



**UNIVERSIDAD MICHOCANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**

**FACULTAD DE AGROBIOLOGÍA “PRESIDENTE
JUÁREZ”**

**OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE POLIFENOLES DE
FRUTOS DE *Rubus* spp., *Styrax ramirezii* Greenm Y *Vaccinium*
spp. CON POTENCIAL NUTRACÉUTICO, COLECTADOS EN
MICHOCÁN**

Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias Biológicas

Presenta:

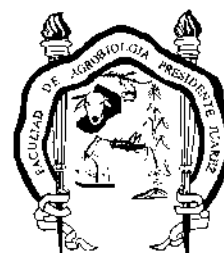
JORGE LUIS GUERRERO MEDINA

Director de tesis:

Dr. en Ciencias de las Plantas PEDRO ANTONIO GARCÍA SAUCEDO

Codirector:

Ph.D. in Plant Science OCTAVIO PAREDES LÓPEZ



Agosto de 2013

Esta tesis se desarrolló en la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez” de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la asesoría y dirección del Dr. Pedro Antonio García Saucedo, la co-dirección del Dr. Octavio Paredes López y la valiosa colaboración y asesoría de los Doctores Mary Ann Lila, Mary H. Grace y Gad G. Yousef del Plants for Human Health Institute (PHHI) de la Universidad Estatal de Carolina del Norte (NCSU) Carolina del Norte, EUA.

Dedico este trabajo

A Dios creador y fuente de sabiduría, por la vida que me prestó para consolidar este proyecto.

A mi amada esposa Claudia por su apoyo que me alentó a lograr la conclusión de este objetivo.

A mis hijos Claudia, Jorge y Maritza que son la razón de mi existencia y de mis esfuerzos

A mis padres Jorge Guerrero y Estela Medina, que me han prodigado su amor y apoyo incondicional.

A mis familiares que me alentaron con sus palabras y demostraciones de afecto.

A todos los que durante este proceso me extendieron su mano y aconsejaron.

Agradezco especialmente

A Pedro mi asesor que generosamente me dedico su valioso tiempo y conocimientos sin lo cual no hubiera sido posible este logro.

A los Doctores en Ciencias Mary Ann Lila, Mary H. Grace, y Gad Yousef por su atención y guía durante mi estancia en el PHHI de North Carolina Research Campus.

A Rigoberto Guzmán y toda su familia por su hospitalidad y generosidad.

A mis amigos Charles Warlick y su esposa Susan Warlick que me abrieron las puertas de su casa y me cuidaron durante mi estancia en Kannapolis.

A la Sra. Lupe C. Tondee que estuvo al pendiente de mí mientras estuve en Kannapolis.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| 1. Introducción | 1 |
| 2. Marco teórico | 2 |
| 2.1 Frutos | 2 |
| 2.1.1 Importancia comercial y económica de los frutos en México | 3 |
| 2.1.2 Importancia de los frutos en la alimentación y la salud | 4 |
| 2.2 Frutillas | 5 |
| 2.2.1 Mamuyo | 6 |
| 2.2.2 Arándano | 8 |
| 2.2.3 Zarzamora | 10 |
| 2.3 Polifenoles | 13 |
| 2.3.1 Clasificación de polifenoles | 14 |
| 2.3.2 Propiedades de los polifenoles | 18 |
| 2.3.3 Propiedades nutraceuticas de los polifenoles | 19 |
| 2.3.3.1 Antocianinas | 20 |
| 2.3.3.1.1 Propiedades de las antocianinas | 22 |
| 2.3.3.1.2 Propiedades nutraceuticas de las antocianinas | 23 |
| 2.3.3.2 Taninos | 26 |
| 2.3.3.2.1 Propiedades de los taninos | 28 |
| 2.3.3.2.2 Propiedades nutraceuticas de los taninos | 29 |
| 2.4 Análisis de polifenoles | 32 |
| 2.4.1 Extracción de polifenoles | 32 |
| 2.4.2 Separación de polifenoles | 34 |
| 2.4.2.1 Cromatografía de capa fina | 34 |
| 2.4.2.2 Extracción en fase sólida | 34 |
| 2.4.2.3 Cromatografía de alta velocidad a contracorriente | 35 |
| 2.4.2.4 Filtración por membranas | 35 |
| 2.4.2.5 Cromatografía líquida de alto desempeño | 36 |
| 3. Justificación | 37 |
| 4. Objetivos | 38 |
| 4.1 Objetivo general | 38 |
| 4.2 Objetivos específicos | 38 |
| 5. Materiales y métodos | 39 |
| 5.1 Materiales Vegetales | 39 |
| 5.2 Reactivos | 40 |
| 5.3 Obtención de extractos polifenólicos | 40 |
| 5.4 Cuantificación de antocianinas por HPLC | 42 |
| 5.5 Análisis de polifenoles totales | 42 |
| 5.6 Cuantificación de proantocianidinas | 43 |
| 5.7 Cuantificación de flavonoides totales | 43 |

| | |
|--|----|
| 5.8 Medición de la capacidad antioxidante por DPPH | 44 |
| 5.9 Identificación y cuantificación de compuestos por espectrometría de masas LC- MS-TOF | 44 |
| 5.10 Análisis de identificación cualitativa de proantocianidinas en muestras de mamuyo por HPLC | 45 |
| 5.11 Identificación de compuestos por espectrometría de masas LCMS ⁿ -IT-TOF | 45 |
| 5.12 Análisis estadístico | 45 |
| 6. Resultados y discusión | 46 |
| 6.1 Ubicación de especies y descripción de morfoespecies silvestres | 46 |
| 6.2 Obtención de extractos polifenólicos | 47 |
| 6.3 Cuantificación de antocianinas por HPLC | 51 |
| 6.4 Cuantificación de polifenoles totales por Folin-Ciocalteau | 53 |
| 6.5. Cuantificación de proantocianidinas por DMAC | 56 |
| 6.6 Flavonoides totales | 57 |
| 6.7 Capacidad antioxidante por DPPH | 58 |
| 6.8 Identificación cualitativa de catequina y procianidinaB2 de mamuyo por HPLC-DAD | 61 |
| 6.9 Cuantificación de taninos hidrolizables e identificación de polifenoles de zarzamoras y arándano por LC-MS-TOF | 62 |
| 6.10 Identificación de compuestos fenólicos de mamuyo por espectrometría de masas LC-MS ⁿ -IT-TOF | 68 |
| 7. Conclusiones | 72 |
| 8. Referencias | 73 |

1. INTRODUCCIÓN

La demanda de información sobre el contenido de nutraceuticos en frutas se ha incrementado, pues es sabido que existe una relación directa entre su ingesta y beneficios en la salud (Paredes-López y col., 2010; Lila, 2007). Esto es atribuible a sus compuestos fitoquímicos como vitaminas, carotenoides y polifenoles, que tienen actividad biológica y pueden ayudar a disminuir la probabilidad de desarrollar enfermedades crónicas como afecciones cardíacas, problemas oncológicos, inflamatorios (Stevenson y Hurst, 2007) y de diabetes (Kellog y col., 2010) entre otros. Entre los compuestos bioactivos destacan los polifenoles gracias a sus propiedades antioxidantes. Los polifenoles pueden clasificarse en flavonoides, ácidos fenólicos, taninos, estilbenos y lignanos (Ignat y col., 2011). Las antocianinas son flavonoides responsables de la coloración de muchas flores y frutos, sobresalen por su amplia gama de colores, su actividad antioxidante y la gran cantidad de diferentes moléculas que se han reportado de estas.

México es un país con gran biodiversidad y cuenta con especies vegetales cuyo análisis de compuestos nutraceuticos es importante para caracterizarlos y poder promover la introducción de nuevas fuentes de frutos con compuestos antioxidantes, resaltar sus propiedades para incrementar su aceptación en el mercado y aprovechar sus compuestos fitoquímicos para potenciar el valor de productos alimenticios elaborados con estos. Son particularmente interesantes los frutos silvestres, ya que tienen altos niveles de compuestos fenólicos (Cuevas-Rodríguez y col., 2010) y contienen la información genética esencial para el desarrollo de cultivares de características nutraceuticas importantes. En el estado de Michoacán, se cuenta con especies vegetales tanto silvestres como cultivadas, con cualidades nutraceuticas, su análisis es importante para tener la información que permita evaluar su potencial como una fuente de alimento rica en compuestos bioactivos, por ello, en el presente trabajo se reporta la caracterización de antocianinas, una fracción de los polifenoles y la actividad antioxidante de frutos silvestres de *Rubus spp.* y *Styrax ramirezii*, así como de dos variedades no comerciales de *Vaccinium* colectados en el estado de Michoacán.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Frutos

Fruto es el órgano procedente de la flor que contiene las semillas. En las angiospermas, el o los carpelos se transforman en el pericarpio y los óvulos en las semillas. El pericarpio consta de: Epicarpio, que es la parte externa, pudiendo ser lisa como en el tomate, cerosa como en las uvas, glandulosa como en los cítricos, o pubescente como en el durazno; Mesocarpio, el cual se desarrolla a partir del mesófilo y genera carbohidratos, pigmentos, vitaminas, y fibras; Endocarpio, que es la parte interna que rodea las semillas. Los frutos pueden ser clasificados como simples, agregados, múltiples y/o accesorios. Los frutos simples provienen de flores con un solo carpelo o varios carpelos unidos entre sí, por ejemplo el tomate (*Solanum lycopersicum*). Los frutos agregados provienen de flores con gineceos formados por varios carpelos que se hallan libres como en las zarzamoras (*Rubus* spp.) o las fresas (*Fragaria* spp.). El fruto múltiple proviene de una inflorescencia como en el caso de las moras (*Morus* spp.). Si cualquiera de los frutos anteriormente descritos tiene tejido extracarpelar se conocen como frutos accesorios por ejemplo la manzana (*Malus* spp.). De acuerdo con las características del fruto, estos pueden ser considerados como frutos secos o carnosos, los frutos carnosos a su vez se dividen de acuerdo a su origen en, bayas, balaustas, conocarpos, drupas, hesperídios, nuculanios, pepónides, pomos, pseudobayas, siconos y sorosis, ejemplos de cada uno de estos puede encontrarse en el Cuadro 1.

Los frutos facilitan la dispersión de la semilla gracias al atractivo que presentan para los frugívoros que se alimentan con ellos. Se piensa que existe una estrecha relación entre las características de frugívoros y frutos, producto de una coevolución, esta relación puede ser el origen del desarrollo de pigmentos en los frutos puesto que en un momento donde la competencia por la reproducción es fuerte, hay una ventaja para el individuo que sobresalga para ser seleccionado.

Cuadro 1 Tipos de frutos de acuerdo a su morfología y origen.

| Tipo de fruto | Descripción | Ejemplos |
|----------------------|--|---|
| Bayas | Fruto carnoso, derivado de ovario súpero con el epicarpio delgado y el mesocarpio y endocarpio jugosos | Uva (<i>Vitis vinifera</i>) |
| Balaustas | Fruto carnoso, de ovario ínfero, pluriseminado con las semillas con episperma jugoso | Granada (<i>Punica granatum</i>), Maracuyá (<i>Passiflora edulis</i>), |
| Conocarpos | Fruto carnoso, formado por varios aquenios derivados cada uno de un carpelo dispuestos sobre un receptáculo cónico carnoso | Zarzamora (<i>Rubus</i> spp.), Fresa (<i>Fragaria</i> spp.) |
| Drupas | Fruto carnoso, derivado de ovario súpero, unicarpelar, uniseminado con el endocarpio óseo (carozo), el mesocarpio carnoso y el epicarpio delgado | Durazno (<i>Prunus persica</i>) |
| Hesperidios | Fruto carnoso, derivado de ovario súpero, pluricarpelar, pluriseminado con el epicarpio glanduloso, el mesocarpio corchoso y el endocarpio con pelos glandulares jugosos | Naranja (<i>Citrus sinensis</i>) |
| Nuculanios | Fruto carnoso, derivado de un ovario ínfero, pluricarpelar, pluriseminado, cada semilla encerrada por un carozo | Tejocote (<i>Crataegus</i> spp.) |
| Pepónides | Fruto carnoso, derivado de ovario ínfero, pluricarpelar, pluriseminado con el receptáculo esclerificado llamado clamidocarpio generalmente grande unilocular, con placentas carnosas | Calabaza (<i>Cucurbita</i> spp.), Melón (<i>Cucumis melo</i>), Sandía (<i>Citrullus lanatus</i>) |
| Pomos | Fruto carnoso, derivado de ovario ínfero, pluricarpelar, pluriseminado con endocarpio membranoso, y rodeado por el receptáculo muy desarrollado que constituye la mayor parte comestible | Manzana (<i>Malus</i> spp.), Pera (<i>Pyrus</i> spp.) |
| Seudobayas | Es una baya derivada de ovario ínfero | Platano (<i>Musa paradisiaca</i>), Guayaba (<i>Psidium guajava</i>), Tuna (<i>Opuntia</i> spp.) |
| Siconos | Fruto compuesto, carnoso, con las flores unisexuales dispuestas dentro de un receptáculo acopado con un poro en el extremo. Las flores femeninas originan aquenios que quedan envueltos por el receptáculo | Higo (<i>Ficus carica</i>) |
| Sorosis | Fruto compuesto, carnoso, generalmente formado por pequeñas drupas ubicadas sobre un receptáculo convexo, común | Moras (<i>Morus</i> spp.), Piña (<i>Ananas comosus</i>) |

2.1.1 Importancia comercial y económica de los frutos en México.

México es un país con importante producción de diversos frutos como aguacate, papaya, limón, sandía, fresa y mango entre otros. Hasta abril de 2013, el sector agropecuario empleó formalmente a 494 419 personas (INEGI, 2013), y un total de 22.1 millones de hectáreas fueron dedicadas a la producción de cultivos, lográndose un valor de la

producción de 354.6 miles de millones de pesos (SAGARPA-SIAP, 2013). Aun cuando en el mercado nacional se consume alrededor del 75% de la producción total de frutas y hortalizas, hasta 2009 México era el principal país exportador de frutas y hortalizas de América Latina (Macías, 2010). De acuerdo con Ayala y col. (2011) la fruticultura en el país es una de las pocas actividades del sector rural con balanza comercial positiva, ya que se exportaron 4.5 veces más frutos que los importados desde 1961 hasta 2006. De enero de 2012 a marzo de 2013, se exportaron frutales a 59 países por un monto de aproximadamente 4 713 millones de dólares (SAGARPA-SICAGRO, 2013), lo que representa cerca del 1% del valor de las exportaciones totales de México para el mismo periodo (INEGI, 2013). No obstante el desempeño del país en exportación de frutas, la competitividad del sector presenta diversos fenómenos que inciden en la economía, tales como la concentración del manejo de la producción en pocos grandes productores, la pobre diversidad de cultivos producidos a nivel competitivo para la exportación, la explotación irracional de recursos naturales y cambio de uso de suelo (Macías, 2010), factores que son oportunidades para equilibrar y fortalecer el panorama productivo con la introducción de nuevos cultivos o la mejora de especies originarias del país que permitan ofrecer frutos con un valor agregado como fuentes importantes de antioxidantes. En lo referente a la industrialización de frutas, el INEGI (2011) a través de sus series estadísticas sectoriales reportó una cantidad de 1153 unidades económicas dedicadas a la conservación de frutas, verduras y alimentos preparados con un total de 51682 personas ocupadas, generando un valor de la producción de casi 53 mil millones de pesos. El valor comercial de frutales en México, la cantidad de países a los que se exporta y las posibilidades de desarrollo de nuevos frutales, muestran un importante potencial para el desarrollo económico, científico y tecnológico del país a través del conocimiento de las especies y sus fitoquímicos.

2.1.2 Importancia de los frutos en la alimentación y la salud.

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, las frutas y verduras son parte esencial de la dieta diaria y se aconseja su consumo en cantidades de 400 gramos por día (excluyendo papas y tubérculos feculentos), para contribuir a la prevención de enfermedades vasculares y/o crónico-degenerativas, además recomienda a los países, que al

implementar políticas y directrices dietéticas nacionales, consideren un aumento en el consumo de frutas y verduras (OMS, 2013). Los frutos son ricos en nutrientes como carbohidratos, lípidos y minerales, contienen además fibras y compuestos bioactivos que ayudan a regular y proteger las funciones celulares colaborando a mantener un adecuado estado de salud. Estudios de la relación entre el consumo de frutas y la salud, han reportado una correlación inversa entre el consumo de frutas y los niveles de incidencia de cáncer (Vainio *et al.*, 2006), afecciones cardíacas (Dauchet y col., 2009), diabetes (Kurotani y col., 2013), problemas de osteoporosis (Hamidi *et al.*, 2011), problemas oculares y de la vista (Abdel-Aal y col., 2013), desarrollo de la enfermedad de Parkinson (Gao y col., 2012) y en combinación con el ejercicio y una dieta adecuada, previenen contra la obesidad (Alinia y col., 2009).

2.2 Frutillas

Frutilla es el término utilizado para designar los frutos de diferentes especies que comparten como características distintivas su tamaño y colorido, incluyen diferentes especies de los géneros *Rubus*, *Vaccinium*, *Fragaria*, *Prunus*, *Viburnum*, *Ribes*, *Empetrum*, *Sambucus*, *Sorbus*, *Hippophae* y recientemente se han considerado también algunas especies de *Punica*, *Lycium*, *Garcinia*, *Euterpe* y *Aristotelia* (Seeram, 2008). Las frutillas han cobrado especial importancia debido a sus compuestos nutraceuticos, particularmente sus polifenoles (Paredes-López y col., 2010) cuya actividad biológica incide positivamente en la salud humana (Cuadro 2). Estudios sobre frutos silvestres de diversas partes del mundo buscan caracterizar sus compuestos fitoquímicos para identificar fuentes potenciales de nuevas frutillas con atractivo comercial. Históricamente, México ha aportado al mundo diversos vegetales comestibles como el cacao, maíz, tomate, algunas especies de chile, y tiene la posibilidad de desarrollar nuevos materiales gracias a su riqueza en la diversidad de especies vegetales.

Cuadro 2. Ejemplos de frutillas y sus principales compuestos fenólicos con efecto en la salud

| Nombre científico | Nombre común | Compuestos polifenólicos | Ref. |
|------------------------------|--------------------------------|---|------|
| <i>Aristotelia Chilensis</i> | Maqui (Maquiberry) | Antocianinas y proantocianidinas | a |
| <i>Aronia melanocarpa</i> | Aronia (Chokeberry) | Proantocianinas, antocianinas, ácidos fenólicos | b |
| <i>Empetrum nigrum</i> | Bayas de cuervo (Crowberry) | Antocianinas, flavonoles | c |
| <i>Euterpe oleracea</i> | Asaí (Açaiberry) | Antocianinas y proantocianidinas | d |
| <i>Fragaria ananassa</i> | Fresa (Strawberry) | Antocianinas, taninos hidrolizables, ácidos fenólicos y catequina | e |
| <i>Garcinia mangostana</i> | Mangonstino (Mangosteen) | Antocianinas, proantocianidinas, xantonas y ácidos fenólicos | f |
| <i>Ribes uva crisper</i> | Grosella espinosa (Gooseberry) | Ácidos fenólicos y flavonoles | g |
| <i>Rubus adenotrichos</i> | Zarzamora (Blackberry) | Antocianinas, proantocianidinas, elagitaninos, | h |
| <i>Rubus idaeus</i> | Frambuesa roja (Raspberry) | Antocianinas, proantocianidinas, ácidos fenólicos y elagitaninos | e |
| <i>Sambucus nigra</i> | Moras de sauco (Elderberry) | Antocianinas, flavonoles y ácidos fenólicos | i |
| <i>Vaccinium corymbosum</i> | Mora azul (Blueberry) | Antocianinas, proantocianidinas, flavonoles y ácidos fenólicos | j,k |
| <i>Vaccinium macrocarpon</i> | Arándanos rojos (Cranberry) | Antocianinas, proantocianidinas y flavonoles | l,m |

a). Schreckinger y col., 2012. b). Oszmianski y col., 2005. c). Hakkinen y col., 1999. d). Schauss y col., 2006. e). Maatta-Riihinen y col., 2004. f). Zadernowsky y col., 2009. g). Da Silva y col. 2010. h). Cuevas-Rodríguez y col., 2010. i). Lee y col., 2007. j). Gavriloova y col. 2011. k). Yousef y col., 2013. l). Neto y col., 2006. m). Viskelis y col., 2009.

2.2.1 Mamuyo

El género *Styrax* comprende unas 130 especies de árboles y arbustos ampliamente distribuidos en Asia, América y el Mediterráneo (Fritsch, 1999), algunas especies se usan como ornamentales y otras tienen usos medicinales. Extractos de plantas de diversas especies de *Styrax* son usados para tratamiento de afecciones estomacales, fiebre (Moraes y col., 2011) y problemas inflamatorios (Mendoça y col., 2000); tinturas de la resina se usan en vaporizaciones para el tratamiento de bronquitis y asma (Pauletti y col., 2006). Los compuestos identificados en diversas plantas de *Styrax* son principalmente terpenoides (Mendoça y col., 2000; Yoshikama y col., 2000; Pauletti y col., 2006; Park y col., 2009), ácidos grasos (Breuer, 1987) y saponinas (Yoshikama y col., 2000; Park y col., 2009).

El mamuyo (*Styrax ramirezii*. Greenm) es una especie endémica de México (Fritsch, 1997), el árbol de entre 5 a 15 m de altura, crece en los bosques centrooccidentales del país y produce drupas comestibles de forma elipsoide (8-13 mm de longitud y 4-9 mm de diámetro), florece de marzo a julio y se le ha visto con fruto de octubre a marzo (Carranza,

1993), cuando los frutos están maduros, desarrollan un color morado indicativo del contenido de pigmentos antociánicos (Figura 1). Se reporta su presencia en los estados de Sinaloa, Durango, Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, México, Morelos, Guerrero, Oaxaca y Chiapas (Gonzalez-Espinoza y col., 2011). Recibe los nombres comunes de azajar (Jalisco), escaramuza (Jalisco), mamullo (Jalisco), mamuyo (Jalisco y Michoacán), palo de casa (Jalisco), duraznillo (Michoacán), garrapata (Michoacán), jaboncillo colorado (Michoacán), tepamu (Lengua purépecha, Michoacán), Kwat'anu (Lengua purépecha, Michoacán), chilacate (Morelos), memelita (Estado de México) (Carranza, 1993; Fritsch, 1997).

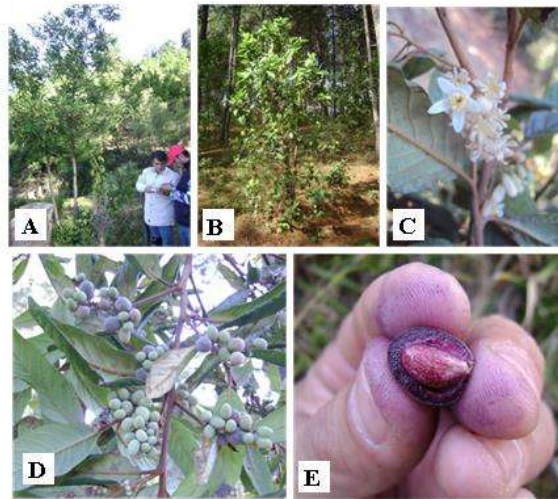


Figura 1. Diferentes aspectos físicos del mamuyo. A) y B) Árbol de *S. ramirezii*. C) Inflorescencia del mamuyo. D) Frutos en diferentes estados de madurez. E) Corte transversal del fruto.

Sobre sus usos se sabe muy poco, en algunos lugares la madera es usada para hacer postes (Carranza, 1993) y los frutos son consumidos en fresco, hasta el momento no se tiene conocimiento de reportes sobre propiedades fisicoquímicas y/o funcionales del fruto o la planta. Las publicaciones acerca de la especie hechas por Carranza (1993) y por Fritsch (1997), no hacen referencia a que la especie se encontrara en riesgo, y mencionan una alta frecuencia de la especie en las zonas de estudio, sin embargo, González-Espinoza (2011) incluye a *Styrax ramirezii* en una lista de especies amenazadas del bosque nuboso mexicano.

2.2.2 Arándano

El arándano o mora azul (Blueberry) pertenece al género *Vaccinium*, de la familia *Ericaceae*, el género se encuentra en regiones montañosas de la mayoría de los continentes excepto Australia y la mayor parte de África y cuenta con entre 450 a 500 especies. En América se tiene conocimiento de cerca de 90 especies que incluyen las importantes especies comerciales de mora azul (*V. corymbosum*) y arándano rojo (*V. macrocarpon*) (Pedraza-Peñalosa y col., 2011). Las moras azules son ricas en compuestos polifenólicos, principalmente antocianinas, aunque también contienen proantocianidinas, ácidos fenólicos, flavonoles y estilbenos, el Cuadro 3 muestra los principales polifenoles identificados en 13 genotipos de moras azules.

Cuadro 3. Principales polifenoles identificados en 13 genotipos de moras azules.

| Antocianinas | | |
|---------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|
| Delfinidina 3-O-galactósida | Delfinidina 3-O-glucósida | Cianidina 3-O-galactósida |
| Delfinidina 3-O-arabinósida | Cianidina 3-O-glucósida | Cianidina 3-O-arabinósida |
| Petunidina 3-O-galactósida | Petunidina 3-O-glucósida | Peonidina 3-O-galactósida |
| Petunidina 3-O-arabinósida | Malvidina 3-O-galactósida | Malvidina 3-O-glucósida |
| Malvidina 3-O-arabinósida | Delfinidina 3-O-(6"-acetil)-glucósida | Cianidina 3-O-(6"-acetil)-glucósida |
| Malvidina 3-O-(6"-acetil)-galactósida | Petunidina 3-O-(6"-acetil)-glucósida | Malvidina 3-O-(6"-acetil)-glucósida |
| Ácidos fenólicos | | |
| Ácido clorogénico | Ácido caféico | Ácido p-cumárico |
| Ácido ferúlico | Ácido malonil cafeoilquínico | Ácido malonil dicafeoilquínico |
| Cafeoil hexosa | Feruloil hexosa | |
| Flavonoles | | |
| Quercetina 3-O-Glucósida | Rutinina | Laricitrina-3-Glucósida |
| Quercetina-3-Arabinosida | Sirenetina-3-Glucósida | Catequina |
| Proantocianidinas | | |
| Dímero B | | |

Las variedades analizadas fueron Arlen, Bluecrop, Duke, Legacy, Lenoir, O'Neal, Pamlico, Sampson y Toro, así como una selección de cuatro variedades (NC 4385, NC4900, SHF2B-1 21:3, y SHF2B-1 25:41) generadas en el programa de desarrollo de plantas de mora azul de la Universidad Estatal de Carolina del Norte. Adaptado de Gavriloova y col., 2011 y Yousef y col., 2013.

En diversas investigaciones se ha evaluado la actividad biológica de las moras azules y sus compuestos nutraceuticos, los resultados sustentan el hecho de que el consumo de moras

azules ayuda a fortalecer el sistema inmune (Yu-Ping y col., 2010), reducir la probabilidad de desarrollar enfermedades crónico degenerativas como diabetes (Kellog y col., 2010), Alzheimer (Joseph y col., 2003), cáncer (Schmidt y col., 2006) y enfermedades cardíacas (Del Bo y col., 2012), así como proteger el organismo de infecciones del tracto urinario (Howell, 2007).

En lo económico el comercio del arándano presenta un importante dinamismo, en un informe realizado por Bascopé (2013), se menciona que México se perfila como un actor relevante en el mercado mundial de arándano y que el cultivo de arándano en México es el cultivo de mayor rentabilidad hortofrutícola. Por su parte la FAO reporta que la producción de arándanos en México en 2011 fue de 6 704 toneladas, lo que le valió ser el cuarto productor mundial produciendo el 2% del total mundial (FAOSTAT, 2011), sin embargo, estuvo muy por debajo de los dos principales productores Estados Unidos de Norte América y Canadá (Figura 2).

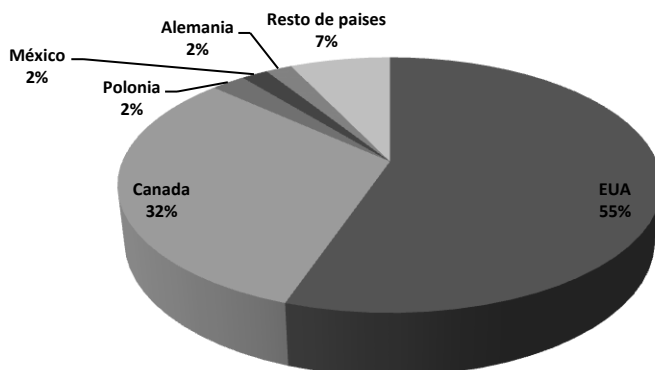


Figura 2 Porcentaje de la producción mundial de arándanos que generaron los cinco principales productores <http://faostat.fao.org/> (2011).

En 2012 la producción de arándanos en México tuvo un valor de aproximadamente 319 millones de pesos, sin embargo históricamente el precio del producto mexicano está por debajo del alcanzado por principal productor mundial (Figura 3). El cultivo de arándano en México ha tenido un importante crecimiento, no obstante, es notorio el caso de algunos países como el de Polonia y Lituania que sufrieron un drástico descenso de su producción (el comportamiento de la producción en estos países puede verse en la Figura 4.), lo que puede ser indicativo de un manejo del mercado por parte de los dos principales países productores, ya que el 87 % de la producción mundial está concentrada en ellos además de

tener un intenso comercio de la fruta entre ambos, en 2011 Canadá, siendo el segundo productor de la frutilla con una producción de 112 363 Ton, importó de Estados Unidos, una cantidad de aproximadamente 46 704.64 Ton equivalente a casi un 40 % de su producción, por su parte, Estados Unidos que produjo 196 905 Ton el mismo año, importó 29 289.82 Ton de arándanos de Canadá, representando un equivalente de 14.88 % de su producción (USDA, 2013) .

