



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Maestría en Recursos Bióticos

**Caracterización Físico Química del Fruto de Garambullo (*Myrtillocactus
geometrisans*)**

Tesis
Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Maestro en Ciencias-Recursos Bióticos

Presenta
Catalina González Nava

Santiago de Querétaro; junio de 2010.



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Maestría en Recursos Bióticos


“Caracterización Físico Química del Fruto de Garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*)”

Tesis
Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestro en Recursos Bióticos

Presenta:
Catalina González Nava

Dirigido por:
Dr. Elhadi Yahia Kazuz

Dr. Elhadi Yahia Kazuz
Presidente



firma

M. en C. Fabiola Gutiérrez Orozco
Secretario




firma

Dr. Raúl Francisco Pineda López
Vocal



firma

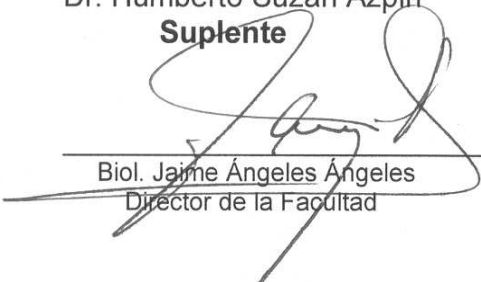
Dr. Luis Gerardo Hernández Sandoval
Suplente

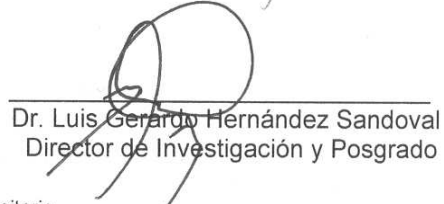


firma

Dr. Humberto Suzan Azpiri
Suplente



firma

Biol. Jaime Ángeles Ángeles
Director de la Facultad

Dr. Luis Gerardo Hernández Sandoval
Director de Investigación y Posgrado

RESUMEN

El garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*), es una cactácea endémica que crece en varios estados del país y produce frutos consumidos a nivel local. Sin embargo, su valor nutricional ha sido poco estudiado. La caracterización fisicoquímica del fruto de garambullo se realizó durante la madurez y congelación. La fruta congelada fue de un solo estado de madurez cosechada en una primera temporada y la fruta fresca fue de dos estados de madurez cosechada en una segunda temporada: fruta roja (I) y púrpura (II). Se utilizaron técnicas espectrofotométricas, espectroscopía de masas y cromatografía líquida (CLAR) y de gases. Los frutos presentaron sólidos solubles totales en un rango de 5.2-16.8 °Brix, mientras que la humedad resultó de 75.5-79.1%. El ángulo de color (h°) fue de 340.7-341.8, la saturación (C^*) de 9.9-16.1 y luminosidad (L^*) de 17.0-36.1. El pH fue de 3.5-3.8 y el peso promedio de 1.3-1.4 g. El garambullo congelado, fue la fruta más madura, seguida de madurez II y madurez I. La capacidad antioxidante se midió por FRAP y DPPH, los extractos hidrofílicos presentaron mayor capacidad antioxidante que los extractos lipofílicos. El contenido de betacianinas fue mayor que de betaxantinas. Se identificaron mediante CLAR acoplada a masas (CLAR-MS) cuatro betaxantinas (indicaxantina, derivado de histidina, muscaurina y fenilalanina) y cinco betacianinas (betanina, isobetanina, filocactina, *cis*-isómero de gomfrenina II e isogomfrenina). Se encontró un bajo contenido de carotenoides totales y se identificaron como posibles compuestos a un epóxido de β -caroteno y ésteres de violaxantina. Se encontró una concentración de 0.033 mg/g ps de α -tocoferol en garambullo congelado y 0.025-0.023 mg/g ps de δ -tocoferol en madurez I y II. En madurez I se encontró la mayor concentración de ácido isoascórbico (8.6 mg/100 g pf), L-ascórbico (105.5 mg/100 g pf) y de compuestos fenólicos totales (8.8 g equivalentes de ácido gálico/100 g ps), mientras que la fruta congelada presentó bajo contenido. En los tres estados de madurez se identificaron mediante CLAR-MS diez compuestos fenólicos y se cuantificaron cinco ácidos grasos por cromatografía de gases. El ácido graso de mayor concentración fue el ácido linoléico, seguido del ácido oléico, palmítico, esteárico y linolénico. La fruta más madura presentó la mayor capacidad antioxidante y contenido de betalaínas mientras que los estados menos maduros presentaron mayor contenido de compuestos fenólicos y ácido ascórbico. El almacenamiento a bajas temperaturas no presentó efectos negativos en los fitoquímicos presentes y se concluyó que la fruta es rica en fitoquímicos de importancia para la salud humana.

(Palabras clave: *Myrtillocactus geometrizans*, nutrición, fitoquímicos).

SUMMARY

Garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*), an endemic plant from México, belongs to the Cactaceae family, and grows in the arid regions of the country. Although the fruit from this plant is consumed locally, its nutritional value has not been studied area. Frozen fruit from a first season and fresh fruit in two ripening stages [red (I) and purple (II)] from a second season were used in this study to characterize their phytochemical content. Analysis included spectrophotometry, mass spectroscopy and liquid and gas chromatography techniques. TSS content was 5.2-16.8 °Brix while the humidity content was 75.5-79.1%. Color parameter were hue (h°) 340.7-341.8, chroma (C^*) 9.9-16.1 and lightness (L^*) 17.0-36.2. pH values were from 3.5 to 3.8, while the average fruit weight ranged between 1.3-1.4 g. Frozen fruit were the most ripe. Antioxidant capacity was measured by FRAP and DPPH assays, and it was higher in the hydrophilic than in the lipophilic extracts. Higher betacyanins than betaxanthin concentration was found. Four betaxanthins (indicaxanthin, histidine derivative, muscaaurin and phenylalanine) and five betacyanins (betanin, isobetanin, phylocactin, *cis*-isomer of gomphrenin II and isogomphrenin) were identified by HPLC-MS analysis. Total carotenoids content was low and possible carotenoids compounds were identified by HPLC-MS including epoxy β -carotene and violaxanthin esters. A concentration of 0.033 mg/g dw of α -tocopherol in frozen fruit and 0.025-0.023 mg/g dw of δ -tocopherol in stage I and II were found. Isoascorbic acid (8.6 mg/100 g fw), ascorbic acid (105.5 mg/100 g fw) and phenolic compounds (8.8 g AGE/100 g dw) were high in fresh fruit and low in frozen fruit. We identified 10 phenolic compounds using HPLC-MS spectrometry and five fatty acids by gas chromatography. Linoleic acid was the high concentration and then oleic, palmitic, stearic and linolenic acid. Frozen fruit was found to contain high antioxidant capacity and betalain content, while high phenolic compounds and ascorbic acid contents were observed in ripening stage I. Freezing of the fruit did not show negative effects on phytochemical content. In summary, the fruit of garambullo is rich in phytochemical compounds of importance to human health.

(Key words: *Myrtillocactus geometrizans*, nutrition, phytochemicals).

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Fitoquímicos y Nutrición de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro, bajo la dirección del Dr. Elhadi Yahia Kazuz, a quien agradezco el apoyo brindado, paciencia, tiempo, dedicación, la oportunidad y experiencia vivida.

Agradezco al Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada.

A mis padres por el apoyo incondicional, la confianza, los consejos, los ánimos que siempre han sido mi inspiración, gracias por todo. A mi hermana Rosalba y sobrina Rosalba por compartir conmigo este logro y por sus mejores deseos.

A Jorge mi esposo e hijos Valentina y Gustavo, por la paciencia y comprensión, gracias por existir, son mi motivación, gracias Jorge por tus consejos, por escucharme y todo tu amor.

A la familia Hernández Velázquez por su apoyo, por cuidar de mis hijos y sus mejores deseos.

Al Dr. Jones por la oportunidad y confianza que me brindó.

A la M en C. Fabiola Gutiérrez Orozco, por el apoyo técnico brindado y su tiempo dedicado para hacer de esta tesis un mejor trabajo.

A mis amigos de la maestría Yolanda, Pepe y Kruskaia por estar siempre al pendiente de mí, por su amistad incondicional, por su apoyo. A mis amigos y compañeros del laboratorio Dra. Marisela Rivera, Dr. Armando Carrillo, Dra Nagwa Salhim, Dra. Laura Gayosso, IBQ. Claudia Arvizu, IBQ. Javier Esparza, Edgar Salinas y Marco Moreno, que compartieron conmigo esta experiencia, gracias por el apoyo y amistad.

INDICE

	Página
Resumen	i
Summary	ii
Agradecimientos	iii
Índice	iv
Índice de cuadros	vi
Índice de figuras	ix
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Elementos importantes en la nutrición humana	1
1.2 Agua	2
1.3 pH	3
1.4 Hidratos de carbono y energía	3
1.5 Color	4
1.6 Pigmentos	5
1.6.1 Clorofila	6
1.6.2 Carotenoides	8
1.6.3 Betalaínas	11
1.7 Compuestos fenólicos	15
1.7.1 Flavonoides	17
1.7.2 No flavonoides	19
1.8 Vitaminas	22
1.8.1 Vitamina A	22
1.8.2 Vitamina E	23
1.8.3 Vitamina C	25
1.9 Ácidos grasos	26
1.10 Capacidad antioxidante	28
1.11 El garambullo (<i>Myrtillocactus geometrizans</i>)	31
II. OBJETIVOS	34
2.1 Hipótesis	34
2.2 Objetivo general	34
2.2.1 Objetivos específicos	34
III. MATERIALES Y METODOS	35
3.1 Materiales	35

3.2 Reactivos, estándares y solventes utilizados	36
3.3 Métodos	37
3.3.1 Determinación de peso	37
3.3.2 Determinación de color	37
3.3.3 Congelación, liofilización y determinación de humedad	37
3.3.4 Análisis de sólidos solubles totales y pH	38
3.3.5 Determinación del contenido de betalaínas	39
3.3.6 Determinación del contenido de carotenoides	42
3.3.7 Determinación del contenido de α y δ tocoferol	44
3.3.8 Determinación del contenido de ácido L-ascórbico e isoascórbico	44
3.3.9 Determinación del contenido de compuestos fenólicos	45
3.3.10 Capacidad antioxidante	47
3.3.11 Determinación del contenido de ácidos grasos	48
3.3.12 Análisis estadístico	50
IV. RESULTADOS Y DISCUSION	51
4.1 Parámetros de calidad de la fruta y caracterización de los estados de madurez	51
4.2 Contenido de betalaínas	55
4.3 Contenido de carotenoides	66
4.4 Contenido de α y δ tocoferol	75
4.5 Contenido de ácido L-ascórbico e isoascórbico	76
4.6 Contenido de compuestos fenólicos	79
4.7 Capacidad antioxidante	91
4.8 Contenido de ácidos grasos	95
V. CONCLUSIONES	99
BIBLIOGRAFÍA	102

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Clasificación de algunos compuestos fenólicos por subgrupo.	16
2	Sólidos solubles totales (°Brix), pH, peso, humedad y color en dos estados de madurez de garambullo fresco y un estado de madurez de garambullo congelado.	54
3	Contenido de betaxantinas, betacianinas y betalaínas totales medidas por espectrofotometría en dos estados de madurez de garambullo fresco y un estado de madurez de garambullo congelado.	57
4	Betalaínas identificadas en dos estados de madurez de garambullo fresco y un estado de madurez de garambullo congelado mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectroscopía de masas con interfase electro spray de ionización positiva (CLAR-IEE ⁺ -EM).	62
5	Contenido de carotenoides totales en dos estados de madurez de garambullo fresco y un estado de madurez de garambullo congelado.	66
6	Identificación de posibles carotenoides en extracto lipofílico de garambullo congelado mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectroscopía de masas con interfase de ionización química a presión atmosférica con polaridad positiva (CLAR-APCI ⁺ -EM).	69
7	Identificación tentativa en extractos de carotenoides en garambullo fresco y congelado mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectroscopía de	73

	masas con interfase de ionización química a presión atmosférica con polaridad positiva (APCI ⁺ -EM).	
8	Contenido de α -tocoferol y δ -tocoferol en dos estados de madurez de garambullo fresco y un estado de madurez de garambullo congelado.	76
9	Contenido de ácido isoascórbico y ácido L-ascórbico en dos estados de madurez de garambullo fresco y un estado de madurez de garambullo congelado.	78
10	Contenido de compuestos fenólicos totales mediante espectrofotometría en dos estados de madurez de garambullo fresco y un estado de madurez de garambullo congelado.	80
11	Cuantificación de compuestos fenólicos mediante cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) con detector de arreglo de diodos (DAD) en dos estados de madurez de garambullo fresco y un estado de madurez de garambullo congelado.	84
12	Identificación de posibles compuestos fenólicos en extracto hidrofílico de un estado de madurez de garambullo congelado mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectroscopía de masas con interfase electro spray de ionización negativa (CLAR-IEE ⁻ -EM).	87
13	Compuestos fenólicos identificados en garambullo fresco y congelado mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectroscopía de masas con interfase electro spray de ionización negativa (CLAR-IEE ⁻ -EM).	89
14	Capacidad antioxidante en extractos hidrofílico y lipofílico de dos estados de madurez de garambullo fresco y un estado	93

de madurez de garambullo congelado evaluado por dos métodos (FRAP y DPPH).

- 15 Cuantificación de ácidos grasos mediante cromatografía de gases con detector de ionización de flama (FID) en dos estados de madurez de garambullo fresco y un estado de madurez de garambullo congelado. 97

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Parámetros utilizados para la descripción del color, en 1: rojo-verde (a^*), amarillo-azul (b^*), ángulo de color (h^*); 2: brillantes (L^*) y saturación (C^*); 3 y 4: carta de colores.	6
2	Estructura de los pigmentos clorofila, se muestran las diferencias en los grupos sustituyentes que se indican como R_1 , R_2 , R_3 .	7
3	Biosíntesis de algunos carotenoides a partir del fitoeno y sus estructuras.	9
4	Estructuras químicas de 1: ácido betalámico; 2: ciclo-DOPA; 3: vulgaxantina-I (pigmentación amarilla); 4: betanidina; 5: betanina (pigmentación roja).	14
5	Estructura básica de flavonoides C6-C3-C6 con origen biosintético de átomos de carbono y numeración estándar; subgrupos de flavonoides.	18
6	Estructura químicas de no flavonoides.	20
7	Estructura química del retinol.	23
8	Estructura química de α , β , γ y δ tocoferoles.	24
9	Estructuras del ácido L-ascórbico y ácido isoascórbico.	26
10	Betaxantinas identificadas mediante cromatografía líquida de alta resolución con detector de arreglo de diodos a 438 nm en garambullo congelado (A),	59

	garambullo con estado de madurez II (B) y garambullo con estado de madurez I (C).	
11	Betacianinas identificadas mediante cromatografía líquida de alta resolución con detector de arreglo de diodos a 535 nm en garambullo congelado (A), garambullo con estado de madurez II (B) y garambullo con estado de madurez I (C).	60
12	Patrones de fragmentación de betaxantinas en el fruto de garambullo por espectroscopía de masas con interfase electro spray de ionización positiva (IEE ⁺ -EM).	64
13	Patrones de fragmentación de betacianinas en fruto de garambullo por espectroscopía de masas con interfase electro spray de ionización positiva (IEE ⁺ - EM).	65
14	Cromatograma de posibles carotenoides en extracto lipofílico crudo de garambullo congelado por espectroscopía de masas con interfase de ionización química a presión atmosférica con polaridad positiva (APCI ⁺ -EM).	70
15	Carotenoides identificados mediante cromatografía líquida de alta resolución, acoplada a espectroscopía de masas con interfase de ionización química a presión atmosférica con polaridad positiva (CLAR- APCI ⁺ -EM), en garambullo congelado (A), garambullo con estado de madurez II (B) y garambullo con estado de madurez I (C).	72
16	Patrones de fragmentación de carotenoides en el fruto de garambullo por espectroscopía de masas	74

con interfase de ionización química a presión atmosférica con polaridad positiva (APCI⁺-EM).

- | | | |
|----|--|----|
| 17 | Compuestos fenólicos identificados mediante cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), en garambullo congelado (A), garambullo con estado de madurez II (B) y garambullo con estado de madurez I (C). | 85 |
| 18 | Cromatograma de posibles compuestos fenólicos en extracto hidrofílico de garambullo congelado por espectroscopía de masas con interfase electro spray de ionización negativa (CLAR-IEE ⁻ -EM). | 88 |
| 19 | Patrones de fragmentación de compuestos fenólicos en garambullo por espectroscopía de masas con interfase electro spray ionización positiva (ESI ⁺ -EM). | 90 |
| 20 | Capacidad antioxidante en extractos hidrofílico y lipofílico en diferentes estados de madurez del fruto de garambullo evaluado por dos métodos (FRAP y DPPH). | 94 |
| 21 | Ácidos grasos identificados mediante cromatografía de gases con detector de ionización de flama (FID) en garambullo congelado (A), garambullo con estado de madurez II (B) y garambullo con estado de madurez I (C); 1: ácido palmítico, 2: ácido esteárico, 3: ácido oleico, 4: ácido linoleico, 5: ácido linolénico. | 98 |

I. INTRODUCCIÓN

En México la fruta de garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*) es poco conocida y consumida, ya que su comercialización se realiza de manera local en los lugares donde crece esta planta, la información sobre sus propiedades nutricionales es escasa y los estudios previos se han enfocado principalmente a su contenido de betalaínas con potencial como colorantes de origen natural.

1.1 Elementos importantes en la nutrición humana

Los seres humanos necesitan obtener una dieta saludable, que incluya una amplia variedad de alimentos de los diferentes grupos y en proporciones adecuadas, que permita obtener nutrimentos en cantidad y calidad según los requerimientos de distintos grupos de edad, sexo y estado fisiológico. Las frutas y hortalizas son un grupo de alimentos, que aportan agua, fibra y otros nutrimentos importantes para las funciones de mantenimiento y crecimiento de las células (Tolonen, 1995). El contenido de diversos fitoquímicos en los alimentos sobre todo en estado fresco, reduce el riesgo de ciertas enfermedades crónicas como el cáncer y enfermedades cardiovasculares, ya que estos compuestos brindan mecanismos de defensa al cuerpo humano conocidos como sistema antioxidante (Valencia y Robles-Sardin, 2005; Tosun *et al.*, 2009). Algunos fitoquímicos con actividad antioxidante son la vitamina C, E, carotenoides, compuestos fenólicos, entre otros. Además, los fitoquímicos aportan a las frutas y hortalizas, aromas, sabores y colores que las hacen atractivas a la vista del consumidor, y contribuyen a exaltar la palatabilidad (Valencia y Robles-Sardin, 2005).

El oxígeno es esencial para la vida ya que las células lo necesitan para diversas funciones y producción de energía, sin embargo, una generación incontrolada y en grandes cantidades de radicales libres de oxígeno (estrés oxidativo) lleva a la destrucción de las células, tejidos y órganos que abre paso a las enfermedades y el envejecimiento (Tolonen, 1995). Los radicales libres son formados por la reducción del oxígeno, formando anión superóxido (O_2^-), radical hidropéroxido (HO_2) y radical hidroxilo (OH), que dañan biomoléculas celulares como lípidos, proteínas, hidratos de carbono y ADN (Tosun *et al.*,

2009). El estrés oxidativo es generado por diversas causas, incluyendo las actividades metabólicas regulares del cuerpo, factores genéticos, edad, el estilo de vida y la dieta que lleva cada individuo (Tosun *et al.*, 2009)

Desafortunadamente, en la ingesta diaria de alimentos no obtenemos dosis suficientes de nutrientes con actividad antioxidante. De acuerdo con los datos obtenidos en encuestas dietéticas y concentraciones plasmáticas en México, la ingesta total de vitamina A, E y C, así como de compuestos que facilitan la absorción de estas vitaminas, es deficiente para las poblaciones urbanas y rurales, siendo aun más deficiente en la población rural, ya que, a medida que el nivel de ingreso económico mejora, la dieta se vuelve más variada e incluye una diversidad de carnes, productos lácteos, frutas y hortalizas frescas (Bourges *et al.*, 2005).

La caracterización fisicoquímica permite analizar el valor nutricional y calidad de frutas y hortalizas. Los diferentes compuestos antioxidantes pueden caracterizarse, mediante el desarrollado de varias metodologías que proporcionan datos cuantitativos (Tosun *et al.*, 2009). Se evalúan diversos parámetros de calidad como el tamaño (dimensiones, peso, volumen), forma (diámetro, longitud), color (intensidad, uniformidad), ausencia de defectos (morfológicos, físicos, fisiológicos, patológicos, insectos, entre otros.), textura (firmeza), sabor (dulzor, aroma, ausencia de sabor y olor), sólidos solubles totales, humedad, acidez, pH y astringencia (contenido de taninos). Cada uno de estos parámetros desempeña un papel importante en los alimentos y la nutrición humana (Tosun *et al.*, 2009).

1.2 Agua

El agua es el componente más abundante en frutas y hortalizas, constituyendo más del 75% de su peso e incluso supera el 90% en algunos productos hortofrutícolas como tomate, lechuga o fresa (Cano, 2005). El agua presenta dos importantes funciones como nutriente. La primera, como protectora y reguladora, ya que el agua es el principal sustrato de numerosas reacciones biológicas, o actúa como medio en el que tienen lugar gran parte de las reacciones bioquímicas de los seres vivos. La segunda función es la de

regular el pH y la temperatura del cuerpo humano. Así mismo, presenta una función plástica debido a que su presencia asegura la integridad de las células y tejidos (Horton, 1995). Más de la tercera parte del cuerpo humano está constituido por agua y en general, una mayor actividad metabólica de un determinado tejido, implica mayor contenido de agua. Además, desempeña un papel vital en el proceso digestivo y en la eliminación de los productos de desecho del organismo. Por tanto, el consumo de frutas y hortalizas, ya sea en su estado sólido o en forma de jugos es una de las principales fuentes de agua que tiene el ser humano en su dieta (Cano, 2005).

1.3 pH

Además del control metabólico de la célula, una de las funciones del pH en frutas y hortalizas es el control de la actividad antibacterial, las sustancias ácidas se disocian y actúan en la membrana celular de microorganismos que generalmente se encuentra con cargas negativas. Las sustancias ácidas actúan como una barrera, cambiando la permeabilidad de la membrana celular microbiana e interfiriendo con procesos enzimáticos de la célula y con ello su reproducción (Puupponen-Pimiä *et al.*, 2005). El pH del citoplasma de las células bacterianas es generalmente mayor al del medio, pero la disociación de las sustancias ácidas lo acidifica. Ante estos cambios, bacterias como las gram-negativas han desarrollado mecanismos de tolerancia en ambientes de bajo pH (Puupponen-Pimiä *et al.*, 2005).

1.4 Hidratos de Carbono y Energía

Los hidratos de carbono son el principal componente de frutas y hortalizas después del agua, representando más del 90% de su materia seca. El contenido de hidratos de carbono puede llegar a constituir un 6% de su peso fresco en las hortalizas, siendo superior en las frutas hasta 10% de su peso (Cano, 2005). La principal función de los hidratos de carbono en el organismo es aportar la energía necesaria para realizar funciones vitales. Además actúan como nexo de unión entre lípidos y proteínas para la formación de unidades mecánicas estructurales (Bourges *et al.*, 2005).

En general, los hidratos de carbono se clasifican en tres grupos: monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos. Los monosacáridos pueden ser pentosas (arabinosa, xilosa y ribosa) y hexosas (glucosa, fructosa y galactosa). Los oligosacáridos incluyen sacarosa, maltosa, lactosa, rafinosa y estafiosa. Y los polisacáridos incluyen el almidón (constituido por amilosa y amilopectina, ambos polímeros de glucosa), glucógeno y aquellos que forman parte de la fibra, entre otros. Los principales monosacáridos suelen ser glucosa y fructosa y su composición varía de una fruta u hortaliza a otra. Otros monosacáridos como la galactosa, arabinosa y xilosa están presentes en pequeñas concentraciones especialmente en naranjas, limones y uvas (Cano, 2005).

1.5 Color

El color en los alimentos es un parámetro de calidad y factor determinante en la preferencia de los consumidores ya que es un indicador de las características externas e internas, tales como la dulzura, sabor, estado de madurez para cosecha, consumo y procesamiento (Azeredo, 2009; Schreiner, *et al.*, 2000). El color, también es un parámetro que ha sido utilizado para determinar el contenido de pigmentos ya que está correlacionado con el contenido de estos compuestos y pueden variar de acuerdo con su estado de madurez (Azeredo, 2009; Schreiner, *et al.*, 2000; Ornelas-Paz *et al.*, 2008). Los pigmentos que comúnmente contribuyen al color en las frutas y hortalizas son clasificados en cuatro grupos generales: clorofilas, carotenoides, flavonoides y betalainas (Ornelas-Paz *et al.*, 2008).

El color puede ser visto de manera diferente por cada persona debido a la percepción e interpretación subjetiva de cada individuo. La expresión verbal del color es difícil y complicada ya que incluye adjetivos como: brillante, opaco y oscuro. La percepción del color varía debido a diversos factores como la fuente luminosa, la sensibilidad de los ojos de cada persona, el tamaño del área donde son expuestos, el color del fondo donde son expuestos y el ángulo desde donde son vistos (Minolta, 1994). El color puede ser expresado objetivamente en términos de matiz (color), luminosidad (brillantez) y saturación (vivides). Estos atributos se describen en una carta de colores, en donde, el ángulo de color (parámetro h°) indica el color de los objetos, medido a partir del

eje $+a^*$ y es expresado en grados de 0° a 360° ; la luminosidad (parámetro L^*) indica la brillantez o oscuridad de los colores, cambia verticalmente en una escala de 0 a 100 y la saturación (parámetro C^*) que indica vividez, siendo cero en el centro (opaco) y aumenta conforme se aleja del centro (vivido) como se muestra en la Figura 1. Los atributos del color pueden ser medidos numéricamente, para lo cual, a lo largo del tiempo se han establecido escalas y métodos de medición, creados por la Comisión Internacional del Color. Los tres más ampliamente conocidos son el método Yxy color space, establecido en 1931, así como, el $L^*a^*b^*$ color space y $L^*C^*h^\circ$ color space, establecidos en 1976. Los cuales son usados mundialmente para la comunicación del color (Minolta, 1994).

1.6 Pigmentos

Los pigmentos además de proporcionar color en frutas y hortalizas, pueden brindar efectos positivos en la salud. Muchos carotenoides han mostrado actividad antioxidante y algunos de ellos poseen actividad de vitamina A como el licopeno (Yahia y Ornelas Paz, 2010). Algunos flavonoides han sido asociados a la reducción y/o prevención de varias enfermedades, incluyendo algunos tipos de cáncer (Yahia *et al.*, 2008). Por otro lado, los pigmentos de plantas y hortalizas, han estimulado el interés por estudiar su aplicación en alimentos y cosméticos (Georgiev *et al.*, 2008), ya que se ha descubierto que el uso de colorantes sintéticos, provocan daño a la ecología y salud humana (Azeredo, 2009). Desde 1979 más de 700 colorantes sintéticos han sido vetados por organizaciones como la Agencia de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés), permitiendo hoy en día el uso de solo 36 colorantes, de los cuales, siete son sintéticos y 26 naturales (Azeredo, 2009).

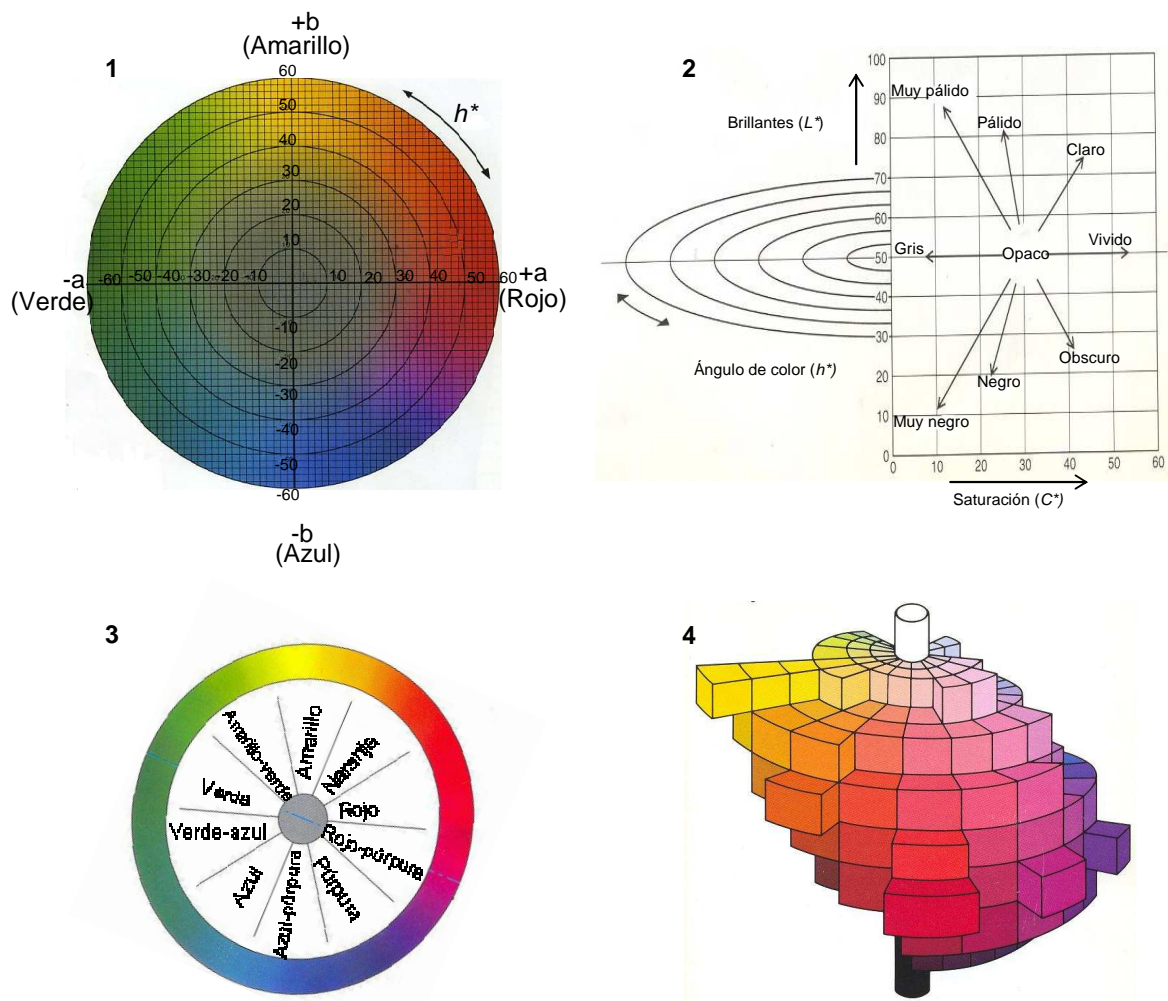
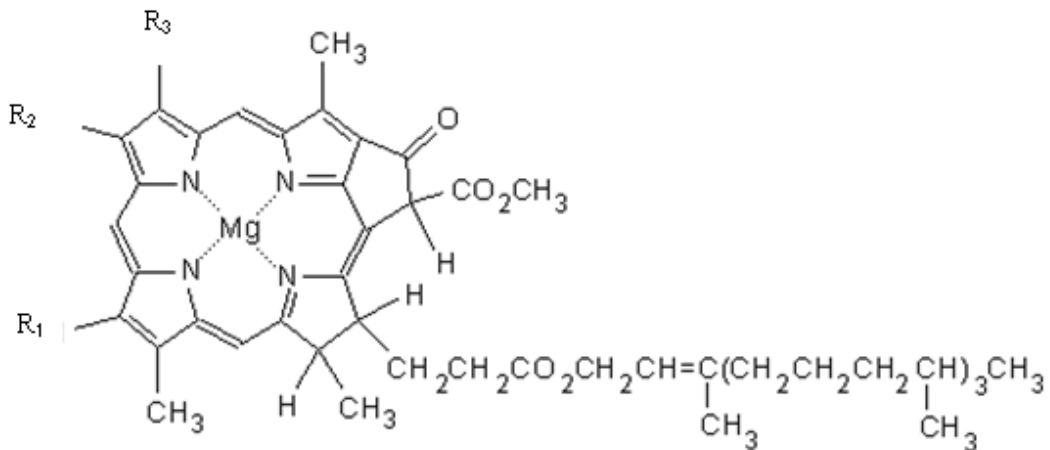


Figura 1. Parámetros utilizados para la descripción del color, en **1**: rojo-verde (a^*), amarillo-azul (b^*), ángulo de color (h^*); **2**: brillantes (L^*) y saturación (C^*); **3** y **4**: carta de colores (Minolta, 1994).

1.6.1 Clorofila

La clorofila es un pigmento liposoluble, se encuentra en la naturaleza en cuatro tipos diferentes: clorofila *a*, *b*, *c* y *d*. Estos compuestos se diferencian por la estructura química en los grupos R1, R2, R3 unidos al anillo porfirínico de la molécula como se muestra en la Figura 2. El anillo porfirínico es similar a los grupos protéticos hemo de la hemoglobina, mioglobina y citocromos. a diferencia de la hemoglobina, que contiene hierro (Fe^{2+}), la clorofila contiene magnesio (Mg^{2+}) quelado por los átomos de nitrógeno pirrólicos del anillo, al cual, también se encuentra una cadena conocida como fitol con característica

hidrofóbica, que permite anclar la clorofila a la membrana celular. La clorofila *a* y *b* absorben la luz entre la región violeta y azul con absorción máxima de 400 a 500 nm y de la región entre naranja y rojo con absorción máxima de 650 a 700 nm. Debido a que sus estructuras son un poco diferente, sus absorciones máximas de clorofila *a* y *b* no son idénticas (Horton, 1995).



Clorofila	R ₁	R ₂	R ₃
a	-CH=CH ₂	-CH ₃	-CH ₂ -CH ₃
b	-CH=CH ₂	-CO-H	-CH ₂ -CH ₃
c	-CO-CH ₃	-CH ₃	-CH ₂ -CH ₃
d	-CO-CH ₃	-CH ₃	-CH ₂ =CH ₂

Figura 2. Estructura de los pigmentos clorofila. Se muestran las diferencias en los grupos sustituyentes que se indican como R₁, R₂, R₃ (Horton, 1995).

La clorofila *a* y *b* se encuentran en plantas superiores. La clorofila *a* que da coloración verde-amarillo, es más abundante que *b* y es el pigmento fotosintético primario en plantas verdes. Así también, la clorofila *b* (color azul-verde), se encuentra junto con la clorofila *a* en algas verdes y plantas altas, en tanto que, la clorofila *c* con clorofila *a*, es encontrada en algas cafés y diatomeas (Björn *et al.*, 2009). La clorofila es la principal molécula que absorbe la luz solar en los procesos de fotosíntesis y da a las plantas la coloración

verde (Borovsky y Paran, 2008). El cambio de color está asociado al proceso de, que a su vez resulta una estrategia desarrollada por las plantas para atraer a los agentes dispersores de semillas maduras (Azoulay *et al.*, 2008). Este cambio de color es debido a la biosíntesis y acumulación de otros pigmentos como los carotenoides (Kato *et al.*, 2004), donde los cloroplastos hacen la transición a cromoplastos (Azoulay *et al.*, 2008).

