



FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

**CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE CERAS FOLIARES EPICUTICULARES DE
LA RESERVA DEL PARQUE ESTADUAL DAS FONTES DO IPIRANGA,
APLICANDO GNPS**

Línea de investigación:

Genética, Bioquímica y Biotecnología

Tesis para optar por el Título Profesional de Licenciado en Biología

Autor:

Hurtado Caceres, Ivan

Asesora interna:

Gutiérrez Román, Ana Isabel Flor
(ORCID: 0000-0002-7020-7387)

Asesora externa:

Furlan, Cláudia Maria
(ORCID: 0000-0002-6180-1034)

Jurado:

Lopez Bulnes, Jorge Luis
Saez Flores, Gloria Maria
Mayanga Herrera, Ana Lucia

Lima - Perú

2022

DEDICATORIA

Dedicó esta tesis a toda mi familia, en especial a mi madre Gladis Caceres, porque este trabajo es el resultado también de su esfuerzo, apoyo incondicional y amor inmenso para cada uno de sus hijos.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por permitirme compartir nuevas e increíbles experiencias a nivel académico y familiar durante los tiempos difíciles que pasamos en la pandemia.

Quisiera agradecer inmensamente a la Mg. Ana Gutiérrez por todo el apoyo brindado durante mi formación académica. Asimismo, agradecerle por todas las buenas charlas que tuvimos durante la elaboración de la tesis, incluyendo las mentorías y críticas a fin de mejorar y poner a prueba mis habilidades, con lo cual logré conocerla un poco más allá de la gran profesional que es y el compromiso que tiene con sus orientados. ¡Mil gracias, profesora Ana por el trabajo que realiza!

Asimismo, agradezco con todo el cariño del mundo a la Dra. Cláudia Furlan, por darme la gran oportunidad de descubrir, a través de la elaboración de esta tesis, una increíble área de investigación que me permitió aprender y desarrollar más habilidades. Además, agradezco su gran amabilidad y paciencia para dilucidar mis dudas durante las reuniones remotas que tuvimos, estaré eternamente agradecido por ese desprendimiento

y calidad humana que posee con cada uno de sus orientados. Tenho certeza que você é uma das melhores cientistas e pessoas que conhecí! Brigadão Cláudia!

Agradezco a mi familia por su apoyo incondicional y comprensión durante la elaboración de esta tesis, en especial a mi hermano Edgar que no podía disfrutar plenteramente sus animes durante varios días en la sala de la casa, a fin de concentrarme durante la elaboración de esta tesis, hermano agradezco tu apoyo incondicional y comprensión.

Finalmente, quiero agradecer a los amigos que pude hacer durante la universidad, prácticas, trabajo y elaboración de tesis, ya que con ellos pude desarrollar mis habilidades blandas, que creo que también es muy importante que vaya acompañado a lo académico.

ÍNDICE

| | |
|---|------------|
| DEDICATORIA..... | ii |
| ÍNDICE | v |
| ÍNDICE DE TABLAS..... | ix |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | x |
| ÍNDICE DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS | xvi |
| Resumen..... | xx |
| Abstract..... | xxi |
| I. INTRODUCCIÓN..... | 22 |
| 1.1 Descripción y formulación del Problema..... | 23 |
| <i>1.1.1 Problema general</i> | <i>25</i> |
| <i>1.1.2 Problemas específicos</i> | <i>25</i> |
| 1.2 Antecedentes | 25 |
| 1.3 Objetivos | 27 |
| <i>1.3.1 Objetivo general</i> | <i>27</i> |
| <i>1.3.2 Objetivos específicos</i> | <i>27</i> |
| 1.4 Justificación..... | 27 |
| 1.5 Hipótesis..... | 30 |
| II. MARCO TEÓRICO | 32 |
| 2.1 Cutícula vegetal..... | 32 |
| <i>2.1.1 Localización.....</i> | <i>32</i> |
| <i>2.1.2 Estructura</i> | <i>32</i> |

| | |
|---|-----------|
| 2.1.3 <i>Función</i> | 33 |
| 2.2 Ceras vegetales..... | 35 |
| 2.2.1 <i>Composición química de las ceras cuticulares</i> | 35 |
| 2.2.2 <i>Biosíntesis de ceras</i> | 36 |
| 2.3 Principales contaminantes atmosféricos..... | 42 |
| 2.4 Biomonitorio vegetal de contaminantes | 44 |
| 2.5 Metabolómica..... | 45 |
| 2.5.1 <i>Metabolómica dirigida</i> | 45 |
| 2.5.1 <i>Metabolómica no dirigida</i> | 45 |
| 2.6 Recursos informáticos para el análisis de datos espectrales EM | 45 |
| 2.6.1 <i>Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS)</i> | 46 |
| III. Método | 51 |
| 3.1 Tipo de investigación | 51 |
| 3.2 Ámbito temporal y espacial..... | 51 |
| 3.3 Variables..... | 51 |
| 3.3.1 <i>Variable independiente</i> | 51 |
| 3.3.2 <i>Variable dependiente</i> | 51 |
| 3.4 Población y muestra | 52 |
| 3.5 Instrumentos..... | 53 |
| 3.5.1 <i>Recursos informáticos</i> | 53 |
| 3.5.2 <i>Equipos</i> | 54 |

| | |
|--|-----------|
| 3.5.3 <i>Materiales de escritorio</i> | 54 |
| 3.6 Procedimiento..... | 54 |
| 3.7 Análisis estadísticos | 57 |
| 3.8 Consideraciones éticas | 58 |
| IV. Resultados | 58 |
| A. Identificar los componentes químicos de ceras foliares epicuticulares de la Reserva del PEFI durante las estaciones verano e invierno, en la plataforma de GNPS | 58 |
| 4.1 Resultados de las redes moleculares de los principales componentes químicos en las ceras foliares epicuticulares del PEFI..... | 58 |
| 4.1.1 <i>Alchornea sidifolia</i> | 58 |
| 4.1.2 <i>Amaioua intermedia</i> | 58 |
| 4.1.3 <i>Eugenia excelsa</i> | 59 |
| 4.1.4 <i>Guarea macrophylla</i> | 59 |
| 4.1.5 <i>Miconia cabucu</i> | 59 |
| 4.1.6 <i>Solanum granuloso-leprosum</i> | 60 |
| B. Identificar los contaminantes atmosféricos a partir de una biblioteca de espectros de fragmentación de ceras foliares epicuticulares obtenidas de árboles de la Reserva del PEFI durante las estaciones verano e invierno, en la plataforma de GNPS. | 89 |
| 4.2 Resultados de las redes moleculares de los contaminantes presentes en las ceras foliares epicuticulares del PEFI..... | 89 |
| 4.2.1 <i>Ftalatos</i> | 89 |
| 4.2.2 <i>Compuestos orgánicos nitrogenados</i> | 89 |

| | |
|--|------------|
| C. Identificar los factores de estrés ambiental (meteorológicos y contaminantes atmosféricos) que inducen a cambios estacionales sobre el contenido de sus principales clases químicas de las ceras foliares epicuticulares, a partir de las identificaciones de la GNPS. | 90 |
| 4.3 Análisis descriptivo | 90 |
| 4.3.1 Estudio de valores faltantes (<i>missings</i>) | 93 |
| 4.3.2 Gráfica de cajas y bigotes iniciales..... | 94 |
| 4.4 Preprocesamiento | 99 |
| 4.5 Análisis de los datos..... | 101 |
| 4.5.1 Análisis univariante..... | 101 |
| 4.5.2 Análisis multivariante..... | 106 |
| V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS..... | 113 |
| A. Identificar los componentes químicos de ceras foliares epicuticulares de la Reserva del PEFI durante las estaciones verano e invierno, en la plataforma de GNPS..... | 113 |
| B. Identificar los contaminantes atmosféricos a partir de una biblioteca de espectros de fragmentación de ceras foliares epicuticulares obtenidas de árboles de la Reserva del PEFI durante las estaciones verano e invierno, en la plataforma de GNPS. | 114 |
| C. Identificar los factores de estrés ambiental (meteorológicos y contaminantes atmosféricos) que inducen a cambios estacionales sobre el contenido de sus principales clases químicas de las ceras foliares epicuticulares, a partir de las identificaciones de la GNPS. | 115 |
| VI. CONCLUSIONES | 122 |
| VII. RECOMENDACIONES..... | 123 |
| VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 124 |
| IX. ANEXOS | 136 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|-----|
| Tabla 1. Compuestos mayoritarios de las ceras epicuticulares | 36 |
| Tabla 2. Principales contaminantes atmosféricos | 43 |
| Tabla 3. Bases de datos espectrales en línea para la identificación | 47 |
| Tabla 4. Clasificación de especies arbóreas disponibles en la base de datos | 52 |
| Tabla 5. Estadísticos para cada clase química, separado por especies arbóreas..... | 90 |
| Tabla 6. Número de missings por clase química | 93 |
| Tabla 7. P-values obtenidos con la prueba ANOVA y ordenados según su nivel de significancia | 101 |
| Tabla 8. P-values obtenidos con la prueba ANOVA de las clases químicas entre las estaciones | 102 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Ubicación y estructura de la cutícula..... | 33 |
| Figura 2. Multifuncionalidad de la cutícula vegetal | 34 |
| Figura 3. Metabolismo secundario del carbono | 37 |
| Figura 4. Síntesis de novo de los ácidos grasos | 39 |
| Figura 5. Alargamiento de los ácidos grasos | 40 |
| Figura 6. Diagrama de la síntesis de las sustancias grasas de las ceras | 41 |
| Figura 7. Flujo de trabajo para el análisis de datos metabolómicos | 57 |
| Figura 8. Mapa de redes moleculares generada para <i>A. sidifolia</i> | 61 |
| Figura 9. Representación gráfica de la abundancia espectral de cada metabolito de la FM1, los cuales pertenecen a las clases de los acilos grasos (subclase: ácidos grasos), esteroides y terpenos (mono-, sesqui-, di-, triterpenos)..... | 62 |
| Figura 10. Representación gráfica de la abundancia espectral de cada metabolito perteneciente a la FM4, identificándose a la clase de hidrocarburos y sus subclases: alcanos y alquenos ... | 63 |
| Figura 11. Representación gráfica de la abundancia espectral de cada metabolito pertenecientes a la FM8 (A) y FM11 (B), identificándose al grupo químico de los bencenoides | 63 |
| Figura 12. Mapa de redes moleculares generada para <i>A. intermedia</i> | 64 |
| Figura 13. Representación gráfica de la abundancia espectral de cada metabolito de la FM1, los cuales pertenecen a las clases hidrocarburos (subclases: alcanos, alquenos, cicloalcanos y cicloalquenos), los acilos grasos (subclases: ácidos grasos, aldehídos grasos y alcoholes grasos), y compuestos de organooxígeno | 65 |
| Figura 14. Representación gráfica de la abundancia espectral de cada metabolito de la FM3, los cuales pertenecen principalmente a la clase de acilos grasos (subclases: ácidos grasos) | 66 |

| | |
|--|----|
| Figura 15.Representación gráfica de la abundancia espectral de cada metabolito de la FM4, los cuales pertenecen a la clase terpenos (subclases: sesqui-, diter- y triterpenos) y esteroides, principalmente..... | 67 |
| Figura 16.Representación gráfica de la abundancia espectral de cada metabolito de la FM7, los cuales pertenecen a la clase acilos grasos (subclases: ácidos grasos y ésteres de ácidos grasos) | 68 |
| Figura 17.Representación gráfica de la abundancia espectral de cada metabolito de la FM8, los cuales pertenecen a la clase acilos grasos (amida grasa) y ácidos carboximídicos | 68 |
| Figura 18.Representación gráfica de la abundancia espectral de cada metabolito de la FM13, los cuales pertenecen a la clase acilos grasos (ácidos grasos) | 68 |
| Figura 19.Representación gráfica de la abundancia espectral de cada metabolito de la FM29, los cuales pertenecen al grupo químico de los bencenoides | 69 |
| Figura 20.Representación gráfica de la abundancia espectral de cada metabolito de la FM31, los cuales pertenecen al grupo químico de los bencenoides y la clase benzofuranos..... | 69 |
| Figura 21.Mapa de redes moleculares generada para <i>E. excelsa</i> | 70 |
| Figura 22.Representación gráfica de la abundancia espectral de cada metabolito de la FM1, los cuales pertenecen a la clase de acilos grasos (subclases: ácidos grasos, aldehídos grasos, alcoholes grasos y esterres de ácidos grasos), hidrocarburos (subclases: alquenos, alcanos, cicloalquenos), compuestos de organooxígeno y compuestos de organonitrógeno | 71 |
| Figura 23.Representación gráfica de la abundancia espectral de cada metabolito de la FM2, los cuales pertenecen a la clase de acilos grasos (subclase:ácidos grasos), y compuestos de organooxígeno..... | 72 |

| | |
|---|----|
| Figura 24.Representación gráfica de la abundancia espectral de cada metabolito de la FM3, los cuales pertenecen a la clase hidrocarburos (subclases: alcanos, alquenos) y acilos grasos (subclases: ester de ácidos grasos)..... | 73 |
| Figura 25.Representación gráfica de la abundancia espectral de cada metabolito de la FM4, los cuales pertenecen a la clase de terpenos (subclase: triterpenos) y esteroides | 74 |
| Figura 26.Representación gráfica de la abundancia espectral de cada metabolito de la FM7, los cuales pertenecen a la clase hidrocarburos (subclase: alcano)..... | 74 |
| Figura 27.Representación gráfica de la abundancia espectral de cada metabolito de la FM8, los cuales pertenecen a la clase de acilos grasos (subclase: amidas grasas)..... | 75 |
| Figura 28.Representación gráfica de la abundancia espectral de cada metabolito pertenecientes a la FM23 (A) y FM29 (B), identificándose al grupo químico de los bencenoides | 75 |
| Figura 29.Mapa de redes moleculares generada para <i>G. macrophylla</i> | 76 |
| Figura 30.Representación gráfica de la abundancia espectral de cada metabolito de la FM1, los cuales pertenecen a las clases de los hidrocarburos (subclases: alcanos y alquenos), acilos grasos (subclase: ácidos grasos), terpenos (sesqui-, triterpenos) y esteroides..... | 77 |
| Figura 31.Representación gráfica de la abundancia espectral de cada metabolito perteneciente a la FM3, identificándose a la clase de hidrocarburos y sus subclases: alcanos y alquenos ... | 78 |
| Figura 32.Representación gráfica de la abundancia espectral de cada metabolito perteneciente a la FM5, identificándose a la clase de acilos grasos y su subclase: ésteres de ácidos grasos | 78 |
| Figura 33.Representación gráfica de la abundancia espectral de cada metabolito perteneciente a la FM10, identificándose a la clase de acilos grasos (subclases: alcoholes grasos y aldehídos grasos) e hidrocarburo..... | 79 |

| | |
|--|----|
| Figura 34.Representación gráfica de la abundancia espectral de cada metabolito pertenecientes a la FM12, identificándose al grupo químico de los bencenoides | 79 |
| Figura 35.Mapa de redes moleculares generada para <i>M. cabucu</i> | 80 |
| Figura 36.Representación gráfica de la abundancia espectral de cada metabolito de la FM3, los cuales pertenecen a las clases de los hidrocarburos (subclases: alcanos y alquenos), acilos grasos (subclases: aldehídos grasos, alcoholes grasos, ésteres de ácidos grasos y amidas grasas) | 81 |
| Figura 37.Representación gráfica de la abundancia espectral de cada metabolito de la FM4, los cuales pertenecen a la clase terpenos (subclases: sesqui-, diter- y triterpenos) y esteroides, principalmente..... | 82 |
| Figura 38.Representación gráfica de la abundancia espectral de cada metabolito perteneciente a la FM6, identificándose a la clase de acilos grasos y su subclase: ésteres de ácidos grasos | 83 |
| Figura 39.Representación gráfica de la abundancia espectral de cada metabolito perteneciente a la FM9, identificándose a la clase de acilos grasos y su subclase: ésteres de ácidos grasos | 83 |
| Figura 40.Representación gráfica de la abundancia espectral de cada metabolito pertenecientes a la FM22(A), FM30 (B) y FM37 (C), identificándose al grupo químico de los bencenoides | 83 |
| Figura 41.Mapa de redes moleculares generada para <i>S. granuloso-leprosum</i> | 84 |
| Figura 42.Representación gráfica de la abundancia espectral de cada metabolito de la FM1, los cuales pertenecen a la clase de acilos grasos y su subclase: ácidos grasos..... | 85 |
| Figura 43.Representación gráfica de la abundancia espectral de cada metabolito de la FM3, los cuales pertenecen a la clase de hidrocarburos (subclases: alcanos y alquenos), acilos grasos (subclases: alcoholes grasos, aldehídos grasos y amidas grasas) y compuestos de organooxígeno..... | 86 |

| | |
|---|-----|
| Figura 44.Representación gráfica de la abundancia espectral de cada metabolito de la FM4, los cuales pertenecen a la clase de hidrocarburos y sus subclases: alcanos y cicloalquenos | 64 |
| Figura 45.Representación gráfica de la abundancia espectral de cada metabolito de la FM5, los cuales pertenecen a la clase de hidrocarburos y sus subclases: alcanos y cicloalquenos | 87 |
| Figura 46.Representación gráfica de la abundancia espectral de cada metabolito de la FM17, los cuales pertenecen al grupo químico de los bencenoides y la clase benzofuranos..... | 89 |
| Figura 47.Cajas y bigotes de las clases químicas de las ceras foliares epicuticulares antes del preprocesamiento | 94 |
| Figura 48.Cajas y bigotes de las clases químicas de las ceras foliares epicuticulares antes del preprocesado | 98 |
| Figura 49.Cajas y bigotes del nuevo escalado de la clase de ésteres | 99 |
| Figura 50.Comparación de las gráficas de cajas y bigotes antes y después del preprocesamiento | 100 |
| Figura 51.Gráficos de caja y bigotes de las clases químicas más significativas después del preprocesamiento | 105 |
| Figura 52.Gráfico bidimensional del Análisis de Componente Principal (PCA) entre los contenidos de las clases químicas de las ceras foliares epicuticulares de las 6 especies colectadas durante las estaciones seca y lluviosa del PEFI, mediante un escalado de Pareto | 107 |
| Figura 53.Gráfico bidimensional del Análisis de Componente Principal (PCA) del contenido de las clases químicas de las ceras foliares epicuticulares de las 6 especies arbóreas y las condiciones ambientales durante la estación seca y lluviosa del PEFI, a través de un escalamiento de rango..... | 109 |

| | |
|---|-----|
| Figura 54. Gráfico bidimensional del Análisis de Componente Principal (PCA) entre las clases de compuestos químicos de las ceras foliares epicuticulares relacionadas con la estación seca y lluviosa del PEFI..... | 111 |
|---|-----|

ÍNDICE DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

| | |
|--------------------|--|
| \geq | Mayor o igual |
| ACCasa citosólica | Acetil-CoA carboxilasa citosólica |
| ACCCase plastidial | Acetil-CoA carboxilasa plastidial |
| Acetil-CoA | Acetil coenzima A |
| ACP | Proteína transportadora de acilo |
| BML-NMR | Birmingham Metabolite-Nuclear Magnetic Resonance |
| BMRB | Biological Magnetic Resonance |
| Cd | Cadmio |
| CETESB | Companhia Ambiental do Estado de São Paulo |
| CG | Cromatografía de Gases |
| CG/EM | Cromatografía de gases/Espectrometría de Masas |
| CO | Monóxido de carbono |
| CO ₂ | Dióxido de carbono |
| CoA | Coenzima A |
| CSV | Comma Separated Values |
| Cu | Cobre |
| Da | Dalton |
| ECR | Enoil-CoA reductasa |
| EM/EM | Espectrometría de masas en tándem |

| | |
|----------------|---|
| EPA | Agencia de Protección Ambiental Americana |
| FAE | Elongasas de ácidos grasos |
| FAS II | Ácido graso sintasa tipo II |
| FATB | Acil graso-ACP tioesterasa B |
| GMD | Golm Metabolome Database |
| GNPS | Global Natural Product Social Molecular Networking |
| HCD | β -cetoacil-CoA dehidratasa |
| HMDB | Human Metabolome Database |
| HPAs | Hydrocarbons polycyclic aromatic |
| HSQC | Heteronuclear Single Quantum Coherence |
| JCAMP-DX | Joint Committee on Atomic and Molecular Physical data extension |
| KAS I, II, III | Cetoacil sintasa I, II e III |
| KCR | β -cetoacil-CoA reductasa |
| KCS | Cetoacil-CoA sintasa |
| LACS | Larga cadena de acil-CoA sintasa |
| malonil-CoA | Malonil coenzima A |
| MCATasa | Malonil-CoA-ACP transilasa |
| Metlin | Metabolite Link |
| MHA1 | Midchain alkane hidroxylase |
| MMCD | Madison-Qingdao Metabolomics Consortium Database |

| | |
|-----------------|---|
| Mn | Manganeso |
| MSI-XML | Microsoft Software Installer-Extensible Markup Language |
| NAPROC-13 | Natural products carbono 13 |
| Ni | Niquel |
| NIH | National Institutes of Health |
| NIST | National Institute of Standards and Technology |
| NMR | Nuclear magnetic resonance |
| NMR-STAR | Nuclear magnetic resonance-Self-Defining Text Archive and Retrieval |
| NO | Monóxido de nitrógeno |
| NO ₂ | Dióxido de nitrógeno |
| NO _X | Óxidos de nitrógeno |
| O ₃ | Ozono |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| PEFI | Parque Estadual das Fontes do Ipiranga |
| Reductasa 1 | 3-cetoacil-ACP reductasa |
| Reductasa 2 | enoil-ACP reductasa |
| ReSpect | RIKEN tandem mass spectral database |
| RMN | Resonancia magnética nuclear |
| S | Azufre |
| SDBS | Spectral Database for Organic Compounds |

| | |
|-----------------|---|
| SE | Sureste |
| SO ₂ | Dióxido de azufre |
| TIC | Total Ion Chromatogram |
| USB | Universal Serial Bus |
| UV | Ultravioleta |
| WinSCP | Windows Secure Copy |
| XCMS | Various forms (X) of chromatography mass spectrometry |
| Zn | Zinc |

Resumen

El Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI) es la tercera mayor reserva de la selva atlántica ubicada en el Municipio de São Paulo que se expone a los contaminantes antropogénicos y a las condiciones meteorológicas de cada estación, logrando manifestar sus efectos nocivos medibles en ciertos organismos biológicos, como las plantas. En vista que la cera epicuticular es la capa más externa de las hojas, se buscó caracterizar los posibles componentes químicos de las ceras foliares epicuticulares de seis especies arbóreas del PEFI a través de la GNPS para identificar posibles contaminantes atmosféricos y efectos de los estresores ambientales sobre el contenido de las clases químicas durante las estaciones seca y lluviosa del 2019. Para abordar este objetivo, se utilizó la Red Molecular de la GNPS para cada especie, la elaboración de una matriz global de datos y los análisis estadísticos metabolómicos (univariantes y multivariantes) en función a las clases químicas. La GNPS anotó 552 posibles metabolitos que se dividieron principalmente en 10 clases químicas y el grupo de los bencenoides como contaminante prevalente en las muestras de la estación lluviosa. Por otro lado, los análisis univariantes permitieron indicar que existían variaciones significativas entre las muestras de cada estación, que fueron corroboradas y mejor explicadas con los análisis multivariantes, porque evidenciaron un mayor contenido y número de clases químicas cíclicas y alifáticas en las muestras de la estación lluviosa, debido a la posible erosión que generan las altas concentraciones de contaminantes atmosféricos sobre las ceras de la estación seca.

Palabras claves: ceras foliares epicuticulares, caracterización química, GNPS

Abstract

The Fontes do Ipiranga State Park (PEFI) is the third largest Atlantic Forest reserve located in the Municipality of São Paulo, which is exposed to anthropogenic pollutants and to the seasonality of the weather conditions, managing to manifest its measurable harmful effects on certain biological organisms, such as plants. Given that the epicuticular wax is the outermost layer of the leaves, we sought to characterize the possible chemical components of the epicuticular foliar waxes of six tree species from PEFI using the GNPS database to annotated the possible atmospheric contaminants and effects of environmental stressors on the content of chemical classes during the dry and rainy seasons of 2019. To address this objective, it was developed for each species, a global data matrix and metabolomic statistical analyzes (univariate and multivariate) based on the chemical classes, using Molecular networking of the GNPS. Over 552 possible metabolites were annotated using GNPS being mainly divided into 10 chemical classes and the benzenoids group as the prevalent contaminant in the rainy season samples. On the other hand, the univariate analyzes allowed us to indicate that there were significant variations between the samples of each season, which were corroborated and better explained with the multivariate analyses, since they showed a greater content and number of cyclic and aliphatic chemical classes in the samples of the station. rainy season, due to the possible erosion generated by the high concentrations of atmospheric pollutants on the dry season waxes.

Keywords: epicuticular foliar waxes, chemical characterization, GNPS

I. INTRODUCCIÓN

En el siglo XX, los avances industriales junto con el crecimiento urbano han llevado a la pérdida de diversidad biológica debido a la fragmentación del hábitat y la contaminación ambiental (Domingos et al., 2015; Mosadegh et al., 2019). El Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI), ubicado en el sureste de Brasil, se considera como una de las reservas nativas más grandes de São Paulo. Sin embargo, esta región, debido a las actividades humanas como la industrialización y la agricultura, emite muchas sustancias xenobióticas que desencadenan problemas de fragmentación y contaminación atmosférica (Domingos et al., 2003; Emberson et al., 2001; Freitas et al., 2010; Groeneveld et al., 2009; Lira et al., 2012; Ribeiro et al., 2009; Visnadi, 2015; Moura, 2013). Inclusive, estas sustancias contaminantes se ha visto que se transportan a largas distancias durante las condiciones meteorológicas de la estación lluviosa, lo que amplifica los problemas ambientales en otras regiones a largo plazo (Engela, 2016).

La protección de la vegetación en los remanentes de bosque urbano es crucial para mejorar la calidad del aire, ya que actúa como un filtro natural y reduce la dispersión de contaminantes, esta capacidad ha permitido que las plantas sean empleadas como organismos que reflejan los efectos nocivos del medio ambiente (Carneiro & Takayanagui, 2009; Ferretti et al., 2010; Janhäll, 2015; Domingos et al. 2015). En particular, se han estudiado las lesiones foliares visibles en especies vegetales como indicadores de la acumulación de sustancias xenobióticas, como metales pesados o hidrocarburos aromáticos policíclicos (Domingos et al., 2015). Sin embargo, también se ha reconocido la importancia de estudiar el perfil químico de las ceras foliares epicuticulares, ya que su composición varía según la ubicación geográfica, las fuentes de emisión y las condiciones meteorológicas.

El análisis de perfiles químicos de ceras foliares epicuticulares se ha vuelto crucial, y se utilizan herramientas informáticas, como la plataforma GNPS, para anotar y correlacionar los compuestos químicos presentes en las muestras. Esta plataforma permite analizar conjuntos enormes de espectros de fragmentación, obtenidos por espectrometría, y compararlos con una biblioteca para elaborar anotaciones y redes moleculares (Wang et al., 2016).

Debido a esto, detallar los efectos del estrés ambiental (meteorológicos y contaminantes atmosféricos) en los remantes de bosque del Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, a través de los perfiles químicos de las ceras foliares epicuticulares, permitirá ejecutar futuros planos de conservación y protección ambiental en este lugar.

1.1 Descripción y formulación del Problema

Con los avances industriales ocurridos principalmente en el siglo XX, la expansión del uso de la tierra para el desarrollo industrial y urbanístico en favor a los intereses humanos ha sido considerada una de las principales razones en la pérdida de la diversidad biológica de los ecosistemas terrestres. Esta pérdida se origina debido a la fragmentación del ecosistema y la contaminación ambiental por diversas sustancias xenobióticas (Domingos et al., 2015; Mosadegh et al., 2019).

El Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI), se considera como la tercera mayor reserva de mata nativa del Municipio de São Paulo y está ubicado en la región Sureste del Brasil, siendo una de las regiones económica y socialmente más desarrollada. Sin embargo, en el SE-Brasil presenta una profunda fragmentación del dominio de la Mata Atlántica y contaminación ambiental, debido a que se encuentra expuesto a sustancias xenobióticas emitidas a la atmósfera por una variedad de actividades antrópicas, tales como conglomerados metropolitanos, centros industriales y extensas tierras agrícolas (Domingos et al., 2003; Emberson et al., 2001; Freitas et

al., 2010; Groeneveld et al., 2009; Lira et al., 2012; Ribeiro et al., 2009; Visnadi, 2015; Moura, 2013). Asimismo, estos contaminantes atmosféricos logran concentrarse con mayor y menor intensidad durante la estación seca y lluviosa, respectivamente; lo cual permite identificar que, durante la estación lluviosa, los contaminantes puedan ser transportados a grandes distancias antes de llegar al nivel del suelo, ampliando estos problemas ambientales hacia otras regiones a largo plazo (Engela, 2016).

Las alteraciones de la calidad atmosférica pueden ser detectadas por ciertos organismos vivos, que se conocen como bioindicadores, ya que estos logran manifestar los efectos nocivos medibles (denominados como biomarcadores) dentro de un estudio de biomonitoreo (Carneiro & Takayanagui, 2009; Ferretti et al., 2010). Hasta este momento se han utilizado diversas especies vegetales como bioindicadores, en las cuales se ha encontrado a las lesiones foliares visibles como un biomarcador estándar, esto a partir de estudios de microscopía y acumulación de sustancias xenobióticas atmosféricas, tales como metales pesados o hidrocarburos aromáticos policíclicos (HPAs) (Domingos et al., 2015). Asimismo, estos estudios consideran importante la composición específica de las sustancias xenobióticas atmosféricas, ya que varían de acuerdo con la ubicación geográfica, fuentes de emisión y estacionalidad (condiciones meteorológicas).

En la actualidad, muchas investigaciones se han centrado en estudiar la variación morfológica de los cristales presentes en ceras foliares epicuticulares en función a la exposición a sustancias xenobióticas atmosféricas y las condiciones meteorológicas, descuidando el estudio de los efectos de estos factores sobre el perfil químico de las ceras foliares epicuticulares. Inclusive, las últimas investigaciones son más holísticas, ya que se identifican marcadores morfológicos, químicos y bioquímicos, logrando estimar la salud y el impacto ambiental de ecosistemas fragmentados como la Reserva del PEFI (Domingos et al., 2015). Es más, debido a que el perfil

químico de muchas estructuras vegetales, tales como las ceras, se están determinando por técnicas cromatográficas modernas que originan una gran cantidad de datos, se ha vuelto muy importante el uso de herramientas informáticas que permitan el reconocimiento y la desreplicación de derivados químicos que pueden relacionarse estructuralmente a partir de patrones de fragmentación, como los obtenidos en una cromatografía de gases acoplada a espectrómetro de masas (CG/EM) (Raheem et al., 2019).

1.1.1 Problema general

¿De qué manera los espectros de fragmentación de los constituyentes de las ceras foliares epicuticulares de árboles de la Reserva del PEFI podrían ser caracterizadas químicamente a través de la plataforma GNPS, a fin de identificar contaminantes e indicar los efectos de los estresores ambientales (condiciones meteorológicas y contaminantes atmosféricos) sobre las principales clases químicas de estas ceras, durante la estación seca y lluviosa del año 2019?

1.1.2 Problemas específicos

¿Cómo los espectros de fragmentación de ceras foliares epicuticulares podrían ser útiles para la identificación de componentes químicos presentes en la Reserva del PEFI, al aplicar GNPS?

¿Cómo la caracterización química de las ceras foliares epicuticulares colaboraría en la identificación de los efectos de estrés ambiental durante las estaciones seca y lluviosa del PEFI, a partir de las anotaciones de la GNPS?

1.2 Antecedentes

A fin de evaluar la influencia de los factores de estrés ambiental en un bosque urbano, es importante primero investigar la deposición del material particulado extraño sobre la superficie foliar y ceras de las diferentes especies arbóreas, tal como lo realizado por [Dzierżanowski et al.](#)

(2011), quienes a través de análisis gravimétricos en cuatro especies de árboles, tres especies de arbustos y una especie trepadora, mostraron que las fracciones de diferentes tamaños de partículas difiere entre y dentro de las especies, así como entre las superficies de las hojas y las ceras, siendo esta última estructura dependiente de la composición química, estructura de la capa de cera epicuticular y la cantidad presente de cera, tal como lo informaron [Nakazato et al. \(2018\)](#), al detallar que la composición de la cera y la morfología de la hoja favorecen la absorción del material particulado de HPAs.

En los últimos años se han publicado trabajos como el de [Domingos et al. \(2015\)](#), quienes determinaron por CG/EM los componentes químicos de las ceras, en tres especies de árboles, que fueron seleccionados como bioindicadores potenciales para la evaluación futura de los efectos de la contaminación en la Mata Atlántica altamente diversa en el sureste de Brasil. Ellos encontraron que la estructura de la superficie de la hoja y/o la composición de cera epicuticular señalaban propiedades acumuladoras en *Croton floribundus* y *Piptadenia gonoacantha*. La especie *C. floribundus* fue indicado como un candidato para evaluar la acumulación potencial de Cu, Cd, Mn, Ni, S y Zn. *P. gonoacantha* fue señalado como un candidato para monitorear HPAs. Así mismo, indicaron que la composición de la cera epicuticular y la estructura de la superficie foliar fueron más relevantes para definir las propiedades de bioacumulación de las especies arbóreas sobre los datos hallados mediante la medición de la dimensión del área foliar o el área específica, como también lo comentaron [Bakker et al. \(2000\)](#), [Jouraeva et al. \(2002\)](#) y [Dias et al. \(2016\)](#), sobre la acumulación de HPAs.

Utilizando el análisis de espectrometría de masas (EM) y aplicando la plataforma GNPS, [Bouslimani et al. \(2016\)](#), estudiaron como el medio externo influye en la composición química de la capa más externa de la piel; permitiendo predecir el tipo de producto de belleza que usa el

individuo, la comida que ingiere, los medicamentos que toma, o los lugares donde ha estado y con ello medir las exposiciones ambientales, como la exposición a plastificantes y otros contaminantes; por lo que este estudio demuestra que la aplicación de la plataforma GNPS y su biblioteca de patrones y fragmentos moleculares, permiten analizar rastros químicos para comprender temas complejos como el que se ha buscado analizar en esta tesis.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Caracterizar los componentes químicos de las ceras foliares epicuticulares de la Reserva del PEFI a través de la plataforma GNPS, a fin de identificar contaminantes y evidenciar los efectos de los estresores ambientales sobre la composición de sus principales clases químicas, durante la estación seca y lluviosa del año 2019.

1.3.2 Objetivos específicos

Identificar la composición química de ceras foliares epicuticulares de árboles de la Reserva del PEFI durante las estaciones verano e invierno, utilizando la plataforma de GNPS.

Identificar los contaminantes atmosféricos, como HPAs, a partir de una biblioteca de espectros de fragmentación de ceras foliares epicuticulares obtenidas de la Reserva del PEFI durante las estaciones verano e invierno, en la plataforma de GNPS.

Identificar los factores de estrés ambiental (meteorológicos y contaminantes atmosféricos) que inducen a cambios estacionales sobre el contenido de sus principales clases químicas de las ceras foliares epicuticulares, a partir de las identificaciones de la GNPS.

1.4 Justificación

La contaminación atmosférica originada principalmente por la actividad humana (Domingos et al., 2015), tiene un gran impacto en los ecosistemas, generando ambientes

perturbados o remanentes de bosques tropicales, donde la mayoría de las especies raras, nativas o endémicas se ven restringidas a estos fragmentos y expuestas al peligro de extinción (Farah et al., 2017). Además, esto implica tener herramientas de biomonitoreo que permitan comprender el complejo funcionamiento de las comunidades vegetales frente a las frecuencias de los cambios ambientales (Lavell et al., 2012) y la velocidad que estos cambios influyen en los ecosistemas restantes (Feeley et al., 2011; Kondrat et al., 2014). Esta eliminación de especies sensibles, disminuyen la biodiversidad observada en los bosques, como consecuencia de los efectos causados por contaminantes atmosféricos (Dias, 2015).

Respecto al enfoque del área de salud frente a los efectos de la contaminación ambiental, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha establecido una relación directa entre la exposición a altas concentraciones de partículas gruesas y finas con los niveles de desenlaces epidemiológicos (mortalidad y morbilidad) de la población mundial, lo cual ha permitido estimar que dicha exposición pueda causar hasta 3,7 millones de muertes prematuras en el mundo (OMS, 2014). Inclusive, las partículas finas y ultrafinas, aun representando una menor parte de la masa total del material particulado, presentan considerables efectos sobre la salud humana (Li et al., 2017). Debido a ello, la protección de la vegetación de remanentes de bosque en zonas urbanizadas ha permitido mejorar la calidad del aire, ya que influye en la dispersión de los contaminantes y/o actúa como un filtro natural al impedir el transporte de estos contaminantes por el aire, mediante sus hojas, ramas y ramillas (Janhäll, 2015). Por el contrario, la mayoría de las partículas gruesas son eliminadas por las precipitaciones, mientras que los depósitos en la cera de la hoja se eliminan muy difícilmente (Dzierżanowski et al., 2011). Por consiguiente, la cera de la hoja es un óptimo biomarcador para el biomonitoreo de ambientes impactados con contaminantes atmosféricos, ratificando así el sentido lógico y relevante del por qué se debe realizar análisis de datos para la

elaboración de perfiles químicos de ceras foliares epicuticulares y comprender como el contenido químico de estas ceras influyen en la acumulación de sustancias xenobióticas atmosféricas.

La protección de la biodiversidad y especialmente la que se encuentra en los remanentes de bosque, no solo poseen una importancia ecológica o ambiental, sino también una importancia farmacológica. Es así como para revalorizar la importancia del cuidado de la biodiversidad que alberga la naturaleza, existen investigaciones acerca de la bioprospección de metabolitos con valores medicinales a partir de perfiles químicos en organismos biológicos, aplicándose desde grupos vegetales muy basales como los briófitos hasta grupos de plantas superiores tales como las angiospermas. Inclusive, la detección de metabolitos medicinales ha mostrado hasta la fecha un avance promisorio en la aplicación de estos frente a mecanismos de resistencias bacterianas, micóticas y víricas (Ayaz et al., 2019).

Además, el estudio de perfiles químicos y de metabolitos han servido como una herramienta para el biomonitoreo de ambientes impactados con sustancias xenobióticas suspendidas en el aire, tal como lo demuestra el trabajo de Domingos et al. (2015), a partir de análisis de marcadores químicos en ceras epicuticulares mediante CG/EM.

A la fecha, las investigaciones han apuntado en realizar estudios metabolómicos para un mejor esclarecimiento del perfil químico de componentes biológicos mediante la técnica de espectrometría de masas (EM), lo cual origina una gran cantidad de espectros de fragmentación (Raheem et al., 2019), siendo su análisis muy complicado porque la búsqueda es manual, es decir, compuesto por compuesto. Sin embargo, en el 2014 apareció la plataforma libre GNPS (<https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/static/gnps-splash.jsp>), la cual permite analizar conjuntos de datos de EM y compararlo con todos los datos disponibles públicamente en una sola vez. Hasta el momento, se han importado más de 221000 espectros de EM/EM y están puestos a disposición

para ser analizados en línea. La confiabilidad de la plataforma GNPS es considerada alta por sus usuarios, ya que les permite realizar funciones de desreplicación para ver el grado de similitud entre los espectros de fragmentación de un trabajo con respecto a la biblioteca de la GNPS, permitiendo así la identificación de componentes químicos (Wang et al., 2016).

GNPS cuenta con los análisis de redes moleculares, favoreciendo la visualización y correlación espectral que puede detectar conjuntos de espectros de moléculas relacionadas (nodos). Inclusive, los nodos pueden complementarse con metadatos, que incluyen coincidencias de desreplicación u otra información agregada por el usuario (abundancia, origen del producto, la actividad bioquímica o hidrofobicidad), que pueden reflejarse en el color y tamaño del nodo (Wang et al., 2016).

Por lo tanto, esta tesis buscó poder aplicar la plataforma GNPS en el análisis de datos de espectros de fragmentación EM de ceras foliares epicuticulares de árboles expuestas a contaminantes atmosféricos, para la elaboración de perfiles químicos y la posterior comprensión de las relaciones químicas de las ceras foliares epicuticulares y factores de estrés ambiental (contaminantes atmosféricos y condiciones meteorológicas), afín de garantizar la protección de la biodiversidad y la salud ambiental en los remanentes de bosque de la Reserva del PEFI.

1.5 Hipótesis

H_a : La aplicación de la GNPS facilita a la caracterización de los constituyentes de las ceras foliares epicuticulares en la Reserva del PEFI, permitiendo identificar posibles contaminantes y evidenciar los efectos de los estresores ambientales sobre la composición de sus principales clases químicas, durante la estación seca y lluviosa del año 2019.

H_0 : La aplicación de la GNPS dificulta en la caracterización de los constituyentes químicos de las ceras foliares epicuticulares en la Reserva del PEFI, impidiendo identificar posibles

contaminantes y no evidencia los efectos de los estresores ambientales sobre la composición de sus principales clases químicas, durante la estación seca y lluviosa del año 2019.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Cutícula vegetal

La cutícula es una membrana altamente hidrofóbica que está presente en todas las embriofitas, desde los grupos más basales (briófitos) hasta los grupos más recientes (poliesporangiofitas) (Deustua, 2019 & Roma, 2018).

2.1.1 Localización

En las embriofitas más recientes la cutícula se encuentra sobre las células epidérmicas de las partes aéreas de todos los tejidos con crecimiento primario, tales como las hojas (excepto en estomas), flores, frutos y tallos (Roma, 2018 & Tafolla-Arellano et al., 2013).

2.1.2 Estructura

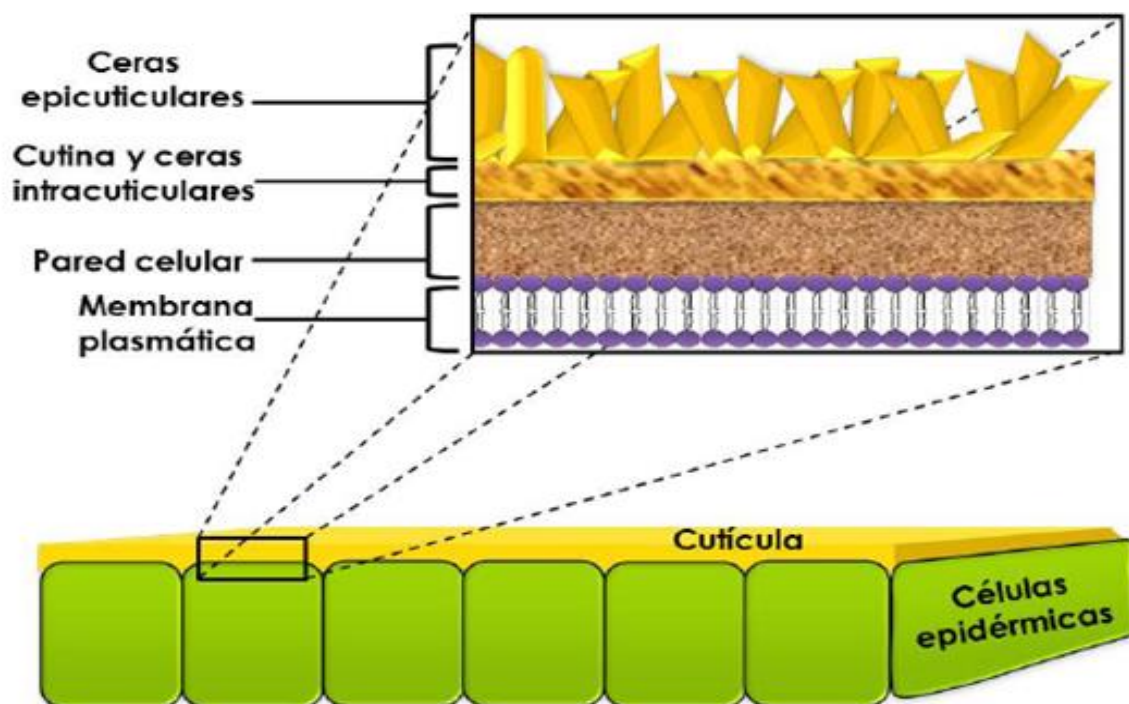
Desde un enfoque estructural (figura 1), la hoja está compuesta por una cubierta superior de ceras epicuticulares, seguida por otra capa inferior formada por cutina y ceras mezcladas con sustancias de la pared celular, pectinas, celulosa y otros carbohidratos, los cuales constituyen la capa cuticular (Tafolla-Arellano et al., 2013). Roma (2018) reporta a la cutícula como un componente estratificado en 3 partes:

- 1) La parte más externa a la epidermis: formada solo por ceras, denominadas ceras epicuticulares, se caracterizan por poseer diversas morfologías.
- 2) Cámara intermedia (debajo de las ceras epicuticulares): segunda capa compuesta por cutina embebida en cera, denominada como cutícula propiamente dicha.
- 3) Cámara cuticular (muy próxima a la pared celular): es una espesa cámara, formada por cutina, cera y muchos polisacáridos, encontrándose muy asociada a la cámara de pectina (localizada entre la pared celular y la cutícula).

Finalmente, las ceras encontradas en la cámara intermedia y la cámara cuticular pueden ser denominadas ambas como las ceras intracuticulares.

Figura 1

Ubicación y estructura de la cutícula vegetal.



Nota. Capas estructurales de la cutícula vegetal. Fuente [Tafolla-Arellano et al. \(2013\)](#).

2.1.3 Función

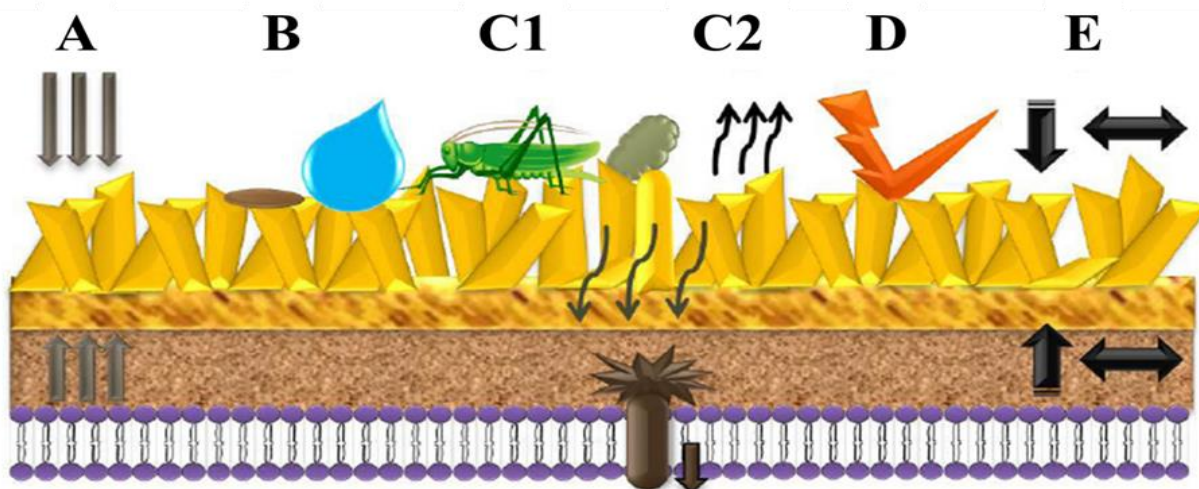
[Tafolla-Arellano et al. \(2013\)](#), mencionan que a pesar de que la cutícula es proporcionalmente minoritaria en el total de la masa de hojas y frutos, cumple funciones cruciales en la sobrevivencia de las plantas (figura 2), debido a sus propiedades físicoquímicas, mecánicas y morfológicas. Las funciones se describen a continuación:

- a) Reduce la pérdida de agua y difusión de gases.

