

**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.**

**CONTENIDO DE COMPUESTOS BIOACTIVOS Y SU CONTRIBUCIÓN A LA
CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DURANTE LA MADURACIÓN DE PIÑA
CV. "ESMERALDA"**

PRESENTADA POR:

CINDY ROSAS DOMÍNGUEZ

TESIS APROBADA POR LA:

**COORDINACIÓN DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS DE ORIGEN
VEGETAL**

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

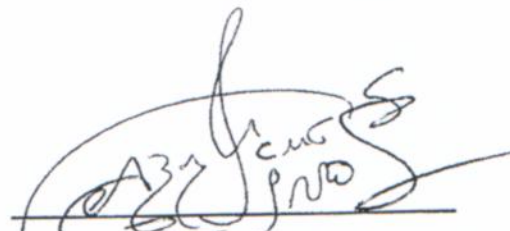
MAESTRÍA EN CIENCIAS

HERMOSILLO, SONORA

AGOSTO DEL 2011

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de la I.B.Q. Cindy Rosas Domínguez, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.




Dr. Gustavo A. González Aguilar
Director de Tesis



Dr. J. Fernando Ayala Zavala

Ana María Mendoza Wilson
Dra. Ana María Mendoza Wilson

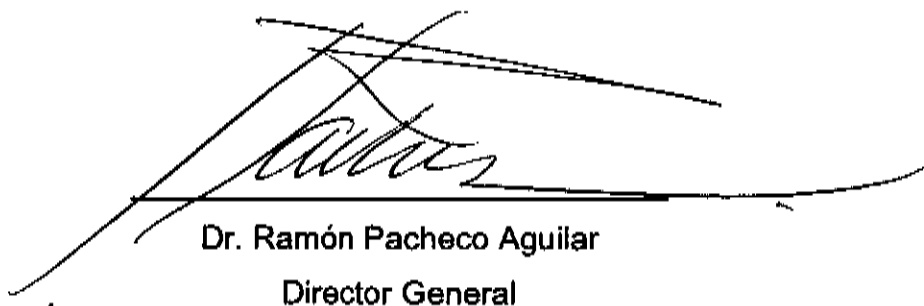


Dr. Saúl Ruiz Cruz

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del director del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD).

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director o directora de la tesis.



Dr. Ramón Pacheco Aguilar
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al **Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.**, por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de maestría y permitirme alcanzar una meta más dentro de mi formación personal y profesional.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)**, por el apoyo económico brindado durante la realización de mis estudios de posgrado.

Al **Instituto Tecnológico de Tepic** por abrigarme en sus instalaciones durante la recolección de las muestras para el trabajo experimental.

A la **Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Vegetal**, por brindarme sus instalaciones para llevar a cabo la realización de este trabajo.

A mi **Director de Tesis, Dr. Gustavo A. González Aguilar** por haber confiado en mí y compartir conmigo la responsabilidad de llevar a cabo esta investigación, por ser un ejemplo a seguir y sobre todo, gracias por su apoyo, sus consejos y su amistad.

A mi **Comité de Tesis** integrado por el **Dr. J. Fernando Ayala Zavala, Dra. Ana María Mendoza Wilson** y el **Dr. Saúl Ruiz Cruz** por su apoyo, dedicación y guía durante estos dos años. Mil gracias por todo!!!.

Al personal del **Laboratorio de Antioxidantes y Alimentos Funcionales, Q.B. Mónica Alejandra Villegas Ochoa, M.C. Chrystian Mariana Rodríguez**

Armenta y al **M.C. Reynaldo Cruz Valenzuela**, por la capacitación y el apoyo técnico recibido en las diferentes técnicas.

Al **M.C. Jorge Mercado** y al **M.C. Orlando Tortoledo Ortíz** por el apoyo técnico recibido en el uso del HPLC.

Al **Q.B. René Valenzuela** por el apoyo técnico recibido durante la liofilización de mis muestras.

A **Karla Gabriela Robles Bernal** por su apoyo técnico durante estos dos años.

DEDICATORIA

A DIOS.....por la vida y la bella familia que tengo!!!

A GLORIA y ALEJANDRO (mis padres), por darme tanto amor, por cada noche de desvelo cuando enfermaba, por cada alegría compartida, por esas navidades inolvidables, por cada palabra de aliento, por enseñarme a ver con el corazón y a luchar por alcanzar mis sueños, pero sobre todo, por darme una hermosa FAMILIA y la herencia más grande que cualquier ser humano pueda recibir.....EDUCACIÓN.

A quien fue mi compañero de travesuras en la niñez, mi peor tormento en la adolescencia (no se me olvida que me espantabas a todos los pretendientes eehhhh!!!, fuiste un celoso compulsivo!!!) y mi amigo y cómplice hasta el día de hoy.....a ti DANIEL.....por ser el mejor hermano del mundo.

A quien de manera inesperada apareció en mi vida y a base de perseverancia, detalles y sonrisas me robó el corazón. Al sapo que se convirtió en hombre, al hombre que se convirtió en príncipe, al príncipe que hace que los momentos grises se tornen rosa pastel. Mil gracias por cada momento a tu lado, eres lo mejor que me ha pasado en la vida.....TE AMO ANTONIO.

A mi segunda mamá, gracias por cada consejo, por cada regaño, por tenderme la mano en los momentos difíciles y estresantes, por cuidarme constantemente de terminar con

cáncer de estómago, gracias por todo el cariño recibido, en verdad le digo que se queda en mi corazón, la quiero mucho MAMÁ BRENDA.

*Al ángel que al terminar su misión en la tierra tuvo que regresar al cielo... a ti
ABUELO*

*A mis nuevos y grandes amigos, Violeta, Fabiola, Yazaric, Gilda Joana, Johana Marilú, Citlaly, Karina, Brenda, Rosela, Adriana, Miriam, Ana Elena, Laura, José Alberto, Hugo, Jorge, Gabriel José, Juan Manuel, Julio, Luis y Moisés, tripulantes del mismo barco, gracias por hacer amena esta travesía y a pesar de que el barco a llegado a puerto y cada uno tomará caminos diferentes, me quedo con lo mejor de ustedes.....su
AMISTAD.*

Cindy

CONTENIDO

	Página
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABLAS	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiv
RESUMEN.....	xv
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES.....	3
Cambios Fisiológicos y Bioquímicos durante la Maduración de la Piña	3
Respiración y producción de etileno	3
Color	5
Firmeza.....	6
Sólidos solubles totales, acidez titulable y pH.....	7
Volátiles	8
Cambios en el Contenido de Compuestos Bioactivos durante la Maduración de la Piña.....	9
Vitamina C	12
Carotenoides.....	13
Compuestos fenólicos.....	14
Mecanismo de acción antioxidante	17
Enzimas involucradas en la biosíntesis y degradación de compuestos fenólicos	17
Fenilalanina amonio liasa (PAL)	19
Polifenol oxidasa (PPO).....	21
Peroxidasa (POD).....	23
Contribución de Compuestos Bioactivos a la Capacidad Antioxidante	24
HIPÓTESIS.....	26

OBJETIVOS.....	26
Objetivo General	26
Objetivos Específicos.....	26
MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
Materia Prima.....	27
Caracterización Fisiológica	29
Producción de CO ₂ y etileno	29
Color	30
Sólidos solubles totales (SST), acidez titulable y pH	30
Jugosidad.....	31
Determinación de Compuestos Bioactivos	32
Vitamina C	32
β-Caroteno	33
Compuestos fenólicos.....	33
Preparación de extractos hidrofílicos y lipofílicos.....	33
Fenoles totales.....	34
Flavonoides totales	34
Capacidad Antioxidante	35
DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidracilo).....	35
TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity)	35
Perfil de Compuestos Fenólicos	36
Contribución de Compuestos Bioactivos a la Capacidad Antioxidante	37
Enzimas Involucradas en la Biosíntesis y Degradación de	
Compuestos Fenólicos.....	38
Fenilalanina amonio liasa (PAL).....	38
Polifenol oxidasa (PPO).....	39
Peroxidasa (POD)	40
Análisis de Datos	41
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42

Caracterización Fisiológica y Físicoquímica.....	42
Compuestos Bioactivos	44
Vitamina C	44
β-caroteno.....	46
Compuestos fenólicos.....	48
Ensayos de Capacidad Antioxidante	51
Perfil de Compuestos Fenólicos	53
Contribución de Compuestos Bioactivos a la Capacidad Antioxidante	57
Enzimas Involucradas en la Biosíntesis y Degradación de Compuestos Fenólicos	64
CONCLUSIONES	68
REFERENCIAS	69

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Tendencias en el contenido de Fenoles Totales (a), Flavonoides Totales (b) y Capacidad Antioxidante (c) en papaya “Maradol”, mango “Ataulfo” y aguacate “Hass” durante el proceso de maduración	11
2. Clasificación de los compuestos fenólicos	15
3. Mecanismo de acción antioxidante de los compuestos fenólicos	18
4. Esquema de la ruta de biosíntesis de los fenilpropanoides	20
5. Reacción general de oscurecimiento catalizada por la enzima PPO, a partir de sustratos fenólicos	22
6. Estados de madurez muestreados en piña “Esmeralda”	28
7. Contenido de vitamina C en pulpa de piña “Esmeralda” en cuatro estados de madurez	45
8. Contenido de β -caroteno en pulpa de piña “Esmeralda” en cuatro estados de madurez	47
9. Cambios en el contenido de fenoles totales y flavonoides totales en pulpa de piña “Esmeralda” en cuatro estados de madurez	50

10. Inhibición del radical DPPH y ABTS en pulpa de piña “Esmeralda” en cuatro estados de madurez.....	52
11. Perfil típico de compuestos fenólicos de extractos hidrolizados de pulpa de piña “Esmeralda”	54
12. Contribución de compuestos bioactivos a la capacidad antioxidante durante la maduración de piña “Esmeralda”	58
13. Inhibición (%) del radical DPPH de los compuestos fenólicos identificados en pulpa de piña cv. “Esmeralda”	60
14. Variaciones en la actividad de PAL y POD durante la maduración de piña “Esmeralda”.....	67

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Caracterización fisicoquímica de pulpa de piña “Esmeralda” en cuatro estados de madurez	43
2. Variaciones en el contenido de compuestos fenólicos durante la maduración de piña “Esmeralda”	56
3. Número y localización de los grupos sustituyentes presentes en compuestos fenólicos identificados en pulpa de piña cv. “Esmeralda”	62

LISTA DE ABREVIATURAS

Ae	Área del estándar
Am	Área de la muestra
AT	Acidez titulable
BHT	Butilhidroxitolueno
CAT	Capacidad antioxidante total
Cge	Concentración del gas estándar
EAG	Equivalentes de ácido gálico
EM	Estados de madurez
EQ	Equivalentes de quercetina
ET	Equivalentes trolox
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidracil
PAL	Fenilalanina amonio liasa
Pf	Peso del fruto
PICB	Porcentaje de inhibición de compuestos bioactivos
PMSF	Fluoruro de metano sulfonilo
POD	Peroxidasa
PPO	Polifenol oxidasa
PVPP	Polivinilpirrolidona
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SST	Sólidos solubles totales
TEAC	Capacidad antioxidante en equivalentes trolox
THF	Tetrahidrofurano
Ti	Tiempo de incubación
UA	Unidades de actividad
Vec	Volúmen de espacio de cabeza