La degradación de la clorofila es un proceso muy complejo durante el ciclo de vida de las plantas, en el que participan diversas enzimas como la clorofilasa y magnesio dequelatasa en una primera etapa; y feoforbida *oxigenasa* en una segunda etapa. Esta última enzima es activada por los procesos de maduración, responsable de la pérdida del color verde y es clave para regular la degradación de la clorofila. Otras enzimas como la lipoxigenasa, clorofil oxidasa y peroxidasa participan en el proceso de degradación de la clorofila (Hörtensteiner, 2006; Roca y Minguez-Mosquera, 2006).

1.6.2 Carotenoides

Los carotenoides son compuestos hidrofóbicos, con poca o nada solubilidad en agua pero muy solubles en solventes orgánicos, su estructura está formada por largas cadenas de isopreno (Yahia y Ornelas-Paz, 2010). La mayoría son polienos derivados del fitoeno como se muestra en la Figura 3. Estas cadenas hidrocarbonadas pueden contener un grupo cíclico al final, siendo el más común la β -ionona, seguida por ϵ -ring, encontrado en α -caroteno y luteína. Otros grupos cíclicos inusuales son el anillo ciclopentano de capsantina y capsorubina que proporcionan coloraciones rojas (Cuttriss *et al.*, 2007). La biosíntesis de los carotenoides comienza a partir de la condensación de ocho isoprenos (cinco unidades de carbonos), los cuales, se condensan para formar una cadena de cuarenta átomos de carbono (Yahia y Ornelas-Paz, 2010). Los cambios en la estructura química de los carotenoides (ciclización o isomerización) es debida a la acción de diferentes enzimas específicas que dan lugar al extenso número de carotenoides (Ornelas-Paz *et al.*, 2008; Timko, 1998).

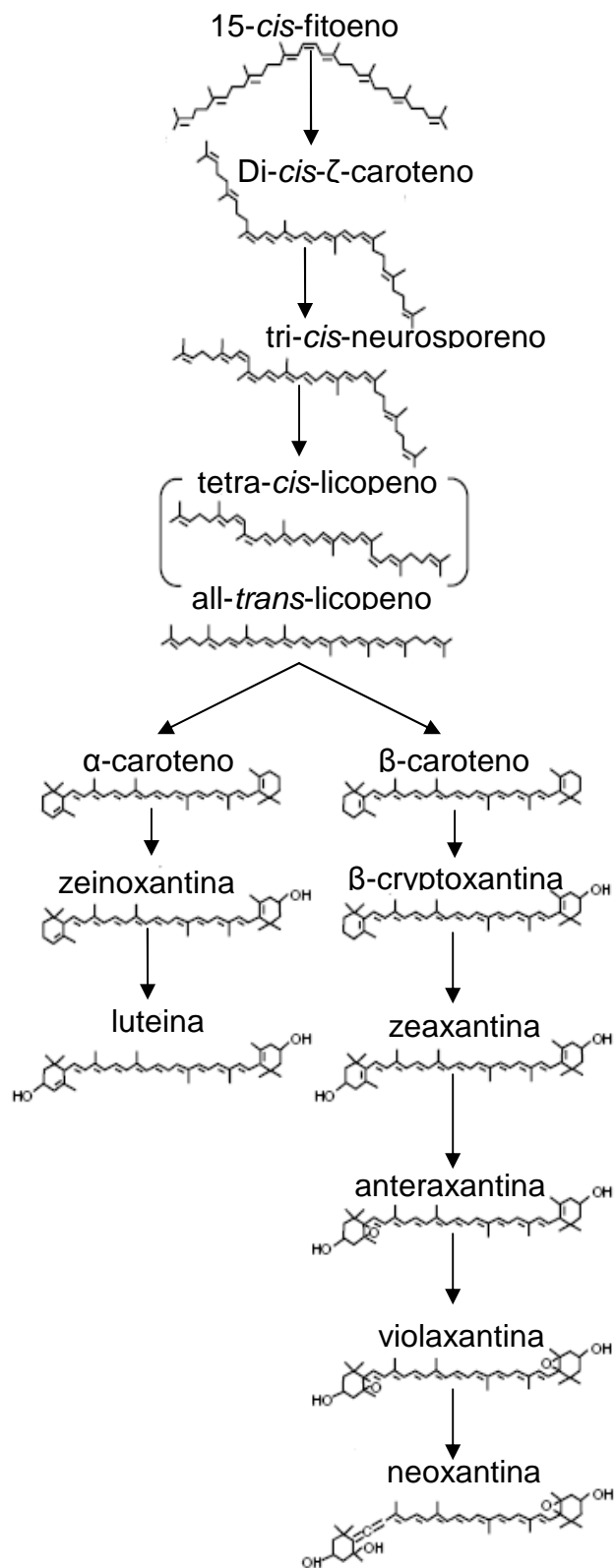


Figura 3. Biosíntesis de algunos carotenoides a partir del fitoeno y sus estructuras (Horton 1995).

Más de 600 carotenoides han sido identificados, estos divididos en dos subclases por la presencia o ausencia de oxígeno en la molécula. Si un átomo de oxígeno está presente, las sustancias son llamadas xantofilas y en el caso de ausencia son conocidos como carotenos (Yahia y Ornelas-Paz, 2010). La mayoría de los carotenoides absorben de 400 a 600 nm (Breithaupt *et al.*, 2007). Los carotenoides proveen aromas y coloraciones rojas, naranjas y amarillas, proporcionando importancia comercial en la agricultura, industria de alimentos y cosméticos, además de participar de manera importante en la fotosíntesis y en la nutrición. Los carotenos más comunes son el β -caroteno y licopeno que se acumulan en los cromoplastos de flores y plantas. Las xantofilas más abundantes son la luteína, violaxantina y neoxantina que proporcionan coloraciones amarillas (Cuttriss *et al.*, 2007). Los carotenoides se pueden encontrar en plantas, levaduras, hongos, algas y bacterias. En los organismos fotosintéticos, como plantas, son sintetizados en los cloroplastos y también pueden ser encontrados con clorofilas en hojas y frutas verdes, y en otras partes de la plantas como flores, frutas, raíces y semillas en coloraciones amarillo, naranja y rojo (Yahia y Ornelas-Paz, 2010). Los carotenoides son indicadores de cosecha, brindan protección solar durante la fotosíntesis y proveen sustrato para la biosíntesis del ácido ascórbico (Timko, 1998). Algunos son usados como colorantes, cosméticos o farmacéuticos (Tanaka *et al.*, 2008).

Los carotenoides en la salud y nutrición de las personas, como en el caso de *all-trans*- β -caroteno proveen provitamina A, brindan actividad anticancerígena ya que funcionan como agentes protectores previniendo el daño oxidativo en membranas celulares. Están relacionados con enfermedades del corazón y degeneración muscular (Ornelas-Paz *et al.*, 2007). Las xantofilas como la luteína y zeaxantinas han presentado correlaciones positivas entre su consumo y la prevención de enfermedades de los ojos como la formación de cataratas y degeneración ocular relacionada con la edad (Ornelas-Paz *et al.*, 2007). No obstante, los efectos benéficos de los carotenoides depende de diversos factores como: su naturaleza química (isómeros o esteres), las cantidades que son absorbidas o metabolizadas por el organismo, la composición de los alimentos (cantidades contenidas de grasa y fibra) y el nivel

de procesamiento de los alimentos (Breithaupt *et al.*, 2007; Ornelas-Paz *et al.*, 2008).

Los carotenoides muestran diferencias cualitativas, por ejemplo, en tejidos verdes, compuestos como la zeaxantina, violaxantina, anterxantina y luteína se encuentran en hojas y tallos. En tejidos no verdes, se encuentra carotenoides como el licopeno en el caso del tomate. En general, las plantas no acumulan carotenoides en raíces, excepto la zanahoria y la papa dulce que acumulan altas concentraciones de β -caroteno siendo una fuente importante de vitamina A en la dieta humana (Tanaka *et al.*, 2008).

1.6.3 Betalaínas

El término betalaína fue introducido para describir compuestos derivados del ácido betalámico. Estos pigmentos fueron aislados por primera vez de (*Beta vulgaris*), dándoles por esta razón el nombre con el que se les conoce (Castellanos-Santiago y Yahia, 2008). Son metabolitos secundarios nitrogenados, solubles en agua. Se encuentran en las plantas, actúan como pigmentos rojos–púrpura (betacianinas, forma básica) y amarillos–naranja (betaxantinas, forma ácida). Se encuentran en algunas especies de hongos del género *Amanita* e *Higrocibe*, semillas, plantas, frutas y flores de la familia Cariofilales (*Achatocarpaceae*, *Aizoaceae*, *Amarantaceae*, *Basellaceae*, *Cactaceae*, *Chenopodiaceae*, *Didiereaceae*, *Halofitaceae*, *Hectorellaceae*, *Nictaginaceae*, *Fitolaccaceae*, *Portulacaceae* y *Stegnospermataceae*) (Castellanos-Santiago y Yahia, 2008; Georgiev *et al.*, 2008; Tanaka *et al.*, 2008).

En plantas, las betalaínas y antocianinas son mutuamente excluyentes (Azeredo, 2009; Georgiev *et al.*, 2008; Tanaka *et al.*, 2008) y atraen a polinizadores y dispersores. Las betalaínas, cuentan con propiedades antivirales y antimicrobiales, por lo que en plantas subterráneas, proveen resistencia a patógenos del suelo. En cactus con espinas, cumplen con funciones específicas como repelentes de algunos tipos de insectos. En el caso de las betacianinas, proveen protección de los rayos UV en plantas cubiertas con hielo (Moreno *et al.*, 2008). Las betalaínas son antioxidantes naturales, que

actúan sinérgicamente en el organismo con otros compuestos, brindando protección contra el estrés oxidativo y procesos inflamatorios. La extracción de estos pigmentos en tejidos de plantas o cultivo de células, comúnmente es realizada con solventes orgánicos como el metanol, etanol o agua (Moreno *et al.*, 2008). Trabajos realizados en frutas de cactáceas indican que la mayor extracción y estabilidad de pigmentos puede ser obtenida utilizando agua como solvente (Castellanos-Santiago y Yahia, 2008). La ligera acidificación del medio de extracción, favorece la estabilidad de betacianinas y evita la oxidación causada por la enzima polifenoloxidasas. La aplicación de calor al extracto, puede inactivar enzimas que degradan betalaínas y la fermentación puede reducir azúcares libres e incrementar el contenido de betacianinas (Azeredo, 2009).

Las betalaínas, son menos usadas como pigmentos naturales que las antocianinas y carotenoides, hasta el momento, la fuente más importante de betalaínas es la remolacha roja o betabel (*Beta vulgaris*) con un rendimiento de 50 a 60 toneladas por hectárea y una concentración que varía según los cultivares. Fuentes potenciales de betalaínas podrían ser especies como el género *Amaranthus*, *Opuntia*, *Hylocereus* y *Myrtillocactus*, así como, la acelga suiza y remolacha amarilla, las cuales, han estimulado estudios respecto a su posible empleo como colorantes de alimentos o conocer los beneficios a la salud humana (Azeredo, 2009; Moreno *et al.*, 2008). En la mayoría de los casos, los pigmentos mayoritarios rojo-violeta son la betanina, isobetanina, betanidina e isobetanidina, y los pigmentos amarillos mayoritarios son la vulgaxantina I y vulgaxantina II, como por ejemplo, la remolacha roja, que contiene mayor cantidad de betanina y vulgaxantina I (Azeredo, 2009).

Las betalaínas tienen diversas aplicaciones en alimentos como: repostería, confitería, colorante en polvo y productos cárnicos y lácteos. Estos pigmentos son estables en un rango de temperatura de 14 °C a 25 °C, mientras que las betacianinas son menos estables a 37 °C. Las betalaínas procedentes de frutas de cactáceas, no presentan impactos negativos en el sabor de los alimentos, convirtiéndose en fuentes de color potenciales. Las cactáceas requieren poco suelo y agua para su cultivo, por lo que representan una

alternativa para la agricultura de regiones áridas y semiáridas. En diversos estudios se ha reportado que la pulpa de fruta de cactáceas contiene altas concentraciones de betacianinas y betaxantinas (Azeredo, 2009).

Las betalaínas son sintetizadas a partir del aminoácido tirosina (Tanaka *et al.*, 2008). El ácido betalámico (Figura 4) es el cromóforo común en todas las betalaínas, y la adición de residuos determina la clasificación de los pigmentos como betacianinas o betaxantinas. Las diferencias estructurales reflejan la variedad de subgrupos. Las betacianinas y betaxantinas contienen en su estructura química un grupo fenólico y una amina acíclica, los cuales son excelentes donadores de electrones para estabilizar radicales libres, permitiendo a estos compuestos dar protección a las células contra el estrés oxidativo (Moreno *et al.*, 2008). Las betacianinas contienen un residuo de ciclo-3,4-dihidroxifenilalanina (ciclo Dopa) y un anillo aromático difenólico que juntos son llamados betanidina (Figura 4). La betanidina, es el aglicón de la mayoría de las betacianinas y de la diferente sustitución (glicosilación y acilación) de uno o ambos grupos hidroxilos localizados en posición cinco ó seis de la betanidina resulta la formación de varias betacianinas (Georgiev *et al.*, 2008). La mayoría se han detectado como 5-o-glucósidos y 6-o-glucósidos, sin embargo, no se han encontrado betacianinas que tengan ambas posiciones sustituidas con residuos de azúcares. La forma más común de glicosilación es la 5-o-glucósido y su esterificación con ácido hidroxicinámico (Nollet, 2000).

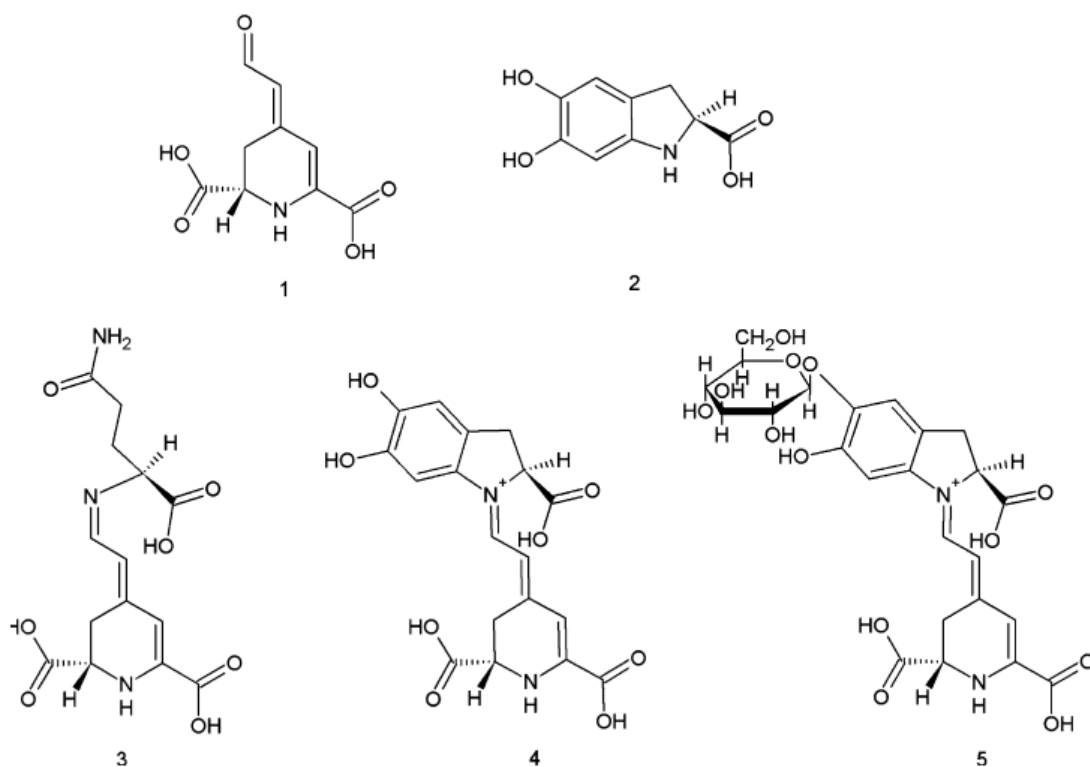


Figura 4. Estructuras químicas de **1:** ácido betalámico; **2:** ciclo-DOPA; **3:** vulgaxantina-I (pigmentación amarilla); **4:** betanidina; **5:** betanina (pigmentación roja) (Georgiev *et al.*, 2008).

La betacianina más común es la betanidina-5- α - β -glucósido (betanina), pigmento mayoritario en remolachas rojas (Azeredo, 2009). Se han identificado cerca de 50 betacianinas, la mayoría basada en los dos isómeros aglicones betanidinicos e isobetanidinicos. La fórmula de la betanidina tiene dos carbonos asimétricos (C_2 y C_{15}) por lo que es ópticamente activo. La isomerización ocurre bajo condiciones ácidas o la aplicación de calor. En la naturaleza, la forma más común de las betacianinas es el modo glicosilado con glucosa, soforosa y ramnosa. Los modos acilados más comunes son los ácidos sulfúricos, malónicos, 3-hidroxi-3-metilglutarico, cítrico, *p*-coumárico, ferúlico, caféico y sinápico (Nollet, 2000).

En betaxantinas, el ácido betalámico es sustituido por una amina o un aminoácido y en el grupo R usualmente un hidrógeno, como por ejemplo: glutamina (vulgaxantina-I; R=H), ácido glutámico (vulgaxantina-II, R=H),

metionina sulfóxido (miraxantina-I, R=H), ácido aspártico (miraxantina-II, R=H), tiramina (miraxanthin-III, R=H), L-DOPA (dopaxantina, R=H), así como la histidina (muscaaurina-VII, R=H). En el caso de las betaxantinas indicaxantina y portulaxantina, los grupo R y R' son sustituidos por prolina e hidroxiprolina, respectivamente (Nollet, 2000). Las betaxantinas al igual que las betacianinas regularmente se encuentran como aglicones óptimamente activos. La absorción máxima de las betaxantinas es a 480 nm debido a que la conjugación de la estructura no es muy amplia. En las betacianinas los grupos R y R' son sustituidos por anillos aromáticos que ocasionan absorciones a 540 nm (Nollet, 2000). También es conocido que se ven afectadas por el calor, la luz, y el hierro con una concentración de 15 ppm. No obstante el ácido ascórbico en niveles de 0.1% protege su integridad química así como un pH entre 4 y 6 (Reynoso, 1995).

1.7 Compuestos fenólicos

Estos compuestos son generados durante el metabolismo secundario de hortalizas, frutas, nueces, semillas, granos, hojas y flores, proporcionan funciones esenciales en la reproducción y crecimiento, actúan como defensa contra patógenos, parásitos y depredadores, contribuyen al sabor, color y propiedades sensoriales, y en ocasiones son inducidos como respuesta a diversas condiciones de estrés (Sellappan *et al.*, 2002; Puupponen-Pimiä *et al.*, 2005). Los compuestos fenólicos comprenden una amplia gama de estructuras, contienen anillos aromáticos con uno o más grupos hidroxilos. Se clasifican de acuerdo al número de anillos fenólicos y elementos estructurales unidos a ellos. Existen dos grupos principales: flavonoides y no flavonoides. Los flavonoides se subdividen en: flavonas, flavanoles, antocianidinas, isoflavonoides, flavanonas, flavanonoles, flavonoles, calconas, como se muestra en el Cuadro 1. Y los no flavonoides se subdividen en: fenoles simples, ácidos fenólicos, ácidos benzoicos, taninos hidrolizables, acetofenonas, ácidos hidroxicinámicos, coumarinas, benzofenonas, xantonas, estilbenos, lignanos y secoiridoides (Nollet, 2000; Andrés-Lacueva *et al.*, 2010, Tsao y McCallum, 2010). La mayoría de los glicósidos fenólicos son solubles en agua, mientras que los aglicones son menos solubles (Nollet, 2000).

Cuadro 1. Clasificación de algunos compuestos fenólicos por subgrupo.

Subgrupo	Flavonoides
Flavonas	Apigenina, luteolina, tangeretina, nobiletina.
Flavonoles	Quercetina, kaempferol, miricetina, isorhamnetina.
Flavanonas	Naringenina, hesperetina.
Flavanonoles	Taxifolina.
Antocianidinas	Cianidina, delphinidina, milvidina, pelargonidina, peonidina, petunidina.
Flavanoles	Catequina, epicatequina, ésteres de ácido gálico, procianidinas.
Calcones	Xantohumol, phloretin.
Isoflavonoides	Daidzein, genistein, gliciteina

Subgrupo	No flavonoides
Fenoles simples	<i>p</i> -vinilguaiacol, tirosol, hidroxitirosol.
Ácidos fenólicos	Ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico, Ácido gálico, Ácido siríngico, Ácido protocatéico.
Acetofenonas	2-hidroxiacetofenona, Ácido 2-hidroxifenilacético.
Ácidos hidroxicinámicos	<i>p</i> -coumarico, ácido caféico, ácido ferúlico, sinápico.
Coumarinas	Scopoletina, esculina.
Benzofenonas	Maclurina, 2,4,6,3'-tetrahidroxibenzofenona, 4,6,3',4'-tetrahidroxi-2-metoxibenzofenona.
Xantonas	1,8-dihidroxi-3,5-dimetoxixantona, 1-hidroxi-2,3,4,5-tetrametoxixantona.
Estibenos	Resveratrol, Piceatanol, Piceico.
Lignanós	Secoisolariciresinol.
Secoiridoids	Oleuropein.

Andrés-Lacueva *et al.*, 2010; Tsao y McCallum, 2010.

Los análisis cromatográficos de compuestos fenólicos en alimentos, son usados en la caracterización, estudios quimiotaxonómicos, clasificación de variedades, análisis de los procesos de maduración y propiedades benéficas en la salud. Algunos compuestos fenólicos, son comunes en distintas especies, y algunos son muy específicos a una clase de plantas o a una sola especie, entre las especies más estudiadas en cuanto a compuestos fenólicos, se encuentran la manzana, uva, cítricos, así como el jugo y vino (Nollet, 2000). El consumo de alimentos que presentan estos compuestos, puede contribuir a mejorar la salud. Numerosas investigaciones *in vitro*, han demostrado efectos positivos como anticancerígenos en el sistema mamario y degenerativo, protección antioxidante del ADN, efectos estrogénicos, entre otros (Oyvind *et al.*, 2006).

1.7.1 Flavonoides

Los flavonoides son compuestos fenólicos complejos, conjugados con azúcares y ácidos orgánicos. Su estructura básica es difenilpropano, dos anillos benzoicos conectados por una cadena de tres carbonos, formando un anillo pirano (Figura 5). En plantas, se encuentran principalmente en forma glicosilada con glucosa o ramosa principalmente, así como galactosa, arabinosa, xilosa, ácido glucurónico u otros azúcares. El número de grupos glucosílicos unidos a estos compuestos fenólicos varía de uno a tres (Vallejo *et al.*, 2004). Los compuestos fenólicos proporcionan una amplia variedad de color, desde el amarillo pálido al azul (Tanaka *et al.*, 2008). Las antocianinas, son responsables de la coloración naranja - azul en flores, hojas, frutas, semillas y otros tejidos. Son compuestos hidrosolubles que se almacenan en las vacuolas, y son ampliamente usados como colorantes naturales en alimentos. El color de las antocianinas, cambia dependiendo del pH y los iones metálicos presentes, como el aluminio, hierro y magnesio (Tanaka *et al.*, 2008). Se encuentran en forma de glucósidos en plantas y alimentos, llamadas antocianidinas.

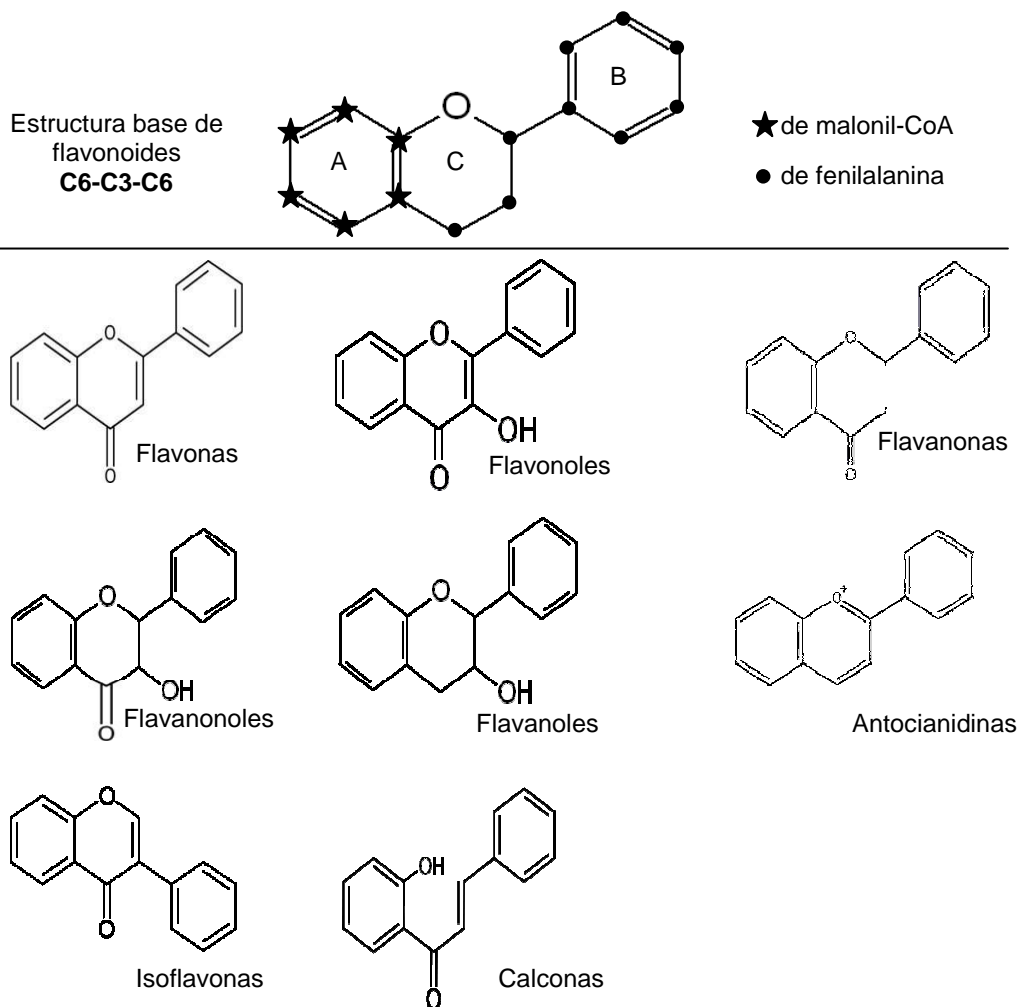


Figura 5. Estructura básica de flavonoides C6-C3-C6 con origen biosintético de átomos de carbono y numeración estándar; subgrupos de flavonoides (Tsao y McCallum, 2010).

Los flavonoles y flavonas tienen una doble cadena entre el carbono C2 y C3, y un átomo de oxígeno en la posición C4, así mismo tienen un grupo hidroxilo en la posición C3 (Shier *et al.*, 2001). Los flavonoles son los flavonoides más abundantes en los alimentos como la alcaparra, bayas, cebolla, especias y hierbas (U.S. Department of Agriculture, 2007a), cocoa, vino rojo y té (Lamuela-Raventós *et al.*, 2001). Las flavonas se encuentran en pequeñas cantidades en plantas como perejil, orégano y tomillo, en su forma de glucósidos se encuentran en apio, cebolla roja y lechuga (U.S. Department of Agriculture, 2007a). En el caso de los dihidroflavonoles, tienen la misma

estructura que los flavonoles, pero sin el doble enlace entre C2 y C3. Las flavanonas, son representadas por la saturación de la cadena con tres carbonos y un átomo de oxígeno en la posición C4 (Shier *et al.*, 2001), se encuentran en cítricos y sus derivados principalmente (Manach *et al.*, 2004), aunque también se han encontrado en pequeñas cantidades en menta, almendras, uvas y lima (U.S. Department of Agriculture, 2007a). Los isoflavones, tiene una estructura difenilpropano, en la cual el anillo B está localizado en la posición C3, cuentan con estructura análoga a estrógenos como estradiol, con grupos hidroxilos en posición C7 y C4 (Shier *et al.*, 2001). Estos compuestos se encuentran en leguminosas (Manach *et al.*, 2004), soya y sus productos derivados (U.S. Department of Agriculture, 2007b).

Los compuestos flavan-3-ols o flavanoles, tienen una saturación en la cadena de tres carbonos con un grupo hidroxilo en la posición C3 (Andrés-Lacueva *et al.*, 2010). En alimentos, están presentes como monómeros o como proantocianidinas, las cuales son flavanoles poliméricos (4 a 11 unidades) conocidos también como taninos condensados, en alimentos no se encuentran glicosilados. Los flavan-3-ols se encuentran en frutas, vino rojo, cerveza, nueces, té y chocolate (U.S. Department of Agriculture, 2007a), mientras que las proantocianidinas se encuentran principalmente en bayas, frijoles y ciruelas (Gu *et al.*, 2004; U.S. Department of Agriculture, 2004).

1.7.2 No flavonoides

Los fenoles simples (C6) de este grupo, están formados con un anillo aromático como se observa en la Figura 6, sustituido por un alcohol o cadenas alcohólicas en una o más posiciones (Andrés-Lacueva *et al.*, 2010). Estos compuestos, los encontramos principalmente en vino (Fernández de Simón *et al.*, 2003) y aceite de oliva virgen (Tovar *et al.*, 2001). Los ácidos fenólicos con la misma estructura que los fenoles simples tienen un grupo carboxilo unido al benceno (Andrés-Lacueva *et al.*, 2010), se encuentran en frutas y hortalizas, variando su concentración dependiendo del tejido, cultivo, madurez, temporada, entre otros, principalmente se encuentran en bayas, ciruela negra, cereza, col, té verde, té negro, café (Mattila *et al.*, 2006) y vino blanco (Li *et al.*, 1993).

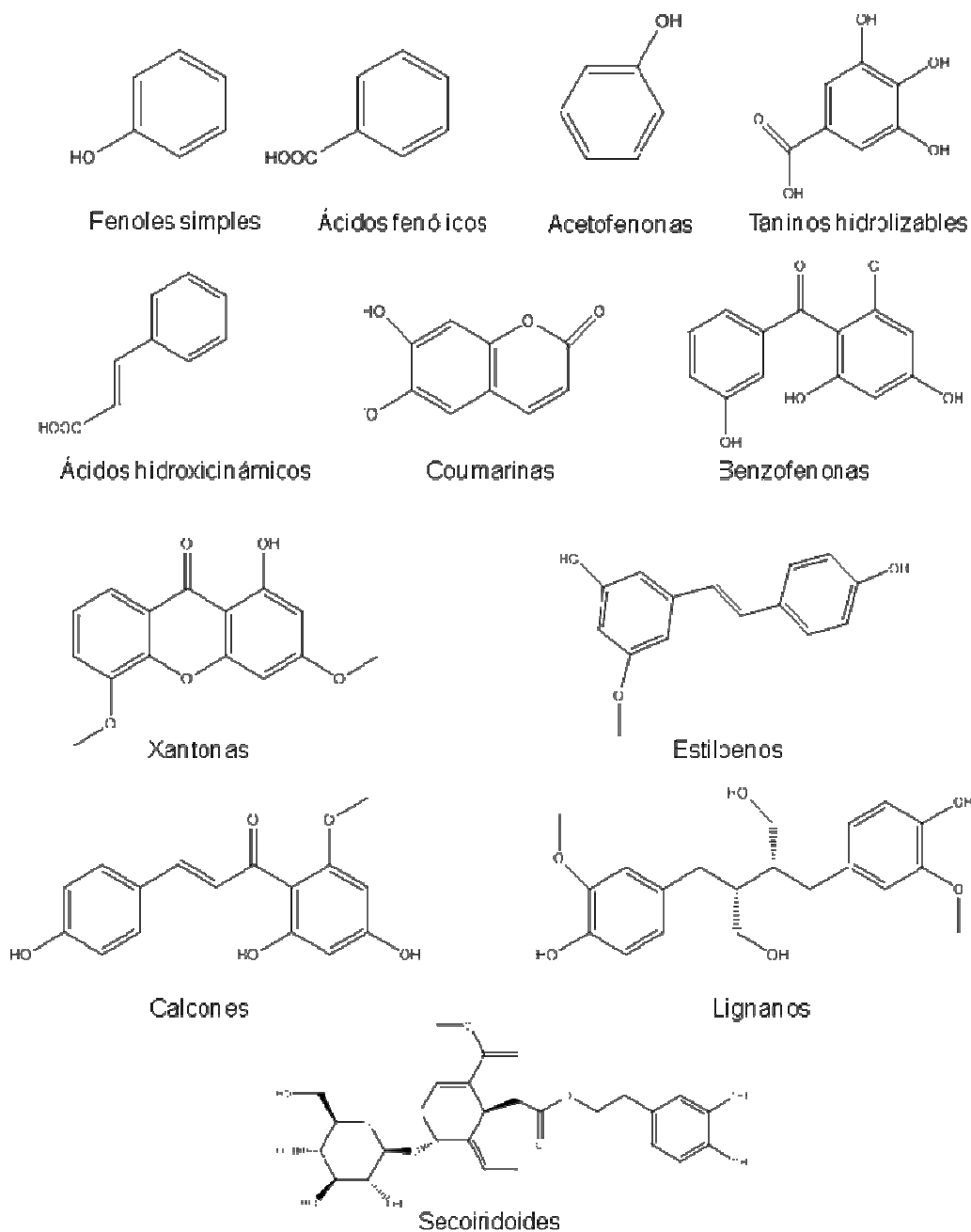


Figura 6. Estructura químicas de noflavonoides (Andrés-Lacueva *et al.*, 2010)

Los taninos hidrolizables, son principalmente ésteres de ácido gálico con glucosa, los cuales se dividen en: gallotaninos y ellagitaninos, ambos produciendo ácido ellágico como común producto derivado. Los taninos hidrolizables se encuentran en té verde, madera de roble, cebada (Taubert *et al.*, 2005), semillas de uva y otras especies de árboles del género *Diospyros* de

la familia Ebenacea (Ahn *et al.*, 2002). Las acetofenonas, son cetonas aromáticas y ácidos fenilacéticos que tienen una cadena de ácido acético unido al benceno, mientras que los ácidos hidroxicinámicos son incluidos en el grupo fenil propanoico y están formados de un anillo aromático y una cadena de tres carbonos, los ácidos hidroxicinámicos comprenden cuatro estructuras básicas: los ácidos coumaricos, ácidos caféicos, ácidos ferúlicos y ácidos sinápicos que se encuentran principalmente en la parte externa de los frutos y en ocasiones su concentración disminuye durante la maduración de las frutas (Andrés-Lacueva *et al.*, 2010). El ácido caféico es el ácido hidroxicinámico más abundante en frutas y vegetales, la principal fuente es el café, la lechuga, zanahorias, zarzamoras, arándanos, papas, durazno, naranja, manzana, jitomate y uvas (Betés-Saura *et al.*, 1996). El ácido ferúlico se encuentra de manera abundante en cereales, brócoli, espárragos y berenjena principalmente (Andrés-Lacueva *et al.*, 2010).