- b) Induce desprendimiento de gotas de agua y partículas de polvo, además de esporas, con el propósito de mantener limpia y seca la superficie de la planta o del fruto (auto limpieza foliar).
- c) Debido a sus propiedades anti-adhesivas, influye en las interacciones planta-insecto y ayuda a evitar la proliferación de microbios patógenos, ya que cuenta con la capacidad de reconocimiento de señales de patógenos e insectos.
- d) Involucrada en un papel termorregulador dentro de las interacciones de plantas-ambiente y reduce los daños por la insolación excesiva de radiación UV.
- e) Funciona como soporte mecánico y participa de manera indirecta en la correcta formación de los órganos en las primeras fases de desarrollo de la planta, impidiendo la adhesión incontrolada de las células epidérmicas de los órganos en formación.

Figura 2

Multifuncionalidad de la cutícula vegetal.



Nota. A) Reducción de agua y fusión de gases. B) Evita acumulación de agua y polvo. C1) Participa en las interacciones planta-insecto. C2) Participa en la activación de genes específicos.

D) controla los cambios de temperatura. E) Provee soporte mecánico. Fuente: [Tafolla-Arellano et al. \(2013\)](#).

2.1.4 Componentes químicos

La cutícula está compuesta por dos componentes. Uno de ellos es la cutina, un biopolímero formado a partir de ácidos grasos hidroxilados o epoxidados a media cadena de extensiones C16 y C18 inter-enlazados mediante grupos éster y glicerol. El otro componente son las ceras, las cuales se encuentran sobre (ceras epicuticulares) y en la cutícula (ceras intracuticulares). Las ceras epicuticulares son una mezcla de compuestos altamente lipofílicos de cadenas alifáticas muy largas ([Deustua, 2019](#)).

2.2 Ceras vegetales

Según el concepto químico, las ceras son ésteres de ácidos grasos y alcoholes primarios de cadenas largas, lo cual le confiere un carácter hidrofóbico y de escasa reactividad ([Deustua, 2019](#) & [Tafolla-Arellano et al., 2013](#)).

2.2.1 Composición química de las ceras cuticulares

Están formadas en su mayoría por diversas sustancias hidrofóbicas, que son extraídas en solventes orgánicos (hexano, diclorometano y cloroformo). Estas sustancias pertenecen a diferentes clases que pueden dividirse en dos grupos, una que contiene muchos ácidos grasos de cadena larga y otra que contiene diversas sustancias cíclicas ([Roma, 2018](#)). Normalmente, estos componentes constituyen entre 20% y 60% de la masa de la cutícula ([Deustua, 2019](#)).

Estudios en *Arabidopsis thaliana* han concluido que la mayor parte de las ceras está constituida por alcanos y sus derivados provenientes de las rutas de síntesis de alcanos que llegan a formar el 70-80% de las ceras totales ([Deustua, 2019](#)).

2.2.1.1 Composición química de las ceras epicuticulares

Los compuestos principales de las ceras epicuticulares son ésteres de ácidos grasos, alcanos, alquenos, alcoholes de cadenas largas y compuestos cíclicos como flavonoides y terpenoides.

Tabla 1

Compuestos mayoritarios de las ceras epicuticulares

| Compuesto | N° Carbono |
|-----------------------------------|---|
| Alcanos lineales saturados | C21-C35 |
| Alcoholes primarios | C22-C40 |
| Ácidos grasos | C14-C18 y C20-C24 |
| Aldehídos | C24-C36 |
| Alcoholes secundarios | C21-C35 |
| Cetonas | C21-C35 |
| β-dicetonas | C22-C36 |
| ésteres n-alquilo | C36-C60 y con hidroxilaciones en media cadena |

Nota. Recuperado y modificado de [Deustua \(2019\)](#).

2.2.1.2 Composición química de las ceras intracuticulares

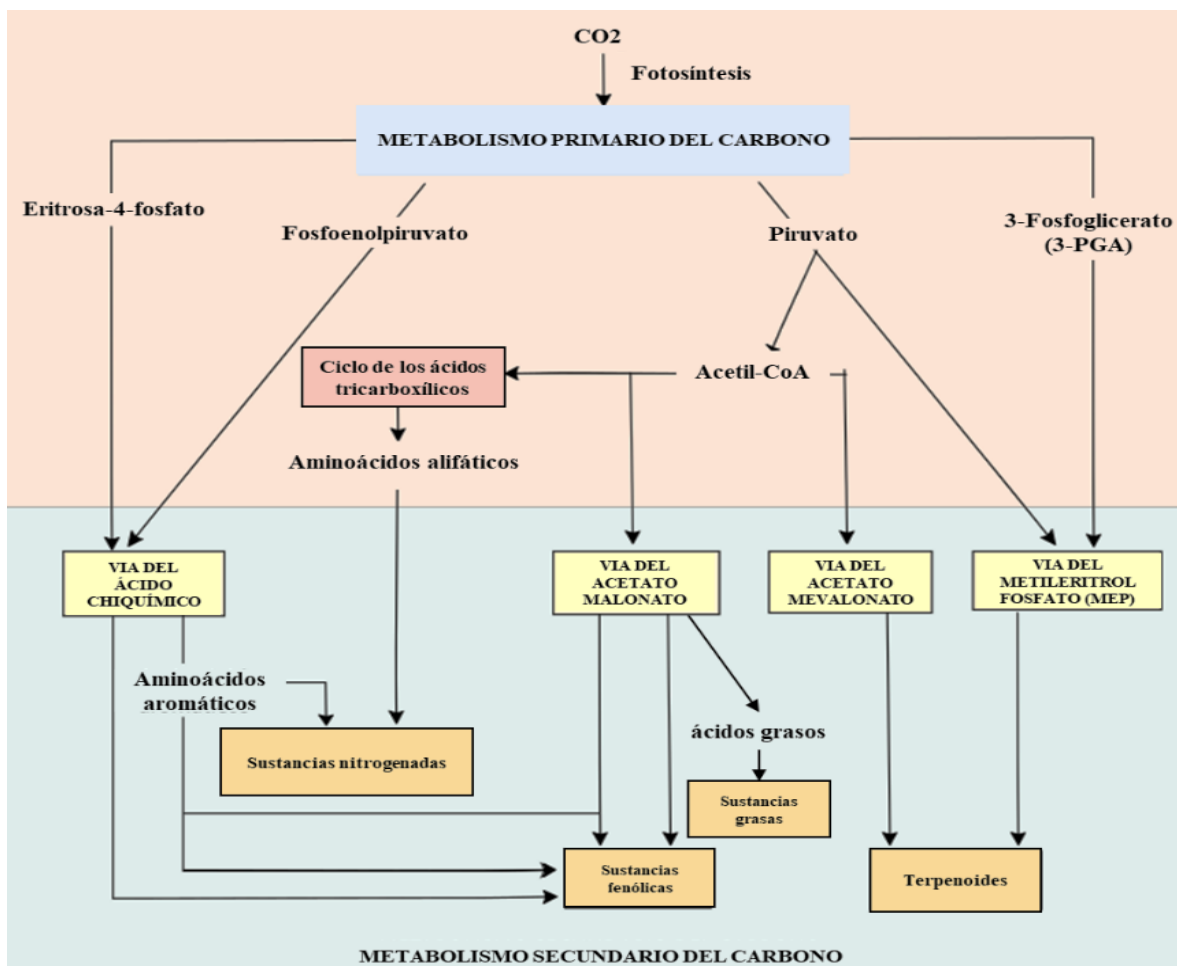
Los compuestos cíclicos contenidos en las ceras son ácidos triterpenoides pentacíclicos, alcoholes triterpenos, cetonas triterpénicas, ésteres triterpenos, flavonoides, tocoferoles y glicósidos ([Deustua, 2019](#)). Además, presenta ácidos grasos de cadena corta en las intracuticulares ([Tafolla-Arellano et al., 2013](#)).

2.2.2 Biosíntesis de ceras

Los organismos fotosintéticos, a través de la fijación de carbono atmosférico, se caracterizan por sintetizar moléculas precursoras para diversas reacciones, lo cuales son denominados metabolitos vegetales (dos Santos, 2020). Los metabolitos vegetales se clasifican en dos grandes grupos: los metabolitos primarios, que son producidos en el metabolismo primario del carbono; y los metabolitos secundarios, que son producidos por algunas rutas metabólicas que tienen como precursores a subproductos derivados del metabolismo primario del carbono, denominado metabolismo especializado o metabolismo secundario del carbono (dos Santos, 2020; Taiz & Zeiger, 2006) (figura 3).

Figura 3

Metabolismo secundario del carbono.



Nota. Esquema general-simplificado de la interface entre el metabolismo primario y las vías de síntesis de los metabolitos secundarios. Fuente: [Taiz & Zeiger \(2006\)](#).

En plantas, los metabolitos secundarios presentan una distribución heterogénea y pueden agruparse en 4 grandes grupos: terpenos, productos nitrogenados, sustancias fenólicas y moléculas grasas de cadena larga, las cuales se incluyen las sustancias grasas de las ceras y los monómeros de la cutina ([dos Santos, 2020](#)).

La ruta biosintética de la cera vegetal aún no es clara, por ello se han propuesto diversas hipótesis sobre la biosíntesis de los componentes cuticulares y sus mecanismos de transporte. Sin embargo, estudios bioquímicos y moleculares aplicados en *Arabidopsis thaliana*, han permitido una comprensión más detallada acerca de la biosíntesis y transporte de las ceras vegetales ([Deustua, 2019 & Tafolla-Arellano et al., 2013](#)).

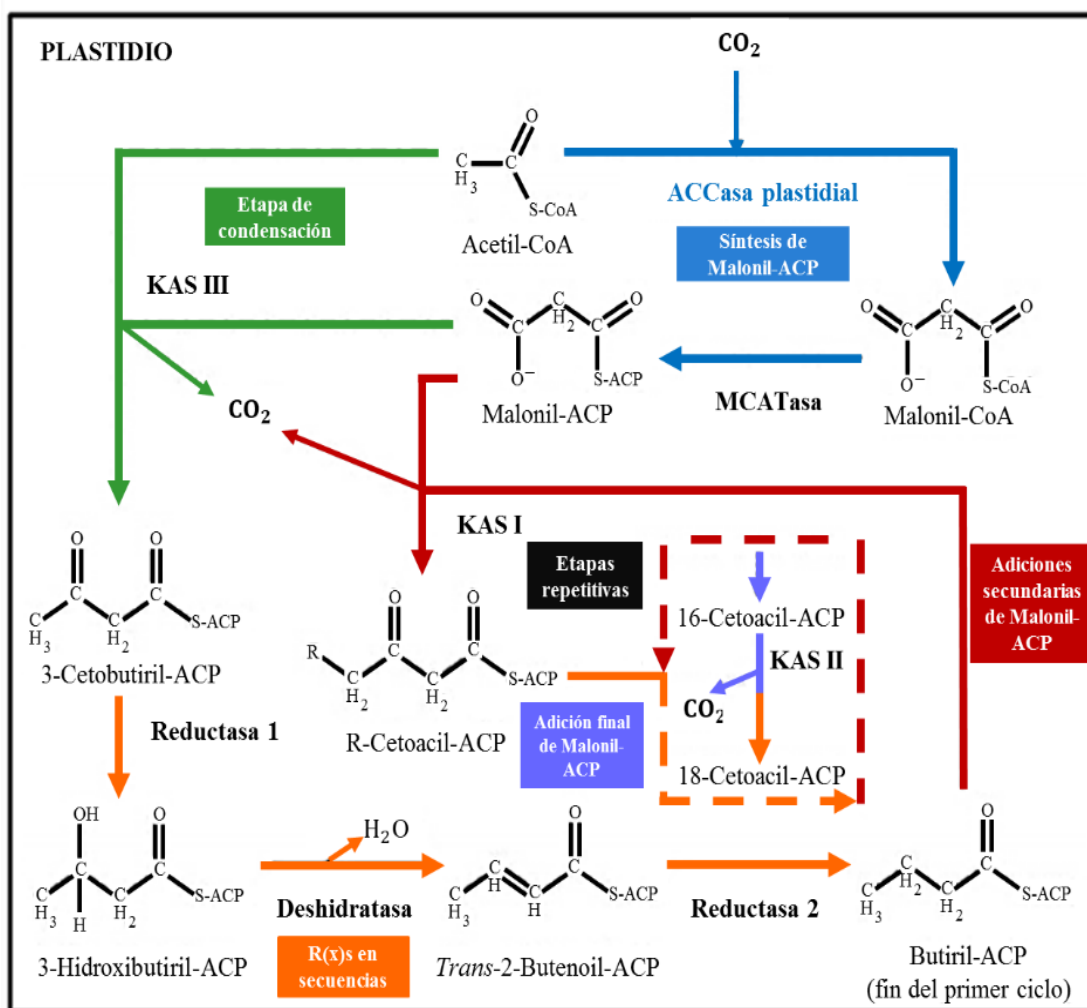
En general, las ceras son sintetizadas en las células epidérmicas de las plantas mediante la adición de bloques de dos carbonos de acetil-coenzima A (acetil-CoA) para formar cadenas alifáticas de extensiones entre 24 y 34 carbonos ([Deustua, 2019](#)). Esto ocurre en 3 etapas distintas: síntesis *de novo* de ácidos grasos, elongación de los ácidos grasos y transporte de monómeros hacia el exterior de la pared celular ([Tafolla-Arellano et al., 2013](#)).

En la primera etapa, la síntesis *de novo* (figura 4) consiste en la producción de ácidos grasos C16 y C18 en el estroma de los plastidios y es coordinada por un complejo enzimático denominado FAS II (ácido graso sintasa tipo II) y por una enzima inicial denominada de ACCasa plastidial (plastidial acetil-CoA carboxilasa) ([Roma, 2018; dos Santos, 2020](#)). El cofactor ACP (proteína transportadora de acilo) también es esencial para esta ruta y puede considerarse como parte de FAS II y es responsable de "retener" las sustancias grasas que se sintetizan a través del enlace tiol presente en el átomo de azufre ([Roma, 2018](#)). Los ácidos grasos C16 y C18 son parte de la

lipogénesis general de la planta y son moléculas intermediarias principales en todas las clases de lípidos esenciales para la planta (Deustua, 2019).

Figura 4

Síntesis de novo de los ácidos grasos.



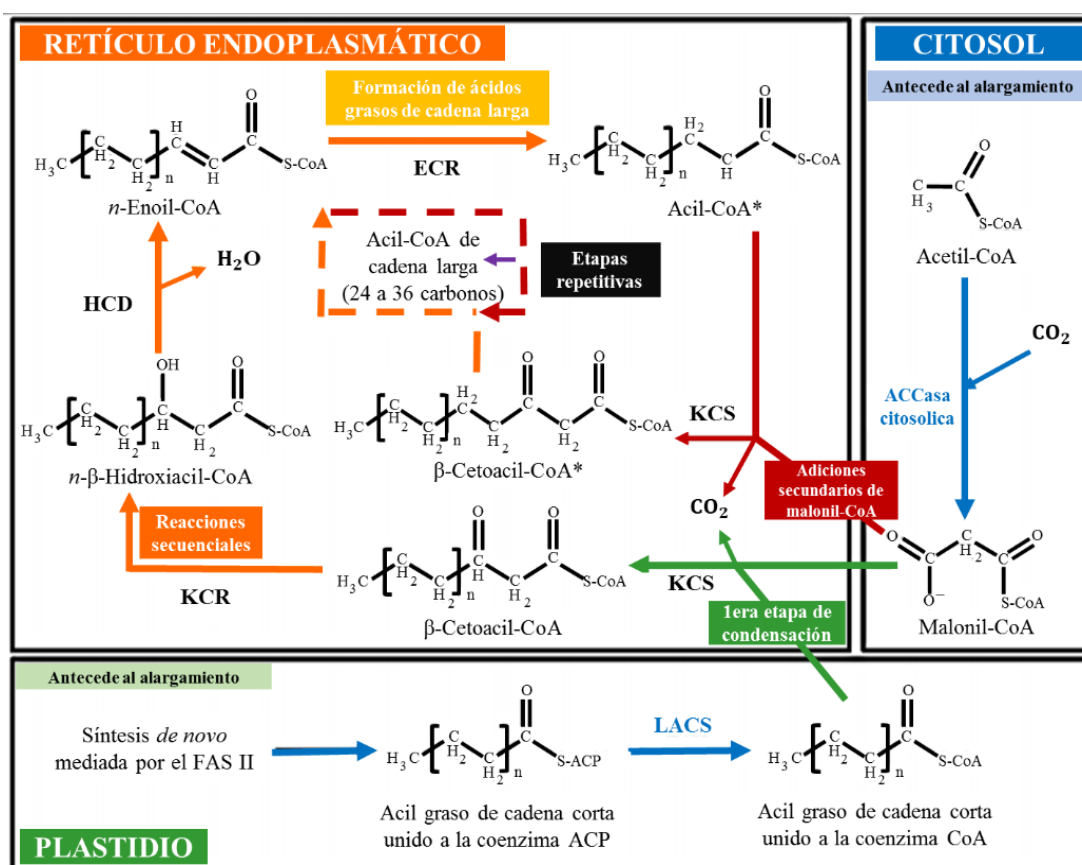
Nota. Trazos azules: síntesis de malonil-ACP; trazos verdes: primera etapa de condensación; trazos naranjas: reacciones secuenciales; trazos rojos: adiciones secundarias de malonil-ACP; líneas punteadas: etapas repetitivas; trazo lila: adición final de malonil-ACP. ACCasa plastidial = acetil-CoA carboxilasa plastidial; Deshidratasa = 3-hidroxiacil-ACP deshidratasa; KAS I, II, III = cetoacil sintasa I, II e III; MCATasa = malonil-CoA-ACP transilasa; Reductasa 1 = 3-cetoacil-

ACP reductasa; Reductasa 2 = enoil-ACP reductasa. Nombres en **negrita** corresponden a las enzimas responsables en la síntesis *de novo*. Fuente: [Roma \(2018\)](#).

En la segunda etapa, el alargamiento de los ácidos grasos (figura 5) consiste en que algunos de estos ácidos grasos son esterificados a CoA y son transportados al retículo endoplasmático para ser enlongados por acción de enzimas ácido graso elongadoras para convertirse en ácidos grasos de cadena muy larga, entre C24 y C36. Estos compuestos enlongados están principalmente dedicados a la producción de ceras epicuticulares ([Deustua, 2019](#)).

Figura 5

Alargamiento de los ácidos grasos.

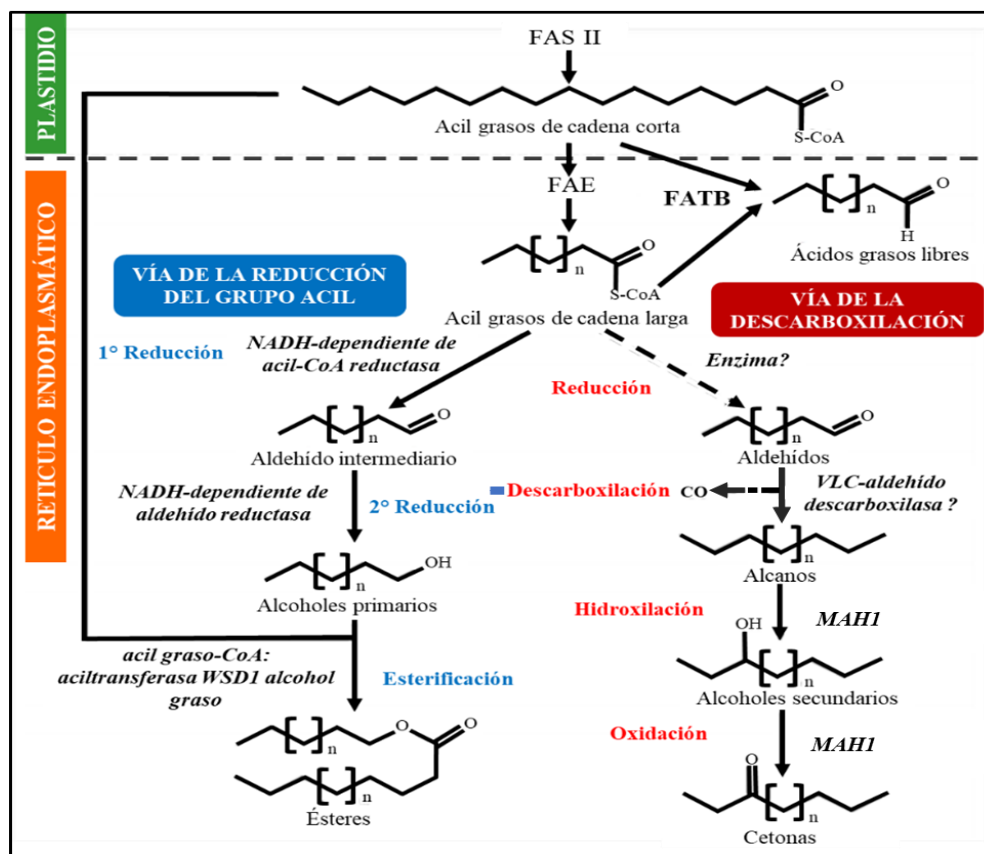


Nota. En el citosol y en el plastidio – trazos azules: etapas que anteceden el alargamiento propiamente dicho. En el retículo endoplasmático – trazos verdes: primera etapa de condensación;

trazos naranjas: reacciones secuenciales; trazos rojos: adiciones secundarias de malonil-CoA; líneas punteadas: etapas repetitivas; trazo morado: formación de ácidos grasos de cadena larga. ACCasa citosólica = acetil-CoA carboxilasa citosólica; ECR = enoil-CoA reductasa; HCD = β -cetoacil-CoA dehidratasa; KCR = β -cetoacil-CoA reductasa; KCS = cetoacil-CoA sintasa; LACS = larga cadena de acil-CoA sintasa. *molécula con dos carbonos más que la molécula inicial en el ciclo. Los nombres en negrita = enzimas involucradas en el alargamiento de los ácidos grasos. Fuente: Roma (2018).

Figura 6

Diagrama de la síntesis de las sustancias grasas de las ceras.



Nota. FAE = elongasas de ácidos grasos; FAS II = ácido graso sintasa tipo II; FATB = acil graso-ACP tioesterasa B; MAH1= alcano hidroxilasa de cadena media. Los nombres en negrita-cursiva

corresponden a las enzimas relacionadas en las vías de reducción del grupo acil y de la descarboxilación. Las líneas punteadas corresponden las etapas todavía no esclarecidas completamente. Fuente: [Roma \(2018\)](#).

La tercera etapa consiste en la reducción y descarboxilación de los ácidos grasos elongados a los componentes principales de las ceras y se dividen en dos vías importantes (figura 6): la vía para reducir el grupo acilo que dará lugar a alcoholes y ésteres primarios, y la vía para la descarboxilación que es responsable de la formación de aldehídos, alcanos, alcoholes secundarios y cetonas ([Roma, 2018](#); [Deustua, 2019](#); [dos Santos, 2020](#)).

2.2.3 Factores extrínsecos y exógenos sobre las ceras cuticulares

Los factores intrínsecos comprenden los factores genéticos que actúan sobre la variabilidad natural de las ceras cuticulares en individuos o especies. Por ejemplo, diferentes órganos vegetales pueden presentar composiciones y morfologías distintas, al igual que el contenido químico de las ceras pueden variar según la edad fisiológica del individuo ([Roma, 2018](#)). Asimismo, la cutícula presenta una importancia funcional y ecológica, ya que es la capa más externa de las células vegetales y se encuentra interaccionando con el ambiente (factor exógeno) ([Tafolla-Arellano et al., 2013](#)). Por ello, se entiende que los factores ambientales son capaces de interferir en las características de las ceras cuticulares ([Roma, 2018](#)), entre ellas se encuentra tres tipos:

- 1) Factores naturales, tales como la temperatura, humedad, luminosidad y altitud.
- 2) Factores bióticos, como la presencia de herbívoros o patógenos.
- 3) Factores antrópicos, como la contaminación atmosférica.

2.3 Principales contaminantes atmosféricos

Los avances industriales y urbanísticos principalmente han generado innumerables sustancias xenobióticas suspendidas en el aire y acelerando la fragmentación de ambientes

naturales. Los principales contaminantes atmosféricos son el dióxido de carbono (CO₂), monóxido de carbono (CO), dióxido de azufre (SO₂), óxido de nitrógeno (NO_x), monóxido de nitrógeno (NO), dióxido de nitrógeno (NO₂) y ozono (O₃) (tabla 2) (Brito, 2018).

Dentro los contaminantes atmosféricos, destacan también HPAs, compuestos orgánicos que presentan un carbono y dos o más anillos aromáticos condensados en su estructura. Los HPAs están presentes en combinaciones complejas en el ambiente, ya que son liberados directamente a la atmósfera por resuspensión y/o volatilización directa de derivados de petróleo como HPAs petrogénicos o por combustión de compuestos orgánicos, originando HPAs pirogénicos. Además, cuando los HPAs llegan a la atmósfera, pueden pasar por procesos oxidantes, generando compuestos más tóxicos, como los oxi-HPAs, así colaboran más con los procesos de los “Smog fotoquímico” atmosférico. Además, algunos HPAs son considerados prioritarios para la evaluación de la contaminación ambiental y consideradas como marcadores de contaminantes atmosféricos, según la Agencia de Protección Ambiental Americana (EPA). Además, algunos HPAs son potencialmente tóxicos para los seres humanos y otros están ampliamente distribuidos en el ambiente (Dias, 2016).

Tabla 2

Principales contaminantes atmosféricos

| Contaminantes | Especificaciones |
|--|---|
| Dióxido de carbono (CO₂) | Originado principalmente de la quema de combustibles fósiles. |
| Monóxido de carbono (CO) | Uno de los gases más peligrosos liberados por la industria, con efectos similares a los del CO ₂ . |
| Dióxido de azufre (SO₂), | Liberado principalmente por las industrias, e conocido por su alta toxicidad, siendo uno de los gases que reaccionan con moléculas de agua, formando la lluvia ácida. |

| | |
|-----------------------------------|--|
| Óxido de nitrógeno (NOX) | Es de naturaleza corrosiva y altamente oxidante, siendo producido por procesos de combustión. |
| Monóxido de nitrógeno (NO) | Se origina a elevadas temperaturas, por ejemplo, en el proceso de combustión, el oxígeno del aire puede reaccionar con el nitrógeno molecular y originar NO. |
| Dióxido de Nitrógeno (NO2) | Se origina por la reacción de NO por la reacción con hidrocarburos volátiles |
| Ozono (O3) | Es el principal componente de la contaminación fotoquímica, originados por reacciones fotoquímicas complejas sobre los NOX e hidrocarburos |

Nota. Fuente: Recuperado y modificado de [Brito, 2018](#)

2.4 Biomonitorio vegetal de contaminantes

El biomonitorio es un método de análisis ambiental que permite la evaluación de cambios en el medio ambiente o la calidad del aire mediante el uso de organismos vivos, siendo su principal ventaja el bajo costo ([Ribeiro et al., 2020](#)).

En las investigaciones se reportan muchos tipos de biomonitorio, pero principalmente con plantas, ya que es utilizado internacionalmente para evaluar o analizar el potencial de contaminación de deposiciones atmosféricas ([Fischer et al., 2010](#)).

Para evaluar y analizar las concentraciones de contaminantes se pueden utilizar dos tipos de biomonitorio vegetal ([Ribeiro et al., 2020](#)) en el área contaminada:

- 1) Biomonitorio pasivo que se encarga del estudio del potencial de contaminación ambiental sobre especies que ya existen en el sitio.
- 2) Biomonitorio activo que estudia el potencial de contaminación ambiental sobre especies insertadas en el medio que se va a evaluar.

Para el biomonitorio se utilizan métodos basados en la medición de respuestas seleccionadas (denominadas biomarcadores), en especies bioindicadoras. Entre los biomarcadores

estandarizados medidos en especies vegetales se encuentran la lesión foliar visible tras la validación microscópica y la acumulación de sustancias xenobióticas en diferentes órganos, como metales pesados HPAs (Domingos et al., 2015).

2.5 Metabolómica

La metabolómica es una herramienta ómica que se encarga de la identificación, cuantificación, estructura química e interacciones de pequeñas moléculas (<1500 Da) de un organismo (Razzaq et al., 2019).

2.5.1 Metabolómica dirigida

La metabolómica dirigida o “targeted” desarrolla métodos analíticos cuantitativos que se caracterizan por presentar una mayor sensibilidad y selectividad para grupos de compuestos o para metabolitos implicados en una vía conocida (información *a priori*) (Worley et al., 2013 & Johnson et al., 2016).

2.5.1 Metabolómica no dirigida

La metabolómica no dirigida o “non-targeted” “global” se basa en medir y comparar los patrones o “huellas dactilares” de metabolitos extraídos de una muestra sin un conocimiento *a priori* del metaboloma y, como consecuencia, se logre evidenciar variaciones no esperadas o innovadoras (Worley et al., 2013 & Johnson et al., 2016).

2.6 Recursos informáticos para el análisis de datos espectrales EM

Los campos del descubrimiento de productos naturales y la metabolómica, se encargan de estudiar compuestos químicos (metabolitos) que son sintetizados por organismos vivos. Sin embargo, ambos campos de estudio divergen en el tipo de análisis de metabolitos, mientras que el área de productos naturales está enfocada en identificar metabolitos bioactivos individuales, la metabolómica busca extraer significado de conjuntos de datos extraordinariamente complejos. A

pesar de esta divergencia en el estudio de los organismos vivos, ambos utilizan las mismas tecnologías analíticas (Robinette et al., 2012), tales como la espectrometría de masas (EM), a menudo junto con la separación cromatográfica previa, y la resonancia magnética nuclear (RMN).

La convergencia de la metabolómica y el descubrimiento de productos naturales suceden en la etapa en la que se buscan bases de datos espectrales con parámetros fisicoquímicos (por ejemplo, tiempo de retención relativo, relación de masa sobre carga – m/z , patrones de fragmentación espectral de masas y/o picos espectrales de RMN) determinados para mezclas complejas o metabolitos aislados. La calidad de la anotación de picos (asignando una identidad química o un identificador único) en los experimentos de metabolómica y la desreplificación (reconociendo y eliminando de una consideración adicional los metabolitos con estructuras conocidas) en la selección de productos naturales dependen críticamente de la integridad y accesibilidad de las bases de datos espectrales (Johnson et al., 2015 & Wang et al., 2016).

Durante décadas, los investigadores de productos naturales se han basado principalmente en bases de datos comerciales (por ejemplo, NIST Standard Reference MS Database y Aldrich Spectral Viewer ®NMR Library) o han desarrollado bases de datos internas personalizadas con acceso público limitado o nulo. Sin embargo, el campo de la metabolómica ha adoptado bases de datos de acceso abierto e intercambio de datos para todos los aspectos del proceso experimental, desde los algoritmos de análisis de datos e ingreso de metadatos (Johnson et al., 2015).

2.6.1 Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS)

GNPS es una plataforma que proporciona un espacio de conocimiento dirigido por la comunidad en el que los investigadores de todo el mundo pueden compartir, analizar y anotar datos de metabolómica y productos naturales. Permite un ciclo de anotación, en el que los usuarios seleccionan los datos, la desreplificación continua (identificación de productos) y alberga una base

de conocimientos de bibliotecas espectrales de referencia y conjuntos de datos públicos que permite la identificación de espectros en redes moleculares. GNPS ha recopilado bibliotecas espectrales de EM / EM disponibles y relevantes para productos naturales (que también incluyen otros metabolitos y moléculas), incluidos MassBank, ReSpect y NIST (Wang et al., 2016).

Tabla 3

Bases de datos espectrales en línea para la identificación

| Base de datos | Parámetros de búsqueda | Compuestos | Espectros | Formato de registro | Acepta presentaciones | Notas |
|----------------|---|------------|------------------------|--|-----------------------|---|
| BML-NMR | Nombre | 208 | 3.328 RMN | Específico del proveedor, MSI-XML | No | Cada compuesto medido con 16 conjuntos de parámetros de RMN diferentes |
| BMRB | Nombre, masa, estructura, 13 turnos C-RMN, 1 turnos H-RMN, picos HSQC-RMN, otro | 1,249 | 8.996 RMN | NMR-STAR, CSV, específico del proveedor | Sí | |
| GMD | Nombre, masa, fórmula, grupo funcional, picos de EM, índice de retención, otros | 2.22 | 26,587 EM | NIST, JCAMP-DX, TagFinder, Búsqueda de destino | Sí | Índices de retención de CG. Interfaz de búsqueda multiparamétrica. Herramienta de árbol de decisión para la identificación de subestructuras. Acceso a la API |
| GNPS | EM ² en formato mzML, nombre, aducto, otro | > 5.500 | 27,593 EM ² | mgf | Sí | Flujo de trabajo de desreplicación automatizada a |

| | | | | | | partir de datos de EM ² |
|-----------------|--|----------|---------------------------------|---------------------------------------|----|--|
| HMDB | Estructura, masa, aducto, picos de EM, picos de EM ² , tiempo de retención de CG, índice de retención de CG, cambios de 1 H-NMR, cambios de 13C-NMR, 2D TOCSY 13 C HSQC otros | 41,806 | 2,240 NMR; 1.220 EM; 8.176 EM 2 | Texto, específico del proveedor, NIST | No | Específico para metabolitos humanos. No todos los compuestos tienen espectros experimentales |
| MassBank | Estructura, nombre, masa, fórmula, fragmento, picos de EM (n), pérdida neutra | > 11.000 | 40,889 EM incluye MSn | MassBank | Sí | Muchos de los registros también incluyen información detallada sobre las condiciones cromatográficas y los tiempos de retención. Búsqueda por lotes disponible. API SOAP |
| METLIN | Masa, aducto, fragmento, nombre, fórmula, pérdida neutra, picos de EM ² | 240,515 | 61,872 EM 2 | No descargable | No | Búsqueda por lotes disponible. No todos los compuestos tienen espectros experimentales |
| MMCD | Nombre, estructura, cambios y conectividad de RMN, masa, aducto | 20.306 | 5.256 RMN | Texto, específico del proveedor | No | Búsqueda por lotes disponible. Puede utilizar varios tipos de espectros en una sola búsqueda. No todos los compuestos |

| | | | | | | |
|------------------------------|--|--------|-------------------------------|--|----|---|
| | | | | | | tienen espectros experimentales |
| NAPRO C-13 | Nombre, familia química, fórmula, masa, publicación, desplazamiento de ^{13}C y multiplicidad | 20,297 | 20.297 RMN | No descargable | No | Búsqueda iterativa donde se pueden agregar turnos a la búsqueda de uno en uno. Conectividad de búsqueda por turno |
| Desplazamiento NMR DB | Nombre, fórmula, cita, estructura, cambios de RMN (núcleos múltiples), condiciones experimentales | 42,838 | 50,883 RMN | CML, JCAMP-DX, separados por tabulaciones, SQL | Sí | Enumera los cambios químicos de RMN, pero no el tamaño del pico. La base de datos está disponible en la página de SourceForge |
| ReSpect | Masa, aducto, fragmento, nombre, palabra clave, fórmula, espectro EM (n) | 3.71 | 9.017 espectros de MSn | MassBank | No | Específico para fitoquímicos |
| SDBS | Nombre, fórmula, masa, picos de IR, cambios de ^{13}C -NMR, cambios de ^1H -NMR, picos de EM | 34 | 29.000 NMR; 24,700 EM | No descargable | No | Puede utilizar varios tipos de espectros en una sola búsqueda. Límite de 50 búsquedas por día |
| Spektraris | Masa, tiempo de retención, tiempo de retención relativo, picos de EM (n), fórmula, | 733 | 466 NMR; 1,445 EM; 1,181 EM 2 | MassBank, separado por pestañas, JCAMP- | Sí | Interfaz de búsqueda de múltiples parámetros. Los datos de RMN se limitan actualmente a |

| | | | | | | |
|------------------------|---|-----|------------|--|----|----------------------------|
| | cambios de 1H-NMR, cambios de 13C-NMR | | | DX, específic o del proveed or | | los taxanos diterpenos |
| SpinAssi gn | 13C-HSQC NMR desplazamient os, 1H-RMN desplazamient os, 13C-RMN desplazamient os | 980 | 980 RMN | No descarga ble | No | Optimizado para mezclas |

Nota. Recuperado y modificado de [Johnson et al., 2015](#).

III. Método

3.1 Tipo de investigación

A causa de la naturaleza y origen de los datos CG-EM (.cdf file), esta investigación ha sido de tipo básico y transversal. Es decir, la investigación fue un análisis complementario de espectros de fragmentación existentes, los cuales permitieron descubrir y/o comprender, a través de la GNPS, los fenómenos envueltos en los componentes químicos de las ceras foliares epicuticulares expuestos a los contaminantes atmosféricos de la Reserva del PEFI, durante las estaciones verano e invierno del 2019. En consecuencia, ha sido también de tipo correlacional/causal, porque se midió el grado de relación entre las variables dependientes e independientes de la población estudiada.

3.2 Ámbito temporal y espacial

Ámbito temporal. Los análisis de redes moleculares de la GNPS se dieron sobre los datos CG-EM (.cdf file) de ceras epicuticulares foliares de especies vegetales del PEFI, coletadas durante las estaciones verano e invierno del año 2019.

Ámbito espacial. Los datos de CG-EM (.cdf file) de ceras epicuticulare foliares elaboradas en el Laboratorio de Fitoquímica del Instituto de Biociencias de la Universidad de São Paulo, fueron analizados en la plataforma GNPS.

3.3 Variables

3.3.1 Variable independiente

Los parámetros de filtrado de la GNPS en los datos obtenido por CG-EM: la detección del umbral, el tiempo de retención (RT) y algoritmo de alineación espectral (valores de similitud).

3.3.2 Variable dependiente

La caracterización química de las ceras foliares epicuticulares.

3.4 Población y muestra

Población. La población estuvo conformada por 57 documentos de CG-EM sin procesar (.cdf file), las cuales se obtuvieron de ceras foliares epicuticulares de seis especies arbóreas de la reserva del PEFI durante las estaciones verano e invierno del año 2019.

Muestra. Se tomaron de la población 52 documentos de CG-EM sin procesar (.cdf file), debido a que ciertas especies arbóreas no tenían la misma cantidad de files para la estación seca y lluviosa, esta pariedad de files es muy importante para la introducción de datos en la GNPS. Asimismo, se detalló en la tabla 4, la clasificación de las seis especies arbóreas, la cantidad de files .cdf que se tenía para cada estación obtenidas en el PEFI durante el año 2019 (identificador estación seca y lluviosa) y la familia botánica, las cuales se organizaron en una base datos que se elaboró para esta tesis.

Tabla 4

Clasificación de especies arbóreas disponibles en la base de datos

| Especies arbóreas | Identificador estación seca | Identificador estación lluviosa | Familia botánica |
|----------------------------|------------------------------------|--|-------------------------|
| <i>Alchornea sidifolia</i> | ALD1 | ALR1 | Euphorbiaceae |
| | ALD2 | ALR2 | |
| | ALD3 | ALR3 | |
| | ALD4 | ALR4 | |
| | ALD5 | ALR5 | |
| <i>Amaioua intermedia</i> | AMD1 | AMR1 | Rubiaceae |
| | AMD2 | AMR2 | |
| | AMD3 | AMR3 | |
| | AMD4 | AMR4 | |
| | AMD5 | AMR5 | |
| <i>Eugenia excelsa</i> | EUD1 | EUR1 | Myrtaceae |
| | EUD2 | EUR2 | |
| | EUD3 | EUR3 | |
| <i>Guarea macrophylla</i> | GUD1 | GUR1 | Meliaceae |
| | GUD2 | GUR2 | |
| | GUD3 | GUR3 | |
| | GUD4 | GUR4 | |
| <i>Miconia cabucu</i> | MID1 | MIR1 | Melastomataceae |

| | | | |
|-----------------------------------|------|------|------------|
| | MID2 | MIR2 | |
| | MID3 | MIR3 | |
| | MID4 | MIR4 | |
| | SOD1 | SOR1 | |
| | SOD2 | SOR2 | |
| <i>Solanum granuloso-leprosum</i> | SOD3 | SOR3 | Solanaceae |
| | SOD4 | SOR4 | |
| | SOD5 | SOR5 | |

Los criterios de inclusión fueron los espectros de fragmentación obtenidos de ceras foliares epicuticulares de especies arbóreas nativas del PEFI durante las estaciones verano e invierno del año 2019, las cuales fueron elaboradas en el Laboratorio de Fitoquímica del Instituto de Biociencias de la Universidad de São Paulo. Por otro lado, los criterios de exclusión fueron los espectros de fragmentación de ceras epicuticulares foliares obtenidas en verano e invierno de otros años.

3.5 Instrumentos

3.5.1 Recursos informáticos

El recurso informático para la identificación y elaboración de perfiles químicos fue la plataforma Global Natural Product Social Molecular Networking (GNPS) a través de un análisis de datos espectrales en línea (<https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/static/gnps-splash.jsp>). Para ello, la GNPS cuenta con colecciones de referencia [MassBank Europe, MassBank Japan, MassBank North America, ReSpect, Human Metabolome Database (HMDB), various forms (X) of chromatography mass spectrometry/Metabolite Link (XCMS-online/Metlin), National Institute of Standards and Technology/National Institutes of Health/ Environmental Protection Agency Mass Spectral Library (NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library) y mzCloud y Repositorios de datos (Metabolights y Metabolomics workbench). Sin embargo, antes de utilizar la GNPS se empleó el programa WinSCP v5.19 a fin de compartir los archivos de espectros de fragmentación con el escritorio de la GNPS.

La recolección y manejo de los datos se realizó en el software de hojas de cálculo Microsoft office Excel 2010.

Los análisis estadísticos, se realizaron con el apoyo de softwares de códigos abiertos: Past v4.09, Fitopac v2.1 y MeV v4.7. Por otro lado, la visualización de las redes moleculares se utilizó el software de código abierto Cytoscape v3.8.2.

En la elaboración de las figuras, se importaron las imágenes desde las estructuras químicas almacenadas de la GNPS, la base de datos de moléculas del Public chemical (Pubchem) y la base de datos de ChemSpider. Asimismo, la edición de las figuras químicas como también de las redes moleculares fueron hechas en el software Microsoft office Power point 2010. Sin embargo, para la edición de figuras del *heatmap*, PCA y gráficas de cajas y bigotes se empleó el programa de Paint 2010.

3.5.2 Equipos

En este estudio se utilizó una Laptop Asus VivoBook 15 M513IA 15.6", con el fin de realizar los análisis en la plataforma GNPS, la creación y visualización de las redes moleculares. Además, se empleó un disco duro externo Toshiba Canvio 4TB, USB 3.0 para el almacenamiento exclusivo de los resultados, avances en esta investigación que se discutieron y así como el almacenamiento de los programas informáticos.

3.5.3 Materiales de escritorio

Durante el estudio se utilizaron materiales como hojas blancas, bolígrafos, corrector líquido y un cuaderno de trabajo.

3.6 Procedimiento

Los procedimientos realizados para el análisis de datos metabolómicos, se dividió en seis grandes etapas: análisis de los cromatogramas, la visualización y exportación de datos de la red

molecular, análisis descriptivo inicial, preprocesamiento, análisis de los datos e interpretación de los resultados (Fernández, 2019; Alghamdi et al., 2019)

- 1) **Análisis de los cromatogramas:** los datos de CG-EM sin procesar (.cdf file) fueron ingresados a la plataforma GNPS, a través del software de código abierto: WinSCP v5.19, para su deconvolución (ver anexo A), con el fin de obtener las áreas (valores cuantitativos) de los componentes espectrales y filtrar aquellos valores que posean un *balance score* $\geq 65\%$. Esta primera base de datos fue importada (.csv file) y organizada en hojas de cálculo Microsoft office Excel 2010 (ver anexo B).
- 2) **La visualización y exportación de datos de la red molecular:** tras la deconvolución se continuo con la identificación de los posibles compuestos químicos, a través de la búsqueda en la biblioteca espectral GNPS (ver anexo C); ingresando metadatos (.txt file), tales como un identificador de las especies arbóreas, estación y nombre científico de las especies; así mismo se condicionaron los bordes de la red molecular, delimitando una puntuación coseno ≥ 0.70 y mayor a 6 picos coincidentes. Además, se requirió que cada nodo se mantenga enlazado con otros 10 nodos que presenten más similitud, el tamaño máximo de una familia molecular este en 100 y las coincidencias mantenidas entre los espectros de la red y los espectros de la biblioteca tengan una puntuación ≥ 0.75 . Finalmente, se obtuvieron dos documentos (.graphml y .csv file) que se complementaron para una mejor visualización e identificación de los compuestos químicos en el software de código abierto: Cytoscape v3.8.2.
- 3) **Análisis descriptivo inicial:** antes de este procedimiento, se elaboró una base de datos en hojas de cálculo Microsoft office Excel 2010, a partir de los componentes espectrales deconvueltos (*balance score* $\geq 65\%$) y lo importado desde cytoscape

v3.8.2, lo cual permitió obtener una información organizada de acuerdo con la especie botánica, estación y las clases químicas de cada componente espectral.

Con la finalidad de obtener una visión general de la dispersión de la base de datos, se emplearon los análisis estadísticos básicos como la media, desviación estándar y coeficiente de variación en el software de código abierto: Past v 4.09. Asimismo, se realizó una descripción de los valores faltantes, en la cual si una variable superaba el 20% se podría eliminar de la base de datos.

Finalmente, para una mejor descripción de dispersión, se elaboró una gráfica de cajas y bigotes múltiples en el Past v4.09, lo que permitió observar si era correcto transformar los datos y escalarlos.