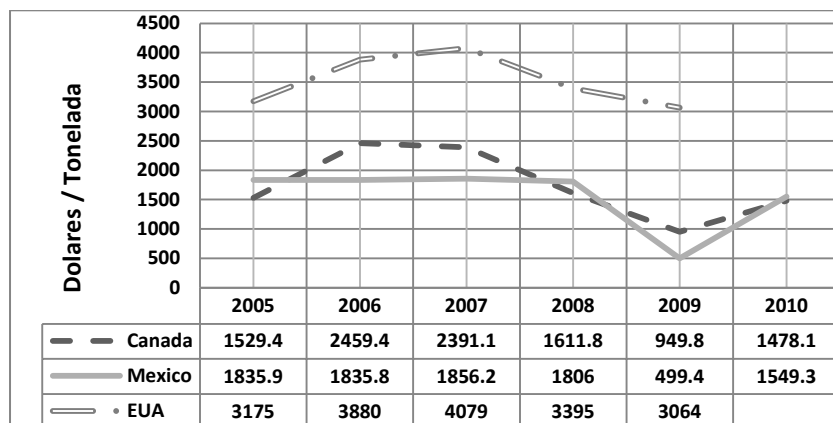


Figura 3. Comparativo del comportamiento de los precios de blueberry entre México y los principales productores mundiales. <http://faostat.fao.org/> (2011)

El procesamiento de arándano en México es prácticamente nulo debido a que la producción se destina casi completamente a la exportación en fresco o congelado (Bascopé, 2013).

2.2.3 Zarzamora

Las zarzamoras pertenecen a la familia de las *Rosaceas*, género *Rubus*, que incluye además a las frambuesas rojas, negras y sus híbridos. Se menciona la existencia de entre 250 a 700 especies distribuidas principalmente en las áreas de clima templado y frío del hemisferio norte, aunque también se les encuentra en zonas montañosas intertropicales, en México, entre los estados de Michoacán, Guanajuato, Querétaro y San Luis Potosí, se reporta la existencia de las especies silvestres *R. glaucus* (Cuevas-Rodríguez y col., 2010), *R. adenotrichos*, *R. cymosus*, *R. humistratus*, *R. eriocarpus*, *R. coriifolius*, *R. macvaughianus*, *R. philyrophyllus*, *R. pumilus*, *R. sapidus* (Rzedowski y Calderón, 2005). Se tienen evidencias del consumo de frutos de *Rubus* como parte de la dieta humana, que data de entre los años 5600 a 4000 A.C. (Kubiak-Martens, 1999). Tradicionalmente los frutos de

zarzamora en México se consumen además de en fresco, en diversos platillos que incluyen tamales, atole, bebidas y dulces (Bello-Gonzalez, 2006).

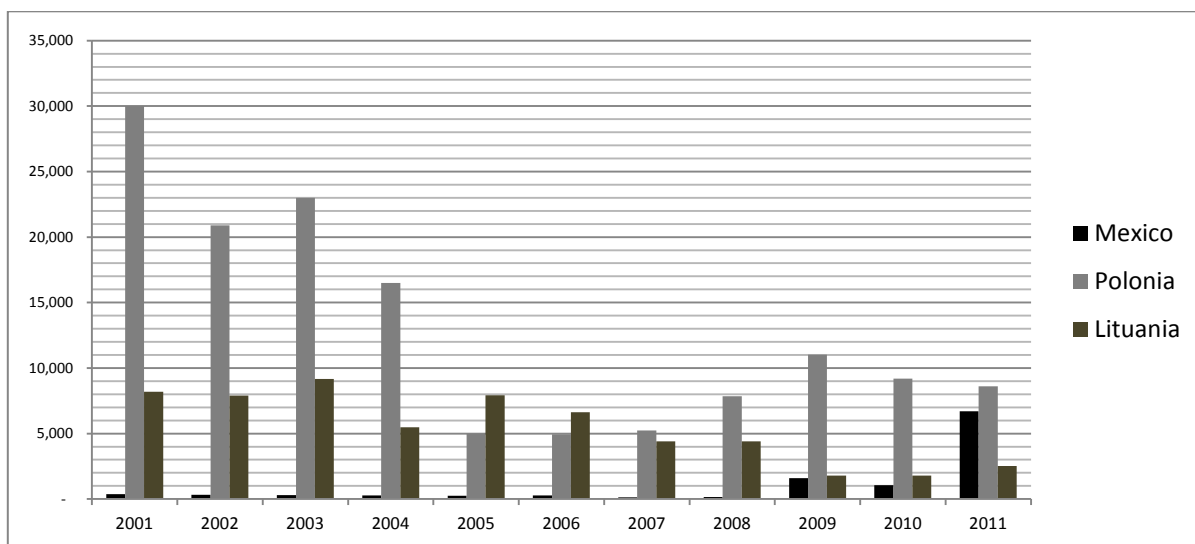


Figura 4. Comportamiento de la producción de arándano en México y otros países<http://faostat.fao.org/> (2011).

Comunidades indígenas incluyen los frutos, flores, hojas y raíces en la herbolaria tradicional para el alivio de diarrea, inflamación y dolor de oído (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009). Actualmente los frutos de zarzamora son utilizados también como materia prima de algunos alimentos procesados debido a su sabor, propiedades nutricionales y el aporte benéfico a la salud de sus compuestos nutraceuticos. Los frutos de zarzamora son una rica fuente de polifenoles, principalmente antocianinas y taninos hidrolizables, conteniendo además flavonoles, flavan-3-oles y ácidos fenólicos (Cuadro 4). La actividad biológica de los compuestos nutraceuticos de las zarzamorras, ha sido intensamente estudiada, encontrándose que el consumo de sus frutos tiene efectos sobre la salud de los consumidores ayudando a prevenir el desarrollo de enfermedades crónico degenerativas como diabetes (Johnson y col., 2013), cáncer (Seeram, 2006) y alzhéimer (Tavares y col. 2012).

En el rubro económico, la producción de zarzamora en México durante el 2012 fue de una magnitud de 139 000 Ton representando un valor de la producción de casi 3 900 millones de pesos (SIAP-SAGARPA, 2013), que comparado con otros cultivos de frutillas

comerciales como fresa, frambuesa y arándano se ubica en segundo lugar nacional (Figura 5).

No obstante que el valor de la producción de fresa y zarzamora son similares, el rendimiento de la producción de zarzamora comparado contra con el obtenido por la fresa, es muy bajo, ya que la fresa alcanza casi 42 Ton/Ha mientras que la zarzamora aproximadamente 12 Ton/Ha lo cual representa una oportunidad para el desarrollo de nuevas variedades más productivas

Cuadro 4. Principales polifenoles identificados en zarzamoras comunes en México.

| Antocianinas | | | | | | | | | |
|---------------------------------------|---|----|----|----|----|----|----|----|--|
| Especie | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | Referencia |
| <i>Rubus adenotrichos</i> | x | x | x | x | | | | | Acosta-Montoya y col., 2010 Cuevas-Rodríguez y col., 2010 |
| <i>Rubus coriifolius</i> | x | x | x | x | | | | | Cuevas-Rodríguez y col., 2010 |
| <i>Rubus glaucus</i> | x | x | | | x | x | x | x | Cuevas-Rodríguez y col., 2010, Estupinan y col., 2011; Garzon y col., 2009 |
| <i>Rubus</i> sp. var. Tupy | x | x | x | x | | | | | Cuevas-Rodríguez y col., 2010 |
| Polifenoles diferentes a antocianinas | | | | | | | | | |
| | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | Referencia |
| <i>Rubus adenotrichos</i> | x | x | x | x | x | x | x | x | Cuevas-Rodríguez y col., 2010 Mertz y col., 2007 |
| <i>Rubus corifolius</i> | | | | | | | x | x | Cuevas-Rodríguez y col., 2010 |
| <i>Rubus glaucus</i> | x | x | | | x | x | x | x | Vasco y col., 2009 |
| <i>Rubus</i> sp. var. Tupy | | | | | | | x | x | Cuevas-Rodríguez y col., 2010 |

1. Cianidina-3-O-glucósida. 2. Cianidina-3-O-rutinósida. 3. Cianidina-3-O-arabinósida. 4. Cianidina-3-O-(6-malonil)glucósida. 5. Cianidina-3-O-sambubiósida. 6. Pelargonidina-3-O-rutinósida. 7. Cianidina-3-O-xilosilrutinosida. 8. Pelargonidina-3-O-glucósida. 9. Ácido elágico. 10. Ácido gálico. 11. Ácido caféico. 12. Ácido ferúlico. 13. Glicósidos de quercitina. 14. Glicósidos de kampferol. 15. Lambertianina C. 16. Sanguina H-6.

En el plano internacional, México juega un importante papel como exportador de zarzamora, aportando cerca de un 7% de la producción mundial, exportando principalmente a EUA donde el fruto alcanza un precio favorable debido a que los meses de producción que coinciden con el tiempo de escases en el mencionado país.

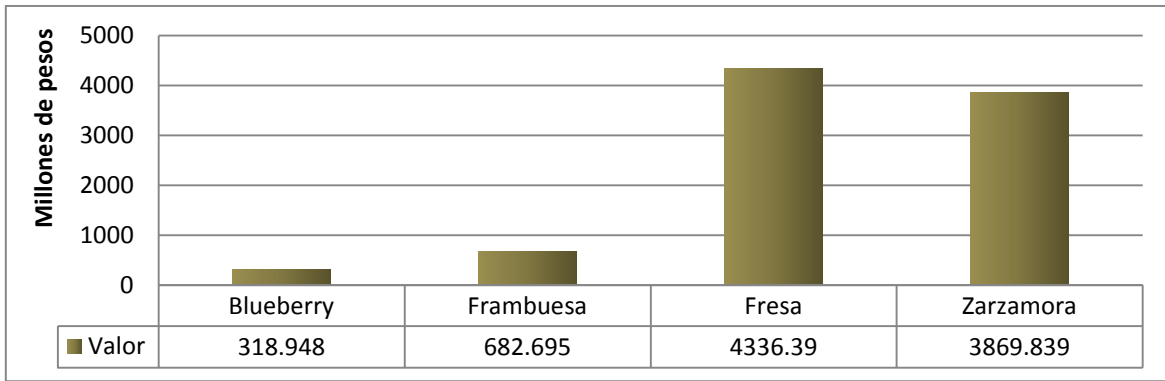


Figura 5. Tabla comparativa del valor económico de las principales frutillas producidas en México de manera comercial durante 2012. Fuente SAGARPA-SIAP, 2013

2.3 Polifenoles

El término “Polifenol”, fue utilizado a principios de los años 1920’s y se difundió ampliamente desde los 1990’s, actualmente es usado como sinónimo de fenólico. De acuerdo con Quideau y col. (2011), los polifenoles son metabolitos secundarios de las plantas, derivados exclusivamente de las rutas metabólicas del shikimato o ácido shikímico [ácido (3R,4S,5R)-3,4,5-trihidroxi-1-ciclohexen-1-carboxílico] (Figura 6), de los fenil propanoides y/o de los policétidos, presentando más de un anillo fenólico y que carezca de grupos funcionales nitrogenados en su estructura más básica.

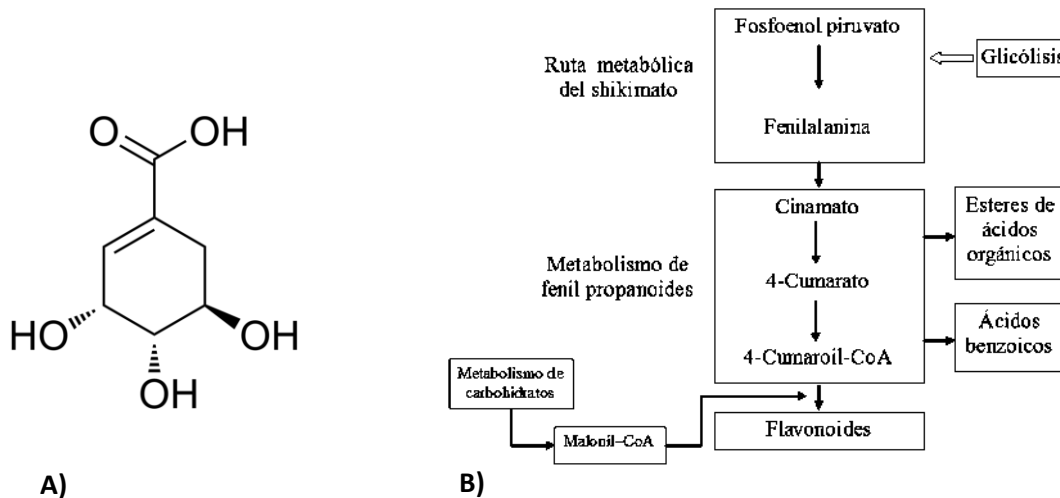


Figura 6. Ruta metabólica para producción de polifenoles. A) Estructura del ácido shikímico. B) Ruta metabólica del ácido shikímico (Ryan y Robards, 1998)

Los polifenoles forman uno de los grupos más numerosos de compuestos de las plantas, están presentes en prácticamente todos los vegetales y son parte integral de la dieta humana y animal (Bravo, 1998). Se conocen más de 8000 estructuras fenólicas (Tsao, 2010), desde fenoles muy simples hasta compuestos altamente polimerizados con pesos moleculares mayores a 30 000 Da (Bravo, 1998). Los polifenoles son muy reactivos y buenos sustratos de varias enzimas incluyendo las polifenol-oxidasas, peroxidasas, glicosidasas y esterasas (Cheynier, 2005). Frutas y bebidas como té y vino tinto, son las principales fuentes de polifenoles de la dieta humana (Manach y col., 2004), aunque también se ingieren cuando se consumen otros órganos de plantas comestibles como ciertas flores, hojas, tallos, semillas y raíces. Los polifenoles brindan fotoprotección a las plantas y participan en la reproducción. Se ha propuesto el uso del perfil de polifenoles como marcadores taxonómicos de las plantas (Siracusa y col., 2011) ya sea para identificar especies o detectar adulteraciones en alimentos procesados (Bravo, 1998). Sin embargo el principal interés del análisis de polifenoles es debido a su potente actividad antioxidante, que reduce el efecto de los radicales libres y está relacionada con la prevención del desarrollo de diversas enfermedades crónicas y el la disminución de síntomas de las mismas (Fernandez-Panchón, 2008).

2.3.1 Clasificación de polifenoles

Los polifenoles se han clasificado atendiendo diferentes criterios como su fuente de origen, función biológica o estructura química. De acuerdo a su estructura, se clasifican como ácidos fenólicos, flavonoides, taninos, estilbenos y lignanos (Paredes-López y col., 2010) conteniendo además diversos subgrupos, la Figura 7 muestra las estructuras de los principales grupos de polifenoles.

En general, el nombre ácido fenólico describe a los fenoles que contienen un ácido carboxílico funcional, cuando se habla de metabolitos de plantas se hace referencia a un grupo particular de ácidos orgánicos formados por una estructura básica C1-C6 para compuestos conocidos como ácidos benzóicos y C3-C6 para los nombrados ácidos cinámicos (Tsao, 2010). En algunos casos, aldehídos análogos como la vainillina son incluidos en la misma clasificación (Robbins, 2003).

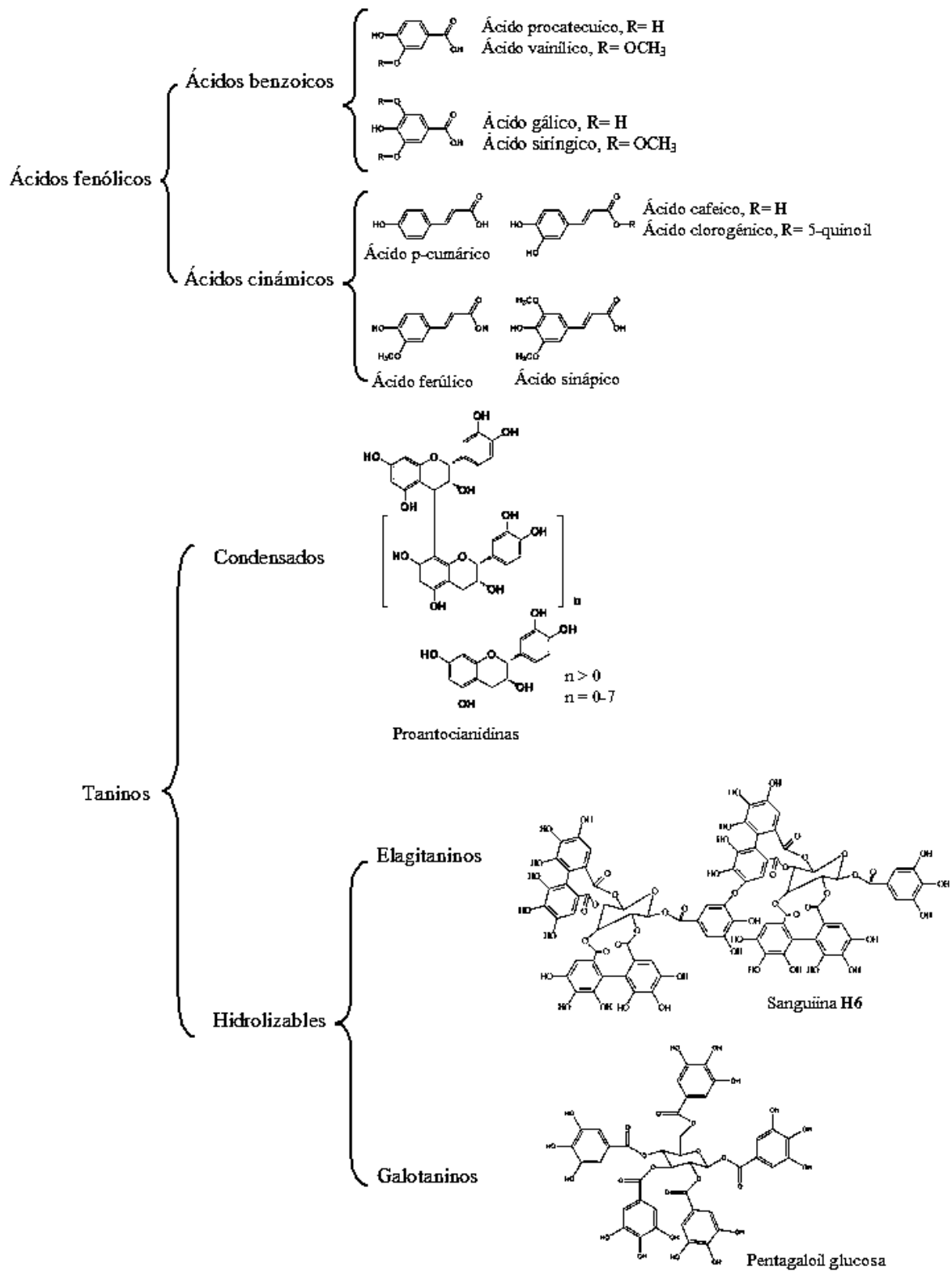


Figura 7. Principales grupos de los polifenoles

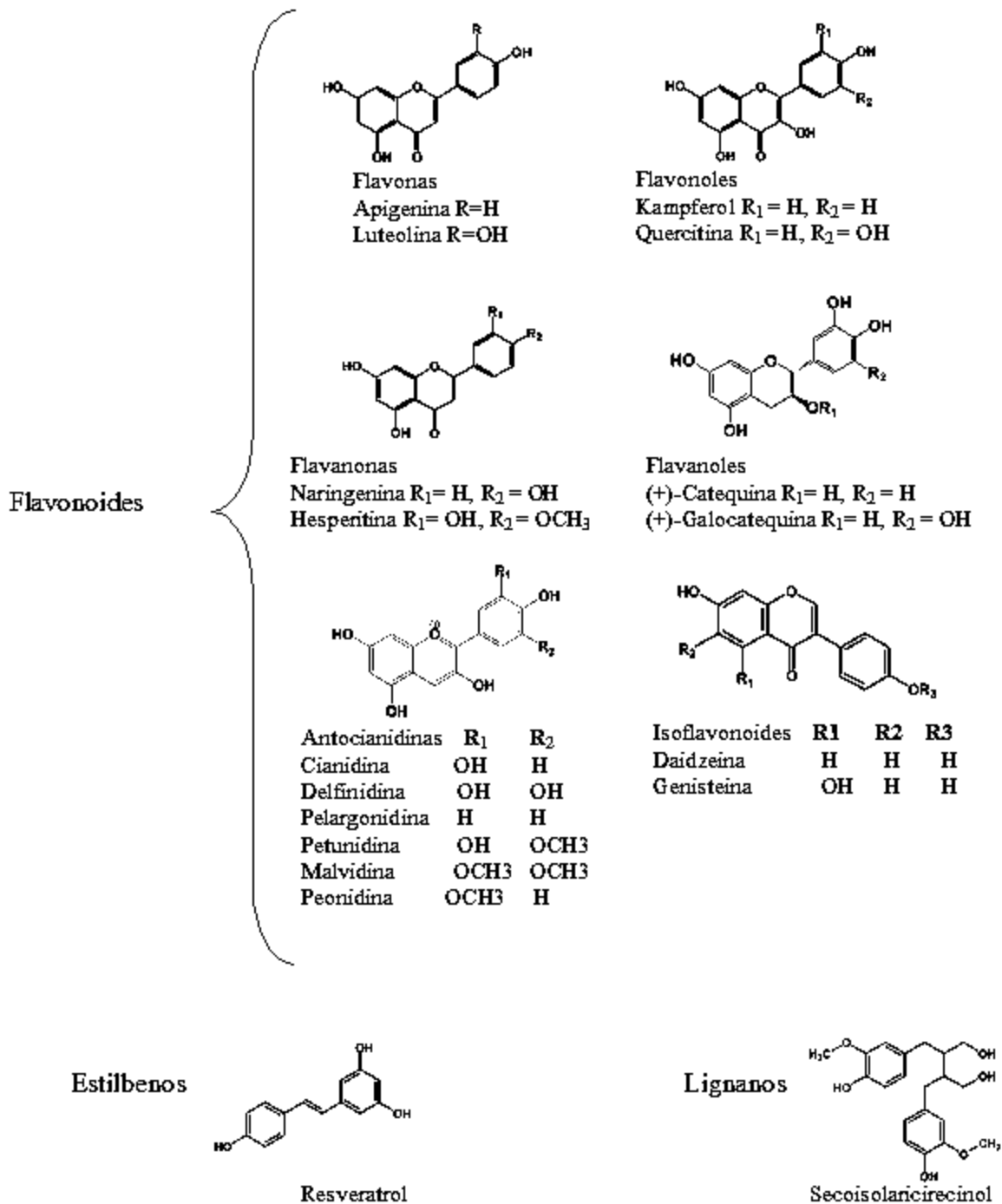


Figura 7. Principales grupos de los polifenoles (continuación).

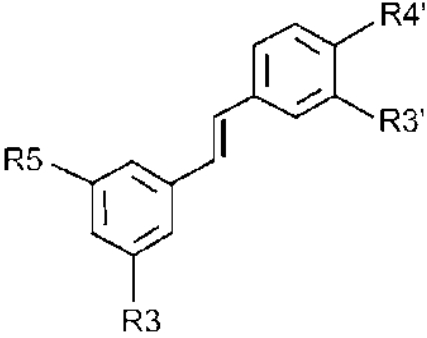
Los flavonoides tienen una estructura general C₆-C₃-C₆, que agrupan varias subclases de entidades estructurales, hasta el 2011 se habían reportado más de 8000 distintas moléculas (Quideau y col., 2011). Algunos investigadores consideran los flavonoides como el más

amplio grupo de compuestos nutraceuticos en las plantas, que actúan como antioxidantes y quelantes de metales (Jeng-Kun y Meng-Shih, 2006).

Los taninos son un grupo de metabolitos fenolicos que tienen la capacidad de acomplejarse fuertemente con carbohidratos y/o proteínas (Serrano y col., 2009), el origen del término tanino se ubica a finales de 1700's cuando en las antiguas curtidurías se utilizaba extracto de corteza de roble llamado ácido tánico (tann es una palabra que proviene del celta y significa roble) para mejorar las características de manejo de la piel (Arapitsas, 2012). Los taninos son responsables de la astringencia de alimentos que los contienen debido a que precipitan proteínas de la saliva. Pueden dividirse en dos grandes grupos; taninos hidrolizables y taninos condensados (Bravo, 1998). Los taninos son compuestos bioactivos que ayudan a prevenir el desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas y comunes, Serrano y col. (2009) reportaron tres diferentes formas en que actúan los taninos; i) formando complejos con iones metálicos, ii) ejerciendo una actividad antioxidante, iii) formando complejos con otras moléculas como proteínas y carbohidratos.

Los estilbenos son un pequeño grupo de fenilpropanoides que se caracterizan por tener una estructura 1,2-difeniletieno (Figura 8), la mayoría derivados del trans-resveratrol que es el compuesto más representativo y estudiado de los estilbenos, y se le han comprobado efectos positivos para reducir la probabilidad de desarrollar afecciones cardíacas, cáncer y diabetes (Stuart y Robb, 2013)

| <i>Estilbeno</i> | <i>R3</i> | <i>R5</i> | <i>R3'</i> | <i>R4'</i> |
|---------------------------|------------------|------------------|------------|------------------|
| Trans-resveratrol | OH | OH | H | OH |
| Trans-piceido | OGlu | OH | H | OH |
| Pinosilvino | OH | OH | H | |
| Piceatannol | OH | OH | OH | OH |
| Pinosilvino monometiléter | OCH ₃ | OH | H | OH |
| Trans-pterostilbeno | OCH ₃ | OCH ₃ | H | OH |
| Astringina | OGlu | OH | OH | OH |
| Rhapontina | OGlu | OH | OH | OCH ₃ |



1,2-difeniletieno

Figura 8. Estructura y ejemplos de estilbenos. (Adaptado de Chong y col., 2009)

Los lignanos son compuestos fenólicos bioactivos cuya estructura básica está compuesta por dos unidades de fenilpropanoides (C3-C6)₂(Figura 7), de acuerdo a la forma en que incorporan oxígeno en su estructura se reconocen cuatro grupos estructurales(Figura 9). Los lignanos se encuentran en semillas de linaza, ajonjolí, girasol, centeno, trigo y en bebidas como café, té y vino entre otros. Algunos lignanos son considerados fitoestrógenos y se conoce que presentan actividad antitumoral, antiviral anti aterosclerótica, inhiben enzimas e intervienen en procesos hormonales(Landete, 2012).

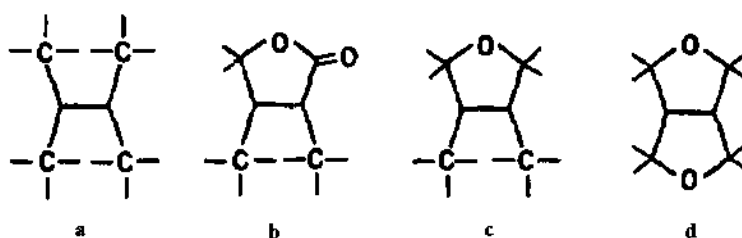


Figura 9. Agrupación de lignanos de acuerdo al oxígeno en su estructura. a) Lignanos. b) Lignanólidos. c) Mono-epoxilignanos. d) Bisepoxilignanos. (Adaptado de McRae y Towers, 1983)

2.3.2 Propiedades de los polifenoles

En la forma más elemental, las funciones de un fenol están definidas por la combinación anfipática de sus componentes, por un lado el anillo aromático tiene carácter hidrofóbico, mientras que el grupo hidroxilo tiene comportamiento hidrofílico, esta aparente dicotomía tiene con frecuencia efectos complementarios que le permiten interactuar con otras biomoléculas (Quideau y col., 2011). La variedad de estructuras de las moléculas de polifenoles van desde las más sencillas de los ácidos fenólicos hasta las muy complejas de los taninos con varios miles de Dalton de masa molecular, esto genera una inmensa cantidad de variabilidad en sus propiedades fisicoquímicas, que al mismo tiempo que contribuye a incrementar la gama de efectos bioactivos, también dificulta su análisis (Tsao, 2010). La estructura química de los polifenoles está estrechamente relacionada con diversas propiedades como la solubilidad y biodisponibilidad (Bravo, 1998). De forma natural los polifenoles se encuentran conjugados con uno o más azúcares enlazados a los grupos hidroxilo, además también se presentan enlaces directos entre los azúcares y los carbonos aromáticos. Los azúcares enlazados a las moléculas de polifenoles pueden presentarse como monosacáridos o disacáridos y aun algunos oligosacáridos (Bravo, 1998). Los

polifenoles pueden unirse también con ácidos orgánicos, aminas, lípidos y es común la asociación con otros fenoles (Bravo, 1998). Los compuestos fenólicos tienen propiedades redox lo que les permite actuar como agentes reductores, donadores de hidrogeno y estabilizador de oxígeno singlete (Stalikas, 2010). La estructura es la clave de su propiedad antioxidante; en ácidos fenólicos la actividad antioxidante depende del número y posición de hidroxilos, incrementándose de manera proporcional al grado de hidroxilación, mientras que en los flavonoides es más complejo; el grado de hidroxilación y la posición de los hidroxilos en el anillo B (Figura 10), resultan en una actividad mayor; un doble enlace entre C2 y C3 conjugado con el grupo 4-oxo en el anillo C incrementa la capacidad de capturar radicales; un doble enlace entre C2 y C3 combinado con un OH en 3-OH incrementa la actividad y una sustitución del 3-OH la reduce; la sustitución de hidroxilos por metoxilos en el anillo B reducen la capacidad antioxidante (Balasundram y col., 2006).