Las coumarinas pertenecen al grupo de compuestos conocidos como benzopironas, comprenden un anillo benceno unido a una pirona. Son encontrados en la naturaleza en combinación con azúcares como glicósidos. Las benzofenonas y xantonas tienen la estructura C6-C1-C6 y su estructura básica es una difenil cetona. Más de 500 xantonas se encuentran en la naturaleza, y 50 de ellas se encuentran en el mangostin con sustituyentes prenil (Walker, 2007). Los estilbenos, tiene un 1,2-difeniletieno como estructura básica C6-C2-C6. Resveratrol, el compuesto más ampliamente conocido, contiene tres grupos hidroxilos en la estructura básica y es llamada 3,4',5-trihidroxiestilbeno (Lamuela-Raventós *et al.*, 1995). En plantas, picéico, el glucósido de resveratrol es un derivado. Estilbenos están presentes en plantas como *cis* o *trans* isómeros, la forma *trans* puede ser isomerizada a *cis* por radiación UV. Calcones, con una estructura C6-C3-C6, son compuestos que no se encuentran en plantas (Lamuela-Raventós *et al.*, 1995). Los lignanos que son compuestos derivados de dos unidades de β - β' -fenilpropanoico (C6-C3) se encuentran distribuidos ampliamente en plantas y se clasifican en ocho subgrupos: furofuran, furan, dibencilbutano, dibencilbutirolactona, ariltetralin, arilnaftaleno, dibenzoiclooctadieno y dibenzilbutirolactol. Los secoiridoidos son fenoles complejos, se producen en el metabolismo secundario de terpenos

como precursores de algunos alcaloides, son caracterizados por la presencia de ácido elenoico en su forma glucosídica o aglicónica (Soler-Rivas *et al.*, 2000).

1.8 Vitaminas

Las vitaminas se encuentran presentes en hortalizas, frutas y granos, se clasifican de acuerdo a su solubilidad en grasa o agua. Poseen funciones importantes en el cuerpo humano como coenzimas en procesos metabólicos (Brown, 2007). Dentro de las vitaminas solubles en agua encontramos la vitamina C, tiamina, riboflavina, niacina, B6, B12, folacina, biotina y ácido pantoténico. Las vitaminas solubles en grasa o liposolubles, incluyen la vitamina A, D, E y K. Generalmente, las vitaminas solubles en agua son más susceptibles a la pérdida postcosecha. Por ejemplo, la inestabilidad de la vitamina C es mayor que la de las vitaminas A y B. No obstante, estas se pueden degradar a altas temperaturas y en la presencia de oxígeno (Yahia *et al.*, 2008).

Estos nutrientes influyen en la salud, previniendo enfermedades como cáncer, afecciones cardíacas, alergias, deficiencias del sistema inmune, neurodegeneraciones, osteoporosis, entre otras. Algunas vitaminas poseen actividad antioxidante protegiendo a las células de los radicales libres. Así mismo, refuerzan el funcionamiento del sistema inmunitario contra bacterias, virus y cancerígenos (Tolonen, 1995). Las vitaminas no se correlacionan entre sí, ni química ni funcionalmente. Cada una desempeña su propia función y no puede ser sustituida por ningún otra sustancia (Tolonen, 1995).

1.8.1 Vitamina A

Los compuestos con actividad de vitamina A son el retinol, retinal, retinoides, el β -caroteno y otros carotenoides, los cuales, ayudan a prevenir algunas formas de cáncer. El retinol, participa de manera importante en la función visual porque es el precursor de la rodopsina, protegiendo de la ceguera nocturna y mejorando la visión. La deficiencia de vitamina A, produce con frecuencia infecciones urinarias en niños, reduce la respuesta inmunológica y es además la causa principal de ceguera infantil en el mundo

(Bourges *et al.*, 2005). La molécula del retinol (Figura 7) contiene un ciclohexenil (β -ionona), y en el carbono 6 de este anillo se encuentra unida una cadena hidrocarbonada con cuatro dobles enlaces, proporcionando isómero geométrico *cis-trans*. El isómero predominante, *all-trans-retinol* posee 100% de actividad de vitamina A, y en los alimentos frecuentemente es acompañado por pequeñas concentraciones de *13-cis-retinol*, el cual presenta una actividad relativa del 75%. Otros *cis* isómeros de retinol, ocurren en la naturaleza y presentan bajo potencial y casi no contribuyen a la actividad total de vitamina A (Yahia y Ornelas Paz, 2010). Una absorción adecuada de vitamina A en el organismo, requiere la presencia de grasas que faciliten la biodisponibilidad del β -caroteno, licopeno y otros carotenoides. Fuentes importantes de vitamina A incluyen la grasa animal, la yema de huevo, zanahorias y hortalizas verdes, amarillas y rojas (Tolonen, 1995).

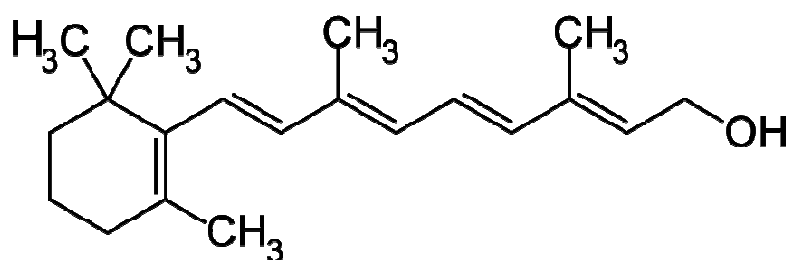


Figura 7. Estructura química del retinol

1.8.2 Vitamina E

Esta vitamina funciona en el organismo como el mayor antioxidante liposoluble, protege los lípidos contra los daños peroxidativos, y de este modo, contra numerosas enfermedades degenerativas y trastornos, incluyendo el cáncer, enfermedades cardiovasculares, las cataratas y el envejecimiento. Las fuentes principales de vitamina E son los aceites vegetales, la harina integral, las nueces, las hortalizas frescas y el huevo (Tolonen, 1995). Vitamina E es el nombre genérico dado a un grupo de compuestos, los tocoferoles: α , β , γ y δ -tocoferol (Figura 8) que se caracterizan por ser potentes antioxidantes liposolubles. Su deficiencia en seres humanos presenta síntomas de

neuropatía periférica, ataxia espino cerebral, miopatía de músculo esquelético, retinopatía pigmentada, anemia hemolítica y hemorragia intraventricular (Bourges *et al.*, 2005).

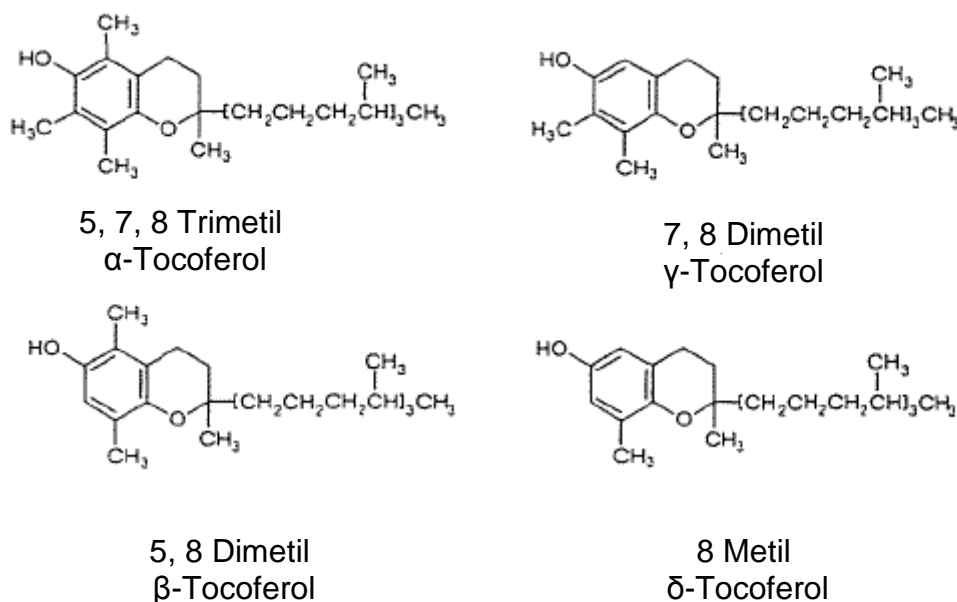


Figura 8. Estructura química de α , β , γ y δ tocoferoles (Warner y Mounts, 1990)

En la célula, la vitamina E protege de la peroxidación a las lipoproteínas y membranas celulares. Recientes evidencias han mostrado la influencia de la vitamina E en señalización celular, expresión de genes y actividad enzimática. Las propiedades relacionadas a la actividad antioxidante de la vitamina E, se deben a la interrelación con enzimas, proteínas estructurales, lípidos y factores de transcripción. La vitamina E ha sido analizada en muchos estudios relacionados con enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer o Parkinson, enfermedades cardiovasculares y ciertos tipos de cáncer (Mazzini *et al.*, 2009; Yahia y Ornelas-Paz, 2010). En la estructura general de los tocoferoles, el grupo polar es derivado de un aminoácido aromático, mientras que las cadenas saturadas son derivadas del pítol-difosfato (pítol-DP). Las diferentes formas de vitamina E, difieren solo del número y posición del grupo metil en la estructura aromática. Las plantas generalmente presentan bajas concentraciones de tocoferoles,

comparado con el alto contenido de tocoferoles en semillas (10–20 veces más). En plantas α -tocoferol es el componente de menor contenido (DellaPenna *et al.*, 2006).

1.8.3 Vitamina C

Este nutriente aumenta la absorción de hierro, contribuye a la formación de huesos, dientes y tejidos, acelera la cicatrización de las heridas, mantiene la elasticidad de la piel, es necesario para la producción de hormonas y mejora la resistencia a infecciones, hipertensión, arterioesclerosis y cáncer (Tolonen, 1995). La vitamina C, es un importante antioxidante hidrosoluble intracelular por su gran capacidad para donar electrones. Su deficiencia se conoce como escorbuto y se asocia a una mayor susceptibilidad a infecciones, en niños puede causar anomalías y hemorragias óseas. El consumo de esta vitamina reduce el riesgo de cáncer de la cavidad bucal, esófago, estómago y páncreas (Bourges *et al.*, 2005). Las fuentes de esta vitamina son frutas en general y hortalizas. Gran parte de la vitamina C, se pierde durante la cocción, congelación, conservación de alimentos y además, es sensible a la luz. El mango y kiwi son buenas fuentes de vitamina C con 100 mg/100 g de peso fresco y los cítricos con 50 mg/100 g de pulpa, sin embargo, los pimientos y muchas frutas tropicales contienen cinco veces más vitamina C que los cítricos (Nollet, 2000).

La vitamina C refuerza los efectos y la duración de la actividad de otros antioxidantes, como las vitaminas A y E, estas tres vitaminas actúan sinérgicamente. Si la vitamina C se expone al aire, luz o calor se forma un compuesto de color marrón y es conocido como dehidroascorbato (Tolonen, 1995). El ácido ascórbico (Figura 9) es importante en la biosíntesis de aminoácidos, formación de adrenalina y detoxificación en el hígado. Sin embargo, la mayoría de los aspectos relacionados con la síntesis y metabolismo de esta vitamina son poco conocidos. Su contenido en frutas y hortalizas es muy variable. Debido a su importancia, es importante conocer la evolución de su producción y pérdida durante el desarrollo de las frutas, ya que es información básica para determinar tiempos de cosecha con el mayor contenido de vitamina C. Los mecanismos de pérdida de esta vitamina no han

sido bien conocidos a la fecha y se cree que está relacionado a factores como: oxidación, pH, humedad relativa y temperatura. La enzima ácido ascórbico oxidasa, cataliza la oxidación del ascorbato a ácido dihidroascorbico (Yahia *et al.*, 2001).

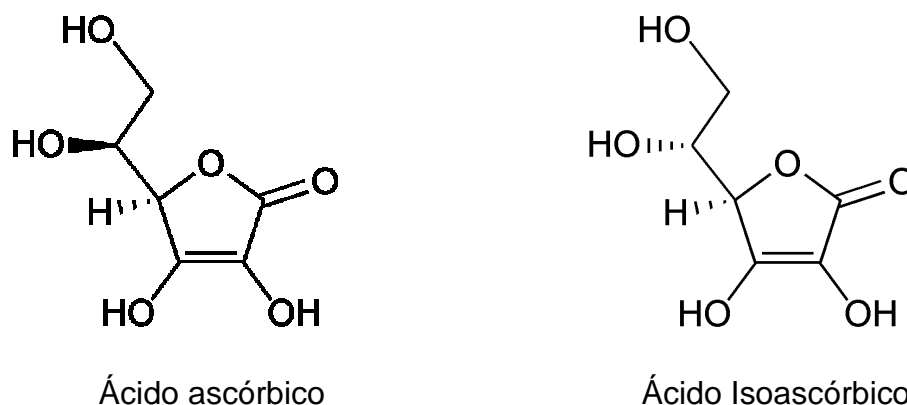


Figura 9. Estructuras del ácido L-ascórbico y ácido isoascórbico.

1.9 Ácidos grasos

Los ácidos grasos son lípidos sencillos insolubles en agua y solubles en solventes orgánicos, su fórmula general es R-COOH donde R representa una cola de hidrocarburo. Estos compuestos se diferencian por la longitud de sus colas hidrocarbonadas, número de dobles enlaces y por la posición de los dobles enlaces (*cis* ó *trans*) (Undurti, 2006). Los ácidos grasos pueden ser de origen animal, bacteriano y vegetal, se encuentran unidos como ésteres de oxígeno en lípidos complejos, como triacilgliceroles, glicerofosfolípidos, esfingolípidos, ceras y eicosanoides (Horton, 1995; Conn y Stumpf, 1998). Los ácidos grasos que no tienen un doble enlace, se clasifican como saturados, mientras que los insaturados tienen al menos un doble enlace. Los ácidos grasos insaturados con solo un doble enlace se llaman monoinsaturados, y aquellos con dos o más, se llaman poliinsaturados. Generalmente la configuración de los ácidos grasos es *cis* (Horton, 1995; Undurti, 2006).

El alto consumo de ácidos grasos saturados, contenidos en carnes rojas y subproductos, está asociado a altas concentraciones de colesterol en sangre, riesgo de hipertensión, diabetes y enfermedades cardiovasculares, que a diferencia del consumo de ácidos grasos insaturados, contenidos en grasa y aceite vegetal, y aceite de pescado, está asociado a disminuir el riesgo de arterosclerosis e incidencia de enfermedades cardiovasculares. Estudios realizados indican que la sustitución de ácidos grasos saturados por insaturados, disminuye el colesterol en sangre y muchos efectos sobre inflamación, trombosis y reactividad vascular. Además, los ácidos grasos monoinsaturados en lípidos de lipoproteínas, incrementa su resistencia a oxidarse (Ros y Mataix, 2006; Djazayery y Jazayery, 2008).

La mayoría de ácidos grasos insaturados tiene usos industriales (Walters *et al.*, 2004). El ácido linoleico es utilizado como suplemento en el alimento de animales, el cual puede proporcionar productos saludables para el consumo humano (Álvarez *et al.*, 2004), ya que la formación de ácido linoleico conjugado en productos como huevo, carne y leche, proporcionan potencial anticarcinogénico, antidiabético y antiadipogénico (Khanal y Olson, 2004). El ácido oleico puede ser usado en formulaciones dietéticas (Oladiji *et al.*, 2009), en cosméticos como emolientes y agentes limpiadores, en la manufactura de farmacéuticos, margarina (Oladiji *et al.*, 2009), aceites para cocinar (Liu *et al.*, 2002), sopas y detergentes. En la actualidad, se incrementa el interés por la producción de biodisel a partir de metil ésteres de ácidos grasos, debido a su similitud con las propiedades de combustibles derivados del petróleo, pero hasta la fecha, no ha resultado viable los costos de producción del biodisel (Ferrari *et al.*, 2005, Chongkhong *et al.*, 2007). Algunos ácidos grasos libres y sus ésteres, son utilizados en pesticidas ya que poseen actividad antimicrobial incluyendo virus y bacterias gran-positivas y gran-negativas. El ácido láurico (12:0) ha mostrado actividad antibacterial y antifúngica, el ácido graso insaturado linoleico ha mostrado poseer actividad antibacterial principalmente contra *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus* (Walters *et al.*, 2004, Nair *et al.*, 2005).

Los ácidos grasos derivados del ácido *cis*-linoleico y α -linolenico, son conocidos como ácidos grasos esenciales ω -6 y ω -3, respectivamente (Undurti, 2006). Los ácidos grasos esenciales no pueden ser sintetizados en el cuerpo, pero pueden ser obtenidos de la dieta, se encuentran principalmente en aceites vegetales de maíz, girasol, cártamo y soya, pescado y aceite de pescado, hortalizas de hoja verde y semillas (Simopoulos, 1999; Walters *et al.*, 2004). Los ácidos grasos esenciales, son constituyentes de las membranas celulares, favoreciendo el funcionamiento de enzimas y receptores, también, resultan de gran importancia para el cerebro, retina, hígado, riñones, glándulas suprarrenales y gónadas (Undurti, 2006). Los ácidos grasos esenciales, tienen propiedades antiinflamatorias, antitrombóticas, antiarrítmicas, hipolipidémicas y vasodilatatorias, lo cual previene enfermedades del corazón, hipertensión, diabetes tipo dos, enfermedades renales, artritis reumatoide, colitis y cáncer (Simopoulos, 1999).

1.10 Capacidad antioxidante

Una amplia variedad de alimentos como cereales, especias, semillas, bayas, frutas y hortalizas, son fuentes de antioxidantes como la vitamina C, vitamina E, carotenoides, compuestos fenólicos, tocoferoles, fitoestrógenos, ácido fitico, taninos, esteroides, entre otros, que pueden contribuir a la protección de enfermedades degenerativas (Li *et al.*, 2005; Valencia y Robles-Sardin, 2005; Halvorsen *et al.*, 2006; Tosun *et al.*, 2009; Hirawan *et al.*, 2010). La medición de manera individual del contenido de antioxidantes, no refleja la capacidad antioxidante total (CAT) de los alimentos, ya que debe considerarse, la sinergia e interacción de los diferentes compuestos con esta capacidad. Diferentes métodos se han desarrollado para la medición de la capacidad antioxidante total, los cuales difieren en los mecanismos químicos que utilizan para hacer esta medición. Cada antioxidante actúa *in vivo* a través de diferentes mecanismos, por lo que, es conveniente evaluar la capacidad antioxidante total a través de más de un método (Pellegrini *et al.*, 2003).

La capacidad de los antioxidantes para reaccionar químicamente con los radicales libres de oxígeno, puede ser medida mediante métodos químicos, sensoriales o instrumentales. Los métodos químicos pueden dividirse en dos

categorías: (1) ensayos basados en reacción de transferencia de átomo de hidrógeno (TAH) y (2) ensayos basados en reacción de transferencia de un electrón (TE) (Huang *et al.*, 2005). Los ensayos basados en TE involucran reacciones óxido reducción, donde el oxidante es usado como indicador del punto final de la reacción. El indicador por sí mismo es un oxidante que atrae un electrón del antioxidante, causando un cambio de color durante la reacción. El grado de cambio de color, es proporcional a la concentración de antioxidante, y el punto final de la reacción se alcanza cuando cesa el cambio de color. El cambio de color, es medido por absorbancia y es graficado contra la concentración de antioxidante. Los métodos basados en TE detectan la habilidad de un antioxidante para transferir un electrón y reducir cualquier compuesto. Este tipo de reacciones son dependientes del pH, ya que el método se basa en el potencial de ionización de los grupos funcionales reactivos. Estas reacciones son generalmente lentas y pueden requerir grandes periodos de tiempo para su determinación (Huang *et al.*, 2005).

Los ensayos basados en TAH, se monitorean mediante una cinética de reacción competitiva y la cuantificación se deriva de la curva cinética. Estos métodos se componen de un generador de radicales libres, un indicador molecular oxidable y un antioxidante. La habilidad del antioxidante para suprimir radicales libres, es medida por la donación de átomos de hidrógeno. Las reacciones de TAH son independientes del pH, solventes empleados y generalmente se llevan a cabo en segundos a minutos. La presencia de agentes reductores incluyendo metales, complican el ensayo, pudiendo conducir a falsas reactividades aparentemente altas (Huang *et al.*, 2005). Los métodos para medir capacidad antioxidante bajo el principio de transferencia de un electrón, pueden ser: capacidad antioxidante equivalente a trolox (TEAC, por sus siglas en inglés), poder antioxidante para la reducción del ion fierro (FRAP), 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), *N,N*-dimetil-*p*- fenilendiamina (DMPD), capacidad de reducción del cobre (II) y el ensayo de fenoles totales por el reactivo de folin-ciocalteu. Todos estos métodos están basados en la siguiente reacción de transferencia de electrones:

Indicador (oxidante) + e⁻ (de antioxidante) → Indicador reducido + antioxidante oxidado

En las reacciones de transferencia de átomo de hidrógeno, se encuentran los siguientes ensayos: capacidad de absorbancia del radical oxígeno (ORAC, por sus siglas en inglés), parámetro antioxidante de la captura total de radicales (TRAP), capacidad total del secuestro de oxidantes (TOSC), método de decoloración de crocina, consumo de oxígeno inhibido (IOU), método de decoloración de β -caroteno y la inhibición de oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL). Los ensayos de ORAC y TRAP son métodos que pueden ser estandarizados, mientras que otros como el TOSC, el de quimioluminiscencia, fotoquimioluminiscencia, oxidación de LDL y decoloración de β -caroteno, son más apropiados para aplicaciones específicas (Huang *et al.*, 2005).

Ensayo poder antioxidante para la reducción del ion fierro (FRAP).- Es un ensayo basado en la transferencia de un electrón (TE), donde un compuesto oxidante es utilizado como indicador, sustrae un electrón del compuesto antioxidante causando un cambio de color en el indicador. El cambio de color es proporcional a la concentración del antioxidante, la reacción termina cuando deja de haber cambio de color, estos cambios, pueden ser monitoreados mediante cambios de absorbancia (ΔA) (Huang *et al.*, 2005).

Para medir la capacidad antioxidante de un extracto, es utilizada la ecuación resultante de graficar el cambio de absorbancia ($\Delta A = \Delta A_{\text{final}} - \Delta A_{\text{inicial}}$) producido por un antioxidante estándar contra su concentración, lo cual dará una curva lineal, la ecuación de la curva refleja la capacidad de reducción del estándar, de esta manera el cambio de absorbancia producido por el extracto antioxidante, será introducido en esta ecuación para conocer su concentración, la cual es expresada como equivalencia de trolox (ET) o equivalente de ácido gálico (EAG) (Huang *et al.*, 2005). La sal férrica que es usada como antioxidante en este ensayo, tiene la siguiente fórmula $\text{Fe (III) (TPTZ)}_2 \text{Cl}_3$ donde TPTZ es 2,4,6-tripiridyl-s-triazine (Huang *et al.*, 2005).

Ensayo 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil (DPPH).- Este ensayo mide la capacidad recolectora de radicales libres y está basado en la transferencia de un electrón, esta capacidad es monitoreada por la decoloración del radical 2,2-

difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), el cual es ampliamente usado por su estabilidad, simplicidad, reproducibilidad y disponibilidad comercial. Este radical en solución genera un color púrpura oscuro con una absorbancia máxima a 515 nm, y cuando es reducido el color, desaparece gradualmente hasta que la lectura de absorbancia es estable, lo cual puede ser monitoreado con un espectrofotómetro (Huang *et al.*, 2005).

1.11 El Garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*)

El género *Myrtillocactus* pertenece a la familia de las cactáceas, e incluye cuatro especies, tres de las cuales se encuentran en México (*Myrtillocactus cochal*, *Myrtillocactus geometrizans*, *Myrtillocactus schenckii*) y una en Guatemala (*Myrtillocactus eichlamii*) (Anderson, 2001). La distribución geográfica de estas especies en México es como sigue: *Myrtillocactus cochal*, se distribuye en los límites del desierto de Sonora y Baja California. *Myrtillocactus schenckii*, se distribuye en Puebla y Oaxaca (Anderson, 2001). *Myrtillocactus geometrizans*, es una de las pocas especies de cactáceas columnares endémicas de México con amplia distribución en la República Mexicana (Hernández *et al.*, 2007), encontrándose en los estados de Hidalgo, Guanajuato, Michoacán, Jalisco, Querétaro, San Luis Potosí, Zacatecas, Tamaulipas, Nuevo León, Estado de México, Puebla, Veracruz, Guerrero y Oaxaca (Bravo, 1978; Scheinvar, 2004).

En el estado de Querétaro se encuentra únicamente la especie *Myrtillocactus geometrizans*, misma que presenta 3 subespecies, sin embargo, por carecer de aislamiento geográfico no amerita la categoría de subespecie y Scheinvar (2004) la describe como sigue: es una planta arborescente, candelabriforme, de 2 a 8 m de altura. *Tronco* de 8 a 65 cm de ancho. *Ramas inferiores* de 30 a 60 cm de longitud y de 5.5 a 12 cm de ancho, las superiores más cortas. *Costillas* 6 a 7, a veces 4 con el ápice obtuso, sinuoso. *Areolas* distantes 2 a 3.5 cm entre sí, obovoides, de 2 a 7 mm de longitud, con pelos y lana escasa o muy abundante, brindándole un aspecto peculiar, de color blanco grisáceo. *Espinas* radiales 3 a 5, rígidas, subuladas, aplanadas, ensanchadas en la base, la mediana inferior o las 2 superiores en general más cortas, 3 en la parte inferior de la areola, algo elevadas, de 1 a 6 mm de longitud, a veces hay

2 laterales más largas, de 1.2 a 1.7 cm de longitud. *Espina central* 1, a veces ausente, rígida, en forma de daga, aplanada, a veces ligeramente angulada, con la base ensanchada o angulada, ligeramente ascendente, de 0.5 a 7 cm de longitud. *Inflorescencias* cortas, a veces con 6 a 12. *Pseudocefalio* ausente. *Flores laterales*, en la parte superior de la areola, inmersas en la lana que puede ser abultada, de 2 a 3 cm de ancho, rotaceas. *Pericarpelo* de color verde olivo con tintes purpúreos o verde oscuro brillante, globoso a elipsoide, de 5 a 7 mm de ancho, con algunas areolas lineales, con escama basal verde, de casi (ca.) 1 mm de longitud y lana blanca emergente. *Tubo* de 2 a 6 mm de longitud y 4 a 5 mm de ancho. *Segmentos exteriores del pericarpio* de color verde olivo o amarillo verdoso, con amplia banda mediana de color castaño rojizo, crasos, obovados a oblongos, apiculados, hasta de 8 mm de longitud. *Segmentos interiores* blanco verdoso o amarillentos, oblongos, crasos. *Estambres* casi todos del mismo largo. *Filamentos blancos*, ligeramente verdosos, de ca. 1.2 cm de longitud. *Estilo* blanco en la base y amarillento en el ápice, de 1 a 1.2 cm de longitud, mas o menos sinuoso, lóbulos del estigma 4 a 6, de color crema, lineales a oblongos, de 4 a 7 mm de longitud, exertos en la antesis. *Fruto* rojo violeta, globoso a elipsoide, de 9 a 15 mm de ancho glabro, sin espinas ni cerdas. *Semillas* negras a castaño negruzcas, cortamente obovoides, truncadas en la base, con bordes afilados, de ca. 2 mm de longitud, 0.5 a 1 mm de ancho y 1-2 mm de espesor; testa verrucosa o plegada; taza del hilo basal, amplia.

El garambullo se encuentra en altitudes de 1800 a 2200 m. Crece en suelos fértiles y poco fértiles. Es una planta resistente a los rayos de sol y al ataque de insectos (*Spodoptera frugiperda* y *Tenebrio molitor*) por su contenido de terpenoides (peniocerol, macdougallina y chichipegenina) (Hernández-López *et al.*, 2008). En Querétaro crece en matorrales xerófilos crasicale, micrófilo y rosetófilo, en pastizales y en el bosque tropical caducifolio (Scheinvar, 2004). El clima muy lluvioso y con bajas temperaturas menores a 10 °C, limita su distribución en varias regiones de México, su propagación puede ser de manera *in vivo* por explantes, injertos ó semillas, e *in vitro* por explantes apicales o basales (Hernández-López *et al.*, 2008).

En los meses de junio a septiembre esta cactácea produce frutos conocidos como garambullos, los cuales se encuentran en mercados locales (Bravo, 1978; Hernández-López *et al.*, 2008). El fruto es no climatérico con tiempo de vida postcosecha muy corto (Guzmán-Maldonado *et al.*, 2010), es consumido de manera fresca o procesado de manera local, ya que es utilizado para preparar refrescos, mermeladas, como colorante para alimentos, licor, pasteles, galletas, dulces, agua fresca, en conserva, nieve, helados y paletas (Bravo, 1978). Los estudios en la fruta se han enfocado a las betalainas, pigmentos característicos con un contenido de 2.3 mg/100 g de peso fresco. En análisis por HPLC, se han identificado cuatro picos, una betaxantina, betanina, isobetanina y probablemente filocactina (Reynoso *et al.*, 1997). Las betalainas se han encontrado estables a pH bajo, sin riesgos toxicológicos e inocuas en concentraciones hasta 15 g/kg en vía oral en la utilización como aditivo colorante (Reynoso, 1995).

El uso del 1-metilciclopropeno (1-MCP) como inhibidor de la madurez en frutos de garambullo no reveló una diferencia significativa en frutos no tratados, sin embargo, presentó una menor invasión fúngica. En la aplicación de este compuesto es necesario considerar una variedad de factores, incluyendo el cultivar, la etapa de desarrollo, el tiempo de cosecha que transcurre hasta la aplicación del tratamiento y la edad de la planta (Corona, 2007). Los recubrimientos a base de caseinato de sodio plastificado con sorbitol y glicerol, mejoran las propiedades fisicoquímicas y texturales del fruto de garambullo durante su almacenamiento, además de conservar su actividad antioxidante y su efecto inhibitorio sobre la actividad de la α -glucosidasa, enzima relacionada con la absorción de la glucosa a nivel intestinal (Correa, 2009).

II. OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

El fruto de garambullo posee un alto valor nutricional y contiene diversos fitoquímicos que pueden ser de gran importancia para la nutrición y la salud humana.

2.2 Objetivo General

Evaluar el valor nutricional del fruto de garambullo a través de su caracterización fisicoquímica.

2.2.1 Objetivos específicos

- Evaluación del color de la fruta e identificación y cuantificación de sus pigmentos.
- Análisis de algunos componentes involucrados en la calidad de la fruta.
- Determinación del contenido de vitamina C (ácido L-ascórbico y ácido isoascórbico).
- Determinación del contenido de vitamina E (α -tocoferol y δ -tocoferol).
- Determinación del contenido de carotenoides, incluyendo algunos específicos como el β -caroteno.
- Determinación de compuestos fenólicos.
- Determinación del contenido de ácidos grasos.
- Determinación de capacidad antioxidante del fruto utilizando los ensayos 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) y poder antioxidante para la reducción del ion hierro (FRAP).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

Se utilizó fruta cosechada en una primera temporada de un estado de madurez, la cual, fue congelada para su análisis y de aquí en adelante será referida como congelada. Y fruta cosechada en una segunda temporada con dos estados de madurez (madurez I y II), la cual, fue analizada en forma fresca en los análisis de sólidos solubles totales, pH, humedad, color, peso promedio, capacidad antioxidante, contenido de betalaínas totales, carotenoides totales y fenoles totales. Y se utilizó de forma liofilizada en el resto de los análisis.

Temporada 1.

La fruta de esta primera temporada se colectó en el mes de agosto de 2008 en la localidad de Cerro Colorado (Latitud 20° 45'39.35'' N, Longitud 100° 29'57.60'' O) perteneciente al municipio de Querétaro. La fruta fue extraída manualmente y fue llevada al laboratorio de Fitoquímicos y Nutrición de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro, para su limpieza e inmediatamente fue congelada almacenándola a -70 °C. Posteriormente, la fruta se liofilizó, molió y almacenó protegida de la luz para su análisis. Para su liofilización, se colocó fruta congelada dentro de tubos para centrífuga de 50 mL, se taparon con tela porosa y se colocaron dentro de frascos para liofilizadora de 600 mL. Las condiciones de liofilización fueron -40 °C y 0.08 milibares durante cinco días hasta peso constante.

Temporada 2.

Se colectó fruta de dos estados de madurez: fruta roja (I) y fruta púrpura (II), procedente de tres localidades del municipio de Querétaro: Cerro Colorado (Latitud 20° 45'39.35'' N, Longitud 100° 29'57.60'' O), Obrajuelos (Latitud 20° 35' 46.95'' N, Longitud 100° 29' 25.81'' O) y Santa Rosa Jáuregui (Latitud 20° 44' 31.43'' N, Longitud 100° 26' 22.36'' O). Las colectas fueron hechas en el mes de julio de 2009 durante la mañana. Se trabajó con dos muestreos en cada lugar: uno para la fruta con estado de madurez I y otro para estado de madurez II.

La fruta fue extraída manualmente, se colocó en bolsas de plástico dentro de una hielera con refrigerantes para su transporte al laboratorio de Fitoquímicos y Nutrición de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro, donde la fruta fue lavada, seleccionada y pesada. Se colectó en promedio 1.2 kg de fruta por muestreo. La cantidad de muestra colectada fue repartida en tres porciones: una para realizar pruebas relacionadas con calidad de la fruta; otra porción para pruebas de actividad antioxidante y una tercera porción fue congelada con nitrógeno líquido para almacenarla y liofilizarla en análisis posteriores. El garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*) fue identificado por Biólogos de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro, se cuenta con ejemplar de referencia depositado en el Herbario de la Facultad con número de colecta 718.

3.2 Reactivos, estándares y solventes utilizados.

Los siguientes reactivos fueron obtenidos de J.T. Baker (Baker Mallinckrodt, México): ácido acético glacial con pureza del 99.70%, ácido cítrico monohidratado granular, ácido clorhídrico 37.40%, ácido fórmico 88%, carbonato de sodio, fosfato de potasio monobásico (KH₂PO₄), hidróxido de amonio 30%, hidróxido de potasio perlas 87.4%, hidróxido de sodio 98.3% y sulfato de sodio. Y de Sigma Aldrich (St.Louis. MO) se obtuvieron los reactivos: 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), bromuro de hexadeciltrimetilamonio (cetrimida) 98%, cloruro de hierro III hexahidratado 97%, etilendiaminatetraacético, folin-ciocalteu fenol 2N, sephadex LH-20, 2,4,6-tris(2-piridil)-5-triazine (TPTZ) 98%.

Los siguientes estándares con 99% de pureza fueron obtenidos de Sigma Aldrich (St.Louis. MO): ácido L(+)-ascórbico, ácido isoascórbico, luteína, licopeno, β-caroteno, ácido gálico, ácido protocateico, quercetina, ácido sinápico, ácido p-hidroxibenzoico, ácido clorogénico, ácido caféico, kaempferol, catequina, miricetina, ácido ferúlico, isoramnetina, epicatequina, cinámico, ácido p-coumarico, 2-hidroxicinámico, ácido vanílico, aminoácidos: serina, prolina, fenilalanina, histidina, ácido aminobutírico, asparagina y glutamina; el ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (TROLOX) se obtuvo con

pureza de 97%, α -tocoferol 95%, δ -tocoferol 90%, ácido laurico, mirístico, palmítico, palmitoleico, esteárico, oleico, linoleico y linolenico.

Los solventes: acetona, acetonitrilo, diclorometano, etanol, hexano, metanol, terbutil-metil-éter y tolueno grado HPLC, fueron obtenidos de J.T. Baker (Baker Mallinckrodt, México). El agua destilada grado HPLC fue preparada por un sistema de purificación Milli-Q plus (Millipore Corp., Bedford, MA).

3.3 Métodos

3.3.1 Determinación de peso.

En cada muestreo se seleccionaron 20 frutas al azar, utilizando tablas aleatorias (Spiegel y Stephens, 1999). El peso fue determinado usando una balanza digital Explorer (OHAUS co., Nänikon, Suiza). Se registró el peso de cada fruta y se calculó el promedio de los datos obtenidos.