- 4) Preprocesamiento: una vez finalizado el análisis descriptivo inicial, se prosiguió con la aplicación de técnicas de preprocesamiento, con la finalidad de convertir y reducir los datos no procesados a una base de datos con distribución no tan heterogénea. Como primer paso, se imputó el valor mínimo dividido entre dos para los valores faltantes; seguido de una transformación logarítmica en base dos para todos los datos; y finalizando con una normalización a través del escalado de Pareto, donde se utilizó la raíz cuadrada de la desviación estándar de cada variable, como factor de escala para cada dato, de tal manera que todas las variables se vuelven igualmente importantes.
- 5) Análisis de los datos: Tras este pretratamiento, los datos se analizaron utilizando estadística univariante en el software Past v4.09, y multivariante en los softwares de códigos abiertos: Fitopac v2.1 y MeV v4.7 para un análisis de componentes principales (PCA) y mapa de calor (*Heatmap*), respectivamente.

Con el fin de comparar las medias entre las variables o indicar el grado de varianza, se aplicó el análisis univariante de tipo ANOVA de un criterio, destacando aquí el *p-value* de cada variable, ya que indicaron si las diferencias entre los grupos son o no significativas. Por último, se obtuvieron nuevas graficas de cajas y bigotes múltiples para verificar que la distribución de los datos es más acertada después del preprocesamiento.

Por otro lado, se aplicaron los análisis multivariantes, para analizar simultáneamente las diversas variables que existen para cada muestra, por ello se empleó un PCA y un *heatmap*. Cabe señalar que para el análisis de PCA, se elaboraron dos gráficos bidimensionales: uno con el escalamiento de Pareto y otro con un rango escalado, siendo este último, diseñado en base a los datos de contaminantes atmosféricos (ver anexo L) y condiciones meteorológicas obtenidos en [CETESB \(2020\)](#) y [IAG-USP \(2020\)](#) recuperado de [Santos \(2021\)](#), respectivamente (ver anexo M).

- 6) Interpretación de los resultados: En esta última etapa, se buscó identificar los cambios significativos y coordinados de expresión entre las clases químicas de las ceras foliares epicuticulares de las especies arbóreas durante la estación seca y lluviosa del 2019. Asimismo, se realizó una integración de datos procedentes de artículos científicos.

3.7 Análisis estadísticos

Los análisis de datos en esta investigación se realizaron con el método computacional de redes moleculares a través del CG-EM Deconvolution *Workflow* de la plataforma GNPS ([Aksenov et al., 2021](#)), permitiendo la alineación espectral y la deconvolución espectral en todo el conjunto de datos. Asimismo, se empleó la plataforma de *software* de código abierto: Cytoscape v3.8.2 ([Smoot et al., 2011](#)), para la visualización y anotación de redes moleculares elaboradas en la

GNPS. Asimismo, se emplearon otros *softwares* de códigos abiertos, como el Past v4.09 para los análisis univariantes (media, desviación estándar, coeficiente de variación, ANOVA y gráficas de cajas y bigotes); y el Fitopac v2.1 (Shepherd, 2010) y MeV v4.7 (Howe et al., 2010) para análisis multivariantes, como un PCA y *heatmap*, respectivamente.

En la Figura 7 se muestra el flujo de trabajo para el análisis de datos metabolómicos, graficando desde la deconvolución e identificación en la GNPS, hasta la aplicación de pruebas estadísticas que se explicó con mayor detalle en el apartado 3.6.

3.8 Consideraciones éticas

Las consideraciones para la realización de esta investigación son las siguientes:

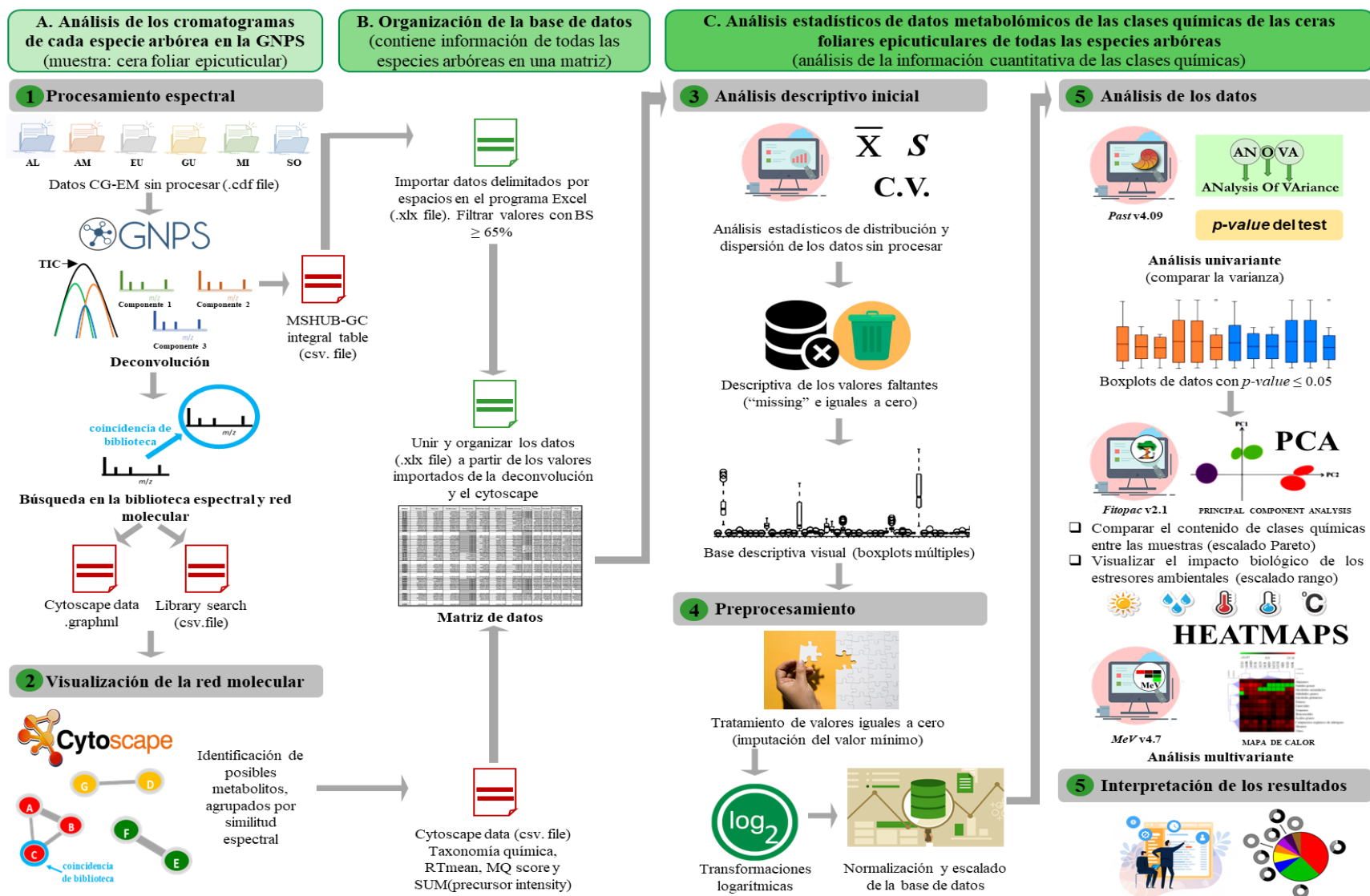
No genera gran impacto ambiental. La investigación solo involucró el uso de análisis informáticos.

No genera un gran peligro a la salud humana, porque este estudio colabora en identificar los perfiles químicos a partir de documentos CG-EM sin procesar de ceras foliares epicuticulares expuestas a contaminantes atmosféricos en los remanentes del bosque de la Reserva del PEFI durante las estaciones seca y lluviosa, permitiendo conocer las relaciones de estos contaminantes con la composición de las ceras foliares epicuticulares.

No se atenta con la propiedad intelectual. Este trabajo de investigación contó con la autorización para la manipulación de los datos (ver anexo N). Asimismo, se encuentra basado en una plataforma de redes moleculares y análisis estadísticos de libre uso.

Figura 7

Flujo de trabajo para el análisis de datos metabolómicos.



IV. Resultados

A. Identificar los componentes químicos de ceras foliares epicuticulares de la Reserva del PEFI durante las estaciones verano e invierno, en la plataforma de GNPS

4.1 Resultados de las redes moleculares de los principales componentes químicos en las ceras foliares epicuticulares del PEFI

4.1.1 *Alchornea sidifolia*

A partir de la combinación de 1959 espectros EM / EM de las ceras epicuticulares de *A. sidifolia* (<https://n9.cl/gnpse>), resultó una red molecular (Figura 8) compuesta por 380 nodos organizados en un total de 61 familias moleculares que comprendieron dos nodos como mínimo, los cuales se visualizaron en Cytoscape v3.8.2. Asimismo, cada nodo (el cual simboliza un único espectro de fragmentación) fue marcado por un distinto color que representó las diferentes subclases químicas de los 97 posibles metabolitos identificados, encontrándose 27 de estas distribuidas en 12 clases químicas. Además, se representó en un gráfico circular de 2 colores, la abundancia espectral de cada metabolito correspondiente a la estación seca (invierno) y lluviosa (verano) del PEFI (Figuras 9 - 11).

4.1.2 *Amaioua intermedia*

La red molecular resultante de *A. intermedia* se visualizó en Cytoscape v3.8.2 (Figura 12), a partir de la combinación de 1776 espectros EM / EM de sus ceras epicuticulares foliares (<https://n9.cl/gnpsam>), obteniéndose 473 nodos, los cuales se organizaron en un total de 58 familias moleculares que integraron dos nodos como mínimo. Asimismo, cada nodo (el cual simboliza un único espectro de fragmentación) fue marcado por un distinto color que representó las diferentes subclases químicas de los 87 posibles metabolitos identificados, encontrándose 26 subclases distribuidas en 13 clases químicas. De igual modo, en Cytoscape v3.8.2 se logró

representar en un gráfico circular de 2 colores, la abundancia espectral de cada metabolito correspondiente a la estación seca (invierno) y lluviosa (verano) del PEFI (Figuras 13 - 20).

4.1.3 *Eugenia excelsa*

En Cytoscape v3.8.2 se elaboró una red molecular resultante para *E. excelsa* (Figura 21), esto a partir de la combinación de 1859 espectros EM / EM de sus ceras epicuticulares foliares (<https://n9.cl/gnpseu>) , visualizándose 377 nodos organizados en un total de 53 familias moleculares que integraban dos nodos como mínimo, donde cada nodo (el cual simboliza un único espectro de fragmentación) fue marcado por un distinto color que representó las diferentes subclases químicas de los 86 posibles metabolitos identificados, hallándose 28 subclases distribuidas en 14 clases químicas. Inclusive, se logró representar en un gráfico circular de 2 colores, la abundancia espectral de cada metabolito correspondiente a la estación seca (invierno) y lluviosa (verano) del PEFI (Figuras 22 - 28).

4.1.4 *Guarea macrophylla*

A través de Cytoscape v3.8.2 se elaboró una red molecular que resulto de la combinación de 1838 espectros EM / EM (<https://n9.cl/gnpsgu>) de las ceras foliares epicuticulares de *G. macrophylla* (figura 29); así pues, se obtuvieron 352 nodos organizados en un total de 61 familias moleculares que comprendieron dos nodos como mínimo, donde cada nodo simbolizó a un único espectro de fragmentación, y fueron presentados con un color distinto para representar las distintas subclases químicas de los 90 posibles metabolitos identificados, visualizándose 21 subclases distribuidas en 11 clases químicas. Además, se observaron gráficas circulares de 2 colores, que representaron la abundancia espectral de cada metabolito de la estación seca (invierno) y lluviosa (verano) del PEFI (Figuras 30 - 34).

4.1.5 *Miconia cabucu*

El resultado de la combinación de 1627 espectros EM / EM de ceras foliares epicuticulares de *M. cabucu* (<https://n9.cl/gnpsmi>), se observó a través de una red molecular en Cytoscape v3.8.2 (figura 35); debido a lo cual, se obtuvieron 389 nodos organizados en un total de 62 familias moleculares que comprendieron dos nodos como mínimo, donde cada uno simbolizó un único espectro de fragmentación. Los nodos fueron marcados con un color para representar las distintas subclases químicas de los 85 posibles metabolitos identificados, hallándose 23 subclases químicas distribuidas en 12 clases químicas. Asimismo, en Cytoscape v3.8.2 se logró representar en un gráfico circular de 2 colores, la abundancia espectral de cada metabolito correspondiente a la estación seca (invierno) y lluviosa (verano) del PEFI (Figuras 36 - 40).

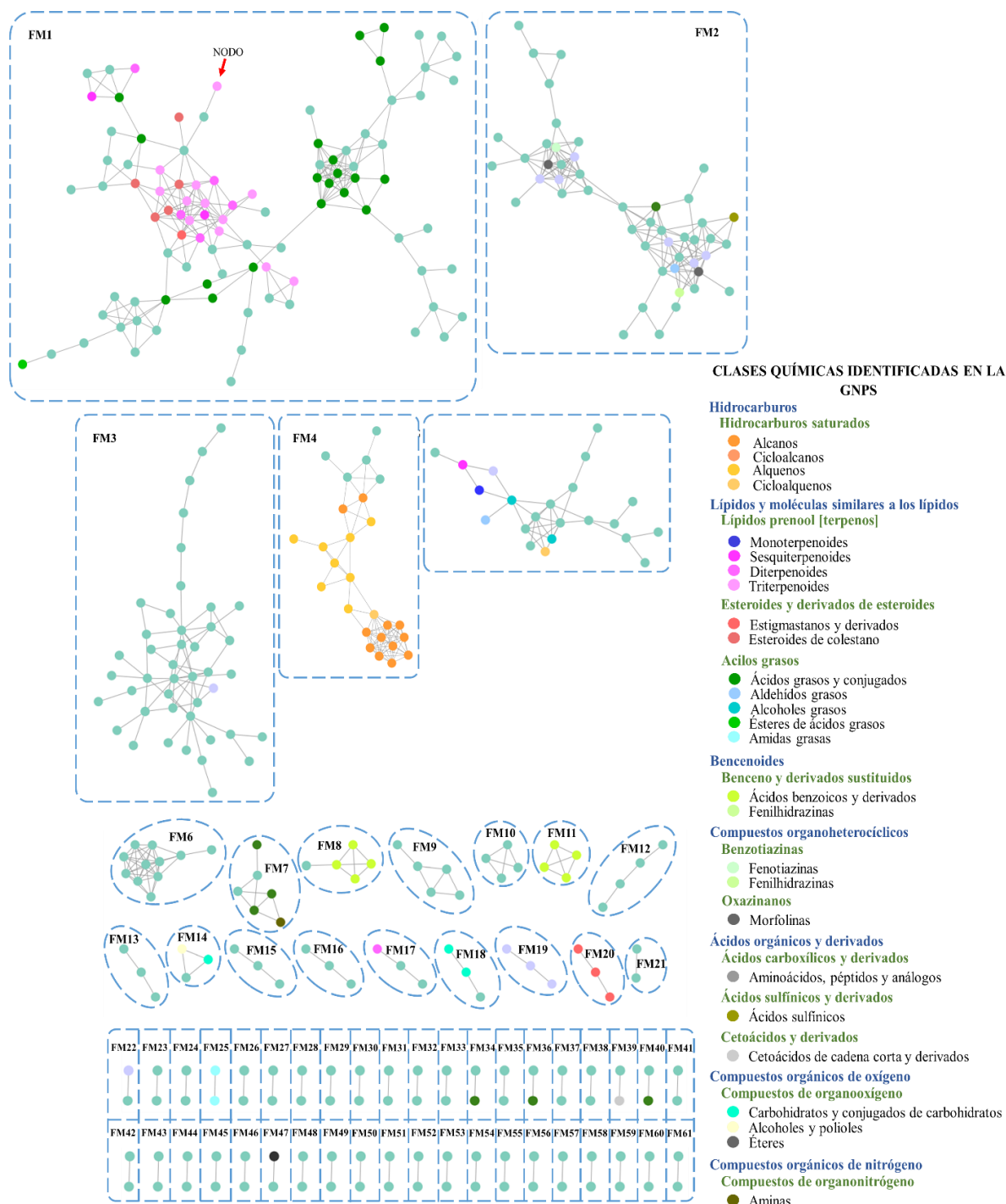
4.1.6 *Solanum granuloso-leprosum*

La red molecular resultante de *Solanum granuloso-leprosum* se visualizó en Cytoscape v3.8.2 (Figura 41), a partir de la combinación de 2950 espectros EM / EM de sus ceras epicuticulares foliares (<https://n9.cl/gnpsso>), obteniéndose 393 nodos, los cuales se organizaron en un total de 42 familias moleculares que integraron dos nodos como mínimo. Asimismo, cada nodo (el cual simboliza un único espectro de fragmentación) fue marcado por un distinto color que representó la subclase química de los 107 posibles metabolitos identificados, encontrándose 25 subclases distribuidas en 13 clases químicas. De igual modo, en Cytoscape v3.8.2 se logró representar en un gráfico circular de 2 colores, la abundancia espectral de cada metabolito correspondiente a la estación seca (invierno) y lluviosa (verano) del PEFI (Figuras 42 - 46).

Asimismo, se presentó la identificación, la estructura química y el número de carbonos (C) de los principales y posibles metabolitos identificados mediante las redes moleculares obtenidas en la GNPS para cada cera epicuticular foliar de las seis especies arbóreas descritas; para más detalle de las 552 posibles identificaciones, ver los anexos D, E, F, G, H y I.

Figura 8

Mapa de redes moleculares generada para *Alchornea sidifolia*.



Nota. FM: Familia molecular; los puntos representan los nodos y sus colores representan las subclases químicas.

Figura 9

Representación gráfica de la abundancia espectral de cada metabolito de la FM1, los cuales pertenecen a las clases de los ácidos grasos (subclase: ácidos grasos), esteroides y terpenos (mono-, sesqui-, di-, triterpenos).

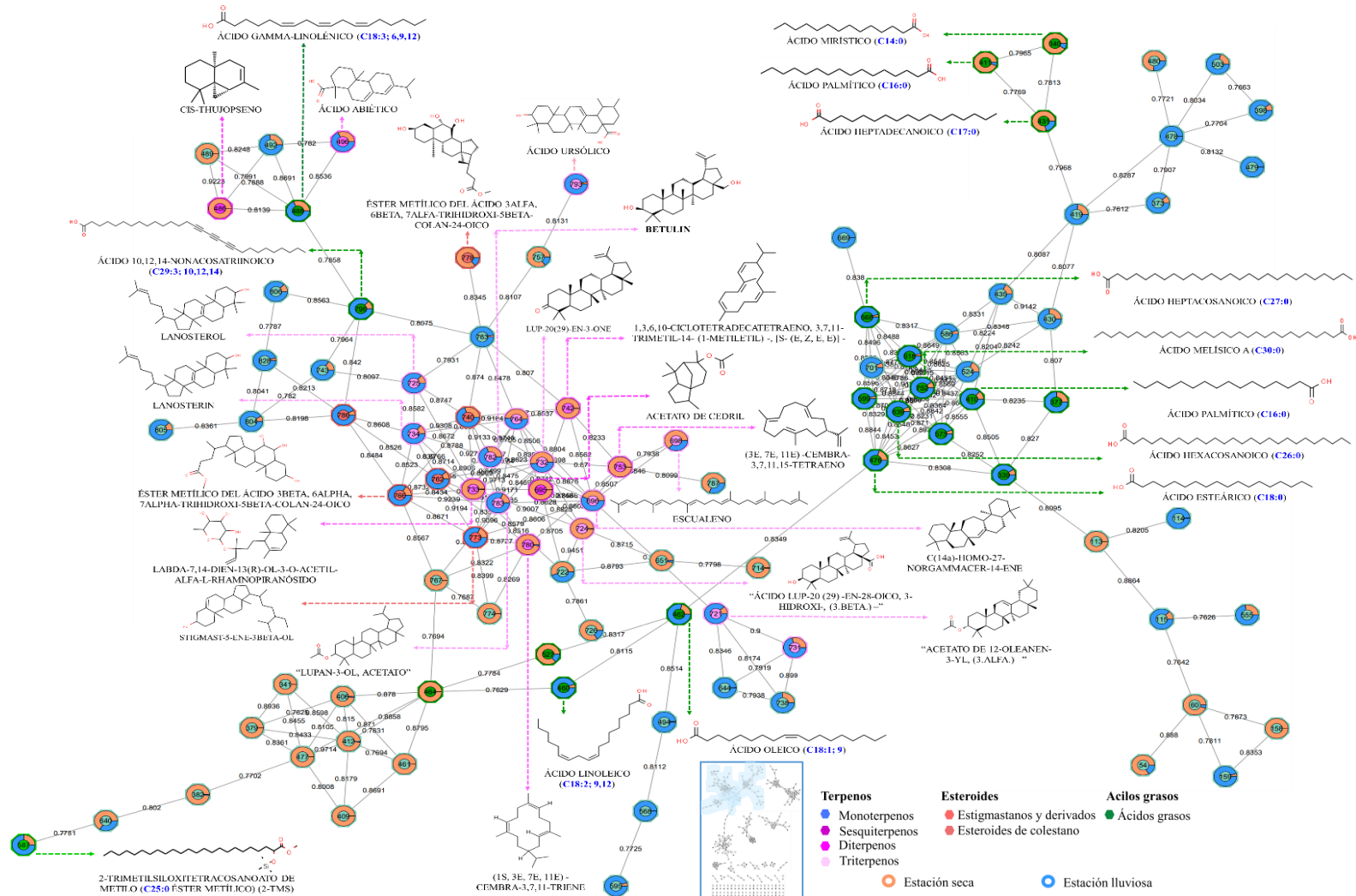
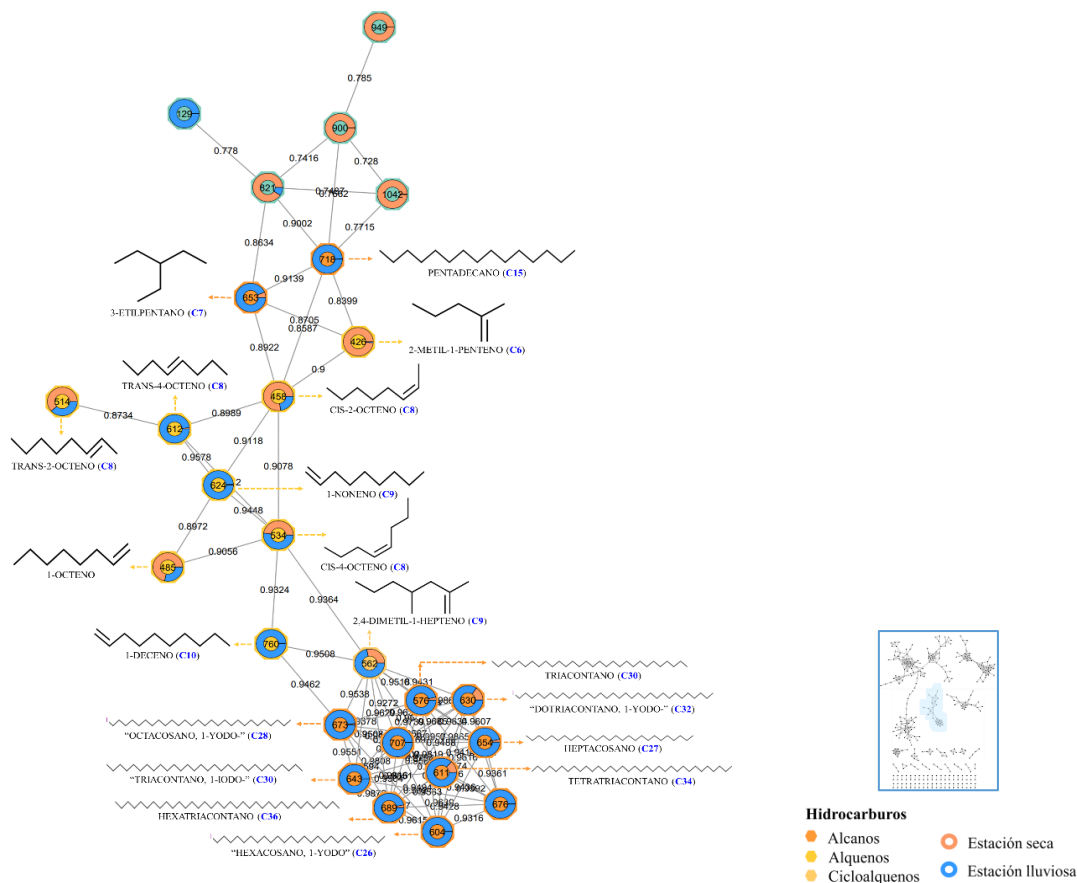


Figura 10

Representación gráfica de la abundancia espectral de cada metabolito perteneciente a la FM4, identificándose a la clase de hidrocarburos y sus subclases: alcanos y alquenos.

**Figura 11**

Representación gráfica de la abundancia espectral de cada metabolito pertenecientes a la FM8 (A) y FM11 (B), identificándose al grupo químico de los benzenoides.

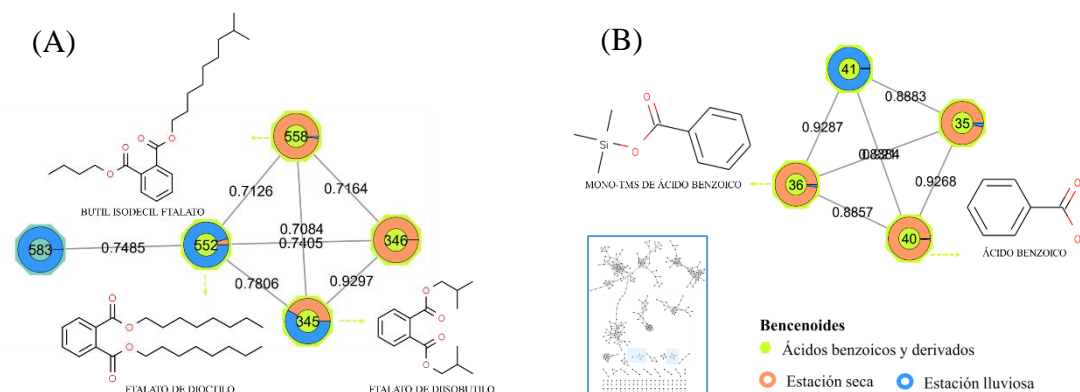
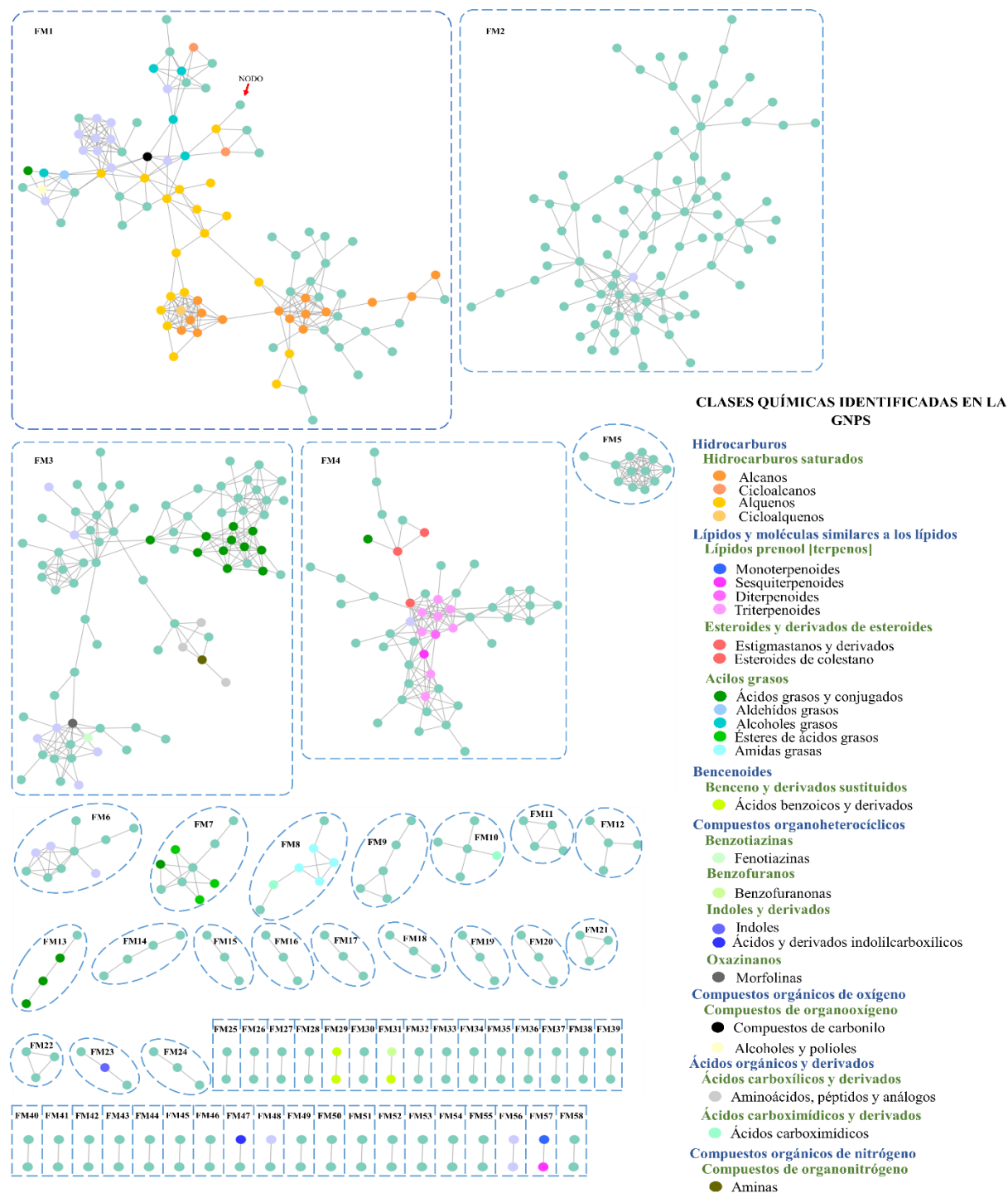


Figura 12

Mapa de redes moleculares generada para *Amaioua intermedia*.



Nota. FM: Familia molecular; los puntos representan los nodos y los colores representan las subclases químicas.

Figura 13

Representación gráfica de la abundancia espectral de cada metabolito de la FM1, los cuales pertenecen a las clases hidrocarburos (subclases: alcanos, alquenos, cicloalcanos y cicloalquenos), los acilos grasos (subclases: ácidos grasos, aldehídos grasos y alcoholes grasos), y compuestos de organooxígeno.

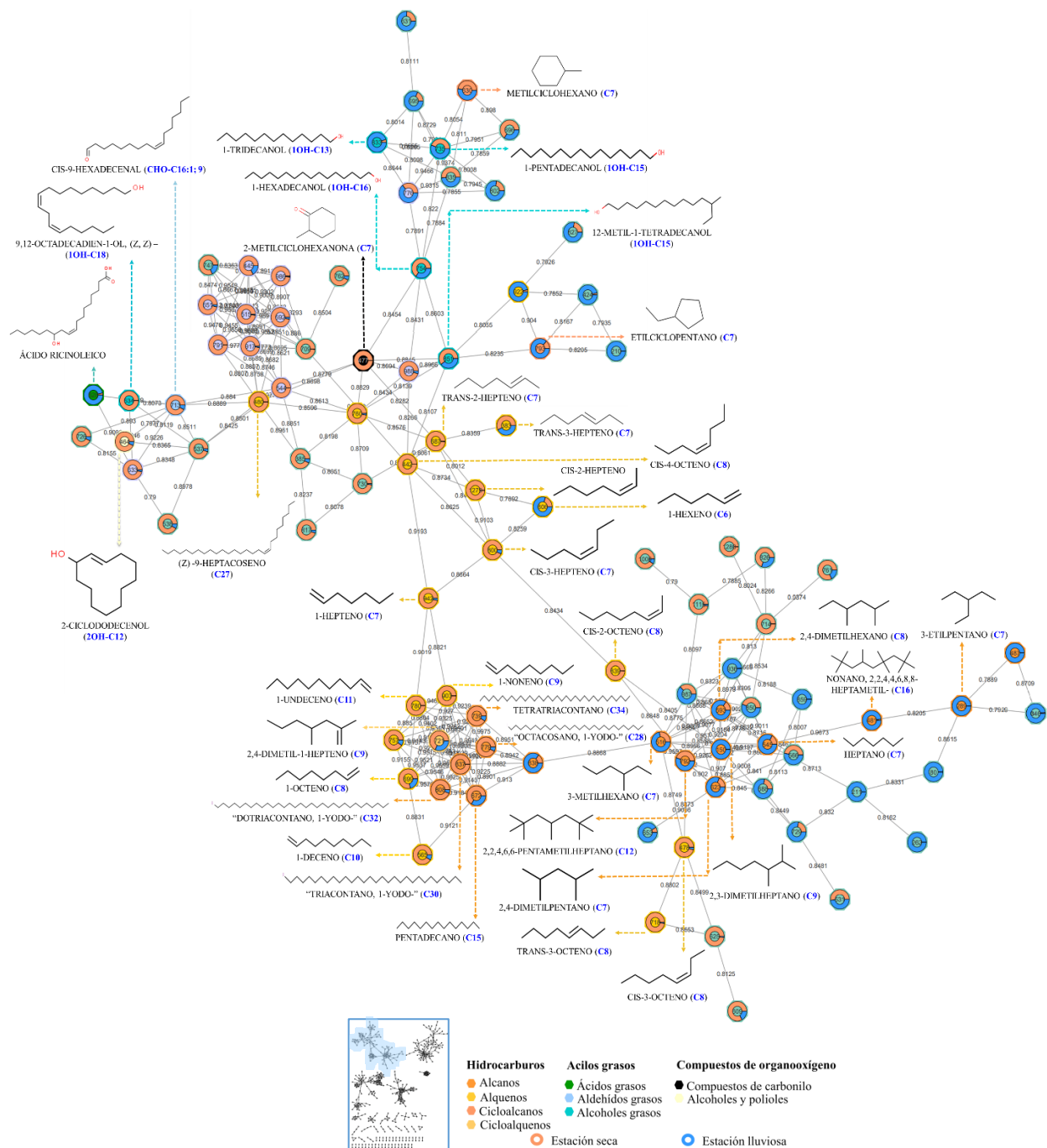


Figura 15

Representación gráfica de la abundancia espectral de cada metabolito de la FM4, los cuales pertenecen a la clase terpenos (subclases: sesqui-, diter- y triterpenos) y esteroides, principalmente.

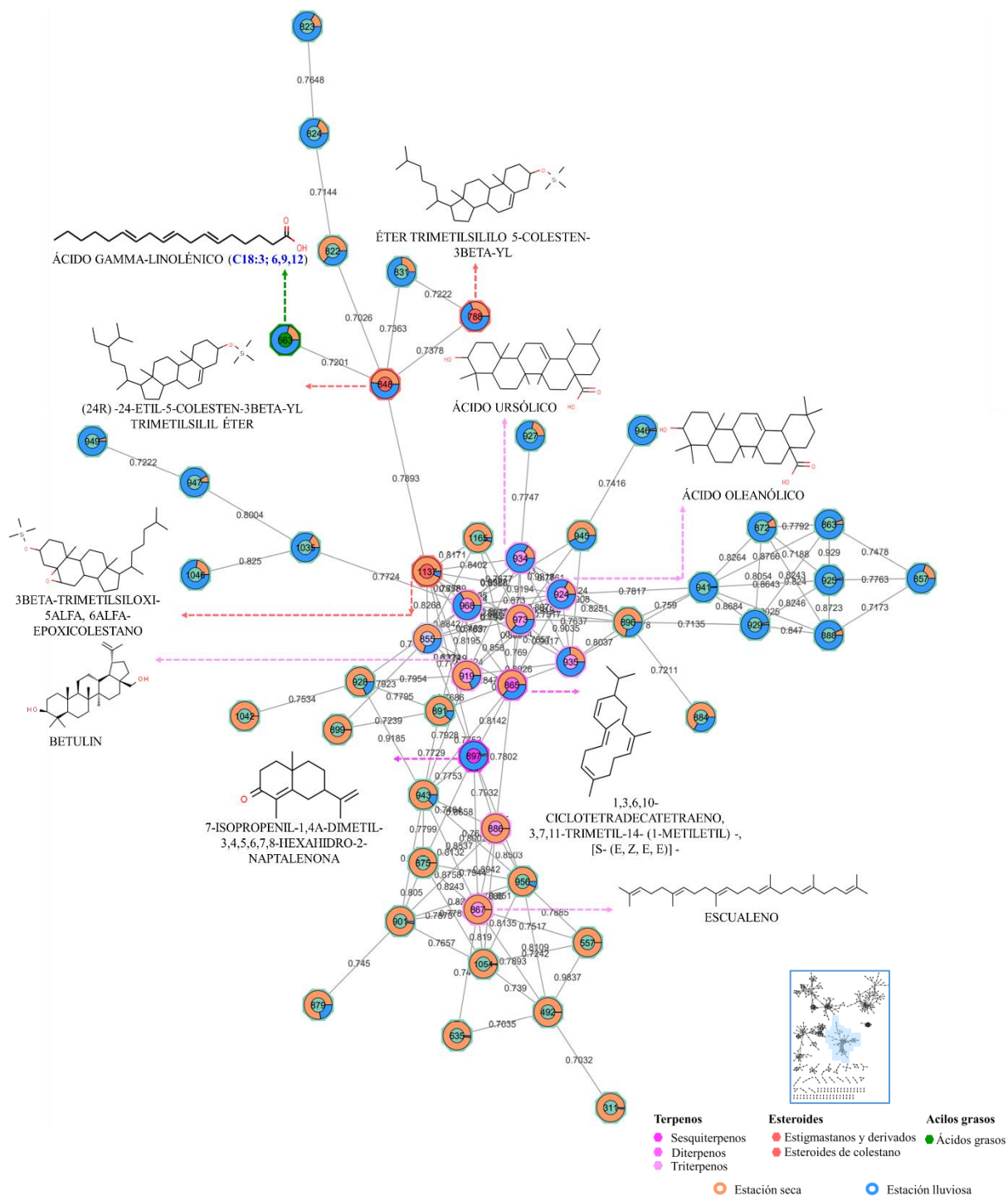
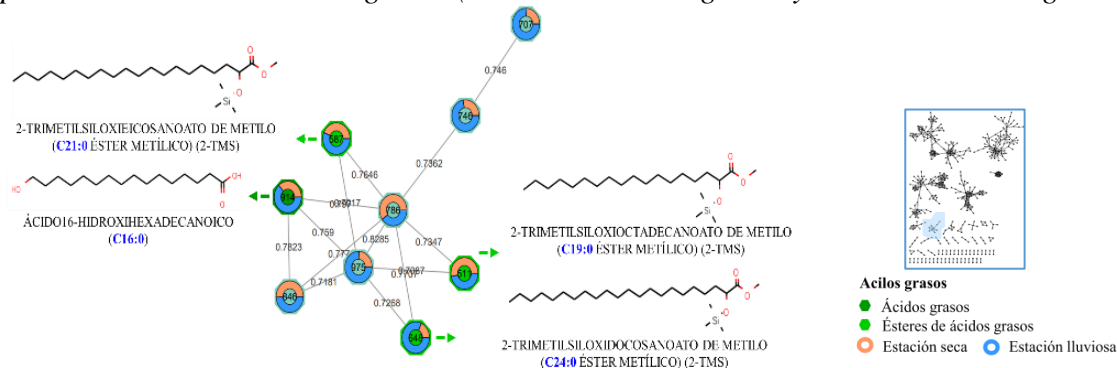
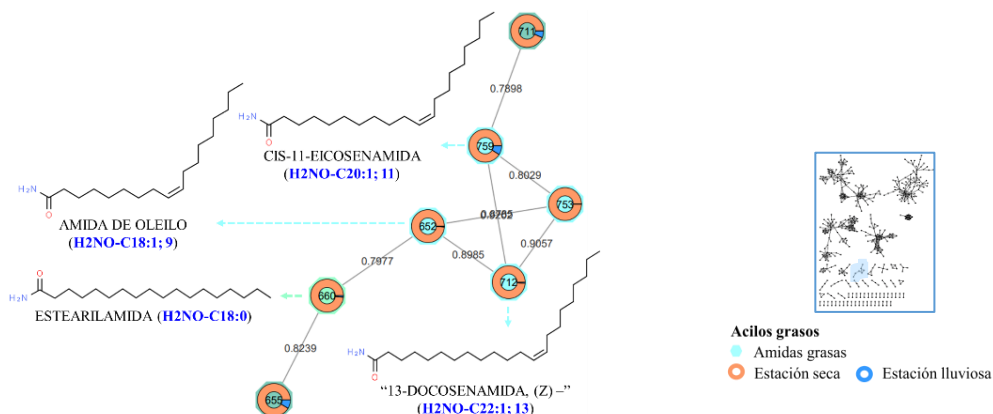


Figura 16

Representación gráfica de la abundancia espectral de cada metabolito de la FM7, los cuales pertenecen a la clase acilos grasos (subclases: ácidos grasos y ésteres de ácidos grasos).

**Figura 17**

Representación gráfica de la abundancia espectral de cada metabolito de la FM8, los cuales pertenecen a la clase acilos grasos (amida grasa) y ácidos carboximídicos.

**Figura 18**

Representación gráfica de la abundancia espectral de cada metabolito de la FM13, los cuales pertenecen a la clase acilos grasos (ácidos grasos).

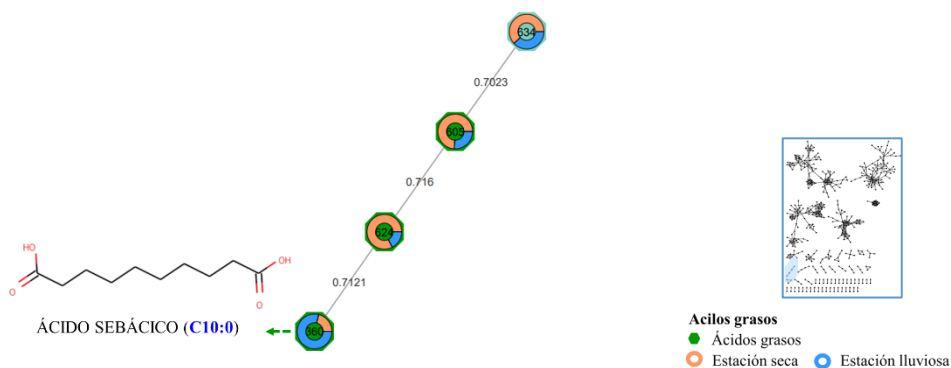
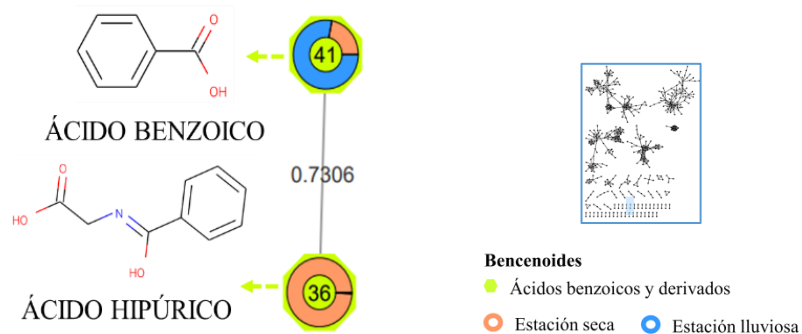


Figura 19

Representación gráfica de la abundancia espectral de cada metabolito de la FM29, los cuales pertenecen al grupo químico de los bencenoides.

**Figura 20**

Representación gráfica de la abundancia espectral de cada metabolito de la FM31, los cuales pertenecen al grupo químico de los bencenoides y la clase benzofuranos.

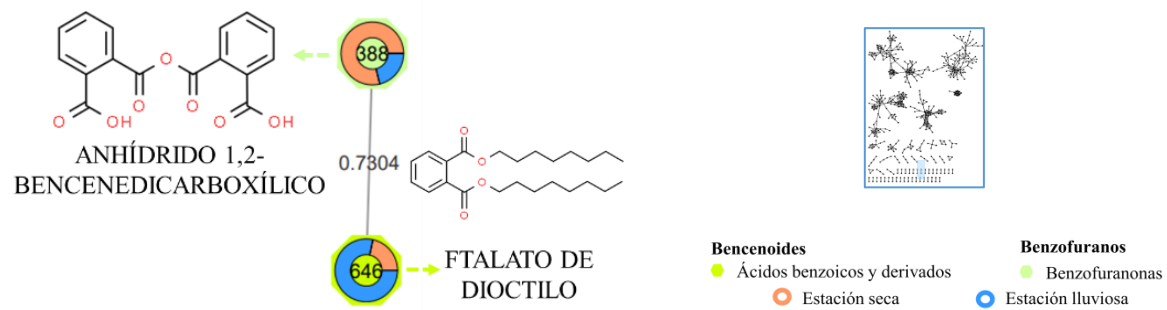
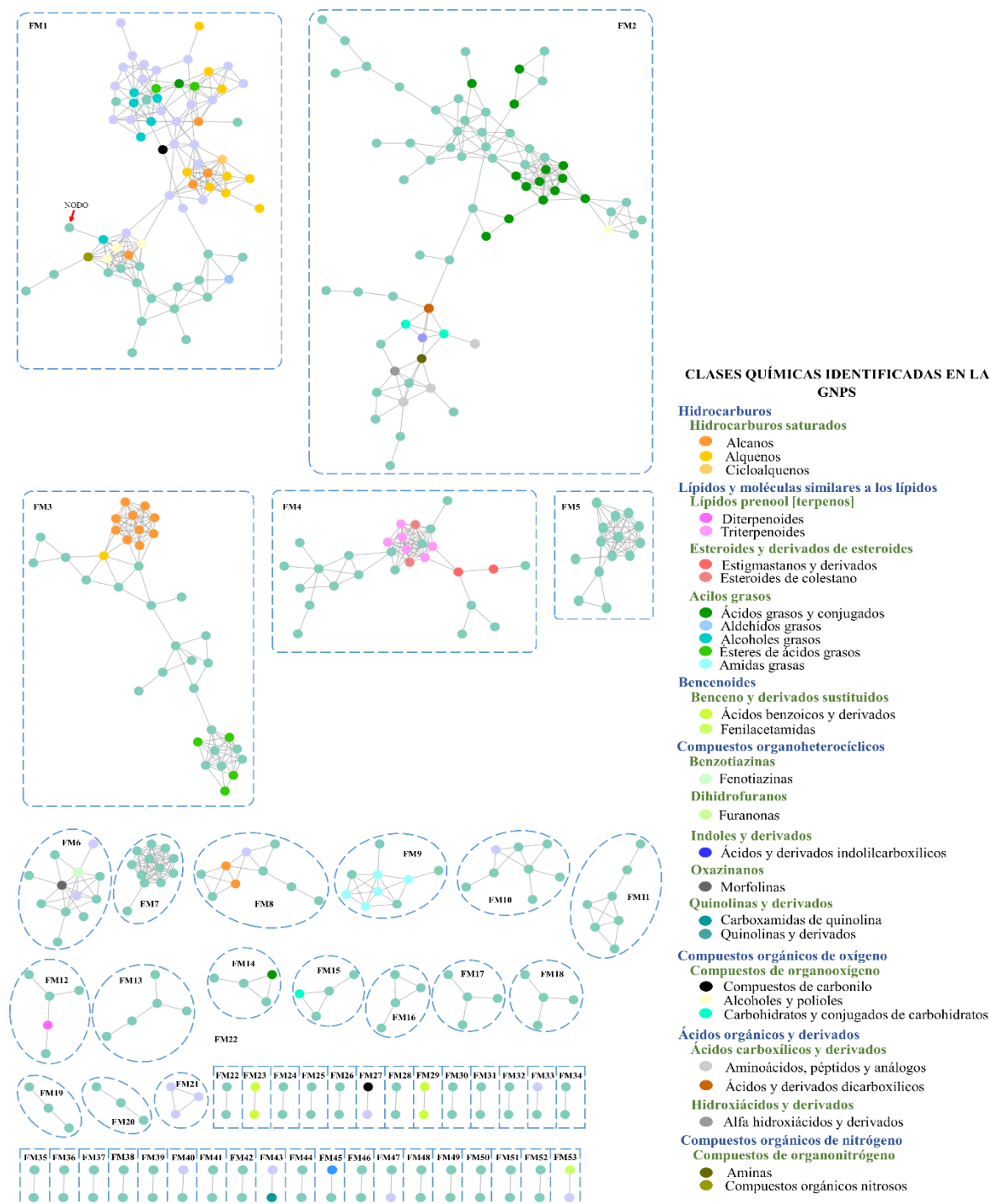


Figura 21

Mapa de redes moleculares generada para *Eugenia excelsa*.