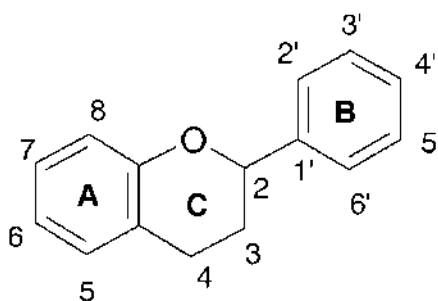


Figura 10. Estructura básica de los flavonoides

Los polifenoles participan en las características de sabor de alimentos, la amargura y astringencia de alimentos como chocolate, frutas, té y vino está influida por polímeros de flavonoles (Lesschaeve y Noble, 2005). La interacción de polifenoles con componentes volátiles, puede incrementar la intensidad en la percepción de los aromas y sabores de los alimentos (Aronson y Ebeler, 2004).

2.3.3 Propiedades nutraceuticas de los polifenoles

Los polifenoles son sustancias bioactivas es decir, agentes que actúan sobre un sistema biológico (Gebelein, 1985). El interés en su bioactividad se centra en su efecto

nutracéutico; se define como nutracéutico a cualquier alimento o constituyente de los alimentos que ejerce acción benéfica sobre la salud humana (Birujete y col., 2009). Históricamente se ha resaltado la actividad antioxidante de los polifenoles, que protege la célula frente a daños causados por radicales libres que se pueden formar por el simple estrés oxidativo, y que es el paso precursor de muchas enfermedades crónicas (Lila, 2007). Se ha estudiado el efecto de la actividad antioxidante de los polifenoles para la prevención de diversas enfermedades como cáncer (Zi y Simoneau, 2013), diabetes (Williamson, 2013), artritis (Riegsecker *et al.*, 2013), la enfermedad de Parkinson y Alzheimer (Tavares *et al.*, 2012). Además los polifenoles pueden interactuar con enzimas, en algunos casos reduciendo su actividad que de otra forma aceleraría el desarrollo de la enfermedad y en otros acelerando su actividad para detoxificar (Schreckinger *et al.*, 2012). También se ha comprobado su capacidad inmunomodulatoria y propiedades vasodilatorias que contribuyen a la disminución de enfermedades cardiovasculares (Tangney y Rasmussen, 2013); su actividad antimicrobiana ayuda a evitar el desarrollo de varios tipos de microorganismos patógenos (Puupponen-Pimia *et al.*, 2005) y la adhesión de bacterias de *E. coli* a las células uroepiteliales reduciendo el desarrollo de infecciones de vías urinarias (Barbosa-Cesnik *et al.*, 2011). Se ha analizado su uso en cosméticos para prevenir los efectos nocivos de la radiación solar sobre la piel (Quideau *et al.*, 2011). Por estas causas una considerable parte de las investigaciones de polifenoles, se ha enfocado en su actividad nutracéutica.

2.3.3.1 Antocianinas

Las antocianinas (del Griego (*anthos*): ‘flor’ + (*kyanos*): ‘azul’) son el grupo de pigmentos más importantes después de la clorofila (Delgado-Vargas *et al.*, 2000). Las antocianinas son compuestos polifenólicos responsables de la coloración de la mayoría de flores, frutos y hojas de plantas angiospermas, causando tonalidades que van desde el rosa salmón, pasando por el rojo y violeta, hasta el azul oscuro (Jordheim, 2007), son flavonoides con estructura básica de 15 carbonos con una o más moléculas de azúcar enlazadas a diferentes posiciones hidroxiladas de la estructura básica (Figura 11), (Delgado-Vargas *et al.*, 2000). Particularmente, las antocianinas son glicósidos del ion fenil-2-benzopirilio, las agliconas

de las antocianinas son nombradas antocianidinas yaunque se reportan alrededor de treinta antocianidinas (Jordheim, 2007), cerca del 90% de las antocianinas provienen de las seismás comunes (Cuadro 5).

Cuadro 5. Principales antocianidinas.

| Nombre | Sustituyente y posición del mismo en la estructura básica de los flavonoides (Figura 11) | | | | | | | Color |
|----------------------|--|----|----|----|-----|----|-----|------------------|
| | R1 | R2 | R3 | R4 | R5 | R6 | R7 | |
| <u>Cianidina</u> | OH | OH | H | OH | OH | OH | H | Magenta y Carmín |
| <u>Delfinidina</u> | OH | OH | H | OH | OH | OH | OH | Morado-Azul |
| <u>Pelargonidina</u> | OH | OH | H | OH | H | OH | H | Naranja-Salmon |
| <u>Malvidina</u> | OH | OH | H | OH | OMe | OH | OMe | Morado |
| <u>Peonidina</u> | OH | OH | H | OH | OMe | OH | H | Magenta |
| <u>Petunidina</u> | OH | OH | H | OH | OMe | OH | OH | Morado |

Me= metilo. Adaptado de Delgado-Vargas *et al.*, 2000

Andersen y Jordheim (2006), reportaron 539 diferentes antocianinas identificadas, incluídasdos clases de antocianinas diméricas, de las cuales el primer tipo se forma por la unión de una antocianina y una flavona o flavonol y el segundo por el enlace de uno de cuatro tipos de catequina, unida covalentemente a la pelargonidina-3-glucósida; además de un nuevo tipo de antocianinas llamadas pirano-antocianinas. Las diferencias entre las antocianinas son el número de grupos hidroxilo y metoxilo, la naturaleza y número de azúcares en la molécula y la posición, naturaleza y número de ácidos alifáticos y aromáticos que pueden estar unidos a los residuos de azúcar (Escribano-Bailón *et al.*, 2002).

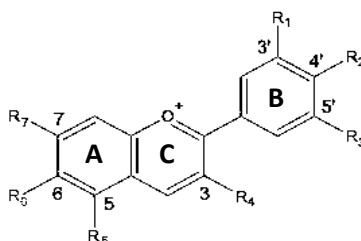


Figura 11. Estructura básica de las antocianidinas.

De manera natural, las antocianinas presentan glicosidación en las posiciones 3 y 5 con mono, di o trisacáridos siendo los azúcares más comunes la glucosa, galactosa, xilosa, ramnosa, arabinosa, rutinosa, soforosa, sambubiosa y gentobiosa. De acuerdo con Andersen y Jordheim (2006), los glicósidos más frecuentes son los formados por disacáridos (240 reportes) y se reportaron además 24 antocianinas con trisacáridos y hasta la fecha del reporte ningún tetrasacárido. Los azúcares se unen a la aglicona por medio de enlaces de sustitución del H (O-enlace), pero se ha reportado la identificación de una especie de antocianina con el azúcar directamente enlazada a uno de los carbonos (C- enlace) llamada C-glicosilantocianina (Andersen y Jordheim, 2006).

2.3.3.1.1 Propiedades de las antocianinas

Una de las principales propiedades de las antocianinas es su capacidad de absorber radiaciones electromagnéticas en los rango tanto de la luz UV como de la luz visible por lo cual presentan coloración. Las antocianinas son los flavonoides pigmentantes más importantes y tienen un trascendente papelecológico en las plantas, actuando como atraentes de polinizadores y dispersores de semillas; tienen además acción foto protectora (Steyn y col., 2002), de acuerdo con Schaefer (2011), protegen a las plantas especialmente cuando su exposición a la radiación solar es elevada y la temperatura es baja, ya que esta combinación induce la formación de radicales libres por el aparato fotosintético, los cuales dañarían el tejido de la planta. El color de las antocianinas está relacionado con el número y posición de hidroxilos y metoxilos, una mayor cantidad de hidroxilos en el anillo B produce tonos azules, mientras que la metoxilación produce tonalidades rojas (He y col., 2010). El color está de igual forma influido por el pH, concentración y la presencia de copigmentos como iones metálicos, ácidos orgánicos, alcaloides, aminoácidos, nucleótidos, polisacáridos, otros flavonoides y antocianinas (Mazza y Brouillard, 1989). La acilación con ácidos orgánicos alifáticos o aromáticos es un factor importante en la tonalidad (Garzon, 2008), la copigmentación intramolecular es característica de antocianinas aciladas, la parte hidrofóbica del ácido se apila en el núcleo del flavilio reduciendo la hidrólisis de la antocianina e incrementando la intensidad del color rojo, al mismo tiempo que desplaza el equilibrio hacia estructuras de base quinonoidal de color azul-violeta a pH neutro (Mateus y

De Freitas, 2009). Las antocianinas pueden acomplejarse con metales lo cual puede causar un salto batocrómico en la absorción de la máxima longitud de onda, provocando un azulado del complejo (Delgado-Vargaset *al.*, 2000). Las antocianinas como los flavonoides en general, están formadas por anillos aromaticos que tienen sustituyentes polares que juntos producen una molécula polar mas soluble en agua que solventes no polares, pero pueden solubilizarse en éter si se mantiene un valor de pH en el cual no se ionice (Delgado-Vargas, 2000), la estructura de las antocianinas depende fuertemente del pH, a pH entre 1-3 predomina el catión flavilio de color rojo intenso, mientras que si el pH se eleva a valores entre 4-5, se genera una pseudobase carbinol incolora que puede derivar después en la apertura del anillo para formar chalconas de ligero color amarillo, mientras que a pH entre 6-7 la estructura se transforma alternadamente en aniones quinonoides azul purpura (Kahkonen y Heinonen, 2003). El grado de hidroxilación y metoxilación en el anillo B afecta su estabilidad y reactividad y por tanto su actividad antioxidante (Kahkonen y Heinonen, 2003), adicionalmente el patrón de glicosilación es importante, en diversos estudios la actividad antioxidante de antocianidinas, resultó mayor que la de los correspondientes glicósidos (Wang y col., 1997)

2.3.3.1.2 Propiedades nutraceuticas de las antocianinas

El efecto nutraceutico de las antocianinas es la característica más atractiva para su estudio, se ha demostrado la actividad antioxidante de las antocianinas en la neutralización de especies reactivas de oxigeno (ROS), sus átomo de oxigeno de carga positiva y sus estructuras resonantes las hacen tener características antioxidantes más potentes o al menos distintas a las de otros flavonoides (Zafra-Stone y col., 2007), lo cual incide en la prevención de enfermedades crónico degenerativas, como cáncer, padecimientos cardiovasculares, diabetes, Alzheimer y enfermedad de Parkinson entre otras; se ha comprobado además su actividad antiinflamatoria relacionada con afecciones como artritis, capacidad para inhibir la actividad de ciertas enzimas relacionadas con la obesidad y el síndrome metabólico (Gordon y Stewart, 2005) se sabe que mejoran la visión y que tienen actividad antimicrobiana (Wang y col., 2012; He y Giusti. 2010).

Se denomina cáncer a un conjunto de enfermedades que se caracterizan por el crecimiento anormal de células cuando la clave cromosómica genética ha sido alterada (Camargo y col., 2004). La mayoría de los estudios *in vitro* sobre los efectos anticancerígenos de antocianinas, se han realizado en células tumorales humanas, a través de dichos estudios se ha obtenido información acerca de los mecanismos de acción anti cancerígena y se ha determinado que incluyen; acción antioxidante mediante la neutralización de radicales libres, activación de enzimas metabólicas de la fase II, inhibición de la proliferación de células pre-malignas, inducción de apoptosis, diferenciación celular, además de efectos anti inflamatorios, anti angiogénicos y anti invasivos (Wang y col., 2012), de acuerdo con Stoner y col. (2010) pacientes con cáncer de colon que ingirieron 60 g/día de frambuesa negra en polvo, durante un periodo de 2 a 4 semanas, mostraron una reducción de sus índices de proliferación de células Ki-67. Así mismo, un tratamiento tópico con un gel de frambuesas negras aplicado a lesiones displásicas orales por un periodo de 6 semanas, resultó en una reducción de grado histológico y restauración de pérdida de heterocigocidad en alrededor de 50% de las células, esto debido a la acción anti cancerígena de las antocianinas.

Las enfermedades cardiovasculares (ECV), incluyen una serie de afecciones tales como enfermedades coronarias, cerebro vasculares, trombosis de las venas, embolia pulmonar y aterosclerosis causadas posiblemente por malos hábitos, alimentación deficiente y poca actividad (Wallace, 2011). El consumo de antocianinas ayuda a reducir los síntomas del padecimiento de ECV y reduce el riesgo de su desarrollo. En un estudio realizado con más de 90 000 mujeres de entre 29-40 años se examinó durante un periodo de 18 años la relación entre el infarto al miocardio con el consumo de antocianinas y otros flavonoides, concluyéndose que un alto consumo de antocianinas puede reducir el riesgo de infarto al miocardio especialmente en mujeres jóvenes (Cassidy y col., 2013). En otro estudio, un suplemento de antocianinas provenientes de jugos de frutas y vino tinto, suministrado a ratones, redujo lesiones cardiacas en ejemplares a los que se les indujo el daño (Scalbert y col. 2005), lo que demuestra el potencial de antocianinas para la prevención de ECV.

El Programa Nacional de Educación en Colesterol en Estados Unidos de América, define el síndrome metabólico como el tener 3 o más de los siguientes factores; 1). Cintura con circunferencia ≥ 102 cm en hombres y 88 cm en mujeres 2). Triglicéridos con niveles ≥ 150

mg/dL. 3). Hipertensión (valores $\geq 130/85$ mmHg) 4). Niveles de glucosa ≥ 110 mg/ dL. Padecer síndrome metabólico incrementa al doble el riesgo de sufrir una enfermedad cardiovascular y en 1.5 veces el de todas las causas de mortalidad (Motillo y col. 2010). Se ha relacionado el efecto del consumo de antocianinas sobre el síndrome metabólico y la diabetes, Kellogg y col. (2010), analizaron los resultados del consumo de moras ricas en antocianinas y otros polifenoles (*Vaccinium spp.*, *Rubus spp.* y *Empetrum nigrum*), como parte de la dieta de tres poblaciones nativas de Alaska, encontrando que la ingesta de estos frutos reduce la acumulación de lípidos y los niveles de glucosa en la sangre, observándose además una baja incidencia de diabetes mellitus tipo 2 en los pobladores de las comunidades bajo estudio. Tsuda y col., (2003). Condujeron un experimento para evaluar el efecto preventivo de antocianinas sobre el desarrollo de obesidad e hiperglicemia en ratones, tras alimentarlos con dietas de alto contenido de grasa, y contrastar los valores contra los obtenidos de ratones alimentados con la misma dieta rica en grasa pero que contenía antocianinas de maíz morado, encontrando que los individuos alimentados exclusivamente con la dieta rica en grasa desarrollaron hiperglicemia, hiperinsulinemia e hiperleptinemia, mientras que en el grupo de ratas cuyo alimento además incluyó antocianinas, todas estas posibles perturbaciones fueron normalizadas, concluyendo que una dieta con antocianinas puede ayudar en la prevención de la obesidad y la diabetes.

La enfermedad de Parkinson, es un desorden neurológico caracterizado por la degeneración de neuronas dopaminérgicas en el área de la *substantia nigra zona compacta* del cerebro, que se manifiesta en síntomas como tremor, dificultad de movimiento, rigidez y desequilibrio corporal, y aunque las causas que generan la aparición de la enfermedad de Parkinson no están completamente definidas, se sabe que ciertos factores como la presencia de radicales libres y pro-inflamatorios como el óxido nítrico (ON), puede incidir en la aparición del padecimiento (Aquilano y col. 2008). Las antocianinas inhiben pro-inflamatorios, Cuevas-Rodríguez y col. (2010a) determinaron el efecto de antocianinas de zarzamora en la inhibición de ON, obteniendo como resultado que extractos ricos en antocianinas inhibieron la actividad del ON.

La enfermedad de Alzheimer se caracteriza patológicamente por la deposición de la β -proteína amiloide ($A\beta$) lo cual resulta neurotóxico. Ping-Hsiao y col. (2011), evaluaron el potencial terapéutico de las antocianinas para prevenir la neurodisfunción originada por la

deposición de la A β , encontrando que las antocianinas inhiben la pérdida de la actividad neuronal mediada por la A β .

2.3.3.2 Taninos

En la sección 2.3.1 correspondiente a la clasificación de polifenoles, se definieron dos grandes grupos de taninos; taninos condensados o proantocianidinas (PAC) y taninos hidrolizables (TH).

Los taninos condensados, es el segundomás grande grupos de polifenoles después de las ligninas, se encuentran de forma ubicua en plantas leñosa y en algunas herbáceas. Son oligómeros o polímeros de hidroxiflavanos o flavan-3-oles, que producen antocianidinas por rompimiento del enlace interflavanilC-C (Ferreira y col., 2006), los monómeros más comunes se muestran en la figura 12.

| Proantocianidina tipo | Monómero | R1 | R2 | |
|-----------------------|------------------|----|----|--|
| Procianidina | Catequina | OH | H | |
| Prodelfinidina | Galocatequina | OH | OH | |
| Propelargonidina | Afzelequina | H | H | |
| Procianidina | Epicatequina | OH | H | |
| Prodelfinidina | Epigalocatequina | OH | OH | |
| Propelargonidina | Epiafzelequina | H | H | |

Figura 12. Estructuras de los monómeros más comunes de las proantocianidinas. ,

Cuando los monómeros se unen por enlaces sencillos entre los carbonos en las posiciones 4 \rightarrow 6 o 4 \rightarrow 8, se tienen PAC tipo B y cuando hay un enlace adicional entre C2 \rightarrow C7 o enlace éter C2-O, se denominan PAC tipo A (Figura 13). El grado de polimerización varía desde los dímeros hasta polímeros con cerca de 200 unidades monoméricas (Serrano y col., 2009). La reactividad de las PAC con moléculas de importancia biológica efectos sobre la

nutrición y consecuencias fisiológicas, sus múltiples grupos hidroxilo, los conducen a la formación de complejos con proteínas, polisacáridos e iones metálicos. Las proantocianidinas pueden estar esterificadas con ácido gálico en ciertas posiciones y excepcionalmente con azúcares, lo cual puede cambiar sus propiedades significativamente (Schofield y col., 2001)

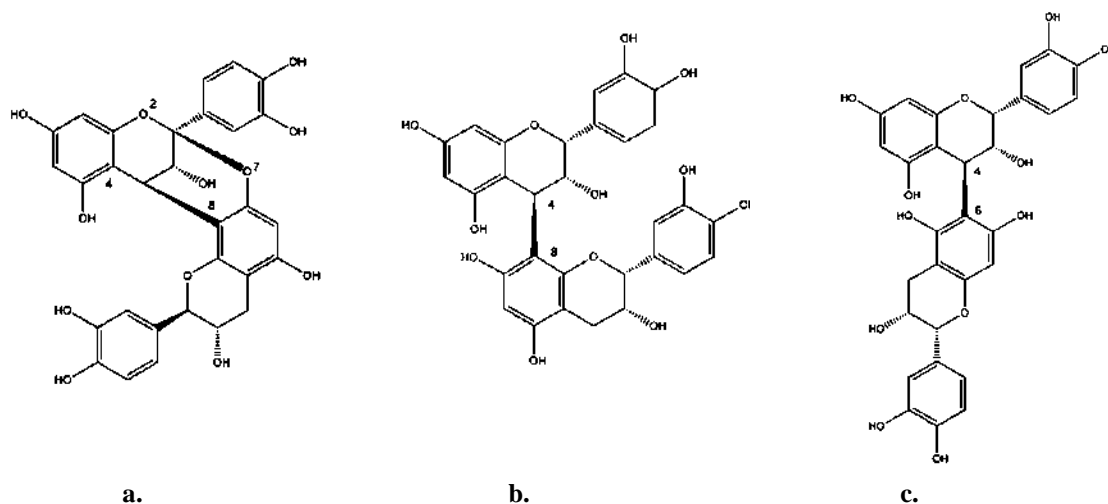


Figura 13. Ejemplos de estructuras tipos A y B deproantocianidinas. a). PAC A1 [Epicatequina-(2 β →O→7, 4 β →8)-catequina]. b). PAC B2 [Epicatequina-(4 β →8)-epicatequina]. c). PAC B5 [Epicatequina-(4 β →6)-epicatequina]. (Adaptado de Serrano y col., 2007).

La designación taninos hidrolizables, es debido al hecho de que estos compuestos se descomponen en sus respectivos azúcares y ácidos por rompimiento hidrolítico de sus enlaces cuando se someten a tratamiento con ácidos diluidos. Si el ácido componente es el ácido gálico (Fig 14a), son llamados galotaninos; ésteres con ácido hexahidroxi difénico (HHDF) el cual forma ácido elágeno (Fig 14b) por eliminación de agua cuando se hidroliza, son llamados elagitaninos. En la mayoría de los casos la glucosa es el principal azúcar en los TH, aunque también la fructosa, xilosa y sacarosa son comunes (Serrano y col., 2009). Los TH se encuentran en frutos como zarzamoras, frambuesas, fresas (*Rubus* spp.), uvas muscadinas (*Vitis rotundifolia*) moras azules y arándanos (*Vaccinium* spp.), nueces pecanas (*Carya illinoensis*) y de castilla (*Juglans* spp.) y en alimentos procesados como vinos (Arapitsas, 2012). Los elagitaninos son constituyentes típicos de muchas familias de plantas, en contraste con los galotaninos que no están tan ampliamente distribuidos en la naturaleza.

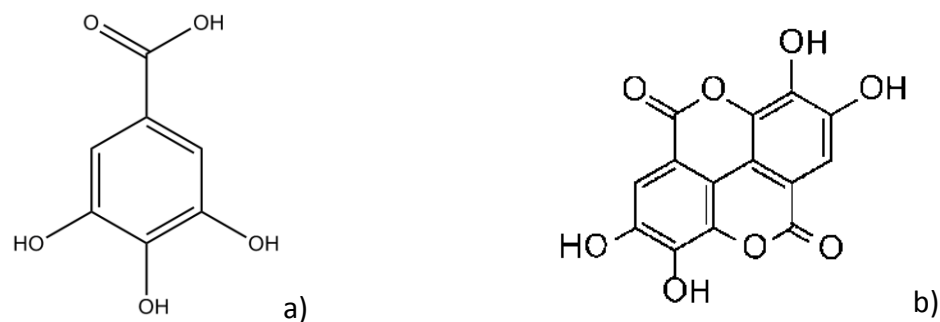


Figura 14. Ácidos característicos que forman los taninos hidrolizables. a). Ácido gálico. b). Ácido elágico.

Más de 1000 TH se han identificado, desde la simple glucogalina de 332 Da de masa molecular, hasta elagitaninos pentaméricos de más de 5000 Da.

2.3.3.2.1 Propiedades de los taninos

Las PAC presentan las reacciones características de polifenoles (Folin-Ciocalteu, Cloruro de hierro) y pueden reaccionar con ácidos minerales o con vainillina en presencia de ácido clorhídrico produciendo una coloración roja. La reacción de las PAC con dietilaminocinamaldehído (DMAC) produce una coloración azul, propiedad que es comúnmente usada para la cuantificación espectrofotométrica. Las PAC forman complejos con biomoléculas principalmente con proteínas, afectando la digestibilidad de las mismas; el grado de polimerización influye en las propiedades de las PAC para formar los complejos con proteínas Chung y col. (1998), mencionan el hecho de que dímeros o trímeros tienen interacciones menos complejas por lo que pueden ser más fácilmente absorbidos en el intestino.

El análisis de TH presenta un mayor grado de complejidad comparado con otros polifenoles debido a la variedad de estructuras posibles y la falta de estándares comerciales, no obstante algunas de sus propiedades pueden utilizarse para su identificación. Los galotaninos tienen un característico espectro de absorción con un máximo de absorbancia a los 280 nm. El espectro de absorción es particularmente útil en la identificación de TH; todos los derivados de glucogalol tienen un espectro de absorción muy similar (Figuras 15b y c), con un salto batocrómico de 10-12 nm cuando se compara con el espectro del ácido

gálico (Figura 15a). Los elagitaninos, también tienen un característico espectro (Fig. 15d–f) con un máximo de absorbancia por debajo de 270 nm. Cuando solo HHDF está presente en la molécula la Figura 15d es el espectro mas probable; y cuando los elagitaninos tienen simples galoil-ésteres la Figura 15f es la más probable. Finalmente cuando el ácido elágico es parte de la estructura molecular el espectro será más parecido a la Figura 15i (Arapitsas, 2009).

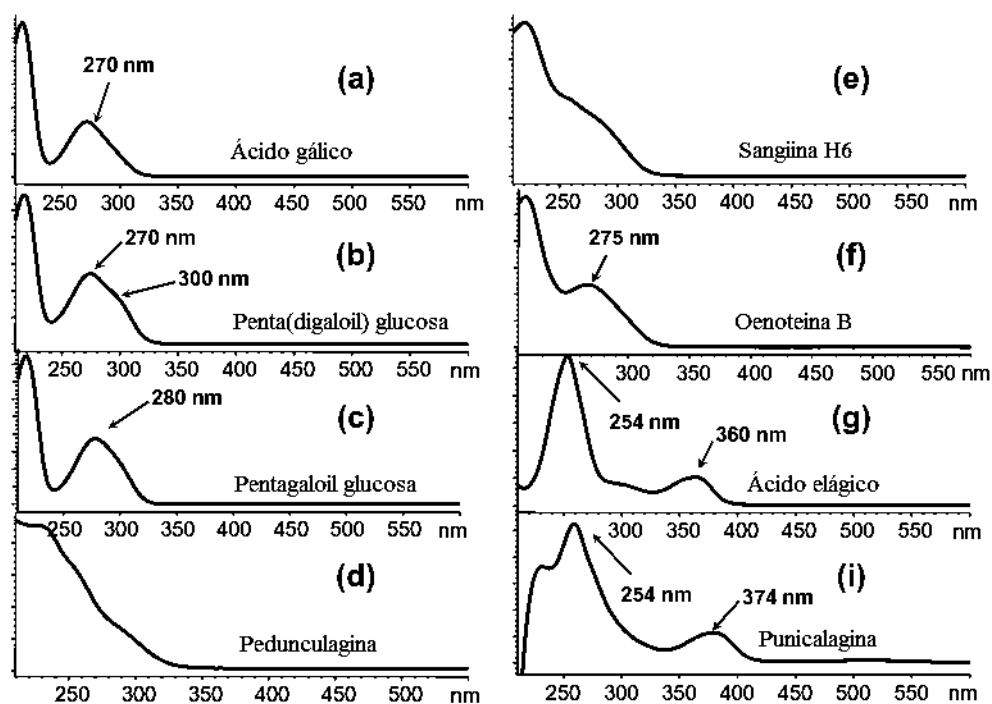


Figura 15. Espectros de absorción de TH comunes. (Adaptado de Arapitsas, 2009)

2.3.3.2.2 Propiedades nutracéuticas de los taninos

La capacidad antioxidante de los taninos es reconocida, se sabe que inhiben la oxidación de lípidos y lipoxigenasas *in vitro*, y la información demuestra su capacidad para inhibir radicales hidroxil, superóxido y peroxil (Gyamfi y Aniya, 2002). Esta capacidad antioxidante, se ha proclamado como la clave para la prevención y/o reducción de enfermedades crónicas relacionadas con el estrés oxidativo y desórdenes relacionados con el incremento en la edad (Quideau y col., 2011).

La actividad biológica de las PAC está relacionada con diversos efectos en la salud humana, numerosos estudios demuestran la actividad antioxidante de las PAC, que como ya se ha mencionado, reduce el riesgo de desarrollar enfermedades crónicas. En este apartado se describen ejemplos de las aplicaciones de las PAC para prevenir, reducir o aliviar el padecimiento de algunas de las más importantes enfermedades y/o factores que pueden incidir en su desarrollo, y en los cuales están relacionadas las PAC.

La inflamación crónica está involucrada en diversas patologías como cáncer, enfermedades neurodegenerativas y cardiovasculares, obesidad y diabetes (Cuevas-Rodríguez y col., 2010a). En el proceso inflamatorio participan enzimas como la óxido-nítrico-sintasa inducible (iNOS) y la ciclooxigenasa-2 (COX-2) que producen óxido nítrico y prostaglandina (Cuevas-Rodríguez y col., 2010a). La sobre expresión de COX-2 promueve la resistencia a la apoptosis de células tumorales e incrementa la angiogénesis y la invasión tumoral (Sharma y col., 2010). La aplicación de PAC en células tumorales, inhibe la actividad de la iNOS y COX-2 y la generación de prostaglandina, lo que resulta en la inhibición del crecimiento de células tumorales y el incremento de su mortalidad (Cuevas-Rodríguez y col., 2010; Sharma y col., 2010).

La acumulación de grasa en el tejido adiposo, es un problema que puede conducir a padecer el síndrome metabólico que como ya se expuso anteriormente (apartado 2. 3. 4. 1. 2.), implica graves riesgos para la salud. Ardevól y col. (2013), probaron el efecto de PAC sobre la acumulación de grasa en depósitos adiposos de ratas, encontrando que las PAC redujeron selectivamente la acumulación de grasa en el cuerpo de las ratas. También se ha estudiado el efecto benéfico de la ingesta de PAC cuando el cuerpo ha perdido el control sobre la homeóstasis de la glucosa. Maritim y col. (2003), mostraron que la ingesta de 10 mg de PAC de corteza de pino (picnogenol®) por cada Kg de masa corporal, mejoró los niveles de glucosa en ratas diabéticas después de 14 días de tratamiento; Pinent y col. (2004), suministraron 250 mg de PAC / Kg de masa a ratas diabéticas, registrando un claro efecto anti-hiperglicémico y mencionan que puede deberse a un “mimetismo” de las PAC en el que actúan como insulina (Pinent y col., 2004).

Las PAC pueden contribuir a reducir el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer. Toda y col. (2011), probaron el efecto anti-agregativo de PAC de manzana sobre β -proteínas amiloides (elemento principal en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer),

encontrando que las PAC tuvieron un potente efecto anti-agregativo de proteínas A β 42 y disociaron agregados actuando como neuroprotectores.

