, 9(12), 303.

Reddy, E. P., Lakshmi, T. M., and Kiran, S. R. (2018). Tender Coconut Water Uses, Health Benefits, Good Nutritive Value and Antioxidant Capacity. *Indian Journal of Public Health Research y Development*, 9(4).

Redestig, H., Kusano, M., Ebana, K., Kobayashi, M., Oikawa, A., Okazaki, Y. and Saito, K. (2011). Exploring molecular backgrounds of quality traits in rice by predictive models based on high-coverage metabolomics. *BMC Systems Biology*, 5(1), 1-11.

Richter, E. M., Jesus, D. P. D., Muñoz, R. A., Lago, C. L. D., and Angnes, L. (2005). Determination of anions, cations, and sugars in coconut water by capillary electrophoresis. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 16, 1134-1139.

Roberts, L. D., Souza, A. L., Gerszten, R. E., and Clish, C. B. (2012). Targeted metabolomics. *Current protocols in molecular biology*, 98(1), 30-2.

Roda, A., Lucini, L., Torchio, F., Dordoni, R., De Faveri, D. M. and Lambri, M. (2017). Metabolite profiling and volatiles of pineapple wine and vinegar obtained from pineapple waste. *Food Chemistry*, 229, 734-742.

Saccenti, E., Hoefsloot, H. C., Smilde, A. K., Westerhuis, J. A., y Hendriks, M. M. (2014). Reflections on univariate and multivariate analysis of metabolomics data. *Metabolomics*, 10(3), 361-374.

Salem, M., Bernach, M., Bajdzienko, K., Giavalisco, P. (2017) Simple Fractionated Extraction Method for the Comprehensive Analysis of Metabolites, Lipids, and Proteins from a Single Sample. *Journal of Visualized Experiments*. 124 (1), 1-10.

Salem, M. A., Perez de Souza, L., Serag, A., Fernie, A. R., Farag, M. A., Ezzat, S. M., y Alseekh, S. (2020). Metabolomics in the context of plant natural products research: From sample preparation to metabolite analysis. *Metabolites*, 10(1), 37.

Santos, G. A., Batugal, P. A., Othman, A., Baudouin, L., and Labouisse, J. P. (1996). Manual on standardized research techniques in coconut breeding. International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI) and International Coconut Genetic Resources Network (COGENT). Manado, Indonesia. 46 pp.

Schrimpe-Rutledge, A. C., Codreanu, S. G., Sherrod, S. D., y McLean, J. A. (2016). Untargeted metabolomics strategies—challenges and emerging directions. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 27, 1897–1905.

Silverstein, R. M., Webster, F. X., Kiemle, D. J., y Bryce, D. L. (2014). *Spectrometric identification of organic compounds*. John Wiley & Sons

Soto, G. M., y Rosales, C. M. (2016). Efecto del solvente y de la relación masa/solvente, sobre la extracción de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de extractos de corteza de *Pinus durangensis* y *Quercus sideroxylla*. *Maderas. Ciencia y tecnología*, 18(4), 701-714.

Sakamoto, T., Morinaka, Y., Ishiyama, K., Kobayashi, M., Itoh, H., Kayano, T., y Tanaka, H. (2003). Genetic manipulation of gibberellin metabolism in transgenic rice. *Nature biotechnology*, 21(8), 909-913.

Sousa Silva, M., Cordeiro, C., Roessner, U., y Figueiredo, A. (2019). Metabolomics in crop research, Current and emerging methodologies. *Frontiers in plant science*, 10, 1013.

Tahir, N. I., Rozali, N. L., Rahmah, A. R. S., Amiruddin, M. D., Hwa, L. F., Shaari, K., y Ramli, U. S. (2022). Metabolome study of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) planted in different environment conditions. *Tropical Plant Biology*, 15(3), 211-232.

Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I. M., y Murphy, A. (2015). *Plant Physiology and Development* (6th ed.). Sinauer Associates.

Tammes, P. L. M. (1955). Review of coconut selection in Indonesia. *Euphytica*, 4(1), 17-24.

Tuyekar, S. N., Tawade, B. S., Singh, K. S., Wagh, V. S., Vidhate, P. K., Yevale, R. P., Gaikwad, S., y Kale, M. (2021). An overview on coconut water: As A multipurpose nutrition. *International journal of pharmaceutical sciences review and research*, 68(2). <https://doi.org/10.47583/ijpsrr.2021.v68i02.010>

Valli, S. A., y Gowrie, S. U. (2020). Coconut Sprouts as Phytomedicine: An Approach towards the Development of Nutraceuticals In Phytomedicine. CRC Press. (pp. 187-195).

Venskutonis, P. R., y Kraujalis, P. (2013). Nutritional components of amaranth seeds and vegetables: a review on composition, properties, and uses. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(4), 381-412.

Wolfender, J. L., Marti, G., Thomas, A., y Bertrand, S. (2015). Current approaches and challenges for the metabolite profiling of complex natural extracts. *Journal of Chromatography A*, 1382, 136–164.

Yanes, Ó. (2015). Metabolómica: la ciencia ómica más multidisciplinaria. *Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular*, 186, 7-10.

Yang, Y., Bocs, S., Fan, H., Armero, A., Baudouin, L., Xu, P., and Xiao, Y. (2021). Coconut genome assembly enables evolutionary analysis of palms and highlights signaling pathways involved in salt tolerance. *Communications biology*, 4(1), 1-14.

Yong, J. W., Ge, L., Ng, Y. F., and Tan, S. N. (2009). The chemical composition and biological properties of coconut (*Cocos nucifera* L.) water. *Molecules*, 14(12), 5144-5164.

Zhang, B., Huang, H., Huang, W., Zhang, Z., Wang, Q., y An, B. (2023). Metabolomic and transcriptomic analyses provide insights into metabolic networks during cashew fruit development and ripening. *Food Chemistry*, 404, 134765.

Zhang, J., Zhang, X., Chen, R., Yang, L., Fan, K., Liu, Y., y Liu, Y. (2020). Generation of transgene-free semidwarf maize plants by gene editing of gibberellin-oxidase20-3 using CRISPR/Cas9. *Frontiers in plant science*, 11, 1048.

Zhang, Y., Chen, W., Chen, H., Zhong, Q., Yun, Y., and Chen, W. (2020). Metabolomics analysis of the deterioration mechanism and storage time limit of tender coconut water during storage. *Foods*, 9(1), 46.

Zhang, Y., Li, D., Zhou, R., Wang, X., Dossa, K., Wang, L., y You, J. (2019). Transcriptome and metabolome analyses of two contrasting sesame genotypes reveal the crucial biological pathways involved in rapid adaptive response to salt stress. *BMC plant biology*, 19(1), 1-14.

Zhang, Y., Zhou, W. E., Yan, J. Q., Liu, M., Zhou, Y., Shen, X., and Li, G. H. (2018). A review of the extraction and determination methods of thirteen essential vitamins to the human body: An update from 2010. *Molecules*, 23(6), 1484.

Zhao, S., Garcia, D., Zhao, Y., y Huang, D. (2021). Hydro-electro hybrid priming promotes carrot (*Daucus carota* L.) seed germination by activating lipid utilization and respiratory metabolism. *International journal of molecular sciences*, 22(20), 11090.

Zizumbo-Villarreal, D., Colunga-GarcíaMarín, P., Fernández-Barrera, M., Torres-Hernández, N., and Oropeza, C. (2008). Mortality of Mexican coconut germplasm due to lethal yellowing. *Plant Genetic Resour Newslett, FAO-Biovers*, 156, 23-33.