Nota. FM: Familia molecular; los puntos representan los nodos y los colores representan las clases químicas.

Figura 22

Representación gráfica de la abundancia espectral de cada metabolito de la FM1, los cuales pertenecen a la clase de acilos grasos (subclases: ácidos grasos, aldehídos grasos, alcoholes grasos y ésteres de ácidos grasos), hidrocarburos (subclases: alquenos, alcanos, cicloalquenos), compuestos de organooxígeno y compuestos de organonitrógeno.

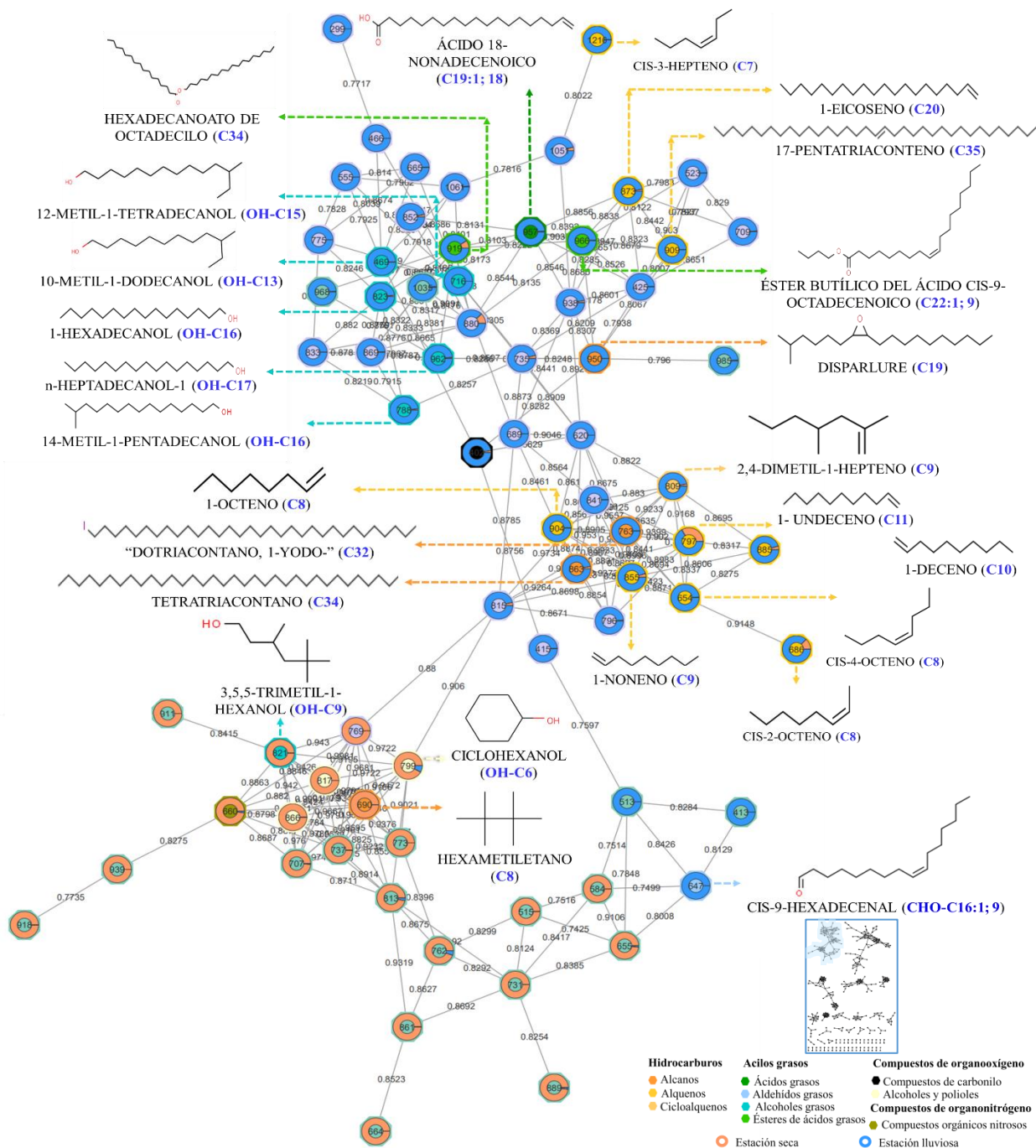


Figura 23

Representación gráfica de la abundancia espectral de cada metabolito de la FM2, los cuales pertenecen a la clase de acilos grasos (subclase:ácidos grasos), y compuestos de organooxígeno.

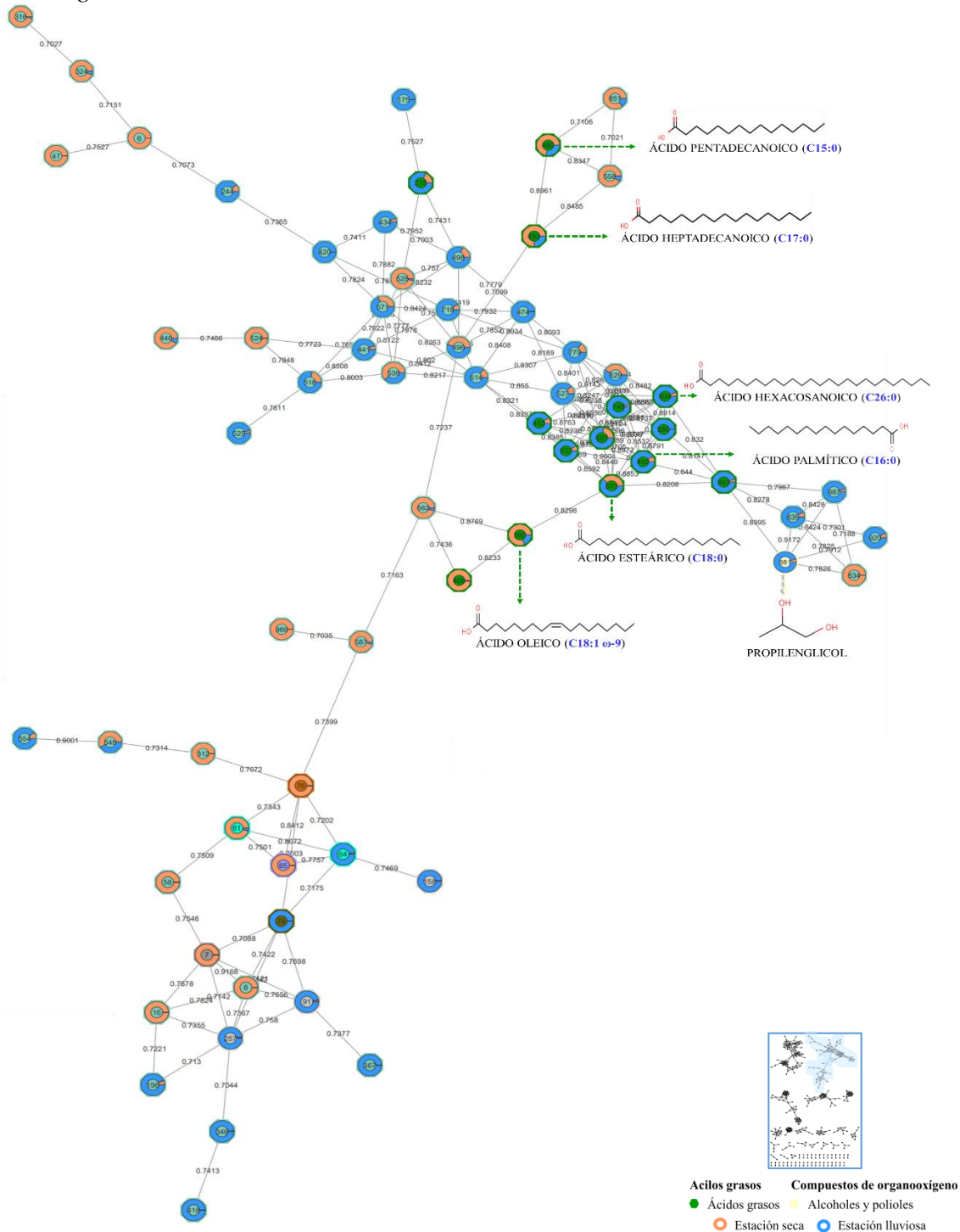


Figura 24

Representación gráfica de la abundancia espectral de cada metabolito de la FM3, los cuales pertenecen a la clase hidrocarburos (subclases: alcanos, alquenos) y acilos grasos (subclases: esteres de ácidos grasos).

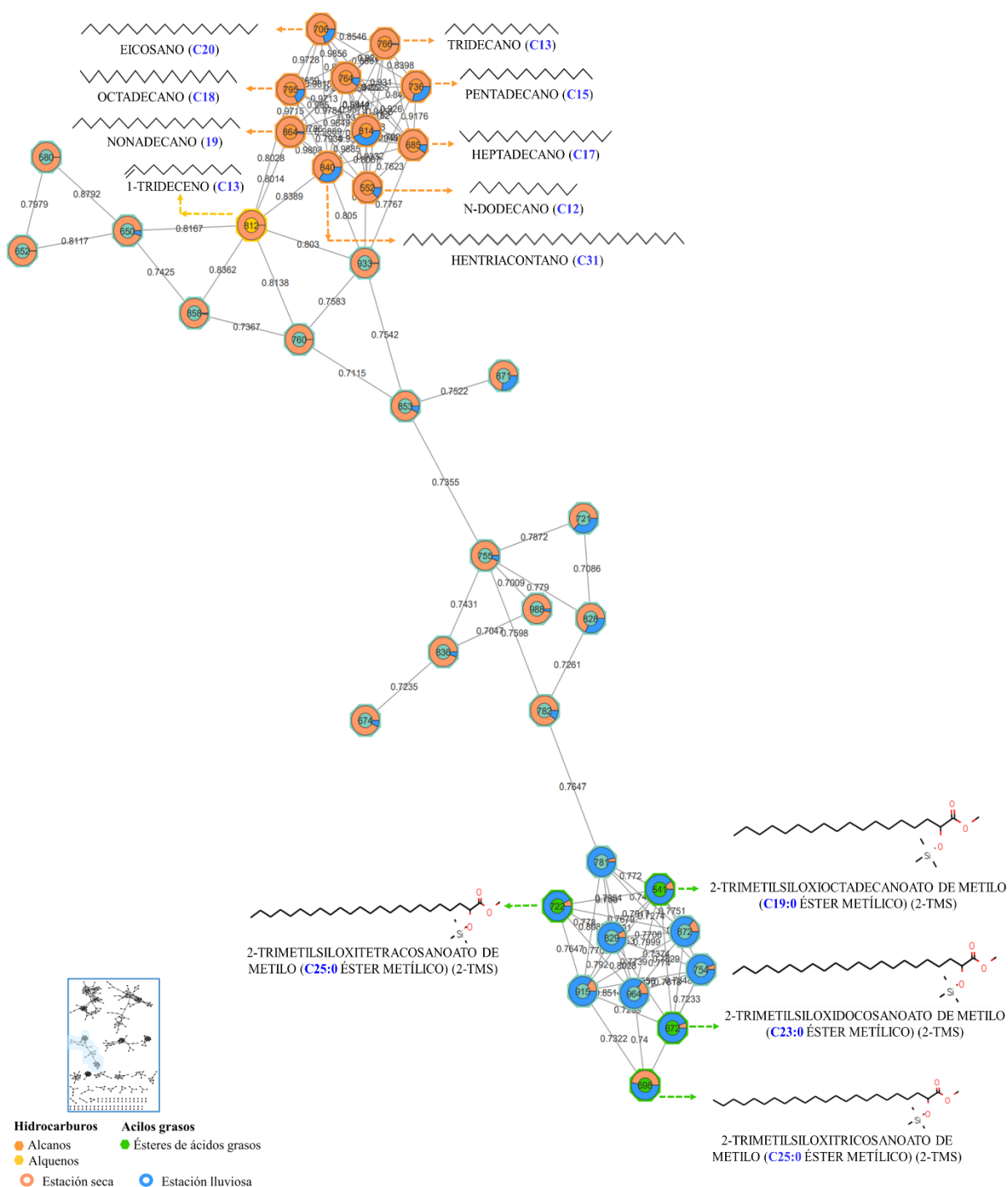
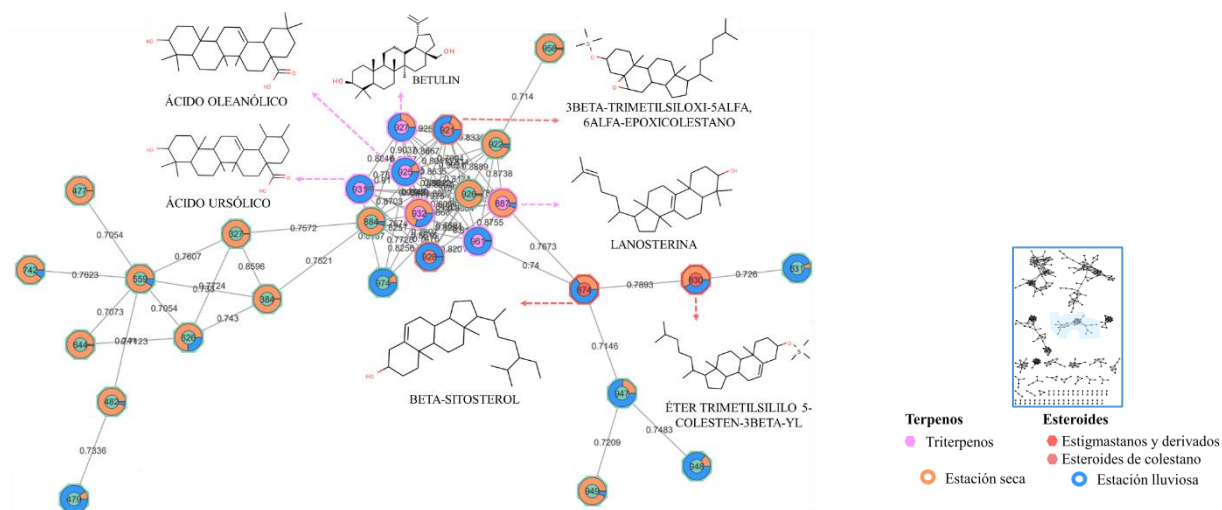


Figura 25

Representación gráfica de la abundancia espectral de cada metabolito de la FM4, los cuales pertenecen a la clase de terpenos (subclase: triterpenos) y esteroides.

**Figura 26**

Representación gráfica de la abundancia espectral de cada metabolito de la FM7, los cuales pertenecen a la clase hidrocarburos (subclase: alcanos).

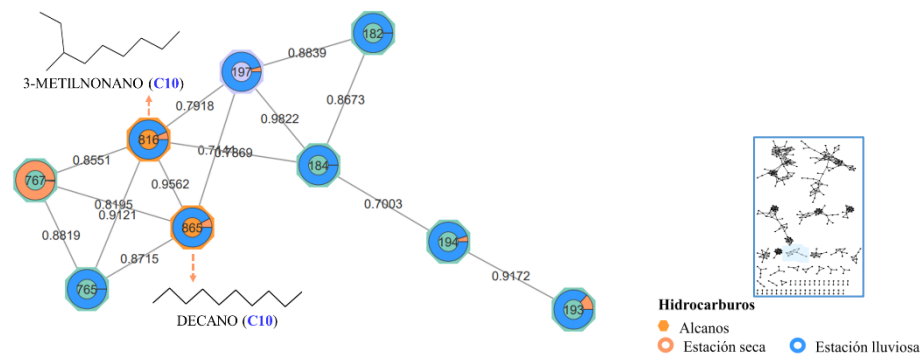
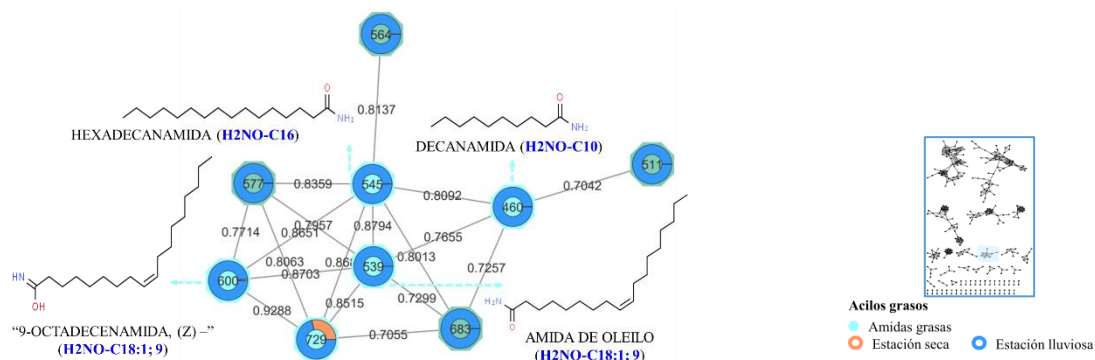


Figura 27

Representación gráfica de la abundancia espectral de cada metabolito de la FM8, los cuales pertenecen a la clase de acilos grasos (subclase: amidas grasas).

**Figura 28**

Representación gráfica de la abundancia espectral de cada metabolito pertenecientes a la FM23 (A) y FM29 (B), identificándose al grupo químico de los bencenoides.

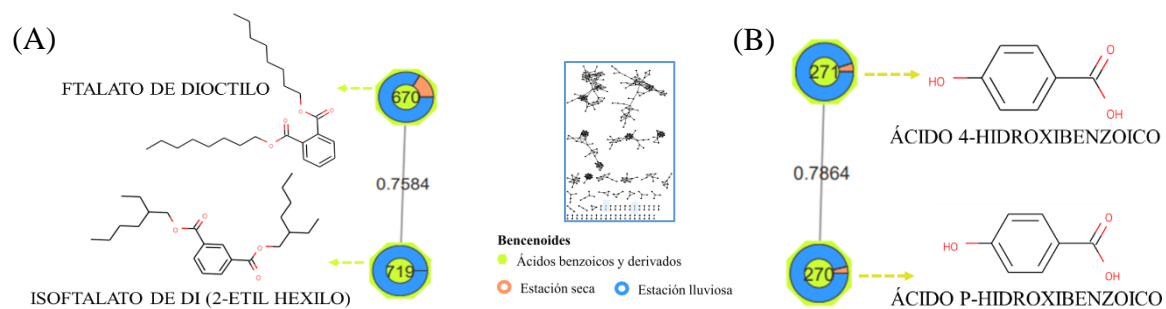
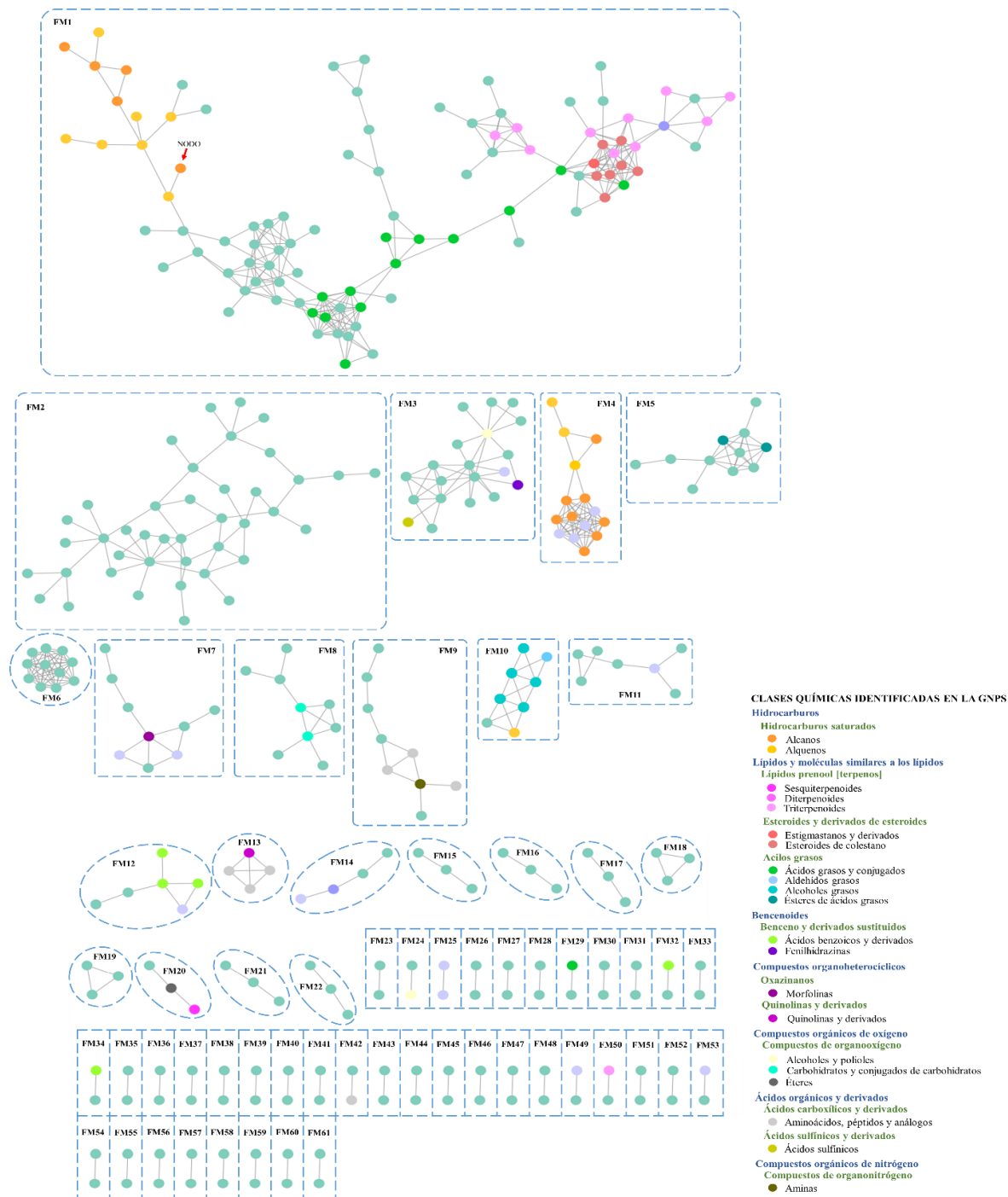


Figura 29

Mapa de redes moleculares generada para *Guarea macrophylla*.



Nota. FM: Familia molecular; los puntos representan los nodos y los colores representan las clases químicas.

Figura 30

Representación gráfica de la abundancia espectral de cada metabolito de la FM1, los cuales pertenecen a las clases de los hidrocarburos (subclases: alcanos y alquenos), acilos grasos (subclase: ácidos grasos), terpenos (sesqui-, triterpenos) y esteroides.

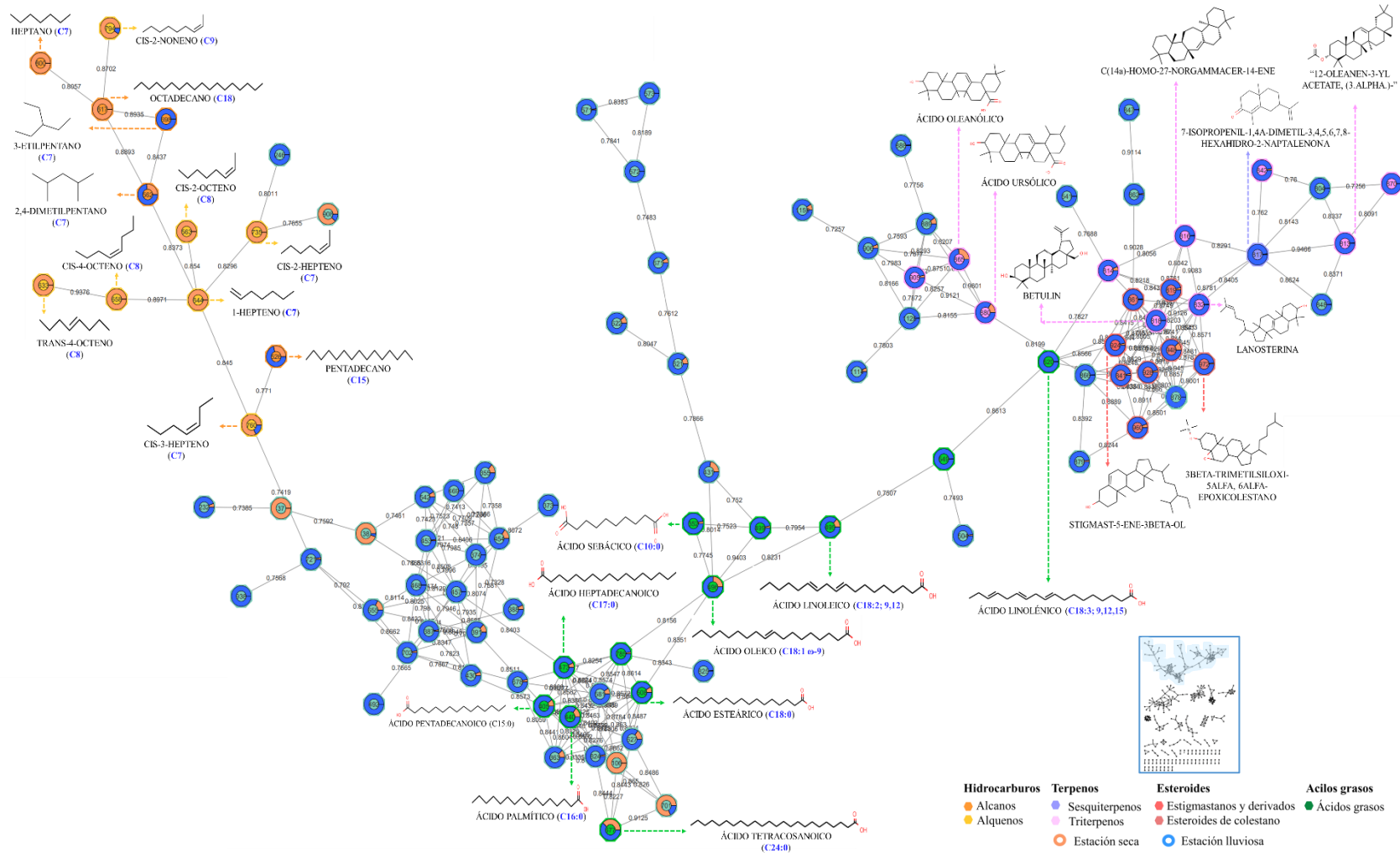
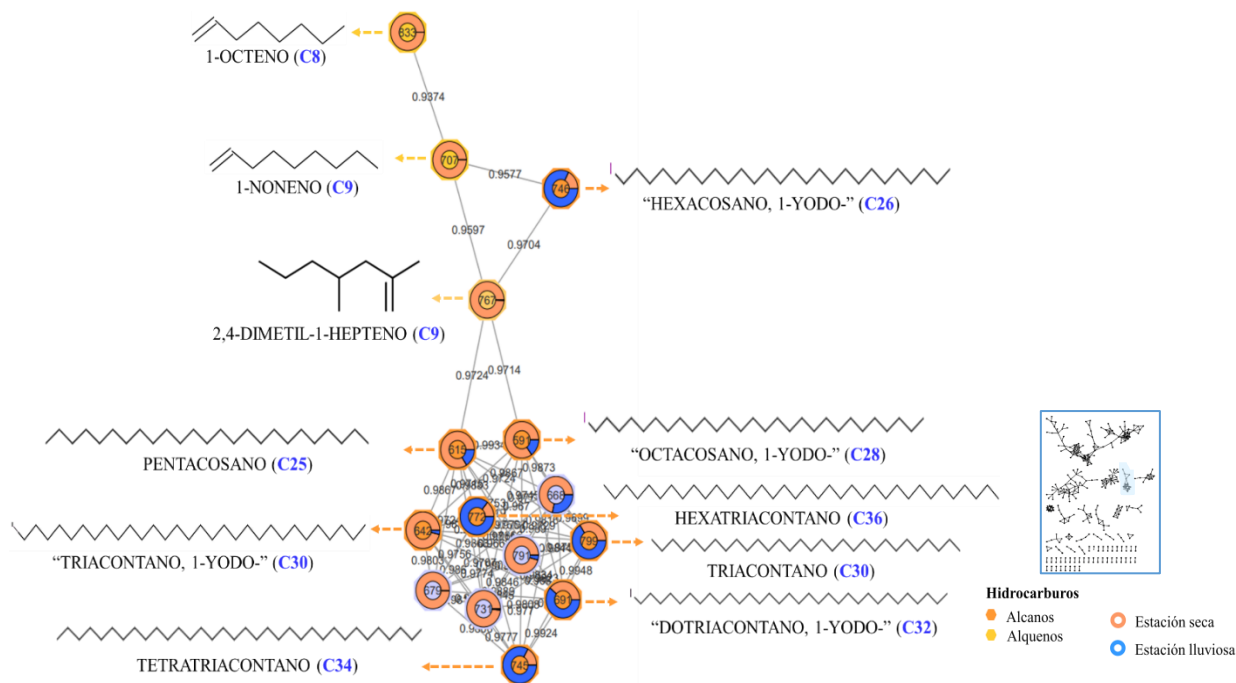


Figura 31

Representación gráfica de la abundancia espectral de cada metabolito perteneciente a la FM3, identificándose a la clase de hidrocarburos y sus subclases: alcanos y alquenos.

**Figura 32**

Representación gráfica de la abundancia espectral de cada metabolito perteneciente a la FM5, identificándose a la clase de acilos grasos y su subclase: ésteres de ácidos grasos.

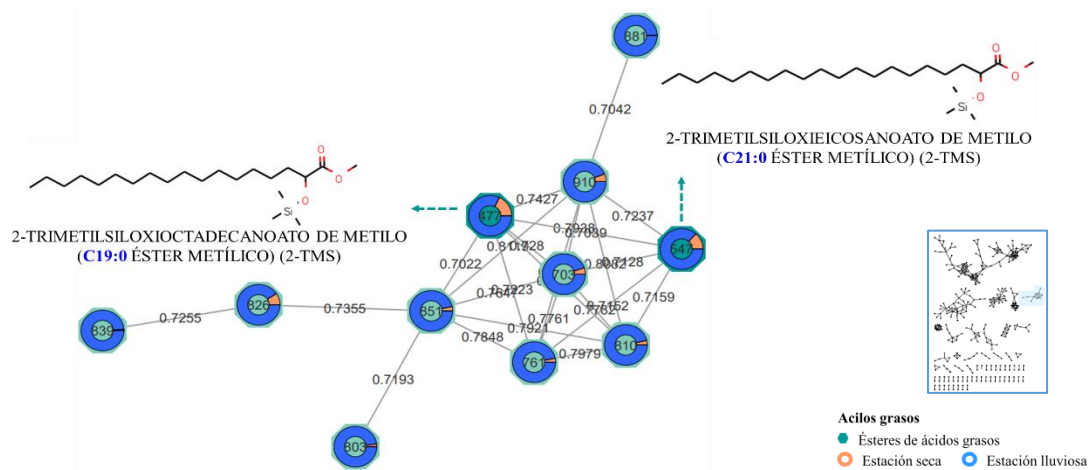
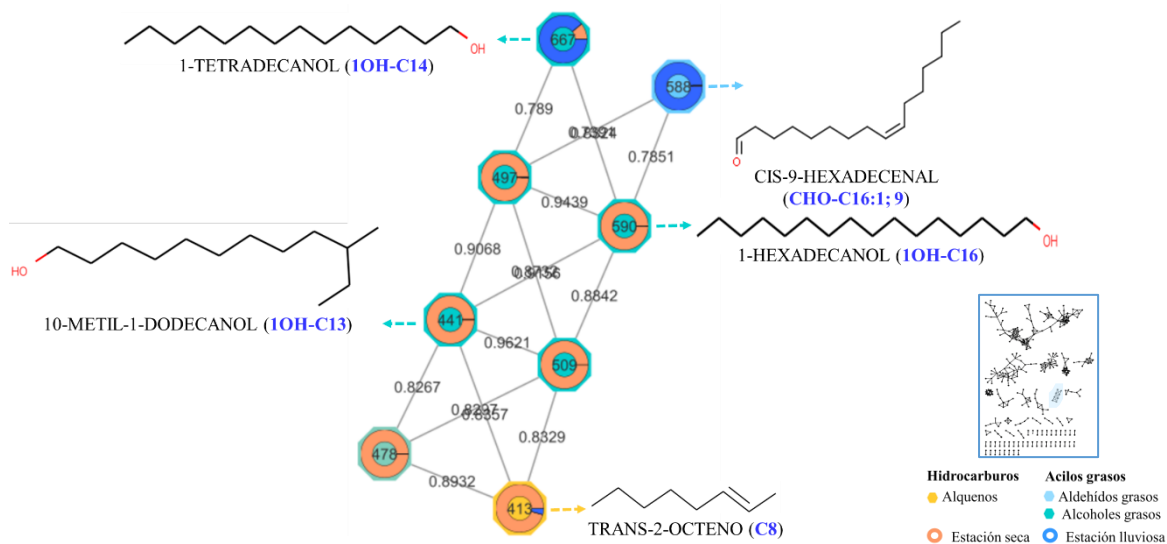


Figura 33

Representación gráfica de la abundancia espectral de cada metabolito perteneciente a la FM10, identificándose a la clase de acilos grasos (subclases: alcoholes grasos y aldehídos grasos) e hidrocarburo.

**Figura 34**

Representación gráfica de la abundancia espectral de cada metabolito pertenecientes a la FM12, identificándose al grupo químico de los bencenoides.

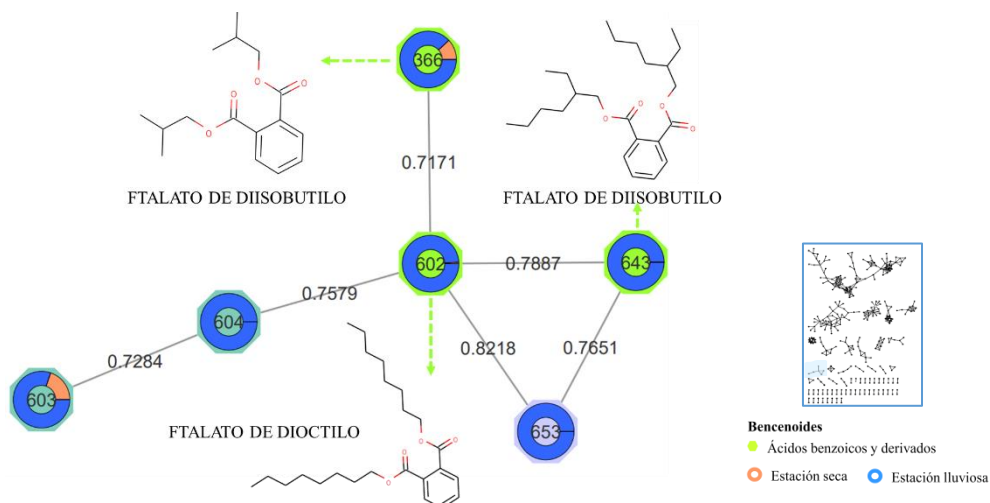
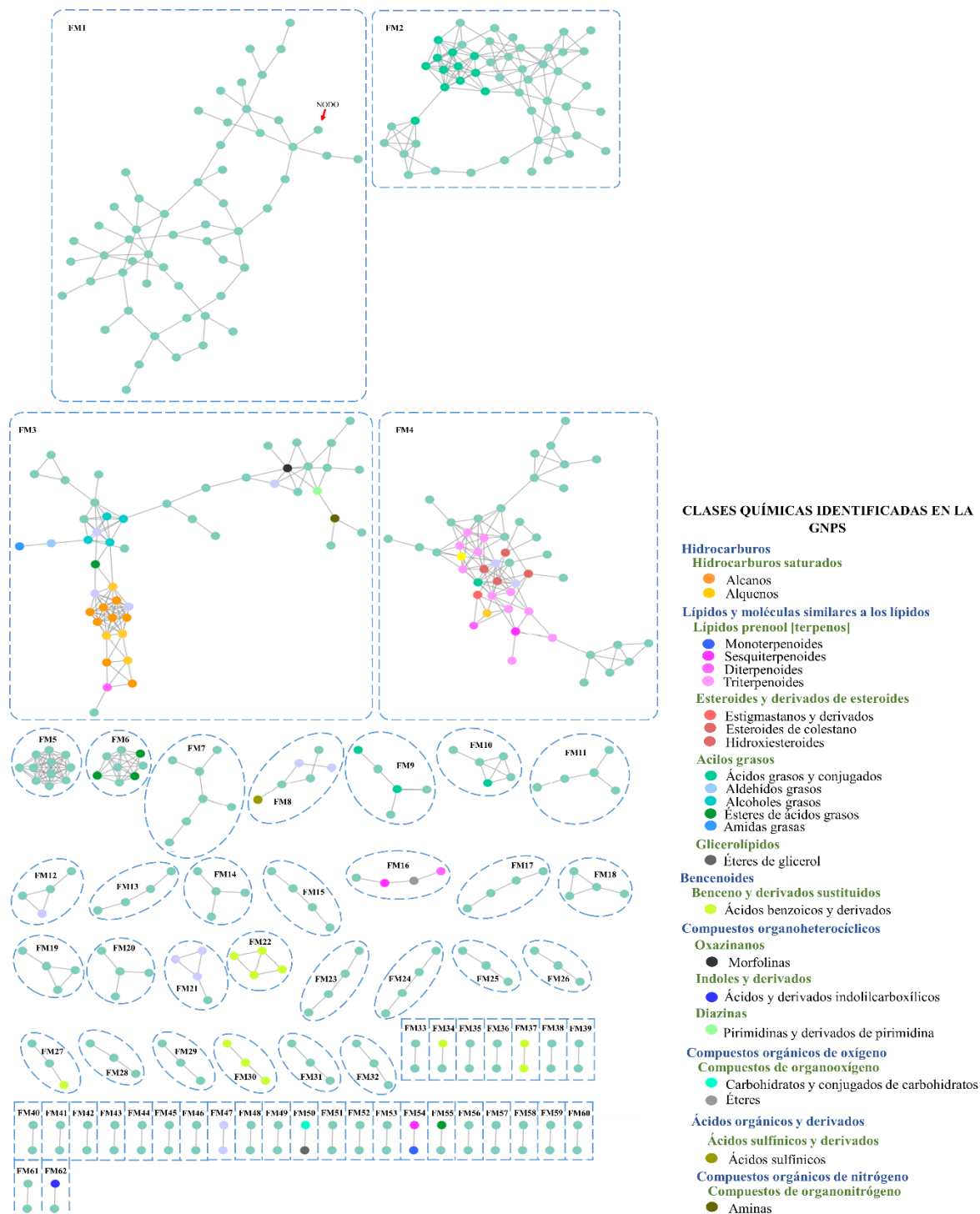


Figura 35

Mapa de redes moleculares generada para *Miconia cabucu*.



Nota. FM: Familia molecular; los puntos representan los nodos y los colores representan las clases químicas.

Figura 37

Representación gráfica de la abundancia espectral de cada metabolito de la FM4, los cuales pertenecen a la clase terpenos (subclases: sesqui-, diter- y triterpenos) y esteroides, principalmente.

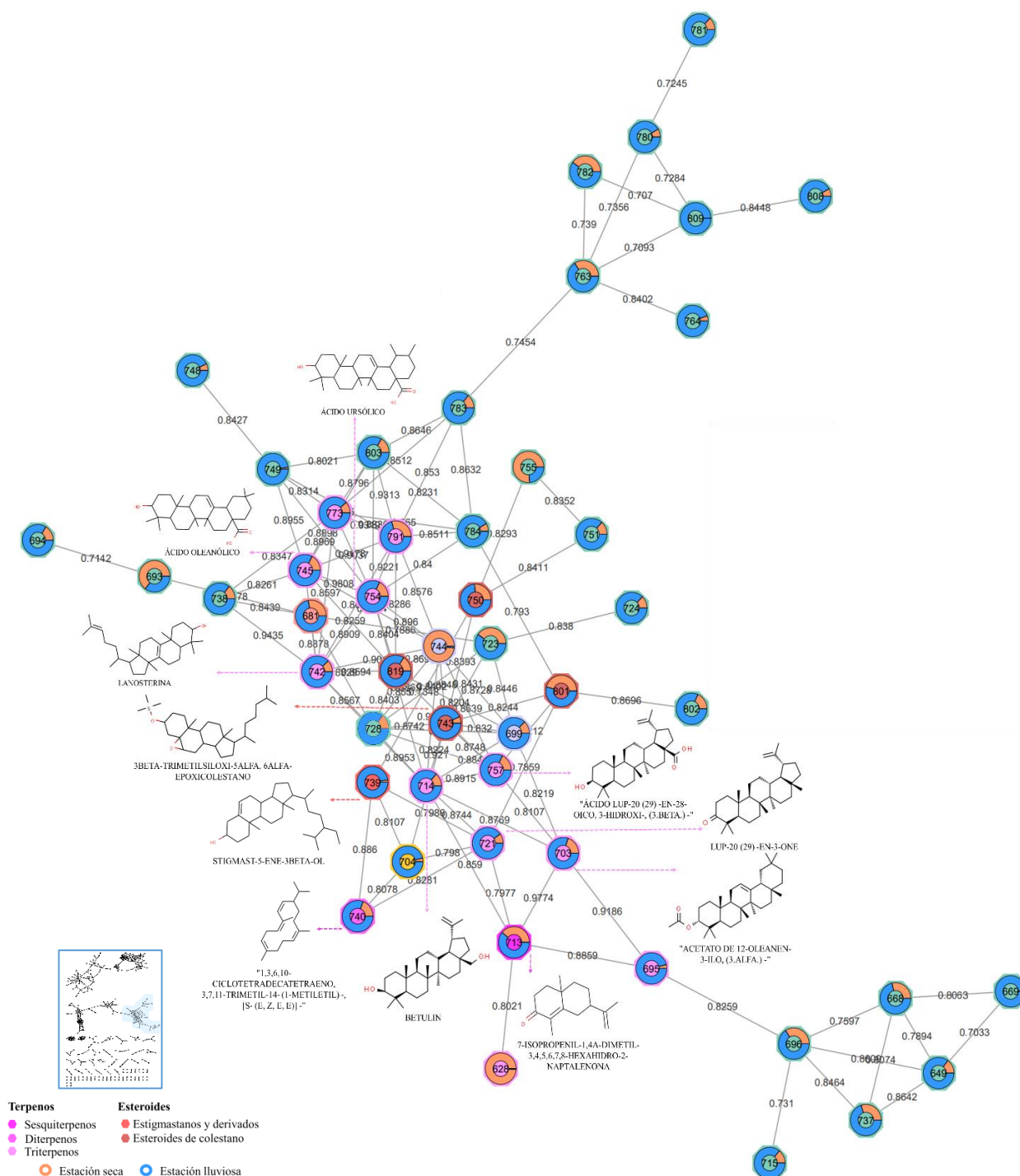


Figura 41

Mapa de redes moleculares generada para *Solanum granuloso-leprosum*.



Nota. FM: Familia molecular; los puntos representan los nodos y los colores representan las clases químicas.

Figura 42

Representación gráfica de la abundancia espectral de cada metabolito de la FM1, los cuales pertenecen a la clase de acilos grasos y su subclase: ácidos grasos.