3.3.2 Determinación de color.

Preparación de la muestra.- Se colocó la fruta en una licuadora domestica y se trituró hasta formar un puré, el cual se colocó en tres cajas petri. Se realizaron cuatro mediciones de color en cada caja.

Medición de color.- Se llevó a cabo utilizando un espectrofotómetro Minolta CM-2002 (Minolta Co., Tokio, Japón) y el programa Spectra Match 3.3.7 para procesar los datos y obtener los parámetros de color L^* , C^* , a^* , b^* y h° del sistema CIELAB. L^* indica que tan claro u oscuro es el color; C^* , es la vividez del color, y h° el ángulo de color en la fruta.

3.3.3 Congelación, liofilización y determinación de humedad.

En cada muestreo, la fruta de garambullo fue lavada, seleccionada y secada, posteriormente fue cortada, congelada en nitrógeno líquido y almacenada a $-70\text{ }^\circ\text{C}$ hasta su liofilización. Para la liofilización, se pesaron 18 tubos cónicos para centrifuga de polipropileno sin muestra y se colocó un promedio de 23.4 ± 0.6 g de fruta congelada en cada tubo, los cuáles se

taparon con tela delgada y liga. El peso de los tubos con muestra se registró y los tubos se colocaron en los frascos de la liofilizadora Frezone 1 (Labconco Co., Kansas C., MO, EUA). La humedad de las muestras, fue medida por triplicado. El contenido de humedad final de los productos, se calculó usando la siguiente fórmula.

$$\% \text{ humedad} = \frac{\text{PCMH} - \text{PCMS}}{\text{PCMH} - \text{PCV}} \times 100$$

Donde:

PCMH = peso del contenedor con muestra húmeda

PMCS = Peso del contenedor con muestra seca

PCV = Peso del contenedor vacío

Los pesos finales de los contenedores con muestra, fueron registrados cuando no hubo diferencia en peso de un día y otro. El tiempo de liofilización de las frutas fue de cinco días. Una vez liofilizadas las muestras, éstas fueron molidas hasta obtener una harina y almacenadas en la obscuridad hasta su utilización.

3.3.4 Análisis de sólidos solubles totales y pH.

Se tomaron 5 g de pulpa fresca y se homogeneizó con 10 mL de agua destilada durante dos minutos, empleando un mezclador de tejidos Ultra Turrax modelo T25 IKA Works (Laborerchnik Inc., Willmington, USA). Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 10,000 g por 10 minutos a 25 °C en una centrífuga modelo Hermle z 323 k (Labortechnik Inc., Wehing, Alemania). A continuación se tomaron unas gotas del sobrenadante para evaluar los sólidos solubles totales (°Brix) mediante un refractómetro manual modelo ATC-1 (ATAGO, Tokio, Japón). Se realizó la lectura por triplicado. Los cálculos para la determinación de sólidos solubles totales (SST) de las muestras se realizaron mediante la siguiente fórmula:

$$\text{SST}_{\text{muestra}} = \frac{(\text{SST de muestra diluida})(10\text{g} + \text{peso muestra})}{\text{peso muestra}}$$

El pH fue medido en el sobrenadante obtenido de la extracción de sólidos solubles totales, utilizando un equipo Orion Research Digital pH/millivoltmeter 611 y las lecturas se hicieron por triplicado.

3.3.5 Determinación de contenido de betalaínas.

La metodología de extracción y cuantificación de betalaínas totales, identificación de betalaínas por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), extracción de betanina, síntesis de betaxantinas y la identificación de betalaínas por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) acoplada a espectroscopia de masas, descrita a continuación se realizó como reporta Castellanos-Santiago y Yahia (2008).

Método de extracción.- Se pesaron 5 g de muestra fresca y se añadieron 20 mL de agua, se homogeneizó durante un minuto empleando un mezclador de tejidos Ultra Turrax modelo T25 IKA Works (Laborerchnik Inc., Willmington, USA). Se mantuvo en reposo por 10 minutos en la oscuridad, posteriormente la muestra se centrifugó a 12000 g, 15 °C por 15 minutos en una centrífuga Hermle z 323 k (Labortechnik Inc., Wehing, Alemania). Los extractos obtenidos fueron analizados espectrofotométricamente y por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR).

Cuantificación de betalaínas totales.- Se utilizó un espectrómetro UV/vis Beckman, USA equipado con UVWinLab V 2.85.04 software. El espectro de absorción se leyó por triplicado a 482 y 535 nm para betacianinas y betaxantinas respectivamente y el contenido de betacianinas (BC) se calculó en base a la siguiente ecuación.

$$\text{BC (mg/g)} = [(A(DF)(MW)vd/\epsilon LWD)]$$

Donde A es el valor de absorción, DF es el factor de dilución, vd es el volumen de solución con pulpa fresca (ml), L es la longitud de celda (1 cm), WD

es el peso de la pulpa fresca, MW es el peso molecular y ϵ el coeficiente molar, para las betacianinas MW= 550 g/mol; ϵ = 60000 L/(mol cm) en agua. Para la cuantificación de betaxantinas (BX) se utilizó la ecuación descrita, solo que se aplicó el coeficiente molar $\epsilon = 48,000$ L/(mol cm) y MW = 308 g/mol.

Identificación de betalainas por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR).- La identificación se realizó en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución marca Hewlett-Packard (Agilent Technologies Co., Palo alto, CA), series 1100 con inyector automático, sistema de bombeo cuaternario, sistema de desgasificación automática y detector de arreglo de diodo (DAD). Se utilizó una columna de fase reversa Symmetry C18 de 150 X 4.6 mm de diámetro interno y tamaño de partícula de 3.5 μ m (Waters, Milford, MA), a 25 °C. La fase móvil consistió en una mezcla de agua y ácido fórmico 1% en v/v (A) y metanol (B) con flujo de 1 mL/min. La separación de betalainas inició con 100% (A) durante 10 minutos seguido de un gradiente lineal de 0% (B) a 30% (B) en 30 minutos, y finalmente un gradiente lineal de 30% (B) a 100% (B) en 20 minutos. El volumen de inyección de las muestras fue de 20 μ L. Betaxantinas y betacianinas fueron monitoreadas a 482 y 535 nm, respectivamente. La identificación de los diferentes picos en el cromatograma se confirmó con los tiempos de retención de estándares sintetizados.

Extracción de betanina.- La extracción de betanina fue a partir de betabel liofilizado (*Beta vulgaris*) cv. Pablo. Se pesó 1 g de betabel liofilizado con 20 mL de metanol al 20% en agua destilada grado HPLC, se homogeneizó durante un minuto en vortex modelo M63215 (Thermoline, Dubeque, USA), se mantuvo en reposo por 10 minutos en la oscuridad y posteriormente se centrifugó a 12000 g, 15 °C por 15 minutos en una centrífuga Hermle z 323 k (Labortechnik Inc., Wehing, Alemania). El extracto crudo color magenta se colocó en una columna Sephadex LH-20 (10 g) y se separó por elución con agua. Este procedimiento se repitió diez veces por porciones de 2 mL de extracto cada una. La betanina (fracción rojo-violeta), fue monitoreada a 535 nm y colectada para ser congelada, liofilizada y obtener polvo de betanina purificada.

La columna Sephadex LH-20 se elaboró con 10 g de este polímero, el cual se homogeneizó con 50 mL de metanol 20% en agua destilada grado HPLC, la mezcla se colocó en una columna de vidrio de 30 cm de largo y filtro en la base, la cual se montó en soporte universal. La mezcla se dejó reposar una noche, al día siguiente, compactada la columna, se agregó nuevamente 30 mL de la solución metanol 20% con el objeto de no dejar secar la columna hasta su utilización.

Síntesis de betaxantinas.- Se utilizó polvo de betanina (10 mg) obtenida previamente, se hidrolizó en 1 mL de hidróxido de amonio (NH_4OH) a pH de 11 por 45 minutos. La hidrólisis fue seguida espectrofotométricamente a 420 nm para detectar el ácido betalámico y añadir posteriormente el aminoácido, el cual se preparó con una concentración 10 molar. Se homogeneizó en vortex modelo M63215 (Thermoline, Dubuque, USA) y se dejó reposar por 35 minutos hasta la condensación de la betaxantina correspondiente, se almacenó a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ protegida de la luz hasta su análisis.

Identificación de betalaínas por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) acoplada a espectroscopía de masas con interfase electro spray de ionización positiva (CLAR-IEE⁺-EM).- El cromatógrafo de líquidos de alta resolución con detector de arreglo de diodos CLAR-DAD se acopló a un espectrómetro de masas 6210 tiempo de vuelo (TOF, por sus siglas en inglés) (Agilent, Palo Alto, CA) equipado con una fuente de ionización electro spray (ESI) y software Mass Hunter (A.02.01), modo de ionización positiva. Se utilizó nitrógeno con un flujo de 12 L/min con nebulización a 35 psi, voltaje de electro spray de 3.5 kV y temperatura del nebulizador de 350 °C. Se utilizó como fase móvil una mezcla de ácido fórmico 1% en agua v/v (A) y metanol (B). El método inició con 100% (A) durante 10 minutos seguido de un gradiente lineal de 0% (B) a 30 % (B) en 30 minutos, y finalmente un gradiente lineal de 30% (B) a 100% (B) en 20 minutos. El volumen de inyección de muestra fue de 20 µL. Para la identificación de betaxantinas, se analizaron las estructuras de muestras y estándares por espectroscopía de masas.

3.3.6 Determinación del contenido de carotenoides.

La extracción de carotenoides fue seguida como reporta Corral-Aguayo *et al* (2008), se pesó 5 g de tejido fresco y se agregó 20 mL de solución extractora (hexano:acetona:etanol:tolueno 10:7:6:7 v/v/v/v). La mezcla se homogeneizó durante 2 minutos utilizando un mezclador de tejidos Ultra Turrax modelo T25 IKA Works (Laborerchnik Inc., Willmington, USA). Posteriormente se agregó 1 mL de hidróxido de potasio (KOH) al 40% en metanol, se mezcló perfectamente con ayuda del vortex, se sometió a agitación por 20 min a 30 rpm y 56 °C empleando un baño con agitación modelo 25 (Precisión Scientific, Chicago, USA), protegiendo los tubos de la luz. Una vez transcurrido el tiempo de agitación, la mezcla se enfrió colocando los tubos en hielo, se agregaron 10 mL de sulfato de sodio (Na₂SO₄) al 10%, se agitó durante 1 min más y se agregó 10 mL de hexano. La mezcla se dejó en reposo durante 1 hora en la oscuridad y hielo, tiempo en el cual se observó una separación de fases, siendo de interés la fase superior la cual se transfirió a un tubo de 15 mL para su análisis.

Cuantificación de carotenoides totales.- Se tomó una alícuota de la fase orgánica obtenida de la extracción arriba mencionada y se colocó en una celda de cuarzo, para medir su absorbancia a 450 nm en un espectrofotómetro UV/vis Beckman, equipado con UVWinLab V 2.85.04 software. Las lecturas se hicieron por triplicado. Se empleó hexano como blanco y los resultados fueron expresados como mg/100g de peso fresco de β-caroteno. Para los cálculos, se construyó una curva de calibración. Se preparó una solución stock de β-caroteno en hexano con concentración de 1 mg/mL, posteriormente se hicieron diluciones de 0.008, 0.006, 0.004, 0.002 y 0.001 mg/mL para ser leídas a 450 nm (Corral-Aguayo *et al.*, 2008).

Cuantificación de carotenoides por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR).- La cuantificación de carotenoides se realizó como reporta Yahia *et al* (2007) con algunas modificaciones. La fase superior obtenida se filtró con membrana 0.45 μm de nylon (Millipore Millex, Billerica, MA) y se inyectó 15 μL a un cromatógrafo de líquidos de alta resolución, marca Hewlett-Packard (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) series 1100 con un

inyector automático, sistema de bombeo cuaternario, sistema de desgasificación automática y detector de arreglo de diodo (DAD). Se utilizó una columna YMC HPLC column con dimensiones de 150 X 4.6 mm diámetro interno. La fase móvil utilizada fue una mezcla de metanol (C) y terbutilmetileter (D) a un flujo de 1 mL/min, temperatura de 15 °C, con longitudes de onda de 450 y 470 nm, tiempo de corrida de 45 minutos, se siguió un gradiente lineal de 0% (D) a 100% (D) en 30 minutos y después un gradiente lineal de 100% (D) a 100% de (C) en 40 minutos antes de regresar a condiciones iniciales. Los análisis fueron monitoreados usando HP ChemStation software versión A.06.03 (Agilent Technologies Co., Palo Alto. CA). Se utilizó curva de calibración de β -caroteno en hexano con diluciones de 0.001, 0.0001, 0.00001, 0.000001 y 0.0000008 g/mL, licopeno en hexano con diluciones de 0.1, 0.01, 0.001 y 0.0001 g/mL y luteína en hexano con diluciones de 0.5, 0.05, 0.005, 0.0005, 0.00005 g/mL. Las mediciones se hicieron por triplicado.

Identificación de carotenoides por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) acoplada a espectroscopía de masas con interfase de ionización química a presión atmosférica con polaridad positiva (CLAR-APCI⁺-EM).- La técnica que a continuación se describe se realizó con algunas modificaciones de Ornelas-Paz *et al* (2007). El cromatógrafo de líquidos de alta resolución con detector de arreglo de diodos CLAR-DAD, se acopló a un espectrómetro de masas 6210 tiempo de vuelo (TOF, por sus siglas en inglés) (Agilent, Palo Alto, CA) equipado con una interfase de ionización química a presión atmosférica con polaridad positiva (APCI⁺) y software Mass Hunter (A.02.01). Se utilizó nitrógeno con un flujo de 5 L/min con nebulización a 20 psi, voltaje de capilar de 4 kV, fragmentor 200 V, skimer 60 V, temperatura del vaporizador y nebulizador de 400 y 350 °C, respectivamente. Las condiciones utilizadas en el cromatógrafo de líquidos, fueron las mismas que en los análisis de cuantificación antes mencionada. El volumen de inyección de muestra fue de 15 μ L y un flujo de 1 mL/min. Para la identificación de carotenoides, se consideró los tiempos de retención de estándares (β -caroteno, licopeno y luteína) así como su patrón de fragmentación.

3.3.7 Determinación del contenido de α y δ tocoferol.

Para la cuantificación de tocoferoles, se pesaron 0.5 g de fruta liofilizada, la cual se homogeneizó con 10 mL de metanol grado HPLC. Las muestras se mantuvieron en agitación en baño María a 55 rpm por 15 min a 30 °C. Posteriormente se centrifugaron a 5000 g durante 10 min. El sobrenadante se filtró con membrana de nylon de 0.45 μ m de poro, y se inyectaron 20 μ L del filtrado en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución con detector de arreglo de diodos CLAR-DAD marca HP serie 1100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA), usando para la separación una columna Symmetry C18 con dimensiones de 4.6 x 150 mm y como fase móvil, metanol grado HPLC al 100% a un flujo de 0.8 mL/min. Para la detección de los tocoferoles se utilizó una longitud de onda de 294 y 325 nm. Previamente se hicieron curvas de calibración a partir de una solución stock de 0.1 mg/mL de α y δ tocoferol en metanol, a partir de las cuales se hicieron siete diluciones (0.1 – 0.00125 mg/mL) (Yahia *et al.*, 2007).

3.3.8 Determinación del contenido de ácido L-ascórbico e isoascórbico.

Extracción.- Se pesaron 0.5 g de muestra liofilizada y se añadieron 10 mL de solución extractora (ácido cítrico 0.1 M y EDTA al 0.5%, pH 2.35-2.4). Después se homogeneizaron por un minuto con vortex modelo M63215 (Thermoline, Dubeque, USA). Las muestras se centrifugaron a 15000 g por 10 min y 2 °C. Se separó el sobrenadante y se filtró a través de un cartucho Sep-Pack C18 Vac 3 mL (Waters Co., Milford, CT). Los primeros 5 mL fueron desechados y los siguientes 3 mL fueron analizados. El cartucho fue previamente acondicionado con 10 mL de etanol y luego 10 mL de agua grado HPLC. A la muestra obtenida se le agregó 1 mL de 1,2-fenilendiamina (0.832 mg/mL) preparada en metanol/agua (5:95, v/v). Las muestras fueron filtradas con membrana de nylon de 0.45 μ m (Millipore Corp., Bedford, MA) y se colocaron en viales para su determinación por cromatografía líquida de alta resolución (Corral-Aguayo *et al.*, 2008).

Cuantificación por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR).-

El ácido ascórbico y el ácido isoascórbico de las muestras, se determinaron utilizando un cromatógrafo de líquidos de alta resolución con detector de

arreglo de diodos CLAR-DAD marca Hewlett-Packard (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) series 1100 con un inyector automático, sistema de bombeo cuaternario y sistema de desgasificación automática. Se utilizó una columna μ bondapack C18 de 10 μ m (3.9 X 300 mm) equipada con una precolumna Sentry μ bondapack C18 de 10 μ m (Waters Co., Milford, CT). La fase móvil fue bromuro de hexadeciltrimetilamonio (cetrimida) 5mM y fosfato de potasio dihidratado (KH_2PO_4) con una concentración de 50mM en metanol-agua (1:99 v/v) y pH de 4.6 con un flujo de 1 mL/min. Se utilizó un detector de arreglo de diodos (DAD) a 261 y 348 nm para cuantificar el ácido ascórbico y el ácido isoascórbico. Las curvas de calibración fueron preparadas con diluciones de 0.8, 0.4, 0.2, 0.05, 0.025 mg/mL (Corral-Aguayo *et al.*, 2008).

3.3.9 Determinación del contenido de compuestos fenólicos.

Se pesaron 5 g de fruta fresca y se agregaron 10 mL de acetona al 80% con ácido fórmico al 2%, se homogeneizó usando un mezclador de tejidos Ultra Turrax modelo T25 (IKA Works, Willmington, NC) a temperatura ambiente. Se sonicó por 5 minutos en un sonicador Bransonic 2510 (Bransonic Ultrasonic Co., Danbury, CT). Posteriormente se centrifugó a 19000 g por 15 minutos a 2 °C. El sobrenadante fue colectado y al residuo se realizó nuevamente la extracción. Los dos sobrenadantes se mezclaron y evaporaron a 20 °C y baja presión con rotavapor Büchi R205. El concentrado fue diluido con 25 mL de metanol y llevado a 50 mL con agua grado HPLC. La extracción se realizó por triplicado. Para la cuantificación de fenoles totales, las alícuotas fueron diluidas 1:10 con agua grado HPLC. En una microplaca de 96 pozos, se colocó 30 μ L de muestra diluida, 150 μ L de reactivo Folin-Ciocalteu 2N (dilución 1:10 con agua destilada) y 120 μ L de 7.5% de carbonato de sodio (Na_2CO_3). Para el blanco se utilizó agua destilada, posteriormente se dejó reposar por 2 horas en la oscuridad, y se midió absorbancia a 630 nm en un espectrofotómetro Dynex MRX microplate reader (Dynex Technol. Chantilly, VA). La curva de calibración se realizó con ácido gálico en agua destilada, con diluciones de 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.031 y 0.015 mg/mL (Corral-Aguayo *et al.*, 2008).

Cuantificación de compuestos fenólicos por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR).- Esta metodología se desarrolló con algunas modificaciones de Rivera-Pastrana *et al* (2009). Se inyectó 20 µL de extracto filtrado con membrana de nylon 0.45 µm al cromatógrafo de líquidos de alta resolución con detector de arreglo de diodos, CLAR-DAD marca Hewlett-Packard (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) series 1100, con un inyector automático, sistema de bombeo cuaternario, sistema de desgasificación automática y detector de arreglo de diodo (DAD). Se utilizó una columna XTERRA con dimensiones de 250 X 4.6 mm diámetro interno (Waters). La fase móvil utilizada fue una mezcla de ácido fórmico 1% en agua grado HPLC (A) y acetonitrilo grado HPLC (B) a un flujo de 0.5 mL/min. La columna fue mantenida a una temperatura de 25 °C. Se registró la absorbancia a 280 y 320 nm. Se utilizó como fase móvil una mezcla de ácido fórmico 1% en agua v/v (A) y metanol (B). El método inició con 2% de (B), seguido por un gradiente lineal de 2% B a 100% B en 60 minutos, estas condiciones se mantuvieron por 10 minutos para después disminuir hasta 2% de (B) en el minuto 70. Los resultados fueron monitoreados usando HP ChemStation software versión A.06.03 (Agilent Technologies Co., Palo Alto, CA). Se realizó curva de calibración para los estándares de compuestos fenólicos (ácido protocateico, quercetina, ácido sinápico, ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido clorogénico, ácido gálico, ácido caféico, kaempferol, catequina, miricetina, trans-4-hidroxy-3-metoxicinámico, isoramnetina, epicatequina, cinámico, ácido *p*-coumárico, 2-hidroxicinámico, ácido vanílico). La solución stock de cada uno fue de 0.1 mg/mL en metanol, se hicieron diluciones de 0.1, 0.01, 0.001, 0.0005 y 0.0001 mg/mL. Las mediciones se hicieron por triplicado.

Identificación de compuestos fenólicos por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) acoplada a espectroscopía de masas con interfase electro spray de ionización negativa (CLAR-IEE⁻-EM).- Esta metodología se desarrolló con algunas modificaciones de Rivera-Pastrana *et al* (2009). El cromatógrafo de líquidos de alta resolución con detector de arreglo de diodos CLAR-DAD se acopló a un espectrómetro de masas 6210 tiempo de vuelo (TOF, por sus siglas en inglés) (Agilent technologies, Palo Alto, CA) equipado con una fuente de ionización electro spray (ESI) y software Mass

Hunter (A.02.01), modo de ionización negativa. Se utilizó nitrógeno con un flujo de 9 L/min con nebulización a 40 psi, voltaje de electro spray de 3.0 kV, temperatura del nebulizador de 350 °C. En el cromatógrafo de líquidos se utilizó el mismo gradiente que el descrito en la cuantificación de estos compuestos. El volumen de inyección de muestra fue de 20 µL. Para la identificación de compuestos fenólicos, se consideró el tiempo de retención de los estándares y sus patrones de fragmentación.

3.3.10 Capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante se determinó por 2 métodos: 2,2–difetil-1-picril hidrazil (DPPH) y poder antioxidante para la reducción del ion hierro (FRAP), el análisis se realizó utilizando extractos lipofílicos e hidrofílicos de las muestras como reporta Corral-Aguayo *et al* (2008).

Extracto lipofílico

A 5 g de fruta fresca se le añadieron 20 mL de hexano:diclorometano (1:1v/v), y se homogeneizó por un minuto empleando un mezclador de tejidos Ultra Turrax modelo T25 IKA Works (Laborerchnik Inc.,Willmington, USA). Después se sonicó por 5 minutos en un sonicador Bransonic 2510 (Bransonic Ultrasonic Co., Danbury, CT) para luego centrifugar a 15000 g por 10 minutos a 4 °C, El sobrenadante fue recolectado y el residuo sometido al proceso descrito. Una vez colectados los sobrenadantes, estos se evaporaron a sequedad a 40 °C en un rotavapor Büchi R205. El residuo se resuspendió en 10 mL de acetona para su análisis.

Extracto hidrofílico

Al residuo obtenido después del extracto lipofílico se le agregaron 20 mL de una solución acetona–agua–ácido acético (70:29.5:0.5 v/v/v) empleando un mezclador de tejidos Ultra Turrax mod.T25 IKA Works (Laborerchnik Inc., Willmington, USA). Luego se sonicó por 5 minutos y después se centrifugó a 15000 g por 10 minutos y 4 °C, el sobrenadante se recolectó y el residuo fue sometido a una extracción adicional. Una vez juntos los sobrenadantes fueron analizados.

Método 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH).

Se preparó una disolución de DPPH en metanol, a una concentración de 100 μ M con 0.0048 g de reactivo DPPH en 200 mL de metanol. Posteriormente se tomaron 280 μ L de esta disolución y se mezclaron con 20 μ L de extracto, se midió la absorbancia a 515 nm en un espectrofotómetro MRX microplate reader (Dynex Technology, Chantilly, VA). Las mediciones fueron hechas a los 30 minutos de reposo en la oscuridad. Como control se tomaron 280 μ L de disolución de DPPH preparada como se explicó anteriormente más 20 μ L de metanol. Los resultados se expresaron como micromoles equivalentes trolox/100 g peso fresco, para lo cual se realizó una curva de calibración con ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (TROLOX) como estándar, las concentraciones utilizadas fueron 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 y 1 mg/mL (Corral-Aguayo *et al.*, 2008).

Método de poder antioxidante para la reducción del ion hierro (FRAP).

El reactivo FRAP se preparó como sigue: 25 mL de buffer de acetatos 300 mM (pH 3.6) más 5 mL de solución de 2, 4, 6-tripiridil-2-triazina (TPTZ) con una concentración de 10 mM en ácido clorhídrico 40 mM y 5 mL de cloruro de hierro 20 mM. El reactivo de FRAP se utilizó recién preparado. 30 μ L de muestra fueron mezclados con 270 μ L de solución FRAP en microplaca de 96 pozos y se dejó reposar por 30 minutos para luego ser leídas a 593 nm en un espectrofotómetro Dynex MRX. Como blanco se utilizó metanol. La curva de calibración fue hecha a partir de una solución stock de ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (TROLOX), las concentraciones utilizadas fueron 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 y 1 mg/mL, los resultados fueron expresados como micromoles equivalentes de trolox por 100 gramos de peso fresco (Corral-Aguayo *et al.*, 2008).

3.3.11 Determinación del contenido de ácidos grasos

Extracción.- La extracción de aceite se llevó a cabo usando el método de Folch (1957). Se pesaron 2 g de muestra liofilizada y se añadieron 10 mL de cloroformo-metanol (2:1). La mezcla se homogeneizó por un minuto utilizando un vórtex modelo M63215 (Thermoline, Dubeque, USA) y se sonicó por 10 minutos en un sonicador Bransonic 2510 (Bransonic Ultrasonic Co., Danbury,

CT). Se centrifugó a 10853 g por 10 minutos a 23 °C en una centrífuga Hermle Z323K (Wehingen, Germani), el sobrenadante obtenido se filtró en Whatman (#2) y al residuo se repitió los pasos anteriores. Se juntaron los sobrenadantes y se añadió 4 mL de 0.9% de cloruro de sodio (NaCl) en agua grado HPLC. Se homogeneizó durante un minuto y se centrifugó a 434.112 g por 5 minutos a 23 °C, se extrajo la fase inferior la cual se evaporó a 20 °C y baja presión en el rotavapor Büchi R205 hasta concentrar el aceite. El residuo se resuspendió en 1 mL de hexano.

Metilación de ácidos grasos.- Se colocaron 100 µL de aceite obtenido en un vial y se agregaron 3 mL de hidróxido de sodio (NaOH) con una concentración de 3.75 M en metanol. La mezcla se agitó y calentó a 100 °C por 25 minutos, empleando un baño de agua modelo 25 (Precisión Scientific, Chicago, USA). Se añadió 6 mL de ácido clorhídrico (HCl) con una concentración de 3.25 N en metanol, se mezcló y calentó a 80 °C por 10 minutos. Posteriormente se añadió 3.75 mL de hexano-terbutilmetileter (1:1), se homogeneizó y se dejó en reposo por 5 minutos. La fase superior fue recolectada, se agregó 9 mL de hidróxido de sodio con una concentración de 0.3 M en agua grado HPLC y se homogeneizó nuevamente. La mezcla fue colocada en congelador por 5 minutos para la separación de fases y se tomó la capa superior. El volumen final fue registrado para los cálculos (Paisley, 1997).

Cuantificación de ácidos grasos por cromatografía de gases.- Se inyectaron 20 µL de extracto en el cromatógrafo de gases marca Hewlett-Packard Serie 5890 II con detector de ionización de flama (FID). Se utilizó una columna capilar marca Hewlett Packard INNOWax, con dimensiones de 30 m de largo, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 µm de espesor de película. El programa de temperatura fue de 180 °C a 220 °C con un incremento de 1.5 °C/min, la temperatura del inyector fue de 250 °C, del detector de 270 °C, el flujo del gas acarreador fue de 1.8 mL/min de helio y el split ratio fue de 1:20. Para la integración de áreas de cada pico se utilizó el software GC ChemStation Rev. A.0803[847]. Para la identificación de los ácidos grasos, se consideraron los tiempos de retención de los estándares: ácido laurico, mirístico, palmítico, palmitoleico, esteárico, oleico, linoleico y linolenico, que

fueron corridos bajo las mismas condiciones que las muestras. Las mediciones de las muestras y estándares se hicieron por triplicado y los resultados fueron expresados en mg/100 g de peso seco (Hewlett-Packard, 1998).

3.3.12 Análisis estadístico.

Los resultados de cada análisis se presentaron como media \pm error estándar. En garambullo congelado la media fue resultado de tres observaciones (n=3) y en garambullo fresco la media fue resultado de nueve observaciones (n=9). Los resultados fueron sujetos a análisis de varianza (ANDEVA) para determinar si existieron diferencias significativas entre las medias para cada ensayo. La comparación de medias entre los tres estados de madurez se realizó con Tukey Kramer HSD y T-student para la comparación entre dos estados de madurez. Se utilizó el software JMP versión 5.0.1a, Copyright © 1989 - 2002 SAS Institute Inc.

Los resultados del análisis de varianza, estadístico de Tukey Kramer HSD y T-student, de cada parámetro evaluado en el fruto de garambullo, se muestran en los cuadros de resultados, con las letras F, P, HSD y t. Si el valor de la distribución F (F) es mayor a uno y si la probabilidad asociada a F ó t (P), presenta valor menor a 0.05, existen diferencias significativas entre medias. El valor de F fue considerado en la comparación de tres medias y el valor de t fue considerado en la comparación de dos medias. El valor estadístico de la prueba de tukey (HSD) y t-student (t) permitieron conocer entre que medias hay diferencias significativas, al restar el valor absoluto de la diferencia de dos medias a el valor estadístico de HSD ó t, se pudo observar valores positivos que indicaron diferencia significativa entre medias ó valores negativos que indicaron no diferencia significativa entre medias, las diferencias significativas entre medias fueron identificadas con letras a, b y c.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados que se presentan, se refieren a fruta cosechada en una primera temporada con un estado de madurez, la cual, fue congelada para su análisis y referida como congelada. Y fruta cosechada en una segunda temporada con dos estados de madurez (madurez I y II), la cual, fue analizada en forma fresca en los análisis de sólidos solubles totales, pH, humedad, color, peso promedio, capacidad antioxidante, contenido de betalaínas totales y carotenoides totales. Y se utilizó de forma liofilizada en el resto de los análisis.

4.1 Parámetros de calidad de la fruta y caracterización de los estados de madurez.

Los sólidos solubles totales, fueron medidos en fruta de garambullo fresco y congelado como se muestra en Cuadro 2. El garambullo con estado de madurez I (fruta roja), presentó el valor más bajo de sólidos solubles totales, seguido de la fruta de madurez II (fruta púrpura) y garambullo congelado, con valores de 5.2, 11.7 y 16.8 °Brix, respectivamente. Los resultados indicaron que el fruto congelado fue el fruto más maduro de las muestras analizadas, ya que los sólidos solubles totales representan la presencia de azúcares principalmente, los cuales tienden a incrementar con la maduración de las frutas (Gayosso-García Sancho *et al.*, 2010). En otras frutas de cactáceas en estado maduro como la pitahaya (*Hylocereus undatus*), los sólidos solubles totales fueron mayores al garambullo con un rango de 17 a 19.5 °Brix (Chang y Shu, 1997). En tuna, se encontró un rango de 8 a 14.7 °Brix (Chavez-Santoscoy *et al.*, 2009) y 13.3 °Brix (Corral-Aguayo *et al.*, 2008).

El estado de madurez I presentó el pH más bajo de 3.5, seguido del estado de madurez II con 3.6 y el garambullo congelado con 3.8. No se encontró diferencia significativa entre el pH de garambullo congelado y garambullo con estado de madurez II. Los valores bajos de pH representan la presencia de ácidos orgánicos, fenoles y aminoácidos, pero durante la maduración de frutas, el pH tiende a incrementar debido a que principalmente los ácidos orgánicos, fuente de iones hidrógeno, disminuyen con la maduración

(Gayosso-García Sancho *et al.*, 2010). En este estudio, el garambullo congelado y madurez II presentaron el pH más alto mostrando ser frutos de mayor madurez. El pH ácido encontrado en garambullo puede contribuir a su capacidad antibacteriana ya que Puupponen-Pimiä *et al.* (2005), mencionan que el pH ácido en frutas y hortalizas cambia la permeabilidad de la membrana celular de bacterias, interfiriendo con procesos enzimáticos y con ello su reproducción. El pH en garambullo fue más ácido que el de otras frutas de cactáceas como las tunas que reportan un pH de 4.3 a 5.4 (Chavez-Santoscoy *et al.*, 2009).

El peso promedio de la fruta de garambullo se encontró entre 1.3 y 1.4 g como se muestra en Cuadro 2. El peso se evaluó solo en fruta fresca y no se encontró diferencia significativa entre el estado de madurez I y el estado de madurez II. La humedad en garambullo se encontró entre 75.5% y 79.1%, presentándose diferencias significativas entre los tres estados de madurez evaluados. El garambullo congelado presentó el mayor contenido de humedad (79.1%), lo cual, pudo deberse a una mayor cantidad de lluvia durante la primera temporada de colecta a diferencia de la segunda temporada de los estados de madurez I y II. La fruta fresca con estado de madurez I presentó un mayor contenido de humedad (77.5%) comparado con el estado de madurez II (75.5%), observándose una pérdida de humedad conforme avanzó la maduración.

El garambullo congelado presentó una mayor intensidad de color que el garambullo fresco, ya que el parámetro de saturación (C^*) fue mayor en fruta congelada con un valor promedio de 16.1, mientras que en garambullo de madurez I (C^*) fue de 10.3 y en madurez II (C^*) fue de 9.9. Entre los estados de madurez de fruta fresca, los valores de (C^*) no presentaron diferencias significativas. Se observó que el garambullo congelado presentó una coloración más oscura comparada con la fruta fresca, ya que el valor promedio de brillantes (L^*) en garambullo congelado fue de 17.0, seguido de garambullo de madurez II con 34.8 y madurez I con 36.2, los valores promedio de (L^*) no presentaron diferencias significativas entre los estados de madurez en fresco.

El parámetro (a^*) presentó diferencias significativas entre los tres estados de madurez. En garambullo congelado, fue mayor el valor promedio de (a^*) y disminuyó en garambullo fresco de madurez II, seguido de madurez I con valores promedio de (a^*) de 15.1, 11.2 y 9.8, respectivamente. El parámetro (b^*) fue mayor en garambullo congelado (-4.76) mientras que en garambullo fresco disminuyó y no presentó diferencias significativas entre madurez I (-3.15) y madurez II (-3.2) como se muestra en Cuadro 2. En el ángulo de color (h°) no se observó diferencias significativas entre garambullo fresco y congelado, se encontraron valores promedios de (h°) de 340.74° a 341.80° en la región rojo-púrpura como se muestra en Cuadro 2. En general, se observó un incremento en la intensidad del color en garambullo congelado, por un aumento en los valores (a^*), (b^*) y (C^*) y una disminución en el valor de (L^*). En fruta fresca el garambullo con estado de madurez II presentó mayor coloración roja por un aumento en el valor de (a^*).

Los resultados obtenidos en sólidos solubles totales, pH y parámetros de color en garambullo congelado, indican una mayor madurez que la fruta colectada en la segunda temporada. Entre el estado de madurez I y II, la diferencia en sólidos solubles totales, pH, humedad y valores de a^* , indican una mayor madurez en el estado II.