El efecto de las PAC sobre enfermedades cardiovasculares es una de sus propiedades nutraceuticas sobresalientes, las PAC inciden positivamente inhibiendo la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL por sus siglas en inglés), reduciendo la constricción de venas y presión sanguínea, además de reducir la actividad de la colagenasa, elastasa, hialuronidasa y la β glucuronidasa ayudando a mantener la elastina y estabilizar el colágeno logrando un efecto cardioprotector (De la Iglesia y col., 2010).

Es también conocida la actividad antimicrobiana y anti adhesión bacteriana de las PAC, inhibiendo el desarrollo de diversos microorganismos patógenos como *Candida* spp. y *Cryptococcus neoformans* (Patel y col., 2011), evitando además la adhesión de bacterias al tracto digestivo y vías urinarias, lo que ayuda a prevenir infecciones causadas por *Helicobacter pylori* y *Escherichia coli* entre otros microorganismos patógenos (Grace y col., 2012).

Los TH despliegan igualmente, una importante gama de actividades biológicas relacionadas con la salud humana. Serrano y col. (2009) resaltan la importancia de la capacidad de los TH para formar complejos con proteínas e inactivar el desarrollo de bacterias y virus, destacando el efecto sobre virus de VIH, influenza, herpes y hepatitis.

Los TH ejercen funciones cardioprotectoras, se han realizado múltiples estudios utilizando modelos representativos de la estructura vascular, comprobándose su efecto anti-aterogénico, anti-trombótico, anti-inflamatorio y anti-angiogénico (Larrosa y col., 2010), además de reducir los niveles de colesterol (Aviram y col., 2008).

El efecto de los TH sobre el cáncer se ha demostrado a través de diversos estudios, la sanguina H6 y lambertianina, comúnmente encontrados en zarzamoras y frambuesas presentan actividad anti tumoral (Serrano y col., 2009). Ureña y col. (2013) evaluaron la actividad citotóxica y antitumoral de TH sobre cáncer de seno en ratas, encontrando que indujeron la apoptosis y disminuyeron el diámetro del tumor y el número de células metastásicas.

Zhang y col. (2009). Realizaron una revisión de la actividad biológica de la pentagalactosa, uno de los galotanos más comunes, reportando además de los efectos ya mencionados de los HT, actividad antialérgica, capacidad para evitar la formación de

cálculos renales, actividad antiinflamatoria, capacidad para estabilizar la elastina y el colágeno, y actividad anticonvulsiva.

2.4 Análisis de polifenoles

2.4.1 Extracción de polifenoles

Muchas sustancias biológicas se encuentran como mezclas de diferentes componentes en una matriz sólida, para separar el soluto deseado de la fase sólida, ésta se pone en contacto con una fase líquida. Ambas fases entran en contacto y el soluto se difunde desde el sólido a la fase líquida, lo que permite una separación de los componentes originales del sólido. Este proceso se llama lixiviación líquido-sólido o simplemente, lixiviación (Geankoplis, 1999). Este mecanismo de separaciones de uso generalizado para extraer compuestos fenólicos, se utilizan diversos solventes polares afines que sirven como medio de difusión obteniéndose un lixiviado que contiene una mezcla de compuestos que posteriormente se separan por diversos métodos, en el Cuadro 5 se muestran algunos solventes y medios de separación empleados para lixiviar y aislar polifenoles de diversos órganos vegetales. La naturaleza polar de las polifenoles, causada por sus sustituyentes (hidroxilos, carboxilos y azúcares) le confiere la propiedad de disolverse fácilmente en compuestos polares. Es común el uso de metanol acidificado con ácido clorhídrico hasta en 1% sin embargo cuando se tienen grupos dicarboxil alifáticos como el oxálico, malónico o málico, estos son susceptibles a ácidos fuertes diluidos por lo que se recomienda el uso de ácidos débiles. Con metanol el ácido cítrico es el más efectivo, seguido por el tartárico, fórmico, acético y propiónico; con agua son mejores los ácidos acético, cítrico, tartárico y clorhídrico. También se ha evaluado el uso de dióxido de carbono diluido en agua (1000 ppm) mostrando resultados superiores a los obtenidos con etanol: agua: ácido acético (Delgado-Vargas y col., 2000). Se puede realizar la lixiviación de polifenoles utilizando una mezcla de un compuesto orgánico polar como metanol con otro de baja polaridad como el cloroformo, para obtener una separación en dos fases, en la fase acuosa se tendrán compuestos polares (fenólicos, azúcares, ácidos orgánicos otros compuestos solubles en agua), y en la otra fase compuestos no polares (lípidos, carotenoides, clorofila) solubles en

solventes orgánicos, obteniendo de esta manera un extracto libre de contaminantes lipofílicos (Rodríguez-Saona y Wrolstad, 2001).

La extracción ultrasónica asistida, se emplea en combinación con la lixiviación; el uso de tratamiento ultrasónico ha demostrado tener alta eficiencia en la extracción de compuestos como polisacáridos, antocianinas, compuestos fenólicos y proteínas. Este incremento en la eficiencia de la extracción, se atribuye a los efectos mecánicos de las cavitaciones acústicas a la que se somete la muestra, facilitando la transferencia de masa (Irakose y col., 2010). En el tratamiento se utiliza un baño ultrasónico en el que puede ajustarse la frecuencia y controlarse la temperatura mediante algún mecanismo de enfriamiento.

Cuadro 5. Solventes y métodos de separación de polifenoles en algunas muestras vegetales.

| Material lixiviado | Solvente para lixiviación | Agente para el fraccionamiento de polifenoles | Referencia |
|---|--|--|------------|
| Moras de Bay (<i>Laurus nobili</i>) | Metanol, ácido clorhídrico(0.1% v/v) | Columna con C-18 Sep-Pack | 1 |
| Maiz Morado (<i>Zea mayz</i>) | Metanol, ácido acético (5% v/v) | Amberlita XAD-7 | 2 |
| Camote de pulpa morada (<i>Ipomoea batatas</i>) | Metanol al 80 %, ácido acético(7 % v/v). | Filtro de celulosa y arena en extractor acelerado con solvente | 3 |
| Calafate (<i>Berberis microphylla</i>) | Metanol, ácido fórmico (3 % v/v). | Microfiltración | 4 |
| <i>Rubus</i> spp. | Metanol al 80%, ácido trifluoroacético (0.3 % v/v) | Amberlita XAD-7 y Sefadex LH-20 | 5 |

1). Longo y Vasapollo, 2005. 2). Cuevas y col., 2008. 3). Truong y col., 2010. 4). Ruíz y col., 2010. 5). Cuevas-Rodríguez y col., 2010.

2.4.2 Separación de polifenoles

La mezcla obtenida de la lixiviación, generalmente contiene sustancias que interfieren con los análisis y que deben ser separadas, es frecuente el uso de resinas para absorción en fase sólida y/o cromatografía en sus diferentes modalidades (de capa fina, en columna, líquida de alto rendimiento, cromatografía de alta velocidad a contracorriente o combinaciones de estas.) para lograr obtener las moléculas aisladas, a continuación se presentan algunas opciones comunes para lograr el aislamiento.

2.4.2.1 Cromatografía de capa fina

Aunque el uso de la cromatografía de capa fina TLC por sus siglas en inglés (Thin Layer Chromatography) no es comúnmente reportada en investigaciones de identificación y caracterización de antocianinas, es una opción en la separación de compuestos debido a que ha mostrado constantes innovaciones (Delgado-Vargas *et al.* 2000), además de mantener como ventajas lo práctico, rápido y económico que resulta de aplicar, por lo cual se puede utilizar como un paso preparativo previo al análisis mediante técnicas más complejas y costosas (Marston y Hostettmann, 2006). Una actualización de la técnica, es la cromatografía de capa fina de alto rendimiento (HP)TLC, que adiciona una metodología moderna y estandarizada, y la posibilidad de hacer una detección precisa de compuestos y derivatización en la misma placa, permitiendo comparar de forma común compuestos con diferencias en factores de retención (R_f) de hasta 0.03, y cuando son menores utilizar diversos sistemas de solventes para garantizar la definición (Cimpoi, 2006).

2.4.2.2 Extracción en fase sólida

La purificación del extracto obtenido de la muestra vegetal es necesaria, dado que el sistema de solventes comúnmente usados, no es específico para un grupo particular de polifenoles, por lo cual se obtendrá una mezcla. Generalmente métodos convencionales como cromatografía en columna con gel de sílice, poliamida o extracción en fase sólida con resinas como sefadex y amberlita (cuadro 5) son usados para aislar y fraccionar antocianinas de plantas (Valls y col., 2009). De acuerdo con Rodríguez-Saona y col. (2009), el uso de la extracción en fase sólida permite remover compuestos presentes en la

mezcla cruda y que interfieren con el análisis. Mediante el uso de columnas de C18 enlazadas con sílica, estas retienen compuestos fenólicos y permiten el paso de azúcares y ácidos, posteriormente los polifenoles son removidos con un solvente apropiado.

2.4.2.3 Cromatografía de alta velocidad a contracorriente

La cromatografía de alta velocidad a contracorriente HSCCC por sus siglas en inglés (High Speed, Countercurrent Chromatography) es una técnica de separación líquido-líquido, las bases generales para la separación de compuestos deseados, son operaciones rápidas y continuas de mezclado y separación de sistemas de solventes bifásicos inmiscibles en fuertes y rápidamente alternantes campos de fuerza centrífuga. Entre las ventajas de aplicar esta técnica se tiene que al no haber fase fija, se minimizan los efectos de adsorción irreversible (lo cual tiende a suceder en las resinas con los compuestos fenólicos), se opera en condiciones no extremas y permite que la muestra no se destruya durante el aislamiento, aun muestras muy lábiles (Valls y col., 2009), además de no ser necesario contar con una columna de composición especializada para la separación, tener costos más bajos en los solventes comparados con los necesarios para HPLC, recuperarse el 100% del analito, poderse trabajar con extractos crudos que contengan partículas y tener posibilidad de escalar la técnica a nivel industrial (Cuevas y col. 2008). Esta técnica puede usarse como un paso previo a la cromatografía líquida de alto rendimiento y acoplarse a equipos de identificación por espectrometría.

2.4.2.4. Filtración por membranas

Una membrana es una película delgada que separa una mezcla en dos corrientes y actúa como barrera selectiva dejando pasar solo ciertas moléculas, la corriente retenida, es denominada “retenido” o “concentrado” y la corriente que pasa a través de la membrana, se denomina “permeado” (Cheryan, 1998). Estas membranas pueden ser utilizadas en procesos de concentración o fraccionamiento y se han utilizado para separar y fraccionar polifenoles de uva (Tsibranska y Saykova, 2013; Santamaría y col., 2002). Los rangos de separación se basan en las propiedades de las membranas utilizadas, determinando qué

partículas serán retenidas y cuáles pasarán a través de la membrana. En la Figura 16 se muestran los rangos de aplicación de la filtración por membranas.

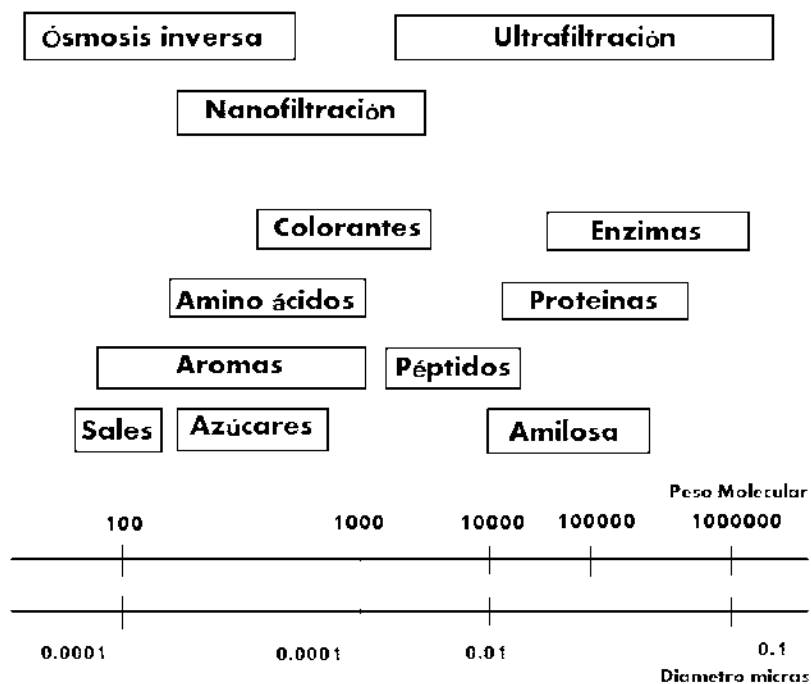


Figura 16. Rango de aplicación de la filtración.

2.4.2.5 Cromatografía líquida de alto desempeño

La cromatografía líquida de alto desempeño HPLC por sus siglas en inglés (High Performance Liquid Chromatography) se ha convertido en el método estándar para la identificación y separación en la mayoría de los laboratorios (Mazza y col., 2004). La HPLC acoplada a un detector por arreglo de diodo (DAD), es una técnica ampliamente difundida para la separación y caracterización de compuestos fenólicos en muestras de plantas (Gavrilova y col., 2011; Truong y col., 2010). En términos generales una cromatografía se realiza permitiendo que la mezcla de moléculas que se desea separar, interaccione con un medio o matriz de soporte que se denomina fase estacionaria. Un segundo medio (la fase móvil) que es inmisible con la fase estacionaria se hace fluir a través de esta para lavar (eluir) a las moléculas en la muestra.

Cuando se utiliza una fase estacionaria polar en combinación con una fase móvil de baja polaridad, la cromatografía se denomina de fase normal; cuando la fase estacionaria es de polaridad baja y la fase móvil de polaridad alta, la cromatografía se denomina de fase reversa. Otro aspecto importante en la HPLC es el tipo de elución; la elución isocrática se realiza a composición constante del eluyente, mientras que la elución en gradiente, emplea una variación controlada en la composición para generar un aumento en la fuerza eluyente obteniendo mejor resolución. El objetivo primordial de la HPLC es la separación y las separaciones se pueden dividir en tres categorías: De alto rendimiento, de alta productividad y de alta resolución, que están relacionadas con la metodología seguida para la separación. Para establecer las condiciones de separación, se puede recurrir a dos opciones, la primera es entender la naturaleza química de la muestra y tratar de seleccionar la mejor opción para las condiciones iniciales, y la otra es suplementar la información con datos de la literatura, aunque casi siempre la mejor estrategia resulta de una mezcla de ambas opciones (Snyder y col. 1997). Algunas consideraciones que pueden ser útiles al establecer un protocolo de separación por HPLC son; La muestra debe ser soluble; los analitos deben ser retenidos y tener migración diferencial en la columna; la fase móvil controla la separación mientras que la fase estacionaria influye el mecanismo de separación; la solución que contenga el analito debe ser preparada con el solvente de la fase móvil (Ahuja y Dong, 2005).

3. JUSTIFICACIÓN

El análisis de compuestos polifenólicos es una importante área de desarrollo científico. Se dedican muchos recursos a la investigación de polifenoles debido a su demostrada capacidad para prevenir el desarrollo de enfermedades crónicas degenerativas a través de sus propiedades antioxidantes, y a las posibilidades de desarrollo de productos naturales que incidan de manera importante en la salud humana; el campo de acción es muy amplio ya que existen miles de estos compuestos contenidos en los vegetales, cuyo valor se puede ver influido en cierto grado por la presencia de altas concentraciones de polifenoles imprimiéndole un carácter de alimento nutracéutico. Michoacán cuenta con una gran diversidad vegetal tanto silvestre como cultivada que ha sido poco explorada para la

caracterización de fitoquímicos y su potencial nutracéutico, por ello se considera importante iniciar estudios que permitan identificar y caracterizar compuestos en frutos, cuyo consumo incida en la salud para valorar su introducción como fuentes de antioxidantes. Esto ayudará a crear opciones para el desarrollo de nuevos frutos y darles valor agregado al reportarlos como alimentos nutracéuticos.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Obtener y caracterizar antocianinas y otros compuestos fenólicos de especies silvestres de *Rubus* spp, *Styrax ramirezii* y una selección de *Vaccinium* spp. colectadas en el estado de Michoacán.

4.2 Objetivos específicos

- Colectar y caracterizar morfológicamente al menos dos especies silvestres con pigmentos antociánicos, utilizadas por comunidades rurales para su consumo.
- Estandarizar los protocolos para la obtención y aislamiento de polifenoles de muestras vegetales silvestres y cultivadas.
- Cuantificar y caracterizar compuestos fenólicos por técnicas cromatográficas, espectroscópicas y de espectrometría de masas.
- Evaluar la capacidad antioxidante de los extractos de los frutos.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Materiales Vegetales

Para la localización de especies silvestres de *Styrax ramirezii*, y *Rubus* spp. se recurrió a la revisión bibliográfica, entrevistas con gente relacionada en el área, encargados de jardines botánicos, productores y vendedores de frutillas en los principales mercados cercanos a las áreas boscosas. Las variedades no comerciales domesticadas de arándano *Vaccinium* spp. se obtuvieron de una colección de plantas descendientes de los cultivares bluecrop y legacy (*V. corymbosum*), obtenidas por polinización selectiva y germinación de semillas, pertenecientes al Dr. José López Medina, fitomejorador de la Facultad de Agrobiología de la Universidad Michoacana de san Nicolás de Hidalgo. Frutos de zarzamora comercial cultivar Tupy, se compraron en un supermercado local.

Para la ubicación se tomaron datos georreferenciales del lugar de colecta y para la descripción morfológica se revisaron las principales características físicas de la planta. Una especie silvestre nombrada SNG (Señaladero Negra Grande) identificada como *R. cymosus*, y otra morfo especie denominada SRM (Señaladero Roja Mediana) se ubican en la comunidad de Señaladero municipio de Hidalgo Michoacán. Otra morfo especie de *Rubus* denominada RC (Roja Canoas), al igual que las plantas de *Vaccinium* spp. (Las plantas corresponden a los individuos 810 y 811), se ubican en el rancho Las Canoas municipio de Acuitzio, Michoacán.

Los frutos de *S. ramirezii* se colectaron durante la primavera de 2012; los frutos de SNG y SRM durante los veranos de 2011 y 2012, los frutos de RC durante el verano de 2012 y los frutos de *Vaccinium* spp. se colectaron durante el verano de 2011. Todos los frutos se colectaron en estado de madurez completa. La colecta y transporte de los materiales hasta el laboratorio se realizó utilizando recipientes térmicos refrigerados para evitar la deshidratación y cambios en sus propiedades. Una vez en el laboratorio, los frutos enteros de todos los tipos de *Rubus* spp., de *S. ramirezii*, así como frutos enteros de *Vaccinium* spp. (Las muestras se identificaron como 810w y 811w) y epicarpio separado del fruto (las muestras se identificaron como 810p y 811p), se congelaron con nitrógeno, se liofilizaron y una vez completamente deshidratados, se retiraron las semillas de los frutos de *Styrax* y todas las muestras se molieron finamente, se envasaron protegidas de la luz y se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

5.2 Reactivos

Solventes de grado LC-MS; Metanol, acetonitrilo y ácido fórmico, se compraron de Honeywell B&J VWR International (Suwanee, GA, USA). Solventes de grado HPLC; Metanol, y ácido trifluoroacético (TFA) fueron de Fisher Scientific (Fairlawn, NJ, USA), ácido acético de J.T. Baker VWR International (Suwanee, GA, USA), ácido fórmico de Macron Chemicals (Netherland). Compuestos de grado reactivo; Etanol de Fisher Scientific USA, reactivo de Folin-Ciocalteu, 4-Dimetilaminocinamaldehído (reactivo DMAC), ácido gálico, ácido clorhídrico, cloruro de potasio, acetato de sodio, hidróxido de sodio, nitrito de sodio, cloruro de aluminio, estándares de catequina, epicatequina, ácido clorogénico, ácido gálico, ácido elágico y DPPH fueron de Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA), trolox de Aldrich Chemistry (Switzerland). Estándares de antocianinas; Cianidina-3-glucósida (Cian-3-Glu) y cianidina-3-sambubiósida (Cian-3-Samb) de Polyphenols (Sandnes, Noruega). Estándares de procianidinas; Procianidinas A1, A2, B1 & B2 de Chromadex (Irvine, CA, USA). Agua ultrapura de Mili-Q (Billerica, MA, USA).

5.3 Obtención de extractos polifenólicos

El proceso de extracción para obtención de extractos crudos (EC), se hizo de acuerdo al diagrama de flujo mostrado en la Figura 17.

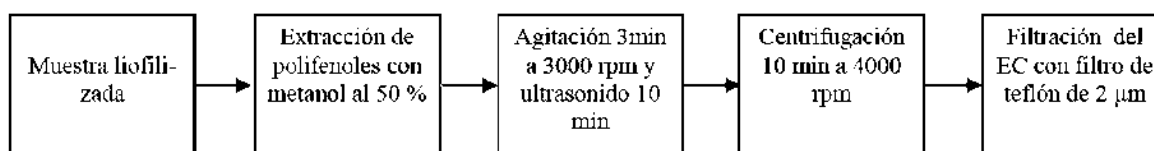


Figura 17. Diagrama de flujo del proceso de obtención de extracto crudo(EC).

Para la obtención de los EC utilizados en la cuantificación de polifenoles totales, antocianinas totales, proantocianidinas, flavonoides totales y actividad antioxidante, de todas las muestras e identificación por LC-MS de polifenoles de arándano, se mezclaron por separado, 5 mg de pulpa liofilizada de mamuyo, fruto entero liofilizado de zarzamoras y arándano, y epicarpio de arándano, con 1 mL de metanol al 50 %, cada mezcla se agitó en

vortex por 3 minutos a 3000 rpm, enseguida se colocaron en un baño ultrasónico por 15 minutos y se centrifugaron por 10 min a 4000 rpm. El sobrenadante (EC) se colectó y filtró usando filtro de teflón (PTFE) de 2 μ m, el extracto crudo se almacenó a -20 °C hasta su análisis.

El proceso de extracción y obtención de extractos post amberlita (EPA), ricos en polifenoles para el análisis de identificación por LC-MS-TOF y fracciones para análisis de LC-MSⁿ-IT-TOF, se hizo siguiendo el proceso mostrado en el diagrama de flujo de la figura 18.

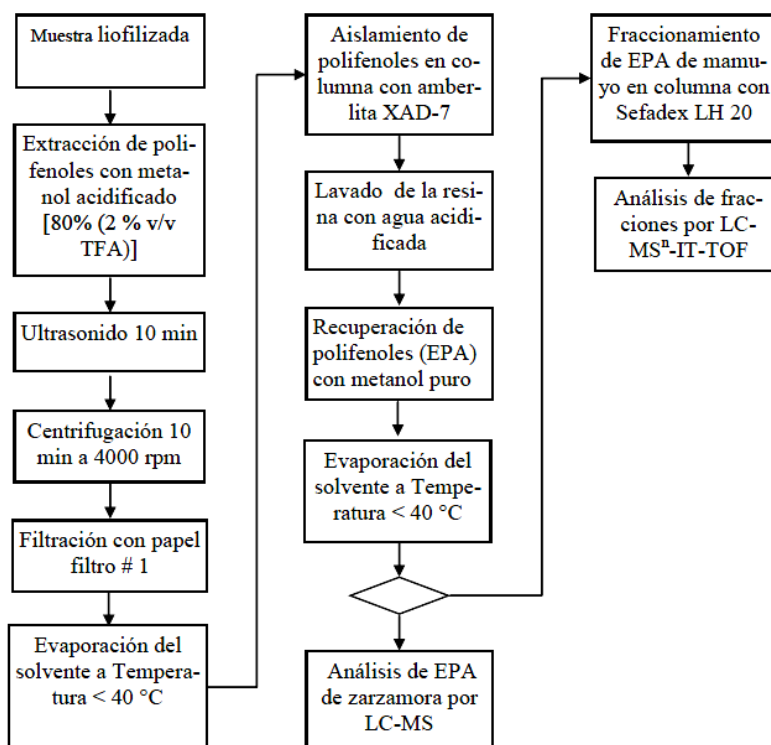


Figura 18. Proceso de obtención de EPA y fracciones para análisis de identificación.

Para la obtención de extractos ricos en polifenoles, 10 g de cada muestra (pulpa liofilizada de mamuyo así como de fruto entero liofilizado de cada tipo de zarzamora), se mezclaron por separado con 100 mL de metanol [80 % (2% v/v TFA)], se colocaron en baño ultrasónico por 10 min y se centrifugaron 10 min a 4000 rpm los sobrenadantes se colectaron y cada residuo se extrajo dos veces más de la misma manera, enseguida los sobrenadantes se combinaron, se filtraron con papel filtro #1 y el metanol se evaporó en evaporador rotatorio (T < 40 °C). La fase acuosa se cargo en una columna con amberlita

XAD-7 previamente equilibrada con agua acidificada (2 % v/v ATF), se lavó con agua acidificada y los polifenoles se eluyeron con 500 mL de metanol puro. Enseguida el metanol se evaporó a baja temperatura ($T < 40\text{ }^{\circ}\text{C}$) para obtener los EPARicos en polifenoles.

Para el análisis de identificación de polifenoles de mamuyo por LC-MSⁿ-IT-TOF, la fase acuosa del EPA de mamuyo se pasó a una columna cromatográfica con sefadex LH-20 y se fraccionó primero usando metanol [80 % (0.5 % v/v ácido acético)], obteniendo 8 fracciones (ricas en antocianinas), enseguida se usó una mezcla de 70% acetona 30% agua como solvente para eluir la fracción rica en procianidinas.

5.4 Cuantificación de antocianinas por HPLC

El análisis de todas las muestras se realizó en un equipo Agilent Technologies 1200 series HPLC, usando una columna de fase reversa Zorbax Eclipse XDB-C18 de 4.6 x 250 mm, 5 μm , USA. La fase móvil fue 5 % de ácido fórmico en agua (solvente A) y 100 % metanol (solvente B). El flujo fue de 1 mL / min en gradiente de 90, 85, 80, 75, 70, 40 y 90 % de solvente A por 5, 10, 5, 5, 20, 5 y 10 minutos respectivamente. La temperatura de la columna fue de 30 $^{\circ}\text{C}$, las mediciones se hicieron por triplicado. Diluciones de cian-3-glu a concentraciones de 0.03125, 0.0625, 0.125, 0.25 y 0.5 mg / mL se utilizaron para construir una curva estándar obteniéndose una $R^2 = 0.9996$, los valores se reportan como mg Cian-3-Glu eq. / g m.s.

5.5 Análisis de polifenoles totales

La concentración de polifenoles totales de los EC de todas las muestras se midió como miligramos de ácido gálico equivalente por gramo de materia seca (mg AGE x g^{-1} M.S.), usando una modificación a la metodología reportada por Ainsworth y Gillespie (2007). Para lo cual, alícuotas de 0.5 mL del extracto crudo se diluyeron con 4 mL de agua y se mezclaron con 0.5 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu, enseguida se adicionaron y mezclaron completamente 5 mL de una solución de carbonato de sodio 0.5 M y 2.5 mL de agua. Después de dos horas de incubación en oscuridad se midió la absorbancia a 765 nm

en un espectrofotómetro Shimadzu UV-2450/UV-Visible. Los valores de concentración se obtuvieron comparando contra una curva estándar de ácido gálico construida con diluciones de 50, 100, 250 y 500 mg / L ($R^2 = 0.9999$) las mediciones se hicieron por triplicado.

5.6 Cuantificación de proantocianidinas

Las proantocianidinas de mamuyo y zarzamora se cuantificaron siguiendo la metodología reportada por Wallace y Giusti (2010), para lo cual, alícuotas de 63 μ L de los EC y del estándar se mezclaron por separado con solución al 0.1% de reactivo DMAC. La absorbancia se midió después de 30 minutos a 640 nm y los valores se compararon con una curva estándar construida con diluciones del estándar de 100, 50, 25, 12.5 y 6.25 μ g/L, obteniendo una $R^2 = 0.973$. Los resultados se reportan como mg de procianidina A por gramo de materia seca (mg PAC/g m.s.).

5.7 Cuantificación de flavonoides totales

Los flavonoides totales de las muestras de mamuyo se midieron usando una modificación de la metodología reportada por Dae-Ok y col. (2003). Brevemente, 0.6 mL de extracto crudo se diluyó con 2.4 mL de metanol al 50 % para hacer tres alícuotas de 1 mL. Cada alícuota o estándar (diluciones de 20, 40, 60, 80 y 100 mg / L de catequina) se mezcló con 4 mL de agua en un matraz volumétrico de 10 mL. Enseguida, fueron adicionados 0.3 mL de solución de nitrito de sodio (NaNO_2) al 5%. Después de 5 minutos, se adicionaron 0.3 mL de tricloruro de aluminio (AlCl_3). Un minuto después, se agregaron 2 mL de solución 1 M de hidróxido de sodio e inmediatamente se diluyó la mezcla hasta el volumen de 10 mL. La absorbancia se midió a 510 nm por triplicado. Se construyó una curva estándar con diluciones de catequina ($R^2 = 0.9996$), los valores se reportan como mg CatE (catequina equivalente) / g m.s.).

5.8 Medición de la capacidad antioxidante por DPPH

La capacidad antioxidante se midió como miligramos de Trólox equivalente por gramo de muestra seca (mg TE / g m.s.), usando una modificación a la metodología reportada por Brand-Williams y col. (1995). Para lo cual, alícuotas del EC de cada muestra se mezclaron con 0.08 M de solución de DPPH en metanol al 80%, midiéndose la absorbancia a 515 nm después de tres horas en oscuridad, los resultados se obtuvieron con una curva estándar construida con diluciones de 100, 200, 300, 400 y 500 μmol de Trólox diluidos en etanol al 95%.