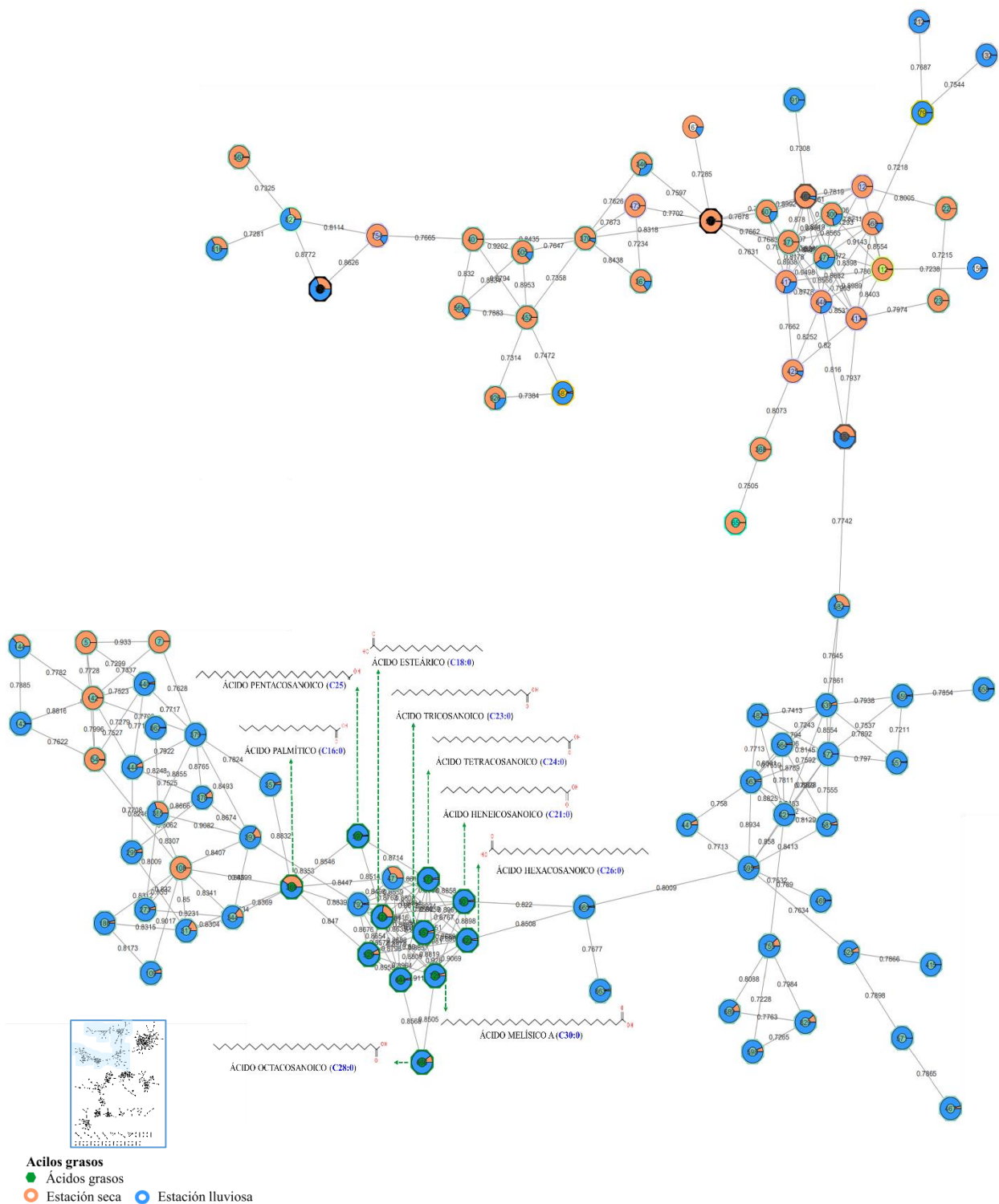


Figura 43

Representación gráfica de la abundancia espectral de cada metabolito de la FM3, los cuales pertenecen a la clase de hidrocarburos (subclases: alcanos y alquenos), acilos grasos (subclases: alcoholes grasos, aldehídos y amidas grasos) y compuestos de organooxígeno

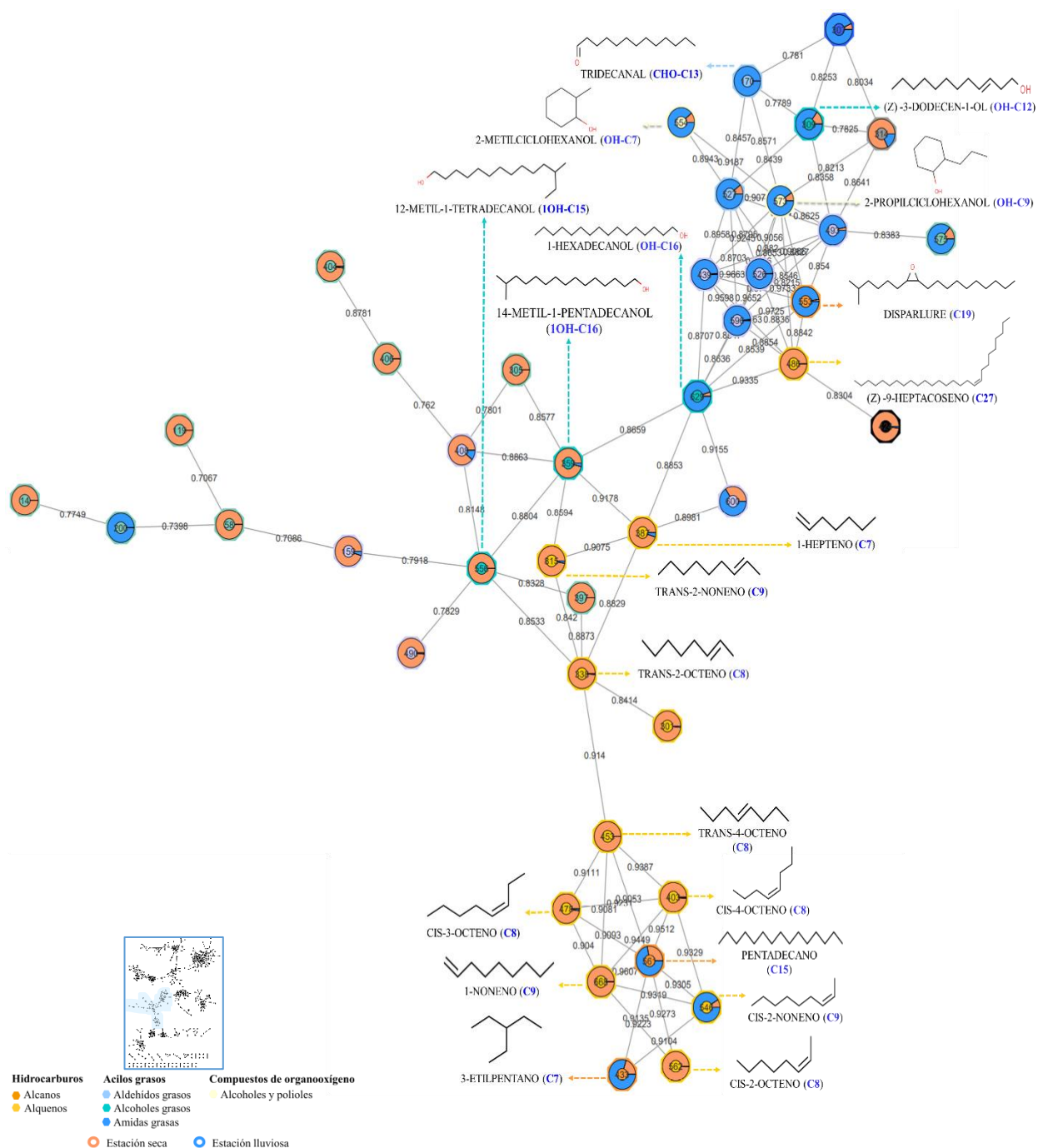
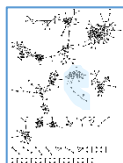
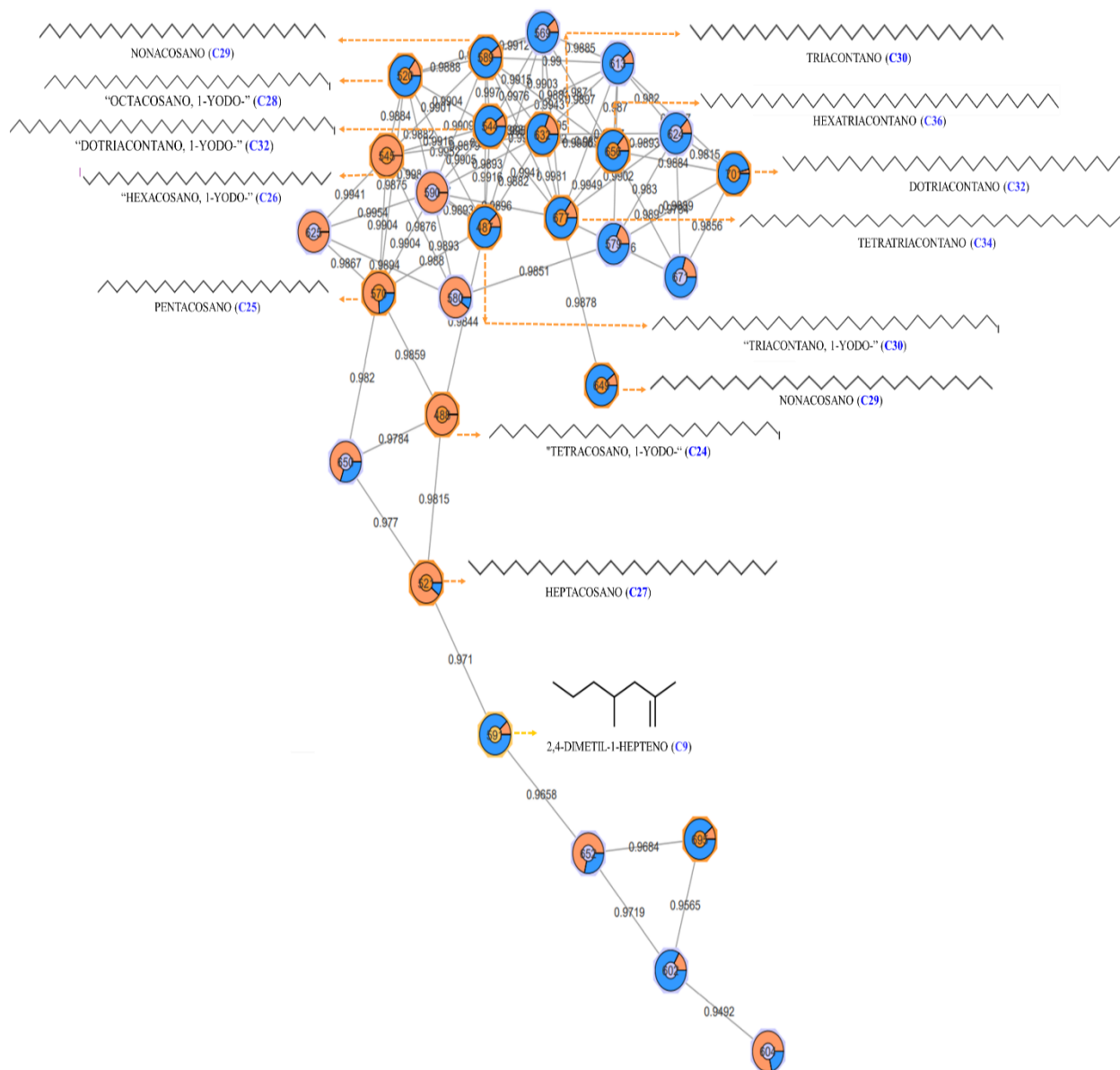


Figura 44

Representación gráfica de la abundancia espectral de cada metabolito de la FM4, los cuales pertenecen a la clase de hidrocarburos y sus subclases: alcanos y cicloalquenos.

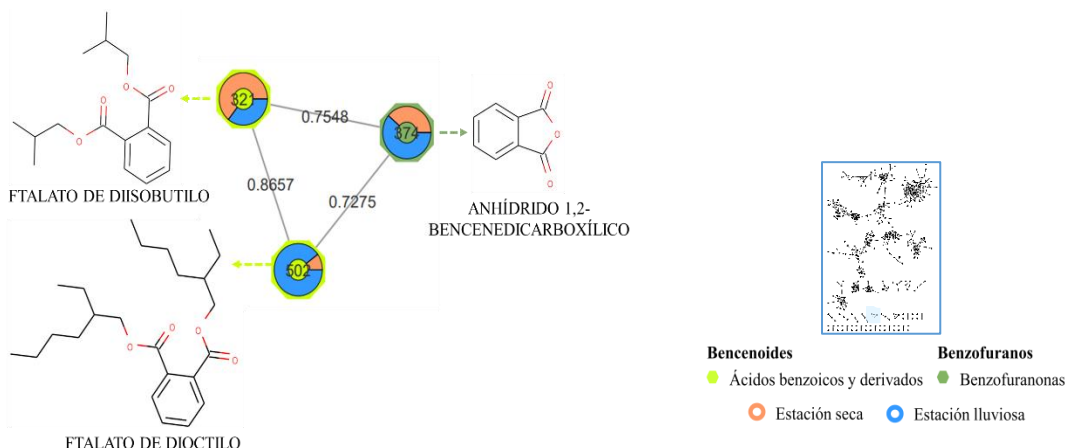


Hidrocarburos

- Alcanos
- Cicloalquenos
- Estación seca
- Estación lluviosa

Figura 46

Representación gráfica de la abundancia espectral de cada metabolito de la FM17, los cuales pertenecen al grupo químico de los bencenoides y la clase benzofuranos.



B. Identificar los contaminantes atmosféricos a partir de una biblioteca de espectros de fragmentación de ceras foliares epicuticulares obtenidas de árboles de la Reserva del PEFI durante las estaciones verano e invierno, en la plataforma de GNPS.

4.2 Resultados de las redes moleculares de los contaminantes presentes en las ceras foliares epicuticulares del PEFI

4.2.1 Ftalatos

Durante la caracterización química de las distintas ceras foliares epicuticulares, a través de las redes moleculares de la GNPS, se logró identificar a un grupo de ftalatos, encontrándose en *A. sidifolia* a ftalato de dioctilo y ftalato de diisobutilo; en *A. intermedia* a ftalato de dioctilo; *E. excelsa* a ftalato de dioctilo; *G. macrophylla* a ftalato de dioctilo y ftalato de diisobutilo; *M. cabucu* a ftalato de butilo isodecilo, ftalato de diamilo y ftalato de dioctilo; y *S. granuloso-leprosum* a ftalato de diisobutilo. Adicionalmente, la concentración de estos posibles contaminantes eran mayores en la estación lluviosa.

4.2.2 Compuestos orgánicos nitrogenados

Además, se identificó en las diferentes muestras otro grupo de compuestos químicos como un posible contaminante, denominado compuestos orgánicos nitrogenados, los cuales integraban a la dietanolamina y diisobutilnitrosoamina.

Finalmente, para más detalle de los contaminantes ver los anexos D, E, F, G, H y I.

C. Identificar los factores de estrés ambiental (meteorológicos y contaminantes atmosféricos) que inducen a cambios estacionales sobre el contenido de sus principales clases químicas de las ceras foliares epicuticulares, a partir de las identificaciones de la GNPS.

Aunque la identificación de los posibles metabolitos o componentes químicos encontrados en las ceras foliares epicuticulares del PEFI, obtenidas de las redes moleculares de la GNPS, colaboran en reportar lo que se está expresando en las células vegetales de las seis especies arbóreas con relación al espacio donde se están desarrollando, esta información por sí sola no fue suficiente para obtener una visión general del impacto que causan los factores de estrés ambiental sobre el contenido de las principales clases químicas de las ceras foliares epicuticulares. Es por eso por lo que se propuso un análisis de datos metabolómicos e integración de datos ambientales.

A continuación, se presentarán los resultados de aquellos pasando por la organización de los datos, métodos de preprocesamiento y técnicas analíticas.

4.3 Análisis descriptivo

Antes de empezar cualquier evaluación sobre los datos metabolómicos, fue importante elaborar una base de datos inicial que se obtuvo de la deconvolución (picos de áreas) y las redes moleculares (identificaciones), a partir de ello se realizó un análisis descriptivo inicial basado en las pruebas estadísticas básicas, obteniendo los siguientes resultados:

Tabla 5

Estadística descriptiva para cada clase química, separado por especies arbóreas

| Clase química | Especie | Estación seca | | | Estación lluviosa | | |
|---------------------|---------|---------------|-------------|------|-------------------|-------------|------|
| | | Media | SE | CV | Media | SE | CV |
| Alcanos | AL | 486356.24 | 319699.77 | 0.66 | 7860444.41 | 14119010.66 | 1.80 |
| | AM | 8401425.14 | 15447834.59 | 1.84 | 854357.73 | 671574.77 | 0.79 |
| | EU | 5358269.25 | 6526390.23 | 1.22 | 13674285.33 | 13857335.17 | 1.01 |
| | GU | 6650154.70 | 10228570.87 | 1.54 | 17476844.71 | 6290886.72 | 0.36 |
| | MI | 308657.47 | 256307.50 | 0.83 | 4539625.27 | 4762237.98 | 1.05 |
| | SO | 32995612.31 | 36437740.26 | 1.10 | 174351951.47 | 57311839.99 | 0.33 |
| Alquenos | AL | 50085.36 | 34368.21 | 0.69 | 108406.27 | 164517.66 | 1.52 |
| | AM | 816639.26 | 1560303.02 | 1.91 | 236971.14 | 421326.44 | 1.78 |
| | EU | 60742.20 | 93622.84 | 1.54 | 191858.91 | 242849.48 | 1.27 |
| | GU | 80610.08 | 131121.75 | 1.63 | 670.24 | 789.35 | 1.18 |
| | MI | 120861.89 | 51331.18 | 0.42 | 442446.69 | 330094.68 | 0.75 |
| | SO | 108965.80 | 102272.60 | 0.94 | 372616.21 | 192311.84 | 0.52 |
| Ácidos grasos | AL | 1173582.48 | 1218706.42 | 1.04 | 5149186.56 | 3777525.23 | 0.73 |
| | AM | 5062714.45 | 6065940.55 | 1.20 | 5427180.06 | 3334745.37 | 0.61 |
| | EU | 2266086.57 | 2903413.61 | 1.28 | 3508859.65 | 2915203.86 | 0.83 |
| | GU | 1842132.15 | 1248121.23 | 0.68 | 14611030.94 | 5712100.16 | 0.39 |
| | MI | 8204368.10 | 7993394.18 | 0.97 | 19568481.85 | 3528546.52 | 0.18 |
| | SO | 4255785.52 | 6906652.80 | 1.62 | 12554333.61 | 3290640.96 | 0.26 |
| Amidas grasas | AL | 21943.74 | 37157.39 | 1.69 | 16.77 | 36.27 | 2.16 |
| | AM | 2776665.19 | 5441568.32 | 1.96 | 41643.60 | 54612.62 | 1.31 |
| | EU | 129919.24 | 70942.83 | 0.55 | 641580.85 | 995122.31 | 1.55 |
| | GU | NA | NA | NA | NA | NA | NA |
| | MI | NA | NA | NA | NA | NA | NA |
| | SO | NA | NA | NA | NA | NA | NA |
| Aldehídos grasos | AL | 79950.21 | 140335.81 | 1.75 | 154476.46 | 93434.37 | 0.60 |
| | AM | 182536.32 | 348329.97 | 1.91 | 15276.45 | 33139.50 | 2.17 |
| | EU | 0.00 | 0.00 | IN | 79871.90 | 136842.26 | 1.71 |
| | GU | 2235.42 | 2862.01 | 1.28 | 223540.87 | 45297.06 | 0.20 |
| | MI | 5255.06 | 10510.13 | 2.00 | 227801.15 | 149487.59 | 0.66 |
| | SO | 684.31 | 1149.75 | 1.68 | 23041.11 | 5796.96 | 0.25 |
| Ésteres | AL | 19939259.82 | 16385160.81 | 0.82 | 58943225.55 | 35070942.33 | 0.59 |
| | AM | 201923.42 | 223777.62 | 1.11 | 243377.80 | 219821.31 | 0.90 |
| | EU | 88160.38 | 126086.49 | 1.43 | 876537.49 | 1407965.13 | 1.61 |
| | GU | 44307.79 | 39674.78 | 0.90 | 221792.20 | 74120.49 | 0.33 |
| | MI | 267010.55 | 154519.20 | 0.58 | 500249.95 | 199540.05 | 0.40 |
| | SO | 23082.91 | 46045.12 | 1.99 | 151774.00 | 124103.00 | 0.82 |
| Alcoholes primarios | AL | 27153.79 | 40508.64 | 1.49 | 14381.16 | 21284.90 | 1.48 |
| | AM | 113997.09 | 243279.78 | 2.13 | 415.98 | 620.13 | 1.49 |
| | EU | 1310.94 | 2268.95 | 1.73 | 94169.63 | 156703.11 | 1.66 |
| | GU | 183200.76 | 358016.77 | 1.95 | 14648.64 | 27363.78 | 1.87 |
| | MI | 7348.42 | 5507.69 | 0.74 | 19050.54 | 17298.64 | 0.91 |
| | SO | 202139.48 | 447537.11 | 2.21 | 6562.41 | 3669.90 | 0.56 |

| | | | | | | | |
|--|----|-------------|-------------|------|-------------|-------------|------|
| Alcoholes secundarios | AL | NA | NA | NA | NA | NA | NA |
| | AM | 18226.28 | 38431.78 | 2.11 | 1295.34 | 734.92 | 0.57 |
| | EU | 12095566.10 | 17798209.18 | 1.47 | 20051.51 | 31711.71 | 1.58 |
| | GU | NA | NA | NA | NA | NA | NA |
| | MI | NA | NA | NA | NA | NA | NA |
| | SO | 3100.63 | 6810.23 | 2.20 | 31092.65 | 21827.61 | 0.70 |
| Terpenos | AL | 23876364.27 | 13133147.56 | 0.55 | 48409673.41 | 28502539.86 | 0.59 |
| | AM | 3482203.62 | 5876790.51 | 1.68 | 15366282.81 | 9244946.58 | 0.60 |
| | EU | 6488487.26 | 7687106.33 | 1.18 | 13112172.61 | 12901454.81 | 0.98 |
| | GU | 601380.13 | 1059284.46 | 1.76 | 8346448.83 | 8304204.64 | 0.99 |
| | MI | 10337936.27 | 8433408.26 | 0.81 | 38312127.01 | 13301131.88 | 0.35 |
| | SO | 459462.00 | 922324.30 | 2.01 | 615051.20 | 600212.24 | 0.98 |
| Esteroides | AL | 1681299.32 | 1881544.51 | 1.12 | 7318599.24 | 6292482.98 | 0.86 |
| | AM | 231853.94 | 203851.75 | 0.88 | 196585.51 | 100135.13 | 0.51 |
| | EU | 265675.29 | 287828.46 | 1.08 | 638127.72 | 505886.19 | 0.79 |
| | GU | 73475.21 | 50107.10 | 0.68 | 2495133.76 | 4119039.98 | 1.65 |
| | MI | 794991.40 | 557944.37 | 0.70 | 3270010.46 | 1083605.15 | 0.33 |
| | SO | 507076.11 | 776504.67 | 1.53 | 183890.92 | 135505.91 | 0.74 |
| Bencenoides | AL | 129592.92 | 80160.01 | 0.61 | 1669686.09 | 1906443.67 | 1.14 |
| | AM | 226192.59 | 301205.24 | 1.33 | 806633.09 | 368798.29 | 0.46 |
| | EU | 130058.01 | 189498.34 | 1.45 | 743009.45 | 434008.39 | 0.58 |
| | GU | 35984.39 | 28556.92 | 0.79 | 3151728.64 | 4635393.70 | 1.47 |
| | MI | 293049.62 | 277785.36 | 0.95 | 2146295.64 | 565955.55 | 0.26 |
| | SO | 79565.17 | 83801.61 | 1.05 | 44008.03 | 24636.91 | 0.56 |
| Compuestos orgánicos de nitrógeno | AL | 1067.86 | 2387.80 | 2.24 | 2474749.84 | 1842456.98 | 0.74 |
| | AM | 30949.07 | 65906.97 | 2.13 | 2761507.05 | 1558282.83 | 0.56 |
| | EU | 43186.06 | 69268.21 | 1.60 | 1637385.20 | 1871660.64 | 1.14 |
| | GU | 143110.97 | 274139.17 | 1.92 | 3545810.09 | 339638.64 | 0.10 |
| | MI | 730.52 | 1461.03 | 2.00 | 2026169.52 | 1393364.20 | 0.69 |
| | SO | 16286.82 | 16560.39 | 1.02 | 3861947.12 | 246772.67 | 0.06 |
| Otros | AL | 3073026.57 | 4647990.47 | 1.51 | 12123305.83 | 13024183.82 | 1.07 |
| | AM | 4978586.11 | 8092544.35 | 1.63 | 7241121.59 | 4474320.06 | 0.62 |
| | EU | 12594404.40 | 19961489.21 | 1.59 | 10128212.26 | 6495334.75 | 0.64 |
| | GU | 3951225.29 | 6824070.36 | 1.73 | 8815509.73 | 3712362.69 | 0.42 |
| | MI | 774987.72 | 845814.08 | 1.09 | 14347806.29 | 9157460.70 | 0.64 |
| | SO | 11245017.64 | 12402946.62 | 1.10 | 38327339.91 | 11104462.07 | 0.29 |

Nota. Identificadores de especies: AL = *Alchornea sidifolia*; AM = *Amaioua intermedia*; EU = *Eugenia excelsa*; GU = *Guarea macrophylla*; MI = *Miconia cabucu*; SO = *Solanum granuloso-leprosum*. SD = Desviación estándar; CV = Coeficiente de variación; IN = Indeterminado y NA = valor faltante.

| N° de datos faltantes (<i>missings</i>) | 0 | 0 | 0 | 26 | 0 | 0 | 0 | 16 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
|---|---|---|---|-----------|---|---|---|-------------|---|---|---|---|---|
| Porcentajes de <i>missings</i> (%) | 0 | 0 | 0 | 50 | 0 | 0 | 0 | 30.7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

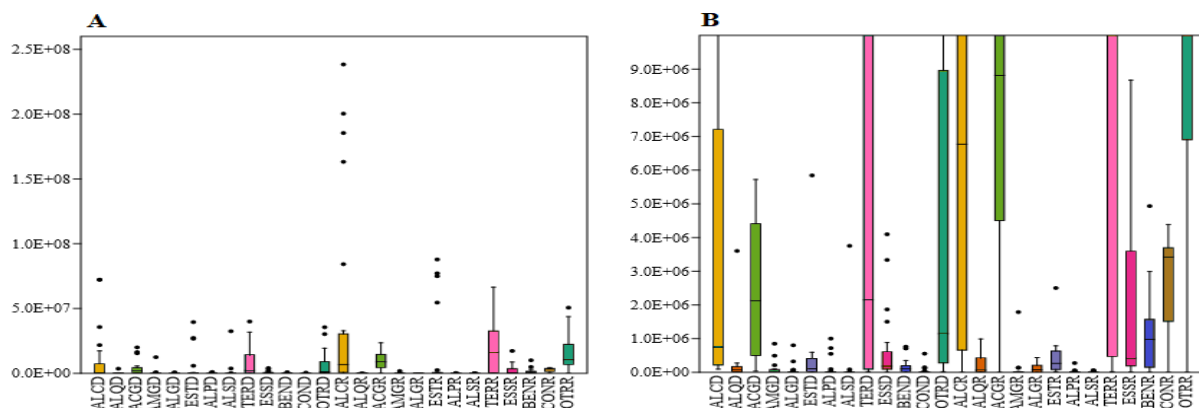
Nota. Identificadores de especies: AL = *Alchornea sidifolia*; AM = *Amaioua intermedia*; EU = *Eugenia excelsa*; GU = *Guarea macrophylla*; MI = *Miconia cabucu*; SO = *Solanum granuloso-leprosum*. Valores en negrita representan los *missings* que superan el 20% de lo permitido.

4.3.2 Gráfica de cajas y bigotes iniciales

Se elaboró una gráfica de cajas y bigotes múltiples que comprendieron las 13 clases químicas disponibles en la base de datos. En la Figura 47 se observó cómo las clases químicas presentaban variabilidad entre ellos y en la estación en la que aparecían; en consecuencia, esto evidenció que fue necesario una transformación y un escalado de datos. De igual manera se elaboraron gráficas de cajas y bigotes para cada clase química hallada en cada especie arbórea; sin embargo, se hizo una selección de algunos gráficos que se presentan en la figura 48 y el resto de las clases se puede observar en el anexo J.

Figura 47

Cajas y bigotes de las clases químicas de las ceras foliares epicuticulares antes del preprocesamiento.



Nota. Identificadores de clases químicas de la estación seca: ALCD = Alcanos; ALQD = Alquenos; ACGD = Ácidos grasos; AMGD = Amidas grasas; ALGD = Aldehídos grasos; ESTD = Ésteres; ALPD = Alcoholes primarios; ALSD = Alcoholes secundarios; TERD = Terpenos; ESSD = Esteroides; BEND = Bencenoides; COND = Compuestos orgánicos nitrogenados; OTRD= Otros compuestos. Identificadores de clases químicas de la estación lluviosa: ALCR = Alcanos; ALQR = Alquenos; ACGR = Ácidos grasos; AMGR = Amidas grasas; ALGR = Aldehídos grasos; ESTR = Ésteres; ALPR = Alcoholes primarios; ALSR = Alcoholes secundarios; TERR= Terpenos; ESSR = Esteroides; BENR = Bencenoides; CONR = Compuestos orgánicos nitrogenados; OTRR = Otros compuestos. A: cajas y bigotes general de todas las clases químicas antes del preprocesamiento; B: cajas y bigotes escalado del grafico general de las clases químicas antes del preprocesamiento.

Los primeras cajas y bigotes de la figura 48 se relacionaron con la clase química alcanos, uno por cada cera epicuticular foliar de cada especie arbórea. En *S. granuloso-leprosum* se evidenció, tanto para la estación seca y lluviosa, una gran dispersión y altos valores comparado con el resto de las especies, especialmente con las ceras foliares epicuticulares de *A. intermedia* de la estación lluviosa y *M. cabucu* de la estación seca, que evidenciaron valores bajos y con datos más próximos. *G. macrophylla* y *M. cabucu* de la estación lluviosa mostraron mejor simetría. La especie donde se percibió más asimetría es en *E. excelsa* de la estación lluviosa, con una asimetría hacia la derecha; es decir sus datos se concentraban más hacia abajo y presentaban una mediana más cercana al primer cuartil. Con respecto al sesgo, se pudo observar que *S. granuloso-leprosum* de la estación lluviosa tuvo un sesgo negativo, ya que la cola de la caja fue más larga hacia los valores bajos, mientras que *A. intermedia* y *G. macrophylla de la estación seca*; *A. sidifolia* y *E. excelsa*, presentaron un sesgo positivo, debido a que la cola de las cajas fue más larga hacia los valores altos.

Respecto a los ácidos grasos, se detectaron variables con mucha dispersión, destacando para la estación seca: *M. cabucu* y *A. intermedia*; y para la estación lluviosa: *G. macrophylla*, *S. granuloso-leprosum* y *M. cabucu*. Por otro lado, *Alchornea sidifolia* parece ser la única especie de la estación seca que presentó valores bajos y menos dispersos con respecto a otras especies de las distintas estaciones. Con respecto a la simetría, destacó *M. cabucu* de la estación lluviosa, ya que tuvo una simetría casi perfecta comparándolo con las demás especies de cada estación. En esta clase también se evidenció en su mayoría sesgos positivos pronunciados para cada estación.

En la clase alcoholes primarios destacaron por sus altos y dispersos valores: *G. macrophylla*, *S. granuloso-leprosum* y *Amaioua intermedia* de la estación seca, respectivamente. Además, destacó la asimetría y sesgos positivos en las especies de la estación seca que destacaban por sus altos valores y dispersión.

Los ésteres se presentaron como un caso atípico, ya que la mayoría de las especies de la estación seca y lluviosa contenían bajísimos valores, es decir, estos valores se mostraron muy pequeños y altamente concentrados, por ello no existía dispersión. Sin embargo, destacaron los valores altos y las semejanzas entre las dispersiones de *A. sidifolia* en cada estación. Asimismo, *A. sidifolia* de la estación seca y lluviosa mostró una simetría y un sesgo negativo. Finalmente, cabe recalcar que a pesar de los valores bajísimos que no se pudieron graficar al inicio de esta caja y bigote, se debió a que *A. sidifolia* presentaba valores extremadamente altos que lograban invisibilizar los valores de las demás especies, por ello se eliminaron sus datos para evidenciar, a través una nueva escala, el grado de dispersión de las demás especies (figura 49).

Sin embargo, a pesar de que este fue un análisis descriptivo inicial y donde no se tomaron en cuenta los valores faltantes, nos permitió evidenciar una razón más del porque fue necesario

ajustar y escalar los valores de la base de datos, con el fin de presentar, más adelante, gráficos muy descriptivos.

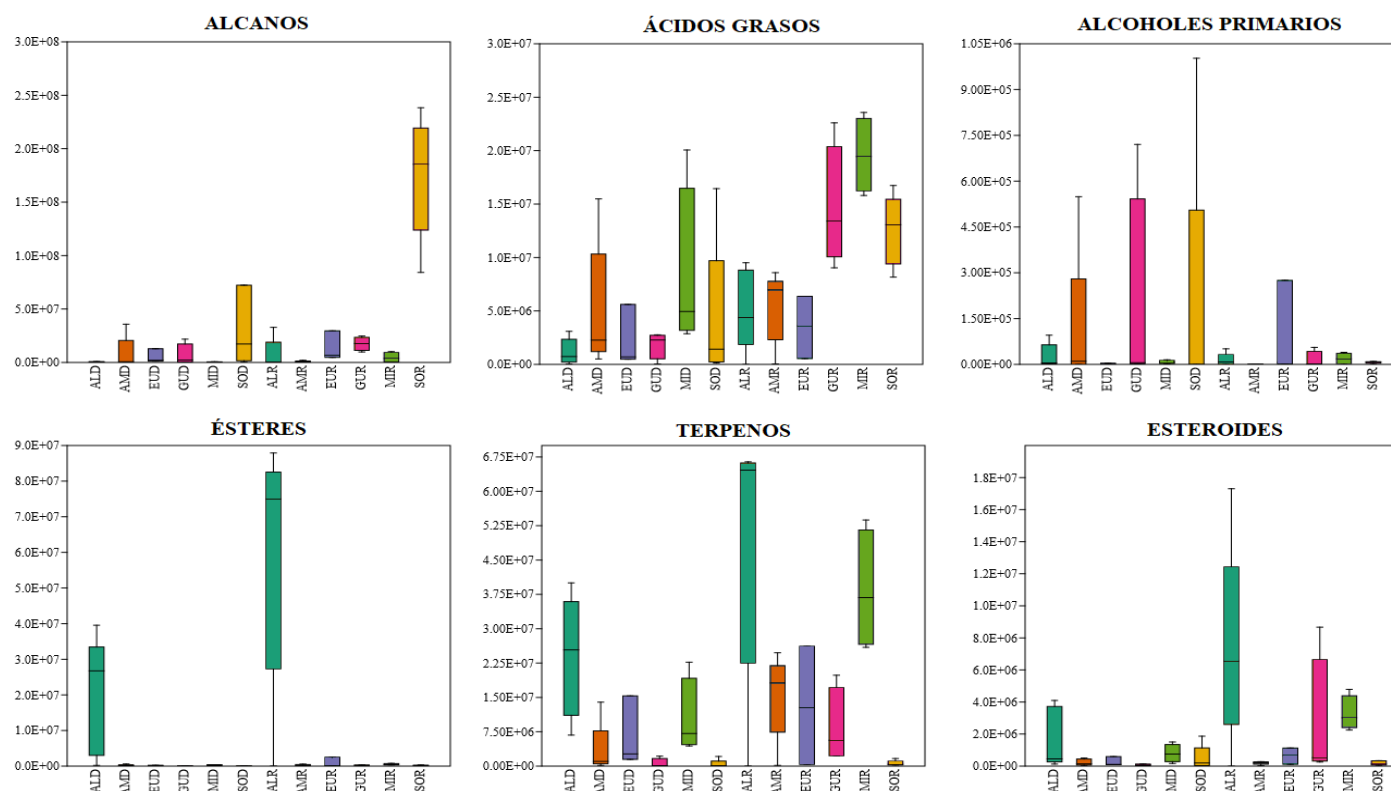
En cuanto a los terpenos, se observaron especies con mucha dispersión y en general bastante asimétricos, excepto *E. excelsa* y *M. cabucu* donde se percibieron más simétricos. Respecto al sesgo, destacó el tipo negativo de *A. sidifolia* de la estación lluviosa.

Por otra parte, los esteroides de *A. sidifolia* de la estación seca, presentó una dispersión alta con respecto a las otras especies de su misma estación. Por otro lado, las especies de la estación lluviosa mostraron mayor dispersión y valores más altos que la estación seca. Las estaciones resultaron ser simétrico y con sesgos de tendencia positiva.

Cabe resaltar que en esta etapa inicial solo se mostraron gráficas de cajas y bigotes a partir de una base de datos con valores faltantes, en consecuencia, simplemente sirvió como ayuda para evidenciar como se comportaron los datos sin procesar (datos crudos) y como deben ser manejados. Sin embargo, no se pudo extraer ninguna conclusión totalmente certera a partir de datos crudos, por ello que después del preprocesamiento, se realizaron nuevos gráficos.

Figura 48

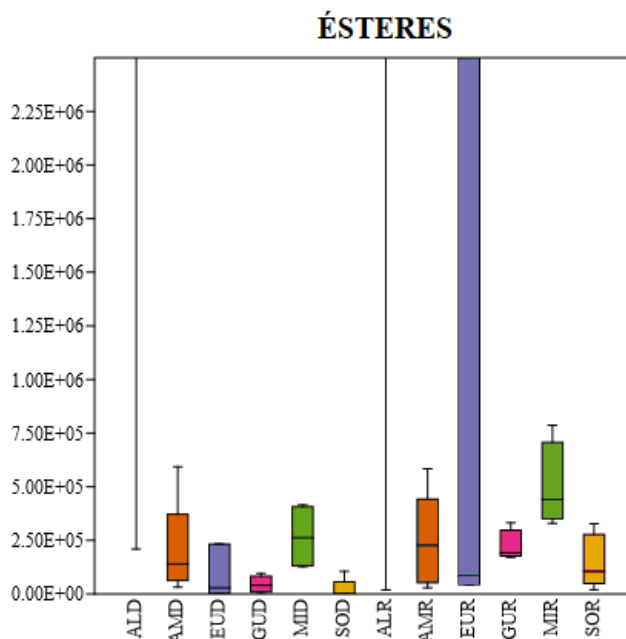
Cajas y bigotes de las clases químicas de las ceras foliares epicuticulares antes del preprocesado.



Nota. Identificadores de especies de la estación seca: ALD = *Alchornea sidifolia*; AMD = *Amaioua intermedia*; EUD = *Eugenia excelsa*; GUD = *Guarea macrophylla*; MID = *Miconia cabucu*; SOD = *Solanum granuloso-leprosum*. Identificadores de especies de la estación lluviosa: ALR = *Alchornea sidifolia*; AMR = *Amaioua intermedia*; EUR = *Eugenia excelsa*; GUR = *Guarea macrophylla*; MIR = *Miconia cabucu*; SOR = *Solanum granuloso-leprosum*.

Figura 49

Cajas y bigotes del nuevo escalado de la clase de ésteres.



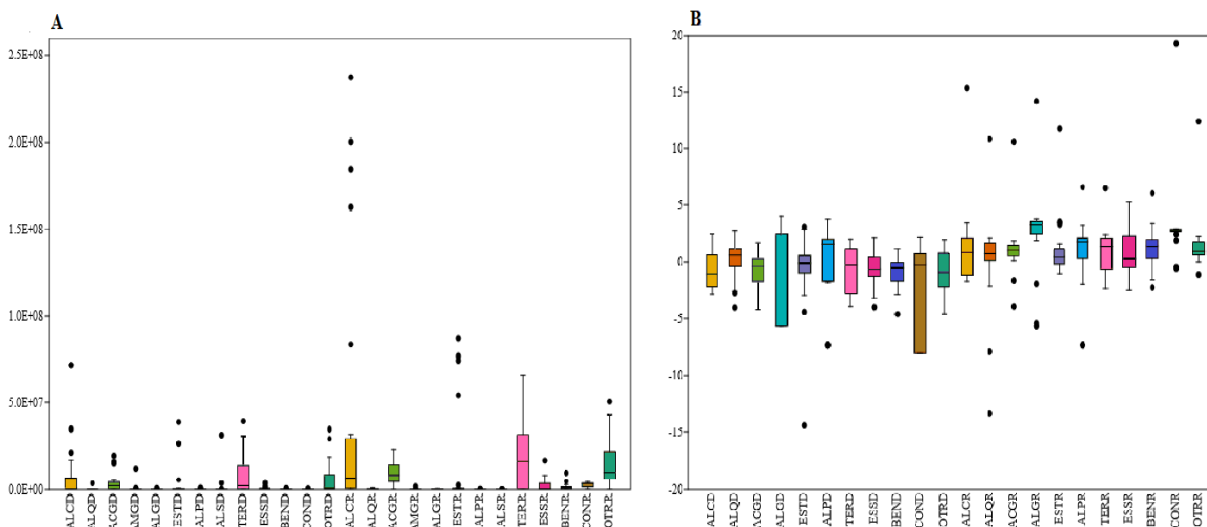
Nota. Identificadores de especies de la estación seca: ALD = *Alchornea sidifolia*; AMD = *Amaioua intermedia*; EUD = *Eugenia excelsa*; GUD = *Guarea macrophylla*; MID = *Miconia cabucu*; SOD = *Solanum granuloso-leprosum*. Identificadores de especies de la estación lluviosa: ALR = *Alchornea sidifolia*; AMR = *Amaioua intermedia*; EUR = *Eugenia excelsa*; GUR = *Guarea macrophylla*; MIR = *Miconia cabucu*; SOR = *Solanum granuloso-leprosum*.

4.4 Preprocesamiento

Inmediatamente después del análisis descriptivo inicial, donde se observó que los datos tenían una variación y distribución sesgada, además de presentar valores *missings* elevados en las amidas y alcoholes secundarios, se decidió presentar una gráfica general como resultado del preprocesamiento de los datos (figura 50).

Figura 50

Comparación de las gráficas de cajas y bigotes antes y después del preprocesamiento.



Nota. A: cajas y bigotes general de las clases químicas antes del preprocesamiento; B: cajas y bigotes general de todas las clases químicas después del preprocesamiento (escalado de Pareto). Identificadores de clases químicas de la estación seca: ALCD = Alcanos; ALQD = Alquenos; ACGD = Ácidos grasos; AMGD = Amidas grasas; ALGD = Aldehídos grasos; ESTD = Ésteres; ALPD = Alcoholes primarios; ALSD = Alcoholes secundarios; TERD = Terpenos; ESSD = Esteroides; BEND = Bencenoides; COND = Compuestos orgánicos nitrogenados; OTRD= Otros compuestos. Identificadores de clases químicas de la estación lluviosa: ALCR = Alcanos; ALQR = Alquenos; ACGR = Ácidos grasos; AMGR = Amidas grasas; ALGR = Aldehídos grasos; ESTR = Ésteres; ALPR = Alcoholes primarios; ALSR = Alcoholes secundarios; TERR= Terpenos; ESSR = Esteroides; BENR = Bencenoides; CONR = Compuestos orgánicos nitrogenados; OTRR = Otros compuestos.

La Figura 50 evidenció, como inicialmente existía variabilidad en los datos y se encontraban descentrados, pero con las transformaciones que se realizó durante el

preprocesamiento se consiguió una solución, por lo que se obtuvieron datos centrados y con menor variabilidad, que permitieron realizar un análisis de datos más metódico.

4.5 Análisis de los datos

4.5.1 Análisis univariante

4.5.1.1 Prueba ANOVA de un criterio para datos independientes.

A través del análisis ANOVA de un criterio para cada clase química, evidenciando que el contenido de estas presentaba más diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las ceras foliares epicuticulares de las especies arbóreas de la estación lluviosa que las de la estación seca (tabla 7).

Tabla 7

P-values obtenidos con la prueba ANOVA y ordenados según su nivel de significancia

| Clase química | CEF de las muestras de la estación seca | Clase química | CEF de las muestras de la estación lluviosa |
|-----------------------------------|---|-----------------------------------|---|
| | <i>P-value</i> | | <i>P-value</i> |
| Terpenos | 0.0000437 | Ésteres | 0.000002054 |
| Compuestos orgánicos de nitrógeno | 0.02282 | Bencenoides | 0.000002867 |
| Ésteres | 0.05844 | Alcanos | 0.000006347 |
| Alcanos | 0.06857 | Esteroides | 0.00002065 |
| Aldehídos grasos | 0.0905 | Terpenos | 0.0006092 |
| Esteroides | 0.1311 | Alquenos | 0.002066 |
| Bencenoides | 0.2333 | Otros | 0.01255 |
| Ácidos grasos | 0.3151 | Aldehídos grasos | 0.01912 |
| Alquenos | 0.3698 | Ácidos grasos | 0.05936 |
| Otros | 0.4599 | Alcoholes Primarios | 0.06357 |
| Alcoholes Primarios | 0.5983 | Compuestos orgánicos de nitrógeno | 0.415 |

Nota. Los valores resaltados en negrita representan a los P-value inferiores al 0.05 ($p > 0.05$). CEF: ceras epicuticulares foliares.

Además, la tabla 8 presenta a las clases químicas que fueron ordenadas de mayor a menor significancia, considerando el *p-value*; así pues, un *p-value* más pequeño impulsa a pensar que las diferencias en aquella clase química son más importantes para las distintas ceras foliares epicuticulares de cada especie arbórea.

Tabla 8

P-values obtenidos con la prueba ANOVA de las clases químicas entre las estaciones

| Clase química | Estación seca-lluviosa |
|-----------------------------------|------------------------|
| | P-value |
| Alcanos | 0.0067 |
| Alquenos | 0.6042 |
| Ácidos grasos | 0.0005 |
| Aldehídos grasos | 0.0006 |
| Ésteres | 0.0533 |
| Alcoholes Primarios | 0.8514 |
| Terpenos | 0.0156 |
| Esteroides | 0.0182 |
| Bencenoides | 0.00001 |
| Compuestos orgánicos de nitrógeno | 0.0000003 |
| Otros | 0.00001 |

Nota. Los valores resaltados en negrita representan a los *P-value* que superan el 0.05 ($p > 0.05$).

Adicionalmente, la tabla 8 evidenció que existen diferencias significativas entre las cantidades de clases químicas en las ceras foliares epicuticulares de cada estación, con excepción de los alquenos y alcoholes primarios.

4.5.1.2 Cajas y bigotes

A partir de los valores de significancia de las clases químicas en relación con sus diferencias entre las distintas ceras foliares epicuticulares de cada especie arbórea, se elaboraron gráficas de las seis clases químicas más significativas en forma de cajas y bigotes (figura 51), no

obstante, el resto de las figuras de los que formaron parte de la base de datos se pueden encontrar en el anexo K.

En todas las clases químicas se observaron diferencias entre las ceras foliares epicuticulares de las especies arbóreas, especialmente las que se obtuvieron durante la estación lluviosa. En tanto a los ésteres, la clase más significativa de la estación lluviosa, abarcaron valores altos y dispersos en la muestra de *A. sidifolia*; mientras que, las otras solo incluyeron valores más bajos; por otra parte, en el contenido de los bencenoides resaltó la cera epicuticular foliar de *S. granuloso-leprosum* de la estación lluviosa por contener los valores más bajos; mientras que en el resto de las muestras destacó la dispersión y los valores altos en *G. macrophylla*. De la misma manera, se detectaron asimetrías a la derecha en las muestras de *A. sidifolia*, *G. macrophylla*, *S. granuloso-leprosum* y *M. cabucu*; sin embargo, también se detectaron asimetrías a la izquierda en *A. intermedia* y *E. excelsa*.

Respecto al contenido de los alcanos, destacó la muestra de *S. granuloso-leprosum* de la estación lluviosa, ya que abarcó valores muy altos con una asimetría a la izquierda; en cambio, las demás incluyeron valores más bajos, pero dispersos entre ellas y asimetrías hacia la derecha e izquierda.