Cuadro 2. Sólidos solubles totales (°Brix), pH, peso, humedad y color, en dos estados de madurez de garambullo fresco y un estado de madurez de garambullo congelado.

	Temporada 1		Temporada 2	F	P	HSD	t
	Madurez I	Madurez II	Congelado				
SST (°Brix)	5.2 ± 0.8c	11.7 ± 0.4b	16.8 ± 0.1a	60.8	0.0001	2.6	NA
pH	3.47 ± 0.04b	3.63 ± 0.03a	3.76 ± 0.02a	8.8	0.0022	2.6	NA
Peso (g)	1.3 ± 0.04a	1.4 ± 0.05a	NE	NA	0.25	NA	-1.2
Humedad (%)	77.5 ± 0.3b	75.5 ± 0.2c	79.1 ± 0.3a	24.8	0.0001	2.6	NA
Color							
Saturación (C*)	10.3 ± 0.2b	9.9 ± 0.3b	16.1 ± 0.4a	41.2	0.0001	2.5	NA
Brillantes (L*)	36.2 ± 2.6a	34.9 ± 2.3a	17.01 ± 0.45b	5.5	0.0096	2.5	NA
Ángulo de color (h*)	340.7 ± 0.5a	341.7 ± 0.9a	341.8 ± 0.6a	0.5	0.642	2.5	NA
(a*)	9.8 ± 0.27c	11.2 ± 0.31b	15.1 ± 0.53a	60.1	0.0001	2.5	NA
(b*)	-3.2 ± 0.05a	-3.4 ± 0.08a	-4.8 ± 0.13b	44.6	0.0001	2.5	NA

Los resultados se refieren a nueve observaciones en garambullo fresco y tres observaciones en garambullo congelado ± error estándar; NE: No evaluado; NA: No aplica; resultados con diferente letra son significativamente diferentes con $\alpha=0.05$.

4.2 Contenido de betalaínas.

En los tres estados de madurez del fruto de garambullo, el contenido de betacianinas fue mayor que el contenido de betaxantinas. Se encontró la mayor concentración de betaxantinas en garambullo congelado, seguido de garambullo fresco de madurez II y madurez I, con concentraciones de 9.7, 8.1 y 4.3 mg/100 g peso fresco (pf), respectivamente, como se muestra en el Cuadro 3. La fruta con madurez II y congelado no presentaron diferencias significativas mientras que el estado de madurez I presentó diferencia significativa.

El contenido de betaxantinas en garambullo congelado y fresco, resultó mayor que reportes en tuna Cardón, Pelón y Moradillo (6.6, 4.6 y 3.3 mg/100g pf, respectivamente), mientras que las tunas cv. Púrpura y Tapón (14.4 y 18.9 mg/100g pf, respectivamente) presentaron mayor cantidad de betaxantinas que el garambullo (Stintzing *et al.*, 2005; Chavez-Santoscoy *et al.*, 2009). El garambullo congelado presentó la mayor concentración de betacianinas, seguido del garambullo fresco de madurez II y madurez I con concentraciones de 32.30, 22.58 y 9.53 mg/100 g pf, respectivamente. El contenido de betacianinas en garambullo congelado y fresco, resultó mayor que el contenido en tunas cv. Purpura y cv. Rojo con 28.79 y 6.47 mg/100 g pf, respectivamente (Stintzing *et al.*, 2005), así como en tuna Tapón, Rastrero, Cardón, Pelón y Moradillo con valores de 30.1, 15.3, 11.2, 5.4 y 8.9 mg/100 g pf, respectivamente (Chavez-Santoscoy *et al.*, 2009).

En garambullo congelado se encontró la más alta concentración de betalaínas totales, seguido del garambullo fresco de madurez II y madurez I (42.0, 23.3 y 14.3 mg/100 g pf, respectivamente) como se muestra en Cuadro 3. El contenido de betalaínas totales en garambullo congelado y fresco evaluado en este trabajo presentó concentraciones mayores a 2.30 mg/100g pf que reporta Reynoso *et al* (1997) en fruta de garambullo. La diferencia pudo deberse a la solución extractora utilizada, ya que Reynoso *et al* (1997) utilizó metanol al 50% y en este estudio se utilizó agua destilada al 100% que reporta mejores resultados según estudios previos de betalaínas en tuna (Azeredo, 2009; Castellanos-Santiago y Yahia, 2008; Georgiev *et al.*, 2008). Además, la

fruta de garambullo fue conservada en refrigeración inmediatamente después de ser cosechada y el análisis de betalaínas se realizó el mismo día de colecta con tejido fresco. Las frutas fueron protegidas de la luz durante su limpieza y análisis, lo cual, pudo evitar la degradación de estos pigmentos.

El contenido de betalaínas totales en garambullo resultó alto comparado con algunos cultivares de tuna (*Opuntia ficus-indica*) cv. Roja y cv. Naranja con 11.4 y 9.1 mg/100 g pf respectivamente que muestra Stintzing *et al* (2005). Otros cultivares de tuna con menor cantidad de betalaínas totales que el garambullo, fueron las de (*Opuntia undulada*) cv. Griff y (*Opuntia ficus-indica*) con 18.5 y 14.5 mg/100 g pf, respectivamente, que muestra Fernández-López *et al* (2002). Sin embargo, el contenido de betalaínas en garambullo resultó de menor concentración comparado con otras variedades de tuna como cv. Púrpura (Stintzing *et al.*, 2005), (*Opuntia stricta*) cv. Haw con 43.2 y 70.0 mg/100 g pf (Fernández-López *et al.*, 2002) y cv. Tapón con 49.0 mg/100 g pf (Chavez-Santoscoy *et al.*, 2009). Así como, comparado con el betabel que contiene la mayor cantidad de betalaínas de 40 a 60 mg/100 g pf (Fernández-López *et al.*, 2002).

La baja concentración de betaxantinas encontrada en garambullo, fue debida a que estos compuestos son característicos de frutos con coloraciones amarillo-naranja (Azeredo, 2009; Georgiev *et al.*, 2008), mientras que el mayor contenido de betacianinas, correspondió a la mayor intensidad de color rojo-púrpura que mostró la fruta de acuerdo a los parámetros C^* , L^* , a^* y b^* . Los resultados obtenidos concuerdan con Stintzing *et al* (2005) que reporta un incremento en el parámetro L^* debido a un alto contenido de betaxantinas y decrece cuando las betacianinas predominan, mientras que el parámetro C^* tiende a incrementar con el alto contenido de betalaínas totales. El contenido de betaxantinas, betacianinas y por consiguiente, el contenido de betalaínas totales, incrementó conforme avanzó la maduración. El contenido de estos pigmentos fue mayor en el garambullo cosechado en la primera temporada y no se observó efecto negativo en el contenido de betalaínas por la congelación de la fruta.

Cuadro 3. Contenido de betaxantinas^{*}, betacianinas^{**} y betalaínas totales, medidas por espectrofotometría en dos estados de madurez de garambullo fresco y un estado de madurez de garambullo congelado.

	Temporada 1		Temporada 2		F	P	HSD		
	Madurez I (mg/100 g pf)	%	Madurez II (mg/100 g pf)	%				Congelado (mg/100 g pf)	%
Betaxantinas (Bx)	4.3 ± 0.4b	33.3	8.1 ± 0.5a	26.4	9.7 ± 0.01a	23.1	9.01	0.0019	2.6
Betacianinas (Bc)	9.5 ± 1.2c	66.7	22.6 ± 1.5b	73.6	32.3 ± 0.1a	76.9	25.5	0.0001	2.6
Betalaínas totales (Bx +Bc)	14.3 ± 1.8c	100	23.3 ± 2.0b	100	42.02 ± 0.02a	100	30.7	0.0001	2.6

^{*}: Extracto medido a una longitud de onda de 482 nm; ^{**}: extracto medido a una longitud de onda de 535 nm; los resultados se refieren a nueve observaciones en garambullo fresco y tres observaciones en garambullo congelado ± error estándar; pf: peso fresco; resultados con diferente letra son significativamente diferentes $\alpha=0.05$.

Identificación de betalaínas.

En la fruta de garambullo, se identificaron por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectroscopía de masas (CLAR-EM), cinco betacianinas y cuatro betaxantinas. En la Figura 10, se muestran los cromatogramas por CLAR de las betaxantinas tentativamente asignadas, las cuales fueron monitoreadas a 535 nm, los picos en los cromatogramas correspondieron a los siguientes compuestos: indicaxantina (1), derivado de histidina (2), muscaaurina (3) y fenilalanina (4). En figura 11, se muestran los cromatogramas por CLAR de las betacianinas tentativamente asignadas, las cuales fueron monitoreadas a 482 nm, los picos en los cromatogramas corresponden a los compuestos de betanina (I), isobetanina(I'), filocactina (II), cis-isomero de gomfrenina II (III) e isogomfrenina (IV).

El perfil del contenido de betalaínas en garambullo, se obtuvo con base a la abundancia relativa, en espectroscopía de masas con interfase electro spray de ionización positiva (IEE⁺-EM) (Castellanos-Santiago y Yahia, 2008) como se muestra en Cuadro 4. De las betaxantinas, el principal compuesto fue la betaxantina con el aminoácido fenilalanina, tanto el garambullo congelado como en garambullo fresco, presentaron abundancia similar en los espectros de masas. La betaxantina con el aminoácido histidina (muscaaurina) presentó mayor abundancia en el garambullo fresco con estado de madurez II, seguido del garambullo congelado y garambullo fresco con madurez I. El derivado de histidina en garambullo congelado y garambullo fresco con madurez II presentaron abundancias similares de este compuesto. La betaxantina con aminoácido prolina (indicaxantina) fue detectado en los tres estados de madurez del garambullo, el cual, ha sido reportado como pigmento típico de los frutos rojo-púrpura (Stintzing *et al.*, 2005; Castellanos-Santiago y Yahia, 2008).

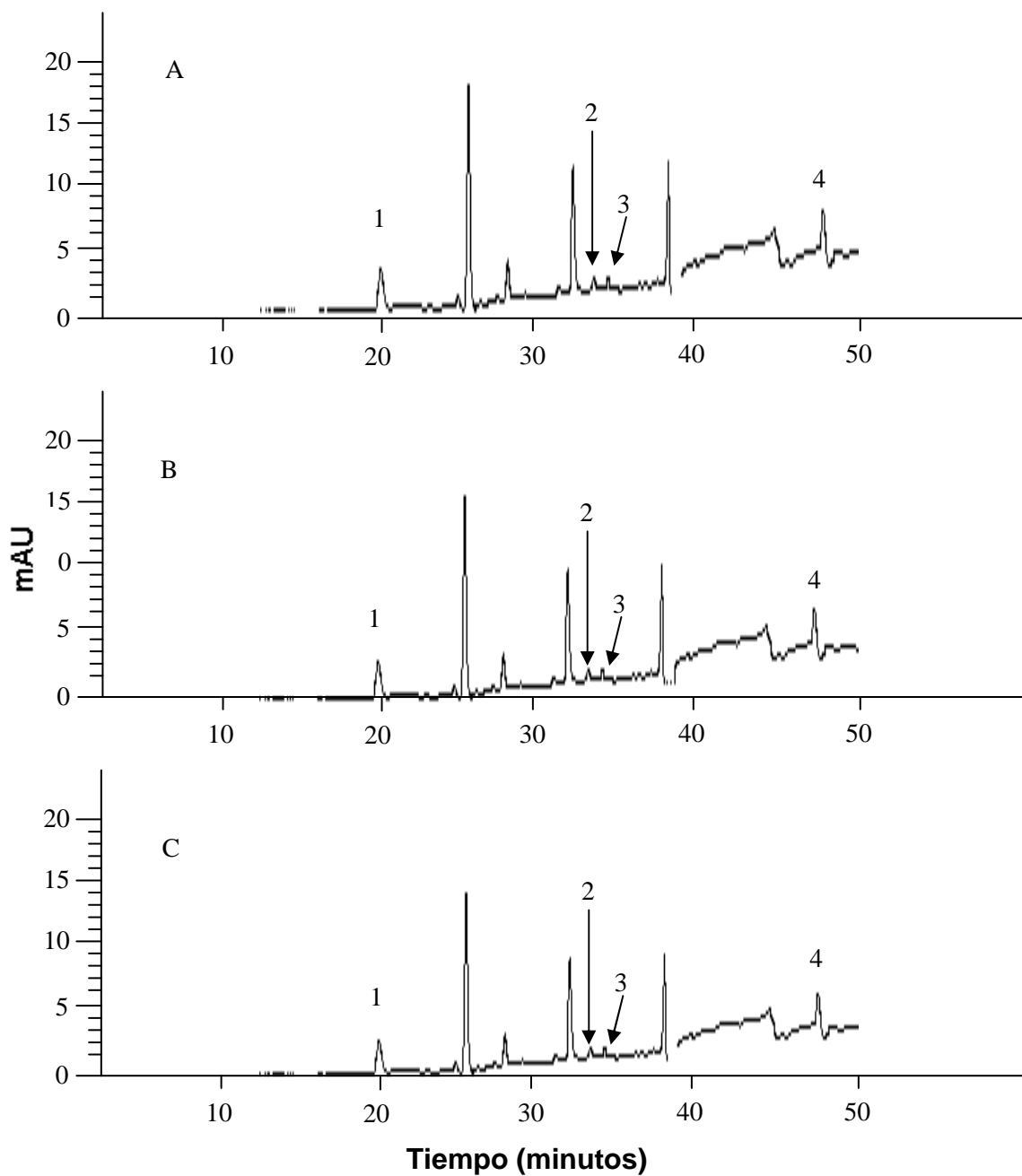


Figura 10. Betaxantinas identificadas mediante cromatografía líquida de alta resolución a 482 nm; (1) prolina, (2) derivado de histidina, (3) histidina, (4) fenilalanina; cromatograma de garambullo congelado (A), garambullo con estado de madurez II (B) y garambullo con estado de madurez I (C); identificación de picos se muestra en Cuadro 4.

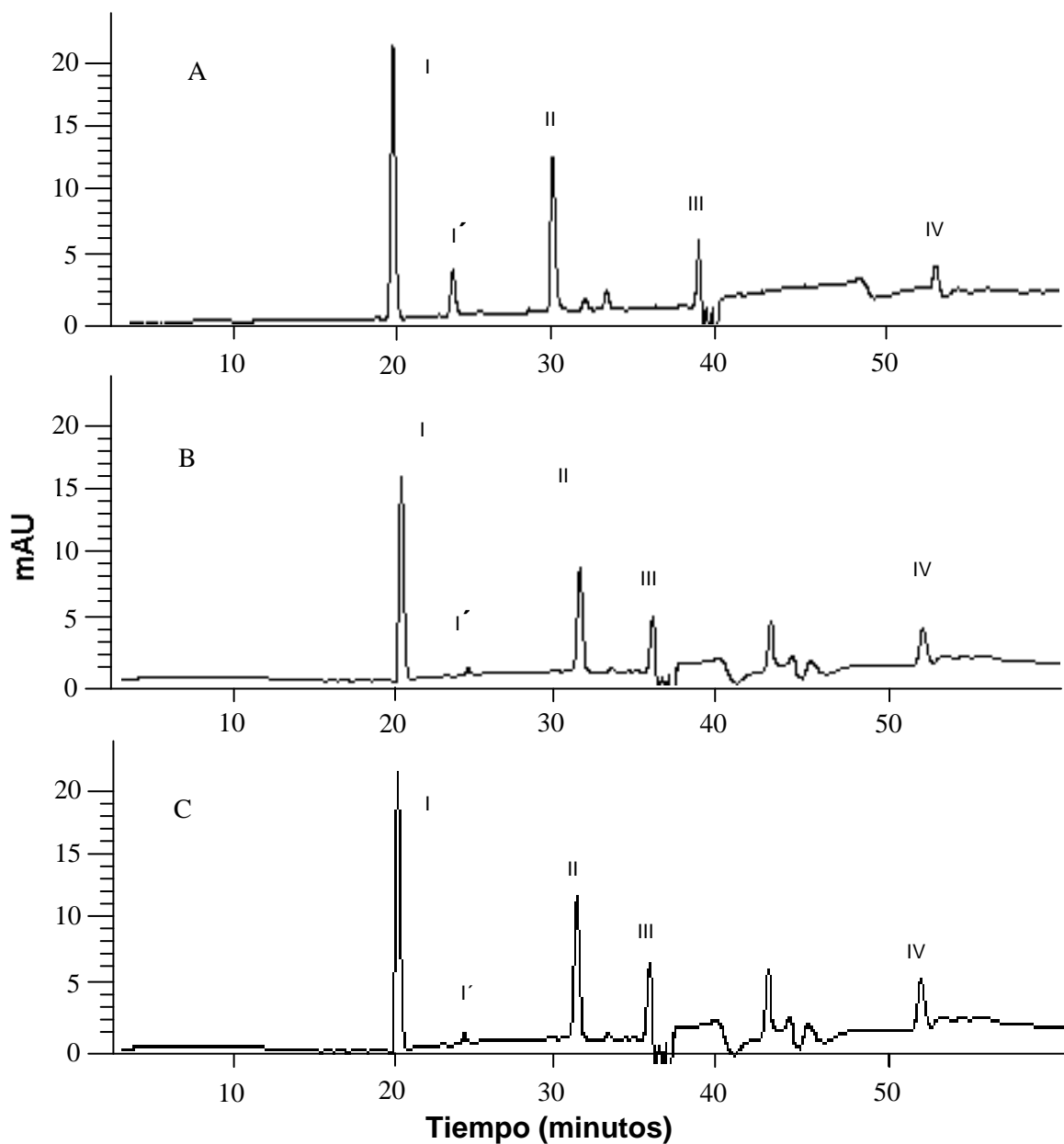


Figura 11. Betacianinas identificadas mediante cromatografía líquida de alta resolución a 535 nm; (I) betanina, (I') iso-betanina, (II) filocactina, (III) *cis*-isomero de gomfrenina II, (IV) Isobetanidina-6-O-(6'-O-*trans*-feruloil)- β -glucósido [isogomfrenina]; en garambullo congelado (A), garambullo con estado de madurez II (B) y garambullo con estado de madurez I (C); identificación de picos se muestra en Cuadro 4.

Las betaxantinas en garambullo, fueron identificadas por los tiempos de retención y patrones de fragmentación de estándares sintetizados. La betaxantina con aminoácido prolina (indicaxantina), se identificó por su espectro de masas (Figura 12) con el ion molecular $[M+H]^+$ m/z 309 que se ha identificado en tuna (Fernández-López *et al.*, 2002; Stintzing *et al.*, 2002; Stintzing *et al.*, 2005; Castellanos-Santiago y Yahia, 2008), en betabel amarillo cv. Bejo zaden (Stintzing *et al.*, 2002) y flores de *Gomphrena globosa* y *Bougainvillea* sp. (Kugler *et al.*, 2007) como se muestra en Cuadro 4. La betaxantina con aminoácido histidina (muscaaurina) se identificó con el ion $[M+H]^+$ m/z 349 (Stintzing *et al.*, 2005; Kugler *et al.*, 2007; Castellanos-Santiago y Yahia, 2008). Y se identificó un isómero de histidina con el ion $[M+H]^+$ m/z 305 (Castellanos-Santiago y Yahia, 2008). La betaxantina fenilalanina se identificó con el ion molecular $[M+H]^+$ m/z 359 (Stintzing *et al.*, 2002; Kugler *et al.*, 2007; Castellanos-Santiago y Yahia, 2008). En Figura 12 se muestra la intensidad de los iones y fragmentos de las betaxantinas encontradas en garambullo.

Las betacianinas fueron identificadas por los patrones de fragmentación en estudios previos de extractos rojo-púrpura de betabel, tuna y flores (Kugler *et al.*, 2007). La betanina y su isómero isobetanina, fue identificada por su espectro de masas característico, con los iones moleculares protonados $[M+H]^+$ m/z 551 y el ion secundario que corresponde a $[\text{betanidina}+H]^+$ m/z 389 (Kujala *et al.*, 2000; Fernández-López *et al.*, 2002; Stintzing *et al.*, 2002; Stintzing *et al.*, 2005; Kugler *et al.*, 2007; Castellanos-Santiago y Yahia, 2008). El patrón de fragmentación del isobetanina presentó un ión característico $[M+H]^+$ m/z 353 que también ha sido encontrado en extractos de tuna (Fernández-López *et al.*, 2002). La betanina fue identificada en los tres estados de madurez del garambullo, mientras que la isobetanina sólo se identificó en el garambullo congelado. La filocactina (6'-O-malonilbetanina) compuesto típico de cactácea (Reynoso *et al.*, 1997; Stintzing *et al.*, 2005), fue identificada en los tres estados de madurez de garambullo con una masa molecular protonada de $[M+H]^+$ m/z 637 según Stintzing *et al.* (2005).

Cuadro 4. Betalaínas identificadas en dos estados de madurez de garambullo fresco y un estado de madurez de garambullo congelado, mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectroscopía de masas, con interfase electro spray de ionización positiva (CLAR-IEE⁺-EM).

Pico*	Nombre común	Aminoácido	λ	$[M+H]^+$ <i>m/z</i> (fragmentos de iones)	<i>T_r</i> (min)	Temporada 1		Temporada 2
						Madurez I	Madurez II	
1	Indicaxanthin	Prolina	482	309 (494, 336, 290, 276, 217, 201, 199, 194, 157, 155, 141, 139, 123, 117)	23.9	++	+	+
2	No conocido	Derivado de histidina	482	305 (637, 471, 351)	28.9	+	++	++
3	Muscaaurina	Histidina	482	349 (455, 409, 365, 349, 284, 201, 194, 149, 141, 125, 107)	30.1	+	+++	++
4	No conocido	Fenilalanina	482	359 (753, 701, 679, 359, 350, 314, 100)	48.6	+++	+++	+++
I	Betanina		535	551 (389, 276, 201, 199, 141, 139, 123)	17.2	++	+++	++
I'	Iso-betanina		535	551 (389, 353, 243, 141, 125)	28.6	-	-	++
II	Filocactina		535	637 (638, 593, 284, 243, 201, 141, 125, 123, 69)	29.2	+++	+++	+++
III	<i>Cis</i> -isomero de gomfrenina II		535	697 (541, 503, 495, 481, 419, 291, 284, 257, 235, 132, 117)	31.0	++	++	++
IV	Isobetanidina-6- <i>O</i> -(6'- <i>O</i> - <i>trans</i> -feruloyl)- β -glucosido [isogomfrenina]		535	727 (859, 815, 771, 639, 595, 551, 284)	58.8	+++	+++	+++

λ : longitud de onda; nm: nanómetros; *T_r*: tiempo de retención en minutos; (+++) presencia en altas cantidades; (++): presencia en cantidades moderadas; (+): presencia en bajas cantidades; (-): no cuantificable o no se obtuvieron señales de la masa; * asignación de picos se refiere a las Figuras 10 y Figura 11.

En los tres estados de madurez de la fruta de garambullo fueron identificadas la betacianinas isogomfrenina y *cis*-isómero de gomfrenina II. La betacianina isobetanidina-6-*O*-(6'-*O*-*trans*-feruloil)- β -glucósido [isogomfrenina] presentó el ión molecular $[M+H]^+$ m/z 727 y la betacianina *cis*-isómero de gomfrenina II presentó el ión molecular $[M+H]^+$ m/z 697 que se han encontrado en extractos rojo-púrpura de flores de *Gomphrena globosa* y *Bougainvillea* sp. (Kugler *et al.*, 2007). En Figura 13 se muestra los patrones de fragmentación y la intensidad obtenida de las betacianinas encontradas en la fruta de garambullo.

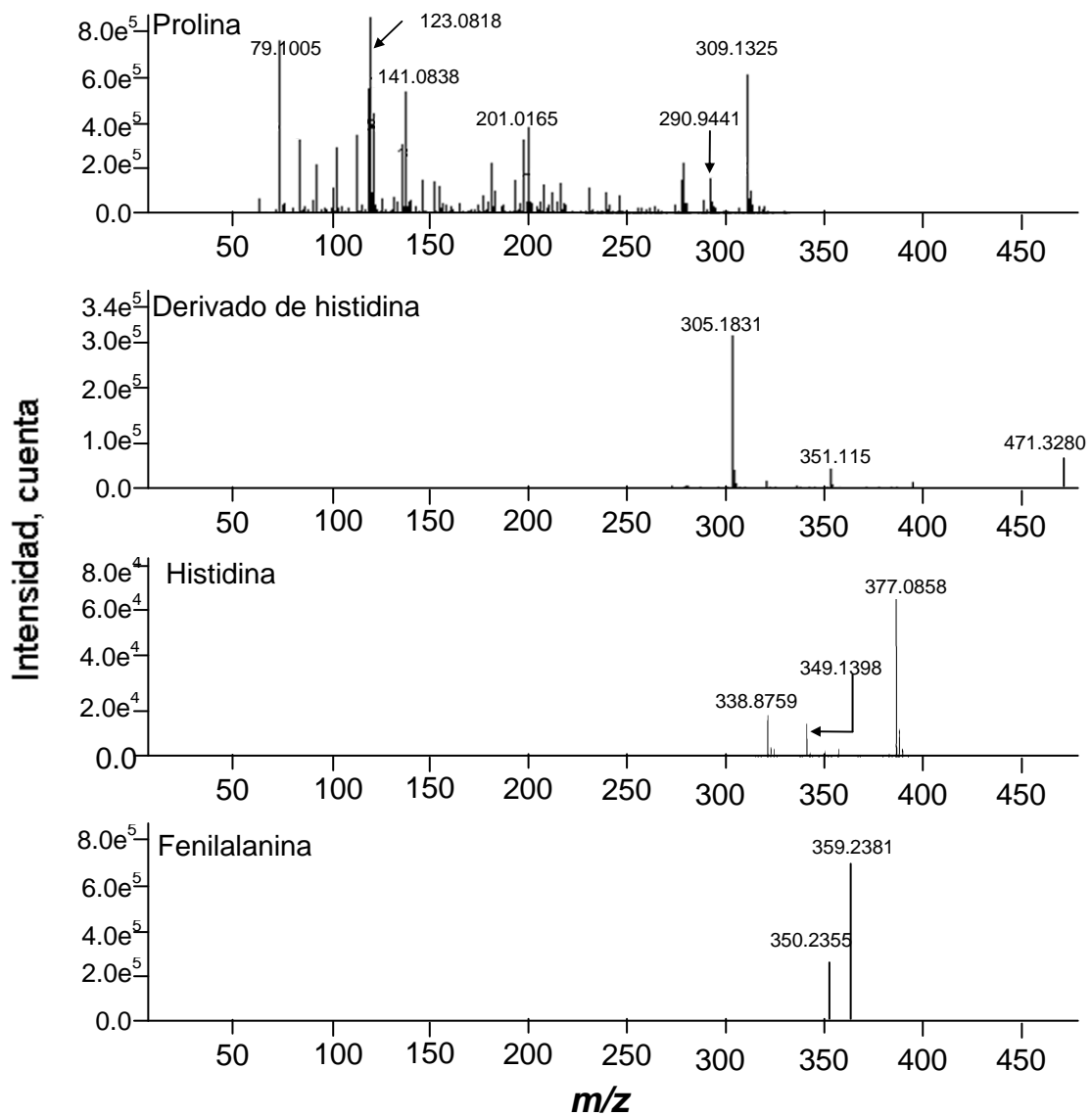


Figura 12. Patrones de fragmentación de betaxantinas en el fruto de garambullo por espectroscopía de masas, con interfase electro spray de ionización positiva (IEE⁺-EM).

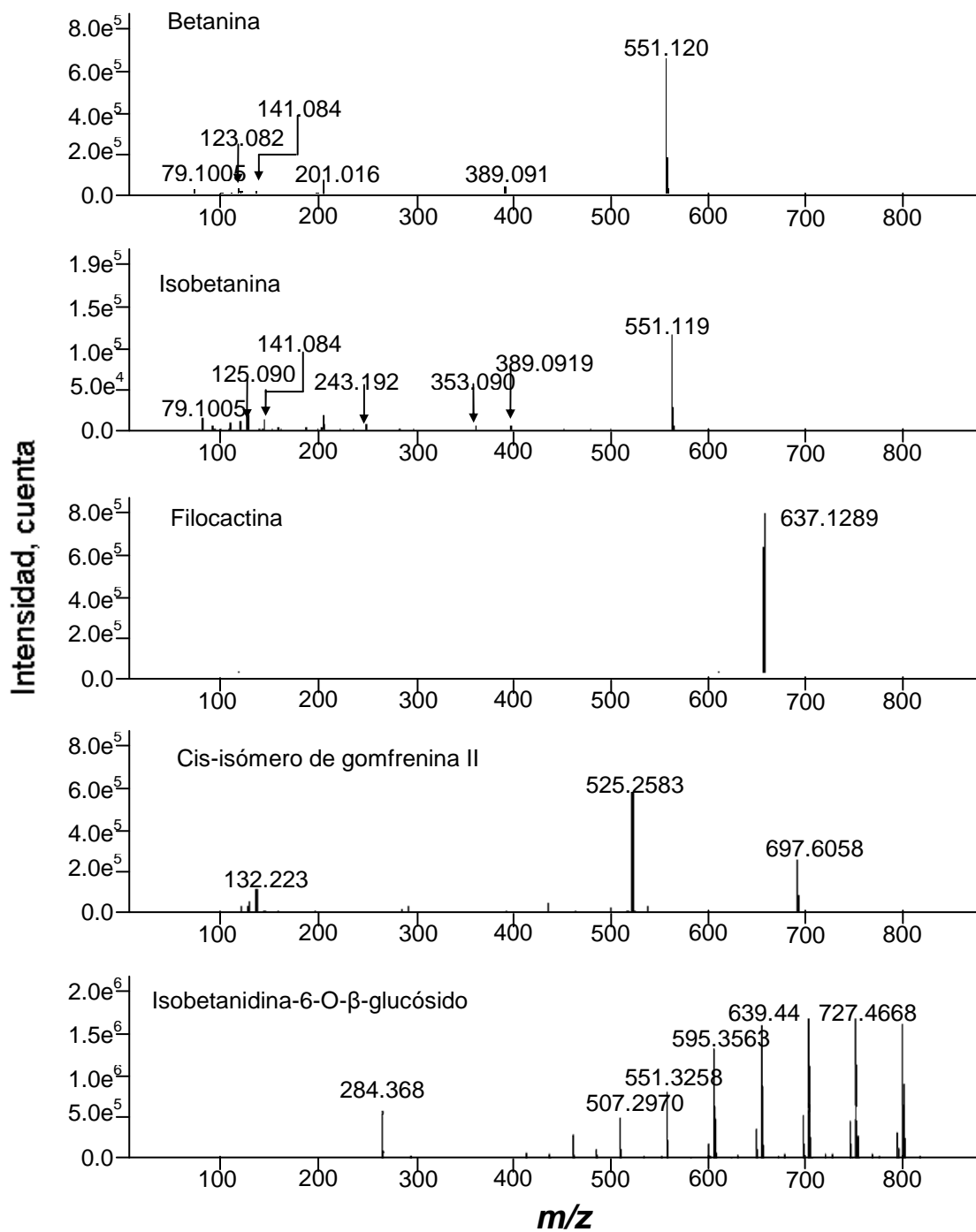


Figura 13. Patrones de fragmentación de betacianinas en fruto de garambullo por espectroscopía de masas, con interfase electro spray de ionización positiva (IEE⁺-EM).

4.3 Contenido de carotenoides.

El contenido de carotenoides totales en garambullo con madurez I, madurez II y congelado fue de 4.3, 2.4 y 1.1 mg/100 g peso fresco (pf) de β -caroteno, respectivamente, como se muestra en Cuadro 5. Los carotenos totales en la fruta de garambullo, presentaron menor concentración que lo que se ha reportado en tuna cv. Naranjona con 85.0 mg/100 g pf (Hernández-Pérez *et al.*, 2005), zanahoria (*Daucus carota*) cv. Bangor y papaya (*Carica papaya*) cv. Maradol con 40.9 y 13.9 mg/100 g pf, respectivamente (Ramírez-Padilla *et al.*, 2009). No obstante, la concentración de carotenos totales en garambullo, fue superior que el contenido en fresa (*Fragaria ananassa*) cv. Sweet charlie y tuna cv. Reina con 0.04 y 0.053 mg/100 g pf (Corral-Aguayo *et al.*, 2008). La fruta de garambullo con madurez I, presentó la concentración más alta de carotenoides totales y se observó una disminución en la concentración de carotenoides totales conforme avanzó el estado de madurez de la fruta. En general, se encontró un bajo contenido de carotenoides totales en garambullo y ninguno de los estándares de β -caroteno, licopeno y luteína, analizados por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) fueron encontrados.

Cuadro 5. Contenido de carotenoides totales, en dos estados de madurez de garambullo fresco y un estado de madurez de garambullo congelado.

	Temporada 1		Temporada 2	F	P	HSD
	Madurez I	Madurez II	Congelado			
Carotenoides totales (mg/100g pf)	4.34 \pm 0.30a	2.44 \pm 0.26b	1.05 \pm 0.01c	24.7	0.0001	2.55

Mediciones mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 450 nm; los resultados se refieren a nueve observaciones en garambullo fresco y tres observaciones en garambullo congelado \pm error estándar; pf: peso fresco; resultados con diferente letra son significativamente diferentes $\alpha=0.05$.

Identificación de carotenoides por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) acoplada a espectroscopía de masas con interfase de ionización química a presión atmosférica con polaridad positiva (APCI⁺-EM)

Análisis de extracto lipofílico en garambullo congelado

El extracto lipofílico de la fruta de garambullo, presentó 13 picos (Figura 14) con masas moleculares correspondientes tentativamente a ésteres de violaxantina. En el Cuadro 6 se muestran los iones moleculares $[M+H]^+$ m/z y tiempos de retención de los posibles carotenoides en garambullo congelado. El espectro de masas en los picos 1 y 2 fue asignado tentativamente a éster de 9-*cis*-violaxantina, donde se presentó el ión molecular $[M+H]^+$ m/z 705 (Ornelas-Paz *et al.*, 2007) y fragmentos de la descarboxilación de la molécula en $[M+H-44]^+$ m/z 661, la pérdida de una molécula de ácido butírico presentó el ión $[M+H-88]^+$ m/z 617 (Ornelas-Paz *et al.*, 2008), la pérdida de dos ácidos butíricos (AB) presentó el ión $[M+H-AB_1-AB_2]^+$ m/z 529 y la pérdida de grupos epóxido, presentó el ión $[M+H-80-80]^+$ m/z 441 (Azevedo-Meleiro y Rodriguez-Amaya, 2004). El éster de *all-trans*-violaxantina en pico 3 presentó el ion molecular $[M+H]^+$ m/z 663 que presentó fragmentos de la pérdida de agua en $[M+H-18]^+$ m/z 619 (Breithaupt y Bamedi, 2002; Ornelas-Paz *et al.*, 2008) y un fragmento de la pérdida de un epóxido y una molécula de agua $[M+H-80-18]^+$ m/z 601.

En los picos 4, 7, 8 y 11 el ion $[M+H]^+$ m/z 881 fue asignado de manera tentativa a éster de *all-trans*-violaxantina (Ornelas-Paz *et al.*, 2007) donde se observó el fragmento $[M+H-280]^+$ m/z 601 que indicó la pérdida del ácido graso linoléico (Breithaupt y Bamedi, 2002). El fragmento $[M+H-278]^+$ m/z 879 en los picos 4, 6 y 7 representó la pérdida del ácido linolénico. Los picos 4, 5, 6, 7, 9 y 13 presentaron el fragmento $[M+H]$ m/z 600 que correspondió a violaxantina desprotonada (C₄₀H₅₆O₄) (Azevedo-Meleiro y Rodriguez-Amaya, 2004). En el pico 6 y 7 se observó un éster de violaxantina por el ión molecular $[M+H]^+$ m/z 903 (Ornelas-Paz *et al.*, 2007) que al perder ácido estéarico, un grupo epóxido

y agua, formó el ión $[M+H-284-80-18] m/z$ 601. En el pico 6, se observó el ión molecular $[M+H]^+ m/z$ 901 que perdió ácido oléico, un grupo epóxido y agua, formando el ión $[M+H-282-80-18] m/z$ 601.