RESUMEN

La piña (*ananas comosus*) cv. "Esmeralda" es una de las frutas tropicales de mayor importancia en México por sus buenos atributos sensoriales y por su alto contenido de compuestos bioactivos (vitamina C, β -caroteno y compuestos fenólicos). Estudios recientes han demostrado que los compuestos fenólicos poseen mayor capacidad antioxidante que la vitamina C y los carotenoides. Las concentraciones de estos compuestos, así como su estatus antioxidante, dependen de la variedad y del estado de madurez en el que se encuentre el fruto. Sin embargo, estos atributos solo han sido reportados para frutos en estado de madurez comercial. En este contexto, el objetivo de este trabajo fue evaluar los cambios en el contenido de compuestos bioactivos y su contribución a la capacidad antioxidante durante la maduración de piña cv. "Esmeralda". Se evaluaron los cambios fisiológicos y fisicoquímicos de la piña en 4 estados de madurez (EM), incluyendo producción de CO₂, color, jugosidad, sólidos solubles totales (SST), pH y acidez titulable (AT). Adicionalmente se determinaron los cambios en el contenido de vitamina C, β -caroteno y fenoles y flavonoides totales durante el proceso de maduración, así como su contribución individual a la capacidad antioxidante. Se identificaron los compuestos fenólicos mayoritarios en pulpa de piña y se evaluó la actividad enzimática de PAL, PPO y POD, (enzimas involucradas en la síntesis y degradación de compuestos fenólicos). La mayoría de los parámetros fisicoquímicos mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) durante la maduración, con excepción del pH. En general, el contenido de vitamina C aumentó durante las primeras tres etapas de la maduración, para mostrar un decremento en el EM4, mientras que las concentraciones de β -caroteno y compuestos fenólicos, aumentaron gradualmente con la maduración. La capacidad antioxidante total antirradical

mostró un incremento con la maduración, hasta inhibir en un 40 % aproximadamente al radical DPPH en el EM4. Los compuestos fenólicos contribuyeron en mayor proporción a la capacidad antioxidante, aportando más del 40% en todos los estados de madurez, seguidos de la vitamina C (27-38 %) y β -caroteno (7-10 %), respectivamente. Los compuestos fenólicos identificados fueron ácido gálico, catequina, epicatequina, ácido vanílico, miricetina y ácido 2-hidroxicinámico. Por último, la actividad de PAL y POD incrementó con la maduración del fruto, mostrando correlaciones positivas con el contenido de compuestos fenólicos. Se concluye que el estado de madurez influyó de manera significativa ($p < 0.05$) en la mayoría de los parámetros evaluados. El contenido de compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante del fruto, aumentaron a lo largo del proceso de maduración. De acuerdo a estos resultados se concluye que la piña cv. "Esmeralda", es una buena fuente de compuestos bioactivos y su consumo podría promover algunos efectos benéficos en la salud del consumidor.

INTRODUCCIÓN

Diferentes estudios epidemiológicos han demostrado que el consumo de frutas y hortalizas frescas juega un papel muy importante en la dieta humana debido a sus efectos positivos en la salud (Yahia, 2010). Dentro de los múltiples beneficios que este tipo de productos ofrecen al consumidor podemos mencionar la reducción de enfermedades degenerativas y la prevención de distintos tipos de cáncer y diversos problemas neurológicos (González-Aguilar, Villa-Rodríguez, Ayala-Zavala, & Yahia, 2010; Yahia, 2010). Debido a lo anterior, se han implementado diversos programas gubernamentales (nacionales e internacionales) que promueven el consumo de este tipo de alimentos en la población (Manach, Mazur, & Scalbert, 2005).

Entre los frutos de mayor consumo en México y de gran demanda en los mercados internacionales se encuentran los frutos tropicales y exóticos (González-Aguilar et al., 2010). Dentro de los cuáles México ha logrado consolidarse como uno de los principales exportadores de papaya, mango y aguacate, siendo la piña el caso de excepción. Con una producción de 720 900 ton, México ocupa el octavo lugar a nivel mundial en la producción y el catorceavo lugar en exportación (FAOSTAT, 2004). De ésta, el 70 % se destina al mercado fresco nacional, el 23-25 % al sector industrial y tan solo del 5-7 % al mercado de exportación (COVECA, 2002).

La piña (*Ananas comosus*) cv. "Esmeralda" es una de las tres variedades de piña más producidas en la República Mexicana. Esta fruta posee atributos de calidad que son apreciados alrededor del mundo debido a que combina buen sabor, aroma, jugosidad, dulzura y textura con un alto contenido de fibra, minerales y compuestos bioactivos (compuestos fenólicos, vitamina C y carotenoides) (Montero-Calderón, Rojas-Graü, & Martín-Belloso, 2010b).

Durante el proceso de maduración de este fruto se llevan a cabo una serie de complejos procesos de transformación de sus componentes químicos, dentro de los cuáles se encuentran los cambios que se dan en el contenido de compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante.

La capacidad antioxidante de la piña y de otros frutos tropicales está en función del tipo y concentración de antioxidante presente en el tejido fresco, así como del estado de madurez en el cual se encuentre el fruto (Ayala-Zavala, Rosas-Domínguez, Vega-Vega, & González-Aguilar, 2010). Sin embargo, este atributo solo ha sido reportado para frutos en estado de madurez comercial, desconociendo sus cambios y el papel fisiológico que desempeñan durante el proceso de maduración. Durante muchos años se creyó que la vitamina C era el principal antioxidante de frutas y hortalizas, sin embargo, estudios recientes han demostrado que los compuestos fenólicos poseen mayor capacidad antioxidante que esta vitamina y los carotenoides, razón por la cual muchos autores se refieren a ellos como “Super Antioxidantes” (Miean & Mohamed, 2001).

En este contexto, el objetivo de este trabajo fue evaluar las variaciones en el contenido de compuestos bioactivos y su contribución a la capacidad antioxidante durante la maduración de piña cv. “Esmeralda”.

ANTECEDENTES

Cambios Fisiológicos y Fisicoquímicos durante la Maduración de la Piña

La maduración es la fase final del desarrollo que ocurre una vez que el fruto adquiere su tamaño máximo (Kader, 1997). Esta etapa implica cambios bioquímicos, fisiológicos y estructurales, que modifican la apariencia, textura, sabor, aroma y características nutricionales del fruto (Giovannoni, 2004). En el caso de las frutas no climatéricas, como la piña, la recolección debe ser realizada una vez que se han desarrollado sus características organolépticas (COVECA, 2002). Esto debido a que los cambios que sufren estas frutas una vez cosechadas son mínimos y sólo ocurren pequeñas modificaciones en el color de la piel y la textura. Sin embargo, se conoce muy poco sobre los cambios nutricionales que acontecen durante la maduración (Hernández, González, & Lobo, 2007).

Respiración y Producción de Etileno

La respiración es un proceso biológico, que continúa después que el fruto es cosechado o removido del árbol, donde el oxígeno atmosférico es aprovechado para metabolizar compuestos de almacenamiento (azúcares y almidón) y formar CO₂, agua y energía (calor) (Hulme, 1989). Ésta involucra tres procesos metabólicos: glucólisis, ciclo de Krebs y la cadena transportadora de electrones (Lizada, 1993). La velocidad de respiración varía dependiendo del tipo de tejido,

área del producto en contacto con el oxígeno, estado de desarrollo, contenido de agua, daños mecánicos del producto, temperatura, humedad relativa, composición de la atmósfera y barreras físicas (Kader, 2002).

La intensidad respiratoria de un fruto se mide como la cantidad de CO₂ (mL) que desprende un kilogramo de fruta en una hora (Fonseca, Oliveira, & Brecht, 2002). A lo largo del crecimiento se produce en primer lugar, un incremento en la respiración, que va disminuyendo lentamente hasta la maduración. Sin embargo, en frutas climatéricas, después de alcanzar el mínimo se produce un nuevo aumento en la intensidad respiratoria hasta alcanzar un valor máximo, llamado pico climatérico, después del cual la intensidad respiratoria disminuye (Lizada, 1993). La piña es una fruta no climatérica, por lo que tiene baja velocidad de respiración, la cual, declina lentamente después de la cosecha (Marrero & Kader, 2006). A una temperatura de 10 °C, la velocidad de respiración es de 3-5 mLCO₂/kg h y se incrementa de 2-3 mL con cada 3 °C de aumento en la temperatura (Marrero & Kader, 2001).

Durante la respiración de los frutos se sintetiza etileno, el cual es conocido como la hormona de la maduración, por lo que es preciso evitar su acumulación y así aumentar el periodo de conservación (Toivonen & De Eil, 2002). Los frutos climatéricos, producen grandes cantidades de etileno a medida que la tasa de respiración aumenta, mientras que la piña (no climatérica), tiene una tasa de producción de etileno baja, menos de 0.2 μLC₂H₄/kg h a 20 °C y su exposición, puede dar como resultado un desverdizado uniforme de la cáscara sin afectar significativamente la calidad interna (Yoldi, Sánchez, Ochoa, Rodríguez, Roque, Ortega, Palacios, & Carrillo, 2000).

El etileno es responsable de la síntesis de enzimas involucradas en cambios físicos, químicos y metabólicos en los tejidos vegetales (Watkins, 2006). Estos, tienen una importante influencia en las características sensoriales relacionadas con el sabor y la firmeza del fruto (González-Aguilar, Gardea, &

Cuamea-Navarro, 2005). La respuesta de la fruta al etileno exógeno depende de varios factores, entre los que destacan: la sensibilidad del tejido, la etapa de maduración, la concentración, el tiempo de exposición a este gas y la temperatura (Saltveit, 1999). Una cantidad elevada de etileno exógeno puede inhibir al sistema responsable de la maduración normal (Atta-Aly, Brecht, & Huber, 2000). Sin embargo, una vez que la fruta inicia el proceso de maduración, la concentración interna de etileno aumenta rápidamente hasta niveles de saturación y la aplicación de etileno exógeno no causa efecto alguno en dicho proceso (Saltveit, 1999).

Color (L, a* y b*)

El color de un fruto es un atributo importante que determina la decisión de compra e indica el grado de maduración (Fenema, 1993). La concentración y tipo de los pigmentos naturales de las frutas y vegetales pueden cambiar a medida que el fruto madura (Kader, 1997; Montero-Calderón & Cerdas-Araya, 2009). Los pigmentos primarios que imparten color se pueden clasificar en dos grupos: los liposolubles, como la clorofila (verde) y los carotenoides (amarillo, naranja y rojo) y los hidrosolubles, como las antocianinas (rojo y azul), flavonoides (amarillo) y betalaínas (rojo) (Barrett, Beaulieu, & Shewfelt, 2010).

En la piña, uno de los cambios más notables durante la maduración y senescencia es la degradación de la clorofila, que se expresa cuando el color verde de la cáscara cambia al amarillo, desenmascarando los carotenoides (Yoldi et al., 2000). Estudios realizados por Chen y Paull (1995) en piña, muestran un incremento en los niveles de clorofila en los últimos 15 días antes de la maduración, para finalmente disminuir. Los carotenos en la cáscara permanecen constantes durante la maduración y declinan ligeramente antes de

la senescencia; mientras que en la pulpa la concentración de carotenos aumenta durante estas dos etapas.

Los cambios en el color pueden utilizarse como indicadores del avance en el proceso de maduración (Montero-Calderón et al., 2010b). Para evaluar estos cambios se utilizan cartas de color y medidores de color como colorímetros, al cual rigen las coordenadas L, a* y b*, que se utilizan para localizar un espacio tridimensional de la coloración del producto. Estas variables quedan definidas mediante los parámetros de luminosidad (L), ángulo de matiz (°Hue) y cromaticidad (C), los cuales pueden darnos una idea más clara del tono de color y color verdadero del fruto (Barrett et al., 2010).

Firmeza

La firmeza es un atributo importante en la calidad del fruto (Montero-Calderón & Cerdas-Araya, 2009). Está representada como la resistencia que ofrece el fruto a una presión dada, la cual puede ser medida con un texturómetro o bien de manera subjetiva, mediante la presión ejercida por la mano o la boca (Barrett et al., 2010). La firmeza o textura del fruto son factores que se deben cuidar en el fruto, ya que el consumidor los toma en cuenta en la decisión de su compra.