En el contenido de los esteroides, destacó la cera epicuticular foliar de *A. sidifolia*, además de presentar una asimetría a la derecha. Con respecto a la asimetría de las demás muestras, estas en su mayoría fueron hacia la izquierda, mientras que *G. macrophylla* y *S. granuloso-leprosum* presentaron una asimetría más hacia la derecha.

Las gráficas de cajas y bigotes correspondientes a los terpenos, resultó que fue la única clase con valores significativos que compartían las muestras de ambas estaciones, aunque con diferentes patrones de dispersión y contenido. En la estación seca, se observó que destacó la

muestra *A. sidifolia* por presentar altos valores, una asimetría a la izquierda con poca dispersión; mientras que el resto se caracterizó por ser más disperso y asimétrico a la derecha. Por otro lado, dentro de las muestras de la estación lluviosa destacó también la cera epicuticular foliar de *A. sidifolia* por su alto valor, una asimetría muy hacia la izquierda con poca dispersión; sin embargo, el resto presentó una mayor y similar dispersión con dos tipos de asimetrías, donde dos fueron hacia la izquierda y una hacia la derecha, esta última fue *S. granuloso-leprosum* que adicionalmente incluyó valores bajos. Finalmente, la única que presentó un modelo más simétrico en sus valores fue *M. cabucu*.

En los alquenos se observó que destacaron las muestras de la estación lluviosa, debido a sus altos y similares valores, donde *A. sidifolia*, *A. intermedia*, *M. cabucu* y *S. granuloso-leprosum*, presentaron una similar dispersión, aunque *A. sidifolia* fue la única muestra de las tres que tuvo una asimetría más hacia derecha. Sin embargo, la única que abarcó una mayor dispersión de valores fue *E. excelsa*.

En el contenido de aldehídos grasos, destacó la cera epicuticular foliar de *M. cabucu*, evidenciando una simetría. Asimismo, destacaron los valores altos, dispersos y asimétricos de *E. excelsa* y *A. intermedia*.

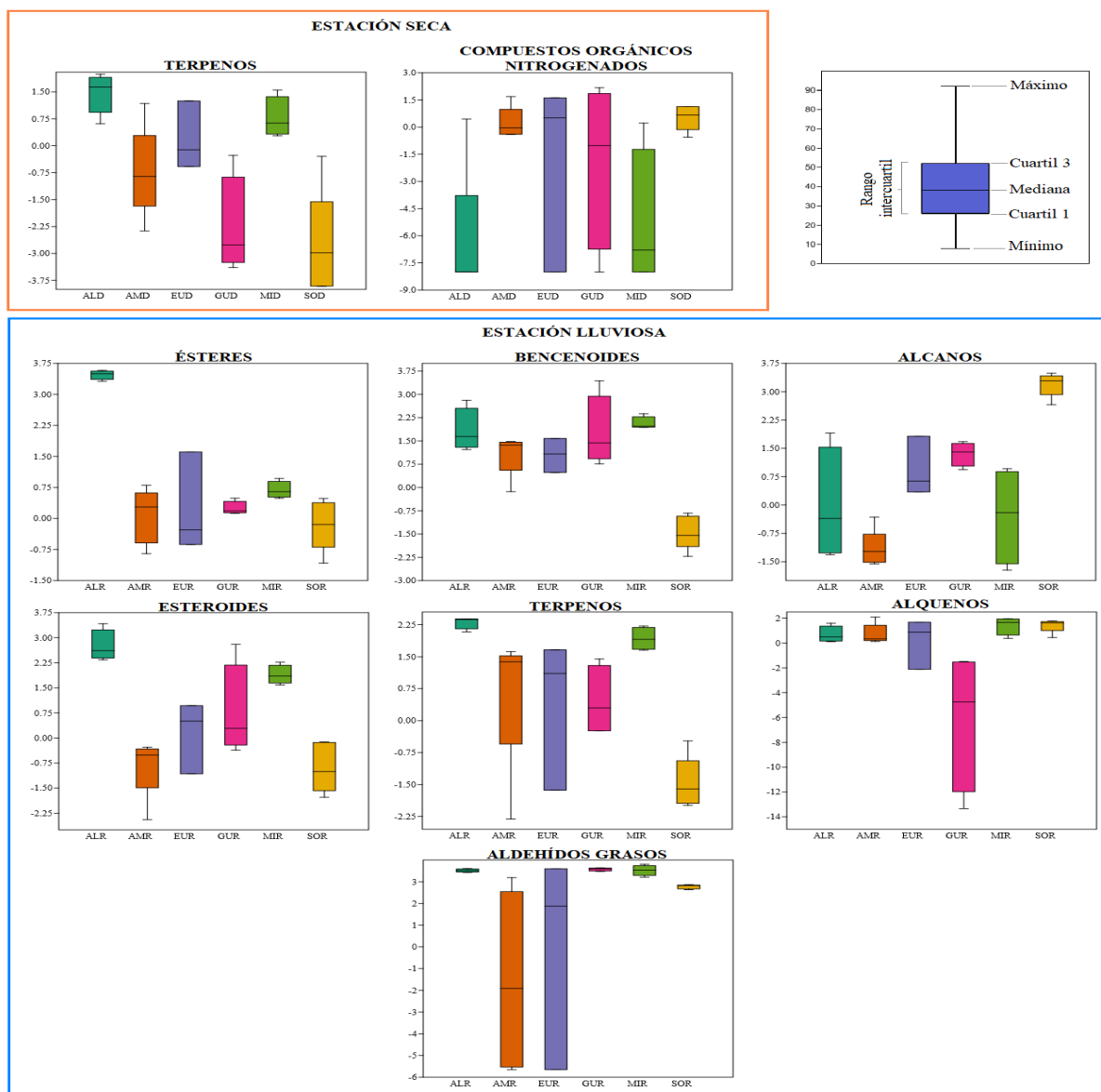
En el contenido de los esteroides, destacó la cera epicuticular foliar de *A. sidifolia*, además de presentar una asimetría a la derecha. Con respecto a la asimetría de las demás muestras, estas en su mayoría fueron hacia la izquierda, mientras que *G. macrophylla* y *S. granuloso-leprosum* presentaron una asimetría más hacia la derecha.

Por último, los compuestos orgánicos nitrogenados, la otra clase que solo reveló la estación seca por su alta significancia, se caracterizó por presentar una similitud entre las muestras de *E. excelsa* y *G. macrophylla*, a nivel de sus altos y dispersos valores, a pesar de que *E. excelsa* tuvo

una asimetría más hacia la izquierda. Asimismo, *A. intermedia* y *S. granuloso-leprosum*, entre ellas presentaron una similitud a nivel de su dispersión y altos valores, aunque difirieron en su asimetría, ya que *A. intermedia* tuvo una asimetría hacia la derecha.

Figura 51

Gráficos de caja y bigotes de las clases químicas más significativas después del preprocesamiento.



Nota. Identificadores de especies de la estación seca: ALD = *Alchornea sidifolia*; AMD = *Amaioua intermedia*; EUD = *Eugenia excelsa*; GUD = *Guarea macrophylla*; MID = *Miconia cabucu*; SOD = *Solanum granuloso-leprosum*. Identificadores de especies de la estación lluviosa: ALR = *Alchornea sidifolia*; AMR = *Amaioua intermedia*; EUR = *Eugenia excelsa*; GUR = *Guarea macrophylla*; MIR = *Miconia cabucu*; SOR = *Solanum granuloso-leprosum*.

4.5.2 Análisis multivariante

4.5.2.1 Análisis de Componentes Principales (PCA)

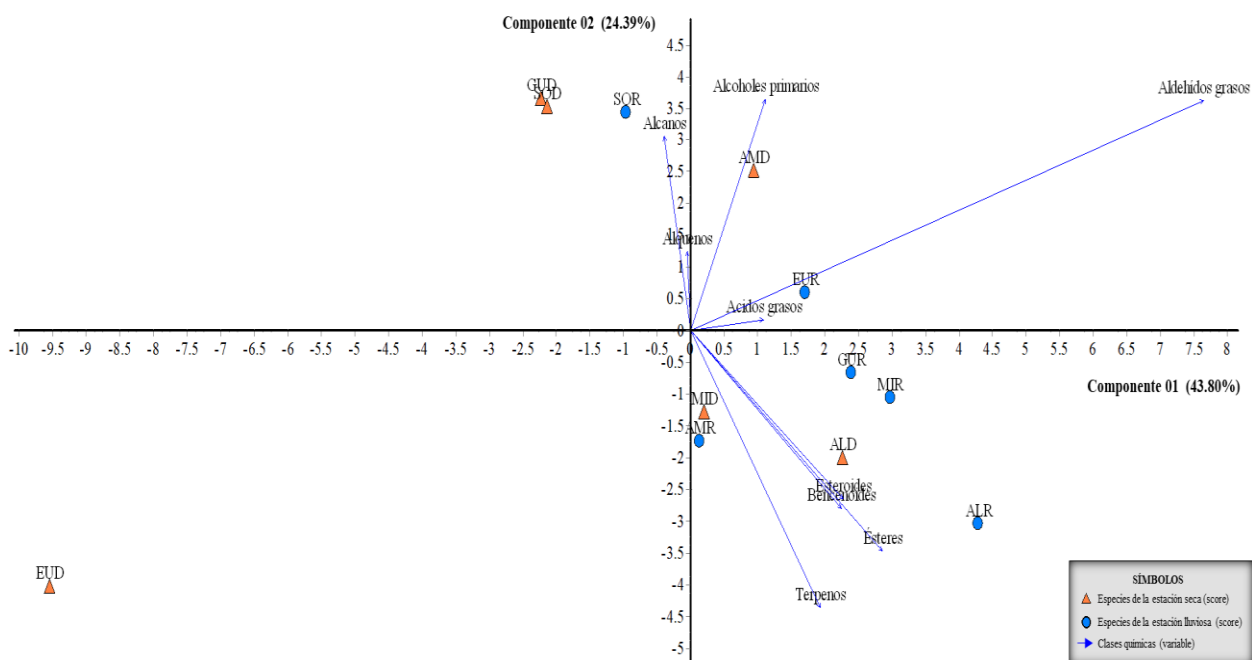
Con el fin de identificar las ceras foliares epicuticulares de cada especie en función a sus clases químicas durante la estación seca y lluviosa, se elaboró un gráfico bidimensional de componentes principales, el cual fue definido por los dos primeros componentes que explicaron el 68.19% de la variedad de los datos (figura 52). A partir de ella fue posible observar un agrupamiento de la mayoría de las muestras de la estación lluviosa con dos de la estación seca (ALD y MID), quienes se caracterizaron por altas cantidades de terpenos, esteroides y bencenoides, respectivamente. Las muestras de la estación seca acompañadas con dos de la estación lluviosa (SOR y EUR) se diferenciaron por las altas cantidades de alcoholes primarios, alcanos y alquenos, correspondientemente. Sin embargo, la muestra *E. excelsa* (EUD) de la estación seca se diferenció de los dos primeros agrupamientos, por tener bajísimas cantidades de aldehídos grasos, en consecuencia, a esta especie se le denominó como un *outlier* o valor atípico.

Cuando se revisó y comparó las variables del gráfico bidimensional de PCA con los *p-values* de la tabla 7, se comprobó que aquellas clases químicas que tenían valores significativos en la prueba ANOVA para cada muestra colectada en las estaciones seca y lluviosa, representaban las variables más representativas y con mayor valor para cada una de las componentes.

Asimismo, cabe indicar que la clase de alcoholes primarios no eran significativos en el ANOVA para las ceras epicuticulares colectadas en ambas estaciones, pero apareció en una de las componentes con un alto valor explicativo. En consecuencia, se determinó que ambos dan resultados similares, ya que las otras clases aparecen con una significancia en el ANOVA, esto al menos, en un grupo de muestras colectadas en una estación. Por último, cabe indicar que en el análisis de componentes principales no se tomaron en cuenta, los valores de las clases amidas grasas y alcoholes secundarios, debido a los altos valores de *missings* descritos en la tabla 6. Además, no se incluyó la clase de los compuestos orgánicos nitrogenados, ya que las sustancias que lo componían, tales como dietanolamina y diisobutilnitrosoamina no se encontraron claramente reportadas en ceras epicuticulares foliares.

Figura 52

Gráfico bidimensional del Análisis de Componente Principal (PCA) entre los contenidos de las clases químicas de las ceras foliares epicuticulares de las 6 especies colectadas durante las estaciones seca y lluviosa del PEFI, mediante un escalado de Pareto.



Nota. Identificadores de especies de la estación seca: ALD = *Alchornea sidifolia*; AMD = *Amaioua intermedia*; EUD = *Eugenia excelsa*; GUD = *Guarea macrophylla*; MID = *Miconia cabucu*; SOD = *Solanum granuloso-leprosum*. Identificadores de especies de la estación lluviosa: ALR = *Alchornea sidifolia*; AMR = *Amaioua intermedia*; EUR = *Eugenia excelsa*; GUR = *Guarea macrophylla*; MIR = *Miconia cabucu*; SOR = *Solanum granuloso-leprosum*.

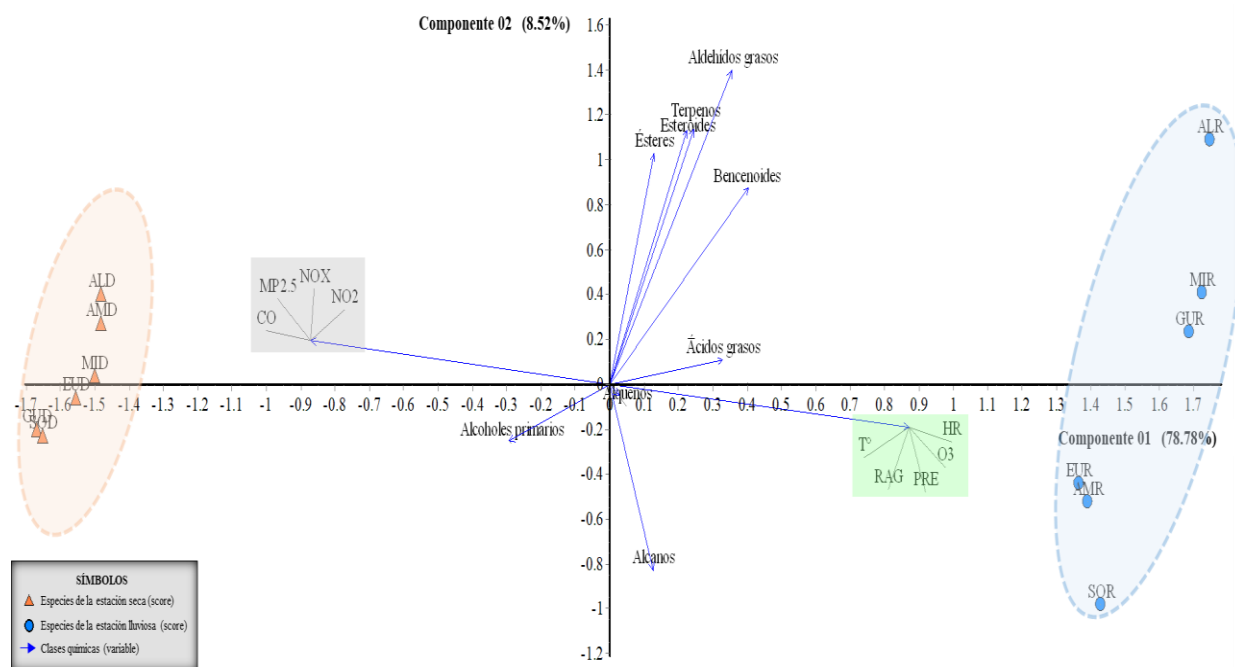
Con respecto a las relaciones entre las variaciones del contenido de las principales clases químicas de las ceras epicuticulares en cada muestra y los estresores ambientales, como contaminantes atmosféricos (MP2.5, CO, NO₂, NO_x, O₃) y /o condiciones meteorológicas (Temperatura, humedad relativa, radiación global y precipitación) de las estaciones seca y lluviosa del PEFI durante el año 2019, se explicaron a través de otro gráfico bidimensional de PCA, que resultó de un escalamiento por rangos en el programa Fitopac v2.1, ya que se analizaron datos con diferentes dimensiones ($\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$, ppm, °C, %, MJ.m⁻²y mm) en búsqueda de una respuesta biológica. En consecuencia, este análisis resumió el 88.49% en la variabilidad de los datos en sus dos primeros componentes (figura 53), siendo que la primera componente contribuyó en resumir mejor la variabilidad (78.78%). Los contaminantes atmosféricos, las condiciones meteorológicas, los ácidos grasos y los alcoholes primarios fueron las variables más correlacionadas con la componente 1, mientras que los aldehídos grasos, terpenos, esteroides, ésteres, bencenoides, alcanos y alquenos con la componente 2.

El PCA presentó una separación clara de las unidades de muestra con relación a las condiciones ambientales de las estaciones lluviosa (elipse celeste) y seca (elipse amarilla). Es así como fue posible verificar que las muestras de la estación lluviosa se relacionaron con niveles altos de aldehídos grasos, terpenos, esteroides, ésteres, bencenoides, ácidos grasos y alcanos; las condiciones meteorológicas (temperatura, humedad relativa, precipitación y radiación) y las

concentraciones de ozono; sin embargo, la concentración de alcanos de EUR, AMR y SOR sugiere que estuvo más relacionada con los estresores ambientales de la estación lluviosa. Por otro lado, las muestras de la estación seca se relacionaron con las concentraciones de los contaminantes atmosféricos (NO_2 , NO_x , $\text{PM}_{2.5}$, CO) y alcoholes primarios; con todo ello, ninguna clase química indicó una mayor relación frente a estos contaminantes atmosféricos de la estación seca.

Figura 53

Gráfico bidimensional del Análisis de Componente Principal (PCA) del contenido de las clases químicas de las ceras foliares epicuticulares de las 6 especies arbóreas y las condiciones ambientales durante la estación seca y lluviosa del PEFI, a través de un escalamiento de rango.



Nota. Especies de la estación seca (elipse naranja): ALD = *Alchornea sidifolia*; AMD = *Amaioua intermedia*; EUD = *Eugenia excelsa*; GUD = *Guarea macrophylla*; MID = *Miconia cabucu*; SOD = *Solanum granuloso-leprosum*. Especies de la estación lluviosa (elipse naranja): ALR = *Alchornea sidifolia*; AMR = *Amaioua intermedia*; EUR = *Eugenia excelsa*; GUR = *Guarea*

macrophylla; MIR = *Miconia cabucu*; SOR = *Solanum granuloso-leprosum*. Contaminantes atmosféricos (cuadro gris): MP2.5 = material particulado < 2.5; CO = monóxido de carbono; NO₂ = dióxido de nitrógeno; NOX = Óxidos de nitrógeno; O₃ = Ozono. Condiciones meteorológicas (cuadro verde): T° = temperatura; HR = humedad relativa; RAG = radiación global; PRE = precipitación.

4.5.2.2 Mapa de calor (Heatmap).

Con el fin de representar y visualizar la variabilidad de cantidades de cada clase química en cada cera epicuticular foliar de la estación seca y lluviosa, resultó un gráfico con una escala de valores que fue de -9.94 (verde) a 4.6 (rojo), donde la intensidad del color representó cuan relacionado esta una clase química con la cera epicuticular foliar de cada especie durante la estación seca y lluviosa.

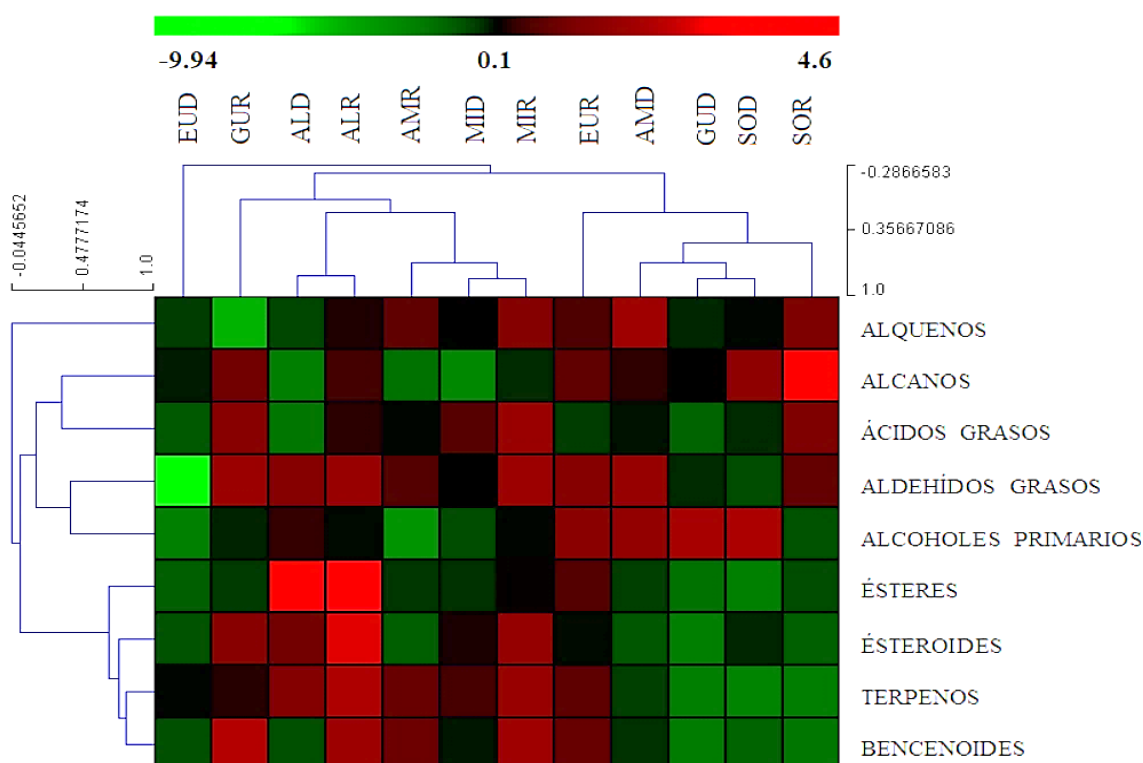
En la figura 54, las muestras aparecieron en el eje vertical y las clases químicas en el horizontal. Lo primero en observarse fueron tres grandes agrupamientos en las muestras a través de un árbol de correlación, evidenciando que las ceras foliares epicuticulares de AMD, EUR, SOR, SOD y GUD mostraron patrones de cantidades similares en las distintas clases químicas, algo parecido ocurrió también con el grupo de las muestras: MIR, AMR, MID, ALR, ALD y GUR. Finalmente, el tercer grupo destacó por ser distinto a los anteriores, ya que estuvo solo conformado por la cera epicuticular foliar de EUD, y esta presentaba un patrón muy distinto en la cantidad de las clases químicas respecto a los dos primeros grupos ya mencionados, siendo que los aldehídos grasos de EUD destacaban por sus bajísimas cantidades; por ello, a este grupo se le identificó como un *outlier*.

Además, podemos observar que una misma especie en diferentes estaciones, puede no presentar una diferencia o variación cuantitativa destacable en sus clases químicas, tal fue el caso

directo de ALD-ALR y MIR-MID; sin embargo, existieron otras muestras que no estuvieron tan estrechamente relacionados como el caso anterior, pero compartían un mismo grupo en general, tales muestras como SOD-SOR. En cuanto a las clases químicas, se observaron clases con colores muy intensos en la mayoría de las muestras, como fueron los aldehídos grasos, terpenos, alcanos y ésteres, donde presentaron al menos un color rojo intenso, lo cual significó altas cantidades.

Figura 54

Mapa de calor del contenido de las clases químicas en función a las muestras.



Nota. Identificadores de especies de la estación seca: ALD = *Alchornea sidifolia*; AMD = *Amaioua intermedia*; EUD = *Eugenia excelsa*; GUR = *Guarea macrophylla*; MID = *Miconia cabucu*; SOD = *Solanum granuloso-leprosum*. Identificadores de especies de la estación lluviosa: ALR = *Alchornea sidifolia*; AMR = *Amaioua intermedia*; EUR = *Eugenia excelsa*; GUR = *Guarea macrophylla*; MIR = *Miconia cabucu*; SOR = *Solanum granuloso-leprosum*.

Finalmente, tanto el primer PCA (figura 52) como el heatmap, coincidieron que los aldehídos grasos, alcoholes primarios, ésteres y terpenos, principalmente, estuvieron altamente relacionadas con ciertas muestras colectadas en la estación seca y lluviosa.

V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

A. Identificar los componentes químicos de ceras foliares epicuticulares de la Reserva del PEFI durante las estaciones verano e invierno, en la plataforma de GNPS

En esta tesis al identificar los componentes químicos de las ceras foliares epicuticulares de las seis especies arbóreas durante las estaciones verano (lluviosa) e invierno (seca) de la Reserva del PEFI a través de las redes moleculares de la GNPS, se pudo identificar un total de 552 posibles metabolitos que se dividieron en 12 clases químicas, tales como alcanos, alquenos, ácidos grasos, alcoholes primarios, alcoholes secundarios, amidas grasas, aldehídos grasos, ésteres, terpenos, esteroides, bencenoides y compuestos orgánicos de nitrógeno; además de un grupo de metabolitos no clasificados, que son denominado como otros. Sin embargo, estos resultados contrastan con las principales clases químicas que menciona [Christie \(2022\)](#) en The Lipidweb, ya que no identifica a los alquenos, bencenoides, compuestos orgánicos nitrogenados y a la lista de metabolitos denominados en esta tesis como otros. Así también coincide [Deustua \(2019\)](#), aunque él agrega a esta lista de componentes a los alquenos y los compuestos cíclicos como los flavonoides y terpenoides, pero no menciona a los esteroides, algo que si detallan los trabajos de [Christie \(2022\)](#), [Roma \(2018\)](#) y [Domingos et al. \(2015\)](#), siendo que este último trabajo nombró a los esteroides como uno de los componentes más abundantes en las ceras epicuticulares de tres especies arbóreas nativas de la mata atlántica del SE-Brasil, hecho que resalta debido a que las especies estudiadas en esta tesis provienen de un fragmento perteneciente a la mata atlántica. Adicionalmente, dos clases químicas (amidas grasas y alcoholes secundarios) no fueron considerados para el análisis de datos metabolómicos, ya que superaban el 20% de *missings* para estas variables, criterio que coincide con la estrategia de corrección de valor faltante que explica [Yang et al. \(2015\)](#). En consecuencia, se obtuvo como principales clases químicas de las ceras foliares epicuticulares de

las seis especies arbóreas del PEFI a los alcanos, alquenos, ácidos grasos, alcoholes primarios, aldehídos grasos, ésteres, terpenos y esteroides.

B. Identificar los contaminantes atmosféricos a partir de una biblioteca de espectros de fragmentación de ceras foliares epicuticulares obtenidas de árboles de la Reserva del PEFI durante las estaciones verano e invierno, en la plataforma de GNPS.

Cuando se determinó la identidad de ciertos contaminantes presentes sobre estas ceras, se buscó en los componentes químicos no comunes para las ceras foliares epicuticulares, hallándose que el contenido de bencenoides, específicamente el de ácido benzoico y derivados, está relacionado con la función que cumplen ciertos compuestos orgánicos volátiles en la protección de la planta frente a estresores bióticos y abióticos ([Pinto et al., 2010](#)); sin embargo, los otros componentes como ftalatos y sus derivados, no han sido reportadas como componentes químicos de las ceras epicuticulares, sino como derivados de materiales plastificantes, algo que coincidentemente también fue encontrado en el trabajo de [Victório et al. \(2022\)](#) al evidenciar la capacidad de acumulación de ftalatos que poseían las ceras foliares epicuticulares de *Avicennia schaueriana* y *Rhizophora mangle*, indicando que posiblemente la presencia de estos contaminantes también se deba a la contaminación atmosférica, además del suelo o agua. Así también [Pereira et al. \(2019\)](#) reportaron a los ftalatos en otra superficie vegetal como las cortezas de árboles urbanos que se encontraban cerca de un complejo industrial en el área metropolitana de São Paulo, algo que, si bien no coincide a nivel de la muestra que se analizó en esta tesis, nos da una noción de la presencia de estos contaminantes en muestras vegetales; por lo cual, teniendo en cuenta ambos trabajos, tiene sentido que se hayan identificado estos contaminantes en las ceras foliares epicuticulares del PEFI, destacando su alto contenido en las muestras de la estación lluviosa, excepto la muestra SOR.

En cuanto al contenido de compuestos orgánicos nitrogenados (dietanolamina y diisobutilnitrosoamina) no se encontraron claramente reportadas en ceras foliares epicuticulares, a pesar de ello, en el Pubchem los describen como metabolitos xenobióticos, pero con información limitada sobre los posibles efectos en la salud.

C. Identificar los factores de estrés ambiental (meteorológicos y contaminantes atmosféricos) que inducen a cambios estacionales sobre el contenido de sus principales clases químicas de las ceras foliares epicuticulares, a partir de las identificaciones de la GNPS.

Debido a que la identificación de componentes químicos se basa en disponer la mayor información sobre aquellos componentes que aparecen como muy significativos para separar las distintas muestras de un estudio ([Fernández, 2019](#)), en la prueba ANOVA se observó que la mayoría de las clases químicas son significativamente distintos según las muestras colectadas en las estaciones verano e invierno (en efecto, solo dos clases de los 10 componentes químicos no lo son). Asimismo, los análisis de componentes principales y el mapa de calor contribuyeron en detallar las clases químicas que más favorecieron en agrupar y diferenciar las muestras.

Los alcanos y alquenos agruparon mejor a las muestras GUD, SOD y SOR. Con respecto a las dos muestras de la estación seca, este resultado coincide con lo mencionado por [Ni et al. \(2012\)](#); [Lavergne et al. \(2018\)](#) y [Liu et al. \(2017\)](#), quienes explican que el alto contenido de alcanos convierte la naturaleza de las ceras vegetales en más hidrofóbicas y las hace más resistentes al estrés hídrico ([da Silva Carreira, 2014](#); [Rahman et al., 2021](#)); por ende, el alto contenido de alcanos de GUD y SOD indicarían que son las especies arbóreas que mejor resisten a la pérdida de agua por deshidratación si se comparan con las demás muestras colectadas en la estación seca del PEFI. Sin embargo, a pesar de que el alto contenido de alcanos se relaciona con ambientes secos, su contenido se vio desfavorecido con respecto al alto contenido que presentó la muestra de la

estación lluviosa (SOR), esto podría explicarse debido a que, en ambientes muy húmedos, como lo que ocurre en el verano de São Paulo, existe una alta concentración de ozono troposférico que genera un alto estrés oxidativo en la célula vegetal, ante ello resulta conveniente para la planta poseer una cera más hidrofóbica y menos permeable ante este contaminante atmosférico (Pina, 2010). Respecto al contenido de alquenos, Hujon & Saral (2022) lo describen junto a los alcanos como constituyentes que posiblemente prevenga la inundación o deshidratación del agua a través de la impermeabilización de las hojas. En consecuencia, las altas cantidades de estos hidrocarburos en la cera foliar epicuticular formaría una barrera que evitaría la salida e ingreso de agua en la célula vegetal de las muestras de GUD y SOD; y una barrera protectora contra el ozono troposférico que se expone SOR.

En tanto a los alcoholes primarios, estos agruparon mejor a las muestras AMD y EUR, los cuales se caracterizaron por presentar alcoholes con un predominante número par de carbonos de cadena corta, hecho que coincide con lo descrito por Tafolla-Arellano et al. (2013) y Bernard & Joubès (2013), quienes describen a los alcoholes primarios como los primeros derivados en forma libre durante la vía de la reducción de acil-CoA de los ácidos grasos, resultando cadenas pares de 12 a 36 carbonos (Barthlott et al., 2017). Además, el poco contenido encontrado para las demás muestras, se explican claramente debido a que este constituyente químico suele ser minoritario en las ceras vegetales (Roma, 2018). Respecto a la muestra AMD, el alto contenido de alcoholes primarios que presento su cera pudo deberse a una respuesta frente a la adaptación de una estación seca del PEFI, algo que guardaría relación con lo descrito por Lavergne et al. (2018), al mencionar que una elevada concentración de alcoholes primarios en la cera puede dar lugar a la formación de densas plaquetas de cristal que favorecen a la resistencia al estrés por sequía. No obstante, la muestra de la estación lluviosa (EUR), también presentó un alto contenido de alcohol en su cera,

claramente esto no es una respuesta frente a un estrés hídrico, pero su contenido podría estar relacionado a una defensa contra ciertos factores bióticos, hecho que puede ser inferido a partir de los resultados también obtenidos en los trabajos de [Lavergne et al. \(2018\)](#) y [Negin et al. \(2021\)](#), al explicar que el contenido de alcoholes primarios de la cera puede cumplir funciones disuasivas frente a insectos y/o estados larvales.

Respecto a las muestras de GUR, MIR, MID, ALR, ALD y AMR se agruparon según el contenido de terpenos, esteres y esteroides. A pesar de ello, las únicas muestras con alto y similar contenido de ésteres fueron ALD y ALR, hecho que pudiera señalar que esta especie regularía bien su contenido hídrico celular en ambas estaciones, y si a este resultado lo complementamos con los otros componentes alifáticos que presentaron un contenido ligeramente alto para esta especie, tales como alcanos y alcoholes primarios, su capacidad de regulación hídrica sería buena, ya que según lo reportado por [Sampangi-Ramaiah et al. \(2016\)](#) en el caso de una mayor cantidad de compuestos de éster y alcohol en la cera vegetal, la tasa de transpiración disminuye y esto podría deberse a la naturaleza lipofílica de estos componentes químicos, conduciendo a una capa de cera menos porosa y una barrera más uniforme contra la pérdida de agua.

En cuanto al contenido de compuestos cíclicos, como los terpenos (especialmente triterpenoides) y esteroides, agruparon y explicaron mejor las muestras de la estación lluviosa; no obstante, las especies *M. cabucu* y *A. sidifolia* (MIR y ALR) presentan un alto y muy parecido contenido en cada una de sus muestras de ceras foliares epicuticulares colectadas en las estaciones lluviosas y secas, estas características en las ceras, según [Dashbaldan et al. \(2020\)](#), se correlacionan con una mayor permeabilidad al agua, ya que existe altos niveles de compuestos cíclicos y una baja concentración de alcanos en las ceras vegetales. Adicionalmente, las dos muestras de la

estación seca presentaron bajo contenido de compuestos cíclicos, por ende, se comprende que sus ceras sean menos permeables y no lleguen a deshidratarse.

En consideración al contenido de los aldehídos, la única muestra que presentó bajísimo contenido fue *E. excelsa* de la estación seca (EUD), mientras que las muestras *G. macrophylla* y *S. granuloso-leprosum* de la estación lluviosa (GUD y SOD) presentaron contenidos bajos. Los aldehídos son compuestos hidrofóbicos alifáticos que derivan de la reducción de los acilos grasos de cadena larga y que dan origen a los alcanos mediante una descarboxilación (Matos, 2020), esto nos ayuda a entender que, si bien GUD y SOD no poseen altos contenidos de aldehídos, si presentaban mayores contenidos de alcanos que podrían haber aparecido por descarboxilaciones en los aldehídos. Por el contrario, en la muestra EUD, no se presentó ningún derivado o metabolito precursor de los aldehídos, ya que los contenidos de estos otros componentes químicos, tales como alcanos o ácidos grasos respectivamente, fueron igual de bajos; en consecuencia, los resultados indicarían que la cera vegetal de EUD es muy permeable en un ambiente seco.

En vista de que la cera cuticular foliar cumple un papel importante en la tolerancia al estrés abiótico y que su capa más externa, la cera epicuticular, es un sitio putativo de facto de percepción primaria (Vaultier & Jolivet, 2015) que cubre la superficie de las hojas contra la radiación UV excesiva, las altas temperaturas (la deshidratación) y contaminantes atmosféricos (Xue et al., 2017; Victório et al., 2022), se evaluó el impacto biológico de las condiciones meteorológicas y contaminantes atmosféricos que rodean al PEFI, sobre las ceras foliares epicuticulares colectadas en verano e invierno, basándonos en que el impacto negativo de los estresores ambientales no es uniforme durante todo el año debido a la fuerte estacionalidad que presentan las ciudades que componen la Región metropolitana de São Paulo como se infiere por lo dicho por Domingos et al. (2015) y Engela, (2016).

Con respecto al verano, el ozono fue el contaminante más representativo porque su concentración se vio favorecida con las condiciones meteorológicas que presenta la estación lluviosa (CETESB, 2020), ello debido a que las altas variaciones del viento permitieron el transporte de las concentraciones de óxidos de nitrógeno (NO_x) y compuestos orgánicos volátiles (COV) que al interactuar con las altas radiaciones solares generaron el ozono troposférico (Sicard et al., 2020; Ibarra-Espinosa et al., 2022); es por ello, que a partir de eventos como el origen del ozono, Brasseur & Jacob (2017) mencionan que la evolución de la contaminación del aire está inseparablemente relacionada con la meteorología. A partir de esta idea, es entendible que las muestras de la estación lluviosa estuvieron expuestas a un alto estrés oxidativo al exponerse directamente con el O₃; sin embargo, una transformación oxidativa por sí sola no parecería tener un impacto significativo en la biosíntesis, composición o hábito cristalino de la cera epicuticular en diferentes árboles, tal como lo detallan Vaultier & Jolivet (2015), a pesar de este parecer, nuestras muestras de la estación lluviosa sí presentaron ligeras diferencias, principalmente, en el contenido alcanos para la muestra SOR; aldehídos, esteroides y terpenos, para ALR. Si bien el contenido de compuestos alifáticos presentes en estas ceras no estuvo evidentemente relacionado con la deficiencia hídrica, este podría cumplir un rol importante en la formación de ceras menos porosas frente a la exposición (Pina, 2010).

El alto contenido de terpenos que presentaron las muestras de la estación lluviosa, coincidentemente Kontunen-Soppela et al. (2007) logra dar ciertas causas de este hecho al estudiar como la exposición prolongada al O₃ (7 años) aumentó los niveles de compuestos relacionados con la formación de la cera cuticular foliar, como son los triterpenoides, los cuales podrían desarrollar una tolerancia al O₃ durante el crecimiento vegetal. Además, el alto contenido de terpenos también se logró ver influenciada posiblemente por la alta exposición de luz en las hojas

(Joensuu et al., 2016), esta otra respuesta coincidiría también con nuestros resultados, ya que los índices de luz que se evidencia en el verano de São Paulo superan con creces los valores en que se ven expuestas las muestras de la estación seca durante el invierno (IAG-USP, 2020 recuperado de Santos, 2021). Adicionalmente, el contenido de los terpenos podría verse inducido frente a estresores bióticos, tales como picaduras de insectos, mordeduras de larvas y patógenos microbianos que inducen a las emisiones de los terpenos tanto locales como sistémicos, a fin de desenvolver una respuesta de resistencia frente a esos ataques (Hejjari et al., 2011; Sharma et al., 2018).

En relación con los estresores ambientales presentes en el invierno, su contenido de contaminantes atmosféricos fue mayor que el verano, ya que esta estacionalidad en días excesivamente secos junto a sus condiciones meteorológicas se caracteriza, según CETESB (2014), por favorecer la ocurrencia de inversiones térmicas, que impiden la dispersión o desplazamiento de los contaminantes suspendidos en la atmósfera.

Además, los contaminantes atmosféricos permitieron agrupar a todas las muestras de la estación seca y explicarlas en función al contenido de alcoholes primarios, los cuales otorgan una condición más hidrofóbica a las ceras para permitirles desarrollar un mecanismo de resistencia contra el estrés hídrico (Lavergne et al., 2018), debido a que las precipitaciones y el porcentaje de humedad relativa en esta estación son muy bajas (IAG-USP, 2020 recuperado de Santos, 2021). Sin embargo, la escasez en las concentraciones de los otros componentes químicos reflejaría el impacto de estos contaminantes sobre la síntesis de metabolitos (especialmente de tipo secundario) (Engela, 2016) que sumado a una baja disponibilidad de agua reduce el balance de carbono en las plantas (Pinheiro & Chaves, 2011; Figueiredo, 2012; Singh & Thakur, 2018), por lo cual se ve afectado la eficiencia fotosintética de los árboles. Adicionalmente, la presencia de contaminantes

atmosféricos ha evidenciado que logran erosionar o degradar las ceras epicuticulares desencadenando en una baja tolerancia al estrés hídrico.

VI. CONCLUSIONES

- Los resultados permitieron concluir que los análisis de los cromatogramas realizados en la GNPS contribuyeron en caracterizar los componentes químicos de las ceras foliares epicuticulares del PEFI, frente a las variaciones estacionales, las condiciones meteorológicas y los niveles de los contaminantes atmosféricos.
- La GNPS anotó diez clases químicas en las ceras foliares epicuticulares de las seis especies arbóreas del PEFI, siendo los alcanos, alquenos, ácidos grasos, alcoholes primarios, aldehídos grasos, ésteres, terpenos y esteroides.
- Se observó al grupo químico de los bencenoides como contaminantes, ya que incluía componentes derivados de ftalato; y además se clasificó para el grupo de los compuestos orgánicos nitrogenados como posibles contaminantes químicos.
- Existe una diferencia en el contenido de las clases químicas entre las muestras colectadas en cada estación; y frente a los estresores ambientales se evidenció un mayor número de contenido de clases químicas en las muestras de la estación lluviosa, incluido el grupo químico de los bencenoides, todo ello a partir de los datos generados en la GNPS mediante los análisis metabolómicos.

VII. RECOMENDACIONES

- En vista que esta tesis se basó en el uso de una plataforma web de código abierto que permitió acercarnos a la identificación de metabolitos o compuestos químicos para un posterior análisis de datos metabolómicos que incluyo datos auxiliares públicos sobre las condiciones meteorológicas y el contenido de contaminantes atmosféricos. Es por ello, que las interpretaciones biológicas en este trabajo merecerían ser evaluadas a futuro.
- Con respecto al tamaño de muestra a trabajar en la GNPS, sería aconsejable tener una cantidad igual de archivos (.cdf file) si se pretende comparar una misma especie en dos distintos escenarios, para así obtener mayores identificaciones que brinden más información de la muestra (.cdf file).
- En relación con las posibles identificaciones químicas de los metabolitos mediante la herramienta CG-EM de la GNPS, se debe tomar en cuenta que un mismo nombre de un metabolito puede aparecer con comillas o sin ellas, y a veces la plataforma puede identificarlas como distintas, es por ello, que el analizador de estos datos tiene que ir filtrando algunos de estos impases al momento de elaborar una base de datos.
- Asimismo, sería factible profundizar, a través del análisis metabolómico, el rol biológico que cumple cada metabolito identificado en cada cera foliar epicuticular durante el verano e invierno del PEFI; así como también, contar con fechas exactas de cada colecta para evaluar con mayor precisión el impacto que tienen los estresores biológicos sobre cada muestra.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aksenov, A. A., Laponogov, I., Zhang, Z., Doran, S. L., Belluomo, I., Veselkov, D., ... & Veselkov, K. (2021). Auto-deconvolution and molecular networking of gas chromatography–mass spectrometry data. *Nature biotechnology*, 39(2), 169-173.
- Alghamdi, A., Gray, A., & Watson, D. (2019). Investigation of metabolomics techniques by analysis of MS propolis data: which pre-treatment method is better?. *Advances and Applications in Statistics*, 58(1), 13-34.
- Ayaz, M., Ullah, F., Sadiq, A., Ullah, F., Ovais, M., Ahmed, J., & Devkota, H. P. (2019). Synergistic interactions of phytochemicals with antimicrobial agents: Potential strategy to counteract drug resistance. *Chemico-biological interactions*, 308, 294-303.
- Bakker, M. I., Tolls, J., & Kollöffel, C. (2000). Deposition of atmospheric semivolatile organic compounds to vegetation.
- Barthlott, W., Mail, M., Bhushan, B., & Koch, K. (2017). Plant surfaces: structures and functions for biomimetic innovations. *Nano-Micro Letters*, 9(2), 1-40.
- Bernard, A., & Joubès, J. (2013). Arabidopsis cuticular waxes: advances in synthesis, export and regulation. *Progress in lipid research*, 52(1), 110-129.
- Bouslimani, A., Melnik, A. V., Xu, Z., Amir, A., da Silva, R. R., Wang, M., ... & Dorrestein, P. C. (2016). Lifestyle chemistries from phones for individual profiling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(48), E7645-E7654.
- Brasseur, G. P., & Jacob, D. J. (2017). Modeling of atmospheric chemistry. Cambridge University Press.

- Brito, K.S. (2018). *Efeitos de poluentes atmosféricos de uma indústria mineradora sobre características morfofisiológicas e anatômicas de bioindicadores vegetais em brumado, Bahia* [Tesis de Doctorado, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia].
- Carneiro, R. M. A., & Takayanagui, A. M. M. (2009). Estudos sobre bioindicadores vegetais e poluição atmosférica por meio de revisão sistemática da literatura. *Brazilian Journal of Environmental Sciences (Online)*, (13), 26-44.
- CETESB (2020). QUALAR: Sistema de informacoes da Qualidade do Ar. <https://cetesb.sp.gov.br/ar/qualar/>
- Christie, W. W. (09 de febrero de 2022). Waxes. *The Lipidweb*. https://lipidmaps.org/resources/lipidweb/lipidweb_html/lipids/simple/waxes/index.htm
- da Silva Carreira, R. (2014). *Determinação de $\delta^{13}C$ em n-alcanos individuais em amostras de folhas e sedimentos* (Doctoral dissertation, PUC-Rio).
- Dashbaldan, S., Paćzkowski, C., & Szakiel, A. (2020). Variations in triterpenoid deposition in cuticular Waxes during development and maturation of selected fruits of Rosaceae family. *International journal of molecular sciences*, 21(24), 9762.
- Deustua, J. E. (2019). *Caracterización de compuestos epicuticulares del árbol Triplaris americana* [Tesis de Pregrado, Pontificia Universidad Católica del Perú]. ALICIA. https://alicia.concytec.gob.pe/vufind/Record/PUCP_931d0f5650c9480870a8b6b87814ca
- 90
- Dias, A. P. L., Rinaldi, M. C., & Domingos, M. (2016). Foliar accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons in native tree species from the Atlantic Forest (SE-Brazil). *Science of the Total Environment*, 544, 175-184.