En el pico 7, 8, 11, 12 se encontraron los iones $[M+H]^+ m/z$, 885 y 883 (Ornelas–Paz *et al.*, 2007), que al perder ácido estearico y oléico respectivamente, se presentó el ión $[violaxantina+H]^+ m/z$ 601. En pico 9 y pico 10 se encontró el ión m/z 857 que al perder ácido palmitico presentó el ión $[M+H-256] m/z$ 601. En el pico 12 se asignó a éster *all-trans*-violaxantina por la presencia de los iones $[M+H]^+ m/z$ 909 y al perder ácido mirístico, se presentó el ión $[violaxantina+H]^+ m/z$ 601. Los posibles carotenoides identificados en garambullo congelado en su extracto lipofílico fueron esteres de violaxantina, los cuales presentaron grupos epoxidos, ácido butirico y ácidos grasos como el esteárico, palmítico, mirístico, linoleico, linolénico y oléico. El ion $[violaxantina+H]^+ m/z$ 601 fue encontrado de forma repetida en la mayoría de los picos identificados, lo cual, pudo ser debido al rompimiento de las moléculas de los distintos ésteres de violaxantina encontrados. La identificación concluyente de los carotenoides en garambullo puede ser lograda mediante el uso de los tiempos de retención, espectro visible y espectro de masas de estándares autenticos, así como el uso de espectros de absorción ($\lambda_{máximas}$) y pruebas con reacciones químicas (Azevedo-Meleiro y Rodriguez-Amaya, 2004).

Cuadro 6. Identificación de posibles carotenoides en extracto lipofílico de garambullo congelado, mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectroscopía de masas, con interfase de ionización química a presión atmosférica, con polaridad positiva (CLAR-APCI⁺-EM).

Pico*	T_r (min)	λ (nm)	APCI⁺(m/z)	Posible compuesto
1	2.7	450 y 470	705 (661, 617, 529, 441)	Ester 9- <i>cis</i> -violaxantina
2	2.4	450 y 470	705 (661, 617, 529, 441)	Ester 9- <i>cis</i> -violaxantina
3	9.9	450 y 470	663 (619, 601, 409, 206)	<i>Ester trans</i> -violaxantina
4	14.3	450 y 470	881 (879, 601, 600)	Ester <i>trans</i> -violaxantina
5	16.3	450 y 470	899 (879, 601, 600)	<i>Ester trans</i> -violaxantina
6	16.5	450 y 470	903 (901, 879, 601, 600)	<i>Ester trans</i> -violaxantina
7	17.5	450 y 470	903 (883, 881, 879, 601, 600)	<i>Ester trans</i> -violaxantina
8	18.8	450 y 470	885 (883, 881, 601)	Ester <i>trans</i> -violaxantina
9	19.9	450 y 470	857 (601, 600)	<i>Ester trans</i> -violaxantina
10	20.8	450 y 470	879 (857, 601)	<i>Ester trans</i> -violaxantina
11	22.1	450 y 470	885 (883, 881, 601)	Ester 9- <i>cis</i> -violaxantina
12	23.1	450 y 470	907 (885, 601,)	Ester <i>trans</i> -violaxantina
13	25.7	450 y 470	937 (881, 601, 600)	Ester 9- <i>cis</i> -violaxantina

*Pico: la asignación de picos se refiere a la figura 14; Tr: tiempo de retención; λ: longitud de onda; m/z: masa del compuesto.

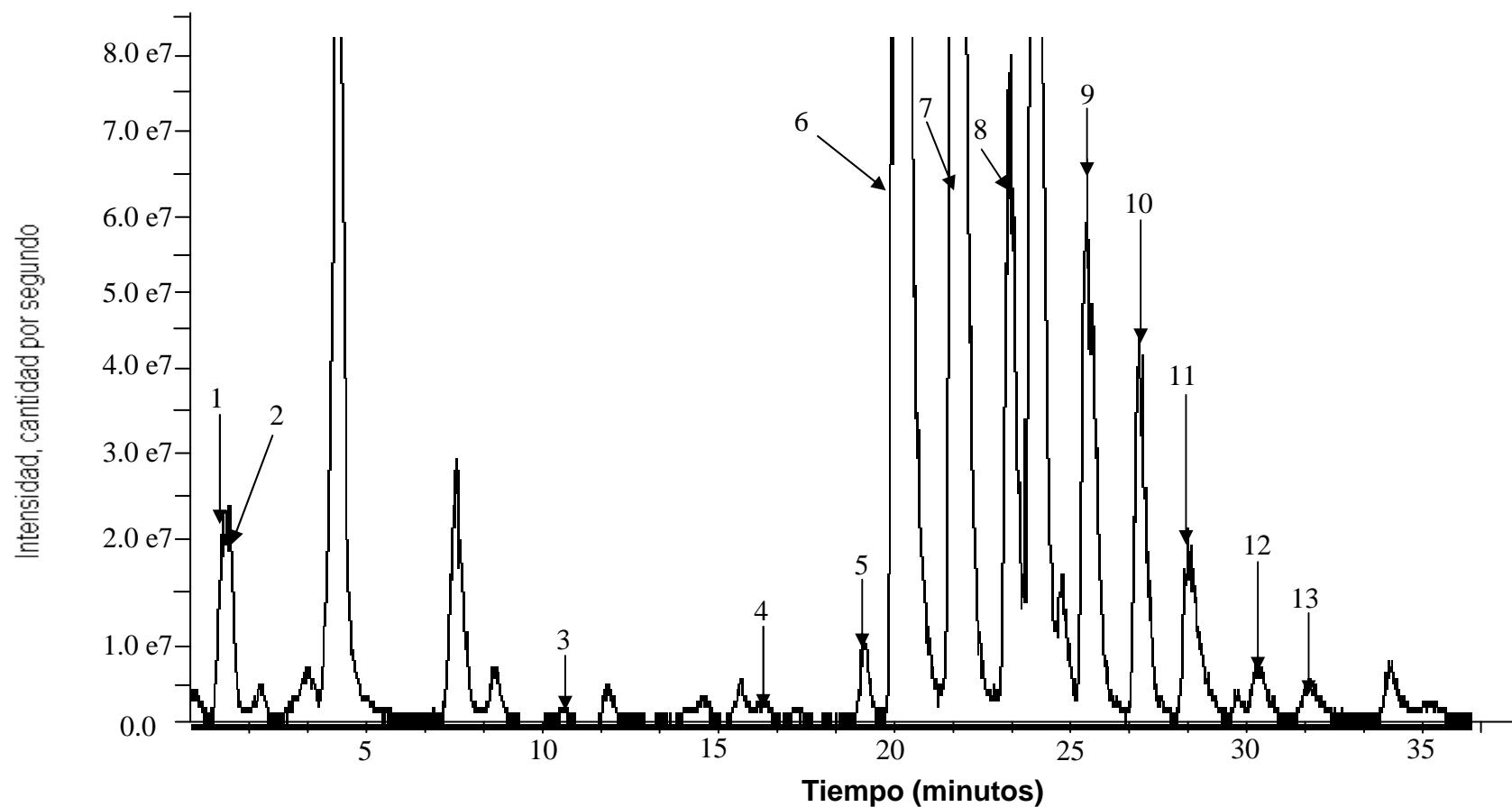


Figura 14. Cromatograma de posibles carotenoides en extracto lipofílico de garmbullo congelado, por espectroscopía de masas con interfase de ionización química a presión atmosférica, con polaridad positiva (APCI⁺-EM); identificación de picos se muestra en Cuadro 6.

Análisis en extracto saponificado de carotenoides, en grambullo con madurez I, II y congelado.

En extractos saponificados de grambullo con madurez I, II y congelado, se identificaron tentativamente cinco carotenoides, cuatro ésteres de violaxantina y un epóxido de β -caroteno como se muestra en el Cuadro 7. En el pico 1, se encontró el ion molecular $[M+H]^+$ m/z 601 que correspondió a la masa protonada de *all-trans*-violaxantina libre. El pico 2, presentó el ion $[M+H]^+$ m/z 671 que correspondió a *all-trans*-violaxantina butirato y en el pico 5 el ion $[M+H]^+$ m/z 863 que correspondió a un éster de *all-trans* violaxantina con ácido linolénico m/z 278 (Ornelas-Paz *et al.*, 2007). En el pico 4, se encontró el ion $[M+H]^+$ m/z 265 que fue asignado tentativamente a un éster de *all-trans*-violaxantina. El ion molecular $[M+H]^+$ m/z 553 en el pico 3, se identificó tentativamente como monoepoxi- β -caroteno (Mercadante *et al.*, 1997).

Como se observa en la Figura 15, los cromatogramas de los extractos de grambullo fresco y congelado presentaron similitud en los picos de los carotenoides, lo cual indica, que la congelación de la fruta no modificó la presencia de estos compuestos. Sin embargo, la concentración de carotenoides se vió disminuida en la maduración de la fruta. Los resultados obtenidos muestran que las xantofilas son los carotenoides principales en la fruta de grambullo. La cantidad de compuestos identificados en extractos saponificados, fue menor que los compuestos identificados en extracto lipofílico sin saponificar de grambullo congelado, ya que la saponificación realizada pudo haber contribuido a la degradación de algunos carotenoides e impurezas como menciona Matsumoto *et al* (2007).

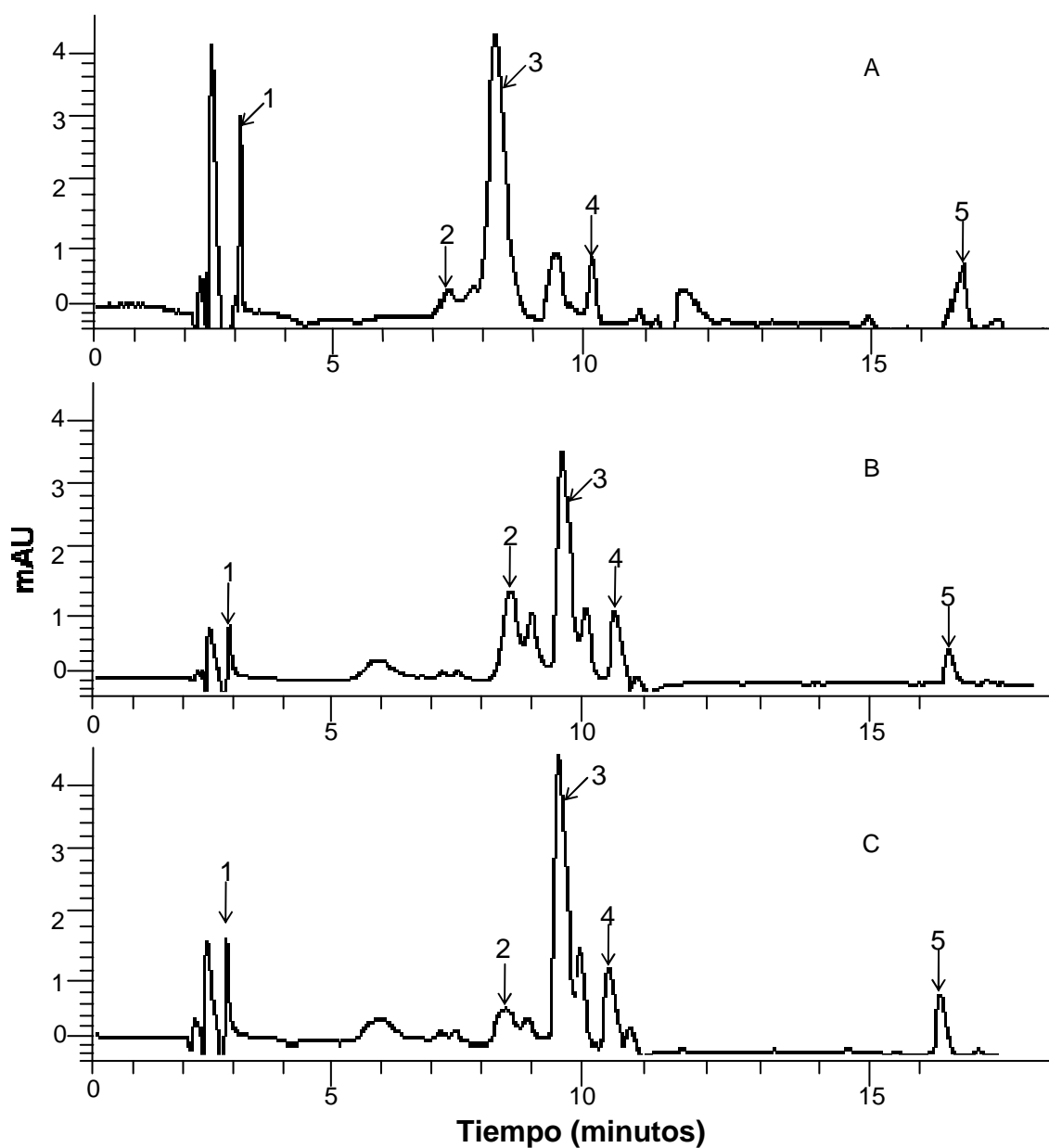


Figura 15. Carotenoides identificados mediante cromatografía líquida de alta resolución, acoplada a espectroscopía de masas con interfase de ionización química a presión atmosférica, con polaridad positiva (CLAR-APCI⁺-EM), en garambullo congelado (A), garambullo con estado de madurez II (B) y garambullo con estado de madurez I (C); identificación de picos en Cuadro 7.

Cuadro 7. Identificación tentativa en extractos saponificados de carotenoides en garambullo fresco y congelado, mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectroscopía de masas, con interfase de ionización química a presión atmosférica y polaridad positiva (APCI⁺-EM).

Pico*	T _r (min)	λ (nm)	APCI ⁺ (m/z)	Compuesto
1	3.0	470	601 (667, 622, 586, 530, 423, 404, 294, 274, 265, 101)	<i>All-trans</i> -violaxantina libre
2	5.0	470	671 (757, 712, 670, 669, 667, 622, 576, 530, 445, 361, 279, 265)	<i>All-trans</i> -violaxantina butirato
3	8.3	470	553 (712, 667, 622, 576, 530, 279, 265)	Monoepoxi-β-caroteno
4	9.7	470	265 (712, 669, 628, 609, 576, 553, 530, 485, 420, 406, 392, 148)	Ester <i>all-trans</i> -violaxantina
5	16.4	470	863 (879, 831, 712, 669, 622, 603, 579, 578, 530, 406, 148)	Ester <i>all-trans</i> -violaxantina

λ: longitud de onda; nm: nanómetros; T_r: tiempo de retención en minutos; * la asignación de picos se refiere a la Figura 15.

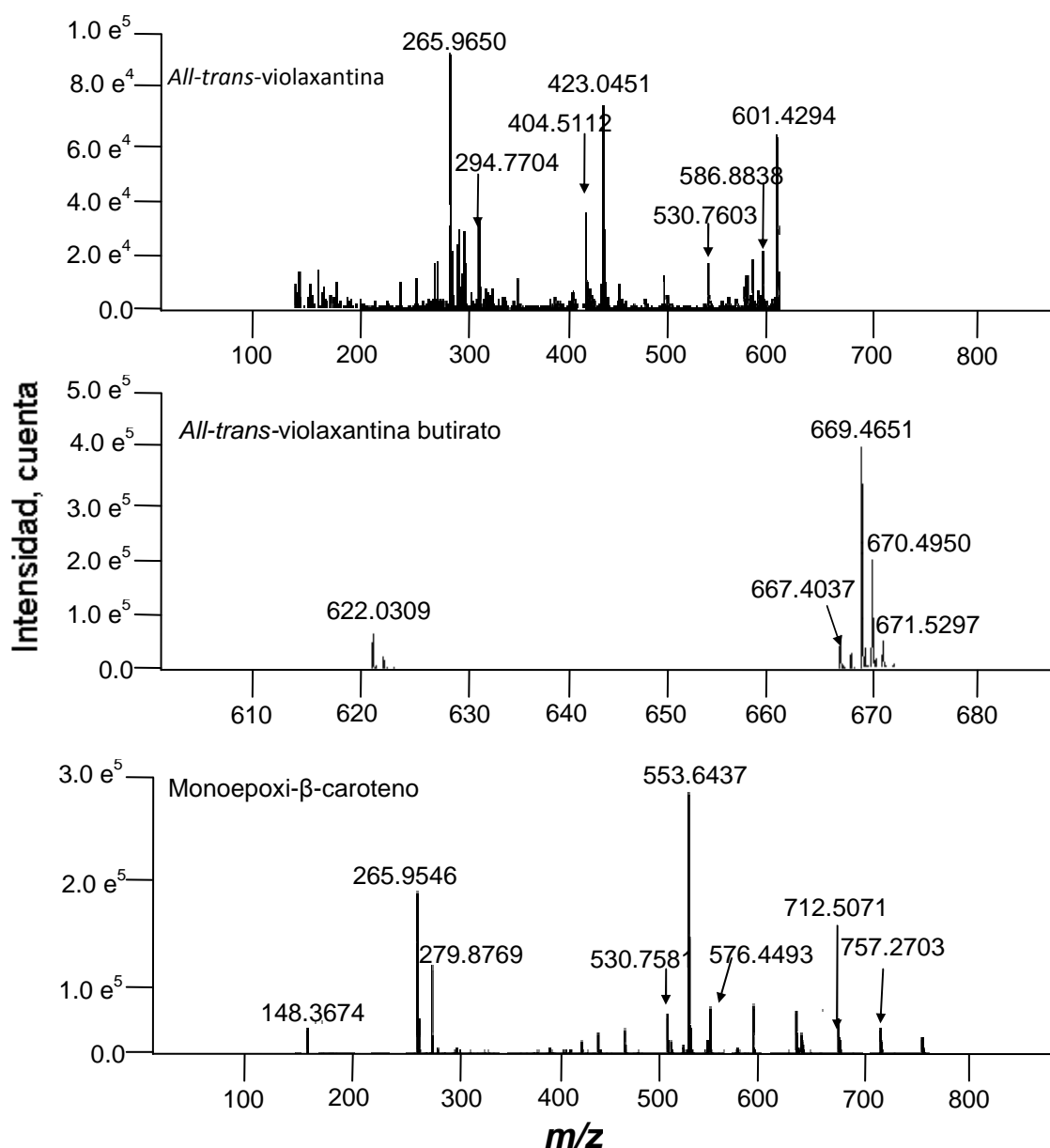


Figura16. Patrones de fragmentación de carotenoides en el fruto de garambullo por espectroscopía de masas, con interfase de ionización química a presión atmosférica y polaridad positiva (APCI⁺-EM).

4.4 Contenido de α y δ tocoferol

En la fruta de garambullo congelado, solo se observó α -tocoferol (0.033 mg/g de peso seco (ps)), mientras que los estados de madurez I y II presentaron δ -tocoferol con un contenido de 0.025 y 0.023 mg/g ps, respectivamente, sin diferencias significativas, como se muestra en Cuadro 8.

La cantidad de δ -tocoferol encontrado en garambullo fresco, fue similar a fresa (*Fragaria xananassa*) con un contenido de 0.020 mg/g ps (Van Hoed *et al.*, 2009). El contenido de δ -tocoferol en garambullo, fue menor que en zarzamora (*Rubus fruticosus*) y frambuesa (*Rubus idaeus*) con 0.032 y 0.058 mg/g ps, respectivamente (Van Hoed *et al.*, 2009). Sin embargo, los arándanos presentaron menor concentración (0.0002 mg/g ps) (Chun *et al.*, 2006) de δ -tocoferol comparado con la fruta de garambullo.

La cantidad de α -tocoferol en garambullo congelado, fue menor que la reportada en frambuesa (*Rubus idaeus*) 0.41 mg/g ps (Van Hoed *et al.*, 2009), mientras que la zarzamora (*Rubus fruticosus*) presentó mayor cantidad de α -tocoferol (0.0254 mg/g ps) (Van Hoed *et al.*, 2009).

El contenido de tocoferoles en garambullo, fue mayor en el estado más maduro (congelado). Resultados similares en bayas (*Hippophaë rhamnoides*), han mostrado que esto es debido, a un aumento en la concentración de tocoferoles en las semillas de los frutos maduros (Kallio *et al.*, 2002). La presencia de todos o algunos tocoferoles en las frutas, como el α -tocoferol en garambullo congelado y δ -tocoferol en garambullos con madurez I y II puede ser debido a las diferentes fechas de cosecha. Por ejemplo, los garambullos congelados se colectaron en el mes de agosto y los garambullos en estado de madurez I y II durante el mes de julio. Un estudio en nuez (*Sclerocarya birrea*), mostró que el contenido de tocoferoles, puede variar según las fechas de cosecha (Mariod *et al.*, 2009).

Cuadro 8. Contenido de α -tocoferol** y δ -tocoferol**, en dos estados de madurez de garambullo fresco y un estado de madurez de garambullo congelado.

	Temporada 1		Temporada 2	P	t
	Madurez I (mg/g ps)	Madurez II (mg/g ps)	Congelado (mg/g ps)		
α-tocoferol	ND	ND	0.033 \pm 0.011	NA	NA
δ-tocoferol	0.025 \pm 0.004 a	0.023 \pm 0.005a	ND	0.75	0.32

** : compuestos cuantificados en garambullo mediante cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) y curvas de calibración de α -tocoferol y δ -tocoferol; ND: no detectado; ps: peso seco; los resultados se refieren a nueve observaciones en garambullo fresco y tres observaciones en garambullo congelado \pm error estándar; NA: no aplica; resultado con diferente letra son significativamente diferentes con $\alpha=0.05$.

La fruta de garambullo puede contribuir a la ingesta diaria recomendada de vitamina E, sin embargo se deben incluir en la dieta, frutos ricos en esta vitamina como las semillas o nueces entre otros, ya que el requerimiento para la población mexicana en personas de 19 años en adelante, debe cubrir 10 mg/día (Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, 2001).

4.5 Contenido de ácido L-ascórbico e isoascórbico.

El garambullo con madurez I presentó el mayor contenido de ácido L-ascórbico seguido por el garambullo con madurez II y el más bajo contenido lo presentó el garambullo congelado con 105.5, 89.1 y 62.6 mg/100 g peso fresco (pf), respectivamente. El contenido de ácido isoascórbico en garambullo con madurez I y II fue de 8.6 y 8.4 mg/100 g pf, respectivamente, sin diferencias significativas, mientras que en garambullo congelado, la concentración fue menor con un contenido de 6.9 mg/100 g pf, como se muestra en el Cuadro 9.

El garambullo presentó mayor contenido de ácido L-ascórbico que sapote negro (*Diospyros digyna*) y nopal (*Opuntia ficus-indica*) cv. Milpa Alta con una concentración de 24.1 y 22.2 mg/100 g pf, respectivamente (Corral-Aguayo *et al.*, 2008), así como, en naranja con una concentración de 54 mg/100 g pf (Kistrup *et al.*, 2002). El contenido de ácido L-ascórbico es mayor en tomate verde-maduro (*Lycopersicon esculentum*) cv. Rhapsody y guayaba (*Psidium guajava*) cv. Media China con una concentración de 237 mg/100 g pf (Yahia *et al.*, 2007) y 222 mg/100 g pf (Corral-Aguayo *et al.*, 2008), respectivamente.

El contenido de ácido L-ascórbico en garambullo, disminuyó en el estado de mayor madurez. Resultados similares han sido reportados en tomate (Moneruzzaman *et al.*, 2008). Uno de los factores que pueden explicar estos cambios en la concentración de ácido L-ascórbico, es la fecha de cosecha. Algunos trabajos reportan alto contenido de L-ascórbico durante los primeros meses de cosecha y bajo en los últimos meses de cosecha, como en el caso de mango (Manthey *et al.*, 2009) y espárragos (Esteve *et al.*, 1995). En el caso de la fruta congelada, la primera colecta se realizó en el mes de agosto y la fruta con estado de madurez I y II durante el mes de julio. No obstante, además de la temporada de cosecha, el contenido de ácido ascórbico en garambullo pudo haber disminuido por la maduración de la fruta, como se ha visto en mango (*Mangifera indica*) cv. Kent (Islas-Osuna *et al.*, 2010) y pitahaya roja (*Hylocereus polyrhizus*) (Novita, 2008).

El consumo de fruta de garambullo puede contribuir a la ingesta diaria recomendada de vitamina C ya que para la población mexicana en personas de 19 años en adelante, se requiere 60 mg/día (Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, 2001). Una porción de 12 frutas de garambullo rojo podrían aportar 16.4 mg de ácido L-ascórbico y 1.3 mg de ácido isoascórbico; en el caso de garambullo madurez II se aportaría 13.9 mg de ácido L-ascórbico y 1.4 mg de ácido isoascórbico.

Cuadro 9. Contenido de ácido isoascórbico* y ácido L-ascórbico*, en dos estados de madurez de garambullo fresco y un estado de madurez de garambullo congelado.

	Temporada 1		Temporada 2	F	P	HSD
	Madurez I (mg/100 g pf)	Madurez II (mg/100 g pf)	Congelado (mg/100 g pf)			
Ácido Isoascórbico	8.6 ± 0.2a	8.4 ± 0.1a	6.9 ± 0.06b	13.9	0.0002	2.6
Ácido L-ascórbico	105.5 ± 3.3a	89.1 ± 4.0b	62.6 ± 4.8c	18.4	0.0001	2.6

*: compuestos cuantificados mediante cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) y curvas de calibración de ácido isoascórbico y ácido L-ascórbico; pf: peso fresco; los resultados se refieren a nueve observaciones en garambullo fresco y tres observaciones en garambullo congelado ± error estándar. Resultados con diferente letra son significativamente diferentes con $\alpha=0.05$.

4.6 Contenido de compuestos fenólicos

Se encontró una mayor concentración de compuestos fenólicos totales, en garambullo de madurez I con 8.8 g equivalentes de ácido gálico/100 g de peso seco (g EAG/100 g ps) y se observó una disminución en la concentración en garambullo de madurez II y congelado con concentraciones de 5.3 y 4.9 g EAG/100 g ps, respectivamente, mostrando diferencias significativas entre los tres estados de madurez como se muestra en Cuadro 10. La concentración de compuestos fenólicos totales en garambullo, presentó concentraciones similares a las reportadas por Mertz *et al.* (2007) en zarzamora (*R. adenotrichus*) y (*R. glaucus*) con 4.3 y 6.3 g EAG/100 g ps, respectivamente. La disminución de la concentración de compuestos fenólicos en los estados más maduros de garambullo, fue un comportamiento similar al de algunas variedades de zarzamora, frambuesa y fresa que se observan en los trabajos de Wang y Lin (2000).

Se cuantificaron diez compuestos fenólicos en la fruta de garambullo mediante cromatografía líquida de alta resolución (Cuadro 11). De estos, cuatro fueron ácidos hidroxicinámicos (ácido *trans*-cinámico, ácido caféico, ácido sinápico y ácido ferúlico), dos flavanoles (catequina y epicatequina), un flavonol (miricetina), un hidroxicinámato (ácido clorogénico) y dos ácidos hidroxibenzoicos (ácido *p*-hidroxibenzoico y ácido vanílico). El compuesto fenólico de mayor concentración en la fruta de garambullo fue el ácido ferúlico, mientras que los más bajos fueron: miricetina y ácido clorogénico. El ácido clorogénico fue encontrado en los tres estados de madurez del garambullo, con diferencias significativas entre garambullo fresco y congelado. En fruta con madurez I se encontró una concentración de 1.2 mg/100 g pf, en madurez II una concentración de 1.3 mg/100 g pf y en fruta congelada 0.3 mg/100 g pf como se muestra en el Cuadro 11. Las concentraciones de ácido clorogénico encontradas en garambullo, resultaron ser bajas comparadas con cerezas dulces (3.2-12.0 mg/100 g pf) y cerezas ácidas (0.6-5.8 mg/100 g pf) (*Kim et al.*, 2005).

Cuadro 10. Contenido de compuestos fenólicos totales mediante espectrofotometría, en dos estados de madurez de garambullo fresco y un estado de madurez de garambullo congelado.

	Temporada 1		Temporada 2	F	P	HSD
	Madurez I	Madurez II	Congelado			
Compuestos fenólicos totales (g EAG/100 g ps)	8.8 ± 0.09a	5.3 ± 0.03b	4.9 ± 0.06 c	935.2	0.0001	2.6

EAG: equivalentes de ácido gálico; ps: peso seco. Los resultados se refieren a nueve observaciones en garambullo fresco y tres observaciones en garambullo congelado ± error estándar; resultado con diferente letra son significativamente diferentes con $\alpha=0.05$.

La más baja concentración de catequina (4.1 mg/100 g pf), fue encontrada en garambullo congelado, mientras que en garambullo con madurez I se encontró una concentración de 8.1 mg/100 g pf y en madurez II 7.8 mg/100 g pf. El contenido de catequina en garambullo fresco, resultó mayor a las concentraciones en plátano de 6.1 mg/100 g pf (U.S. Department of Agriculture, 2010), sin embargo, el garambullo en los tres estados de madurez, las concentraciones de catequina fueron menores a las encontradas en duraznos, frutillas y uva roja (12.2, 11.2 y 10.1 mg/100 g pf, respectivamente) (U.S. Department of Agriculture, 2010).

En garambullo congelado se encontró la más baja concentración de epicatequina (5.04 mg/100 g pf), mientras que en garambullo fresco con estado de madurez I se encontró 7.3 mg/100 g pf y en estado de madurez II 6.7 mg/100 g pf. Las concentraciones de epicatequina encontradas en garambullo fresco, fueron cercanas a las concentraciones encontradas en uvas rojas 8.7 mg/100 g pf (U.S. Department of Agriculture, 2010). Se encontró mayor concentración de ácido caféico en garambullo fresco con estado de madurez I (7.9 mg/100 g pf) y menor concentración en garambullo fresco madurez II y congelado con 4.8 y 3.9 mg/100 g pf, respectivamente. La concentración de ácido caféico en garambullo fue mayor a reportes de moras azules (*Vaccinium ashei*) con 2.4 a 6.3 mg/100 g de pf, moras azules (*Vaccinium corymbosum*) con 3.0 a 3.3 mg/100 g pf y zarzamoras (*Rubus spp.*), con 1.4 a 3.6 mg/100 g pf que reporta Sellappan *et al* (2002). Sin embargo, en arándanos (*Vaccinium macrocarpon*) cv. Early Black, el ácido caféico se encontró en concentraciones mayores al garambullo que presentó una concentración de 16 mg/100 g pf (Zuo *et al.*, 2002).

Se encontró mayor concentración de ácido *p*-hidroxibenzoico en garambullo congelado (15.9 mg/100 g pf) y menor concentración en garambullo fresco con madurez I y madurez II que presentaron 11.4 y 10.1 mg/100 g pf, respectivamente. La concentración de *p*-hidroxibenzoico encontrada en los tres estados de madurez de garambullo, fue mayor que en arándanos (*Vaccinium*

macrocarpon) cv. Early Black con un contenido de 0.4 mg/100 g pf (Zuo *et al.*, 2002). Sin embargo, la concentración del ácido *p*-hidroxibenzoico en garambullo, resultó menor al contenido en mora azul (*Vaccinium ashei*) con 103.7 mg/100 g pf (Sellappan *et al.*, 2002). El ácido sinápico en garambullo, se encontró en los tres estados de madurez con una concentración de 2.3 a 2.4 mg/100 g pf como se muestra en el Cuadro 11. La concentración de ácido sinápico en garambullo fue mayor a la encontrada en arándanos (0.021 mg/100 g pf) como indica Zuo *et al.* (2002).

El ácido ferúlico fue el compuesto fenólico de mayor concentración. El garambullo fresco con estado de madurez I presentó la concentración más alta, seguido del estado de madurez II y congelado con 518.9, 340.9 y 242.7 mg/100 g pf, respectivamente. La concentración de ácido ferúlico en garambullo, resultó mayor a la encontrada en diferentes cultivares de arándanos (3.5-16.9 mg/100 g pf) como indica Sellappan *et al.* (2002). El contenido de miricetina en garambullo fresco y congelado resultó de 1.4 a 1.7 mg/100 g pf. Esta concentración fue menor a la encontrada en moras azules (*Vaccinium corymbosum*) con 6.7 a 6.9 mg/100 g pf, en zarzamoras (*Vaccinium ashei*) con 6.7 a 7.1 mg/100 g pf y zarzamora (*Rubus spp.*) con 9.9 mg/100 g pf como indica Sellappan *et al.* (2002).

El consumo de fruta de garambullo puede aportar una cantidad significativa de compuestos fenólicos, si se considera que la ingesta diaria recomendada es de un gramo por día (Markowski y Plochanski, 2006). Los compuestos fenólicos contenidos en garambullo, pueden actuar como agentes antioxidantes y prevenir enfermedades del corazón, neurológicas, cáncer y procesos mutagénicos (Mattila y Kumpulained, 2002; Zuo *et al.*, 2002; Kvasnicka *et al.*, 2008), ya que los compuestos fenólicos pueden atrapar radicales libres e inhibir las reacciones de oxidación en ácidos nucleicos, proteínas y lípidos (Zuo *et al.*, 2002). El ácido ferúlico, compuesto mayoritario en la fruta de garambullo, es candidato a ser utilizado como medicamento antioxidante (Sohn y Oh, 2003). Además, algunos estudios detectaron actividad

antiinflamatoria, antidiabética, anticancerígena, protección al hígado y pulmones, lo cual es debido al fortalecimiento del sistema inmune (Srinivasan *et al.*, 2007). Miricetina y catequina también han mostrado actividad antidiabética con la reducción de glucosa en músculo y tejido adiposo (Strobel *et al.*, 2005)

Cuadro 11. Cuantificación de compuestos fenólicos, mediante cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) con detector de arreglo de diodos (DAD)

Compuesto fenólico	Temporada 1		Temporada 2	F	P	HSD
	madurez I mg/100 g pf	madurez II mg/100 g pf	Congelado mg/100 g pf			
Ácido cinámico	60.3 ± 1.8a	27.4 ± 1.9c	43.3 ± 3.3b	75.4	0.0001	2.6
Ácido clorogénico	1.2 ± 0.07a	1.3 ± 0.08a	0.3 ± 0.13b	19.3	0.0001	2.6
Catequina	8.1 ± 0.35a	7.79 ± 0.38a	4.1 ± 0.11b	17.8	0.0001	2.6
Epicatequina	7.3 ± 0.24a	6.7 ± 0.37a	5.1 ± 0.26b	7.0	0.0056	2.6
Ácido vanílico	15.7 ± 0.36b	16.9 ± 0.48b	23.7 ± 0.30a	51.2	0.0001	2.6
Ácido caféico	7.9 ± 0.60a	4.8 ± 0.49b	3.9 ± 0.05b	11.6	0.0006	2.6
Ácido <i>p</i> - hidroxibenzoico	11.4 ± 0.20b	10.09 ± 0.41c	15.9 ± 0.06a	46.4	0.0001	2.6
Ácido sinápico	2.4 ± 0.19a	2.4 ± 0.12a	2.3 ± 0.06a	0.1	0.9	2.6
Ácido ferúlico	518.9 ± 17.7a	340.9 ± 20.7b	242.6 ± 13.5c	38.4	0.0001	2.6
Miricetina	1.7 ± 0.28a	1.4 ± 0.26a	1.5 ± 0.06	0.2	0.8	2.6

pf: peso fresco; los resultados se refieren a nueve observaciones en garambullo fresco y tres observaciones en garambullo congelado ± error estándar. Resultados con diferente letra son significativamente diferentes con $\alpha=0.05$.