La pérdida de firmeza en los frutos es un proceso normal que ocurre durante la maduración del fruto y se debe a la hidrólisis de la pared celular (Sams, 1999). Las células dañadas liberan enzimas proteolíticas y pectinolíticas que difunden hacia el interior de los tejidos y actúan sobre sus componentes (Montero-Calderón & Cerdas-Araya, 2009). Para evitar este ablandamiento, se aplican tratamientos térmicos estabilizantes en frutos enteros y tratamientos compuestos principalmente por sales de calcio, los cuales están extensamente probados en frutas mínimamente procesadas (Barrett et al., 2010; Robles-

Sánchez, Islas-Osuna, Astiazarán-García, Vázquez-Ortiz, Martín-Belloso, Gorinstein, & González-Aguilar, 2009).

Sólidos Solubles Totales (SST), Acidez Titulable (AT) y pH

Los frutos no climatéricos tienen un alto contenido de almidón, el cual durante el proceso de maduración se hidroliza de manera muy rápida a azúcares (De Moraes, Filgueiras, de Pinho, Alves, & de Assis, 2003; Robles-Sánchez, Gorinstein, Martín-Belloso, Astiazarán-García, González-Aguilar, & Cruz-Valenzuela, 2007). El sabor del fruto, depende principalmente del contenido de azúcares, el cual se puede alterar por la temperatura y la intensidad de la luz durante el desarrollo, así como también por la estación, el clima, el grado de madurez en la cosecha y otras sustancias empleadas para su crecimiento como hormonas y pesticidas (Montero-Calderón & Cerdas-Araya, 2009; Paull, 1997). Los parámetros de calidad para piña indican que el valor óptimo en cuanto a sólidos solubles es de 11-18 % dependiendo del cultivar y la madurez (Yoldi et al., 2000).

La acidez de una fruta se expresa comúnmente en términos del ácido presente en mayor concentración (Paull, 1997). En piña, el ácido cítrico y málico son los dos ácidos orgánicos predominantes (Chen & Paull, 1995). Durante la maduración, la AT tiende a disminuir lentamente, ya que los carbohidratos son oxidados en el proceso de respiración y son convertidos a ácidos orgánicos. Yoldi et al. (2000), reportaron que los niveles de AT de piña oscilan entre 0.5 y 1.6 % de ácido cítrico, dependiendo del cultivar y el estado de madurez.

El pH es una medida utilizada para evaluar la acidez o alcalinidad de una sustancia (Paull, 1997). En el caso de las frutas, el pH indica la presencia de grupos acídicos, entre los cuales se incluyen ácidos orgánicos, fenoles y

aminoácidos. Sin embargo, normalmente se considera que los ácidos orgánicos son los que proporcionan la mayor parte de los iones hidrógeno (Hulme, 1989). Durante el crecimiento, el pH de la piña disminuye, alcanzando un valor de 3.7 a 3.9 al llegar a la maduración, y se incrementa durante la senescencia, comportamiento contrario al de la acidez (Chen & Paull, 1995).

Volátiles

La calidad de un fruto se compone de factores internos y externos (Montero-Calderón, Rojas-Graü, & Martín-Belloso, 2010a). Con su calidad se debe corresponder a los deseos de muchos consumidores para que puedan satisfacer a la mayoría de sus necesidades, preferencias, gustos y hábitos (Harker, Marsh, Young, Murray, Gunson, & Walker, 2002). El aroma es uno de los factores esenciales para la evaluación de la calidad del fruto y es el resultado de una mezcla compleja de ésteres, alcoholes, aldehídos, compuestos terpenoides, entre otros (Liu, Liu, Yi, Li, & Zhang, 2011).

El aroma es uno de los factores más importantes de atracción de los consumidores y el fortalecimiento del mercado (Liu et al., 2011). Es por ello que el análisis de los compuestos aromáticos juega un papel importante en el proceso de mejoramiento de la calidad del fruto y debido a lo cual los estudios de este tipo de compuestos, así como de los factores que los afectan han ganado importancia poco a poco (Nie, Sun, & Huang, 2004). Cerca de 400 compuestos han sido identificados en productos frescos y elaborados de piña, sin embargo, sólo algunos de ellos son activos en olor y contribuyen al aroma total del fruto (Kader, 1997). El metil butanoato, metil 2-metil butanoato y metil hexanoato son los tres componentes más abundantes y representan el 74 % del total de los volátiles presentes en la piña, mientras que los que contribuyen de

forma activa al olor son metil-2-metil butanoato, etil-2-metil butanoato, hexanoato de etilo y 2,5-dimetil-4-metoxi-3-(2H)-furanona. Estos compuestos volátiles tienden a aumentar tanto en la planta como después de ser cosechados y su concentración depende del cultivar y del estado de madurez del fruto al momento de ser cosechado (Montero-Calderón et al., 2010a).

Cambios en el Contenido de Compuestos Bioactivos durante la Maduración de la Piña

Durante la maduración y senescencia de los frutos, ocurren una serie de complejos procesos de transformación de sus componentes químicos, entre ellos podemos encontrar a los cambios que se dan en el contenido de compuestos bioactivos (vitamina C, β -caroteno y compuestos fenólicos) (Kalt, 2005). Los compuestos bioactivos son sustancias de distinta naturaleza química que tienen actividad biológica dentro del organismo (Zulueta, Esteve, Frasquet, & Frigola, 2007). Están presentes en baja concentración, fundamentalmente en productos de origen vegetal y pueden influir positivamente en el estado de salud del consumidor. Protegen a las células contra el daño oxidativo causado por los radicales libres (Wada & Ou, 2002) y desempeñan un papel importante en la reducción del riesgo de enfermedades crónico-degenerativas (Kalt, Forney, Martin, & Prior, 1999). Por estas propiedades, se les ha relacionado con los efectos benéficos del consumo de frutas y hortalizas, ya que son los responsables de las características antioxidantes de los alimentos de origen vegetal (Prior & Cao, 2000).

Debido a la importancia de los compuestos bioactivos en la salud, todas las investigaciones estaban centradas en evaluar su contenido en diferentes frutos en estado de madurez comercial, dejando a un lado los cambios que se

dan en este tipo de compuestos a lo largo del proceso de maduración y el papel fisiológico que juegan durante dicho proceso. Recientemente se evaluaron los cambios que se dan en el contenido de fenoles totales, flavonoides totales y capacidad antioxidante en papaya “Maradol” (Gayosso-García Sancho, Yahia, Martínez-Téllez, & González-Aguilar, 2010), mango “Ataulfo” (Palafox-Carlos, 2011) y aguacate “Hass” (Villa-Rodriguez, Molina-Corral, Ayala-Zavala, Olivas, & Gonzalez-Aguilar, 2010), respectivamente (**Figura 1a**). El contenido de fenoles totales en papaya “Maradol” disminuyó a medida que avanza el grado de madurez en el fruto, contrario a lo que sucede en mango “Ataulfo” y aguacate “Hass”. En el caso de flavonoides totales, se encontró que su concentración en papaya “Maradol” mostró una tendencia similar a la presentada en fenoles totales, disminuyendo a medida que el fruto pasa del estado verde al maduro. En mango “Ataulfo”, su concentración disminuye durante las primeras etapas de maduración, e incrementa cuando el fruto está totalmente maduro, mientras que en aguacate “Hass” su concentración se incrementa a medida que el fruto madura (**Figura 1b**). Por último, las variaciones en la capacidad antioxidante medida por medio de la técnica de DPPH demuestran que en papaya “Maradol” la capacidad de inhibir a dicho radical disminuye conforme avanza el estado de madurez, mientras que en mango “Ataulfo” y aguacate “Hass” esta capacidad aumenta (**Figura 1c**).

Debido a la controversia existente por investigar cuál de los compuestos bioactivos presenta un mayor potencial antioxidante, Miean y Mohamed (2001) y Martínez-Valverde, Periago, Provan y Chesson (2002) compararon a la vitamina C y carotenos contra los compuestos fenólicos. Dichos autores reportaron que la capacidad antioxidante de la vitamina C está dada por el doble enlace existente entre el carbono 2 y 3 de la pentosa, los carotenos deben su capacidad antioxidante a los dobles enlaces conjugados situados a lo largo de la cadena hidrocarbonada, mientras que la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos es atribuida al número y posición de los grupos

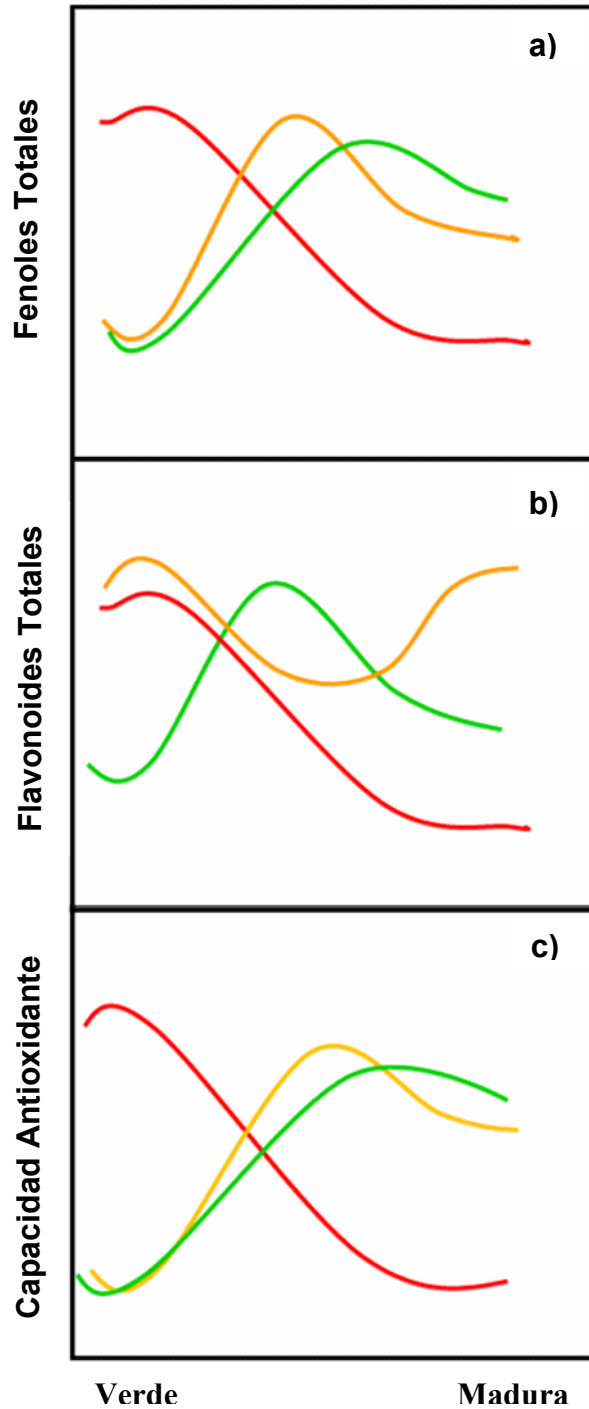


Figura 1. Tendencias en el contenido de Fenoles Totales (a), Flavonoides Totales (b) y Capacidad Antioxidante (c) en **papaya “Maradol”**, **mango “Ataulfo”** y **aguacate “Hass”** durante el proceso de maduración.

hidroxilo en la estructura, así como a la doble ligadura entre los carbonos 2 y 3 del anillo C en el caso de los flavonoides. Por otra parte reportan que tanto la vitamina C como los carotenos tienen la habilidad de donar solamente un electrón por ciclo, mientras que los compuestos fenólicos pueden donar 2 átomos de hidrógeno, protones o electrones por ciclo antes de regenerarse. La vitamina C es de carácter hidrofílico, mientras que los carotenos y compuestos fenólicos son de naturaleza anfipática, la cual les da la propiedad de interactuar con un mayor número de radicales libres. Estos autores concluyen que la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos puede ser hasta 5 veces mayor a la de los carotenos y hasta 20 veces mayor a la presentada por la vitamina C. Cabe mencionar que entre los compuestos bioactivos predominantes en la piña tenemos a la vitamina C, los carotenos y los compuestos fenólicos. Por lo que es de vital importancia conocer el papel que tienen en la contribución a la capacidad antioxidante en los frutos de piña en diferente estado de madurez.