- Dias, A.P.L. (2015). *Aporte e remoção de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em fragmentos florestais na região metropolitana de Campinas–SP* [Tesis de Doctorado, Universidade de São Paulo]. Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP. https://smastr16.blob.core.windows.net/pgibt/2015/01/Ana_Paula_Lopes_Dias_DR.pdf
- Domingos, M., Bulbovas, P., Camargo, C. Z., Aguiar-Silva, C., Brandao, S. E., Dafré-Martinelli, M., ... & Alves, E. S. (2015). Searching for native tree species and respective potential biomarkers for future assessment of pollution effects on the highly diverse Atlantic Forest in SE-Brazil. *Environmental Pollution*, 202, 85-95.
- Domingos, M., Klumpp, A., & Klumpp, G. (2003). Disturbances to the atlantic rainforest in southeast Brazil. *Air Pollution Impacts on Crops and Forests*, Imperial College Press, London, 287-308.
- dos Santos, D. Y. A. C. (2020). Vias de síntese de metabólitos secundários. Em dos Santos, D. Y. A. C. (1.^a ed.), *Biossíntese, Funções e Aplicações dos Metabólitos Secundários de Plantas* (pp. 11-44). Editora Appris.
- Dzierżanowski, K., Popek, R., Gawrońska, H., Sæbø, A. y Gawroński, SW (2011). Deposition of Particulate Matter of Different Size Fractions on Leaf Surfaces and in Waxes of Urban Forest Species *Journal International Journal of Phytoremediation*, 13(10), 1037-1046.
- Emberson, L. D., Ashmore, M. R., Murray, F., Kuylenstierna, J. C. I., Percy, K. E., Izuta, T., ... & Agrawal, M. (2001). Impacts of air pollutants on vegetation in developing countries. *Water, Air, and Soil Pollution*, 130(1-4), 107-118.
- Engela, M. R. G. D. S. (2016). *Variações no conteúdo e na composição de carboidratos solúveis e de compostos fenólicos em espécies arbóreas de Floresta Estacional Semidecidual em resposta a poluentes aéreos* (Doctoral dissertation, Instituto de Botânica).

- Farah, F. T., de Lara Muylaert, R., Ribeiro, M. C., Ribeiro, J. W., Mangueira, J. R. D. S. A., Souza, V. C., & Rodrigues, R. R. (2017). Integrating plant richness in forest patches can rescue overall biodiversity in human-modified landscapes. *Forest Ecology and Management*, 397, 78-88.
- Feeley, K. J., Davies, S. J., Perez, R., Hubbell, S. P., & Foster, R. B. (2011). Directional changes in the species composition of a tropical forest. *Ecology*, 92(4), 871-882.
- Fernández Bargalló, A. (2019). *Desarrollo de un pipeline para el análisis de datos metabólicos* (Bachelor's thesis, Universitat Politècnica de Catalunya).
- Ferretti, M., Fischer, R., Mues, V., Granke, O., & Lorenz, M. (2010). Basic design principles for the ICP forests monitoring networks. Manual part II. *Manual on Methods and Criteria for Harmonized Sampling, Assessment, Monitoring and Analysis of the Effects of Air Pollution on Forests. UNECE ICP Forests Programme Coordinating Centre, Hamburg, ISBN, 978-3.*
- Figueiredo, K. V., Oliveira, M. T., Oliveira, A. F. M., Silva, G. C., & Santos, M. G. (2012). Epicuticular-wax removal influences gas exchange and water relations in the leaves of an exotic and native species from a Brazilian semiarid region under induced drought stress. *Australian Journal of Botany*, 60(8), 685-692. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq340>
- Figueiredo, K. V., Oliveira, M. T., Oliveira, A. F. M., Silva, G. C., & Santos, M. G. (2012). Epicuticular-wax removal influences gas exchange and water relations in the leaves of an exotic and native species from a Brazilian semiarid region under induced drought stress. *Australian Journal of Botany*, 60(8), 685-692.
- Fischer, R., Lorenz, M., Granke, O., Mues, V., Iost, S., Van Dobben, H., ... & De Vries, W. (2010). Forest condition in Europe. *Institute for World Forestry, Hamburg, Germany.*

- Freitas, S. R., Hawbaker, T. J., & Metzger, J. P. (2010). Effects of roads, topography, and land use on forest cover dynamics in the Brazilian Atlantic Forest. *Forest Ecology and Management*, 259(3), 410-417.
- Groeneveld, J., Alves, LF, Bernacci, LC, Catharino, ELM, Knogge, C., Metzger, JP, ... y Huth, A. (2009). El impacto de la regulación de la fragmentación y la densidad en la sucesión forestal en la selva atlántica. *Modelado ecológico*, 220 (19), 2450-2459.
- Howe, E., Holton, K., Nair, S., Schlauch, D., Sinha, R., & Quackenbush, J. (2010). Mev: multiexperiment viewer. In *Biomedical informatics for cancer research* (pp. 267-277). Springer, Boston, MA.
- Hujon, F., & Saral, A. M. (2022). Chemical investigation of epicuticular wax obtained from *Euphorbia milii* leaves. *SN Applied Sciences*, 4(4), 1-8. <https://doi.org/10.1007/s42452-022-05002-2>
- Ibarra-Espinosa, S., da Silva, G. A. M., Rehbein, A., Vara-Vela, A., & de Freitas, E. D. (2022). Atmospheric effects of air pollution during dry and wet periods in São Paulo. *Environmental Science: Atmospheres*. <https://doi.org/10.1039/D1EA00080B>
- Janhäll, S. (2015). Review on urban vegetation and particle air pollution—Deposition and dispersion. *Atmospheric environment*, 105, 130-137.
- Joensuu, J., Altimir, N., Hakola, H., Rostás, M., Raivonen, M., Vestenius, M., ... & Bäck, J. (2016). Role of needle surface waxes in dynamic exchange of mono-and sesquiterpenes. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 16(12), 7813-7823.
- Johnson, C. H., Ivanisevic, J., & Siuzdak, G. (2016). Metabolomics: beyond biomarkers and towards mechanisms. *Nature reviews Molecular cell biology*, 17(7), 451-459.

- Johnson, S. R., & Lange, B. M. (2015). Open-access metabolomics databases for natural product research: present capabilities and future potential. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 3, 22.
- Jouraeva, V. A., Johnson, D. L., Hassett, J. P., & Nowak, D. J. (2002). Differences in accumulation of PAHs and metals on the leaves of *Tilia× euchlora* and *Pyrus calleryana*. *Environmental Pollution*, 120(2), 331-338.
- Kondrat, H. (2014). Dinámica de la Comunidad Vegetal de Mata Atlántica en la Región Metropolitana de São Paulo.
- Kontunen-Soppela, S. A. R. I., Ossipov, V., Ossipova, S., & Oksanen, E. (2007). Shift in birch leaf metabolome and carbon allocation during long-term open-field ozone exposure. *Global Change Biology*, 13(5), 1053-1067.
- Lavell, A., Oppenheimer, M., Diop, C., Hess, J., Lempert, R., Li, J., ... & Cardona, O. D. (2012). Climate change: new dimensions in disaster risk, exposure, vulnerability, and resilience. In *Managing the risks of extreme events and disasters to advance climate change adaptation: Special report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* (pp. 25-64). Cambridge University Press.
- Lavergne, F. D., Broeckling, C. D., Cockrell, D. M., Haley, S. D., Peairs, F. B., Jahn, C. E., & Heuberger, A. L. (2018). GC-MS metabolomics to evaluate the composition of plant cuticular waxes for four *Triticum aestivum* cultivars. *International journal of molecular sciences*, 19(2), 249.
- Lavergne, F. D., Broeckling, C. D., Cockrell, D. M., Haley, S. D., Peairs, F. B., Jahn, C. E., & Heuberger, A. L. (2018). GC-MS metabolomics to evaluate the composition of plant

- cuticular waxes for four *Triticum aestivum* cultivars. *International journal of molecular sciences*, 19(2), 249.
- Li, H., Ji, H., Shi, C., Gao, Y., Zhang, Y., Xu, X., ... & Xing, Y. (2017). Distribution of heavy metals and metalloids in bulk and particle size fractions of soils from coalmine brownfield and implications on human health. *Chemosphere*, 172, 505-515.
- Lira, P. K., Tambosi, L. R., Ewers, R. M., & Metzger, J. P. (2012). Land-use and land-cover change in Atlantic Forest landscapes. *Forest Ecology and Management*, 278, 80-89.
- Liu, X., Feakins, S. J., Dong, X., Xue, Q., Marek, T., Leskovar, D. I., ... & Ibrahim, A. M. (2017). Experimental study of leaf wax n-alkane response in winter wheat cultivars to drought conditions. *Organic Geochemistry*, 113, 210-223.
- Matos, T. M. (2020). *Composição química das ceras cuticulares em espécies de Bryophyta (musgos) e Marchantiophyta (hepáticas)* (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo). https://teses.usp.br/teses/disponiveis/41/41132/tde-22062020-091350/publico/Tamara_Matos_CORRIG.pdf
- Mosadegh, H., Trivellini, A., Lucchesini, M., Ferrante, A., Maggini, R., Vernieri, P., & Sodi, A. M. (2019). UV-B Physiological Changes Under Conditions of Distress and Eustress in Sweet Basil. *Plants (Basel, Switzerland)*, 8(10), 396. <https://doi.org/10.3390/plants8100396>
- Moura, B. B. (2013). *Análises estruturais e ultraestruturais em folhas de espécies nativas sob influência de poluentes aéreos* (Doctoral dissertation, Tese de Doutorado, Instituto de Botânica, São Paulo).
- Nakazato, RK, Esposito, MP, Cardoso-Gustavson, P., Bulbovas, P., Pedroso, ANV, de Assis, PILS y Domingos, M. (2018). Efficiency of biomonitoring methods applying tropical

- bioindicator plants for assessing the phytotoxicity of the air pollutants in SE, Brazil. *Investigación sobre ciencias ambientales y contaminación*, 25 (20), 19323-19337.
- Negin, B., Shachar, L., Meir, S., Ramirez, C. C., Horowitz, A. R., Jander, G., & Aharoni, A. (2021). Fatty Alcohols, a Minor Component of the Tree Tobacco Surface Wax, Reduce Insect Herbivory. *bioRxiv*.
- Ni, Y., Guo, Y. J., Han, L., Tang, H., & Conyers, M. (2012). Leaf cuticular waxes and physiological parameters in alfalfa leaves as influenced by drought. *Photosynthetica*, 50(3), 458-466.
- Oliva, S. R., & Mingorance, M. D. (2004). Study of the impact of industrial emission on the vegetation grown around Huelva (South of Spain) city. *Journal of Atmospheric Chemistry*, 49(1-3), 291-302.
- Part, X. I. I. (2016). Sampling and analysis of needles and leaves. "Manual on Methods and Criteria for Harmonized Sampling, Assessment, Monitoring and Analysis of the Effects of Air Pollution on Forests" (UNECE ICP Forests Programme Co-ordinating Centre ed). Thünen Institute of Forest Ecosystems, Eberswalde, Germany, 19.
- Pereira, G. M., da Silva Caumo, S. E., do Nascimento, E. Q. M., Parra, Y. J., & de Castro Vasconcellos, P. (2019). Polycyclic aromatic hydrocarbons in tree barks, gaseous and particulate phase samples collected near an industrial complex in São Paulo (Brazil). *Chemosphere*, 237, 124499.
- Pina, J. M. (2010). *Trocas gasosas, sintomas foliares visíveis e atividade enzimática antioxidativa em plantas jovens de Psidium guajava 'Paluma' expostas ao ozônio no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga*. 129p (Doctoral dissertation, Tese (Doutorado) Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo).

- Pinheiro, C., & Chaves, M. M. (2011). Photosynthesis and drought: can we make metabolic connections from available data?. *Journal of experimental botany*, 62(3), 869-882.
- Pinto, D. M., Blande, J. D., Souza, S. R., Nerg, A. M., & Holopainen, J. K. (2010). Plant volatile organic compounds (VOCs) in ozone (O₃) polluted atmospheres: the ecological effects. *Journal of chemical ecology*, 36(1), 22-34.
- Raheem, D. J., Tawfike, A. F., Abdelmohsen, U. R., Edrada-Ebel, R., & Fitzsimmons-Thoss, V. (2019). Application of metabolomics and molecular networking in investigating the chemical profile and antitrypanosomal activity of British bluebells (*Hyacinthoides non-scripta*). *Scientific reports*, 9(1), 1-13.
- Rahman, T., Shao, M., Pahari, S., Venglat, P., Soolanayakanahally, R., Qiu, X., Rahman, A., & Tanino, K. (2021). Dissecting the Roles of Cuticular Wax in Plant Resistance to Shoot Dehydration and Low-Temperature Stress in *Arabidopsis*. *International journal of molecular sciences*, 22(4), 1554. <https://doi.org/10.3390/ijms22041554>
- Razzaq, A., Sadia, B., Raza, A., Khalid Hameed, M., & Saleem, F. (2019). Metabolomics: A way forward for crop improvement. *Metabolites*, 9(12), 303.
- Ribeiro, B., Caramantin, H. y dos Santos, J. (2020). Uso de bioindicadores vegetales en el monitoreo de la calidad del aire en el municipio de Camaçari-BA. *Revista Internacional de Ciencias*, 10 (1).
- Ribeiro, M.C., Metzger, J.P., Martensen, A.C., Ponzoni, F.J. y Hirota, M.M. (2009). El bosque atlántico brasileño: ¿cuánto queda y cómo se distribuye el bosque restante? Implicaciones para la conservación. *Conservación biológica*, 142 (6), 1141-1153.

- Robinette, S. L., Brüscheiler, R., Schroeder, F. C., & Edison, A. S. (2012). NMR in metabolomics and natural products research: two sides of the same coin. *Accounts of Chemical Research*, 45(2), 288-297.
- Roma, L. P. (2018). *Composição química e morfologia das ceras cuticulares foliares de diferentes espécies de Simaba Aubl. sensu stricto e Homalolepis Turcz.(Simaroubaceae)* [Tesis de Mestrado, Universidade de São Paulo] Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP.
- Sampangi-Ramaiah, M. H., Ravishankar, K. V., Seetharamaiah, S. K., Roy, T. K., Hunashikatti, L. R., Rekha, A., & Shilpa, P. (2016). Barrier against water loss: relationship between epicuticular wax composition, gene expression and leaf water retention capacity in banana. *Functional Plant Biology*, 43(6), 492-501.
- Santos, T. C. D. *Estudos da interação da poluição do ar e concentrações de hidrocarbonetos por floresta urbana-Isopreno (C₅H₈)*. (2021). (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).
- Sharma, P., Kothari, S. L., RATHORE, M., & GOUR, V. (2018). Properties, variations, roles, and potential applications of epicuticular wax: a review. *Turkish Journal of Botany*, 42(2), 135-149. doi:10.3906/bot-1702-25
- Shepherd, G. J. (2010). FITOPAC 2.1. 2. *Campinas, Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Estadual de Campinas*.
- Sicard, P., De Marco, A., Agathokleous, E., Feng, Z., Xu, X., Paoletti, E., Rodriguez, J., & Calatayud, V. (2020). Amplified ozone pollution in cities during the COVID-19 lockdown. *The Science of the total environment*, 735, 139542. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139542>

- Singh, J., & Thakur, J. K. (2018). Photosynthesis and abiotic stress in plants. In *Biotic and abiotic stress tolerance in plants* (pp. 27-46). Springer, Singapore.
- Smoot, M. E., Ono, K., Ruscheinski, J., Wang, P. L., & Ideker, T. (2011). Cytoscape 2.8: new features for data integration and network visualization. *Bioinformatics*, 27(3), 431-432.
- Tafolla-Arellano, J. C., González-León, A., Tiznado-Hernández, M. E., Zacarías García, L. y Báez-Sañudo, R. (2013). Composición, fisiología y biosíntesis de la cutícula en plantas. *Revista fitotecnia mexicana*, 36(1), 3-12.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2006). Secondary metabolites and plant defense. In *Plant Physiology* (4th ed). (pp. 125). Sinauer Associates.
- Vaultier, M. N., & Jolivet, Y. (2015). Ozone sensing and early signaling in plants: an outline from the cloud. *Environmental and Experimental Botany*, 114, 144-152.
<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2014.11.012>
- Victório, C. P., dos Santos, M. S., & Simas, N. K. (2022). Phthalates: environmental pollutants detected in leaf epicuticular wax of *Avicennia schaueriana* and *Rhizophora mangle* from a mangrove ecosystem. *International Journal of Environmental Studies*, 79(1), 114-123.
- Viegas, M. C., & Bassoli, D. G. (2007). Utilização do índice de retenção linear para caracterização de compostos voláteis em café solúvel utilizando CG-EM e coluna HP-Innowax. *Química nova*, 30(8), 2031-2034.
- Visnadi, SR (2015). Brioflora del Parque Estatal Intervales, São Paulo, Brasil: un área importante para la conservación de la biodiversidad de la Mata Atlántica del sureste de Brasil. *Boletín del Museu Paraense Emílio Goeldi, Ciências Naturales*, 10, 105-125.

- Wang, M., Carver, J. J., Phelan, V. V., Sanchez, L. M., Garg, N., Peng, Y., ... & Porto, C. (2016). Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nature biotechnology*, *34*(8), 828-837.
- World Health Organization. (2014). Ambient (outdoor) air quality and health. Fact sheet, 313.
- Worley, B., & Powers, R. (2013). Multivariate analysis in metabolomics. *Current Metabolomics*, *1*(1), 92-107.
- Xue, D., Zhang, X., Lu, X., Chen, G., & Chen, Z. H. (2017). Molecular and evolutionary mechanisms of cuticular wax for plant drought tolerance. *Frontiers in plant science*, *8*, 621. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00621>
- Yang, J., Zhao, X., Lu, X., Lin, X., & Xu, G. (2015). A data preprocessing strategy for metabolomics to reduce the mask effect in data analysis. *Frontiers in molecular biosciences*, *2*, 4. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmolb.2015.00004>

IX. ANEXOS

Anexo A.

Ventana “Estado del trabajo” generado después del proceso de la deconvolución.

| Job Status | |
|-------------------------|--|
| Workflow | MSHUB-GC (version release_27) |
| Status | <p>DONE [Clone] [Clone to Latest Version] [Restart][Delete]</p> <p>Default Views [View Files View All Deconvolved Spectra]</p> <p>Continue Processing [Search Spectral Library and Molecular Network]</p> <p>Export/Download Files [Download Spectra as MGF Download Feature Table Download MSHub Data Integral Table Download MSHub Spectra Data]</p> |
| User | IVAN31 (ivanhurtado3105@gmail.com) |
| Title | TESTE_CERAS GC AL |
| Re-Analyze Task Outputs | Import to Re-analyze Task Data |
| Date Created | 2021-08-17 20:25:51.0 |
| Execution Time | 17 minutes 18 seconds |
| Progress | <pre> graph LR begin[begin] --> preprocess[preprocess_gcms_data] preprocess --> quant[create_quantification] quant --> end[end] end --> begin end --> preprocess end --> quant </pre> |
| Spectrum Files | <p>IVAN31/TESIS VAMOS/Inverno/ALD/ALD1.CDF IVAN31/TESIS VAMOS/Inverno/ALD/ALD2.CDF IVAN31/TESIS VAMOS/Inverno/ALD/ALD3.CDF IVAN31/TESIS VAMOS/Inverno/ALD/ALD4.CDF IVAN31/TESIS VAMOS/Inverno/ALD/ALD5.CDF IVAN31/TESIS VAMOS/Verao/ALR/ALR1.CDF IVAN31/TESIS VAMOS/Verao/ALR/ALR2.CDF IVAN31/TESIS VAMOS/Verao/ALR/ALR3.CDF IVAN31/TESIS VAMOS/Verao/ALR/ALR4.CDF IVAN31/TESIS VAMOS/Verao/ALR/ALR5.CDF</p> |

Anexo B.

Resultados de cuantificación y tabla de características en el formato tabla integral de datos de MSHUB.

Balance score
(puntuación de equilibrio)

Tiempo de retención (minutos) →

| No: | 5 | 11 | 15 | 16 | 21 | 23 | 25 | 26 | 28 | 39 |
|--------------------|-------------|-------------|-------------|------------|------------|------------|-------------|------------|------------|------------|
| RTS: | 5.31 (100%) | 5.88 (100%) | 6.22 (100%) | 6.31 (75%) | 6.43 (71%) | 6.60 (66%) | 6.64 (100%) | 6.70 (72%) | 6.79 (82%) | 7.40 (80%) |
| Rel. Max Integral: | 0.35 | 0.147 | 0.182 | 0.751 | 0.274 | 0.018 | 0.423 | 1.264 | 0.031 | 0.502 |
| Sample\Best Order: | 266 | 471 | 414 | 169 | 321 | 1452 | 235 | 106 | 1158 | 210 |
| ALD1 | 4349.81579 | 345.565876 | 0 | 15338.2009 | 165714.159 | 11086.2301 | 1403.21588 | 763974.728 | 0 | 0 |
| ALD2 | 0.36610959 | 6.38E-07 | 0 | 93.3717344 | 0 | 247.146764 | 0 | 183457.671 | 0 | 5.68581777 |
| ALD3 | 211448.38 | 89114.7562 | 110257.096 | 0 | 136482.822 | 373.765423 | 255702.275 | 756139.413 | 18904.9313 | 0 |
| ALD4 | 5432.10249 | 0.30176289 | 0 | 453800.879 | 0 | 0 | 0 | 165376.041 | 0 | 38.8880604 |
| ALD5 | 0 | 0.0008225 | 70.7972889 | 268.28528 | 0 | 0 | 0 | 219440.401 | 0 | 2.6532946 |
| ALR1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 7663.28635 |
| ALR2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 167580.974 |
| ALR3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 131.347932 | 0 | 0 |
| ALR4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 303354.354 |
| ALR5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6117.32169 |

← *Muestras*

↓ *Áreas de los picos*

Anexo C.

Ventana “Estado del trabajo” y resultados de la búsqueda en la biblioteca de GNPS

Inspección de los resultados “Ver todos los resultados de la biblioteca”



Job Status

Workflow: MOLECULAR-LIBRARYSEARCH-GC (version release_27)
 DONE [Clone] [Clone to Latest Version] [Restart] [Delete]

Status: Default Molecular Networking Results Views [View All Library Hits] [View Top Hits] [View All Spectra With Annotations]
 Methods and Citation for Manuscripts [networking Parameters and Written Description]
 Export/Download Network Files [Download Cytoscape Data]
 Advanced Views - qline2 Views [View qline2 Emperor Plots] [View qline2 Emperor BI-Plots] [Download qline2 Emperor .qzv] [Download qline2 Features biom .qza]

User: IVAN31 (ivanhurtado3105@gmail.com)
Title: AL GC MS LIBRARY MOLECULAR NETWORKING 09.09.21
Re-Analyze Task Outputs: Import to Re-analyze Task Data
Date Created: 2021-09-09 09:22:27.0
Execution Time: 15 minutes 10 seconds

Progress: [Network graph showing molecular networking results]

Filtros para el procesamiento de los resultados finales Back to main page Back to status page Download

AL GC MS LIBRARY MOLECULAR NETWORKING 09.09.21 Hits 1 - 30 out of 1,959 Go to []

| Apply Filters | View: [] | Compound Name | Scan | Filename | Library Class | Cosine | Balance Score (percentage) | Shared Peaks | TIC Query | RT Query | Spec# [] | LIB# [] | Instrument | PI | Ion Source | Kovats Index Calculated | InChIKey | Superclass | Class | Subclass | |
|---------------|-----------|--------------------|------|--------------|---------------|--------|----------------------------|--------------|-----------|----------|-----------|----------|------------|---------------------------------|------------|-------------------------|---------------------------|------------|-------------------------------------|-------------------------------|--|
| Filter By: | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| USI Links: 1 | View: [] | DIIOCTYL PHTHALATE | 552 | specs_ms.mgf | Gold | 0.98 | 100.00 | 66 | 299273.00 | 2045.40 | 0.00 | 390.28 | EI-8 | MASS SPECTROSCOPY SOC. OF JAPAN | EI | 2606.00 | HQUGAVCHLFZDK-UMFFA0YSA-N | Benzenoids | Benzene and substituted derivatives | Benzoic acids and derivatives | |

USI Links: 1 [View]

Query: Universal Spectrum Identifier (USI)
 mspect:MassIVE:TADX-c1755a2770542909391827d7bc0e11:spec:ms_unformatted/spec:00000.mgf:scan:552

Library: [Mass spectrum plot]

Taxonomía química: Superclass: Benzenoids, Class: Benzene and substituted derivatives, Subclass: Benzoic acids and derivatives

Anexo D.

Áreas de picos de los posibles metabolitos obtenidos de la cera epicuticular foliar de *A. sidifolia*.

| POSIBLE METABOLITO | SUM(PRECURSOR INTENSITY) | RTM EAN | MQSC ORE |
|---|--------------------------|---------|----------|
| ALCANOS | | | |
| "Octacosane, 1-iodo-" (C28) | 281631.729 | 42.54 | 0.876 |
| Unknown | 587317.565 | 42.69 | 0.876 |
| "Dotriacontane, 1-iodo-" (C32) | 1415079.336 | 40.47 | 0.897 |
| Triacontane (C30) | 3062036.103 | 36.37 | 0.902 |
| "Hexacosane, 1-iodo-" (C26) | 503466.086 | 38.64 | 0.875 |
| Methylcyclohexane (C7) | 6733.228 | 24.62 | 0.769 |
| 3-Ethylpentane (C7) | 16113970.260 | 41.76 | 0.879 |
| Heptacosane (C27) | 299761.917 | 41.89 | 0.865 |
| Unknown | 5509147.115 | 43.78 | 0.887 |
| Hexatriacontane (C36) | 3806381.450 | 43.01 | 0.902 |
| Tetatriacontane (C34) | 6893026.518 | 39.15 | 0.905 |
| "Triacontane, 1-iodo-" (C30) | 2979447.538 | 41.28 | 0.894 |
| Pentadecane (C15) | 282737.636 | 44.31 | 0.767 |
| ALQUENOS | | | |
| 1-Octene (C8) | 88747.318 | 30.21 | 0.863 |
| 2,4-Dimethyl-1-heptene (C9) | 207621.019 | 34.91 | 0.867 |
| cis-4-Octene (C8) | 204271.862 | 33.39 | 0.896 |
| 1-Decene (C10) | 181228.249 | 46.13 | 0.868 |
| 1-Nonene (C9) | 37650.545 | 39.99 | 0.886 |
| cis-2-Octene (C8) | 36861.143 | 28.51 | 0.858 |
| trans-4-Octene (C8) | 36078.045 | 39.25 | 0.850 |
| ACIDOS GRASOS SATURADOS | | | |
| Stearic acid (C18:0) | 7822572.165 | 29.30 | 0.932 |
| Melissic acid A = Triacotanoic acid (C30:0) | 722200.139 | 45.83 | 0.775 |
| Hexacosanoic acid = Cerotic acid (C26:0) | 513522.412 | 41.01 | 0.770 |
| Unknown | 1021060.179 | 35.56 | 0.781 |
| Palmitic acid = Hexadecanoic acid (C16:0) | 10113000.040 | 25.80 | 0.938 |
| Heptacosanoic acid = Carbocerico acid (C27:0) | 302783.202 | 42.27 | 0.753 |
| Unknown | 424880.086 | 23.93 | 0.790 |
| Unknown | 386830.001 | 39.71 | 0.763 |
| Unknown | 631025.955 | 21.98 | 0.788 |
| Unknown | 2383457.458 | 38.37 | 0.810 |
| ACIDOS GRASOS INSATURADOS | | | |
| Unknown | 1139886.763 | 28.90 | 0.790 |

| | | | |
|---|---------------|-------|-------|
| Oleic acid (C18:1; 9) | 4074521.297 | 28.82 | 0.931 |
| Linoleic acid (C18:2; 9, 12) | 438369.591 | 28.72 | 0.900 |
| "10,12,14-Nonacosatriynoic acid" (C29:3; 10, 12, 14) | 1307875.605 | 48.17 | 0.755 |
| Unknown | 331860.333 | 32.93 | 0.800 |
| ALCOHOLES PRIMARIOS | | | |
| (7Z,11Z)-7,11-Hexadecadienol (1OH-C13:2; 7, 11) | 96942.078 | 37.90 | 0.786 |
| 10-Methyl-1-dodecanol (1OH-C13) | 110732.646 | 37.73 | 0.777 |
| AMIDAS GRASAS | | | |
| Decanamide- (H2NO-C10) | 109802.557 | 37.63 | 0.779 |
| ALDEHÍDOS GRASOS | | | |
| cis-9-Hexadecenal (CHO-C16:1; 9) | 773926.278 | 33.24 | 0.799 |
| "Octanal, 7-methoxy-3,7-dimethyl-" (CHO-C11) | 398207.034 | 29.01 | 0.796 |
| ÉSTER | | | |
| methyl 2-Trimethylsiloxytetracosanoate (C25:0 methyl ester) (2-TMS) | 209541.019 | 37.12 | 0.813 |
| SESQUITERPENOS | | | |
| cis-Thujopsene | 150418.809 | 30.25 | 0.777 |
| Cedryl acetate | 1584716.885 | 43.27 | 0.766 |
| DITERPENOS | | | |
| Labda-7,14-dien-13(r)-ol-alpha-l-rhamnopyranoside | 11497300.490 | 45.06 | 0.784 |
| (1s,3e,7e,11e)-cembra-3,7,11-triene | 202336.715 | 47.08 | 0.798 |
| (3e,7e,11e)-cembra-3,7,11,15-tetraene | 120613.728 | 45.90 | 0.789 |
| Dehydroabietic acid | 8592604.174 | 31.64 | 0.885 |
| TRITERPENOS | | | |
| "12-Oleanen-3-yl acetate, (3.alpha.)-" | 2762317.799 | 44.45 | 0.930 |
| Lanosterol | 1302445.812 | 44.65 | 0.754 |
| "Lup-20(29)-en-28-oic acid, 3-hydroxy-, (3.beta.)-" | 5253645.368 | 44.59 | 0.796 |
| Lanosterin | 17272706.100 | 45.16 | 0.810 |
| Lup-20(29)-en-3-one | 1593897.819 | 45.01 | 0.873 |
| Unknown | 3867006.668 | 44.92 | 0.900 |
| "Lupan-3-ol, acetate" | 3400534.957 | 47.39 | 0.811 |
| Betulin | 302108300.500 | 47.28 | 0.845 |
| C(14a)-Homo-27-norgammacer-14-ene | 497085.837 | 43.40 | 0.844 |
| Ursolic acid | 1224256.756 | 48.00 | 0.830 |
| ESTEROIDES | | | |
| 5-Cholesten-3beta-yl trimethylsilyl ether | 219728.128 | 42.45 | 0.835 |

| | | | |
|---|--------------|-------|-------|
| 3beta,6alpha,7alpha-Trihydroxy-5beta-cholan-24-oic acid Methyl ester | 11231117.350 | 46.61 | 0.799 |
| Unknown | 1297883.889 | 46.25 | 0.811 |
| 3.beta.-Hydroxy-5-cholen-24-oic acid | 4865219.636 | 47.65 | 0.788 |
| Stigmast-5-ene-3beta-ol | 19178671.370 | 46.86 | 0.852 |
| 3beta-Trimethylsiloxy-5alpha,6alpha-epoxycholestane | 8206872.434 | 45.44 | 0.865 |
| BENCENOIDES | | | |
| Unknown | 3541902.642 | 7.48 | 0.810 |
| Diethyl phthalate | 4785285.774 | 34.09 | 0.983 |
| Benzoic acid | 150259.607 | 7.27 | 0.815 |
| Unknown | 84164.154 | 22.34 | 0.867 |
| Diisobutyl phthalate | 434782.844 | 22.24 | 0.928 |
| COMPUESTOS ORGÁNICOS DE NITRÓGENO | | | |
| Diethanolamine | 12379088.490 | 8.98 | 0.850 |
| OTROS | | | |
| 10-(2-Diethylaminopropyl)-phenothiazine | 296628.677 | 12.23 | 0.837 |
| n-Acetyl-DL-serine | 450093.537 | 16.53 | 0.797 |
| DL-2,3-Diaminopropionic acid | 478346.157 | 5.52 | 0.798 |
| L-Aspartic acid | 166559.578 | 25.67 | 0.780 |
| L-Serine | 865969.786 | 14.25 | 0.763 |
| (z)-5-M+A101:A115ethoxy-3,5-dimethyl-2-hexenyltrimethylsilane | 59529812.210 | 8.13 | 0.773 |
| "2-Morpholinomethyl-1,3-diphenyl-2-propanol" | 49873.637 | 26.87 | 0.868 |
| "Hydantoin, 1-benzoyl-2-thio-" | 1240724.577 | 31.21 | 0.789 |
| 5-Hydroxy-3-(2-morpholinoethyl)indole | 1553628.727 | 20.42 | 0.823 |
| "3-Morpholino-1,2-propanediol" | 7112874.562 | 11.20 | 0.777 |
| 1-Methylsilacyclopentane (1d) | 302196.982 | 6.43 | 0.854 |
| "1,19-Eicosadiene" | 80958.929 | 37.52 | 0.782 |
| cis-1-Chloro-9-octadecene | 1460388.702 | 44.20 | 0.765 |
| n-(3-Trimethylsilyloxypropyl)morpholine | 327281.525 | 9.74 | 0.785 |
| Unkown | 338303.953 | 11.87 | 0.780 |
| (z)-5-Methoxy-3,5-dimethyl-2-hexenyltrimethylsilane | 749257.593 | 25.97 | 0.847 |
| TITLE=Fiehn VocBinbase Bin #836 | 77766.477 | 30.03 | 0.882 |
| TITLE=Fiehn VocBinbase Bin #303 | 150191.506 | 10.04 | 0.753 |
| TITLE=Fiehn VocBinbase Bin #832 | 36442.473 | 5.66 | 0.806 |
| TITLE=Fiehn VocBinbase Bin #1449 | 23583.355 | 31.40 | 0.755 |
| TITLE=Fiehn VocBinbase Bin #488 | 97776.880 | 36.71 | 0.897 |
| TITLE=Fiehn VocBinbase Bin #834 | 145665.321 | 24.68 | 0.787 |

| | | | |
|--|-------------|-------|-------|
| TITLE=Fiehn VocBinbase Bin #1122 | 89070.344 | 34.62 | 0.877 |
| TITLE=Fiehn VocBinbase Bin #945 | 87568.065 | 21.63 | 0.920 |
| TITLE=Fiehn VocBinbase Bin #168 | 62779.813 | 27.48 | 0.850 |
| TITLE=Fiehn VocBinbase Bin #837 | 97624.281 | 32.40 | 0.880 |
| TITLE=Fiehn VocBinbase Bin #473 | 110294.329 | 18.19 | 0.829 |
| "9-Octadecenoic acid, 1,2,3-propanetriyl ester, (E,E,E)-" | 3480645.719 | 29.03 | 0.812 |

Anexo E.

Áreas de picos de los posibles metabolitos obtenidos de la cera epicuticular foliar de *A. intermedia*.

| POSIBLE METABOLITO | SUM(PRECURSOR INTENSITY) | RTM EAN | MQS CORE |
|---|--------------------------|---------|----------|
| ALCANOS | | | |
| 2,3-Dimethylheptane (C9) | 579733.644 | 11.41 | 0.775 |
| Pentadecane (C15) | 183065.677 | 35.09 | 0.858 |
| 3-Ethylpentane (C7) | 152604.246 | 17.61 | 0.865 |
| "Dotriacontane, 1-iodo-" (C32) | 2275105.804 | 43.15 | 0.880 |
| Tetratriacontane (C34) | 7590895.614 | 39.32 | 0.864 |
| Unknown | 679532.358 | 44.39 | 0.825 |
| "Triacontane, 1-iodo-" (C30) | 5687675.742 | 44.36 | 0.872 |
| "Octacosane, 1-iodo-" (C28) | 29130301.260 | 41.94 | 0.869 |
| ALQUENOS | | | |
| (z)-9-Heptacosene (C27) | 1554925.075 | 26 | 0.798 |
| 2,4-Dimethyl-1-heptene (C9) | 364763.986 | 37.95 | 0.868 |
| Unknown | 1741939.140 | 40.63 | 0.835 |
| cis-3-Heptene (C7) | 21275.286 | 42.84 | 0.838 |
| 1-Undecene (C11) | 125492.514 | 42.05 | 0.874 |
| Unknown | 830406.675 | 47.4 | |
| 1-Octene (C8) | 487870.901 | 36.55 | 0.849 |
| 1-Nonene (C9) | 92987.934 | 46.66 | 0.895 |
| trans-3-Octene (C8) | 48390.465 | 37.9 | 0.766 |
| ACIDOS GRASOS SATURADOS | | | |
| Palmitic acid = Hexadecanoic acid (C16:0) | 21681998.490 | 25.8 | 0.944 |
| 16-Hydroxyhexadecanoic acid = 16-hydroxypalmitic acid (C16:0) | 1252750.818 | 47 | 0.752 |
| Unknown | 1784489.086 | 32 | |
| Unknown | 1350871.075 | 21.98 | 0.776 |
| Sebacic acid (C10:0) | 1310494.762 | 21.03 | 0.806 |
| Stearic acid (C18:0) | 17173788.120 | 29.3 | 0.941 |
| Unknown | 638420.587 | 27.59 | 0.770 |
| ACIDOS GRASOS INSATURADOS | | | |
| Oleic acid (C18:1; 9) | 4878271.067 | 28.83 | 0.823 |
| Ricinoleic acid (C18:1; 9) | 1032422.528 | 33.24 | 0.773 |
| Unknown | 949709.105 | 32.94 | |

| ACIDOS GRASOS INSATURADOS DERIVATIZADOS | | | |
|--|--------------|-------|-------|
| 2-Trimethylsilylhexanoic acid (C6:1; 2) (2-TMS) | 396256.928 | 28.72 | 0.786 |
| ALCOHOLES PRIMARIOS | | | |
| "9,12-Octadecadien-1-ol, (Z,Z)-" (1OH-C18) | 572065.352 | 28.93 | 0.836 |
| ALCOHOLES SECUNDARIOS | | | |
| 2-Ciclododecenol (2OH-C12) | 97608.139 | 25.5 | 0.761 |
| AMIDAS GRASAS | | | |
| cis-11-Eicosenamide (H2NO-C20:1; 11) | 787280.112 | 41.01 | 0.812 |
| Unknown | 92525.966 | 40.31 | 0.817 |
| "13-Docosenamide, (Z)-" (H2NO-C22:1; 13) | 13211737.870 | 37.55 | 0.875 |
| ALDEHÍDOS GRASOS | | | |
| cis-9-Hexadecenal (CHO-C16:1; 9) | 989063.809 | 37.63 | 0.814 |
| ÉSTER | | | |
| methyl 2-Trimethylsiloxyoctadecanoate (C19:0 methyl ester) (2-TMS) | 1191339.856 | 27.82 | 0.801 |
| methyl 2-Trimethylsiloxyeicosanoate (C21:0 methyl ester) (2-TMS) | 730300.605 | 31.16 | 0.788 |
| methyl 2-Trimethylsiloxydocosanoate (C24:0 methyl ester) (2-TMS) | 304865.620 | 34.24 | 0.795 |
| DITERPENOS | | | |
| "1,3,6,10-Cyclotetradecatetraene, 3,7,11-trimethyl-14-(1-methylethyl)-, [S-(E,Z,E,E)]-" = Cembrene | 354915.031 | 45.43 | 0.773 |
| TRITERPENOS | | | |
| Betulin | 1988502.937 | 47.32 | 0.824 |
| Unknown | 438799.848 | 48.9 | |
| Oleanolic acid | 25324869.720 | 47.49 | 0.876 |
| Unknown | 193707.626 | 46.12 | |
| Unknown | 497709.342 | 49.05 | |
| Ursolic acid | 64782457.390 | 48 | 0.866 |
| Unknown | 661470.269 | 48.11 | |
| ESTEROIDES | | | |
| (24R)-24-ethyl-5-Cholesten-3beta-yl trimethylsilyl ether | 1860377.423 | 44.85 | 0.881 |
| 3beta-Trimethylsiloxy-5alpha,6alpha-epoxycholestane | 281819.850 | 51.98 | 0.812 |
| BENCENOIDES | | | |
| Benzoic acid | 3730436.967 | 7.47 | 0.816 |
| Diocetyl phthalate | 1433691.413 | 34.1 | 0.922 |
| COMPUESTOS ORGÁNICOS DE NITRÓGENO | | | |
| Diethanolamine | 13962280.590 | 8.98 | 0.855 |
| OTROS | | | |
| 1,2-Benzenedicarboxylic anhydride | 597198.795 | 22.24 | 0.830 |

| | | | |
|---|--------------|-------|-------|
| 10-(2-Diethylaminopropyl)-phenothiazine | 27098.956 | 19.83 | 0.839 |
| n-Acetyl-DL-serine | 380476.016 | 16.53 | 0.773 |
| L-Tyrosine | 656472.281 | 12.44 | 0.809 |
| 5-Methoxy-2,3-dimethyl-1-(2-(6-methyl-3-pyridyl)ethyl)indole | 7120822.592 | 7.98 | 0.765 |
| L-Tryptophane | 184172.409 | 13.35 | 0.757 |
| n-(3-Trimethylsilyloxypropyl)morpholine | 1370088.168 | 9.79 | 0.760 |
| "Undec-10-ynoic acid, octadecyl ester" | 1459669.326 | 33.43 | 0.793 |
| Heptyl octacosyl ether | 135082.148 | 49.27 | 0.759 |
| 4,4'-Bipyridine | 77859.625 | 12.62 | 0.819 |
| "2,2'-Bipyridine" | 182928.105 | 12.54 | 0.827 |
| "3-Morpholino-1,2-propanediol" | 61375.352 | 26.89 | 0.788 |
| Docosyl octyl ether | 148450.920 | 24.4 | 0.780 |
| cis-1-Chloro-9-octadecene | 1028447.763 | 29.5 | 0.817 |
| 4-Amino-5-methyl-2(1H)-pyrimidinethione | 4192824.772 | 14.17 | 0.753 |
| Octyl tetracosyl ether | 290681.109 | 27.99 | 0.758 |
| Heptyl triacontyl ether | 890401.025 | 42.5 | 0.801 |
| "2,2'-Trimethylenebis-1,3-dioxolane" | 140905.450 | 29.67 | 0.769 |
| "DL-1,2,3,4,4a,6,7,8,cis-8a,9,10,trans-10a-Dodecahydro-4a,8a-dimethylphenanthrene-2,8-dione" | 2822887.227 | 45.05 | 0.790 |
| 1-Phenyl-2-trimethylsilylcyclopropane | 403712.853 | 39.27 | 0.769 |
| Thiamine | 169164.257 | 31.33 | 0.753 |
| Butyl dotriacontyl ether | 668624.358 | 47.12 | 0.806 |
| 5-Hydroxy-3-(2-morpholinoethyl)indole | 1464911.440 | 20.41 | 0.834 |
| "2-Morpholinomethyl-1,3-diphenyl-2-propanol" | 31215000.420 | 11.2 | 0.864 |
| "9-Octadecenoic acid, 1,2,3-propanetriyl ester, (E,E,E)-" | 3480645.719 | 29.03 | 0.812 |
| TITLE=Fiehn VocBinbase Bin #912 | 96645.564 | 27.48 | 0.831 |
| TITLE=Fiehn VocBinbase Bin #1122 | 208787.677 | 36.71 | 0.904 |
| TITLE=Fiehn VocBinbase Bin #168 | 177418.561 | 40.5 | 0.855 |
| TITLE=Fiehn VocBinbase Bin #473 | 112519.823 | 18.19 | 0.810 |
| TITLE=Fiehn VocBinbase Bin #488 | 214043.855 | 38.67 | 0.928 |
| TITLE=Fiehn VocBinbase Bin #951 | 95841.141 | 42.23 | 0.843 |
| TITLE=Fiehn VocBinbase Bin #945 | 225571.787 | 34.62 | 0.931 |
| TITLE=Fiehn VocBinbase Bin #476 | 194297.921 | 24.68 | 0.764 |
| TITLE=Fiehn VocBinbase Bin #837 | 125756.739 | 21.62 | 0.865 |
| TITLE=Fiehn VocBinbase Bin #836 | 154061.226 | 32.4 | 0.899 |
| TITLE=Fiehn VocBinbase Bin #834 | 149132.134 | 30.03 | 0.885 |
| TITLE=Fiehn VocBinbase Bin #787 | 174560.982 | 56.95 | 0.750 |

Anexo F.