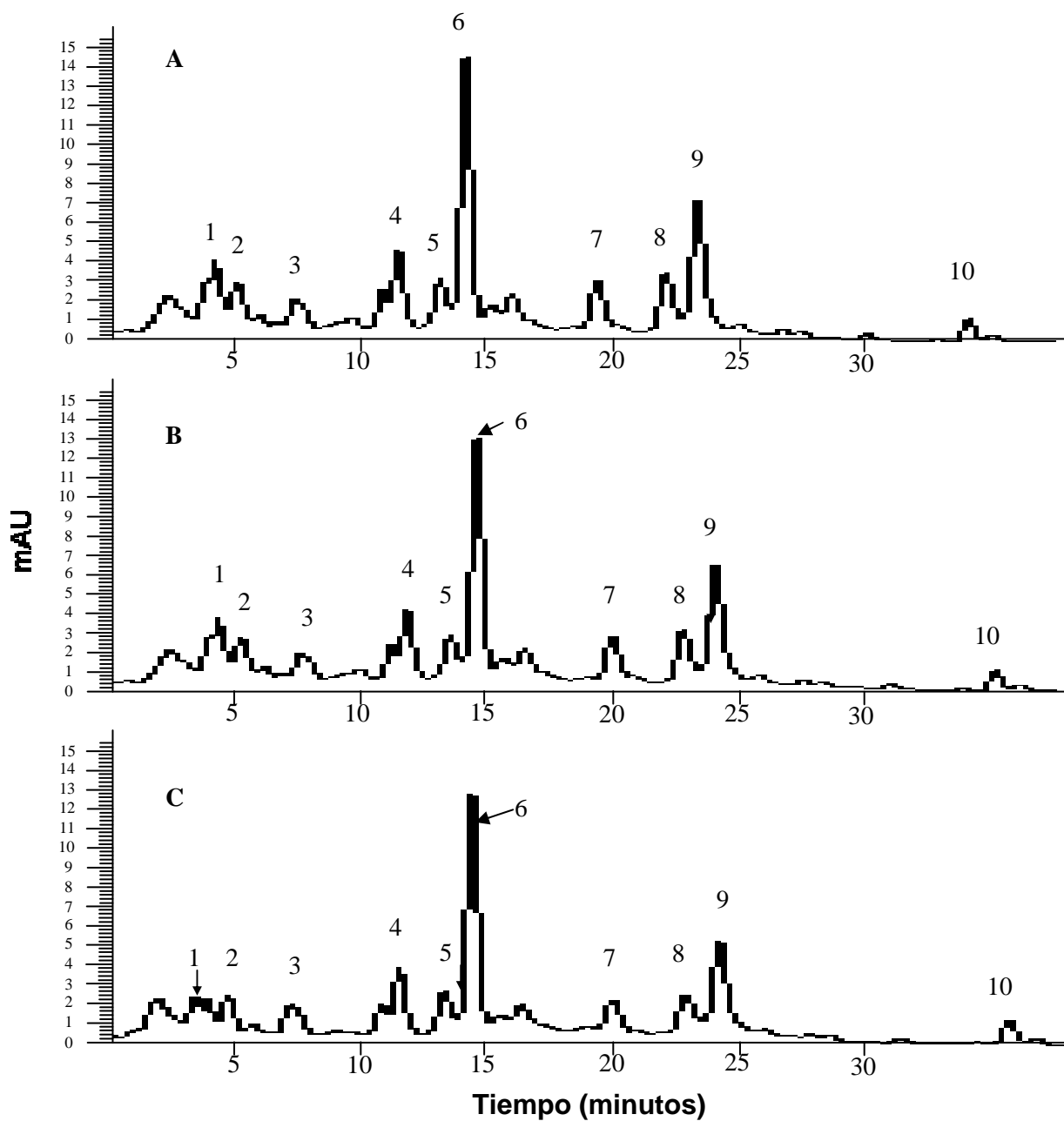


Figura 17. Compuestos fenólicos identificados mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectroscopía de masas con interfase electro spray de ionización negativa (CLAR-IEE⁻-EM), en garambullo congelado (A), garambullo con estado de madurez II (B) y garambullo con estado de madurez I (C).

Análisis de compuestos fenólicos por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) acoplada a espectroscopía de masas con interfase electro spray de ionización negativa (CLAR-IEE⁻-EM).

Extracto hidrofílico de garambullo congelado.

En el extracto hidrofílico de la fruta de garambullo congelado, se identificaron tentativamente 9 compuestos fenólicos por su espectro de masas. En el Cuadro 12 se muestra los tiempos de retención y los patrones de fragmentación de los compuestos identificados. En el pico 1, se identificó tentativamente el ácido siríngico por la presencia del ión $[M-H]^-$ m/z 197. En el pico 2 se identificó el ácido vanílico con el ión molecular $[M-H]^-$ m/z 167 y un fragmento correspondiente al ácido vanílico más una molécula de hexosa $[M-H+162]^-$ m/z 329. En el pico 3 se identificó tentativamente el ácido *p*-hidroxibenzoico con el ión $[M-H]^-$ m/z 137, un fragmento de ácido *p*-hidroxibenzoico más hexosa $[M-H+162]^-$ m/z 299 y el ión que correspondió a ácido *p*-hidroxibenzóico más una molécula de sodio $[M-H+23]^-$ m/z 160. En el pico 4 se identificó tentativamente el ácido cinámico con el ión $[M-H]^-$ m/z 147 y un dímero de ácido cinámico más hexosa con el ión molecular $[M+M-H+162]^-$ m/z 457. En el pico 5 se identificó tentativamente el ácido caféico que fue identificado por el ión $[M-H]^-$ m/z 179 y un dímero menos agua con el ión molecular $[M+H-18]^-$ m/z 341. En el pico 6 se identificó tentativamente un dímero de dihidroquercetina más hexosa con el ión m/z 769. En el pico 7 se identificó tentativamente quercetina-3-*o*-rutinosido con el ión molecular $[M-H]^-$ m/z 609. En el pico 8 se identificó tentativamente miricetina con una molécula de agua que presentó el ión molecular $[M-H+18]^-$ m/z 299. En el pico 9 se identificó isoramnetina $[M-H]^-$ m/z 315 y el ión de isoramnetina más hexosa, más deoxihexosa m/z 623. En la Figura 18 se muestra el cromatograma ESI⁻-MS de los compuestos identificados en el Cuadro 12.

Cuadro 12. Identificación de posibles compuestos fenólicos en extracto hidrofílico de garambullo congelado, mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectroscopía de masas, con interfase electro spray y ionización negativa.

Pico*	T_r	λ	ESI(m/z)	Posible compuesto
1	11.4	280 y 320	197 (391, 217, 191, 111)	Siríngico
2	20.6	280 y 320	167 (329, 315, 152, 108)	Acido vanílico
3	21.2	280 y 320	137 (299, 160, 138, 108)	Acido <i>p</i> -hidroxibenzoico
4	23.8	280 y 320	147 (457, 329, 285, 152)	Ácido cinámico
5	24.7	280 y 320	179 (341, 147, 135, 108)	Ácido caféico
6	29.5	280 y 320	769 (837, 805, 770)	Quercetina
7	30.3	280 y 320	611 (770, 701, 679, 612)	Catequina
8	31.3	280 y 320	318 (299, 161, 137)	Miricetina
9	31.6	280 y 320	315 (623, 463)	Isoramnetina

*Pico: asignación de picos se refiere a la Figura 18; T_r: tiempo de retención; λ: longitud de onda; m/z: masa del compuesto; ESI: interfase electro spray de ionización negativa.

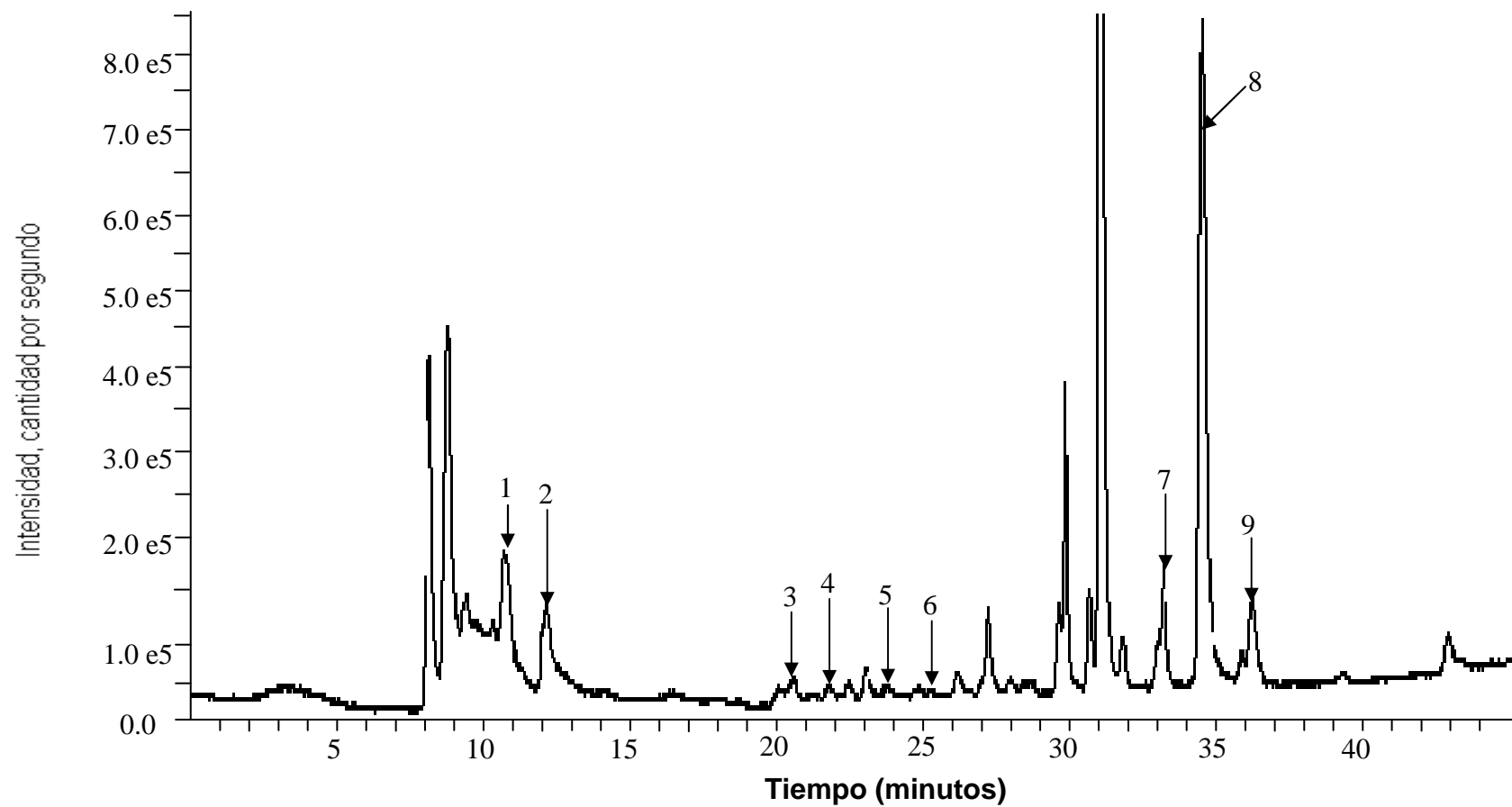


Figura 18. Cromatograma de posibles compuestos fenólicos, en extracto hidrofílico de garmbullo congelado por espectroscopía de masas, con interfase electro spray y ionización negativa (IEE⁻-EM); identificación de picos se muestra en Cuadro 12.

Extracto fenólico de garambullo con estado de madurez I, II y congelado.

Los patrones de fragmentación de los compuestos fenólicos encontrados en garambullo fresco y congelado se muestran en el Cuadro 13. El ion $[M-H]^-$ m/z 147 fue identificado por los iones $[M+146-H]^-$ m/z 293 que corresponde al ácido cinámico más una molécula de deoxihexosa y $[M+M-H]^-$ m/z 295 de un dímero del ácido cinámico. El ión $[M-H]^-$ m/z 353 fue identificado por los iones $[M-80]^-$ m/z 274 que corresponde a la pérdida de un epóxido y m/z 353 de la masa libre del ácido clorogénico. El ácido *p*-hidroxibenzoico presentó los iones $[M-H]^-$ m/z 137 de la masa libre del compuesto y un dímero con el ion $[M+M-H]^-$ m/z 275. El ácido ferúlico en su patrón de fragmentación presentó el ion $[M+23-H]^-$ m/z 216 que corresponde a la presencia de sodio, en la metodología utilizada para este análisis no se utilizó solventes que contengan el ión sodio, por lo que se asume que se encuentra de manera natural en la muestra (Mandal y Dey, 2008).

Cuadro 13. Compuestos fenólicos identificados en garambullo fresco y congelado, mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectroscopía de masas, con interfase electro spray y ionización negativa (CLAR-IEE⁻-EM).

Pico*	T _r (min)	λ (nm)	ESI ⁻ (m/z)	Compuesto fenólico
1	18.5	280 y 320	147 (352, 295, 293, 292, 274, 214, 196, 178, 135)	Ácido cinámico
2	19.7	280 y 320	353 (919, 518, 353, 352, 274, 214, 196, 135)	Ácido clorogénico
7	23.3	280 y 320	137 (808, 772, 413, 352, 275, 274, 214, 137, 135)	Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico
9	24.8	280 y 320	194 (431, 328, 352, 292, 274, 216, 196, 153, 135)	Ácido ferúlico

λ: longitud de onda; nm: nanómetros; T_r: tiempo de retención en minutos; * la asignación de picos se refiere a la Figura 19.

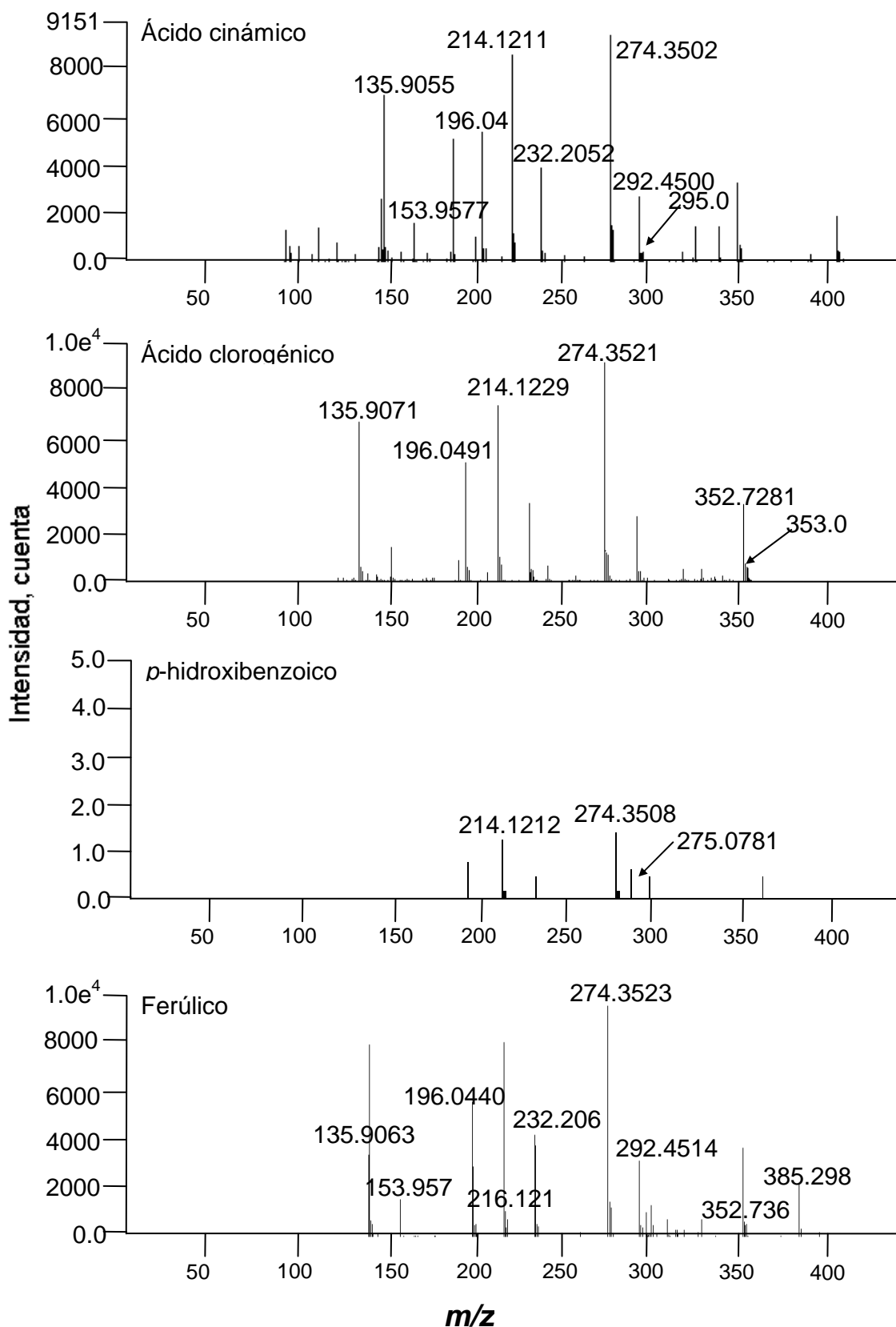


Figura 19. Patrones de fragmentación de compuestos fenólicos en garambullo por espectroscopía de masas con interfase electro spray ionización negativa (ESI-EM).

4.7 Capacidad antioxidante.

La capacidad antioxidante de los diferentes estados de madurez del fruto de garambullo, fue evaluada por los métodos DPPH y FRAP en extractos hidrofílicos y lipofílicos, considerando la suma de ambos como capacidad antioxidante total. Los extractos hidrofílicos evaluados por ambos métodos resultaron con mayor capacidad antioxidante que los extractos lipofílicos, como se observa en la Figura 20. La evaluación de los extractos hidrofílicos por el método DPPH, presentó resultados en un rango de 5202.3 a 10240.9 μmol equivalentes de trolox/100 g peso fresco (pf), y en el método FRAP, el rango fue de 1480.4 a 5038.6 μmol equivalentes de trolox/100 g pf, como se muestra en el Cuadro 14. El extracto lipofílico con el método DPPH presentó resultados en un rango de 372.4 a 907.9 μmol equivalentes trolox/100 g pf, mientras que en el método FRAP, el rango fue de 139.6 a 914.9 μmol equivalentes trolox/100 g pf. La diferencia en los resultados entre los dos métodos utilizados, pueden ser debida a los diferentes mecanismos de reacción y cuantificación de cada método, sin embargo, debido a que cada antioxidante actúa *in vivo* a través de diferentes mecanismos, es conveniente evaluar la capacidad antioxidante a través de más de un método (Pellegrini *et al.*, 2003).

La capacidad antioxidante total del garambullo congelado fue mayor que la del garambullo fresco con madurez I y II, lo cual puede deberse a la presencia de mayor concentración de compuestos con actividad antioxidante como las betalainas principalmente, ya que las betalainas son efectivos inhibidores de radicales libres y contribuyen en un 90% a la actividad antioxidante total (Guzmán-Maldonado *et al.*, 2010). Además, pudo deberse también a la baja temperatura en la que los garambullos de la temporada 1 fueron almacenados, ya que en diversos estudios, han encontrado que en algunas frutas a bajas temperaturas se incrementa la capacidad antioxidante, debido al incremento de algunos compuestos antioxidantes como respuesta al estrés causado por frío (Connor *et al.*, 2002, Shivashankara *et al.*, 2004).

El valor de capacidad antioxidante en extracto hidrofílico medido por DPPH en garambullo, fue mayor al de frutas como guayaba (*Psidium guajava*) cv. Media China, tuna (*Opuntia ficus-indica*) cv. Reina, zapote negro (*Diospyros digyna*), fresa (*Fragaria ananassa*) cv. Sweet Charlie y mango (*Mangifera indica*) cv. Ataulfo con 6000, 200, 1000, 1000 y 1000 μmol equivalentes de trolox/100 g pf, respectivamente (Corral-Aguayo *et al.*, 2008), mientras que la capacidad antioxidante en extracto hidrofílico medido por FRAP resultó menor que en guayaba con 7500 μmol equivalentes de trolox/100 g pf, pero mayor que fresa y tuna con 2400 y 1000 μmol equivalentes de trolox/100 g pf (Corral-Aguayo *et al.*, 2008). El garambullo presentó mayor capacidad antioxidante en los extractos lipofílicos que guayaba, fresa, zapote negro y tuna por la técnica de FRAP (Corral-Aguayo *et al.*, 2008).

Cuadro 14. Capacidad antioxidante (CAO) en extractos hidrofílico y lipofílico de dos estados de madurez, de garambullo fresco y un estado de madurez de garambullo congelado, evaluado por dos métodos (FRAP y DPPH).

Ensayo	Extracto	Temporada 1		Temporada 2	F	P	HSD
		Madurez I μmol ET/100 g pf	Madurez II μmol ET/100 g pf	Congelado μmol ET/100 g pf*			
DPPH	Hidrofílico	5202.3 ± 296.7c	6644.5 ± 464.9b	10240.9 ± 1436.7a	15.0	0.0001	2.6
	Lipofílico	907.9 ± 30.9a	372.4 ± 24.9c	654.2 ± 67.6b	82.6	0.0001	2.6
	CAO total	6110.3 ± 287.1c	7016.9 ± 474.1b	10895.1 ± 1472.4a	13.3	0.0003	2.6
FRAP	Hidrofílico	1480.4 ± 360.86b	1698.4 ± 146.4b	5038.6 ± 449.7a	25.4	0.0001	2.6
	Lipofílico	139.6 ± 24.4b	164.1 ± 21.3b	914.9 ± 66.3a	184.5	0.0001	2.6
	CAO total	1620.0 ± 384.65b	1862.5 ± 153.27b	5953.5 ± 478.7a	33.4	0.0001	2.6

DPPH: 2,2-difenil-1picril-hidrazil; FRAP: poder antioxidante para la reducción del ion fierro; μmoles ET: micromoles equivalentes de trolox; pf: peso fresco; los resultados se refieren a nueve observaciones en garambullo fresco y tres observaciones en garambullo congelado ± error estándar; resultados con diferente letra son significativamente diferentes con α=0.05.

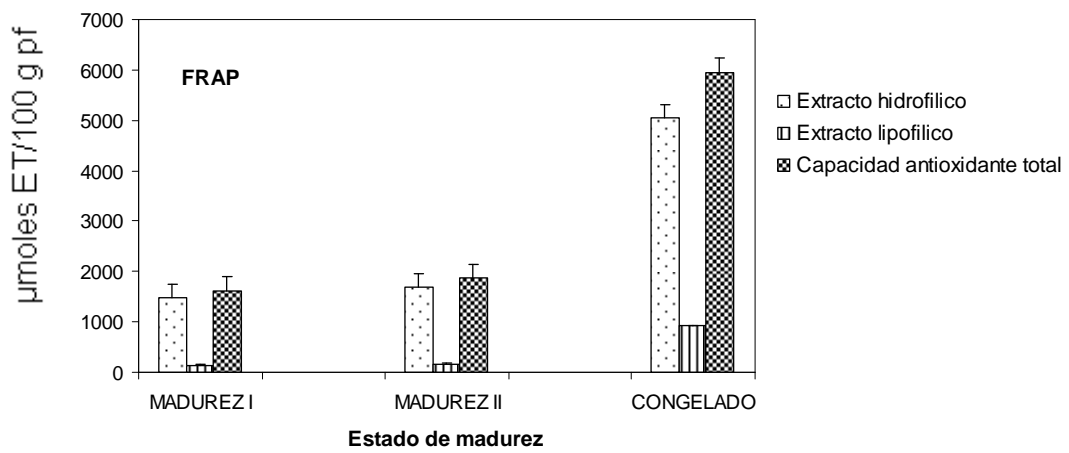
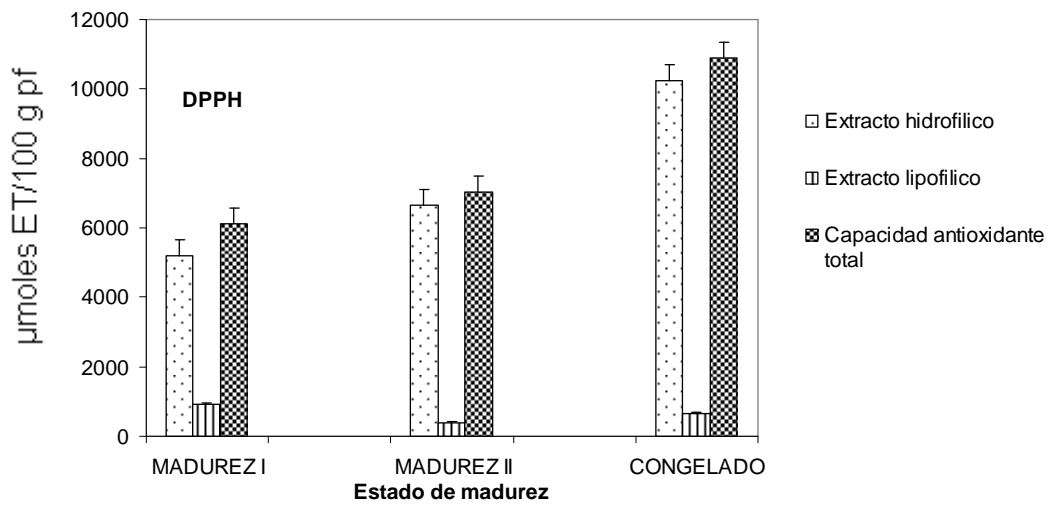


Figura 20. Capacidad antioxidante en extractos hidrofílico y lipofílico en diferentes estados de madurez del fruto de garambullo, evaluado por dos métodos (FRAP y DPPH).

4.8 Contenido de ácidos grasos.

De los ocho estándares de ácidos grasos evaluados, cinco fueron encontrados en los tres estados de madurez de la fruta de garambullo, los cuales fueron: ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido linoleico y ácido linolénico. Su cuantificación fue realizada por cromatografía de gases con detector de ionización de flama (FID), y se consideró los tiempos de retención y curvas de calibración de estándares. Los cromatogramas de los ácidos grasos en garambullo se muestran en la Figura 21. El ácido linoleico fue el ácido graso de mayor concentración. Las concentraciones de ácido linoleico en garambullo con estado de madurez I, II y congelado fueron de 4.4, 3.6 y 3.2 mg/100 g de peso fresco (pf) respectivamente como se muestra en el Cuadro 15. El ácido linolénico en garambullo madurez I, madurez II y congelado, presentó una concentración de 0.5, 0.6 y 0.2 mg/100 g pf, respectivamente, mientras que, el ácido esteárico presentó en madurez I, madurez II y congelado una concentración de 0.7, 0.4 y 0.4 mg/100 g pf, respectivamente. El ácido palmítico, presentó en madurez I, madurez II y congelado, una concentración de 1.4, 1.1 y 0.8 mg /100 g pf, respectivamente. El ácido oleico se encontró en madurez I, madurez II y congelado, una concentración de 2.3, 0.8 y 1.6 mg/100 g pf, respectivamente. El contenido de los ácidos grasos encontrados en garambullo fueron bajos comparados con la fruta ackee (*Blighia sapida*) (Oduyga *et al.*, 1992), aguacate (*Persia americana Mill*) cv Hass (Azizi y Najafzadeh, 2008) y semillas que son fuentes principales de ácidos grasos (U.S. Department of Agriculture, 2010).

El ácido linoleico presentó mayor concentración en garambullo con estado de madurez I y disminuyó en los estados de madurez II y congelado. El contenido de ácido linoleico en garambullo, fue bajo comparado con la soya que contiene 55600 mg/100 g pf (Oliva *et al.*, 2006), aguacate cv Hass con un contenido de 15700 mg/100 g pf (Azizi y Najafzadeh, 2008), así como, nueces, cacahuates, pistaches, almendras, avellanas y nuez de la india que contienen 38100, 15600, 13200, 12200, 7800, 7700 mg/100 g pf, respectivamente (Ros y Mataix, 2006).

El contenido de ácido esteárico en garambullo resultó bajo comparado con soya que contiene 21300 mg/100 g pf (Oliva *et al.*, 2006), aguacate cv Hass con 54500 mg/100 g pf (Azizi y Najafzadeh, 2008) y germen de trigo con 16000 mg/100 g pf (U.S. Department of Agriculture, 2010). El contenido de ácido linolénico incrementó en la madurez de la fruta, presentando el garambullo congelado, la mayor concentración. No obstante, el ácido linolénico resultó bajo comparado con soya que contiene 7300 mg/100 g pf (Oliva *et al.*, 2006), así como pistaches, nuez de la india, avellanas y nueces que presentan 250, 150, 90 y 80 mg/100 g pf, respectivamente (Ros y Mataix, 2006).

El consumo del fruto de garambullo puede contribuir a la ingesta diaria recomendada de ácido linoleico (10000–17000 mg/día) y ácido linolénico (1000–1600 mg/día) (U.S. Department of Agriculture, 2010), los cuales, son considerados ácidos grasos esenciales que el cuerpo humano no puede sintetizar, y que se obtienen mediante la dieta (Undurti, 2006). Los ácidos grasos son importantes para el funcionamiento normal de las células, activadores de enzimas y receptores (Conn y Stumpf, 1998; Undurti, 2006), son fuentes importantes de energía, resultan de gran importancia para el cerebro, retina, hígado, riñones, glándulas suprarrenales y gónadas (Undurti, 2006). Los ácidos grasos esenciales, pueden contribuir a la reducción de riesgos de inflamación, trombosis, presión sanguínea elevada, arterosclerosis, enfermedades cardiovasculares, carcinogénesis, diabetes mellitus, asma (Ros y Mataix, 2006; Djazayery y Jazayery, 2008), problemas renales, artritis reumatoide, colitis y cáncer (Simopoulos, 1999). Además del fruto de garambullo, es recomendable incluir en la dieta: soya, nueces, semillas, aceites vegetales como de soya, canola y maíz, aceite de pescado, huevo y carne (U.S. Department of Agriculture, 2010), los cuales, presentan mayor contenido de ácidos grasos.

Cuadro 15. Cuantificación de ácidos grasos mediante cromatografía de gases con detector de ionización de flama (FID), en dos estados de madurez de garambullo fresco y un estado de madurez de garambullo congelado.

Ácido graso	Temporada 1		Temporada 2	F	P	HSD
	Madurez I mg/100 g pf	Madurez II mg/100 g pf	Congelado mg/100 g pf			
Ácido palmítico	1.4 ± 0.031a	1.1 ± 0.34a	0.8 ± 0.038a	1.7	0.3	3.1
Ácido esteárico	0.7 ± 0.042a	0.4 ± 0.063b	0.4 ± 0.01b	11.6	0.009	3.1
Ácido oleico	2.3 ± 0.72a	0.8 ± 0.05c	1.6 ± 0.11b	123.3	0.0001	3.1
Ácido linoleico	4.4 ± 0.012a	3.6 ± 1.13a	3.2 ± 0.18a	0.9	0.5	3.1
Ácido linolénico	0.5 ± 0.07a	0.6 ± 0.24a	0.2 ± 0.01b	17.08	0.003	3.1

pf: peso fresco; los resultados se refieren a tres observaciones ± error estándar. Resultado con diferente letra son significativamente diferentes con $\alpha=0.05$.

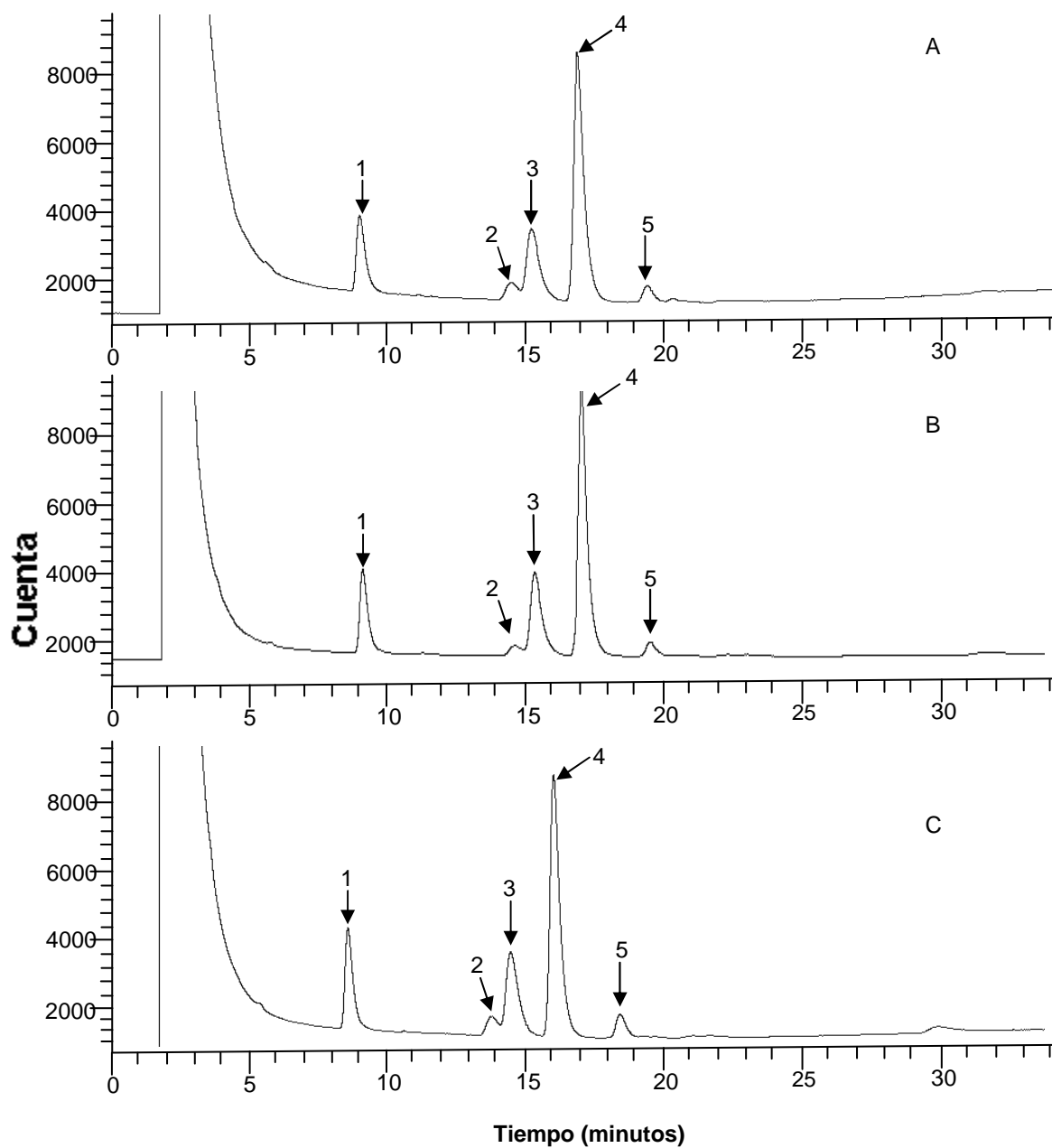


Figura 21. Ácidos grasos identificados mediante cromatografía de gases con detector de ionización de flama (FID), en garambullo congelado (A), garambullo con estado de madurez II (B) y garambullo con estado de madurez I (C); 1: ácido palmítico, 2: ácido esteárico, 3: ácido oleico, 4: ácido linoleico, 5: ácido linolénico.