Vitamina C

La vitamina C es una vitamina hidrosoluble sintetizada a partir de glucosa y galactosa en las plantas (Badui, 2006). Tiene una estructura cetona cíclica con seis átomos de carbono y un grupo enediol entre los carbonos 2 y 3 que la hace un agente ácido y altamente reductor (Hernández, Lobo, & González, 2006). Es una molécula muy pequeña, que se absorbe fácilmente y se puede oxidar con gran rapidez, ya que su potencial de oxido-reducción así se lo permite, evitando de este modo que en su presencia, se oxiden otros compuestos. De ahí su gran valor como agente antioxidante (Badui, 2006). En la piña, el contenido de ácido

ascórbico aumenta a medida que el fruto va madurando, encontrándose concentraciones de 20-65 mg/100 g de peso fresco dependiendo del estado de madurez, la radiación solar y la temperatura de almacenamiento (Montero-Calderón et al., 2010b).

Carotenoides

Los carotenoides son pigmentos del grupo de los isoprenoides, solubles en lípidos y caracterizados por su coloración amarilla, naranjada y roja (Kopsell & Kopsell, 2010). Están presentes en los plastidios de las plantas donde ocurre la biosíntesis de los mismos (Burns, Fraser, & Bramley, 2003; Fraser, Truesdale, Bird, Schuch, & Bramley, 1994). Su estructura básica consiste en un tetraterpeno de 40 carbonos, simétrico y lineal formado a partir de ocho unidades isoprenoides de 5 carbonos. Dentro de los carotenoides más importantes se encuentran la luteína, zeaxantina, licopeno, β -criptoxantina, β -caroteno y α -caroteno (Scott & Rodríguez, 2000).

Los carotenoides presentan importantes actividades biológicas (Kopsell & Kopsell, 2010). Entre ellas podemos mencionar a la actividad antioxidante, la estimulación de la comunicación intercelular, el control del crecimiento celular, la diferenciación intercelular del control del crecimiento y la modulación de la respuesta inmune (Krinsky & Johnson, 2005). Su actividad antioxidante se basa en su estructura de dobles enlaces conjugados, que facilita la deslocalización de los electrones a lo largo de la cadena carbonada poliinsaturada, actuando como neutralizadores de radicales libres y de otras especies reactivas de oxígeno (Olmedilla & Granado, 2001).

Los antioxidantes con color (carotenoides y antocianinas) a menudo llegan a su nivel más alto cuando los frutos están en su óptima madurez (Barrett

et al., 2010). Este dramático incremento suele ir acompañado de un ablandamiento de los frutos y disminución de acidez y astringencia, que se traduce en una mejora en general de la palatabilidad. De esta forma, los pigmentos antioxidantes proporcionan una indicación visual de que el fruto está listo para la ingestión y las semillas maduras para la dispersión (Kalt, 2005).

Compuestos fenólicos

Los compuestos polifenólicos constituyen uno de los grupos antioxidantes naturales más abundantes y ampliamente distribuidos en el reino vegetal (Dreosti, 2000). Son producto del metabolismo secundario de las plantas y se encuentran en raíces, tallos, troncos, hojas y frutos (Stevenson & Hurst, 2007). Los animales no somos capaces de sintetizar este tipo de compuestos, así que dependemos fundamentalmente de la ingesta de productos de origen vegetal para incorporar estas sustancias a nuestro organismo (Crespy, Morand, Besson, Cotelle, Vezin, Demigne, & Remesy, 2003). Los polifenoles comprenden un amplio rango de sustancias que poseen uno o más anillos aromáticos conteniendo por lo menos un grupo hidroxilo (Decker, 2009). Se clasifican en cuatro familias en función del número de anillos fenólicos y de los elementos estructurales unidos a ellos: flavonoides, ácidos fenólicos, estilbenos, cumarinas y taninos (**Figura 2**) (Carratú & Sanzini, 2005).

Existen pruebas suficientes que ratifican que varios compuestos fenólicos son antioxidantes muy efectivos y muy superiores a algunas vitaminas (Cieslik, Greda, & Adamus, 2006). La posición -orto- y -para- del grupo hidroxilo de los polifenoles, son las que permiten participar en las reacciones de oxido-reducción. Los fenoles tienen la capacidad de donar protones y electrones, por lo que pueden ser oxidados con facilidad (Naczek & Shahidi, 2004), o bien,

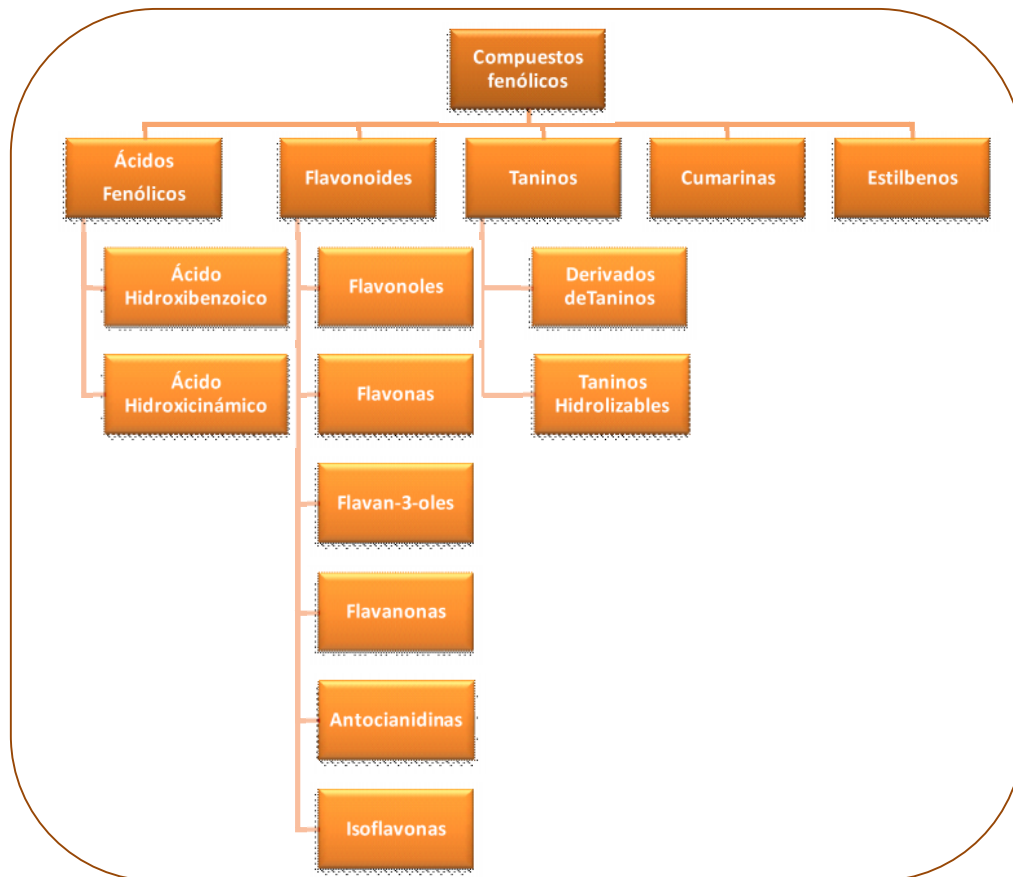


Figura 2. Clasificación de los compuestos fenólicos (Carratú & Sanzini, 2005)

pueden ser donados, logrando así reducir o inactivar una gran diversidad de radicales libres y especies reactivas de oxígeno dañinos para el metabolismo celular (Manach et al., 2005).

Los fenilpropanoides desempeñan funciones importantes en la planta y el fruto. Entre ellas podemos mencionar que ayudan en el soporte mecánico, pues forman parte de la pared celular (lignina), mientras que otros protegen la planta de la nociva radiación solar ultravioleta (UV-B) y la pérdida excesiva de agua, ya que los compuestos fenólicos que contienen suberina y cutina son capaces de producir barreras epidérmicas que reducen al mínimo la pérdida de este líquido. Cierta tipo de estos compuestos atraen a los polinizadores y dispersores de semillas, mientras que otros sirven como señales que inducen reacciones defensivas a factores bióticos o abióticos. Algunos pueden suprimir el crecimiento de las plantas cercanas competidoras, mientras que otros proporcionan protección contra los herbívoros y patógenos (De la Rosa, Álvarez-Parrilla, & González-Aguilar, 2010). Sin embargo, la acumulación de compuestos fenólicos varía fuertemente con el estado fisiológico de la fruta o la planta y es un resultado de un equilibrio entre la biosíntesis y su catabolismo (Morelló, Romero, Ramo, & Motilva, 2005).

La maduración de los frutos es generalmente acompañada de cambios sustanciales en el perfil de antioxidantes fenólicos. Sin embargo, la relación entre la madurez del fruto, el contenido de fenoles y su capacidad antioxidante difiere entre los cultivares (Kalt, 2005). Entre los vegetales y frutos ricos en compuestos fenólicos podemos encontrar a los de hoja verde, amarillos y rojos, como por ejemplo: cebolla, calabaza, brócoli, coliflor, tomate, pimiento, toronja, naranja, fresa, manzana, mango, guayaba, papaya, etc. (Cieslik et al., 2006). En la piña, el contenido de compuestos fenólicos aumenta a medida que el fruto va madurando, encontrándose de 25 a 39 mg/100 g de peso fresco (dependiendo la variedad) y de 37 a 51 mg/100 g de peso fresco durante el almacenamiento a 10 °C (Montero-Calderón et al., 2010b).

Mecanismo de acción antioxidante. El mecanismo a través del cual los compuestos fenólicos ejercen su capacidad antioxidante resulta de la combinación de sus propiedades secuestradoras de radicales libres y quelantes de metales de transición, así como de la inhibición de algunas enzimas (Tulipani, Mezzetti, Capocasa, Bompadre, Beekwilder, de Vos, Capanoglu, Bovy, & Battino, 2008). Lo anterior es debido a las características estructurales de estos compuestos, pues al donar uno o dos átomos de hidrógeno de sus sustituyentes hidroxilos a un radical libre lo estabilizan (**Figura 3**) (Escamilla-Jiménez, Cuevas-Martínez, & Guevara-Fonseca, 2009). Esta acción trae como consecuencia que el compuesto fenólico se convierta en una semiquinona o quinona respectivamente. Este compuesto, posteriormente interactuará con otro radical libre o bien, actuará de manera sinérgica con la vitamina C para regenerarse, de manera que les permita mantener sus funciones antioxidantes durante más tiempo, evitando de esta manera el daño a biomoléculas, como por ejemplo, la peroxidación lipídica, el daño a las bases nitrogenadas del ADN y la oxidación de los aminoácidos de las proteínas (Kähkönen, Heinämäki, Ollilainen, & Heinonen, 2003).

Enzimas involucradas en la biosíntesis y degradación de compuestos fenólicos.