5.9 Identificación y cuantificación de compuestos por espectrometría de masas LC-MS-TOF

Cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas con tiempo de vuelo 6220 Accurate-Mass-TOF LC/MS Agilent Technologies, se empleó para el análisis de identificación de antocianinas en los EC de las muestras de arándano y en los EPA de las muestras de zarzamora, así como para la cuantificación e identificación de taninos hidrolizables en los EPA de las muestras de zarzamoros. El sistema está equipado con un HPLC Agilent Technologies 1200 Series, en la separación se empleó una columna Zorbax XDB-C18 de fase reversa, 4.6 x 250 mm, 5 μm , EUA. La fase móvil consistió de 5 % acetonitrilo en agua (solvente A) y acetonitrilo, agua, ácido fórmico 95-5-1 % (solvente B) el flujo fue de 0.4 mL x min^{-1} en gradiente de 0, 30, 60, 90, 0 y 0% del solvente B a los 0, 30, 45, 50, 51 y 60 min respectivamente. La temperatura del gas fue de 350 °C con un flujo de 10 L x min^{-1} . La concentración de tanninos hidrolizables se calculó como mg equivalentes de ácido elágico por gramo de materia seca (mg EAE/ gm.s.) de manera cualitativa por comparación con estándar de ácido elágico.

5.10 Análisis de identificación cualitativa de proantocianidinas en muestras de mamuyo por HPLC.

El análisis se realizó en fase normal usando un equipo de HPLC Agilent Technologies 1200 series. Se utilizó una columna Devosil diol (Phenomenex, Torrance, CA) de 250 mm x 4.6 mm d. i., 5 μ m. La fase móvil consistió de 2% ácido acético en acetonitrilo (solvente A) y metanol, agua, ácido acético (95, 3, 2 %). Soluciones estándar de proantocianidinas A1, A2, B1, B2, catequina y epicatequina se co-inyectaron para la identificación cualitativa.

5.11 Identificación de compuestos por espectrometría de masas LCMSⁿ-IT-TOF

Para la identificación de compuestos fenólicos en las fracciones de mamuyo, se utilizó un equipo de espectrometría de masas con ionización por electrospray, trampa de iones y tiempo de vuelo (Zhimadzu Scientific Instruments, Columbia, MD). El sistema de LCMS-IT-TOF es un espectrómetro de masas en tándem diseñado para alta precisión en análisis de LC-MSⁿ. Está equipado con un sistema de UHPLC Prominence (automuestreador SIL-20A HT, sistema de bombeo LC-20AD, detector de arreglo de diodos SDP-M20A). La separación se realizó utilizando una columna Shim-Pack XR-ODA (3 mm d.i. x 75 mm, 2.2 μ m; Shimadzu Scientific Instruments, Columbia, MD). El flujo fue de 0.35 mL / min, la temperatura de la columna fue de 40 °C, la fase móvil consistió de 0.1 % de ácido fórmico en agua (solvente A) y 0.1 % de ácido fórmico en metanol (solvente B) en gradiente de 5, 8, 14, 14, 25, 85, 5 y 5% de solvente B a 0, 5, 10, 15, 20, 25, 35 y 40 minutos respectivamente. La ionización por electrospray se operó a temperatura del CDL de 200.1 °C, temperatura del block de 200°C, voltaje del CDL de 17 eV, flujo del gas (N₂) 1.5 mL / min.

5.12 Análisis estadístico

El análisis de varianza y comparación de medias por el método de diferencia mínima significativa (LSD), para la concentración de antocianinas en las muestras de zarzamora se realizó con el programa SAS a un nivel $\alpha=0.05$.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Ubicación de especies y descripción de morfoespecies silvestres

Rzedowsky y Calderon (2005), mencionan la existencia de 9 especies silvestres de *Rubus* en Michoacán, señalando la dificultad para la circunscripción de especies. Carranza (1993) y Fritsch (1997) identificaron a *Styrax ramirezii* en Michoacán. En este trabajo se localizaron 3 morfoespecies de *Rubus* y una *Styracaceae*, la ubicación de plantas de zarzamora SNG y SRM, se realizó en la comunidad de Señaladero municipio de Hidalgo Michoacán, y la planta de RC en el municipio de Acuitzio Michoacán (la ubicación geográfica se muestra en el Cuadro 6).

A partir de las muestras de plantas llevadas al Instituto de Ecología A.C. en Pátcuaro, se identificó a SNG como *Rubus cymosus* por el botánico Dr. Sergio Zamudio Ruiz y se corroboró la identidad de la muestra de *Styrax ramirezii* con las muestras del herbario. La morfoespecie SRM no se identificó y presenta como características principales: Tallo principal glabro, arqueado-postrado, forma de la sección transversal circular, con espinas rectas e inclinadas, hojas compuestas trifoliadas o pentafoliadas, forma del foliolo ovado, inflorescencia en corimbos, fruto rojo oscuro en la madurez, forma cónica a ovoide. Por su parte, el tercer material (RC) tampoco se logró identificar pero por sus rasgos morfológicos se puede considerar como una especie afín a *Rubus humistratus*, presentando como características principales: Tallo principal arqueado-postrado, glabro de corteza rojiza, sección transversal circular, espinas curvas algunas veces pigmentadas, sobre todo las cercanas a la base del tallo principal, hojas trifoliadas y rara vez pentafoliadas, forma del foliolo ovado, inflorescencia en corimbos con pocas flores de pétalos blancos elípticos, frutos de forma subcónica a hemisférica de color rojo oscuro en la madurez.

Cuadro 6. Georreferencias de los sitios de ubicación de especies y morfoespecies de plantas silvestres.

| | <i>Styrax r.</i> | SNG | SRM | RC |
|-----------|------------------|------------|------------|--------------------|
| Sitio | Señaladero | Señaladero | Señaladero | Las Canoas |
| Municipio | Hidalgo | Hidalgo | Hidalgo | Acuitzio del canje |

| | | | | |
|-------------|--------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|
| A.S.N.M. | 2519 m | 2569 m | 2551 m | 2584 m |
| Coordenadas | N19°36'21'' W100° 38'33.7'' | N 19°36'35.2'' W 100°38'24.6'' | N 19°36'34.1'' W 100° 38'23.1'' | N 19°30'11.8'' W 101°15'21.8'' |

La identificación de especies silvestres de *Rubus* presenta un alto grado de complejidad ya que suelen ser muy variables aparentemente por su frecuente reproducción apomítica e hibridación (Rzedowsky y Calderon, 2005), y a menudo se mezclan por estar compartiendo la misma área.

Las plantas de *Rubus cymosus* localizadas en la comunidad de señaladero, son comunes y presentan atractivas características, particularmente el tamaño de sus frutos. Las plantas SRM son escasas en el área pero producen una cantidad de frutos notoriamente superior a SNG, su principal atractivo reside en el color rojo oscuro que presentan en estado de madurez completa. Las plantas de RC se encontraron en un área del bosque muy segmentada por el cambio de uso de suelo, las plantas son comunes pero la extensión del área en que se encuentran es muy reducida (aproximadamente 1 Ha). Entre sus principales características se cuenta con que el fruto no es completamente negro al madurar si no que presenta una coloración rojo oscuro.

6.2 Obtención de extractos polifenólicos

La extracción de polifenoles y el grado de aislamiento se hizo atendiendo a las necesidades y objetivos de los análisis. En este trabajo, se distinguen dos tipos de análisis realizados, los de cuantificación y los de identificación.

Para la cuantificación se siguieron principalmente métodos espectrofotométricos en los que no interfieren los componentes diferentes a los polifenoles debido a la característica que tienen de absorber radiaciones electromagnéticas en longitudes de onda particulares (por ejemplo las procianidinas absorben radiaciones del orden de los 280 nm), en estos casos los EC fueron suficientes al hacer las mediciones.

El análisis de cuantificación por HPLC realizado para las antocianinas de todas las muestras, se logró efectuar con los extractos crudos sin interferencia de otros compuestos gracias a la selección de los métodos, permitiendo tener una excelente resolución de los cromatogramas (Figura 19). Es importante resaltar que además de las

condiciones de operación del equipo de HPLC, el uso de extractos crudos para la cuantificación, implica que al finalizar el proceso de extracción, la concentración de polifenoles en los EC deberá ser adecuada para la obtención de los cromatogramas.

La cuantificación de TH por LC-MS solo se hizo en zarzamoras ya que por reportes previos se sabe que son ricas en estos compuestos, principalmente elagitaninos (Serrano, 2009; Cuevas-Rodriguez, 2010), lo que no sucede con los arándanos ni el mamuyo, ya que en pruebas de LC-MS realizadas con el EC de estos frutos, no se identificaron posibles moléculas correspondientes a TH en cantidades que ameritaran el mismo tipo de análisis que el realizado para las zarzamoras. Sin embargo la cuantificación de TH en zarzamoras no pudo realizarse con HPLC-DAD simple, tal vez debido a la complejidad de las moléculas (Lee y col., 2012), lo que dificulta su separación y causa un enmascaramiento ya que otros polifenoles absorben longitudes de onda similares, por tanto fue necesario purificar los EC de zarzamora con Amberlita y confirmar por MS la presencia de TH característicos de zarzamoras.

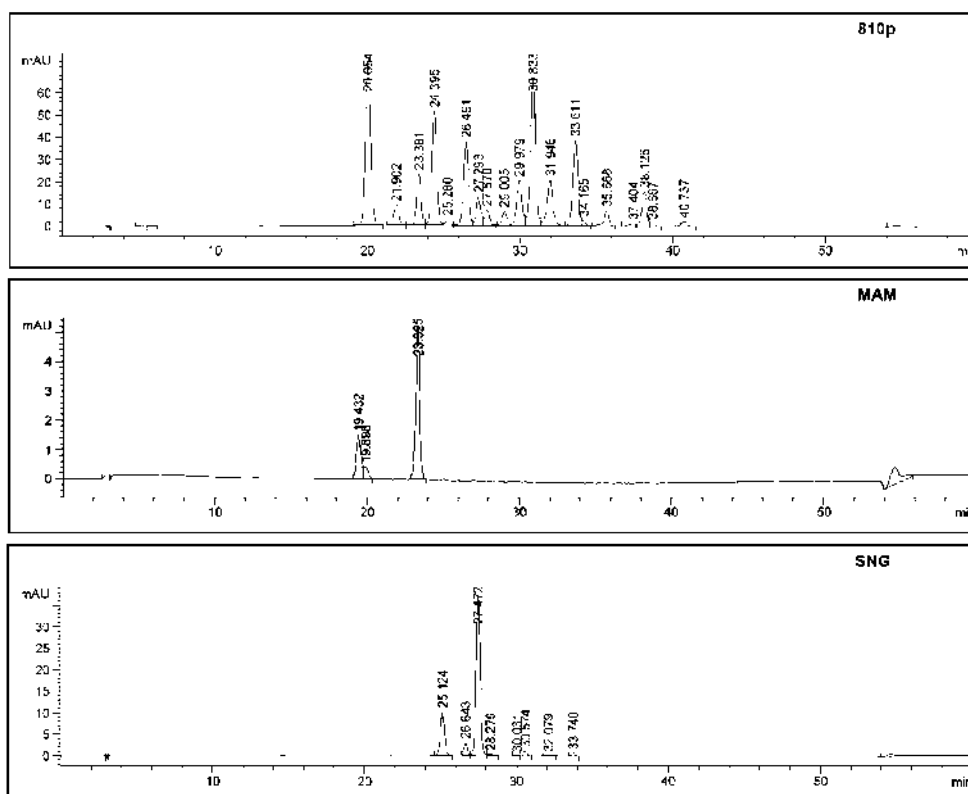


Figura 19. Cromatogramas a 520 nm de longitud de onda, muestran las antocianinas de EC representativas de los frutos y tejidos analizados; arándano 810p, mamuyo MAM y zarzamora SNG.

Por último los extractos crudos, deben ser centrifugados el tiempo suficiente para separar grandes compuestos como fibras y deben ser filtrados con un tamaño de poro que garantice que no se obstruirá la columna del equipo, es común el uso de microfiltros de teflón que además evitan que los compuestos polifenólicos se adhieran a la membrana como en el caso de la celulosa.

Para la identificación se realizaron dos tipos de análisis; a) Análisis cualitativo de identificación por HPLC con estándares y b) Análisis de espectrometría de masas. Para el análisis cualitativo de identificación puede no convenir el uso de extractos crudos ya que los compuestos pueden co-eluir y formar un solo pico en el cromatograma lo que podría originar una identificación equivocada. Para lograr una imagen adecuada de los polifenoles del extracto, se puede purificar y fraccionar, aun previo a la separación por HPLC lográndose una mejor resolución. En la Figura 20 se aprecia la diferencia entre la separación lograda en el extracto crudo de mamuyo y en las fracciones obtenidas por cromatografía de columna con Sefadex LH-20.

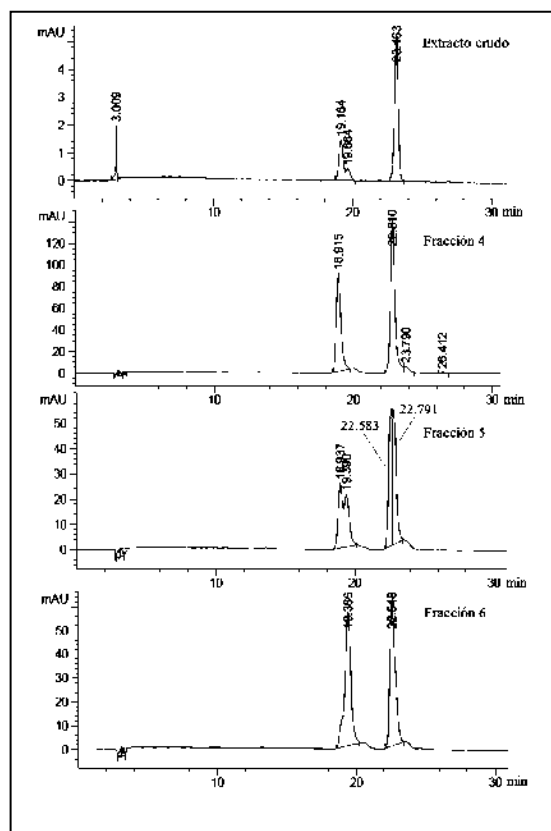


Figura 20. Cromatogramas de mamuyo obtenidos a 520 nm) EC, los picos contienen las cuatro especies de antocianinas presentes en la muestra.b) Fracciones, muestran la separación de las cuatro

especies de antocianinas logrado por la purificación con amberlita y fraccionamiento con sefadex en cromatografía de columna.

Para el análisis de identificación por espectrometría de masas, la selección entre un extracto crudo y uno purificado, está relacionado con la cantidad de diferentes compuestos presentes en el extracto y/o el conocimiento que se tenga de la muestra. Se puede utilizar un extracto crudo y confirmar las especies moleculares características de la muestra, sin embargo la corriente total de iones (TIC) podría contener una cantidad tan grande de compuestos detectados que se dificultaría establecer cuáles son los principales, por tener masas moleculares similares (Figura 21). En caso de necesitarse una mejor resolución, la purificación de polifenoles del EC es favorable para reducir la diversidad de moléculas. Para los análisis de identificación de compuestos polifenólicos en mamuyo, se optó por emplear las muestras fraccionadas debido a que se no se contaba con ningún antecedente sobre análisis de caracterización en estos frutos.

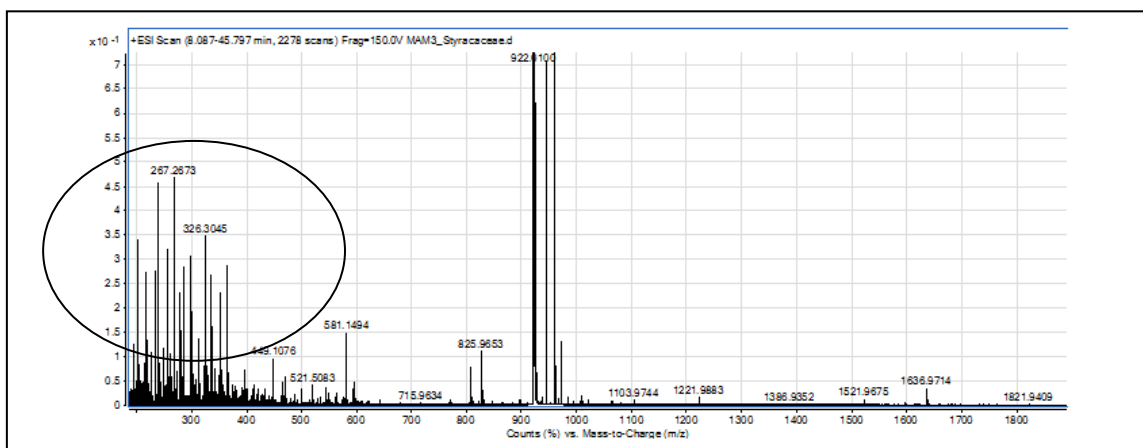


Figura 21. Extracto del espectro de iones (ESI) del EC de mamuyo. La parte circulada muestra la dificultad para establecer los principales compuestos debido a la similitud en sus masas moleculares.

6.3 Cuantificación de antocianinas por HPLC

Los valores obtenidos para la concentración de antocianinas en frutos de zarzamora, se muestran en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Valores de la concentración de antocianinas en las diferentes muestras de zarzamorras.

| Muestra | SNG ^a | SRM ^b | RC ^c | Tupy ^d |
|---------|------------------|------------------|-----------------|-------------------|
|---------|------------------|------------------|-----------------|-------------------|

| | | | | |
|--|------------|-------------|-------------|--------------|
| Concentración (mg Cian-3-Glu eq. / g m.s.) | 3.44± 0.01 | 10.02± 0.34 | 11.90± 0.03 | 12.26 ± 0.02 |
|--|------------|-------------|-------------|--------------|

Superíndices diferentes indican que las muestras tienen diferencia significativa a un nivel $\alpha = 0.05$

Los valores de la concentración de antocianinas del resto de los frutos se muestran en el Cuadro 8. Los niveles de antocianinas en las zarzamoras silvestres analizadas, resultaron comparables a los reportados por diversos investigadores (Cuadro 9).

Cuadro 8. Valores de la concentración de antocianinas en muestras de arándano y mamuyo.

| Muestra | 810w | 810p | 811w | 811p | Mamuyo |
|--|--------------|--------------|--------------|--------------|-------------|
| Concentración (mg Cian-3-Glu eq. / g m.s.) | 23.71 ± 0.14 | 90.62 ± 1.67 | 14.48 ± 0.17 | 91.54 ± 1.73 | 1.21 ± 0.01 |

La letra w en las muestras indica que trata de fruto entero, la letra p indica que se trata del epicarpio.

Cuadro 9. Valores del contenido de antocianinas reportados en muestras de zarzamoras silvestres.

| Muestra | Concentración mg Cian-3-Glu eq. / g m.s. | Referencia |
|------------------------|---|------------------------------|
| <i>R. adenotrichos</i> | 9.2 | Cuevas-Rodríguez y col. 2010 |
| <i>R. adenotrichos</i> | 7.2 | Mertz y col. 2007 |
| <i>R. adenotrichos</i> | 8.96 | Acosta-Montoya y col. 2010 |
| <i>R. glaucus</i> | 8.8 | Cuevas-Rodríguez y col. 2010 |
| <i>R. glaucus</i> | 10.1 | Mertz y col. 2007 |
| <i>R. corifolius</i> | 8.7 | Cuevas-Rodríguez y col. 2010 |

En arándanos, es sobresaliente el valor de antocianinas de los frutos de la muestra 810w; ambos frutos tienen niveles similares a los de variedades comerciales. Yousef y col. (2013) reportan un rango de valores de antocianinas totales de 11.58 a 24.08 mg Cian-3-glu eq. / g m.s. para los frutos de *V. corymbosum* cultivares Lenoir, Legacy, Sampson, Arlen, O'Neal, y Pamlico (Figura 22). La cantidad de antocianinas en el epicarpio de 810p es 3.8 veces superior al contenido en el fruto entero y 6.3 veces superior a 811w. Para ambos casos el contenido de antocianinas en el epicarpio, equivale a más del 9% de su peso.

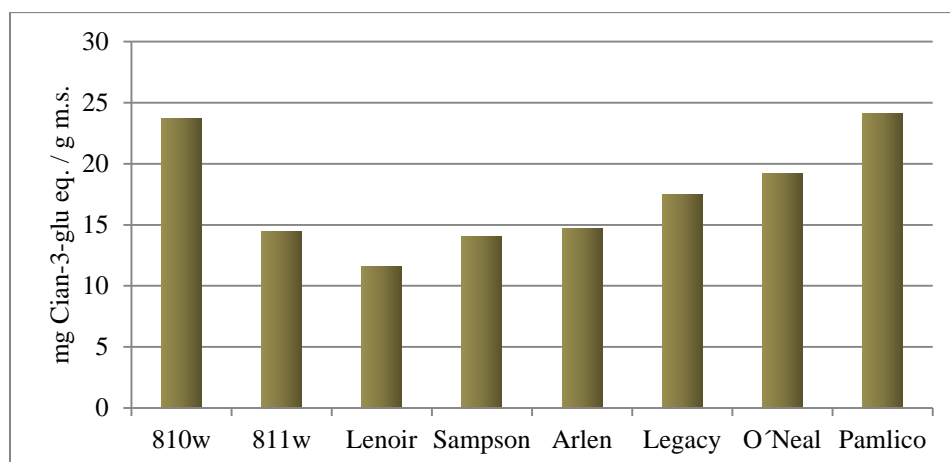


Figura 22. Valores de antocianinas totales medidas en frutos íntegros de arándano 810 y 811, comparados contra los reportados en reconocidas variedades comerciales en EUA.

El nivel de antocianinas en el mamuyo es bajo en comparación con el de otros frutos reconocidos por su alta concentración de antocianinas y su perfil es simple (4 diferentes tipos de antocianinas), sin embargo hasta donde se sabe este es el primer fruto de la familia *Styracaceae* del que se reporta la presencia de antocianinas.

6.4 Cuantificación de polifenoles totales por Folin-Ciocalteu

Todos los frutos analizados registraron importantes niveles de polifenoles totales (la Figura 23 muestra los valores obtenidos).

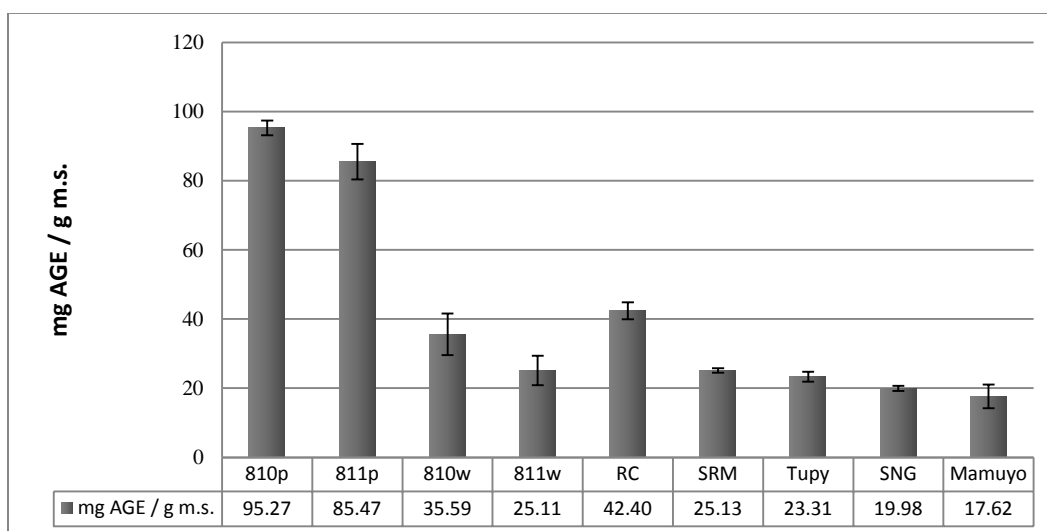


Figura 23. Valores de polifenoles totales medidos en las muestras analizadas.

Los frutos de mamuyo presentan niveles de polifenoles similar al de los arándanos y destaca la morfoespecie de zarzamora RC por tener el valor de fenólicos totales más elevado de todas las muestras de frutos enteros.

Las zarzadoras estudiadas exhiben niveles de polifenoles comparables a otras especies silvestres (Cuadro 10), valores reportados de polifenoles, medidos en frutos frescos de algunas especies silvestres y comerciales de zarzadoras se muestran en el Cuadro 11. Los valores obtenidos, así como los reportados previamente muestran una alta variabilidad de la que ya han hecho mención algunos autores (Lee y col., 2012; Garzón y col., 2009), y que se atribuye a la diferencia en las metodologías utilizadas para la obtención, conservación y análisis de la muestra, sin que haya una explicación concluyente para los hechos, pero que dificulta la comparación de resultados.

Cuadro 10. Valores de polifenoles totales en zarzadoras silvestres.

| | Polifenoles totales mg AGE / g m.s. | Referencia |
|-----------------------------------|--|----------------------------------|
| <i>R. adenotrichos</i> | 25.50 | Cuevas-Rodríguez y col., (2010a) |
| <i>R. glaucus</i> | 23.60 | Cuevas-Rodríguez y col., (2010a) |
| <i>R. corifolius</i> | 19.20 | Cuevas-Rodríguez y col., (2010a) |
| <i>R. adenotrichos</i> | 42.50 | Mertz y col., (2007) |
| <i>R. glaucus</i> | 63.00 | Mertz y col., (2007) |
| <i>R. adenotrichos</i> | 29.00 | Acosta-Montoya y col., 2010 |
| SNG (<i>R. cymosus</i>) | 19.98 | |
| SRM | 25.13 | |
| RC (<i>R. afin humistratus</i>) | 42.40 | |

Los arándanos 810 y 811, tienen niveles de polifenoles totales dentro del rango reportado por diferentes autores, Rodarte y col. (2008); Kalt y col. (2003); Moyer y col. (2002), evaluaron los polifenoles totales en frutos maduros de cultivares comerciales de *V. corymbosum*, reportando promedios de 33 mg AGE / g m.s. (cvs. Reka, Bluecrop, Puru y Berkeley), 15.13 mg AGE / g m.s. (cvs. Brigitta, Bluegold y Nelson) y 29.9 mg AGE / g

m.s.(cvs. Bluecrop, Brigitta, Duke, Rubel y Summit), respectivamente. Al comparar los valores y cultivares, nuevamente hay una evidente variabilidad en los resultados debido prácticamente a las mismas situaciones que suceden con el análisis de especies de *Rubus*, por lo cual se dificulta hacer comparaciones y/o conjeturas acerca de los resultados. El valor de polifenoles totales en el epicarpio de la muestra 810, es 2.7 veces superior al del fruto entero y para la muestra de epicarpio de 811, su valor es 3.4 veces más alto que el contenido en el fruto entero, estos valores son menores a los observados para la relación entre antocianinas en el epicarpio y el fruto entero (3.8 para 810 y 6.3 para 811), por lo que se puede conjeturar que el mesocarpio del fruto contiene una cantidad significativamente mayor de polifenoles diferentes a las antocianinas.

No existe un referente previo adecuado para comparar el nivel de polifenoles totales en frutos de mamuyo, dado que este es el primer fruto comestible de *Styracaceae* analizado del que se reportan compuestos fenólicos, sin embargo al compararlo con los frutos de zarzamora y arándano analizados en este trabajo y los reportados por otros autores, se aprecia que su valor de polifenoles totales está dentro de los rangos exhibidos por las mencionadas frutillas, que en el caso de zarzamoras va de los 19 a los 63 mg AGE / g m.s. y en arándanos de 15.13 a 35.6 mg AGE / g m.s.

Cuadro 11. Valores de polifenoles totales reportados en frutos frescos de zarzamoras silvestres y comerciales.

| | Polifenoles totales mg AGE / g m.f | Referencia |
|-------------------|---------------------------------------|---------------------|
| <i>R. glaucus</i> | 4.68 | Vasco y col., 2009 |
| <i>R. glaucus</i> | 2.94 | Garzón y col., 2009 |
| Cherokee | 4.07 | Moyer y col., 2002 |
| Marion | 5.60 | Moyer y col., 2002 |
| Navaho | 3.04 | Moyer y col., 2002 |

Se ha reportado que la cantidad de polifenoles totales está directamente relacionada con la actividad antioxidante (Wang y Lin, 2000; Prior y col., 1998), considerando esto como punto de partida para hacer una valoración de las cualidades nutraceuticas de los frutos analizados, los resultados arrojan las primeras luces sobre la posibilidad de conseguir un efecto positivo en la salud al consumirlos. Diversos estudios demuestran que las moras de

Rubus y *Vaccinium* son ricas en compuestos fenólicos, por esta razón han sido y siguen siendo objeto de múltiples análisis de caracterización de sus compuestos y actividad biológica, lográndose que a través de estos elementos de juicio, se les resalte como importantes frutos con capacidad de proteger y mejorar la salud humana (Paredes-López y col., 2010; Seeram, 2008; Lila 2007), motivando al análisis de especies silvestres y/o domesticadas con la finalidad de encontrar ejemplares con características similares superiores a las ya conocidas. Al mismo tiempo, se han analizado nuevas especies, buscando ampliar las posibilidades de obtener alimentos que continúen contribuyendo a la mejora de la salud humana y que sean al mismo tiempo, agradables para su consumo. Los resultados obtenidos hasta ahora, ayudan a orientar el manejo de las especies estudiadas como fuente de nuevas frutillas con aceptables niveles de polifenoles.

6.5. Cuantificación de proantocianidinas por DMAC

Los resultados de la cuantificación de proantocianidinas en zarzamora y mamuyo se muestran en el Cuadro 12. Sobresalen los valores de las muestras de mamuyo y frutos de zarzamora RC.