Áreas de picos de los posibles metabolitos obtenidos de la cera epicuticular foliar de *E. excelsa*.

| POSIBLE METABOLITO | SUM(PRECURSOR INTENSITY) | RTME AN | MQSC ORE |
|---|--------------------------|---------|----------|
| ALCANOS | | | |
| Nonacosane (C29) | 29722051.730 | 39.17 | 0.943 |
| "Dotriacontane, 1-iodo-" (C32) | 7337286.119 | 39.14 | 0.892 |
| Disparlure (C19) | 331972.329 | 48.63 | 0.836 |
| Hexamethylethane (C8) | 157852.433 | 35.08 | 0.756 |
| Decane (C10) | 1518362.214 | 44.34 | 0.848 |
| Tetratriacontane (C34) | 70335167.300 | 44.24 | 0.896 |
| Octadecane (C18) | 1753714.519 | 40.46 | 0.921 |
| Eicosane (C20) | 1535087.041 | 36.38 | 0.939 |
| Heptadecane (C17) | 198109.756 | 34.91 | 0.911 |
| 3-Methylnonane (C10) | 1305724.025 | 41.89 | 0.844 |
| ALQUENOS | | | |
| 1-Nonene (C9) | 225164.661 | 43.76 | 0.872 |
| 17-Pentatriacontene (C35) | 938250.084 | 46.62 | 0.785 |
| 1-Tridecene (C13) | 352191.912 | 41.47 | 0.801 |
| ACIDOS GRASOS SATURADOS | | | |
| Unknown | 2123081.897 | 38.37 | 0.804 |
| Hexacosanoic acid = Cerotic acid (C26:0) | 1111288.275 | 41.00 | 0.780 |
| Unknown | 1789427.520 | 45.85 | |
| Unknown | 799325.893 | 22.02 | |
| Stearic acid (C18:0) | 17523912.100 | 29.30 | 0.935 |
| Unknown | 918004.498 | 35.56 | 0.784 |
| Palmitic acid = Hexadecanoic acid (C16:0) | 819653.669 | 23.93 | 0.893 |
| Unknown | 1214826.920 | 21.97 | 0.780 |
| Unknown | 802665.473 | 43.48 | |
| ACIDOS GRASOS INSATURADOS | | | |
| 18-Nonadecenoic acid (C19:1; 18) | 973365.994 | 48.83 | 0.805 |
| Oleic acid (C18:1; 9) | 6574125.044 | 28.84 | 0.831 |
| ALCOHOLES PRIMARIOS | | | |
| 1-Hexadecanol (OH-C16) | 266432.028 | 42.14 | 0.767 |
| 14-methyl-1-Pentadecanol (OH-C16) | 235625.775 | 40.07 | 0.797 |
| 12-methyl-1-Tetradecanol (OH-C15) | 70825.657 | 36.91 | 0.819 |
| ALCOHOLES SECUNDARIOS | | | |
| Unknown | 24690878.480 | 44.39 | |
| Cyclohexanol (OH-C6) | 1491937.607 | 40.63 | 0.813 |

| | | | |
|---|---------------|-------|-------|
| Unknown | 46510889.540 | 41.96 | |
| AMIDAS GRASAS | | | |
| Unknown | 2714250.586 | 37.46 | 0.861 |
| Oleil amide (H ₂ NO-C18:1; 9) | 364550.339 | 27.67 | 0.769 |
| Hexadecanamide (H ₂ NO-C16) | 1550199.605 | 28.10 | 0.843 |
| ALDEHÍDOS GRASOS | | | |
| cis-9-Hexadecenal (CHO-C16:1; 9) | 479231.392 | 33.23 | 0.780 |
| ÉSTER | | | |
| Octadecyl hexadecanoate (C34) | 3835060.333 | 47.27 | 0.799 |
| cis-9-Octadecenoic acid butyl ester (C22:1; 9) | 1626435.592 | 49.22 | 0.875 |
| methyl 2-Trimethylsiloxytricosanoate (C25:0 methyl ester) (2-TMS) | 326691.321 | 35.70 | 0.793 |
| TRITERPENOS | | | |
| Betulin | 102274600.100 | 47.68 | 0.819 |
| Oleanolic acid | 2965050.977 | 47.49 | 0.856 |
| Lanosterin | 12364308.140 | 45.47 | 0.800 |
| ESTEROIDES | | | |
| Beta-Sitosterol | 4511778.689 | 44.85 | 0.900 |
| Unknown | 911039.342 | 47.78 | |
| BENCENOIDES | | | |
| n-(2-Phenylbutyryl)piperidin-2-one | 260550.282 | 25.06 | 0.778 |
| Diocetyl phthalate | 4548633.854 | 34.08 | 0.979 |
| p-hydroxybenzoic acid TMS ether | 429220.585 | 17.25 | 0.915 |
| COMPUESTOS ORGÁNICOS DE NITRÓGENO | | | |
| n,n-Diisobutylnitrosoamine | 264328.320 | 33.56 | 0.786 |
| Diethanolamine | 9819099.235 | 8.98 | 0.847 |
| OTROS | | | |
| 10-(2-Diethylaminopropyl)-phenothiazine | 1627168.495 | 20.64 | 0.855 |
| 3,4-Dihydroxy-L-phenylalanine | 689122.740 | 12.44 | 0.769 |
| N-Acetyl-DL-serine | 452529.035 | 16.53 | 0.799 |
| Oxalic acid | 3420843.747 | 9.05 | 0.842 |
| DL-2,3-Diaminopropionic acid | 1936907.238 | 9.79 | 0.784 |
| L-Ascorbic acid | 465048.049 | 8.65 | 0.774 |
| DL-alpha-Hydroxybutyric acid | 577206.818 | 5.44 | 0.777 |
| D-Xylulose | 96708.357 | 8.46 | 0.774 |
| 2-Methylcyclohexanone | 726608.215 | 21.72 | 0.856 |
| n-(3-Trimethylsilyloxypropyl)morpholine | 361425.995 | 12.10 | 0.767 |
| 3-(Nitromethyl)phthalide | 9564111.310 | 25.51 | 0.848 |
| Octadecanenitrile | 1230613.184 | 22.90 | 0.872 |
| "2,4'-Bipyridine" | 470223.980 | 12.59 | 0.882 |

| | | | |
|--|--------------|-------|-------|
| "2,2'-Bipyridine" | 1088613.992 | 12.52 | 0.946 |
| Hexadecyl methanesulfonate | 937768.986 | 42.62 | 0.816 |
| 5-Hydroxy-3-(2-morpholinoethyl)indole | 89385.071 | 19.08 | 0.807 |
| "Cyclohexane, nonadecyl-" | 368133.317 | 22.57 | 0.759 |
| "Cyclohexane, (1,1-dimethylethyl)-" | 23261171.940 | 39.34 | 0.751 |
| Heptyl hexadecyl ether | 170350.191 | 33.94 | 0.796 |
| "Pentadecafluorooctanoic acid, heptadecyl ester" | 153348.695 | 39.55 | 0.762 |
| cis-1-Chloro-9-octadecene | 3797346.724 | 45.02 | 0.813 |
| 1-(2,6-Dimethylphenoxy)-2-aminopropane | 37466.923 | 5.60 | 0.769 |
| "Pentadecafluorooctanoic acid, octadecyl ester" | 594973.661 | 44.57 | 0.768 |
| "Docosylamine, N,N-dimethyl-" | 701804.851 | 33.53 | 0.926 |
| "Cyclopropanecarboxamide, N-butyl-N-(3-methylbutyl)-" | 319732.756 | 6.71 | 0.751 |
| "2-Morpholinomethyl-1,3-diphenyl-2-propanol" | 39367956.100 | 11.48 | 0.875 |
| Eicosyl nonyl ether | 187260.790 | 51.71 | 0.759 |
| "Undec-10-ynoic acid, hexadecyl ester" | 624918.224 | 43.56 | 0.754 |
| "1,3-Isindolinedione, 2-(4-methoxyphenyl)" | 21775891.930 | 19.66 | 0.792 |
| Heptadecanenitrile | 580198.902 | 26.81 | 0.808 |
| 4-Amino-5-methyl-2(1H)-pyrimidinethione | 16928026.060 | 14.28 | 0.763 |
| Hippuric-benzaldehyde azalactone | 1539329.302 | 30.66 | 0.952 |
| TITLE=Fiehn VocBinbase Bin #520 | 118625.465 | 27.48 | 0.849 |
| TITLE=Fiehn VocBinbase Bin #473 | 167079.864 | 18.20 | 0.839 |
| TITLE=Fiehn VocBinbase Bin #1269 | 888133.780 | 49.45 | 0.754 |
| TITLE=Fiehn VocBinbase Bin #834 | 254602.557 | 24.68 | 0.855 |
| TITLE=Fiehn VocBinbase Bin #837 | 204284.380 | 30.03 | 0.884 |
| TITLE=Fiehn VocBinbase Bin #488 | 227675.231 | 21.63 | 0.931 |
| TITLE=Fiehn VocBinbase Bin #836 | 333103.106 | 34.62 | 0.904 |

Anexo G.

Áreas de picos de los posibles metabolitos obtenidos de la cera epicuticular foliar de *G. macrophylla*.

| POSIBLE METABOLITO | SUM(PRECURSOR INTENSITY) | RTM EAN | MQSC ORE |
|--|--------------------------|---------|----------|
| ALCANOS | | | |
| "Octacosane, 1-iodo-" (C28) | 1134754.669 | 33.38 | 0.878 |
| Pentadecane (C15) | 43249.321 | 30.20 | 0.788 |
| "Triacosane, 1-iodo-" (C30) | 11035786.290 | 36.38 | 0.884 |
| Tetraacosane (C34) | 113407172.400 | 41.78 | 0.907 |
| "Hexacosane, 1-iodo-" (C26) | 1014748.483 | 41.88 | 0.874 |
| Pentacosane (C25) | 986774.253 | 34.89 | 0.872 |
| Disparlure (C19) | 291411.816 | 28.88 | 0.791 |
| Triacosane (C30) | 35670166.740 | 44.23 | 0.902 |
| Hexacosane (C36) | 11145043.890 | 43.01 | 0.893 |
| "Dotriacosane, 1-iodo-" (C32) | 18115928.420 | 39.15 | 0.901 |
| Heptane (C7) | 170959.038 | 44.33 | 0.808 |
| ALQUENOS | | | |
| trans-2-Octene (C8) | 90948.947 | 24.26 | 0.799 |
| trans-4-Octene (C8) | 59200.806 | 35.82 | 0.842 |
| cis-4-Octene (C8) | 36728.805 | 37.25 | 0.895 |
| 1-Nonene (C9) | 128735.857 | 39.97 | 0.882 |
| Cis-2-Heptene (C7) | 22054.379 | 41.56 | 0.816 |
| 2,4-Dimethyl-1-heptene (C9) | 312573.745 | 42.53 | 0.872 |
| ACIDOS GRASOS SATURADOS | | | |
| Sebacic acid (C10:0) | 4862600.910 | 21.03 | 0.820 |
| Pentadecanoic acid (C15:0) | 1630425.529 | 23.93 | 0.758 |
| Palmitic acid = Hexadecanoic acid (C16:0) | 45242691.720 | 25.80 | 0.938 |
| Heptadecanoic acid = Margaric acid (C17:0) | 1329105.131 | 27.58 | 0.764 |
| Stearic acid (C18:0) | 42578134.860 | 29.31 | 0.933 |
| Tetracosanoic acid (C24:0) | 1337464.958 | 38.37 | 0.791 |
| Unknown | 3484169.363 | 43.49 | |
| ACIDOS GRASOS INSATURADOS | | | |
| Linoleic acid (C18:2; 9, 12) | 1678449.515 | 28.72 | 0.907 |
| Oleic acid (C18:1; 9) | 10520448.390 | 28.83 | 0.928 |
| Unknown | 1954060.245 | 28.95 | 0.770 |
| Linolenic acid (C18:3; 9,12,15) | 8998682.136 | 29.74 | 0.792 |

| | | | |
|--|--------------|-------|-------|
| Unknown | 1145597.453 | 31.21 | |
| ALCOHOLES PRIMARIOS | | | |
| 10-Methyl-1-dodecanol (1OH-C13) | 588261.077 | 25.86 | 0.824 |
| 1-Hexadecanol (OH-C16) | 863789.780 | 33.29 | 0.858 |
| 1-Tetradecanol(1OH-C14) | 130744.310 | 37.72 | 0.815 |
| ALDEHÍDOS GRASOS | | | |
| cis-9-Hexadecenal (CHO-C16:1; 9) | 1806210.265 | 33.24 | 0.805 |
| ÉSTER | | | |
| methyl 2-Trimethylsiloxyoctadecanoate (C19:0 methyl ester) (2-TMS) | 1532795.688 | 27.82 | 0.843 |
| methyl 2-Trimethylsiloxyeicosanoate (C21:0 methyl ester) (2-TMS) | 596004.190 | 31.15 | 0.816 |
| SESQUITERPENOS | | | |
| 3-Methylene-7,11-dimethyl-1-dodecene | 321563.067 | 21.70 | 0.833 |
| 7-Isopropenyl-1,4a-dimethyl-3,4,5,6,7,8-hexahydro-2-naphthalenone = .alpha.-cyperone | 11235809.500 | 45.35 | 0.798 |
| DITERPENOS | | | |
| Phytol | 1034269.881 | 28.19 | 0.910 |
| TRITERPENOS | | | |
| "12-Oleanen-3-yl acetate, (3.alpha.)-" | 7020707.902 | 44.93 | 0.887 |
| C(14a)-Homo-27-norgammacer-14-ene = Serratene | 1527968.907 | 45.16 | 0.761 |
| Betulin | 18250618.650 | 45.47 | 0.855 |
| Lanosterin | 2767843.948 | 46.04 | 0.801 |
| Unknown | 430228.263 | 46.61 | |
| Unknown | 392314.959 | 47.63 | |
| Ursolic acid | 27325976.920 | 47.99 | 0.865 |
| Unknown | 941319.526 | 48.90 | |
| squalene | 334010.122 | 49.23 | 0.753 |
| ESTEROIDES | | | |
| Unknown | 955691.109 | 30.85 | |
| Unknown | 1124799.098 | 45.57 | |
| Unknown | 4335264.127 | 46.51 | |
| Stigmast-5-ene-3beta-ol | 953914.304 | 49.56 | 0.770 |
| Tetrahydrocortisone | 1355843.371 | 49.76 | 0.765 |
| Unknown | 1072539.296 | 50.45 | |
| Unknown | 1057859.410 | 50.77 | 0.783 |
| 3beta-Trimethylsiloxy-5alpha,6alpha-epoxycholestane | 2829486.563 | 51.06 | 0.859 |
| Unknown | 6863474.496 | 47.27 | 0.764 |
| BENCENOIDES | | | |
| p-Hydroxybenzoic acid TMS ether TMS ester | 113387.660 | 17.26 | 0.848 |

| | | | |
|---|--------------|-------|-------|
| Diisobutyl phthalate | 664544.095 | 22.24 | 0.834 |
| Diocetyl phthalate | 24723772.520 | 34.10 | 0.984 |
| COMPUESTOS ORGÁNICOS DE NITRÓGENO | | | |
| Diethanolamine | 29511368.450 | 8.98 | 0.854 |
| OTROS | | | |
| DL-2,3-Diaminopropionic acid | 730394.266 | 5.43 | 0.752 |
| Norleucine | 440310.286 | 6.82 | 0.847 |
| L-Tyrosine | 1457779.894 | 12.44 | 0.799 |
| N-Acetyl-DL-serine | 707428.514 | 16.53 | 0.787 |
| L-Norleucine | 142402.277 | 41.92 | 0.775 |
| "1-Decanamine, N,N-dimethyl-" | 108898.749 | 33.53 | 0.828 |
| dl-7-Azatryptophan | 240076.880 | 50.02 | 0.784 |
| Isobutyl tetratriacontyl ether | 4730062.220 | 43.77 | 0.880 |
| 4-Amino-5-methyl-2(1H)-pyrimidinethione | 7190581.004 | 14.17 | 0.754 |
| Docosyl isobutyl ether | 1136152.929 | 37.77 | 0.870 |
| "Docosylamine, N,N-dimethyl-" | 241342.006 | 23.00 | 0.762 |
| "2-Morpholinomethyl-1,3-diphenyl-2-propanol" | 589096.026 | 12.23 | 0.811 |
| Nonyl octacosyl ether | 5575730.235 | 41.29 | 0.890 |
| "3-Morpholino-1,2-propanediol" | 135741.380 | 26.88 | 0.751 |
| Hexacosyl nonyl ether | 2466072.311 | 38.67 | 0.890 |
| 4-Methoxy-2-methyl-3-trimethylsilylmethyl-1-undecene | 1150915.180 | 21.82 | 0.790 |
| alpha-Lactose | 380628.816 | 25.40 | 0.759 |
| Maltotriose | 17000733.510 | 43.09 | 0.789 |
| 2-Methylcyclohexanone | 157411.845 | 29.35 | 0.829 |
| n-(3-Trimethylsilyloxypropyl)morpholine | 2718355.228 | 20.41 | 0.822 |
| Hypotaurine | 51112914.320 | 8.09 | 0.752 |
| TITLE=Fiehn VocBinbase Bin #168 | 776348.565 | 36.71 | 0.940 |
| TITLE=Fiehn VocBinbase Bin #1449 | 89558.269 | 31.39 | 0.775 |
| TITLE=Fiehn VocBinbase Bin #912 | 303058.486 | 43.86 | 0.816 |
| TITLE=Fiehn VocBinbase Bin #787 | 296379.244 | 56.95 | 0.755 |
| TITLE=Fiehn VocBinbase Bin #837 | 517198.448 | 42.23 | 0.901 |
| TITLE=Fiehn VocBinbase Bin #834 | 281111.972 | 21.63 | 0.853 |
| TITLE=Fiehn VocBinbase Bin #945 | 468729.325 | 32.40 | 0.935 |
| TITLE=Fiehn VocBinbase Bin #488 | 737131.368 | 34.62 | 0.954 |
| TITLE=Fiehn VocBinbase Bin #520 | 251336.572 | 27.48 | 0.827 |

Anexo H.

Áreas de picos de los posibles metabolitos obtenidos de la cera epicuticular foliar de *M. cabucu*.

| POSIBLE METABOLITO | SUM(PRECURSOR INTENSITY) | RTM EAN | MQSC ORE |
|--|--------------------------|---------|----------|
| ALCANOS | | | |
| Pentadecane (C15) | 328698.677 | 34.90 | 0.873 |
| "Dotriacontane, 1-iodo-" (C32) | 2320520.474 | 36.37 | 0.896 |
| Triacontane (C30) | 8980193.189 | 39.15 | 0.901 |
| "Octacosane, 1-iodo-" (C28) | 430554.435 | 41.28 | 0.842 |
| Tetratriacontane (C34) | 14535726.250 | 41.76 | 0.906 |
| "Triacontane, 1-iodo-" (C30) | 541642.566 | 43.77 | 0.890 |
| Hexatriacontane (C36) | 11648926.360 | 44.22 | 0.878 |
| ALQUENOS | | | |
| 1-Nonene (C9) | 144872.085 | 28.49 | 0.872 |
| 1-Octene (C8) | 280944.470 | 30.19 | 0.879 |
| cis-4-Octene (C8) | 569846.458 | 33.39 | 0.892 |
| (z)-9-Heptacosene (C27) | 3510805.660 | 37.72 | 0.906 |
| ACIDOS GRASOS SATURADOS | | | |
| Sebacic acid (C10:0) | 6306073.905 | 21.04 | 0.821 |
| Myristic acid = Tetradecanoic acid (C14:0) | 3890110.549 | 21.98 | 0.762 |
| Pentadecanoic acid (C15:0) | 2714922.978 | 23.94 | 0.760 |
| Palmitic acid = Hexadecanoic acid (C16:0) | 82138127.220 | 25.81 | 0.937 |
| Heptadecanoic acid = Margaric acid (C17:0) | 2173060.877 | 27.59 | 0.759 |
| Stearic acid (C18:0) | 66421534.270 | 29.31 | 0.932 |
| Unknown | 3672795.040 | 32.55 | 0.856 |
| Unknown | 2497408.765 | 35.56 | 0.790 |
| Unknown | 3417674.928 | 38.37 | 0.804 |
| Hexacosanoic acid = Cerotic acid (C26:0) | 2370279.056 | 41.01 | 0.775 |
| Octacosanoic acid (C28:0) | 3415315.703 | 43.50 | 0.757 |
| Melissic acid A = Triacontanoic acid (C30:0) | 2517721.885 | 45.83 | 0.776 |
| ACIDOS GRASOS INSATURADOS | | | |
| Linoleic acid (C18:2; 9, 12) | 7238930.397 | 28.73 | 0.931 |
| Oleic acid (C18:1; 9) | 21263679.100 | 28.83 | 0.904 |
| gamma-Linolenic acid (C18:3; 6, 9, 12) | 5132202.842 | 30.29 | 0.795 |
| "10,12,14-Nonacosatriynoic acid" (C29:3; 10, 12, 14) | 7012962.159 | 46.29 | 0.797 |
| ALCOHOLES PRIMARIOS | | | |
| 12-methyl-1-Tetradecanol (OH-C15) | 211191.634 | 43.18 | 0.801 |
| AMIDAS GRASAS | | | |

| | | | |
|---|--------------|-------|-------|
| 13-Docosenamide, (Z)- (H₂NO-C₂₂:1; 13) | 2503240.473 | 37.45 | 0.889 |
| ALDEHÍDOS GRASOS | | | |
| cis-9-Hexadecenal (CHO-C₁₆:1; 9) | 1864449.733 | 33.24 | 0.801 |
| ÉSTER | | | |
| methyl 2-Trimethylsiloxy-hexadecanoate (C₁₇:0 methyl ester) (2-TMS) | 489400.897 | 24.21 | 0.755 |
| methyl 2-Trimethylsiloxyoctadecanoate (C₁₉:0 methyl ester) (2-TMS) | 2716325.175 | 27.82 | 0.842 |
| methyl 2-Trimethylsiloxyeicosanoate (C₂₁:0 methyl ester) (2-TMS) | 1464199.453 | 31.16 | 0.835 |
| methyl 2-Trimethylsiloxydocosanoate (C₂₄:0 methyl ester) (2-TMS) | 748409.847 | 34.24 | 0.812 |
| Octadecyl hexadecanoate = Lanolin (C₃₄) | 719746.505 | 54.24 | 0.807 |
| SESQUITERPENOS | | | |
| 7-Isopropenyl-1,4a-dimethyl-3,4,5,6,7,8-hexahydro-2-naphthalenone | 76972961.230 | 45.36 | 0.794 |
| DITERPENOS | | | |
| Phytol | 355594.982 | 28.19 | 0.899 |
| TRITERPENOS | | | |
| Unknown | 100219.354 | 41.23 | |
| Unknown | 15847098.920 | 44.46 | |
| "12-Oleanen-3-yl acetate, (3.alpha.)-" | 85349434.960 | 44.94 | 0.901 |
| Betulin | 45926342.650 | 45.47 | 0.862 |
| Lup-20(29)-en-3-one | 1175466.268 | 45.74 | 0.805 |
| Lanosterin | 14219243.670 | 47.13 | 0.767 |
| Oleanolic acid | 42220108.570 | 47.49 | 0.873 |
| Ursolic acid | 88601997.220 | 48.01 | 0.866 |
| "Lup-20(29)-en-28-oic acid, 3-hydroxy-, (3.beta.)-" | 11760407.710 | 48.21 | 0.791 |
| Unknown | 2791335.359 | 48.62 | |
| Unknown | 3880295.321 | 49.31 | |
| ESTEROIDES | | | |
| Tetrahydrocortisone | 3189642.999 | 43.89 | 0.764 |
| 3alpha,6beta,7alpha-Trihydroxy-5beta-cholan-24-oic acid Methyl ester | 3307842.218 | 45.97 | 0.807 |
| 3beta-Trimethylsiloxy-5alpha,6alpha-epoxycholestane | 11447848.940 | 47.25 | 0.862 |
| Unknown | 6840001.436 | 47.75 | |
| Unknown | 1068944.629 | 49.53 | |
| Unknown | 6665734.655 | 50.15 | |
| BENCENOIDES | | | |
| Benzoic acid | 8135060.213 | 7.50 | 0.863 |

| | | | |
|--|--------------|-------|-------|
| 4-Hydroxybenzoic acid | 145429.480 | 17.26 | 0.848 |
| Benzen-1,4-Dicarboxylic acid | 2773319.261 | 20.86 | 0.858 |
| "1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-methylpropyl) ester" | 1023791.575 | 22.25 | 0.925 |
| Butyl isodecyl phthalate | 157453.229 | 24.11 | 0.907 |
| Diamyl phthalate | 175970.290 | 26.13 | 0.788 |
| Diocetyl phthalate | 7103738.057 | 34.09 | 0.977 |
| COMPUESTOS ORGÁNICOS DE NITRÓGENO | | | |
| Diethanolamine | 16215200.330 | 8.99 | 0.855 |
| OTROS | | | |
| 1-o-Tetradecylglycerol 2,3-ditrimethylsilyl ether | 46243.727 | 33.44 | 0.822 |
| n-(3-Trimethylsilyloxypropyl)morpholine | 2763717.386 | 20.42 | 0.824 |
| L-Tryptophane | 388084.733 | 13.35 | 0.766 |
| Dihydrouracil | 2754146.320 | 9.80 | 0.823 |
| Hydoxycholic acid | 13271344.060 | 44.67 | 0.768 |
| Nonyl octacosyl ether | 1101435.313 | 43.00 | 0.892 |
| "Docosylamine, N,N-dimethyl-" | 301714.099 | 33.53 | 0.892 |
| "Triacontylamine, N,N-dimethyl-" | 135492.840 | 26.82 | 0.753 |
| "2-Morpholinomethyl-1,3-diphenyl-2-propanol" | 539525.288 | 12.23 | 0.841 |
| Butyl tetratriacontyl ether | 2256121.817 | 40.43 | 0.904 |
| "2,2'-Bipyridine" | 964218.249 | 12.51 | 0.967 |
| "4,4'-Bipyridine" | 252546.067 | 12.54 | 0.818 |
| "2,3'-Dipyridyl" | 136130.109 | 12.64 | 0.844 |
| Ursodeoxycholic acid | 3950167.405 | 47.32 | 0.796 |
| Hypotaurine | 90914950.490 | 8.11 | 0.764 |
| TITLE=Fiehn VocBinbase Bin #488 | 173258.222 | 34.62 | 0.907 |
| TITLE=Fiehn VocBinbase Bin #1510 | 124093.597 | 18.20 | 0.818 |
| TITLE=Fiehn VocBinbase Bin #834 | 122255.126 | 21.63 | 0.872 |
| TITLE=Fiehn VocBinbase Bin #520 | 75903.249 | 27.48 | 0.838 |
| TITLE=Fiehn VocBinbase Bin #912 | 109759.014 | 30.03 | 0.867 |
| TITLE=Fiehn VocBinbase Bin #1122 | 149569.110 | 38.67 | 0.893 |
| TITLE=Fiehn VocBinbase Bin #945 | 151918.772 | 32.40 | 0.933 |
| TITLE=Fiehn VocBinbase Bin #836 | 140151.863 | 40.50 | 0.885 |
| TITLE=Fiehn VocBinbase Bin #168 | 159605.190 | 36.71 | 0.879 |

Anexo I.

Áreas de picos de los posibles metabolitos obtenidos de la cera epicuticular foliar de *S. granuloso-leprosum*.

| POSIBLE METABOLITO | SUM(PRECURSOR INTENSITY) | RTME AN | MQSCORE |
|---|--------------------------|---------|---------|
| ALCANOS | | | |
| 3-Ethylpentane (C7) | 41675.217 | 30.19 | 0.855 |
| "Triacontane, 1-iodo-" (C30) | 2981569.097 | 33.39 | 0.897 |
| "Tetracosane, 1-iodo-" (C24) | 605223.069 | 33.47 | 0.867 |
| "Octacosane, 1-iodo-" (C28) | 2228403.167 | 34.90 | 0.891 |
| Heptacosane (C27) | 730702.828 | 34.96 | 0.869 |
| "Dotriacontane, 1-iodo-" (C32) | 52720185.920 | 36.39 | 0.902 |
| "Hexacosane, 1-iodo-" (C26) | 8383685.411 | 36.45 | 0.880 |
| Disparlure (C19) | 1078830.333 | 36.86 | 0.867 |
| Pentadecane (C15) | 72964.447 | 37.27 | 0.856 |
| Pentacosane (C25) | 1549742.989 | 37.84 | 0.880 |
| Nonacosane (C29) | 65659273.340 | 39.18 | 0.888 |
| Triacontane (C30) | 363823206.100 | 41.84 | 0.905 |
| Nonacosane (C29) | 3968258.552 | 42.55 | 0.857 |
| Hexatriacontane (C36) | 52356468.160 | 43.03 | 0.905 |
| Tetratriacontane (C34) | 468963079.300 | 44.32 | 0.909 |
| Unknown | 1162061.643 | 45.10 | 0.837 |
| Dotriacontane (C32) | 10412489.300 | 45.39 | 0.882 |
| ALQUENOS | | | |
| Unknown | 39103.635 | 21.28 | |
| 1-Heptene (C7) | 25075.353 | 27.30 | 0.853 |
| trans-4-Octene (C8) | 61173.464 | 31.31 | 0.866 |
| (z)-9-Heptacosene (C27) | 151895.464 | 33.32 | 0.849 |
| cis-2-Nonene (C9) | 99577.566 | 36.50 | 0.852 |
| cis-2-Octene (C8) | 45731.955 | 37.32 | 0.880 |
| 2,4-Dimethyl-1-heptene (C9) | 304918.563 | 39.26 | 0.892 |
| 1-Undecene (C11) | 639525.021 | 39.98 | 0.849 |
| 1-Decene (C10) | 1040909.013 | 43.12 | 0.865 |
| ACIDOS GRASOS SATURADOS | | | |
| Palmitic acid = Hexadecanoic acid (C16:0) | 20340810.510 | 25.80 | 0.950 |
| Stearic acid (C18:0) | 12869003.620 | 29.30 | 0.941 |
| Unknown | 1691620.845 | 35.56 | 0.787 |
| Tricosanoic acid (C23:0) | 982221.359 | 36.98 | 0.770 |

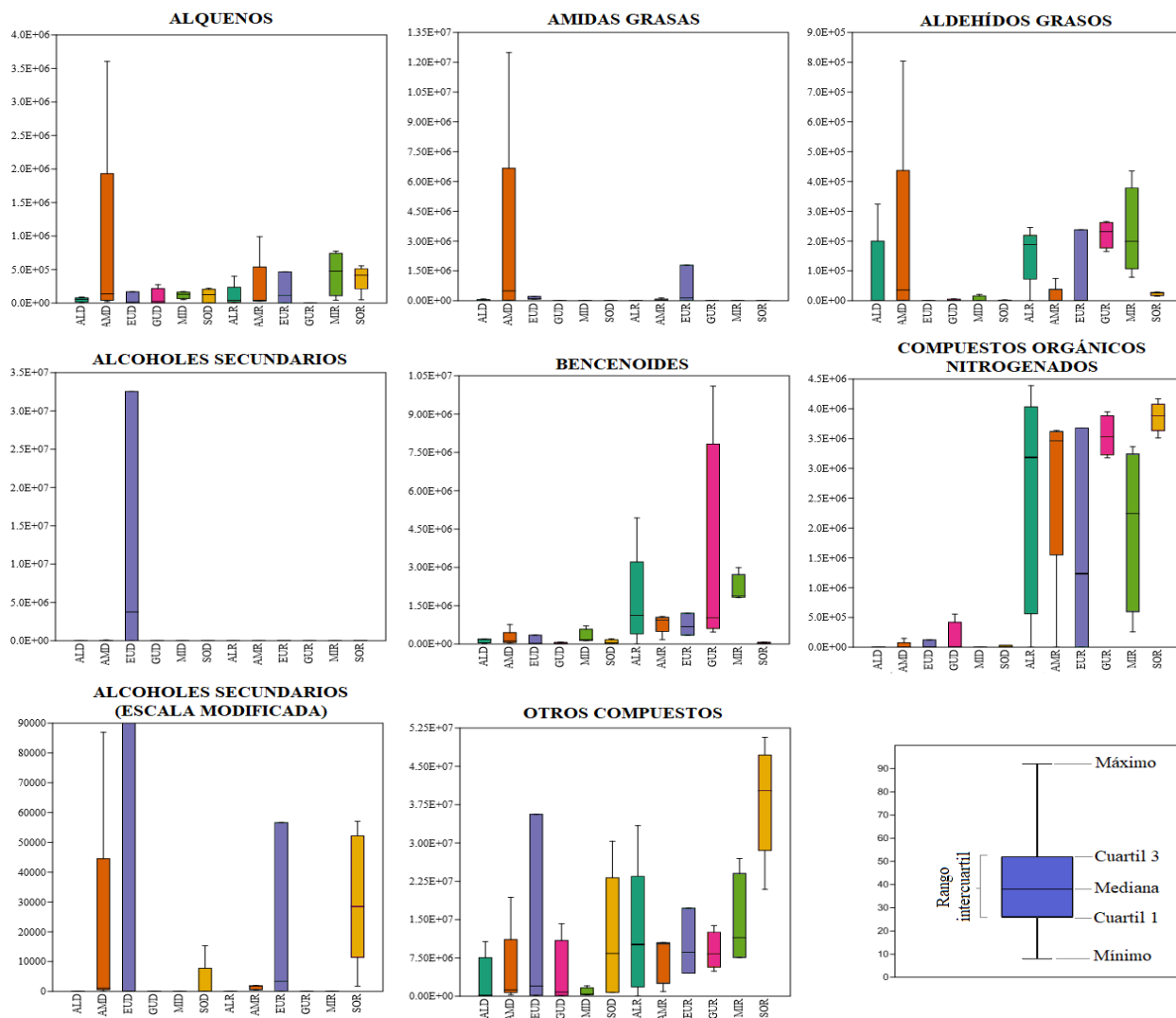
| | | | |
|---|--------------|-------|-------|
| Tetracosanoic acid (C24:0) | 6488958.424 | 38.37 | 0.763 |
| Pentacosanoic acid (C25:0) | 5321402.057 | 39.71 | 0.771 |
| Hexacosanoic acid = Cerotic acid (C26:0) | 2940676.652 | 41.01 | 0.767 |
| Unknown | 18912809.970 | 42.28 | 0.813 |
| Melissic acid A = Triacontanoic acid (C30:0) | 1766378.135 | 45.83 | 0.770 |
| ACIDOS GRASOS INSATURADOS | | | |
| Linoleic acid (C18:2; 9, 12) | 3729623.316 | 28.73 | 0.918 |
| Oleic acid (C18:1; 9) | 6327006.875 | 28.83 | 0.870 |
| gamma-Linolenic acid (C18:3; 6, 9, 12) | 2405953.397 | 30.29 | 0.800 |
| Unknown | 274130.502 | 32.94 | |
| ALCOHOLES PRIMARIOS | | | |
| 14-methyl-1-Pentadecanol (1OH-C16) | 874740.811 | 25.30 | 0.812 |
| 12-methyl-1-Tetradecanol (1OH-C15) | 168768.628 | 36.93 | 0.753 |
| ALCOHOLES SECUNDARIOS | | | |
| 2-Propylcyclohexanol (OH-C9) | 170966.424 | 38.28 | 0.835 |
| ALDEHÍDOS GRASOS | | | |
| Tridecanal (CHO-C13) | 86064.498 | 14.35 | 0.794 |
| Pentadecanal (CHO-C15) | 32562.613 | 35.42 | 0.787 |
| ÉSTER | | | |
| methyl Isovalerate (C6) | 389405.785 | 47.29 | 0.866 |
| Unknown | 484878.754 | 44.63 | 0.784 |
| MONOTERPENOS | | | |
| methyl 2-(4'-(2-trimethylsilyloxy-2-methylpropyl)phenyl)propionate | 170985.341 | 44.57 | 0.753 |
| DITERPENOS | | | |
| abietic acid | 566390.640 | 30.78 | 0.778 |
| TRITERPENOS | | | |
| Oleanolic acid | 1283886.677 | 47.49 | 0.862 |
| Ursolic acid | 3002247.029 | 47.98 | 0.850 |
| Unknown | 349056.272 | 49.31 | |
| ESTEROIDES | | | |
| 5-Cholesten-3beta-yl trimethylsilyl ether | 530253.768 | 42.46 | 0.845 |
| beta-Sitosterol | 1584417.670 | 44.86 | 0.874 |
| 3beta-Trimethylsilyloxy-5alpha,6alpha-epoxycholestane | 751230.669 | 45.47 | 0.807 |
| Unknown | 317188.835 | 45.99 | 0.755 |
| Unknown | 271744.242 | 47.33 | |
| BENCENOIDES | | | |
| Diisobutyl phthalate | 617865.999 | 22.24 | 0.916 |
| COMPUESTOS ORGÁNICOS DE NITRÓGENO | | | |

| | | | |
|---|--------------|-------|-------|
| Diethanolamine | 19391169.740 | 8.99 | 0.854 |
| OTROS | | | |
| 2-Pentadecanone | 956846.944 | 46.84 | 0.785 |
| 1,2-Benzenedicarboxylic anhydride | 99311.911 | 26.13 | 0.754 |
| L-Tyrosine | 1390611.736 | 12.44 | 0.813 |
| N-Acetyl-DL-serine | 492501.879 | 16.53 | 0.793 |
| L-Aspartic acid | 178536.104 | 25.67 | 0.783 |
| N-Methyl-DL-Alanine | 34450.393 | 32.20 | 0.784 |
| n-(3-Trimethylsilyloxypropyl)morpholine | 1682558.521 | 9.79 | 0.782 |
| Ibuprofen | 367029.819 | 6.30 | 0.816 |
| "Docosylamine, N,N-dimethyl-" | 124040.644 | 33.52 | 0.881 |
| (S)-(+)-5-Methyl-1-heptanol | 56344.302 | 13.61 | 0.756 |
| Butyl tetratriacontyl ether | 195534.237 | 39.87 | 0.859 |
| Octyl tetracosyl ether | 364973.671 | 40.18 | 0.852 |
| "2,2'-Trimethylenebis-1,3-dioxolane" | 97876.360 | 29.41 | 0.752 |
| "2-Morpholinomethyl-1,3-diphenyl-2-propanol" | 44690711.120 | 11.21 | 0.851 |
| Heptyl hexacosyl ether | 1438749.402 | 43.89 | 0.860 |
| Isobutyl triacontyl ether | 77900797.240 | 43.80 | 0.893 |
| 5-Hydroxy-3-(2-morpholinoethyl)indole | 1716905.968 | 20.41 | 0.816 |
| Eicosyl isobutyl ether | 2491619.368 | 41.95 | 0.871 |
| Hexacosyl isobutyl ether | 9514080.056 | 38.64 | 0.880 |
| "N,N'-(O-Phenylenebis(oxytrimethylene))diacetamide" | 90340.621 | 26.88 | 0.772 |
| 1-PHENYL-2-TRIMETHYLSILYLCYCLOPROPANE | 501678.713 | 28.96 | 0.792 |
| 1-METHYLSILACYCLOPENTANE (1D) | 249497.955 | 5.50 | 0.829 |
| Eicosyl heptyl ether | 1069188.361 | 42.73 | 0.876 |
| Heptyl triacontyl ether | 4145066.164 | 42.69 | 0.871 |
| Docosyl octyl ether | 1082058.115 | 42.60 | 0.875 |
| "Oxirane, hexadecyl-" | 6550203.138 | 39.66 | 0.907 |
| Nonyl octacosyl ether | 47959398.020 | 41.30 | 0.896 |
| Docosyl isobutyl ether | 10337345.790 | 41.37 | 0.885 |
| Hexacosyl nonyl ether | 3515702.901 | 38.70 | 0.889 |
| "Octanal, 7-methoxy-3,7-dimethyl-" | 800033.993 | 25.90 | 0.821 |
| "Fumaric acid, dodecyl 3-fluorophenyl ester" | 57798.860 | 28.44 | 0.759 |
| Butyl dotriacontyl ether | 129961.995 | 33.85 | 0.783 |
| "Carbonic acid, neopentyl 2-ethylhexyl ester" | 104692.829 | 33.59 | 0.804 |
| "2,2'-Bipyridine" | 142228.992 | 12.54 | 0.857 |
| "2,3'-Dipyridyl" | 147429.591 | 12.64 | 0.842 |
| Nonyl tetracosyl ether | 7917992.140 | 40.48 | 0.883 |

| | | | |
|---|--------------|-------|-------|
| "1,19-Eicosadiene" | 582005.977 | 30.62 | 0.874 |
| "13-Docosen-1-ol, (Z)-" | 987186.105 | 35.38 | 0.880 |
| Docosyl nonyl ether | 5022951.972 | 37.79 | 0.884 |
| Eicosyl nonyl ether | 10876748.000 | 39.21 | 0.882 |
| TITLE=Fiehn VocBinbase Bin #142 | 983035.978 | 37.52 | 0.849 |
| TITLE=Fiehn VocBinbase Bin #836 | 90852.726 | 21.63 | 0.891 |
| TITLE=Fiehn VocBinbase Bin #837 | 123599.013 | 24.68 | 0.798 |
| TITLE=Fiehn VocBinbase Bin #1449 | 26686.789 | 31.40 | 0.773 |
| TITLE=Fiehn VocBinbase Bin #834 | 118292.239 | 34.62 | 0.821 |
| TITLE=Fiehn VocBinbase Bin #473 | 108817.413 | 18.19 | 0.810 |
| TITLE=Fiehn VocBinbase Bin #1122 | 76136.021 | 27.48 | 0.850 |
| TITLE=Fiehn VocBinbase Bin #488 | 169026.110 | 36.71 | 0.901 |
| TITLE=Fiehn VocBinbase Bin #945 | 102351.561 | 30.03 | 0.935 |

Anexo J.

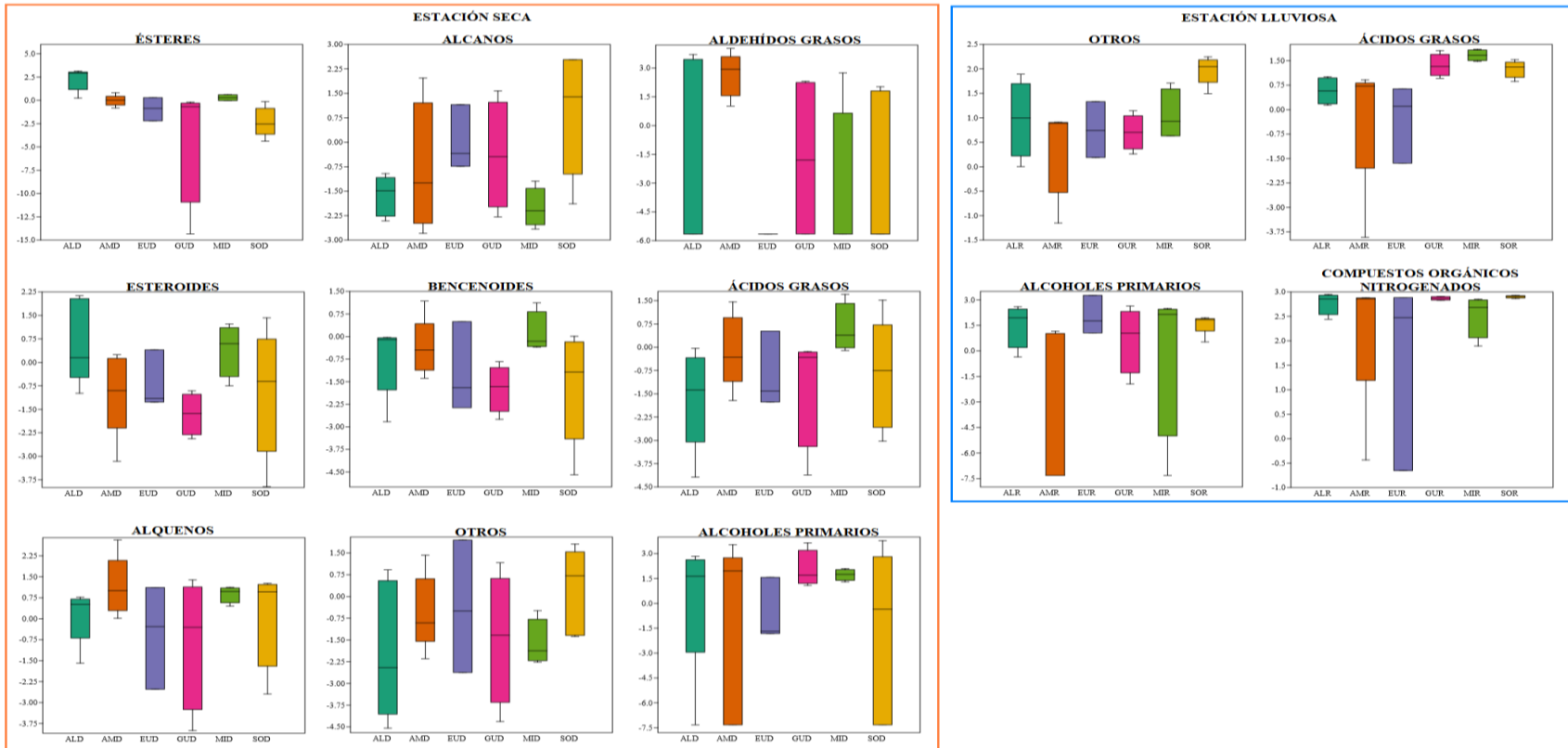
Cajas y bigotes de las otras clases químicas de las ceras foliares epicuticulares antes del preprocesado.



Nota. Identificadores de especies de la estación seca: ALD = *Alchornea sidifolia*; AMD = *Amaioua intermedia*; EUD = *Eugenia excelsa*; GUD = *Guarea macrophylla*; MID = *Miconia cabucu*; SOD = *Solanum granuloso-leprosum*. Identificadores de especies de la estación lluviosa: ALR = *Alchornea sidifolia*; AMR = *Amaioua intermedia*; EUR = *Eugenia excelsa*; GUR = *Guarea macrophylla*; MIR = *Miconia cabucu*; SOR = *Solanum granuloso-leprosum*.

Anexo K.

Gráficos de caja y bigotes de las clases químicas menos significativas después del preprocesamiento.



Nota. Identificadores de especies de la estación seca: ALD = *Alchornea sidifolia*; AMD = *Amaioua intermedia*; EUD = *Eugenia excelsa*; GUD = *Guarea macrophylla*; MID = *Miconia cabucu*; SOD = *Solanum granuloso-leprosum*. Identificadores de especies de la estación lluviosa: ALR = *Alchornea sidifolia*; AMR = *Amaioua intermedia*; EUR = *Eugenia excelsa*; GUR = *Guarea macrophylla*; MIR = *Miconia cabucu*; SOR = *Solanum granuloso-leprosum*.

Anexo L.*Concentración de los contaminantes atmosféricos.*

| Parámetro | Lluviosa (verano) | | | | Seca (invierno) | | | |
|--|--------------------------|---------|-----------|-----------------|------------------------|-------|--------|-----------------|
| | Enero | Febrero | Diciembre | Promedio | Junio | Julio | Agosto | Promedio |
| SO₂ (µg/m³) | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| MP_{2.5} (µg/m³) | 16.000 | 12.00 | 10.000 | 12.7 | 28.000 | 23.00 | 16.000 | 22.3 |
| CO (ppm) | 0.500 | 0.50 | 0.500 | 0.5 | 1.000 | 0.80 | 0.700 | 0.8 |
| NO₂ (µg/m³) | 38.000 | 36.00 | 31.000 | 35 | 51.000 | 53.00 | 39.000 | 47.7 |
| NO_X (µg/m³) | 37.000 | 39.00 | 25.000 | 33.7 | 82.000 | 80.00 | 44.000 | 68.7 |
| O₃ (µg/m³) | 40.000 | 27.00 | 37.000 | 34.7 | 18.000 | 23.00 | 31.000 | 24 |

Nota. ND: No detectado. Recuperado CETESB (2020)

Anexo M.

Concentración de las condiciones meteorológicas.

| Período | Temperatura (°C) | Radiación global (MJ. M-2) | Humedad relativa (%) | Precipitación (mm) |
|----------------------|------------------|----------------------------|----------------------|---------------------------|
| Lluvioso 2019 | 23.000 | 20.80 | 79.100 | 284.6 |
| Seco 2019 | 16.800 | 13.80 | 78.300 | 96.3 |

Nota. Recuperado de Santos (2021)

Anexo N.

Autorización de la utilización de los datos a fin de sustentar la tesis.



São Paulo, 05 de julho de 2022.

À Universidad Nacional Federico Villarreal (UNFV)
Lima, Peru

Por meio desta, autorizo a utilização dos dados constantes no trabalho de conclusão de curso do graduando **Ivan Hurtado Cáceres** e intitulado "Caracterização química de ceras foliares epicuticulares da Reserva do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga" para a apresentação e defesa dos resultados pelo graduando, como parte dos requisitos para a conclusão da graduação e obtenção do título de biólogo.

Declaro ainda, que a presente não confere direitos de propriedade intelectual à UNFV ou a seus membros. Estes estão reservados ao graduando, orientadora e seus colaboradores. O trabalho acima referido foi desenvolvido como parte do projeto "Monitoramento de mudanças ambientais induzidas por poluentes, originados de diferentes usos da terra pelo homem e seus efeitos sobre remanescentes de vegetação nativa", realizado em parceria com a Dra Miriam Spasiani Rinaldi, e coordenado para Dra Marisa Domingos, pesquisadoras do Instituto de Pesquisas Ambientais (FAPESP 2010/52319-2).

Cordialmente.

Cláudia Maria Furlan
Laboratório de Fitoquímica
Departamento de Botânica – IBUSP
+55 11 30918065
furlancm@ib.usp.br