La ruta de los fenilpropanoides es considerada como uno de los caminos metabólicos más importantes en la síntesis de un amplio rango de compuestos naturales. Las enzimas involucradas en la síntesis de estos compuestos son varias, pero la de mayor importancia es PAL (Nugroho, Verberne, & Verpoorte, 2002). Los compuestos fenólicos son susceptibles a la oxidación, reacción catalizada principalmente por enzimas como la PPO y POD, trayendo esto como consecuencia grandes pérdidas económicas en la industria hortofrutícola. Debido a lo anterior las investigaciones se han centrado en evaluar la relación de actividad de PPO y POD con el perfil y contenido de compuestos fenólicos

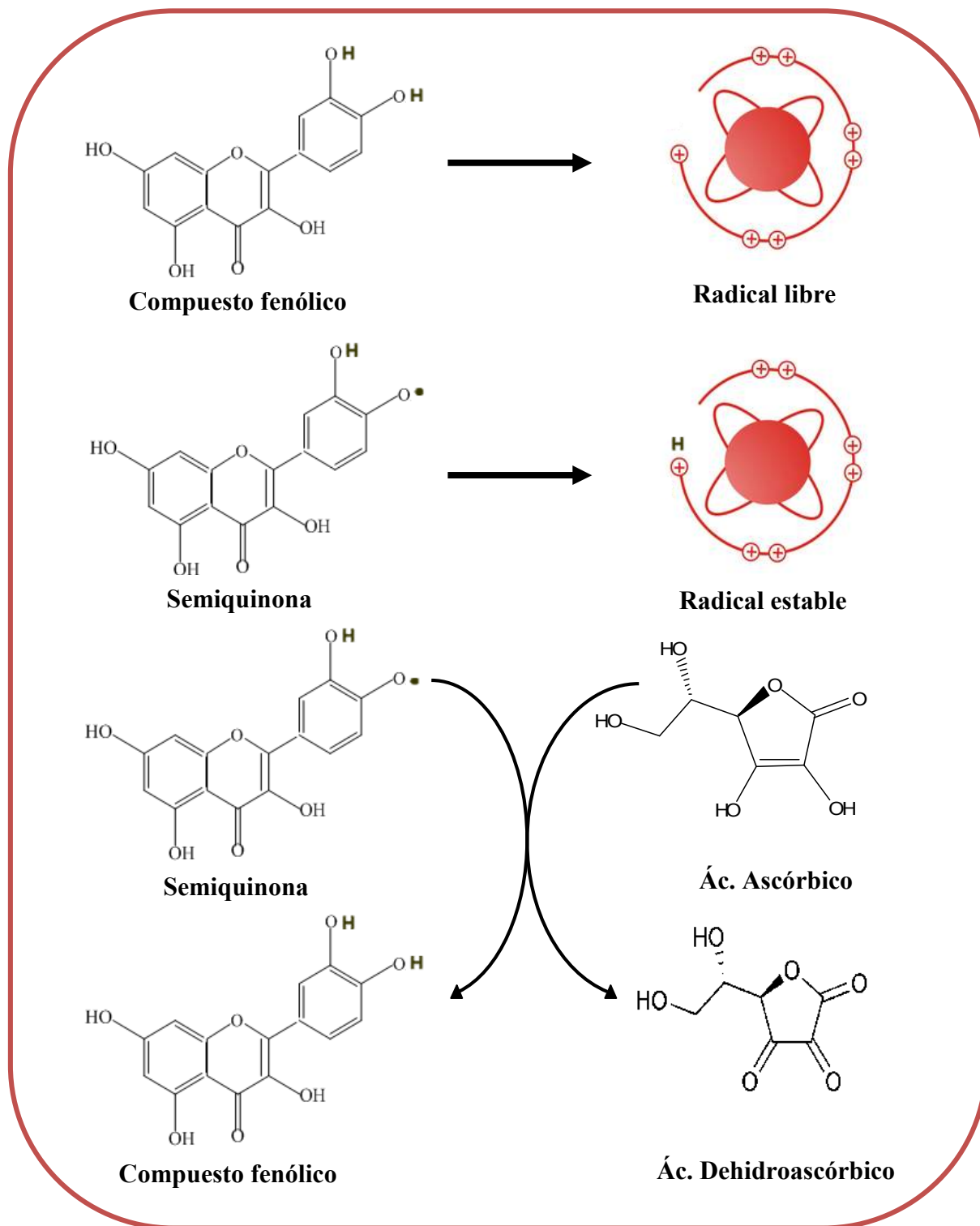


Figura 3. Mecanismo de acción antioxidante de los compuestos fenólicos (Escamilla-Jiménez et al., 2009; Kähkönen et al., 2003).

en los frutos (García-Rodríguez, Romero-Segura, Sanz, Sanchez-Ortiz, & Perez, 2011; Rimbault, Marie-Alphonsine, Horry, Francois-Haugrin, Romuald, & Soler, 2011; Yingsanga, Srilaong, Kanlayanarat, Noichinda, & McGlasson, 2008).

Fenilalanina amonio liasa (PAL). Los precursores de los fenilpropanoides son sintetizados por medio de dos vías básicas: la vía del ácido chiquímico y la vía del ácido mevalónico (**Figura 4**). La primera de éstas produce la mayoría de los compuestos fenólicos en las plantas, mientras que la vía del ácido mevalónico es un importante fuente de compuestos fenólicos en hongos y bacterias, y menos significativa en plantas superiores (De la Rosa et al., 2010). La ruta del chiquimato convierte a los carbohidratos simples en aminoácidos como la fenilalanina y la tirosina, dando lugar con ello a la síntesis de los compuestos fenólicos, la cual forma parte del metabolismo secundario (Limem, Guedon, Hehn, Bourgaud, Chekir Ghedira, Engasser, & Ghoul, 2008).

La reacción que vincula el metabolismo primario y secundario es proporcionada por PAL, la cual es considerada como la enzima clave en el metabolismo de estos compuestos (Assís, Maldonado, Muñoz, Escribano, & Merodio, 2001; Lafuente, Zacarías, Martínez-Téllez, Sanchez-Ballesta, & Granell, 2003). Su actividad depende del suministro del aminoácido fenilalanina, como precursor y de glucosa (Limem et al., 2008). Esta enzima, cataliza el primer paso en la ruta biosintética, desaminando a la L-fenilalanina para formar el ácido trans-cinámico (Nugroho et al., 2002; Roura, Pereyra, & Del Valle, 2008). La actividad de PAL varía con la etapa de desarrollo, así como de las condiciones ambientales, deficiencias nutrimentales y tratamientos herbicidas. Factores bióticos (por ejemplo ataque de patógenos, hongos e insectos) y abióticos (por ejemplo lesiones mecánicas) también pueden aumentar su actividad, así como la síntesis de lignina para el fortalecimiento de la pared

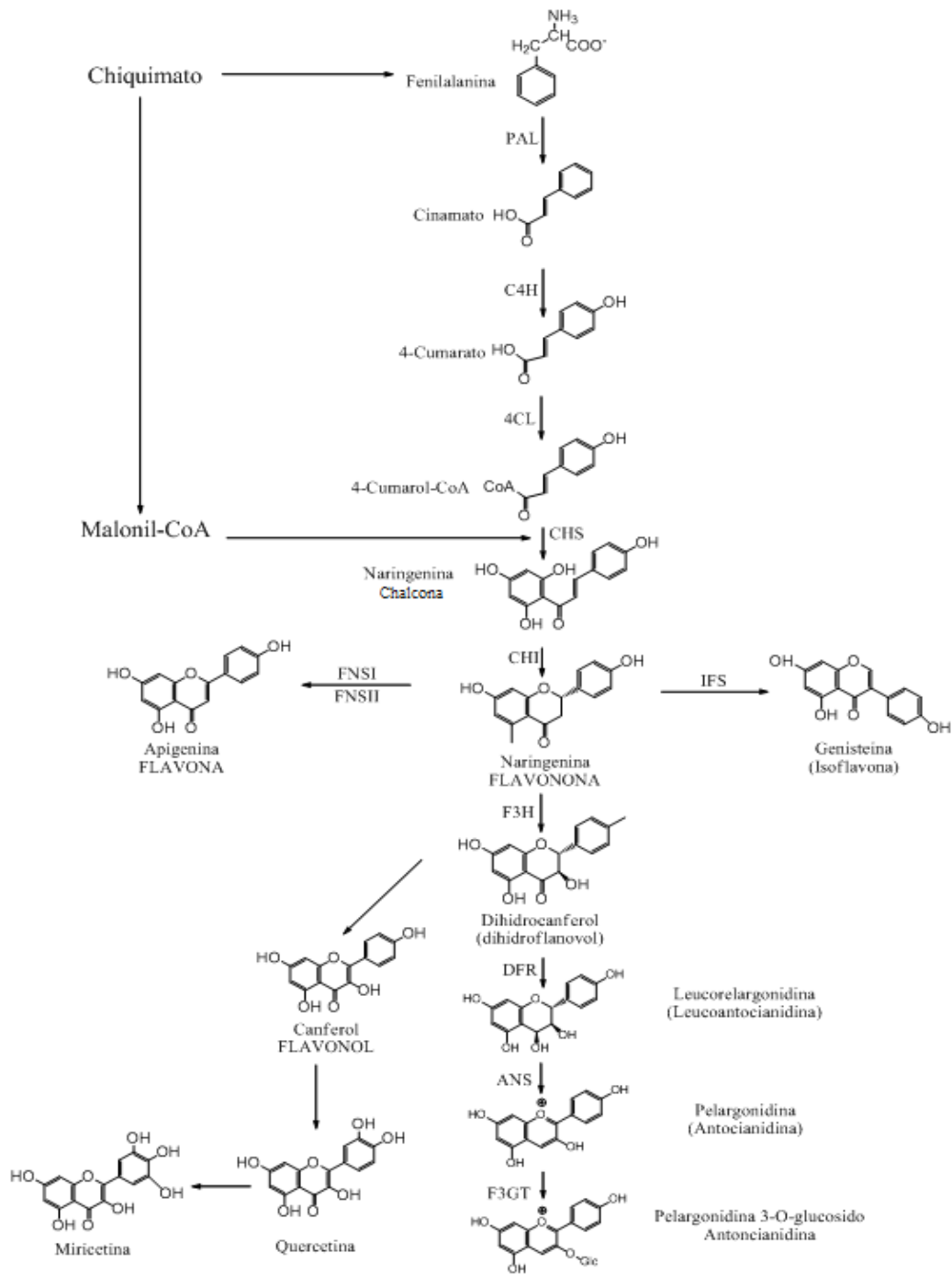


Figura 4. Esquema de la ruta de biosíntesis de los fenilpropanoides (Limem et al., 2008).

secundaria del xilema y la producción de pigmentos para atraer a los polinizadores a las flores (De la Rosa et al., 2010; Morelló et al., 2005). PAL se localiza en el citoplasma, aunque también puede estar asociada a la membrana de algunos organelos y su principal función es ayudar a proteger a la planta o al fruto contra diferentes condiciones de estrés, promoviendo la síntesis de diferentes fenilpropanoides (Nugroho et al., 2002).

Polifenol oxidasa (PPO). La PPO está presente en la mayoría de los tejidos vegetales y en condiciones específicas (procesamiento, daños mecánicos o bajo cierto tipo de estrés) es responsable del oscurecimiento del tejido vegetal (Yoruk & Marshall, 2003). Las reacciones de oscurecimiento en las cuales participa causan deterioro en la calidad de los alimentos debido a los cambios en sus propiedades nutricionales y organolépticas (Bhonwong, Stout, Attajarusit, & Tantasawat, 2009). Estas reacciones disminuyen significativamente la aceptación del fruto por parte de los consumidores, así como el periodo de conservación del alimento y el valor de los productos vegetales.

Al ser los compuestos fenólicos sustratos de la PPO, la degradación de estos afecta el potencial bioactivo de los productos afectados. Es por ello que la oxidación de este tipo de productos ha recibido mucha atención de los investigadores en el campo de la fisiología vegetal y la ciencia de los alimentos (Yoruk & Marshall, 2003). Entre algunos productos vegetales de importancia comercial que son susceptibles a reacciones de oscurecimiento enzimático podemos encontrar a frutas como la manzana, aguacate, plátano, mango, durazno y albaricoque, y vegetales como la berenjena, repollo, lechuga, papa y remolacha (Yoruk & Marshall, 2003).