Cuadro 12. Contenido de proantocianidinas en muestras de zarzamora y mamuyo.

| | SRM | SNG | Tupy | RC | Mamuyo |
|-----------------------------------|-----|-----|------|-----|--------|
| Valor promedio mg PAC / g m.s. | 1.2 | 1.5 | 2.5 | 2.8 | 4.8 |
| Desv. Std. | 0.4 | 0.3 | 0.6 | 0.3 | 0.6 |

Análisis previos de proantocianidinas en frutos de zarzamoros revelaron que contienen cantidades importantes de estos compuestos (Cuevas-Rodríguez y col., 2010). En el presente trabajo, el rango medido de valores para proantocianidinas en muestras de zarzamoros va de 1.2 - 2.8 con promedio de 2 mg PAC / g m.s. lo que implica que la concentración de proantocianidinas en la muestra RC está un 40 % por encima del promedio para zarzamoros. El promedio para todas las muestras resultó de 2.56 mg PAC / g m.s. por lo cual al comparar el contenido de proantocianidinas en mamuyo, su

concentración resulta 87% mayor que el promedio y es 1.7 veces más alto que el de la muestra RC.Wang y col. (2011), en una investigación en frutas que incluía arándano rojo (cranberry), fresa, arándano (blueberry) y zarzamoras entre otras, cuantificaron el contenido de proantocianidinas por el método de DMAC (los resultados se aprecian en la Figura 24), reportando concentraciones en un rango entre los 36.3 - 75.9 con promedio de 56.98 mg PAC / g m.s. y al analizarlos, muestran que los frutos de zarzamora tuvieron nivel de concentración de proantocianidinas 0.35 veces menor que el promedio.

Considerando estos resultados, se aprecia que el mamuyo tiene valores de concentración de proantocianidinas superiores a los de frutillas altamente apreciadas como fuente de estos antioxidantes, lo cual fortalece su posición como fruta con cualidades nutraceuticas.

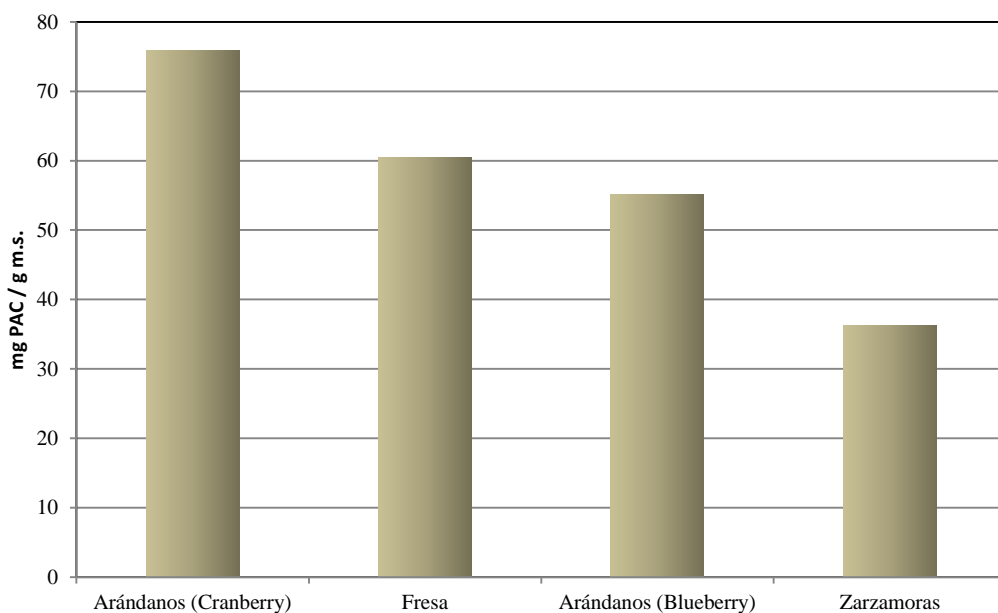


Figura 24. Comparación de los niveles de proantocianidinas medidos en diferentes frutillas (modificado de Wang y col., 2011).

6.6 Flavonoides totales

El nivel de flavonoides totales en la muestra de mamuyo resulto de 1.12 mg CatE / g m.s. confirmando la presencia de flavonoides monómeros diferentes a las antocianinas. Los valores reportados para frutos frescos varían entre especies, en el cuadro 13 se muestran reportes de flavonoides totales para diferentes frutos.

Cuadro 13. Valores de flavonoides totales reportados para diversos frutos frescos

| | Concentración (mg CatE / g masa fresca.) | Referencia |
|--|---|-----------------------|
| Manzana (<i>Malus spp.</i> cv. Gala) | 0.62 | Dae-Ok y col., 2003 |
| Zarzamora (<i>Rubus spp.</i>) | 0.55 | Marinova y col., 2005 |
| Ciruela (<i>Prunus domestica</i> cv. French Damson) | 2.15 | Dae-Ok y col., 2003 |
| Arándano (<i>V. myrtilus</i>) | 0.19 | Marinova y col., 2005 |
| Frambuesa (<i>Rubus spp.</i> cv. Heritage) | 0.10 | Liu y col., 2002 |

6.7 Capacidad antioxidante por DPPH

La capacidad antioxidante de todas las muestras analizadas se presentan en el Cuadro 14.

Cuadro 14. Valores de capacidad antioxidante de todas las muestras en $\mu\text{M TE} / \text{g m.s.}$

| | SNG | SRM | RC | Tupy | Mamuyo | 810w | 811w | 810p | 810w |
|------------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|
| | 187.8 | 205.2 | 243.2 | 168.4 | 114.1 | 126.5 | 75.11 | 213.7 | 213.7 |
| Desv. Std. | 0.7 | 2.3 | 0.9 | 5.4 | 6.2 | 13.5 | 4.1 | 0.8 | 0.5 |

Entre las muestras de zarzamora el promedio del valor de la actividad antioxidante es de $201.15 \mu\text{M TE} / \text{g m.s.}$, sobresalen los valores de las morfoespecies RC como el más alto, siendo un 20% mayor al promedio (Figura 25) y Tupy como el más bajo (16% menor al promedio). En los análisis realizados, Tupy presentó el valor de antocianinas más alto y los segundos más altos para polifenoles totales y proantocianidinas, sin embargo Cuevas-Rodríguez y col., (2010a), en pruebas de capacidad antioxidante con zarzamoras silvestres (incluyendo el cultivar Tupy) obtuvieron resultados para la capacidad antioxidante en un rango de 169.9 a $361.9 \mu\text{M TE} / \text{g m.s.}$, presentando Tupy el valor más bajo.

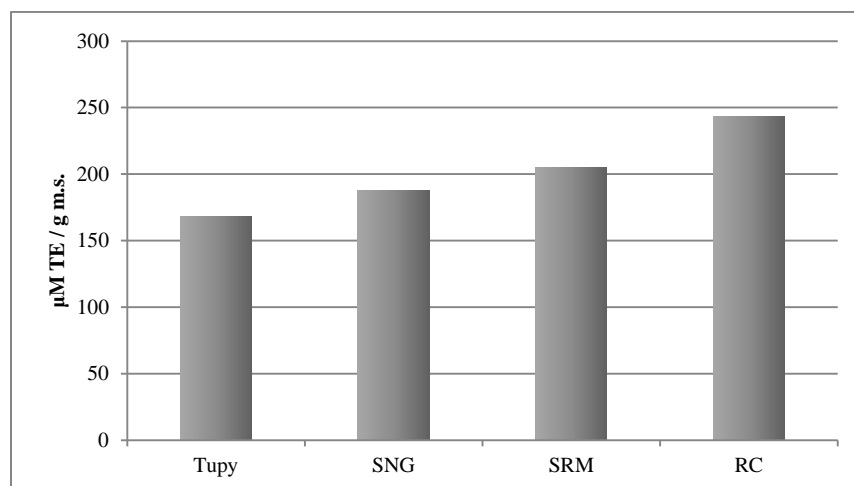


Figura 25. Capacidad antioxidante de las muestras analizadas de zarzamora medida por DPPH.

La relación entre las capacidades antioxidantes de frutos diferentes se ha utilizado como factor comparativo (Ozgen y col., 2006), al comparar la capacidad antioxidante de los frutos utilizando las zarzamoras RC como referente, se obtuvieron los datos del Cuadro 15

Cuadro 15. Relación entre la capacidad antioxidante de la zarzamora RC comparada contra el resto de las muestras analizadas.

| RC | SRM | SNG | Tupy | Mamuyo | 810w | 811w | 810p | 811w |
|----|-----|------|------|--------|------|------|------|------|
| 1 | 1.3 | 1.18 | 1.44 | 2.13 | 1.92 | 3.24 | 1.14 | 1.14 |

El valor de la relación entre las capacidades antioxidantes, contribuye a reafirmar a RC como la muestra con el mayor potencial antioxidante entre los frutos analizados.

Diversos autores atribuyen la alta capacidad antioxidante de zarzamoras a la cantidad y perfil de antocianinas (Kaume y col. 2011; Cuevas-Rodriguez y col., 2010a; Mudnic y col., 2011; Ding y col., 2006), por tanto es probable que el perfil exhibido por las muestras de zarzamora (Figura 26), tenga influencia en el valor de su capacidad antioxidante pues se ha visto que los compuestos polifenólicos pueden tener un efecto sinérgico.

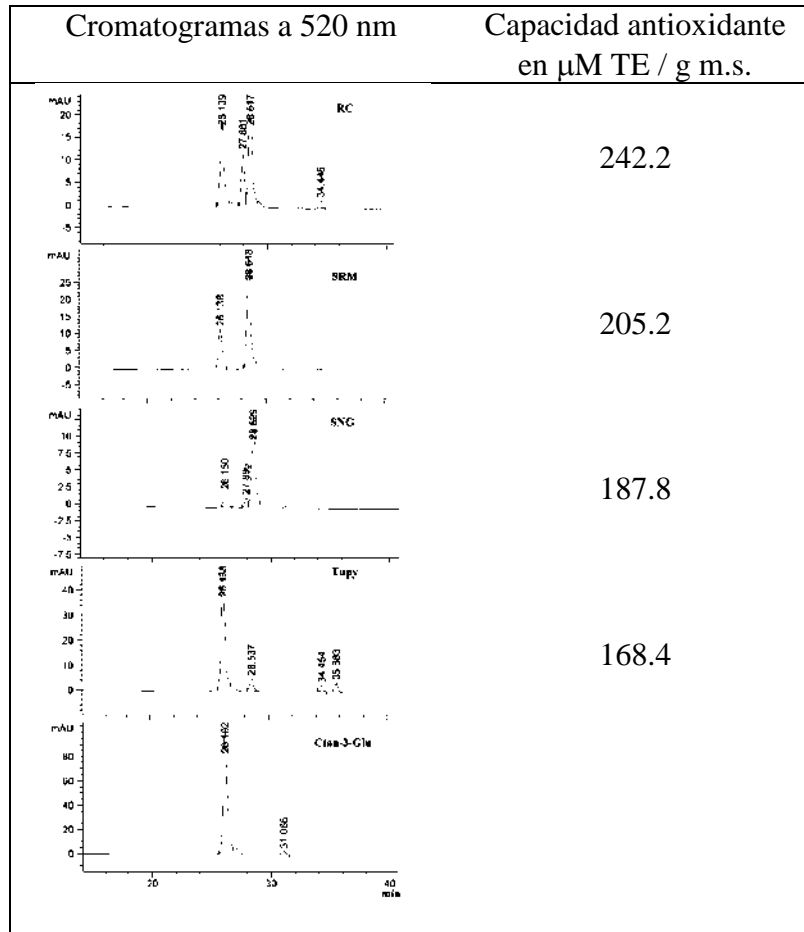


Figura 26. Cromatogramas de extractos crudos de las diferentes muestras de zarzamoras analizadas y de estándar comercial de Cian-3-Glu.

Respecto al resto de las muestras, el valor de capacidad antioxidante del mamuyo (114.13 $\mu\text{M TE} / \text{g m.s.}$) es comparable con los valores obtenidos de frutos enteros de arándanos analizados (Figura 27), siendo 10 % menor que la muestra 810w y 52 % mayor que 811w.

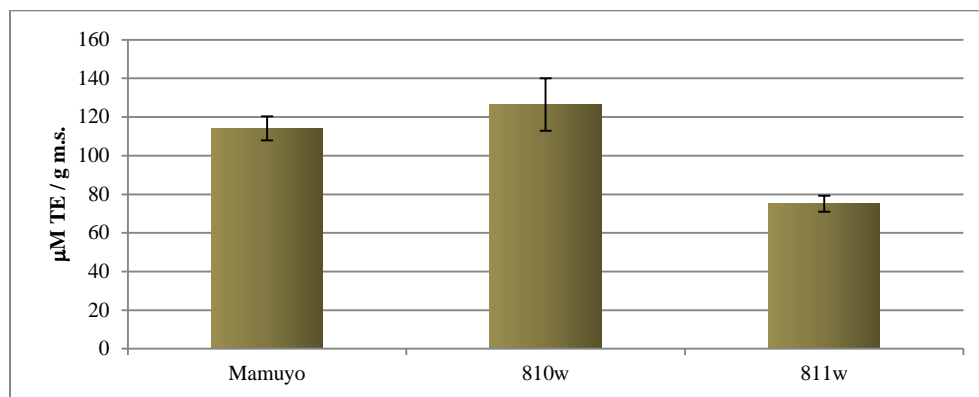


Figura 27 valores de capacidad antioxidante de las muestras de mamuyo y arándanos enteros.

Las actividad antioxidante se ha relacionado con diversos efectos sobre la salud humana, Dai y col. (2009) analizaron la actividad anticancerígena de extractos polifenólicos de diferentes cultivares de zarzamoras y relacionaron el nivel de capacidad antioxidante con la citotoxicidad en células con cáncer de colon (HT-29), pecho (MCF-7) y leucemia (HL-60) encontrando mayor actividad en extractos con niveles mas altos de capacidad antioxidante. Cuevas-Rodriguez y col. (2010a), realizaron estudios analizando el resultado del uso de extractos ricos en polifenoles para inhibir la producción celular de proinflamatorios relacionados con diversas enfermedades como Alzheimer, enfermedades cardiacas, y cáncer, encontrando una correlación positiva entre la capacidad antioxidante y la inhibición de la producción de óxido nítrico (uno de los principales proinflamatorios implicados), Los valores obtenidos de capacidad antioxidante para los diferentes frutos ubican a todas las muestras entre frutos con alta capacidad antioxidante poseedores de características nutraceuticas.

6.8 Identificación cualitativa de catequinas y procianidina B2 de mamuyo por HPLC-DAD

Se identificaron cualitativamente la procianidina B2 y catequina utilizando estándares comerciales, la Figura 28 muestra los cromatogramas de la fracción de mamuyo rica en

procianidinas, extraída con acetona. La presencia de estos compuestos fue corroborada posteriormente por espectrometría de masas.

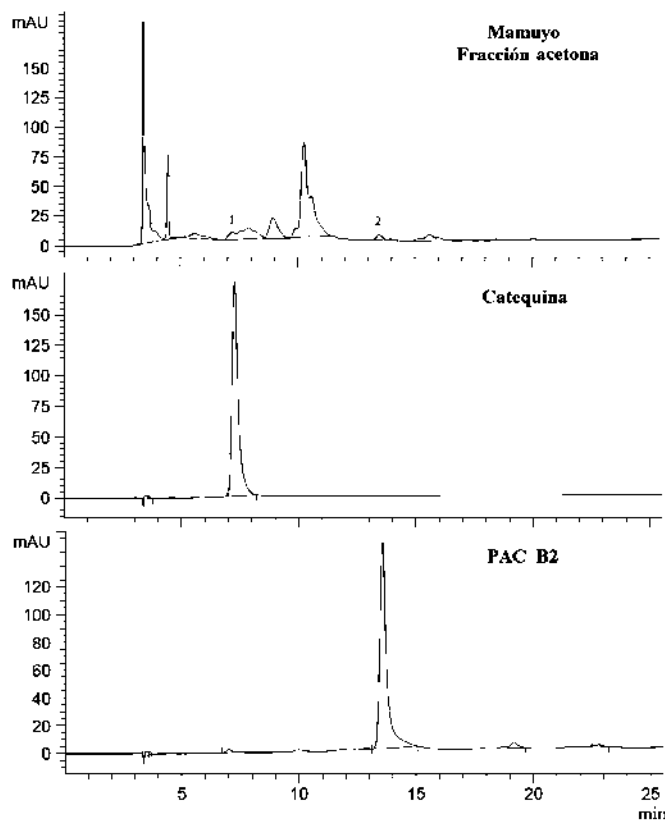


Figura 28. Cromatograma de HPLC en fase normal a 280 nm, de la fracción de mamuyo rica en procianidinas, extraída con acetona. 1) Catequina. 2) PAC B2.

6.9 Cuantificación de taninos hidrolizables e identificación de polifenoles de zarzamoras y arándano por LC-MS-TOF.

Los TH de las muestras de zarzamora se cuantificaron de manera cualitativa (una sola medición comparada contra una concentración del estándar comercial) con ayuda de LC-MS, los resultados se muestran en el Cuadro 16.

Cuadro 16. Concentración de taninos hidrolizables en muestras de zarzamoras cuantificada por LC-MS.

| Tupy | SRM | SNG | RC |
|------|-----|-----|----|
|------|-----|-----|----|

| Concentración mg EAE / g m.s. | 4.8 | 5.5 | 6.4 | 15.2 |
|----------------------------------|-----|-----|-----|------|
|----------------------------------|-----|-----|-----|------|

Las especies de *Rubus* son ricas en compuestos fenólicos especialmente antocianinas y taninos, sin embargo la cuantificación e identificación de taninos implica un reto por la diversidad, tamaño y complejidad de sus estructuras (Cuevas-Rodriguez y col., 2010; Hager y col., 2008). El uso de espectrometría de masas en la cuantificación de taninos ayudó para identificar los límites entre antocianinas y taninos en la separación de compuestos por HPLC. Como se puede apreciar en la Figura 29, a los 520 nm el área del pico del cromatograma corresponde a las antocianinas y va de los 15 min hasta cerca de los 20 min, en el caso del cromatograma a 280 nm no se podría precisar si los picos después de los 20 min corresponden a taninos, por lo cual se hizo necesario revisar los espectros (Figuras 30 y 31) y una vez confirmada la presencia de taninos pudo considerarse la integración de las áreas para el cálculo de concentración de TH, comparandola contra el área del cromatograma de ácido elágico a una concentración conocida. En el caso de la cuantificación e identificación de compuestos polifenólicos en zarzamoras, es favorable el hecho de que diversos investigadores han realizado análisis previos de los frutos de *Rubus*, y esto ayuda a en cierta forma predecir los resultados y orientar la estrategia del análisis. Los análisis de HPLC-DAD realizados previamente a las muestras revelaron la presencia de tres principales especies de antocianinas en las zarzamoras silvestres (Figura 26) identificadas en todas las muestras por LC-MS-TOF como cianidina-glucósida, cianidina-rutinósida y cianidina xilorutinósida (Figura 30a). Los polifenoles diferentes a antocianinas identificados se presentan en el Cuadro 16.

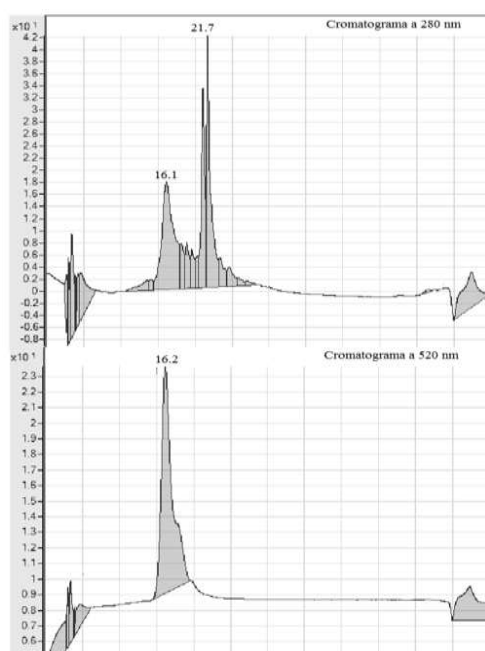


Figura 29. Cromatograma de extractos crudos de zarzamora RC obtenidos por LC-MS.

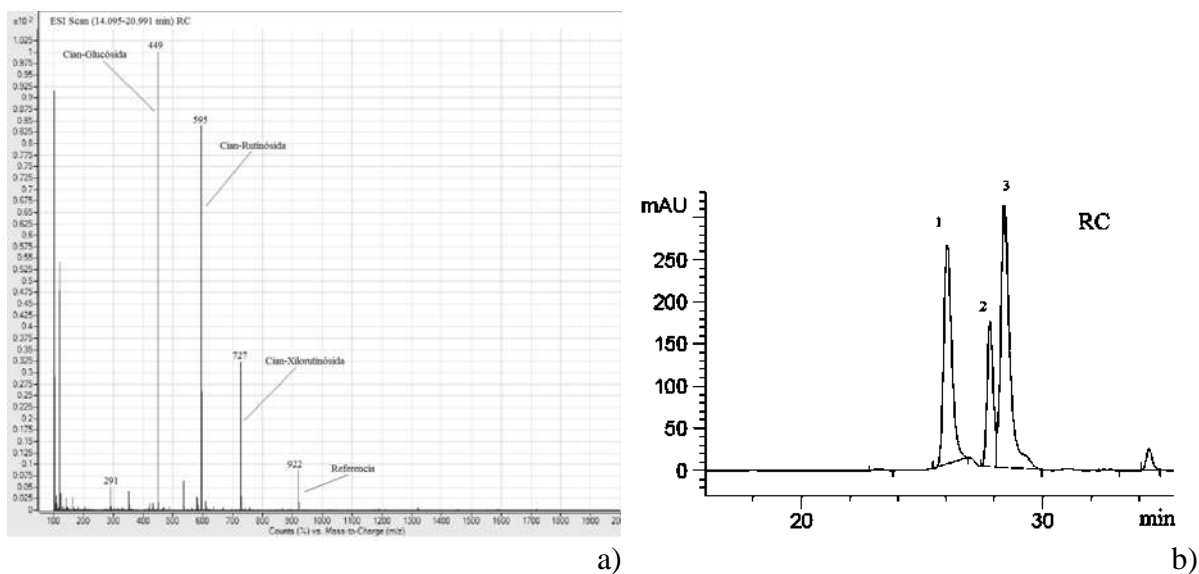


Figura 30. Espectro y cromatograma del extracto de zarzamora RC. a) Espectro entre los 14 y los 21 min m/z (+) 100-2000 muestra la presencia principalmente de antocianinas. b) Identificación de antocianinas en el cromatograma a 520 nm; 1. Cian-Glucósida; 2. Cian-Xilorutinósida; 3. Cian-rutinósida.

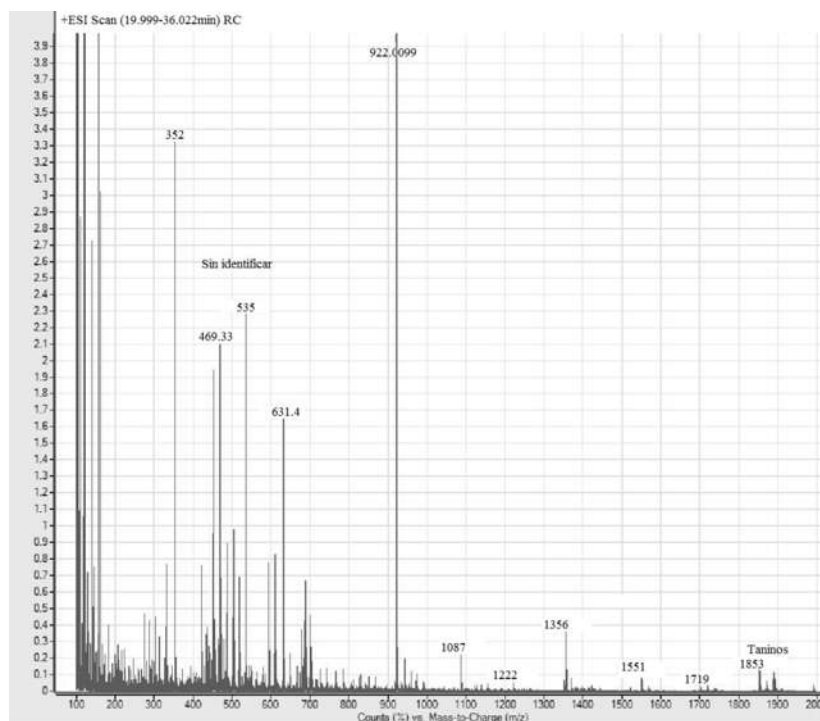


Figura 31. Espectro del extracto de zarzamora RC entre los 20 y 36 min muestra la presencia de taninos.

Al igual que en el caso de las zarzamoras, los arándanos son un fruto extensamente estudiado debido a su importancia económica y la demostrada bioactividad de sus compuestos lo cual facilitó proponer la identidad de las antocianinas. Las muestras de arándano fueron analizadas para identificar solamente sus antocianinas debido a que son el compuesto polifenólico más abundante en estos frutos. Teniendo como antecedente el análisis de HPLC para cuantificación de antocianinas totales (Figura 19), y que muestra al menos 13 principales especies moleculares de antocianinas se logró proponer la identificación de once de ellas (Figuras 32 y 33). En la identificación cuando se presentaron compuestos con igual relación m/z como el caso de la Cian-glucósida y Cian-galactósida (Figura 34), se compararon los espectros de absorción para confirmar la existencia de diferentes tipos de antocianinas con igual masa (Fig 34 a) y se analizaron los máximos de absorción para confirmar la estructura (las antocianinas tienen dos máximos de absorción el primero alrededor de los 280 nm y el segundo cercano a los 520 nm como se aprecia en la Figura 34 b). Cuando se disponía del estándar, se utilizó como referencia para diferenciar el tiempo de retención o se recurrió a reportes previos.

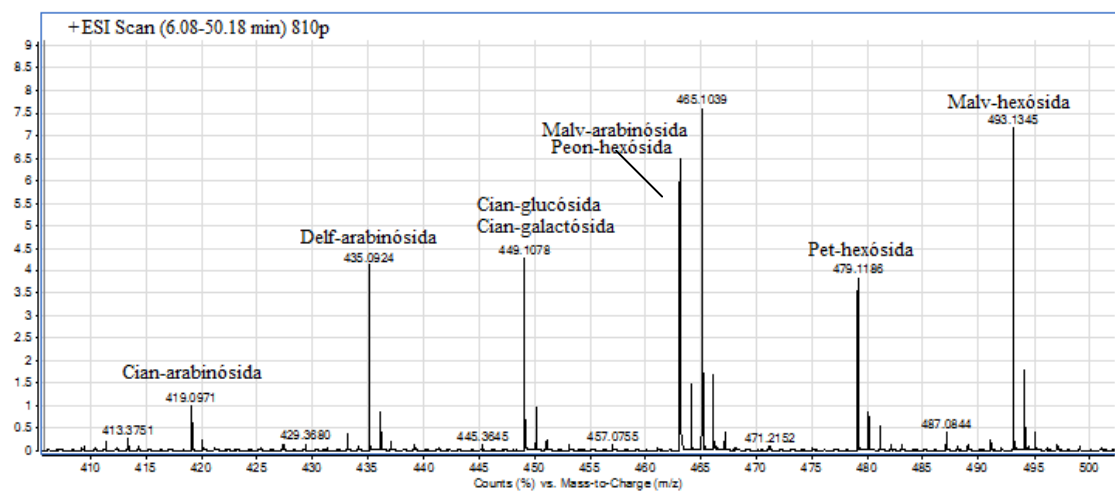


Figura 32. Espectro del extracto de arándano 810p entre los 6 y 50 min muestra los principales compuestos con m/z entre 400 y 500

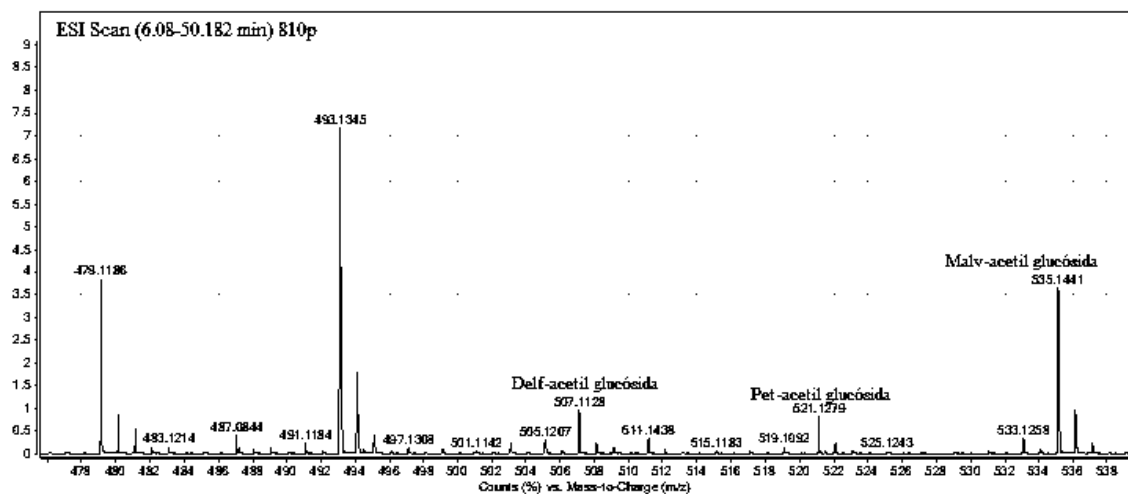
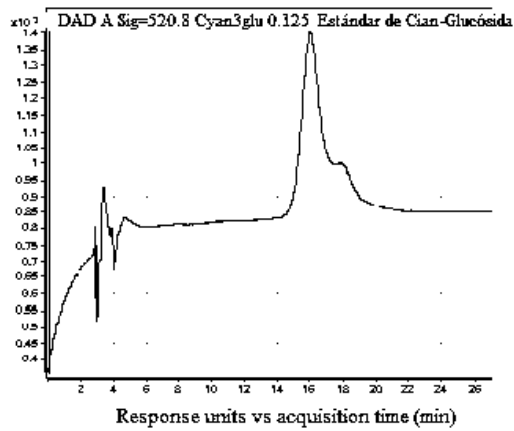
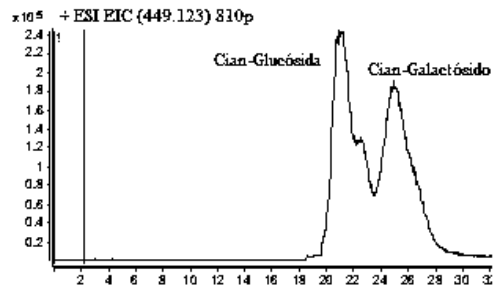


Figura 33. Espectro del extracto crudo de arándano 810p entre los 6 y 50 min m/z 478-538 modo (+), muestra los principales compuestos.