V. CONCLUSIONES

Se identificaron tres estados de madurez diferentes en la fruta de garambullo, fruta muy madura (congelado), fruta madura (madurez II) y fruta menos madura (madurez I). Los cambios observados en los tres estados de madurez fueron atribuidos principalmente a la maduración de la fruta y se observó cambios mínimos por efecto de la congelación. En los parámetros relacionados con la calidad de la fruta, se observó incrementos en el contenido de azúcares, pH y coloración por efecto de la maduración. El contenido de betalainas incrementó durante la maduración de la fruta. Las betacianinas se encontraron en mayor concentración que las betaxantinas. Se observó la probable isomerización de betanina a isobetanina por efecto de la congelación. El contenido de betalainas en garambullo fue alto comparado con algunos cultivares de tuna roja-púrpura, sin embargo, el contenido en betabel muestra mayores concentraciones que la fruta de garambullo.

La fruta de garambullo presentó un bajo contenido de carotenoides comparado con frutos y hortalizas con altas concentraciones como el jitomate, zanahoria, mango y papaya. No obstante, el garambullo resultó con mayor concentración de carotenoides que la fresa y algunas variedades de tuna. Se identificaron ésteres de violaxantina y monoepóxido de β -caroteno. Se encontró α tocoferol en la fruta proveniente de la segunda temporada de cosecha y δ tocoferol de la primera temporada de cosecha. El contenido de tocoferoles en la fruta de garambullo puede contribuir a la ingesta diaria recomendada de vitamina E, pero es conveniente considerar además otras fuentes de tocoferoles como semillas y aceites vegetales, principalmente de oliva y germen de trigo.

El contenido de ácido L-ascórbico e isoascórbico fue mayor en garambullos menos maduros (madurez I), disminuyendo su concentración durante la maduración de la fruta. El ácido L-ascórbico presentó una mayor concentración que el ácido isoascórbico. El consumo de garambullo puede contribuir a la ingesta diaria recomendada de vitamina C. La concentración de

compuestos fenólicos en garambullo, fue mayor en fruta menos madura y disminuyó durante la maduración. De los compuestos fenólicos encontrados, cuatro fueron ácidos hidroxicinámicos, dos flavanoles, un flavonol, un hidroxicinamato y dos ácidos hidroxibenzoicos. Las propiedades antioxidantes de los compuestos fenólicos en garambullo, pueden contribuir de manera importante en el fortalecimiento del sistema inmune y prevenir enfermedades degenerativas. Los compuestos fenólicos de mayor concentración en la fruta de garambullo fueron: el ácido ferúlico, ácido *p*-hidroxibenzoico y ácido sinápico, mientras que los de más baja concentración fueron miricetina, epicatequina y ácido cinámico. El ácido ferúlico fue el compuesto fenólico mayoritario en el garambullo, el cual puede contribuir a la prevención de enfermedades del hígado, pulmones, cáncer y diabetes.

La capacidad antioxidante de los extractos hidrofílicos de la fruta de garambullo, presentó valores mayores que los extractos lipofílicos evaluados en los métodos de FRAP y DPPH. El garambullo muy maduro (congelado) presentó los valores más altos de capacidad antioxidante. En la fruta de garambullo se encontraron dos ácidos grasos saturados (palmítico y esteárico) y tres ácidos grasos insaturados (linoleico, linolenico y oleico), el ácido graso de mayor concentración en garambullo, fue el ácido linoleico, el cual disminuyó su concentración durante la maduración. El ácido linoleico y linolenico son considerados ácidos grasos esenciales que el cuerpo humano no puede sintetizar y que se obtienen mediante la dieta, son importantes para el funcionamiento normal de las células, activadores de enzimas y receptores, son fuentes importantes de energía, resultan de gran importancia para el cerebro, retina, hígado, riñones, glándulas suprarrenales y gónadas, y pueden contribuir a la reducción de riesgos de inflamación, trombosis, presión sanguínea elevada, arterosclerosis, enfermedades cardiovasculares, carcinogénesis, diabetes mellitus, asma, problemas renales, artritis reumatoide, colitis y cáncer. El consumo de garambullo puede contribuir a la ingesta diaria recomendada de ácido linoleico y linolenico. Sin embargo, es recomendable incluir en la dieta: soya, nueces, semillas, aceites vegetales como de soya,

canola y maíz, aceite de pescado, huevo y carne que contienen alta concentración de ácidos grasos.

El mayor contenido de betalaínas fue encontrado en el estado de mayor madurez. Por otra parte, el mayor contenido de compuestos fenólicos, ácido L-ascórbico e isoascórbico se encontró en garambullos menos maduros, por lo que es recomendable consumir esta fruta tanto en estado muy maduro como menos maduro. La presencia de estos fitoquímicos y su alta capacidad antioxidante que le proporcionan mayormente los compuestos hidrofílicos, proporcionan un alto valor nutricional a la fruta que puede ser de gran importancia para la nutrición y la salud de las personas de poblaciones rurales principalmente. Sin embargo, deberán realizarse estudios para medir la biodisponibilidad y efecto de estos fitoquímicos de manera *in vivo* e *in vitro*, principalmente con los de carácter hidrofílico, así como su efecto ante enfermedades degenerativas. Es recomendable realizar estudios sobre tecnología postcosecha que permita conservar las propiedades y la calidad del garambullo para su comercialización. El garambullo por su alto valor nutricional y requerimientos mínimos de agua y suelo, debe considerarse para el desarrollo de plantaciones comerciales, programas de manejo sostenible, restauración y conservación ecológica.

Bibliografía.

- Ahn, H. S., Jeon, T.I., Lee J. Y., Hwang, S.G., Lim, Y., Park, D. K. 2002. Antioxidative activity of persimmon and grape seed extract: in vitro and in vivo. *Nutrition Ressearch*, 22(11): 1265–1273.
- Álvarez, C., Cachaldora, P., Mendez, J., García-Rebollar, P. 2004. Effects of conjugated linoleic acid addition on its deposition in eggs of laying hens, fed with no other fat source. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 2(2), 203-209.
- Anderson, E. E. 2001. *The cactacea family*. Timber press, Inc. 472-475. Portland, Oregon. USA.
- Andrés-Lacueva, C., Medina-Reimon, A., Llorach, R., Urpi-Sarda, M., Khan, N., Chiva-Blanch, G., Zamora-Ros, R., Rotches-Ribalta, M., Lamuela-Raventós, M. 2010. Phenolic compounds: chemistry and occurrence in fruits and vegetables. P. 53-80. En de la Rosa, L., Alvarez-Padilla, E., González-Aguilar, G. A. (Eds). *Fruit and vegetable phytochemicals, chemistry, nutritional value and stability*. Wiley-Blackwell. John Wiley & Sons, Inc. ISBN 978-0-8138-0320-3. Printed in Singapore.
- Azeredo, H. M. C. 2009. Betalains: properties, sources, applications, and stability—a review. *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 2365-2376.
- Azevedo-Meleiro, C. H., Rodriguez-Amaya, D. B. 2004. Confirmation of the identity of carotenoids of tropical fruits by HPLC-DAD and HPLC-MS. *Journal of Food Composition and Analysis*, 17, 385-396.
- Azizi, S. N., Najafzadeh, S. 2008. Fatty acids and volatile compounds in avocado cultivated in north of Iran. *World Applied Sciences Journal*, 5(1), 01-04.
- Azoulay, T., Harpaz-Saad, S., Belausov, E., Lovat, N., Krokhin, O., Spicer, V., Standing, K., Goldschmidt, E., Eyal, Y. 2008. Citrus chlorophyllase dynamics at ethylene-induced fruit color-break: a study of chlorophyllase expression, posttranslational processing kinetics, and in situ intracellular localization. *Plant Physiology*, 148, 108–118.

- Betés-Saura, C., Andrés-Lacueva, C., Lamuela-Raventós, R. M. 1996. Phenolics in white free-run juice and wines from Penedès by high-performance liquid chromatography: changes during vinification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(10), 3040–3046.
- Björn, L. O., Papageorgiou, G. C., Blankenship R. E., Govindjee. 2009. Review, A viewpoint: why chlorophyll a?. *Photosynthesis Research*, 99, 85–98.
- Borovsky, Y., Paran, I. 2008. Chlorophyll breakdown during pepper fruit ripening in the chlorophyll retainer mutation is impaired at the homolog of the senescence-inducible stay-green gene. *Theoretical and Applied Genetics*, 117, 235–240.
- Bourges, H., Casanueva, E., Rosado, J.L. 2005. Recomendaciones de ingestión de nutrimentos para la población mexicana. Editorial Médica Panamericana. Tomo I.
- Bravo, H. H. 1978. Las cactáceas de México. Universidad Nacional Autónoma de México. Vol. 2 México.
- Breithaupt, D. E., Yahia, E. M., Valdés-Velázquez, F. J. 2007. Comparison of the absorption efficiency of α and β -cryptoxanthin in female wistar rats. *British Journal of Nutrition*, 97, 329–336.
- Breithaupt, D. E., Bamedi, A., 2002. Carotenoids and carotenoids esters in potatoes (*Solanum tuberosum* L.): new insights into an ancient vegetable. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 7175-7181.
- Brown, J. E. 2007. Nutrición en las diferentes etapas de la vida. Segunda edición, Mc Graw Hill. México.
- Cano, M. P., Sánchez Moreno, C., Pascual-Teresa S., Begoña de Ancos. 2005. Procesado mínimo y valor nutricional. p. 119-149. En González-Aguilar, G. A. (Ed). Nuevas tecnologías de conservación de productos vegetales frescos cortados. Centro de investigación en alimentación y desarrollo, A.C. Hermosillo, Sonora, México. ISBN 968-58-6206-0. Logiprint Digital S. de R.L. de C.V.
- Castellanos-Santiago, E., Yahia, E. M. 2008. Identification and quantification of betalains from the fruits of 10 Mexican prickly pear cultivars by high-performance liquid chromatography and electrospray ionization mass

- spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 5758 - 5764.
- Chang, M., Shu, C. 1997. Variation of sugar content in various parts of pitaya fruit. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*. 110, 225-227.
- Chavez-Santoscoy, R., Gutierrez-Urbe, J., Serna-Saldivar., S. 2009. Phenolic composition, antioxidant capacity and in vitro cancer cell cytotoxicity of nine prickly pear (*Opuntia* spp.) juices. *Plant Foods for Human Nutrition*, 64, 146-152.
- Chongkhong, S., Tongurai, C., Chetpattananondh, P., Bunyakan, C. 2007. Biodiesel production by esterification of palm fatty acid distillate. *Biomass and Bioenergy*, 31(8), 563-568.
- Chun, J., Lee, J., Ye, L., Exler, J., Eitenmiller, R. R. 2006. Tocopherol and tocotrienol contents of raw and processed fruits and vegetables in the United States diet. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 196–204.
- Conn, E., Stumpf, p., Bruening, G., Doi, R. 1998. *Bioquímica fundamental*. Limusa, S.A. de C.V. ISBN 968-18-5231-1. México, 285-300.
- Connor, A., Luby, J., Hancock, J., Berkheimer, S., Hanson, E. 2002. Changes in fruit antioxidant activity among blueberry cultivars during cold-temperature storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 893–898.
- Corona, C., Mercado E., Ramírez L. 2007. Efecto del 1-mcp sobre el comportamiento fisiológico postcosecha de garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*). Tesis de licenciatura. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Corral-Aguayo, R. D., Yahia, E. M., Carrillo-López, A., González-Aguilar, G. 2008. Correlation between some nutritional components and the total antioxidant capacity measured with six different assays in eight horticultural crops. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(22), 10498-10504.
- Correa, J. 2009. Efecto de un recubrimiento a base de caseinato de sodio sobre las propiedades fisicoquímicas, mecánicas, sensoriales y

- fitoquímicas funcionales de frutos de garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*). Tesis de maestría. Instituto Tecnológico de Celaya. p. 104.
- Cuttriss, A., Mimica, J., Howitt, C., Pogson, B. 2007. Carotenoids. En Wise, R. and Hooper, K. (eds.). The structure and function of plastids. Springer, 315–334.
- DellaPenna, D., Pogson, P., J. 2006. Vitamin synthesis in plants: tocopherols and carotenoids. Annual Review of Plant Physiology, 57, 711–38.
- Djazayery, A., Jazayery, S. 2008. ω -3 Fatty acids in physical and mental health and disease. P. 309-321. En DeMeester, F. and Watson, R. R. (Eds). Wild-Type Food in Health Promotion and Disease Prevention. Totowa, NJ. ISBN: 978-1-58829-668-9. Humana Press Inc.
- Esteve, M. J., Farré, R., Frígola, A. 1995. Changes in ascorbic acid content of green asparagus during the harvesting period and storage. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 43, 2058-2061.
- Faria, A. F., Rosso, V. V., Mercadante, A. Z. 2009. Carotenoid composition of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*), determined by HPLC-PDA-MS/MS. Plants Foods Human Nutrition, 64, 108-115.
- Fernández de Simón, B., Cadahía, E., Jalocho, J. 2003. Volatile compounds in a Spanish red wine aged in barrels made of Spanish, French, and American oak wood. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51(26), 7671– 7678.
- Fernández-López, J. Castelar, R., Obón, J., Alrnela, L. 2002. Screening and mass-spectral confirmation of betalains in cactus pears. Chromatographia, 56, 591-595.
- Ferrari, R. A., da Silva, V., Scabio, A. 2005. Oxidative stability of biodiesel from soybean oil fatty acid ethyl esters. Scientia Agricola, 62(3), 291-295.
- Folch, J., Lees, M., Sloane-Stanley, H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. Journal of Biological Chemistry, 226. 497-509.
- Gayosso-García Sancho, L. E., Yahia, E. M., Martínez-Téllez, M. A., González-Aguilar, G. A. 2010. Effect of maturity stage of papaya maradol on

- physiological and biochemical parameters. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 5(2), 199-208.
- Georgiev, V., Llieva, M., Bley, T., Pavlov, A. 2008. Betalain production in plant in vitro systems. *Acta Physiol Plant*, 30, 581–593.
- Gu, L., Kelm, M. A., Hammerstone, J. F., Beecher, G., Holden, J., Haytowitz, D., Gebhardt, S., Prior, R. L. 2004. Concentrations of proanthocyanidins in common foods and estimations of normal consumption. *The Journal of Nutrition*, 134(3), 613–617.
- Guzmán-Maldonado, S. H., Herrera-Hernández, G., Hernández-López, D., Reynoso-Camacho, R., Guzmán-Tovar, A., Vaillant, F., Brat, P. 2010. Physicochemical, nutritional and functional characteristics of two underutilised fruit cactus species (*Myrtillocactus*) produced in central México. *Food Chemistry*, 121, 381-386.
- Halvorsen, B., Carlsen, M., Phillips, K., Bohn, S., Holte, K., Jacobs, D., Blomhoff, R. 2006. Content of redox-active compounds (ie, antioxidants) in foods consumed in the United States. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 84, 95–135.
- Hernández-López, D., Vaillant, F., Reynoso-Camacho, R., Guzmán-Maldonado, S. H. 2008. *Myrtillocactus* (cactaceae): botanical, agronomic, physicochemical and chemical characteristics of fruits. *Fruits*, 63, 201-208.
- Hernández, M., Terrazas, T., Delgado, A., Luna, C. 2007. Los estomas de *Mirtillocactus geometrizans* (Mart. Ex. Pfeiff.) console (cactaceae): variación en su área de distribución. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 30(3), 235-240.
- Hernández-Pérez, T., Carrillo-López, A., Guevara-Lara, F., Cruz-Hernández, A., Paredes-López, O. 2005. Biochemical and nutritional characterization of three prickly pear species with different ripening behavior. *Plant Foods for Human Nutrition*, 60, 195-200.
- Hewlett-Packard. 1998. The separation of saturated and unsaturated acids and fames using HP-FFAP and HP-INNOWax Columns, Application note 228-398. Hewlett-Packard Company. Printed in USA.

- Hirawan, R., Yuin Ser, W., Arntfield, S., Beta, T. 2010. Antioxidant properties of commercial, regular and whole-wheat spaghetti. *Food Chemistry*, 119, 258–264.
- Hörtensteinsteiner, S. 2006. Chlorophyll degradation during senescence. *The Annual Review of Plant Biology*, 57, 55-77.
- Horton, R., Moran, L., Ochs, R., Rawn, D., Scrimgeour, K. 1995. *Horton: Bioquímica*. Prentice-hall Hispanoamericana, S.A. ISBN 968-880-474-6. México, 9.1-9.3.
- Huang, D., OU, B., Prior, R. L. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841–1856.
- Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INNSZ). 2001. Ingestión diaria recomendada (IDR) de proteínas, vitaminas y nutrimentos inorgánicos para la población mexicana, <http://quetzal1.innsz.mx/docs/idrinn.pdf> (revisada el 17 de diciembre de 2009).
- Islas-Osuna, M. A., Stephens-Camacho, N. A., Contreras-Vergara, C. A., Rivera-Dominguez, M., Sánchez-Sánchez, E., Villegas-Ochoa, M. A., González-Aguilar, G. A., 2010. Novel postharvest treatment reduces ascorbic acid losses in mango (*Mangifera indica* L.) var. Kent. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 5(3), 342-349.
- Kallio, H., Yang, B., Peippo, P. 2002. Effects of different origins and harvesting time on vitamin C, tocopherols, and tocotrienols in sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides*) berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(21), 6136–6142.
- Kato, M., Yoshinori, I., Hikaru, M., Suglura, M., Hyodo, H., Yano, M. 2004. Accumulation of carotenoids and expression of carotenoid biosynthetic genes during maturation in citrus fruit. *Journal of Plant Physiology*, 134, 824–837.
- Khanal, R. C., Olson, K. C. 2004. Factors affecting conjugated linoleic acid (CLA) content in milk, meat and egg: a review. *Pakistan Journal of Nutrition*, 3(2), 82-98.

- Kim, D. O., Heo, H. J., Kim, Y. J., Yang, H. S., Lee, C. Y. 2005. Sweet and sour cherry phenolic and their protective effects on neuronal cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 9921–9927.
- Kistrup, V., Jensen, C., Danielsen, B., Bertelsen, G. 2002. Quality changes in orange juice packed in materials based on polylactate. *European Food Research and Technology*, 214, 423-428.
- Kugler, F., Stintzing, F., Carle, R. 2007. Characterisation of betalain patterns of differently coloured inflorescences from *Gomphrena globosa* L. and *Bougainvillea* sp. by HPLC–DAD–ESI–MSⁿ. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387, 637-648.
- Kujala, T., Loponen, J. M., Klika, K. D., Pihlaja, K. 2000. Phenolics and betacyanins in red beetroot (*Beta vulgaris*) root: distribution and effect of cold storage on the content of total phenolics and three individual compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 5338-5342.
- Kvasnicka, F., Copíková, J., Sevcík, R., Krátká, J., Syntytsia, A., Voldrich, M. 2008. Detremination of phenolic acids by capillary zone electrophoresis and HPLC. *Central European Journal of Chemistry*, 6(3), 410-418.
- Kvesitadze, G., Kalandiya, A., Papunidze, S., Vanidze, M. 2001. Identification and quantification of ascorbic acid in kiwi fruit by high-performance liquid chromatography. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 37(2), 215-218.
- Lamuela-Raventós, R. M., Andrés-Lacueva, C., Permanyer, J., Izquierdo-Pulido, M. 2001. More antioxidants in cocoa. *Journal of Nutrition*, 130, 2109S–2114S.
- Li, P., Wang, X. Q., Wang, H. Z., Wu, Y. N. 1993. High performance liquid chromatographic determination of phenolic acids in fruits and vegetables. *Biomedical and Environmental Sciences*, 6(4), 389–398.
- Li, W., Shan, F., Sun, S., Corke, H., Beta, T. 2005. Free radical scavenging properties and phenolic content of chinese black-grained wheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 8533–8536.
- Liu, Q., Singh, S., Green, A. 2002. High-oleic and high-stearic cottonseed oils: nutritionally improved cooking oils developed using gene silencing. *Journal of the American College of Nutrition*, 21(3), 205S–211S.

- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5), 727–747.
- Mandal, S. M., Dey, S. 2008. LC-MALDI-TOF MS-Based rapid identification of phenolic acids. *Journal of Biomolecular Techniques*, 19(2), 116-121.
- Manthey, J. A., Perkins-Veazie, P. 2009. Influences of harvest date and location on the levels of β -carotene, ascorbic acid, total phenols, the in vitro antioxidant capacity, and phenolic profiles of five commercial varieties of mango (*Mangifera indica* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 10825-10830.
- Mariod, A. A., Matthäus, B., Idrís, Y. M., Abdelwahab, S. I. 2009. Fatty acids, tocopherols, phenolics and the antimicrobial effect of sclerocarya birrea kernels with different harvesting dates. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 87(4), 377-384.
- Markowski, J., Plocharski, W. 2006. Determination of phenolic compounds in apples and processed apple products. *Journal of Fruit and Ornamental Plant*, 14(2), 133-142.
- Matsumoto, H., Ikoma, Y., Kato M., Kuniga, T., Nakajima, N., Yoshida, T. 2007. Quantification of carotenoids in citrus fruit by LC-MS and comparison of patterns of seasonal changes for carotenoids among citrus varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 2356-2368.
- Mattila, P., Hellström, J., Törrönen, R. 2006. Phenolic acids in berries, fruits, and beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(19), 7193–7199.
- Mattila, P., Kumpulainen, J. 2002. Determination of free and total phenolic acids in plant-derived foods by HPLC with diode array detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3660-3667.
- Mazzini, F., Pescitelli, G., Di Bari, L., Netscher, T., Salvadori, P. 2009. Circular dichroism of tocopherols versus tocotrienols. *Chirality*, 21, 35–43.
- Mercadante, A. Z., Rodriguez-Amaya, D. B., Britton, G. 1997. HPLC and mass spectrometric analysis of carotenoids from Mango. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45,120-123.

- Mertz, C., Cheynier, V., Günata, Z., Brat, P. 2007. Analysis of phenolic compounds in two blackberry species (*Rubus glaucus* and *Rubus adenotrichus*) by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ion trap mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 8616–8624.
- Minolta, 1994. *Precise color communication, color control from feeling to instrumentation*. Press, Japan.
- Moneruzzaman, K. M., Hossain, A.B.M.S., Sani, W., Saifuddin M. 2008. Effect of stages of maturity and ripening conditions on the biochemical characteristics of tomato. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 4(4), 336-344.
- Moreno, A., García, C., Gil, I., Gil, A. 2008. Betalains in the era of global agri-food science, technology and nutritional health. *Phytochem Rev*, 7, 261–280.
- Nair, M., Joy, J., Vasudevan, Hinckley, L., Hoagland. T., Venkitanarayanan, K. 2005. Antibacterial effect of caprylic acid and monocaprylin on major bacterial mastitis pathogens. *Journal Dairy Science Association*, 88, 3488–3495.
- Nollet, M. L. 2000. *Food analysis by HPLC*. Segunda edición. Marcel Dekker. New York.
- Novita, M. 2008. Postharvest quality of red pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) as affected by harvest date, storage duration and 1-methylcyclopropene. Tesis de maestría, Facultad de agricultura. Universidad de Putra Malasia.
- Odutuga, A. A., Asemota, H. N., Musac, I., Golden, K. D., Kean, E. A. 1992. Fatty acid composition of arilli from ackee fruit (*Blighia sapida*). *Jamaican Journal of Science and technology*, 3, 30-32.
- Oladiji, A. T., Shoremekun, K. L., Yakubu, M. Y. 2009. Physicochemical properties of the oil from the fruit of *blighia sapida* and toxicological evaluation of the oil-based diet in wistar rats. *Journal of Medicinal Food*, 12(5), 1-9.

- Oliva, M. L., Shannon, J. G., Sleper, D. A., Ellersieck, M. R., Cardinal, A. J., Paris, R. L., Lee, J. D. 2006. Stability of fatty acid profile in soybean genotypes with modified seed oil composition. *Crop Science Society of America*, 46, 2069–2075.
- Ornelas-Paz, J., Yahia, E. 2004. Effects of prestorage dry and humid hot air treatments on the quality, triglycerides and tocopherol contents in ‘hass’ avocado fruit. *Journal of Food Quality*, 27, 115-126.
- Ornelas-Paz, J., Yahia, E. M., Gardea-Bejar, A. 2007. Identification and quantification of xanthophyll esters, carotenes, and tocopherols in the fruit of seven mexican mango cultivars by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-time-of-flight mass spectrometry [LC-(APCl⁺)-MS]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 6628 – 6635.
- Ornelas-Paz, J., Yahia, E. M., Gardea-Bejar, A. 2008. Changes in external and internal color during postharvest ripening of manila and ataulfo mango fruit and relationship with carotenoid content determined by liquid chromatography-APCl⁺-time-of-flight mass spectrometry. *Postharvest Biology and technology*, 50, 145 –152.
- Oyvind, M., Kenneth R. 2006. *Flavonoids chemistry, biochemistry and applications*. CRC Taylor & Francis Group. Boca Raton London New York.
- Paisley, R. 1997. *Mis whole cell fatty acid analysis by gas chromatography, training manual*. MIDI INC. En Hewlett Packard. The separation of saturated and unsaturated acids and fames using HP-FFAP and HP-INNOWax Columns. Application note 228-398.
- Pellegrini, N., Serafini, M., Colombi, B., Del Rio, D., Salvatore, S., Bianchi, M., Brighenti, F. 2003. Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *Journal of Nutrition*, 133, 2812–2819.
- Puupponen-Pimiä, R., Hanna-Leena, A., Kirsi-Marja, O. 2005. Bioactive berry compounds-novel tools against human pathogens. *Journal Microbiol Biotechnol*, 67, 8-18.

- Ramírez-Padilla, G. K., Yahia, E. M., Carrillo-Lopez, A. 2009. Carotenoid content of five fruits and vegetables and their bioconversion to vitamin A measure by retinol accumulation in rat livers. *Acta horticulturae* 841. P. 619-623.
- Rivera-Pastrana, D. M., Yahia, E. M. and G. González-Aguilar. 2009. Identification of phenolic and carotenoid compounds in *Carica papaya* fruit by liquid chromatography – mass spectrometry. *Acta Horticulturae*. In press.
- Reynoso, R. 1995. Extracción, caracterización, estabilidad durante almacenamiento y pruebas toxicológicas del pigmento de garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*). Tesis de maestría. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Reynoso, R., Garcia, F., Morales, D., Gonzalez de Mejia, E. 1997. Stability of betalain pigments from a cactacea fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 2884–2889.
- Roca, M., Minguez-Mosquera, M. I. 2006. Chlorophyll catabolism pathway in fruits of *capsicum annum* (L.): stay-green versus red fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4035–4040.
- Ros, E., Mataix, J. 2006. Fatty acid composition of nuts—implications for cardiovascular health. *British Journal of Nutrition*, 96(2), S29–S35.
- Scheinvar, L. 2004. Flora cactológica del estado de Querétaro: diversidad y riqueza. Primera edición. Fondo de Cultura Económica. México, D.F. p. 195-199.
- Schreiner, M., Huyskens-Keil, S., Peters, P., Widell, S., Schonhof, I., Krumbein, A. 2000. Importance of product color for total quality management. p. 109-117. En Florkowski, W.J., Prussia, S. E., Shewfelt R. L. (Ed). *International multidisciplinary conference: integrated view of fruit & vegetable quality*. ISBN 1-58716-019-6. Technomic Publishing Company, Inc.
- Sellappan, S., Akoh, C., Krewer, G. 2002. Phenolic compounds and antioxidant capacity of georgia-grown blueberries and blackberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2432-2438.

- Shier, W. T., Shier, A. C., Xie, W., Mirocha, C. J. 2001. Structure-activity relationships for human estrogenic activity in zearalenone mycotoxins. *Toxicol*, 39(9), 1435–1438.
- Shivashankara, K., Isobe, S., Al-Haq, M., Takenaka, M., Shiina, T. 2004. Fruit antioxidant activity, ascorbic acid, total phenol, quercetin, and carotene of irwin mango fruits stored at low temperature after high electric field pretreatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1281–1286.
- Simopoulos, A. P. 1999. Essential fatty acids in health and chronic disease. *American Journal of Clinical Nutrition*, 70, 560S-569S.
- Spiegel, M. R., Stephens L. J., 1999. Theory and problems of statistics. Tercera edición, McGraw-Hill. Estados Unidos de América. ISBN 0-07-060281-6. p. 530.
- Srinivasan, M., Sudheer, A. R., Menon, V. P. 2007. Ferulic acid: therapeutic potential through its antioxidant property. *Journal of Clinical biochemistry and Nutrition*, 40, 92-100.
- Stintzing, F. C., Herbach, K., Mosshammer, M., Carle, R., Yi, W., Sellappan, S., Akoh, C., Bunch, R., Felker, P. 2005. Color, betalain pattern, and antioxidant properties of cactus pear (*Opuntia* spp.) clones. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 442–451.
- Stintzing, F. C., Schieber, A., Carle, R. 2002. Identification of betalains from yellow beet (*Beta vulgaris* L.) and cactus pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.] by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2302-2307.
- Sohn, Y. T., Oh, J. H. 2003. Characterization of physicochemical properties of ferulic acid. *Archives of Pharmacal Research*, 26(12), 1002-1008.
- Soler-Rivas, C., Espín, J. C., Wichers, H. J. 2000. Oleuropein and related compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 1013–1023.

- Soto-Zamora, G., Yahia, E., Brecht, J., Gardea, A. 2005. Effects of postharvest hot air treatments on the quality and antioxidant levels in tomato fruit. *Journal LWT - Food Science and Technology*, 38, 657-663.
- Strobel, P., Allard, C., Perez-Acle, T., Calderon, R., Aldunate, R., Leighton, F. 2005. Myricetin, quercetin and catechin-gallate inhibit glucose uptake in isolated rat adipocytes. *Biochemistry Journal*, 386, 471-478.
- Tanaka, Y., Sasaki, N., Ohmiya, A. 2008. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *The Plant Journal*, 54, 733-749.
- Taubert, D., Grimberg, G., Schomig, E. 2005. Tannic acid in plant dust causes airway obstruction. *Thorax*, 60(9), 789–791.
- Timko, M. 1998. Pigment biosynthesis: chlorophylls, heme, and carotenoids. P. 377-414. En Rochaix, M., Goldschmidt-Clermont and S. Merchant (eds). *The molecular biology of chloroplasts and mitochondria in chlamydomonas*, Kluwer Academic Publishers. Printed in The Netherlands.
- Tolonen, M. 1995. *Vitaminas y minerales en la salud y la nutrición*. Editorial ACRIBIA, S.A. Zaragoza, España.
- Tosun, M., Ercisli, S., Karlidag, H., Sengul, M. 2009. Characterization of red raspberry (*Rubus idaeus* L.) genotypes for their physicochemical properties. *Journal of Food Science*, 74, 1-5.
- Tovar, M. J., Motilva, M. J., Romero, M. P. 2001. Changes in the phenolic composition of virgin olive oil from young trees (*Olea europaea* L. cv. Arbequina) grown under linear irrigation strategies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5502–5508.
- Tsao, R., McCallum, J. 2010. Chemistry of flavonoids. P. 131-153. En de la Rosa, L., Alvarez-Padilla, E., González-Aguilar, G. A. (Eds). *Fruit and vegetable phytochemicals, chemistry, nutritional value and stability*. Wiley-Blackwell. John Wiley & Sons, Inc. ISBN 978-0-8138-0320-3. Printed in Singapore.
- Undurti, N. D. 2006. Essential fatty acids: biochemistry, physiology and pathology. *Biotechnology Journal*, 1, 420-439.

- U.S. Department of Agriculture. 2004. USDA database for the proanthocyanidin content of selected foods. Beltsville, MD: USDA. <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/Data/PA/PA.html> (revisada el 9 de agosto de 2010).
- U.S. Department of Agriculture. 2007a. USDA database for the flavonoid content of selected foods. Beltsville, MD: USDA, <http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/12354500/Data/Flav/Flav02-1.pdf> (revisada el 9 de agosto de 2010).
- U.S. Department of Agriculture. 2007b. USDA–Iowa state university database on the isoflavone content of foods. Beltsville, MD: USDA, <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/Data/isoflav/isoflav.html> (revisada el 9 de agosto de 2010).
- U.S. Department of Agriculture. 2010. Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids (2002/2005), <http://www.iom.edu/Global/News%20Announcements/~media/C5CD2DD7840544979A549EC47E56A02B.ashx> (revisada el 25 de junio de 2010).
- Valencia, M. E., Robles-Sardin, A. E. 2005. El valor nutrimental y protector de las frutas y verduras en la dieta humana. p. 1-10. En González-Aguilar, G. A. (Ed). Nuevas tecnologías de conservación de productos vegetales frescos cortados. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Hermosillo, Sonora, México. ISBN 968-58-6206-0. Logiprint Digital S. de R.L. de C.V.
- Vallejo, F., Tomás-Barberán, F. A., Ferreres, F. 2004. Characterisation of flavonols in broccoli (*Brassica oleracea* L. var. italica) by liquid chromatography-UV diode-array detection-electrospray ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1054(1–2), 181–193.
- Van Hoed, V., De Clercq, N., Echim, C., Andjelkovic, M., Leber, E., Dewettinck, K., Verhé, R. 2009. Berry seeds: a source of specialty oils with high content of bioactives and nutritional value. *Journal of Food Lipids*, 16, 33–49.

- Walker, E. B. 2007. HPLC analysis of selected xanthenes in mangosteen fruit. *Journal of Separation Science*, 30(9), 1229–1234.
- Walters, D., Raynor, L., Mitchell, A., Walker, R., Walker, K. 2004. Antifungal activities of four fatty acids against plant pathogenic fungi. *Mycopathology*, 157, 87–90.
- Wang, S., Lin, H. S. 2000. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 140–146.
- Warner, K., Mounts, T. 1990. Analysis of tocopherols and phytosterols in vegetable oils by HPLC with evaporative light-scattering detection. *Journal of American Oil Chemists´ Society*, 67(11), 827-831.
- Wojdylo, A., Oszmianski, J., Laskowski, P. 2008. Polyphenolic compounds and antioxidant activity of new and old apple varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 6520-6530.
- Yahia, E. M., Contreras-Padilla, M., González-Aguilar, G. 2001. Ascorbic acid content in relation to ascorbic acidoxidase activity and polyamine content in tomato and bell pepper fruits during development maturation and senescence. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol*, 34, 452-457.
- Yahia, E. M., El Tamzini, M. I., El Saied, A. A., Al Yateem, S. E. 2008. Training manual on postharvest handling and marketing of horticultural commodities. ISBN 978-92-5-106036-0. FAO. p. 9-23.
- Yahia, E. M., Ornelas-Paz, J. J. 2010. Chemistry, stability and biological actions of carotenoides. 177- 184. En de la Rosa, L., Alvarez-Padilla, E., González-Aguilar, G. A. (Eds). *Fruit and vegetable phytochemicals, chemistry, nutritional value and stability*. Wiley-Blackwell. John Wiley & Sons, Inc. ISBN 978-0-8138-0320-3.
- Yahia, E. M., Soto, G., Brecht, J. K., Gardea, A. 2007. Postharvest hot air treatment effects on the antioxidant system in stored mature-green tomatoes. *Postharvest Biology and Technology*, 44, 107-115.
- Zuo, Y., Wang, C., Zhan, J. 2002. Separation, characterization, and quantitation of benzoic and phenolic antioxidant in american cranberry fruit by GC-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3789-3794.