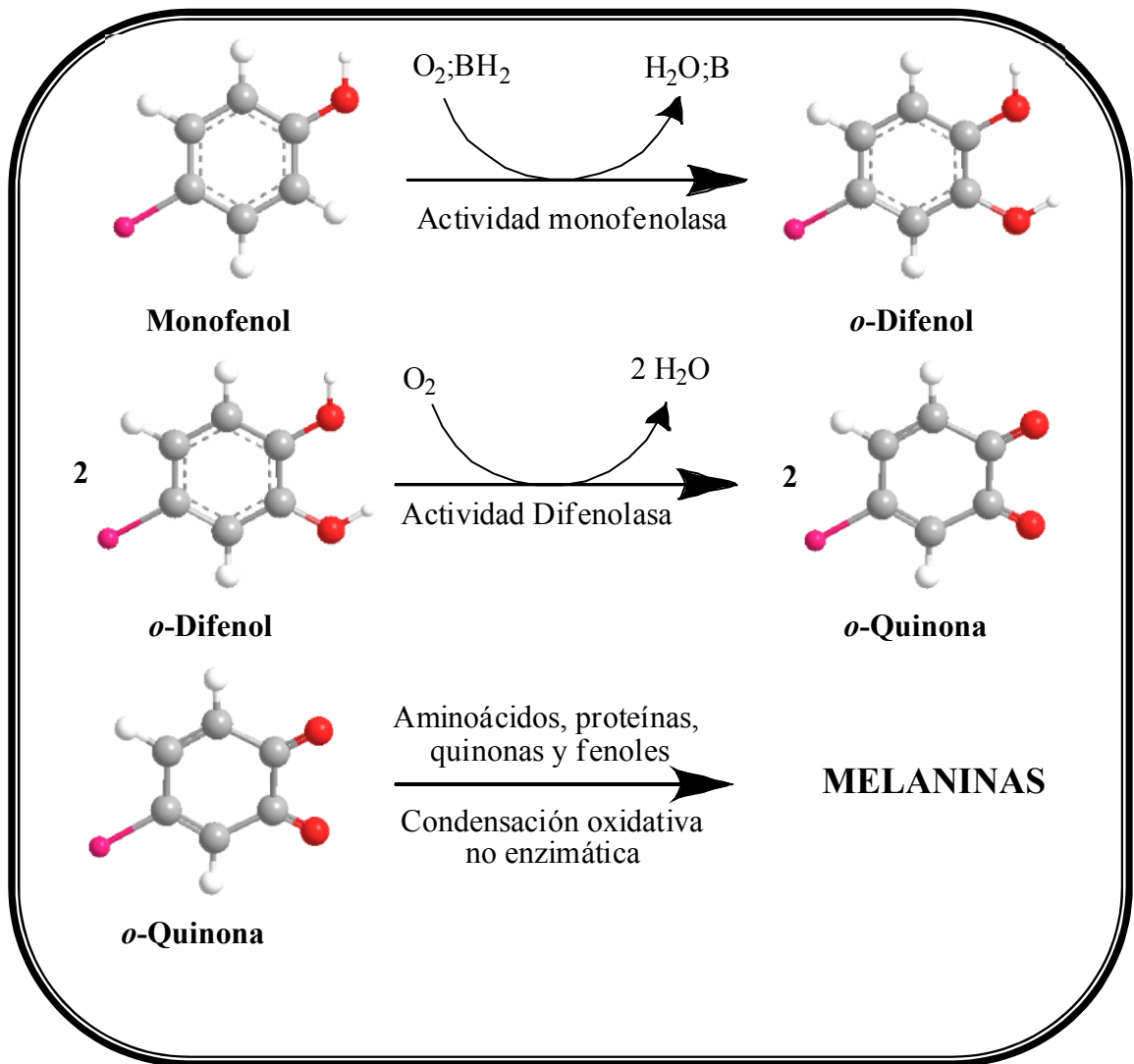


Figura 5. Reacción general de oscurecimiento catalizada por la enzima PPO, a partir de sustratos fenólicos (Yoruk & Marshall, 2003).

Las reacciones simplificadas de la PPO y el subsecuente proceso de condensación no enzimático que involucran la deterioración de los alimentos se muestra en la **Figura 5** (Yoruk & Marshall, 2003). El oscurecimiento enzimático se produce en dos pasos, el primero es la oxidación enzimática de los monofenoles y o-difenoles a o-quinonas, el cual es seguido por reacciones de condensación o polimerización (Bahn, Chung, Shin, Lee, & Hyung, 1999). Se han observado oscurecimientos graves de productos vegetales frescos cortados y en frutos enteros con daños mecánicos debido a la descompartmentalización celular, facilitando el contacto de la PPO con su sustrato y la penetración del oxígeno (Kajiwara, Matsui, Akakabe, Murakawa, & Arai, 2007). Estas reacciones son complejas debido a que la PPO puede reaccionar con un gran número de compuestos monofenólicos y/o difenólicos y a su vez se pueden formar una variedad de productos. Las o-quinonas generadas por la reacción de la PPO con los compuestos fenólicos son muy coloridas (Gui, Wu, Chen, Liao, Hu, Zhang, & Wang, 2006). Sin embargo, el típico color marrón rojizo que caracteriza el oscurecimiento enzimático se debe principalmente a una reacción secundaria no enzimática de las o-quinonas, dando como resultado la formación de polímeros complejos conocidos como melaninas (Yoruk & Marshall, 2003).

Peroxidasa (POD). El oscurecimiento de la pulpa de las frutas es un síntoma común vinculado con la actividad de la PPO y POD (Raimbault et al., 2011). La POD está ampliamente distribuida en las plantas, su asociación con diversos eventos fisiológicos ha sido ampliamente evidenciada, y sus múltiples funciones fisiológicas no han sido totalmente elucidadas (Raimbault et al., 2011). La POD que existen en la célula vegetal es soluble y se encuentra unida a las proteínas de la membrana, está implicada en la biosíntesis de la lignina, ya sea para

desarrollo normal de la planta o para defensa de la misma a través del refuerzo de las paredes celulares en estreses bióticos (Gaspar, Penel, & Grappin, 1991).

Entre otras funciones de defensa, la POD puede participar en la síntesis de compuestos tóxicos como quinonas, las cuales son producidas a partir de la oxidación de compuestos fenólicos en presencia de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y en la regulación de los niveles de éste último compuesto dentro de la célula (García-Rodríguez et al., 2011). El H_2O_2 puede producir especies de oxígeno reactivo (ROS) durante la defensa de la planta (durante una reacción de hipersensibilidad, por ejemplo, lo que lleva a la muerte celular), pero también es considerado como una de las moléculas de señalización temprana en la resistencia sistémica de la misma (Parent, Capelli, & Dat, 2008). La POD está involucrada en la regulación del crecimiento de la planta a través de la regulación hormonal y el aumento en su actividad suele asociarse con lesiones, heridas y la resistencia a enfermedades (Raimbault et al., 2011; Yingsanga et al., 2008).

Contribución de los Compuestos Bioactivos a la Capacidad Antioxidante

La capacidad antioxidante total de un fruto depende de tres factores: la actividad antirradical, la actividad enzimática y la habilidad para quelar iones metálicos. En el caso de las frutas y hortalizas, la actividad antioxidante se expresa en términos de su actividad antirradical, pues es ésta la que no permite que se lleve a cabo la formación de radicales libres. Cada uno de los compuestos bioactivos tiene diferente capacidad antioxidante y por lo tanto, contribuyen en diferente proporción a la capacidad antioxidante antirradical (Miean & Mohamed, 2001).

Robles-Sánchez (2008), evaluó la contribución de vitamina C, vitamina E y β -caroteno a la capacidad antioxidante de cinco frutos tropicales. Los frutos evaluados fueron: piña “Cayena”, plátano “Portalimón”, mango “Kent”, papaya “Maradol” y mango “Ataulfo”. La piña “Cayena” presentó una capacidad antioxidante de 170 μ mET/100 g de peso fresco, de la cual el 21 % fue contribuido por la vitamina C, el 22 % por la vitamina E y el 12 % por β -caroteno. Lo anterior nos hace pensar que el 45 % restante podría deberse a la contribución de los compuestos fenólicos, aún cuando estos compuestos se encuentran a concentraciones bajas en la etapa de madurez comercial. Resultados similares se pudieron observar en plátano “Portalimón” y mango “Kent”, donde al parecer la mayor contribución a la capacidad antioxidante fue aportada por los compuesto fenólicos, mientras que en papaya “Maradol” y mango “Ataulfo” la vitamina C contribuyó con más del 50 % de la capacidad antioxidante.

Hasta el momento no se han encontrado trabajos en los cuales se reporten los cambios en el contenido de compuestos bioactivos, así como en la capacidad antioxidante durante la maduración de la piña cv. “Esmeralda”, solamente hay reportes para frutos en estado de madurez comercial. Debido a lo anterior nos hemos planteado estudiar si el contenido de compuestos bioactivos (compuestos fenólicos, vitamina C y β -caroteno) aumenta a lo largo del proceso de maduración de la piña y cómo contribuye cada grupo a la capacidad antioxidante total del fruto.

HIPÓTESIS

La piña cv. “Esmeralda” contiene compuestos fenólicos característicos que varían con la maduración del fruto, los cuales contribuyen en mayor proporción a la capacidad antioxidante (antirradical) que otros compuestos bioactivos (vitamina C y carotenoides).

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar los cambios en el contenido de compuestos fenólicos y su relación con la actividad antioxidante (antirradical) durante la maduración de piña cv. “Esmeralda”.

Objetivos Específicos

- Caracterizar fisiológica y fisicoquímicamente cuatro estados de madurez de piña cv. “Esmeralda”.
- Evaluar los cambios en el contenido de compuestos fenólicos, vitamina C y carotenoides durante la maduración de la piña.
- Evaluar la capacidad antioxidante, en términos de actividad antirradical, de cada uno de los grupos de compuestos bioactivos de piña y su contribución al potencial antioxidante.
- Evaluar la actividad de las enzimas PAL, PPO y POD de piña en los diferentes estados de madurez.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia Prima

En este estudio se utilizaron frutos de piña (*Ananas Comosus*) cv. “Esmeralda”, los cuales fueron cosechados en diferentes estados de madurez (EM) en el municipio de Ruíz, Nayarit. Estos, se transportaron el mismo día al laboratorio de biotecnología de alimentos del Instituto Tecnológico de Tepic. Los frutos se sanitizaron con cloro a 200 ppm durante 3 min y se dejaron secar a temperatura ambiente. Los frutos libres de defectos y daños mecánicos se seleccionaron y se separaron en cuatro EM de acuerdo a su peso, tamaño y al porcentaje de ojos amarillos presentes en la cáscara del fruto. El EM1 fueron frutos con la cáscara 100 % verde, el EM2 fueron frutos que tenían entre un 25-30 % de ojos amarillos, el EM3 fueron frutos con un 70-75 % de ojos amarillos, mientras que el EM4 fueron frutos con la cáscara 100 % amarilla (**Figura 6**). Se tomaron 5 frutos de cada estado de madurez para llevar a cabo su caracterización fisiológica (SST, AT, pH, jugosidad, color, producción de CO₂ y etileno). Además, se tomaron muestras de pulpa (descartando el corazón) de cada estado, las cuales se envasaron, se almacenaron a -80 °C, se liofilizaron y se almacenaron a -30 °C hasta su análisis. Posteriormente se tomaron muestras para evaluar el contenido de compuestos bioactivos, actividad antioxidante y actividad de las enzimas involucradas en la biosíntesis y degradación de compuestos fenólicos.



Figura 6. Estados de Madurez muestreados en piña “Esmeralda”.