Response units vs acquisition time (min)

a)

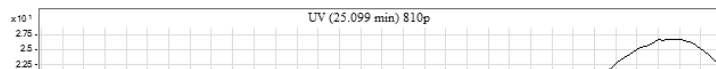
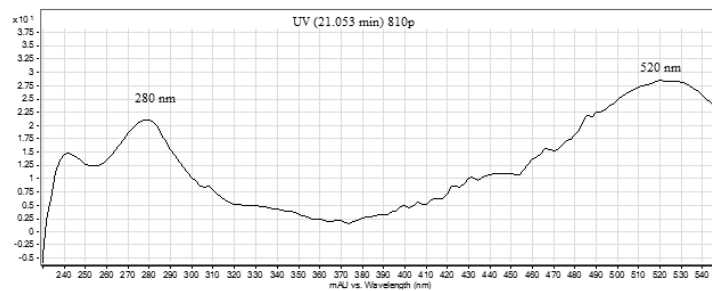


Fig 34. Cromatogramas y espectros de absorción de muestra de arándano 810p analizada por LC-MS-TOF. a) La imagen superior muestra el cromatograma decompuestos con valor $m/z = 449$; la imagen inferior corresponde al estándar de Cian-Glucósido. b) Espectros de absorción a los 21 min y 25 min muestran dos máximos de absorción característicos de antocianinas.

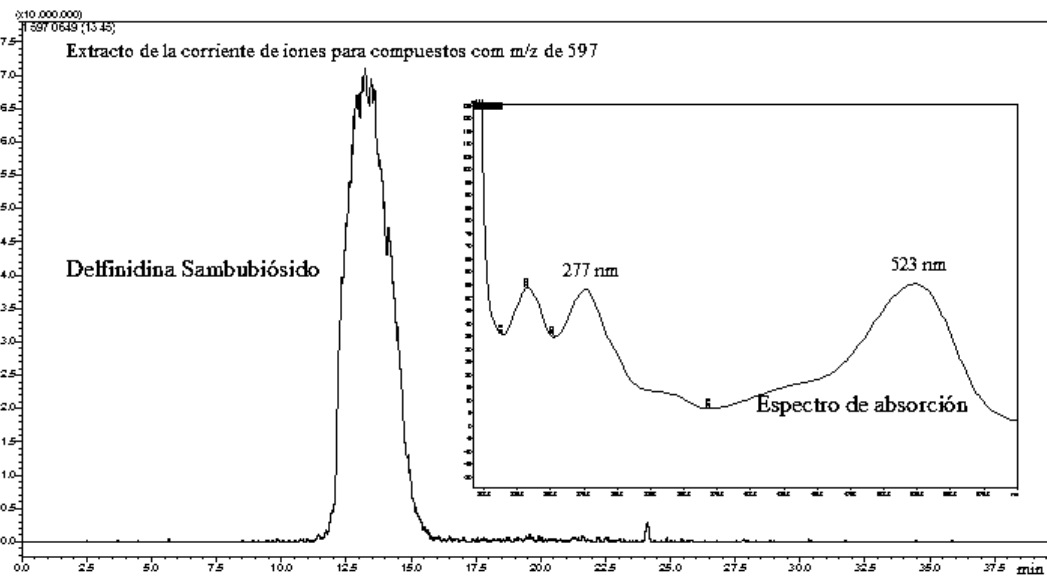
6.10 Identificación de compuestos fenólicos de mamuyo por espectrometría de masas LC-MSⁿ-IT-TOF.

Se analizaron todas las fracciones de la muestra de mamuyo, detectándose cuatro diferentes tipos de antocianinas tentativamente identificadas como delfinidina glucósida, delfinidina sambubiósida, cianidina glucósida y cianidina sambubiosida, entre los compuestos detectados se identificaron además procianidinas (A2 y B2), dímeros de epicatequina-epigallocatequina, catequina y ácido clorogénico los valores de la identificación se muestran en el Cuadro 16. La identificación se realizó considerando los principales iones provenientes tanto de MS como de MS-MS lo cual permite tener información sobre la estructura de la molécula (Figura 35), además del uso de estándares comerciales y los análisis previos de HPLC-DAD.

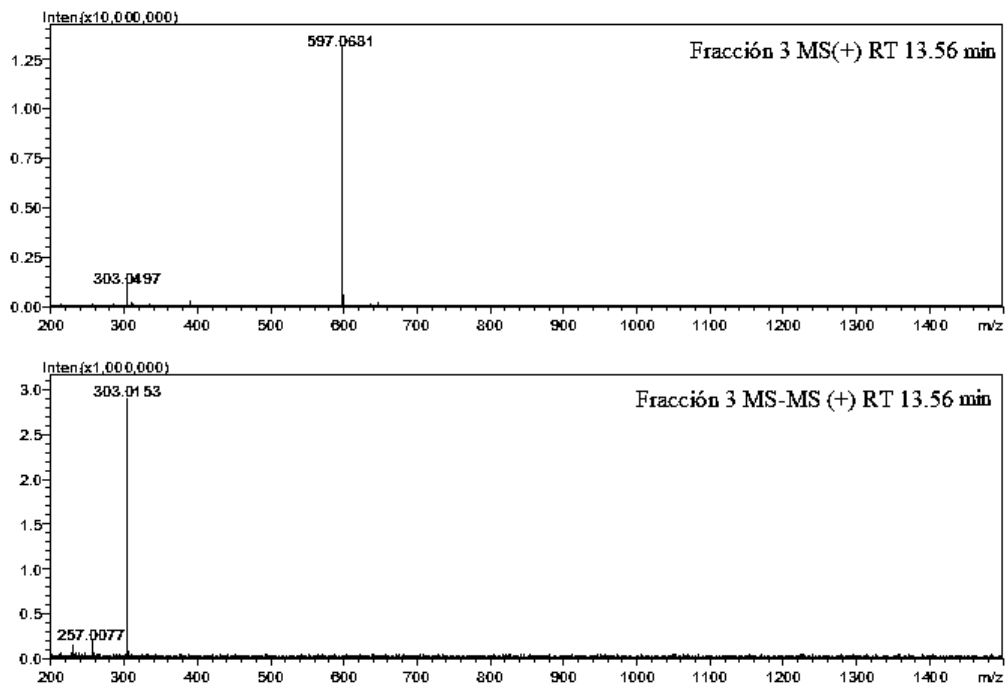
Las antocianinas identificadas en el mamuyo son comunes en moras de maqui (*Aristotelia chilensis*) (Tanaka y col., 2013; Rojo y col., 2012), arándanos (*Vaccinium* spp.) (Roopchand y col., 2011; Grace y col., 2009), frambuesas (*Rubus* spp.) (Dosset y col., 2011), zarzamoras (*Rubus* spp.) (Cuevas-Rodríguez *et al.*, 2010a), y flores de jamaica (*Hibiscus subdariffa*) (Gurrola-Díaz, y col., 2010). Se han reportado diversas actividades biológicas para las antocianinas presentes en el mamuyo, Schreckinger y col. (2012), usaron extractos de *A. chilensis* que contiene delfinidina-glucósida, delfinidina-

sambubiósida y cianidina sambubiósida para inhibir α -glicosidasa y α -amilasa como agentes antidiabéticos, encontrando que la presencia de esas antocianinas fueron relevantes para mejorar los síntomas de la diabetes. Xie y col. (2012), determinaron que la delfinidina glucósida puede neutralizar los efectos del estrés oxidativo y apoptosis en células endoteliales, previniendo lesiones ateroscleróticas. La cianidina-3-glucósido es una de las antocianinas más estudiadas y se le han comprobado efectos anti cancerígenos (Marckzylo y col., 2009), anti obesidad (Tsuda y col., 2003) y anti diabetes (Guo y col., 2012). La cianidina sambubiosida inhibe la producción de óxido nítrico asociada con problemas inflamatorios (Cheng y col., 2009).

Las proantocianidinas A y B, están relacionadas con la inhibición de diversos microorganismos patógenos humanos. Extractos de arándano rojo (*Vaccinium macrocarpon*) inhibieron el crecimiento de hongos de *Candida* spp. (uno de los principales microorganismos que causan infecciones orales y de la piel) y *Cryptococcus neoformans* (Patel y col., 2011). Las proantocianidinas también tienen actividad inhibitoria de adhesión de bacterias (Grace y col., 2012) (lo cual es importante para prevenir enfermedades causadas por bacterias patógenas como *Escherichia coli* o *Helicobacter pylori*) efectos cardiovasculares (anti aterógeno y anti inflamatorio) y efectos antiobesidad (De Pascual-Teresa y col., 2010). El ácido clorogénico es un reconocido agente antioxidante y se ha probado en ratas mostrando propiedades anticolesterolémicas, propiedades protectoras contra aterosclerosis, hígado graso, problemas cardiacos (Wan y col. 2013), y puede ejercer efectos neuroprotectores.



A)



B)

Figura 35. Espectros de la fracción 3 de mamuyo. A) Extracto del scan de la corriente de iones ESI, muestra la intensidad, tiempo de retención para compuestos con $m/z = 597$ y el espectro de absorción característico de antocianinas. B) Espectros MS y MS-MS (+) a los 13.56 min, muestran los principales iones detectados para ese tiempo de retención.

Cuadro 16. Compuestos fenólicos identificados en muestras de todos los frutos analizados.

| Tiempo retención (min) | Muestra / Compuesto tentativo | Modo | m/z | | Referencia |
|------------------------|---------------------------------------|------|------|----------|--------------------|
| | | | MS | MS/MS | |
| | Arándano | | | | |
| | <i>Antocianinas</i> | | | | |
| 20.4 | Delfinidina arabinósida | + | 435 | | 3, 4, 9 |
| 21 | Cianidina glucósida | + | 449 | | Estándar comercial |
| 22.6 | Petunidina hexósida | + | 479 | | 3, 4, 9 |
| 23.9 | Cianidina arabinósida | + | 419 | | 3, 4, 9 |
| 24.8 | Peonidina hexósida | + | 463 | | 3, 4, 9 |
| 25.1 | Cianidina galactósida | + | 449 | | 3, 4, 9 |
| 25.9 | Malvidina hexósida | + | 493 | | 3, 4, 9 |
| 27.6 | Delfinidina acetil glucósida | + | 507 | | 3, 4, 9 |
| 28.5 | Malvidina arabinósida | + | 463 | | 3, 4, 9 |
| 31.4 | Petunidina acetil glucósida | + | 521 | | 3, 4, 9 |
| 34.5 | Malvidina acetil hexósida | + | 535 | | 3, 4, 9 |
| | Mamuyo | | | | |
| | <i>Antocianinas</i> | | | | |
| 12.6 | Delfinidina glucósida | + | 465 | 303 | 3, 4, 9 |
| 13.3 | Delfinidina sambubiósida | + | 597 | 303 | Estándar comercial |
| 15.3 | Cianidina glucósida | + | 449 | 287 | Estándar comercial |
| 16.7 | Cianidina sambubiósida | + | 581 | 287 | 2, 10 |
| | <i>Proantocianidinas</i> | | | | |
| 3.4 | Procianidina A2 | - | 575 | 449 | 1 |
| 4.8 | Dímero epicatequina-epigallocatequina | + | 593 | 425, 289 | 7, 8 |
| 8.72 | Procianidina B2 | - | 577 | 407 | Estándar comercial |
| 10.7 | <i>Catequina</i> | + | 291 | 233 | Estándar comercial |
| 10 | <i>Ácido clorogénico</i> | - | 711 | 355 | Estándar comercial |
| | Zarzamoras | | | | |
| | RC, SNG, SRM | | | | |
| 15.2 | Cianidina glucósida | + | 449 | | Estándar comercial |
| 15.9 | Cianidina xilorutinósida | + | 727 | | 5 |
| 16.7 | Cianidina rutinósida | + | 595 | | 6, 11 |
| | <i>Taninos hidrolizables</i> | | | | |
| 21.7 | Isómeros de pedunculangina | + | 785 | | 11 |
| 21.8 | Sangiina H6 | + | 1889 | | 6, 11 |
| 24.3 | <i>Ácido elágico</i> | + | 303 | | Estándar comercial |

1. Roopchand y col., 2011; 2. Abbas y col., 2010; 3. Borges y col., 2010; 4. Grace y col. 2009; 5. Garzon y col., 2009; 6. Mertz y col., 2007; 7. Maatta y col., 2005; 8. Maatta y col., 2003; 9. Prior y col., 2001; 10. Andersen y col., 1991; 11. Cuevas-Rodríguez y col., 2010. Los compuestos de arándano y zarzamora se identificaron por LC-MS-TOF, los de mamuyo por LC-MSⁿ-IT-TOF; La identificación de procianidina B2 y epicatequina en mamuyo y Cian-3-Glu en zarzamoras se apoyo con HPLC-DAD.

7. CONCLUSIONES

Se logró coleccionar e identificar muestras silvestres con potencial económico; Zarcamoras SNG (*R. cymosus*), RC (aff. *R. humistratus*) y mamuyo (*S. ramirezii*).

Se identificaron compuestos que hacen considerar a las especies silvestres analizadas como frutos nutraceuticos.

Se estableció una metodología para cuantificar taninos hidrolizables en muestras de *Rubus* spp.

La capacidad antioxidante de las zarcamoras analizadas y mamuyo resaltan al compararse con especies mejoradas.

Este trabajo permitió evidenciar la importancia alimenticia del mamuyo como alimento rico en polifenoles.

Los valores de polifenoles, perfil de antocianinas y capacidad antioxidante de la muestra de zarcamora RC (*R. aff. humistratus*), la sitúan en alto grado de importancia para continuar con su análisis y estudios agronomicos.

En este trabajo se resalta los niveles de detección de los compuestos por los equipos y métodos utilizados, ya que en algunos casos se inovó o modificó la metodología previamente reportada.

Hasta donde se tiene conocimiento, este es el primer reporte de análisis de fitoquímicos y actividad biológica de las especies *S. ramirezii*, *R. cymosus* y *R. aff. humistratus*.

Los niveles de polifenoles y capacidad antioxidante medidos en el mamuyo, lo sitúan como un importante fruto con cualidades nutraceuticas que conviene continuar evaluando.

8. REFERENCIAS

Abbas, D., Laleh, K., Jalil, A., Lutfun, N., Satyajit, S. (2010). Isolation and free- radical-scavenging properties of cyanidin 3-O-glycosides from the fruits of *Ribes biebersteinii* Berl. *Acta Pharmaceutica*. 60, (1), 1–11.

Abdel-Aal, E. M., Akhtar, H., Zaheer, K., Rashida, A. (2013). Dietary Sources of Lutein and Zeaxanthin Carotenoids and Their Rol in Eye Health. *Nutrients*. 5,1169-1185.

Acosta-Montoya, O., Vaillant, F., Cozzano, S., Mertz, C., Perez, A. M., Castro, M. V. (2010) Phenolic Content and Antioxidant Capacity of Tropical Highland Blackberry (*Rubus adenotrichus* Schltdl.) during three edible maturity stages. *Food Chemistry*. 119, 1497-1501.

Ahuja, S., Dong, M. (2005). *Handbook of pharmaceutical analysis by hplc*. Sn Diego: Elsevier Inc.

Ainsworth, E. A., Gillespie, K. M. (2007). Estimation of Total Phenolic Content and Other Oxidation Substrates in Plant Tissues Using Folin–Ciocalteu Reagent. *Nature Protocols*. 2, 875-877.

Alinia, S., Hels, O., Tetens, I. (2009). The Potential Association Between Fruit Intake and Body Weight- a Review. *Obesity Reviews*, 10, 639-647.

Andersen, O. M., Jordheim, M. (2006). The anthocyanins. En Andersen y Markham (Eds.). *Flavonoids chemistry, biochemistry and applications*. (471-552). Boca Raton FL: Taylor & Francis Group.

Aquilano, K., Baldelli, S., Rotilio, G., Ciriolo, M. R. (2008). Role of nitric oxide synthases in Parkinson's disease: A review on the antioxidants and anti-inflammatory activity of polyphenols. *Neurochem. Res*. 33, 2416-2426.

Arapitsas, P. (2012). Hydrolizable Tannin Analysis in Food. *Food Chemistry*. 135, 1708-1717.

Ardévol, A., Motilva, M. J., Blay, M., Pinent, M. (2013). Procyanidins target mesenteric adipose tissue in Wistar lean rats and subcutaneous adipose tissue in Zucker obese rats. *Food Chemistry*. 141, 160-166.

Aronson, J., Ebeler, S. E. (2004). Effect of polyphenols on the head space volatility of flavors. *Am. J. Enol. Vitic*. 55, 1, 13-21.

Aviram, M., Volkova, N., Coleman, R., Dreher, M., Reddy, M.K., Ferreira, D., Rosenblat, M., (2008). Pomegranate phenolics from the peels, arils, and flowers are antiatherogenic: studies in vivo in atherosclerotic apolipoprotein e-deficient (E0) mice and in vitro in cultured macrophages and lipoproteins. *J. Agric. Food Chem*. 56, 1148–1157.

Ayala, A. V., De la O, M. O., Carrera, B. (2011) ¿Es Competitivo el Subsector de Frutas en México?. *Revista Fuente*. 3, 9, 151-154.

Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*. 99, 191-203.

Barbosa-Cesnik, C., Brown, M. B., Buxton, M., Zhang, L. DeBusscher, J., Foxman, B. (2011). Cranberry juice fails to prevent recurrent urinary tract infection: results from a randomized placebo-controlled trial. *Clin. Infect. Dis.* 52, (1), 23-30.

Bascope, A., (2013). Realidad Productiva del Arándano en México y Estados Unidos. Agrimundo: Santiago de Chile. Recuperado de <http://www.agrimundo.cl/?publicacion=realidad-productiva-del-arandano-en-ee-uu-y-mexico>.

Bello-González, M. A. (2006). Catálogo de Plantas Medicinales de la Comunidad Indígena Nuevo San Juan Parangaricutiro, Michoacán, México. *Fundación Michoacán Produce*. 116-117.

Ben-Amor, B., Allaf, K. (2009), Impact of Texturing Using Instant Pressure Drop Treatment Prior to Solvent Extraction of Anthocyanins from Malasyan Roselle. *Food Chemistry*. 115, 3, 820-825.

Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. Zaramora. Recuperado de <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/index.php> Julio 2013.

Biruete, G. A., Juárez, H. E., Sieiro, O. E., Romero, V. R. Silencio, B. J. (2009). Los nutraceuticos, lo que es conveniente saber. *Revista Mexicana de Pediatría*. 76, 3, 136-145.

Borges, G.; Degeneve, A.; Mullen, W.; Crozier, A. (2010). Identification of Flavonoids and Phenolic Antioxidant in Black Currants, Blueberries, Raspberries, Red Currant and Cranberries. *J. Agric. Food Chem.* 58, 3901-3909.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995). Use a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensm Wiss Technology*. 28, 25-30.

Bravo, L. (1998). Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*. 56, 11, 317-333.

Breuer, B.; Stuhlfauth, Fock, H.; Huber, H. (1987). Fatty Acids of Some Cornaceae, Hydrangeaceae, Aquifoliaceae, Hamamelidaceae and Styracaceae. *Phytochemistry*. 1987, 26 (5), 1441-1445.

Bridle, P., Timberlake, C.F. (1996). Anthocyanins as Natural Food Colours Selected Aspects. *Food Chemistry*, 58, 103-109.

Camargo, B. C., Weisner, C., Díaz, C. M., Tovar, S. L. (2004). *El cáncer. Aspectos básicos sobre su biología, clínica, prevención, diagnóstico y tratamiento*. República de Colombia: Ministerio de la protección social. Recuperado de <http://www.cancer.gov.co/documentos/Cartillas/Elcancer.pdf> Julio de 2013.

Carranza, E. (1993). *Styracaceae. Flora del bajo y regiones adyacentes*. 21, 1-14.

Cassidy, A., Mukamal, K. J., Liu, L., Franz, M., Eliassen, A. H., Rimm, E. B. (2013). High anthocyanin intake is associated with a reduced risk of myocardial infarction in young and middle aged women. *Circulation*. 127, 188-196.

Cheng, J. C., Kan, L. S., Chen, J. T., Chen, L. G., Lu, H. C., Lin, S. M., Wang, S. H., Yang, K. H. & Chiou, R. Y. (2009). Detection of cyanidin in different-colored peanut testae and identification of peanut cyanidin 3-sambubioside. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 57, 8805-8811.

Cheryan, M. (1998). *Ultrafiltration and Microfiltration Handbook*. Lancaster U.S.A.: Technomic Publishing Company, Inc.

Cheyrier, V. (2005) Polyphenols in Foods. *Am. J. Clin. Nutr.* 81, 223S-229S.

Chong, J., Poutaraud, A., Hugueney, P. (2009). Metabolism and roles of stilbenes in plants. *Plant Science*. 177, 143-155.

Chung, K. T., Wei, C. I., Johnson, M. G. (1998). Are tannins a double-edged sword in biology and health? *Trends Food Sci. Technol.* 9, 168–175

Cimpaiu, C. (2006). Analysis of Some Natural Antioxidants by Thin-Layer Chromatography and High Performance Thin-Layer Chromatography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 29, 1125-1142.

Cuevas, E., Antezana, A., Winterhalter P. (2008). Análisis y Caracterización de Antocianinas en Diferentes Variedades de Maíz (*Zea mays*) Boliviano. *Memorias red-alfa lagrotech*. Comunidad Europea Cartagena.

Cuevas-Rodriguez, E. O., Yousef G. G., García-Saucedo, P. A., López-Medina, J., Paredes-López O., Lila, M. A., (2010). Characterization of Anthocyanins and Proanthocyanidins in Wild and Domesticated Mexican Blackberries (*Rubus spp.*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 7458-7464.

Cuevas-Rodríguez, E. O., Vermont, P. D., Yousef, G. G., García-Saucedo, P. A., López-Medina, J., Paredes-López, O., Gonzalez, E., Lila, M. A. (2010a). Inhibition of Pro-inflammatory Responses and Antioxidant Capacity of Mexican Blackberry (*Rubus spp.*) Extracts. *J. Agric. Food Chem.* 58, 9542-9548.

Dae-Ok, K., Seung, W. J. & Chang, Y. L. (2003). Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chemistry*. 81, 321-326.

Dai, J., Gupte, A., Gates, L., Mumper, R. J. (2009). A comprehensive study of anthocyanin-containing extract from selected blackberry cultivars: Extraction methods, stability, anticancer properties and mechanism. *Food and Chemical Toxicology*. 47, 837-847.

Da Silva, M., Young-In, K., Apostolidis, E., Lajolo, F. M., Genovese, M. I., Shetty, K. (2010). Evaluation of Red Currants (*Ribes rubrum l.*), Black Currants (*ribes nigrum l.*), Red and Green Gooseberries (*Ribes uva-crispa*) for Potential Management of Type 2 Diabetes and Hypertension Using In Vitro Models. *Journal of Food Biochemistry*. 3, 639-660.

Dauchet, L., Amouyel, P., Dallongeville, J. (2009). Fruits, Vegetables and Coronary Heart Disease. *Nature Reviews Cardiology*. 6, 599-608.

De la Iglesia, R., Milagro F., Campión, J., Martínez, J. A. (2010). Healthy Properties of proanthocyanidins. *BioFactors*. 36, 3, 159-168.

Del Bo, C., Kristo, A. S., Kalea, A. Z., Ciappellano, S., Riso, P., Porrini, M., Klimis-Zacas, D. (2012). The Temporal Effect of a Wild Blueberry (*Vaccinium augustifolium*)-Enriched Diet on Vasomotor Tone in the Sprague-Dawley Rats. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 22, 2, 127-132.

Delgado-Vargas, F., Jiménez, A. R., Paredes-López, O. (2000). Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains-Characteristics, Biosynthesis, Processing, and Stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40, 3, 173-289.

De Pascual-Teresa, S., Moreno, D. A. & García-Viguera, C. (2010). Flavonols and anthocyanins in cardiovascular health: A review of current evidence. *International Journal of Molecular Science*. 11, 1679-1703.

Ding, M., Feng, R., Wang, S., Bowman, L., Lu, Y., Qian, Y., Castranova, V., Jiang, B.-H., Shi, X. (2006). Cyanidin-3-glucoside a natural product derived from blackberry, exhibits chemopreventive and chemotherapeutic activity. *The Journal of Biological Chemistry*. 281, 25, 1759-1768.

Dosset, M., Lee, J. & Finn, C. E. (2011). Characterization of a novel anthocyanin profile in wild black raspberry mutants: An opportunity for studying the genetic control of pigment and color. *Journal of Functional Foods*. 3, 207-214.

Duangmal, K., Saicheua, B., Sueeprasan, S. (2004). Roselle Anthocyanins as a Natural Food Colorant and Improvement of its Colour Stability, *Color and Paints*, Interim Meeting of the International Color Association, Proceeding.

Escribano-Bailón, M. T., Santos-Buelga C., Gonzalo L. A., María R. S. (2002). Anthocyanin Composition of the Fruit of *Coriaria myrtifolia L.* *Phytochem. Anal.* 13, 354-357.

- Estupiñan, D. C., Schwartz, S. J., Garzon, G. A. (2011). Antioxidant activity, totalphenolics content, anthocyanin, and colour stability of isotonic modelbeverages coloured with Andes berry (*Rubus glaucus* Benth) anthocyaninpowder. *Journal of Food Science*, 76, S26–S34.
- Fernandez-Panchon, M. S., Villano, D., Troncoso, A. M., García-Parrilla, M. C. (2008).Antioxidant Activity of Phenolic Compounds: From In Vitro Results to In Vivo Evidence.
- Ferreira, D., Slade, D., Marais, J. P. (2006). Flavans and Proanthocyanidins.En Andersen y Markham (Eds.). *Flavonoids chemistry, biochemistry and applications*. (553-616). Boca Raton FL: Taylor & Francis Group.
- Fritsch, P. W. (1997). A Revision of *Styrax* (*Styracacea*) for Western Texas, Mexico and Mesoamerica.*Ann. Missouri Bot. Gard.* 84, (4), 705-761.
- Fritsch, P., W. (1999). Phylogeny of *Styrax* based on Morphological Characters, with Implication for Biogeography and Infrageneric Classification. *Systematic Botany*. 24, (3), 356-378.
- Fuentes-Miranda, W. V. (2005), *Extracción, cuantificación y estabilidad de colorantes naturales presentes en los frutos dePrunus capulíCav. (Cereza), Rubus urticaefolius Poir (Mora) y Sambucus canadensis L. (Sauco) como alternativas naturales de consumo de los colorantes rojo No 40, Rojo No 3 y Rojo No 2 en bebidas en el rango de pH: 3, 4 y 5.* (Tesis inédita de licenciatura), Universidad de San Carlos De Guatemala, Guatemala.
- Gao, X., Cassydi, A., Schwarzschild, M. A., Rimm, E. B., Ascherio, A. (2012). Habitual Intake of Dietary Flavonoids and Risk of Parkinson Disease.*Neurology*. 78, 15, 1138-1145.
- Garzón, G. A. (2008), Las Antocianinas como Colorantes Naturales y Compuestos Bioactivos: Revisión. *Acta biol. Colomb.*13, 3.
- Garzon, G. A., Riedi, K. M., & Schwartz, S. J. (2009). Determiration of Anthocyanins, Total Phenolic Content, and Antioxidant Activity in Andes Berry (*Rubus glaucus* Benth).*Journal of Food Science*, 74, C227–C232.
- Gavrilova, V., Kajdzanoska, M., Gjamovsky, V., Stefova, M. (2011). Separation, Characterization and Quantification of Phenolic Compounds in Blueberry and Red and Black Currants by HPLC-DAD-ESI-MSⁿ. *J. Agric. Food Chem.* 59, 4009-4018.
- Geankoplis, C. J. (1999). *Procesos de transporte y operaciones unitarias 3^a ed.* México: CECSA.
- González-Espinosa, M., Meave, J. A., Lorea-Hernández, F. G., Ibarra-Manríquez, G., Newton, A. C. (2011). *The Red List of Mexican Cloud Forest Trees*.Cambrige, UK: Fauna & Flora international.