Caracterización Fisiológica

Producción de CO₂ y Etileno

Para medir la producción de CO₂ y etileno (C₂H₄) se utilizaron 3 frutos de 2.5 Kg aproximadamente por estado de madurez, los cuales se colocaron individualmente en contenedores de plástico de 11.8 L y se sellaron herméticamente durante 2 h a una temperatura de 20 °C. Posteriormente se tomó una muestra de 1 mL del espacio de cabeza del envase, utilizando una jeringa hipodérmica y se inyectó a un cromatógrafo de gases (Varian Star 3400) con un detector de ionización de flama (FID) y conductividad térmica (TCD). Se utilizó una columna Haysep-N de 2 m de longitud con un diámetro interno de 1/8" y N₂ como gas acarreador. Las condiciones de la corrida fueron: temperatura de la columna (50 °C), temperatura del TCD (170 °C), temperatura del filamento (205 °C) y temperatura del inyector (70 °C) (Watada & Massie, 1981). Las condiciones de los estándares fueron: O₂, 5 %; CO₂, 5 % y 1 ppm de C₂H₄. Para determinar la concentración de cada gas, se integró el área bajo la curva y se compararon con las áreas de los estándares conocidos. Las fórmulas empleadas fueron las siguientes:

$$\text{mL CO}_2/\text{Kgh} = \frac{(\text{Am}) (\text{Cge}) (\text{Vec})}{(\text{Ae}) (\text{Pf}) (\text{Ti})}$$

$$\mu\text{L C}_2\text{H}_4/\text{Kgh} = \frac{(\text{Am}) (\text{Cge}) (\text{Vec})}{(\text{Ae}) (\text{Pf}) (\text{Ti})}$$

Donde:

A_m = Área de la muestra (cm^2)

C_{ge} = Concentración del gas estándar, 1 % etileno y 15 % CO_2

V_{ec} = Volumen del espacio de cabeza (L)

A_e = Área del estándar (cm^2)

P_f = Peso del fruto (Kg)

T_i = Tiempo de incubación (h)

Color (L, a^* y b^*)

Los parámetros de color (L, a^* y b^*) fueron medidos en la superficie de la pulpa de piña utilizando un colorímetro Minolta CR-300. El valor "L" representa colores negros u opacos (0) y colores blancos o de máxima brillantez (100). El valor de a^* va de la escala positiva a la negativa siendo el rojo el máximo cuando los valores son positivos, gris cuando es cero y verde cuando es mínimo o si los valores son negativos. El valor b^* , determina el color amarillo si los valores son positivos, gris cuando es cero y azul cuando es negativo. Se evaluaron cuatro estados de madurez (36 mediciones por estado).

Sólidos Solubles Totales (SST), Acidez Titulable (AT) y pH

Los SST se midieron de manera directa en un refractómetro digital Abbe (Modelo 10450) a 25 °C; colocando una gota de jugo de piña en el equipo, el cual fue previamente calibrado con una gota de agua destilada, para medir el

índice de refracción de la muestra en función de los sólidos solubles presentes. La concentración de SST fue expresada en °Brix.

La AT (%) fue evaluada de acuerdo a la metodología propuesta por la Asociación Oficial de Químicos Agrícolas (AOAC, 1990). La determinación se llevó a cabo a partir de una alícuota de 10 mL de jugo de piña, el cual se homogenizó en 50 mL de agua destilada. La medición de pH y acidez titulable se efectuó directamente del homogenizado, los cuáles se evaluaron con una solución de NaOH 0.1 N en un titulador automático Mettler (Modelo DL21). Se realizaron 3 repeticiones por estado de madurez. La acidez titulable fue expresada en % de ácido cítrico.

Jugosidad

Para medir la jugosidad se empleó el método descrito por Carlin (1990). Se emplearon 9 rodajas de piña por estado de madurez, cada rodaja fue pesada y colocada entre dos papeles Whatman No. 1, posteriormente se le aplicó una fuerza de 2 Kg durante 10 s y se pesó de nuevo. Para calcular el porcentaje de jugosidad se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Jugosidad} = \frac{\text{peso inicial} - \text{peso final}}{\text{peso inicial}} \times 100$$

Compuestos Bioactivos

Determinación de Vitamina C

El contenido de vitamina C fue medido de acuerdo al método descrito por Doner y Hicks (1981). Para la extracción se utilizaron 0.2 g de muestra liofilizada, los cuales se homogenizaron por 1 min con 10 mL de una solución de ácido acético glacial y ácido metafosfórico (Sigma Chemical Co.) (80 mL/30g/L). Posteriormente, se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 min a 4 °C en una centrífuga Beckman Coulter, Allegra 64R. El sobrenadante se filtró en papel filtro de 22 µm y se inyectó a un equipo de Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) Varian 9050. Se empleó una columna Waters-NH₂ tipo µBondapak de 3.9 x 300 mm de diámetro y longitud, con 10 µm de tamaño de partícula. Se utilizó una velocidad de flujo de 1.5 mL/min y una fase móvil acetonitrilo-fosfato de potasio 1M (75:25 v/v) (J.T Baker, Mex; Sigma Chemical Co.). La detección se realizó con un detector UV-VIS Varian 9050, a una longitud de onda de 268 nm. Para determinar la concentración de ácido ascórbico, se integró el área bajo la curva y se comparó con las áreas de estándares conocidos. Se realizaron 9 repeticiones por estado de madurez. Los resultados fueron expresados en mg de ácido ascórbico/Kg de peso fresco.

Determinación de β -caroteno

El contenido de β -caroteno fue medido de acuerdo al método descrito por Mejía et al. (1988). Para la extracción se utilizaron 0.2 g de muestra liofilizada, los cuales se homogenizaron por 1 min con 5 mL de una solución de tetrahidrofurano (THF; J.T Baker, Mex), estabilizado con 0.01 % de Butilhidroxitolueno (BHT; Sigma Chemical Co.). Posteriormente, se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 min a 4 °C en una centrífuga Beckman Coulter, Allegra 64R. El sobrenadante se filtró en papel filtro de 22 μ m y se inyectó a un equipo de Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) Varian 9050. Se empleó una columna Microsorb RPO-C18 de 3.9 x 300 mm de diámetro y longitud, con 10 μ m de tamaño de partícula. Se utilizó una velocidad de flujo de 1 mL/min y una fase móvil acetonitrilo-metanol-tetrahidrofurano (58:35:7 v/v/v) (J.T. Baker, Mex). La detección se realizó con un detector UV-VIS Varian 9050, a una longitud de onda de 460 nm. Para determinar la concentración de β -caroteno, se integró el área bajo la curva y se comparó con las áreas de estándares conocidos. Se realizaron 9 repeticiones por estado de madurez. Los resultados fueron expresados en μ g de β -caroteno/Kg de peso fresco.

Determinación de compuestos fenólicos

Preparación de extractos hidrofílicos y lipofílicos. La preparación del extracto hidrofílico se realizó a partir de la pulpa de piña cv. “Esmeralda” previamente liofilizada. Un g de muestra de cada estado de madurez (balanza analítica PR 2003 Deltarange) se homogeneizó (Homogenizador IKA, ultra Turrax, USA) en 20 mL de metanol al 80 % (J.T. Baker, Mex), el homogenizado se colocó en un

sonicador (Branson 2510, USA) por 30 min y se centrifugó (Centrifuga Beckman Coulter, Allegra 64R, USA) a 14, 000 rpm durante 15 min a 4 °C. Se dieron 2 lavados adicionales con 10 mL de metanol 80 %, colectando el sobrenadante para ser filtrado en papel Whatman No. 1. Finalmente el extracto obtenido fue aforado a un volumen de 30 mL con metanol 80 % (concentración del extracto = 0.033 mg/mL) y almacenado a -20° C hasta su uso en las determinaciones de fenoles totales, flavonoides totales y capacidad antioxidante.

Para la elaboración del extracto lipofílico se siguió el mismo procedimiento descrito con anterioridad, con la variante de que en lugar de metanol 80% se utilizó acetona pura (Fermont, Mex) y β -metilciclodextrina (Sigma Chemical Co.) que fue solamente utilizado en las técnicas de capacidad antioxidante.

Fenoles totales. El contenido de fenoles totales se realizó de acuerdo al método descrito por Singleton y Rossi (1965) con algunas modificaciones. Las mediciones se realizaron en un espectrofotómetro UV-VIS Varian Cary 50 Bio a una longitud de onda de 765 nm, reportando los resultados como mg de equivalentes de ácido gálico (EAG)/100 g peso fresco.

Flavonoides totales. La determinación de flavonoides totales se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Zhishen et al. (1999) con algunas modificaciones. Se utilizó un espectrofotómetro UV-Visible Varian Cary 50 Bio a una longitud de onda de 415 nm. Los resultados se expresaron como mg de equivalentes de quercetina (EQ)/100 g peso fresco.

Capacidad Antioxidante

DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidracil)

La capacidad de los extractos de piña para inactivar al radical estable DPPH fue calculada de acuerdo al método propuesto por Brand-Williams, Cuvelier y Berset (1995). La solución stock fue preparada mezclando 2.5 mg de radical DPPH con 100 mL de metanol puro. La solución fue ajustada a una absorbancia de 0.7 ± 0.02 a 515 nm. La reacción se llevó a cabo con 3.9 mL de radical DPPH y 100 μ L de extracto (metanol al 80% fue utilizado como blanco). La mezcla se agitó y posteriormente se dejó reposando en la oscuridad durante 30 min. La reducción del radical se determinó a 515 nm en un espectrofotómetro UV-Vis Varian Cary 50 Bio. La actividad se expresó como % de inhibición del radical DPPH.

TEAC (Capacidad Antioxidante en Equivalentes Trolox)

El valor de TEAC se determinó de acuerdo a la técnica seguida por Pellegrini et al. (1999), la cual se basa en probar la habilidad de la capacidad los extractos de piña para inactivar el radical ABTS^{•+} (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)). La reducción del radical fue monitoreada a 734 nm de absorbancia en un espectrofotómetro UV-Vis Varian Cary 50 Bio. Para la determinación se preparó una curva de calibración de Trolox (análogo liposoluble de la vitamina E). El valor final de TEAC fue calculado usando una ecuación de regresión entre la concentración de Trolox y el porcentaje de

inhibición. Los valores generados fueron reportados como μ moles de equivalentes trolox (ET)/100 g de peso fresco.

Perfil de Compuestos Fenólicos

Para la extracción de los compuestos fenólicos se utilizó la metodología propuesta por Wolfe et al. (2003). Después de haber utilizado esta extracción se hidrolizaron los extractos crudos, por medio de una hidrólisis ácida que consistió en poner el extracto crudo en relación 1:1 con ácido clorhídrico (2.4 N) (Aldrich Chemical Co.), a 80 °C por 2 h. Una vez terminado este tiempo el hidrolizado se filtró en membranas de 0.45 μ m y se inyectaron en el HPLC.

Se utilizó el método propuesto por Rivera-Pastrana et al (2010) con algunas modificaciones. Se inyectaron 20 μ L de extracto filtrado con una membrana de nylon de 0.45 μ m a un cromatógrafo de líquidos de alta resolución con detector de arreglo de diodos (CLAR-DAD marca Hewlett-Packard series 1100), provisto con un inyector automático, sistema de bombeo cuaternario y sistema de desgasificación automática. Se utilizó una columna XTERRA con dimensiones de 250 x 4.6 mm diámetro interno (Waters). La columna fue mantenida a una temperatura de 25 °C. Se registró la absorbancia a 280 y 320 nm. Se utilizó como fase móvil una mezcla de ácido fórmico 1 % en agua v/v (A) y acetonitrilo (B) a un flujo de 0.5 mL/min. El método inició con 2 % de (B), seguido por un gradiente lineal de 2 % (B) a 100 % B en 60 min y después 100 % (B) a 100 % de (B) en 10 min y finalmente un gradiente lineal de 100 % B a 2 % de B en 5 min. Los resultados fueron monitoreados usando HP ChemStation software versión A.06.03 (Hewlett-Packard/Agilent Technologies Co., Palo Alto. CA). El contenido de compuestos fenólicos fue calculado usando

curvas de calibración de estándares puros y fueron expresados como mg/g de peso seco.