- Gordon, M., Stewart, D., (2005). The inhibitory effects of berry polyphenols on digestive enzymes. *BioFactors*. 23, 189-195.
- Grace, M. H., Massey, A. R., Mbeunkui, F., Yousef, G. G. & Lila, M. A. (2012). Comparison of health-relevant flavonoids in commonly consumed cranberry products. *Journal of Food Science*. 77, 8, 176-183.
- Grace, M. H.; Ribnicky D. M.; Kuhn, P.; Poulev, A.; Logendra, S.; Yousef, G.; Raskin, I.; Lila, M. A. (2009). Hypoglycemic activity of a novel anthocyanin-rich formulation from lowbush blueberry, *Vaccinium angustifolium* Aiton. *Phytomedicine*. 16, 406-415.
- Guo, H., Xia, M., Zou, T., Ling, W., Zhong, R. & Zhang, W. (2012). Cyanidin 3-glucoside attenuates obesity-associated insulin resistance and hepatic steatosis in high-fat diet-fed and db/db mice via the transcription factor FoxO1. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 23, 349-360.
- Gurrola-Díaz, C. M., García-López, P. M., Sánchez-Enríquez, S., Troyo-Sanromán, R., Andrade-González, I. & Gomez-Leyva, J. F. (2010) Effects of *Hibiscus subdariffa* extract powder and preventive treatment (diet) on the lipid profiles of patients with metabolic syndrome (MeSy). *Phytomedicine*. 17, 500-505.
- Gyamfi, M. A., Aniya, Y., (2001). Antioxidant properties of Thonningianin A, isolated from the African medicinal herb, *Thonningia sanguinea*. *Biochem. Pharmacol.* 63, 1725 – 1737.
- Hakkinen, S. H., Karenlampi, S. O., Heinonen, M., Mykkanen, H. M., Torronen, R. A. (1999). Content of the Flavonols Quercetin, Myricetin, and Kaempferol in 25 Edible Berries. *J. Agric. Food Chem.* 47, 2274-2279.
- Hamidi, M., Boucher, B. A., Cheung, A. M., Beyene, J., Shah, P. S. (2011). Fruit and Vegetable Intake and Bone Health in Women Aged 45 and Over: A Systematic Review. *Osteoporos Int.* 22, 1681-1693.
- Harborne, J. B.; Grayer, R.J. (1988). *The Flavonoids.*, Advances in Research Science since 1980. Harborne (ed.), London: Chapman and Hall Ltd, 1-20.
- He, F., Liang, N.-N., Mu, L., Pan, Q.-H., Wang, J., Reeves, M. J., Duan, C.-Q. (2012). Anthocyanins and Their Variation in Red Wines I. Monomeric Anthocyanins and their Color Expression. *Molecules*. 17, 1571-1601.
- He, J., Giusti, M. (2010). Anthocyanins: Natural Colorants with Health Promoting Properties. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 1, 163-187.
- Howell, A. B. (2007). Bioactive Compounds in Cranberries and Their Role in Prevention of Urinary Tract Infections. *Mol. Nutr. Food Res.* 51, 732-737.
- Ignat, I.; Volf, I.; Popa, V. I. (2001). Critical Review of Methods for Characterization of Polyphenolic compounds in Fruits and Vegetables. *Food Chem.* 126, 1821-1835.

Instituto Nacional de Geografía Estadística e Informática.(2011). El Sector Alimentario en México 2011. Serie Estadísticas Sectoriales. México. Recuperado de <http://www.inegi.org.mx/>

Instituto Nacional de Geografía Estadística e Informática. (2013). Cotizantes en el Instituto Mexicano del Seguro Social según actividad económica.México. Recuperado de <http://www.inegi.org.mx/>

Irakose P. C., Haihua Z., Quin L., Zhou K., Huiming Z. (2010). Optimization of Ultrasonic Extraction of polyssacharides from Chinese Malted Sorghum Using Surface Response Methodology.*Pakistan Journal of Nutrition.* 9, 336-342.

Jen-Kun, L., Meng-Shih, W. (2006).Flavonoids as nutraceuticals. En Grotewold, E. (Ed.), *The Science of Flavonoids* (213-238). Columbus, Ohio:Springer.

Johnson, M. H., de Mejia, E. G., Fan, J., Lila, M.A., Yousef, G. G. (2013).Anthocyanins and Proanthocyanidins from Blueberry–Blackberry Fermented Beverages Inhibit Markers of Inflammation in Macrophages and Carbohydrate-Utilizing Enzymes In Vitro. *Mol. Nutr. Food Res.* 57, 1182-1197.

Jordheim, M. (2007).Isolation, Identification and Properties of Pyranoanthocyanin Forms.Tesis Doctoral, Departamento de Química, Universidad de Bergen, Bergen, Noruega.

Joseph, J. A., Denisova, N.A., Arendash, G., Gordon, M., Diamond, D., Shukitt-Hale, B. (2003). Blueberry Supplementation Enhances Signaling and Prevent Behavioral Deficits in an Alzheimer Disease Model. *Nutritional Neuroscience.*, 6, 3, 153-162.

Kalt, W., Lawand, C., Ryan, D., McDonald, J. E., Donner, H. (2003).Oxygen radical absorbing capacity, anthocyanin and phenolic content of highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.), during ripening and storage.*Journal of the American Society for Horticultural Science*, 128, 917–923.

Kahkonen, M., Heinonen, M. (2003).Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons.*J. Agric. Food Chem.* 51, 628- 633.

Kaume, L., Howard, R. L., Devareddy, L., (2011). The Blackberry Fruit: A Review on Its composition and Chemistry, Metabolism and Bioavailability, and Health Benefits. *J. Agric. Food Chem.* 60, 5716-5727.

Kellogg, J., Wang, J., Flint, C., Ribnicky, D., Kuhn, P., Gonzalez, E., Raskin I., Lila, M. A.(2010).Alaskan Wild Berry Resources and Human Health under theCloud of Climate Change.*J. Agric. Food Chem.* 58, 3884-3900.

Konczak I., Zhang, W. (2004). Anthocyanins more tan nature’s colours. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, PII.S1110724304407013.

- Kubiak-Martens, L. (1999). The Plant Food Component of the Diet at the Late Mesolithic (Ertebølle) settlement at Tybrind Vig, Denmark. *Vegetation History and Archaeobotany*, 8, 117–127.
- Kurotani, K., Nanri, A., Goto, A., Mizoue, T., Noda, M., Kato, M., Inoue, M., Tsugane, S. (2013) Vegetable and Fruit Intake and Risk of Type 2 Diabetes: Japan Public Health Center-Based Prospective Study. *British Journal of Nutrition*. 109, 709-717.
- Landete, J. M. (2012). Plant and mammalian lignans: A review of source, intake, metabolism, intestinal bacteria and health. *Food Research International*. 40, 410-424.
- Larrosa, M., García-Conesa, M. T., Espín, J. C., Tomás-Barberán, F. A. (2010). Ellagitannins, ellagic acid and vascular health. *Molecular Aspects of Medicine*. 31, 513-539.
- Lee, J., Dosset, M., Finn, C. E. (2012). *Rubus* fruit phenolic research: The good the bad and the confusing. *Food Chemistry*. 130, 785-796.
- Lee, J. y Finn, C. E. (2007). Anthocyanins and Other Polyphenolics in American Elderberry (*Sambucus canadensis*) and European Elderberry (*Sambucus nigra*) Cultivars. *J. Agric. Food Chem.* 87, 2665-2675.
- Lesschaeve, I., Noble, A. C., (2005). Polyphenols: Factors influencing their sensory properties and their effects on food and beverage preferences. *Am. J. Clin. Nutr.* 330S-335S.
- Lila, M. A. (2007). From Beans to Berries and Beyond Teamwork between Plant Chemicals for Protection of Optimal Human Health. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1114, 372-380.
- Liu, M., Qi, X., Weber, C., Yong, C., Brown, J., Hai, R. (2002). Antioxidant and Antiproliferative Activities of Raspberries. 50, 2926-2930.
- Longo, L. y Vasapollo, G. (2005). Anthocyanins from Bay (*Laurus nobilis* L.) Berries, *J. Agric. Food Chem.* 53, 8063-8067.
- Maatta, K. R., Kahkonen, M. P., Torronen, A. R., Heinonen, I. M. (2005). Catechins and Procyanidins in Berries of Vaccinium Species and Their Antioxidant Activity. *J. Agric. Food Chem.* 53, 8485-8491.
- Maatta-Riihinen, K. R., Kamal-Eldin, A., Torronen, A. R. (2004). Identification and Quantification of Phenolic Compounds in Berries of *Fragaria* and *Rubus* Species (Family Rosaceae). *J. Agric. Food Chem.* 52, 6178-6187.
- Maatta-Riihinen, K. R., Kamal-Eldin, A., Torronen, A. R. (2003). High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) Analysis of Phenolic Compounds in Berries with Diode Array and Electrospray Ionization Mass Spectrometric (MS) Detection: *Ribes* Species. *J. Agric. Food Chem.* 51, 6736-6744.

- Macías, M., A. (2010). Competitividad de México en el mercado de frutas y hortalizas de Estados Unidos de America 1989-2009. *Agroalimentaria*. 16, 31, 31-48
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. (2004). Polyphenols: Food Sources and Bioavailability. *Am J Clin Nutr*. 79, 727- 747
- Marinova, D., Ribarova, F., Atanassova, M. (2005). Total phenolics and total flavonoids in Bulgarian fruit and vegetables. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy*. 40, 3, 255-260.
- Maritim, A, D.B., Sanders, R.A., and Watkins, J.B. III (2003). Effects of pycnogenol treatment on oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Biochem Mol Toxicol*. 17(3): 193–199.
- Marckzylo, T. H., Cooke, D., Brown, K., Steward, W. P., & Gescher, A. J. (2009). Pharmacokinetics and metabolism of the putative cancer chemopreventive agent cyanidin-3-glucoside in mice. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 64, 1261-1268.
- Marstom, A., Hostettmann, K. (2006). Separation and Quantification of Flavonoids. En Andersen y Markham (Eds.). *Flavonoids chemistry, biochemistry and applications*. (1-34). Boca Raton FL: Taylor & Francis Group.
- Mateus, N., De Freitas, V. (2009). Anthocyanins as Food Colorants. En Gould, K.y col. (eds). *Anthocyanins, Biosynthesis, Functions and Applications* (284-304). Springer : New York.
- Mateus, N., Oliveira, J., Haettich-Motta, M., de Freitas, V. (2004). New Family of Bluish Pyranoanthocyanins. *J. Biomed Biotechnol*. 299-305.
- Mazza, G., Brouillard, R. (1989). The Mechanism of Co-Pigmentation of Anthocyanins in Aqueous Solutions. *Phytochemistry*. 29, 4, 1097-1102.
- Mazza G., Cacace J. E., Kay, C. D. (2004). Methods of analysis for anthocyanins in plants and biological fluids. *J. AOAC Int*. 1, 129-145.
- McRae, W. D., Towers, G. H., (1983). Biological activities of Lignans. *Phytochemistry*. 23, 6, 1207-1220.
- Mendoça, P. P.; Regina, A. A.; Marx, Y. M.; Giesbrecht, A. M.; Da Silva B. V. (2000). nor-Lignans from the leaves of *Styrax ferrugineus* (*Styracaceae*) with antibacterial and antifungal activity. *Phytochemistry*. 55, 597-601
- Mertz, C., Cheynier, V., Gunata, 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. *J. Agric. Food Chem*. 55, 8616-8624.

Mihaela B. (2007). *Estudio de estabilidad y algunas propiedades tecnológicas de pigmentos sintetizados por Epicoccum nigrum*. (Tesis inédita de Maestría). Universidad Dunarea de Jos, Galati, Rumania.

Moraes, A.C.; Bertanha, C. S.; Gimenez, V. M.; Groppo, M.; Silva, M. L.; Cunha, W. R.; Januario, A. H.; Pauletti, P. M. (2011). Development and Validation of a High-Performance Liquid Chromatography Method for Quantification of Egonol and Homoeogonol in Styra Species. *Biomed. Chromatogr.* 26, 869-874

Motillo, S., Filion, K., Genest, J., Joseph, L., Pilote, L., Poirier, P., Rinfret, S., Schiffrin, E. L., Eisenberg, L. (2010). The metabolic syndrome and cardiovascular risk. *Journal of the American College of Cardiology.* 56, 14, 113-1132.

Moyer, R. A., Hummer, K. E., Finn, C. E., Frei, B., Wrolstad, R. E. (2002). Anthocyanins, Phenolics, and Antioxidant Capacity in Diverse Small Fruits: *Vaccinium*, *Rubus* and *Ribes*. *J. Agric. Food Chem.* 50, 519-525.

Mudnic, I., Budimir, D., Modun, D., Gunjaca, G., Generalic, I., Skroza, D., Katalinic, V., Ljuvencov., Boban, M. (2011). Antioxidant and vasodilatory effects of blackberry and grape wines. *J. Med. Food.* 15, (3), 315-321.

Neto, C. C., Krueger, C. G., Lamoureaux, T. L., Kondo, M. Vaisberg, A. J., Hurta, R., Curtis, S., Matchett, M. D., Yeung, H. Sweeney, M. I., Reed, J. D. (2006). MALDI TOF MS Characterization of Proanthocyanidins from Cranberry Fruit (*Vaccinium macrocarpon*) that Inhibit Tumor Cell Growth and Matrix Metalloproteinase Expression *In Vitro*. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 86, 1, 18-25

Organización Mundial de la Salud. Estrategia Mundial Sobre Régimen Alimentario, Actividad Física y Salud. (2013). Recuperado de <http://www.who.int/dietphysicalactivity/fruit/es/index.html>

Oszmianski, J., Wojdylo, A. (2005). Aronia *Melanocarpa* Phenolics and their Antioxidant Activity. *European Food Research and Technology.* 221, 6, 809-813.

Ozgen, M., Neil, R., Tulio, A. Z., Scheerens, C., Miller, R. (2006). Modified 2,2-Azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic Acid (ABTS) Method to Measure Antioxidant Capacity of Selected Small Fruits and Comparison to Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) and 2,2 ϕ -Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) Methods. *J. Agric. Food Chem.* 54, 1151-1157.

Paredes-López, O., Cervantes-Ceja, M. L., Vigna-Pérez, M., Hernández-Pérez T. (2010). Improving Human Health and Healthing Aging and Promoting Quality Life- A Review. *Plant Foods Hum Nutr.* 65, 299-308

Park, C., Woo, E., Gun, D. (2009). Antifungal Effect with Apoptotic Mechanism(s) of Styra japonoside C. *Biochemical and Biophysical Research Communication.* 390, 1255-1259.

- Patel, K., Scarano, F., Kondo, M., Hurta, R. A. & Neto, C. C. (2011). Proanthocyanidin-rich extracts from cranberry fruit (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) selectively inhibit the growth of human pathogenic fungi *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans*. *J. Agric. Food Chem.* 59, 12864-12873.
- Pedraza-Peñaloza, P., Luteyn, J. L. (2011). Andean *Vaccinium* (*Ericaceae:Vaccinieae*): Seven New Species From South America. *Brittonia*, 63, (2), 257-275.
- Pinent, M., Blay, M., Blade, M. C., Salvado, M. J., Arola, L., and Ardevol, A. (2004). Grape seed-derived procyanidins have an antihyperglycemic effect in streptozotocin-induced diabetic rats and insulinomimetic activity in insulinsensitive cell lines. *Endocrinology*. 145,(11), 4985–4990.
- Ping-Hsiao, S., Chi-Hao, W., Chi-Tai, Ye., Gow-Chin, Y. (2011). Protective Effects of Anthocyanins against Amyloid β -Peptide-Induced Damage in Neuro-2A Cells. *J. Agric. Food Chem.* 59, 1683-1689.
- Prior, R. L., Cao, G., Martin, A., Sofic, E., McEwen, J., O' Brien, C., Neal, L., Ehlenfeldt, M., Kalt, W., Krewer, G. & Mainland, C. M. (1998). Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity and variety of *Vaccinium* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46, 2686-2693.
- Puuponen-Pimia, R., Nohynek, L., Alakomi, H. L., Oksman-Kaldentey, K. M. (2005). Bioactive berry compounds-novel tools against human pathogens. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 67, (1), 8-18.
- Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., Pouységu, L. (2011). Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. *Angew. Chem. Int.* 50, 586-621.
- Robbins, R. J. (2003). Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical methodology. *J. Agric. Food Chem.* 51, 2866-2887.
- Rodarte, A. D., Eichholz, I., Rohn, S., Kroh, L. W., Huyskens-Keil, S. (2008). Phenolic profile and antioxidant activity of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) during fruit maturation and ripening. *Food Chemistry*. 109, 564-572.
- Rodriguez-Saona, L. E., Wrolstad, R. E. (2001). Extraction, Isolation and purification of Anthocyanins, In John Wiley & Sons Inc. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. F1.1.1-F1.1.11.
- Rojas, L. E., Ribnicky, D., Logendra, S., Poulev, A., Rojas-Silva, P., Kuhn, P., Dorn, R., Grace, M. H., Lila, M. A. & Raskin, I. (2012). In vitro and in vivo anti-diabetic effects of anthocyanins from maqui berry (*Aristotelia chilensis*). *Food Chemistry*. 131, 387-396.

Roopchand, D. E., Grace, M. H., Kuhn, P., Cheng, D., Plundrich, N., Poulev, A., Howell, H., Lila, M. A. & Ilya, R. (2011). Efficient sorption of polyphenols to soybean flour enables natural fortification of foods. *Food Chemistry*. 131, 1193–1200.

Rouhani Sh., Alizadeh N., Salimi Sh., T. Haji-Ghasemi, (2009), Ultrasonic Assisted Extraction of Natural Pigments from Rhizomes of *Curcuma Longa L.* *Progres in Color, Colorants and coatings*, (2):103-113.

Rúiz, A., Hermosin-Gutierrez, I., Mardones, C., Vergara, C., Herlitz, E., Vega, M., Dorau, C., Winterhalter, P., Von-Baer, D. (2010). Polyphenols and Antioxidant Activity of Calafate (*Berberis microphylla*) Fruits and Other Native Berries from Southern Chile. *J. Agric. food Chem.* 58, 6081-6089.

Ryan, D., Robards, K. (1998). Phenolic Compounds in Olives. *Analyst*. 123, 31R-44R.

Rzedowski, J., Calderon, G. (2005). ROSACEAE. *Flora del Bajío y Regiones Adyacentes*. 135, 1-157.

Santamaría, B., Salazar, G., Beltrán, S., Cabezas, J. L. (2002). Membrane sequences for fractionation of polyphenolic extracts from defatted milled grape seeds. *Desalination*. 148-103-109.

Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C., Jimenez, L. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 45, 287-306.

Schaefer, H. (2011). Why Fruits Go To the Dark Side. *Acta Oecologica*. 37, 604-610.

Schauss, A. G., Xianli, W., Prior, R. L., Ou, B., Patel, D., Huang, D., Kababick, J. P. (2006). Phytochemical and Nutrient Composition of the Freeze-Dried Amazonian Palm Berry, *Euterpe oleraceae* Mart. (Acai). *J. Agric. Food Chem.* 54, 8598-8603.

Schmidt, B. M., Erdman, J. W., Lila, M. A. (2005). Differential Effects of Blueberry Proanthocyanidins on Androgen Sensitive and Insensitive Human Prostate Cancer Cell Lines. *Cancer Letters*. 231, 240-246.

Schofield, P., Mbugua, D. M., Pell, A. N. (2001). Analysis of condensed tannins: a review. *Animal Feed Science and Technology*. 91, 21-40.

Schreckinger, M., Lila, M. A., Yousef, G., De Mejia, E. (2012). Inhibition of α -Glucosidase and α -Amylase by *Vaccinium floribundum* and *Aristotelia chilensis* Proanthocyanidins. En Tunick, M. y col. (ACS Symposium Series; American Chemical Society), *Hispanic Foods: Chemistry and Bioactive Compounds* (71-82) Washington, DC.

Seeram, N. P. (2008). Berry Fruits: Compositional Elements, Biochemical Activities and the Impact of Their Intake on Human Health, Performance and Disease. *J. Agric and Food Chem.*56, 627-629.

Seeram, N. P., Adams, L. S., Zhang, Y., Lee, R., Sand, D., Scheuller, H., Heber, D. (2006). Blackberry, Black Raspberry, Blueberry, Cranberry, RedRaspberry, and Strawberry extracts Inhibit Growth and Stimulate Apoptosis of Human Cancer Cells In Vitro. *J. Agric. Food Chem.* 54, 9329-9339.

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera: Cierre de la Producción Agrícola por Estado. México. Recuperado de http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=351 Julio de 2013.

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Sistema de Información Comercial del Sector Agroalimentario: Exportación de Frutales, 2013. México. Recuperado de http://sicagro.sagarpa.gob.mx/SICAGRO_CONSULTA/infoagroanual.aspx Julio de 2013.

Serrano, J., Puupponen-Pimi, R., Dauer, A., Aura, A. M., Saura-Calixto F. (2009). Review Tannins: Current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. *Mol. Nutr. Food Res.* 53, 310 –329.

Sharma, S. D., Meeran, S. M., Katiyar, S. K. (2010). Proanthocyanidins Inhibit *Invitro* and *In vivo* Growth of Human Non-Small Cell Lung Cancer Cells by Inhibiting Prostaglandin E₂ and Prostaglandin E₂ Receptors. *Mol. Cancer Ther.* 9, 569-580

Siracusa, L., Patané, C., Avola, G., Ruberto, G. (2011). Polyphenols as chemotaxonomic Markers in Italian “Long-Storage” Tomato Genotypes. *J. Agric. Food Chem.* 60, 309-314.

Snyder, L. R., Kirkland, J., Glajch, J. L. (1997). Practical HPLC Method Development 2nd edition. NJ: John Wiley and Sons Inc.

Stevenson, D. E. and Hurst, R.D. (2007). Review: Polyphenolic Phytochemicals - Just Antioxidants or Much More?. *Cell.Mol. Life Sci.* 64, 2900-2916.

Steyn, W. J.; Wand, S. J.; Holcroft, D. M.; Jacobs, G. (2002). Anthocyanins in Vegetative Tissues: a Proposed Unified Function in Photoprotection. *New Phytologist.*155, 349-361.

Stalikas, C. D. (2010). *Natural and synthetic antioxidants*. En Uppu y col. (Eds.) *Methods in Molecular Biology.*(65-90). New York:Springer.

Stoner, G. D., Wang, L. S., Sardo, C., Zikri, N., Hecht, S. S., Mallery, S. R.(2010). Cancer prevention with berries: Role of the anthocyanins. En Milner, J. A. y Rogmanolo D.

F.(Eds.),*Nutrition and Health: Bioactive Compounds in Cancer (703-723)*. New York: Springer.

Stuart, J. A., Robb, E. (Eds.).(2013). *Bioactive polyphenols from wine grape*. [Version de Spriger].DOI: 10.1007/978-1-4614-6968-1

Tanaka, J., Kadokaru, T., Ogawa, K., Hitoe, S., Shimoda, H. & Hara, H. (2013). Maqui berry (*Aristotelia chilensis*) and the constituent delphinidin glycoside inhibit photoreceptor cell death induced by visible light. *Food Chemistry*. 139, 129-137.

Tangney, C. C., Rasmussen, H. E. (2013). Polyphenols, inflammation, and cardiovascular disease.*Curr.Atheroscler. Rep.* 15, 324, 1-10.

Tavares, L., Figueira, I., Mc Dougall, G. J., Vieira, H. L., Alves, P. M., Ferreira, R. B., Santos, C. N. (2012). Neuroprotective Effects of Digested Polyphenols, From Wild Blackberries Species.*Eur. J. Nutr.* 52, 225-236.

Timberlake, C.F. (1980). Anthocyanins, Occurrence, Extraction and Chemistry.*Food Chemistry*. 5, 69-80

Toda, T., Sunagawa, T., Kanda, T., Tagashira, M., Shirasawa, T., Shimizu, T. (2011). Apple Procyanidins Suppress Amyloid β -Protein Aggregation. *Biochemistry Research International*. 2011, 1-8. doi:10.1155/2011/784698.

Truong, V.D., Deighton, N., Thompson, R.T., McFeeters, R. F., Dean, L. O., Pecota, K.V., Yencho, G. C. (2010). Characterization of Anthocyanins and Anthocyanidins in Purple-Fleshed Sweetpotatoes by HPLC-DAD/ESI-MS/MS. *J. Agric Food Chem.* 58, 404-410.

Tsao, R. (2010) Chemistry and Biochemistry of Dietary polyphenols.*Nutrients*. 2, 1231-1246.

Tsibranska, I., Saykova, I. (2013). Combining nanofiltration and other separation methods.*Journal of Chemical Technology and Metallurgy*. 48, 4, 333-340.

Tsuda, S., Murakami, M., Matsusaka, N., Kano, K., Taniguchi, K., Sasaki, Y. F. (2001). DNA Damage Induced by Red Food Dyes Orally Administered to Pregnant and Male Mice.*Toxicological Sciences*, 61, 92-99.

Tsuda, T., Horio, F., Uchida, K., Aoky H. & Osawa T. (2003). Dietary cyanidin 3-O-D-glucoside-rich purple corn color prevents obesity and ameliorates hyperglycemia in mice. *The Journal of Nutrition*. 133, 2125-2130.

Ureña, C., Mancipe, J., Hernandez, J., Castañeda, D., Pombo, L., Gomez, A., Asea, A., Fiorentino, S. (2013). Gallotannin-rich *Caesalpinia spinosa* fraction decreases the primary tumor and factors associated with poor prognosis in a murine breast cancer model.*Complementary and Alternative Medicine*. 13, 74, 1-13.

USDA: United States Department of Agriculture
<http://www.usda.gov/wps/portal/usda/usdahome>

Usenik, V., Stampar, F., Veberic, R. (2009). Anthocyanins and fruit color in plums (*Prunus domestica*) during ripening. *Food Chemistry*. 114, 529–534.

Vainio, H., Weiderpass, E. (2006) Fruit and vegetables in cancer prevention. *Nutr Cancer*. 54, 111–142.

Valls, J., Millán, S., Martí, M. P., Borrás E., Arola, L. (2009). Advanced separation methods of foods anthocyanins, isoflavones and flavonols. *Journal of Chromatography A*. 1216, 7143-7172.

Van-Den, T., Nigél, D., Thompson, R. T., McFeeters, R. F., Dean, L. O., Pecota, K. V., Yencho, G. C. (2010). Characterization of Anthocyanins and Anthocyanidins in Purple-Fleshed Sweetpotatoes by HPLC-DAD/ESI-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58, 404-410.

Vasco, C., Riihinen, K., Ruales & Kemal-Eldin, A. (2009). Phenolic Compounds in *Rosaceae* Fruits From Ecuador. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57, 1204–1212.

Viskeliš, P., Rubinskiene, M., Jasutiene, I., Sarkinas, A., Daubaras, R., Cesoniene, L. (2002). Anthocyanin, Antioxidative, and Antimicrobial Properties of American Cranberries (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) and their Press Cake. *Food Chemistry*. 74, 2, 157-161.

Wallace, T. C. (2011). Anthocyanin in cardiovascular disease. *Adv. Nutr.* 2, 1-7.

Wallace, T. C., Giusti, M. (2010). Evaluation of parameters that affect the 4-Dimethylaminocinnamaldehyde assay for flavanols and Proanthocyanidins. *Journal of Food Science*. 75 (7) C619-C625.

Wan, C.-W., Wong, C., Pin, W.-K., Wong, M., Kwok, C.-Y., Chan, R., Yu, P. & Chan, S.-W. (2013). Chlorogenic acid exhibits cholesterol lowering and fatty liver attenuating properties by up-regulating the gene expression of PPar- α in cholesterolemic rats induced with a high-cholesterol diet. *Phytotherapy Research*. 27, 545-551.

Wang, L.-S., Carmella, S., Keyes, R., Kuo, C.-T., Huang, Y.-W., Hecht, S., Stoner, G. (2012). Anthocyanin and cancer prevention. In Sarkar, F. H. (ed.), *Nutraceuticals and cancer* (201-229). Springer: New York.

Wang, H., Cao, G., Prior, R. P. (1997). Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.* 45, 304-309.

Wang, S. Y., 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.

Wang, W., Yagiz, Y., Buran, T. J., do Nascimento C., Gu, L. (2011). Phytochemicals from berries and grapes inhibites the formation of advanced glycation end-products by scavenging reactive carbonyls. *Food Research International*. 44, 9, 2666-2673.

Williamson, G. (2013). Possible effects of dietary polyphenols on sugar absorption and digestion. *Mol. Nutr. food Res*. 57, 48-57.

Xie, X., Zhao, R. & Shen, G. X. (2012). Influence of delphinidin-3-glucoside on oxidized low-density lipoprotein-induced oxidative stress and apoptosis in cultured endothelial cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 60, 1850-1856.

Yoshikama, K.; Hirai, H.; Tanaka, M.; Arihara, S. (2000). Antisweet Natural Products. XV.1) Structures of Jegosaponins A—D from *Styrax japonica* SIEB. et ZUCC. *Chem. Pharm. Bull.* 48, (7), 1093-1096.

Yousef, G. G., Brown, A., Funakoshi, Y., Mbeunkui, F., Grace, M. H., Ballington, J. R., Loraine, A., Lila, M.A. (2013). Efficient Quantification of the Health-Relevant Anthocyanin and Phenolic Acid Profiles in Commercial Cultivars and Breeding Selections of Blueberries (*Vaccinium* spp.). *J. Agric. Food Chem.* 61, 4806-4815.

Yu-Ping, W., Ming-Liang, C., Bao-Fang, Z., Mao, M., Ming-Yu, Z., Jun, W., Cheng-Xiu, L. (2010). Effect of Blueberry on Hepatic and Immunological Functions in Mice. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 9, 2, 164-168.

Zadernowsky, R., Czaplicki, S., Naczki, M. (2009). Phenolic Acid Profiles of Mangosteen Fruits (*Garcinia mangostana*). *Food Chemistry*. 112, (3), 685-689.

Zhang, J., Li, L., Kim, S. H., Hagerman, A. E., Lü, J. (2009). Anti-Cancer, Anti-diabetic and Other Pharmacologic and Biological Activities of Penta-Galloyl-glucose. *Pharmaceutical Research*. 6, 9, 2066-2080.

Zi, X., Simoneau, A. R. (2013). Effect of antioxidant-rich foods and supplements on cancer risk. En Cho, W.C.S. (Ed.). *Cancer chemoprevention and treatment by diet therapy* (169-197) New York: Springer.