Contribución de Compuestos Bioactivos a la Capacidad Antioxidante

Para determinar la contribución a la capacidad antioxidante de los compuestos bioactivos fue necesario tomar en cuenta cada uno de los compuestos identificados (vitamina C, β -caroteno y principales compuestos fenólicos), así como su concentración en los diferentes estados de madurez. Las concentraciones de los compuestos de carácter hidrofílico (vitamina C y compuestos fenólicos) fueron divididas entre 30 (mL de metanol 80 % a los que se aforó el extracto con el que midió la capacidad antioxidante), mientras que las concentraciones de β -caroteno se dividieron entre 10 (mL de acetona pura a los cuales se aforó el extracto con el que se midió capacidad antioxidante lipofílica), lo anterior se hizo con el fin de conocer la concentración en los diferentes EM de cada compuesto en el extracto. Posteriormente, tomando en cuenta la concentración mayor de cada compuesto bioactivo se preparó una solución madre con estándar a partir de la cual se hicieron las diluciones correspondientes. Una vez hecho lo anterior se evaluó la capacidad antioxidante de las diferentes concentraciones de compuestos bioactivos por medio de la técnica de DPPH. Para conocer el % de contribución de cada compuesto bioactivo en los cuatro estados de madurez se sumó la capacidad antioxidante presentada por los extractos hidrofílicos y lipofílicos, obteniéndose la capacidad antioxidante total (antirradical), sustituyéndose los resultados en la siguiente fórmula:

$$\text{Contribución a la CAT (\%)} = \frac{\text{CAT} - \text{PICB}}{\text{CAT}} \times 100$$

Donde:

CAT = Capacidad antioxidante total (%)

PICB = Porcentaje de inhibición del compuesto bioactivo

Enzimas Involucradas en la Biosíntesis y Degradación de Compuestos
Fenólicos

Ensayo de Actividad de PAL

La actividad de PAL fue medida de acuerdo a la técnica descrita por Ke y Salveit (1986) con ligeras modificaciones. Para cada repetición se pesaron 0.2 g de pulpa de piña liofilizada la cual se mezcló con 0.2 g de polivinilpirrolidona (PVPP; Sigma Chemical Co.) y se homogeneizó en 25 mL de buffer de borato 50 mM frío (pH 8.5) a baja velocidad hasta obtener una consistencia uniforme. El buffer de borato era una mezcla de ácido bórico (Sigma Chemical Co.) e hidróxido de sodio (Sigma Chemical Co.) en agua deionizada conteniendo 400 µL de 2-mercaptoetanol (Sigma Chemical Co.) por 1 L de buffer. Los extractos se centrifugaron a 21 000 rpm (Centrifuga Beckman Coulter, Allegra 64R, USA) por 15 min a 4 °C. A lo largo del análisis, los extractos de las muestras se mantuvieron en hielo y en condiciones de oscuridad. Después de la centrifugación, el sobrenadante claro se filtró en papel Whatman No. 1, se recogió y se incubó durante 5 min en un baño de agua a 40 °C. La reacción

consistió en 1.9 mL de extracto enzimático y 100 μ L de fenilalanina 100 mM (Sigma Chemical Co.) como sustrato, los cuales se colocaron en tubos de vidrio y se incubaron durante 1 h en un baño de agua a 40 °C. La actividad de PAL fue medida a 290 nm (utilizando buffer y fenilalanina como blanco) y cuantificada como μ moles de ácido t-cinámico/h g tejido fresco. Se calculó utilizando una curva estándar desarrollada para el ácido t-cinámico (Sigma Chemical Co.) en buffer de borato.

Ensayo de Actividad de PPO

Se realizaron determinaciones de la actividad específica de PPO a partir de polvos de acetona, con el fin de eliminar los pigmentos, fenoles y otros compuestos que pueden interferir en el análisis.

Para la obtención de los polvos de acetona se pesaron 0.4 g de muestra liofilizada, los cuales se homogenizaron durante 30 s (Homogenizador IKA, ultra Turrax, USA) con 30 mL de acetona fría (-20 °C) (Fermont, Mex). El homogenizado se filtró en papel Whatman No. 1 y se lavó una vez más haciendo pasar acetona fría a través del embudo. Al final se obtuvo un polvo fino color crema. Posteriormente, se dejó secar por 1 h y se almacenó a una temperatura de -30 °C, hasta su análisis.

Para determinar la actividad de PPO se basó en el método descrito por Flurkey y Jen (1978) y Das et al. (1997). Se realizaron extracciones enzimáticas a partir de la reacción de 0.2 g de polvo de acetona, 1 % de PVPP (Sigma Chemical Co.) con cloruro de potasio 1M (pH=7) (Fisher Chemical Co.) y 20 μ L de fluoruro de metano sulfonilo (PMSF; Sigma-Aldrich Co.) como inhibidor de las proteasas presentes. El proceso de extracción se efectuó a 4 °C con agitación continua por 60 min en un agitador de alícuotas (Thermolyne Speci-

Mix, Barnstead-Thermolyne, USA). Posteriormente, se centrifugó a 0 °C por 30 min y se filtró en papel Whatman No. 1. El filtrado se incubó por 60 min a 25 °C. El cambio en la absorbancia se basó en la oxidación de un sustrato fenólico, catecol 0.5 M (Sigma Chemical Co.), disuelto en un buffer de citrato 0.1 M (pH=5) (Sigma Chemical Co.), la reacción se llevó a cabo con 150 µL del extracto enzimático + 850 µL de sustrato a 420 nm en un espectrofotómetro UV-Vis Varian Cary 50 Bio. 1 unidad actividad (UA) se definió como el cambio de 0.001 unidades de absorbancia/min. Los resultados de la actividad específica se expresaron como UA/mg de proteína, que para fines prácticos se mencionó como unidades de PPO. La concentración de proteína se determinó de acuerdo al método descrito por Bradford (1976). Se empleó albúmina de suero bovino (BSA; Sigma Chemical Co.) como estándar de calibración a 595 nm.

Ensayo de Actividad de POD

La actividad de POD fue determinada de acuerdo a la metodología descrita por Pérez-Tello et al. (2009) con algunas modificaciones. La enzima fue extraída a partir de 0.2 g de polvos de acetona y homogenizada (Homogenizador IKA, ultra Turrax, USA) en 5 mL de Tris-ácido clorhídrico 0.1 M, pH = 8.8 (Sigma Chemical Co.), conteniendo 5 mM β-mercaptoetanol (Sigma Chemical Co.). La mezcla fue agitada (Thermolyne Speci-Mix, Barnstead-Thermolyne, USA) por 20 min a 4 °C y centrifugada (Centrifuga Beckman Coulter, Allegra 64R, USA) por 30 min a 12 000 rpm a 4 °C. La actividad de POD fue medida a 470 nm por 2 min a 30 °C. La reacción se llevó a cabo en 2.15 mL de acetato de sodio 10 mM (pH=5.3) (Sigma Chemical Co) conteniendo 0.5 % de guayacol (Sigma Chemical Co.), 0.24 mL de H₂O₂ 0.1 % (Sigma Chemical Co.) y 0.1 mL de

extracto enzimático. La actividad específica de POD fue reportada como la descomposición de 1 μmol de guayacol/min mg de proteína.

Análisis de los Datos

El diseño experimental consistió en un ANOVA de una vía (factores = estados de madurez). La comparación de medias se realizó por medio de la prueba de Duncan a una $p \leq 0.05$. Se utilizó el paquete estadístico NCSS 2007.

RESULTADOS

Caracterización Fisicoquímica

La mayoría de los parámetros evaluados en la caracterización fisicoquímica de piña cv. “Esmeralda” tuvieron variaciones significativas ($p < 0.05$) a lo largo del proceso de maduración, con excepción del pH (**Tabla 1**). Los cambios más importantes se presentaron en la acidez titulable y los valores L^* y b^* en el color de la pulpa. El porcentaje (%) de ácido cítrico varió de 0.47 a 1.02 del EM1 al EM4, respectivamente. Mientras que los valores de L^* fueron disminuyendo, resultado de la pérdida de luminosidad y un aumento en color amarillo (b^*) característico de la pulpa de la piña durante la maduración.

Se ha reportado que la jugosidad es una medida confiable del contenido de jugo y frescura de los frutos de piña, ya que la mayor retención de agua y solutos, favorecen los atributos de calidad organoléptica y nutrimental del producto fresco (Montero-Calderón & Cerdas-Araya, 2009). En el presente estudio se observó que la jugosidad (%) aumentó paulatinamente a medida que el fruto pasaba del estado verde (EM1) al maduro (EM4). Lo anterior se relaciona con una menor capacidad de retención de agua del fruto como consecuencia de los cambios químicos de los principales componentes de la pared celular (celulosa, hemicelulosa y pectina) que se dan durante la maduración (Sams, Conway, Abbott, Lewis, & Ben-Shalom, 1993). De esta forma el agua y otros solutos se liberan, proporcionando una mayor sensación de frescura del fruto.

La piña es un fruto no climatérico, por lo que tiene que ser cosechado una vez que esté lista para ser consumida (Hernández et al., 2007). Los frutos

Tabla 1. Caracterización fisiológica de pulpa de piña cv. “Esmeralda” en cuatro estados de madurez.

Parámetro	Estado de Madurez			
	1	2	3	4
Fisicoquímico				
SST (%)	14.86 ^a	16.53 ^c	16.40 ^{bc}	16.12 ^b
Acidez Titulable (% Ácido cítrico)	0.47 ^a	0.63 ^b	0.88 ^c	1.02 ^d
Jugosidad (%)	3.006 ^a	4.029 ^{ab}	4.729 ^{ab}	5.568 ^b
pH	3.82 ^a	4.03 ^a	3.93 ^a	3.91 ^a
CO ₂ (mL/Kg h)	25.39 ^a	29.31 ^b	26.27 ^{ab}	28.36 ^{ab}
Color				
L*	68.52 ^d	66.60 ^c	64.66 ^b	62.59 ^a
a*	-3.66 ^c	-4.84 ^a	-4.57 ^b	-4.88 ^a
b*	17.78 ^a	24.37 ^b	26.17 ^c	28.99 ^d

Diferente literal en el mismo renglón indica diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las medias, $n=12$.

muestreados y utilizados en este trabajo fueron elegidos en cuatro estados de madurez diferentes a partir de la madurez fisiológica, sin embargo, los valores de SST y acidez titulable se encontraron dentro de los parámetros establecidos en el índice de calidad comestible de frutos de piña propuestos por Kader (2009) (SST=10-18 % y acidez titulable=0.4-1.2 % de ácido cítrico), mismos que coinciden con lo reportado para las variedades “Cayena”, “Gold” y “Premium Select” (Marrero & Kader, 2006; Montero-Calderón et al., 2010b) .

Compuestos Bioactivos

Vitamina C

La **Figura 7** muestra el contenido de vitamina C en pulpa de piña cv. “Esmeralda” en cuatro estados de madurez. Se puede observar que la concentración de vitamina C aumentó durante las primeras etapas de maduración, alcanzando una concentración máxima en el EM3 con 481.27 mg ác. ascórbico/Kg de peso fresco y posteriormente disminuir en el EM4 (241.40 mg ác. ascórbico/Kg de peso fresco). Hasta el momento no se habían reportado los cambios en el contenido de vitamina C, así como la de otros compuestos bioactivos y su capacidad antioxidante a lo largo del proceso de maduración en esta variedad de piña. Solamente hay reportes para frutos en estado de madurez comercial (para fines de comparación, en este estudio se tomaron en cuenta los valores presentados en el EM3, que es generalmente el estado de madurez en el cual se comercializa este fruto). Sin embargo el contenido de vitamina C en piña “Esmeralda” es superior a los reportados para las variedades “Gold”, “Phulae”, “Nanglae” con 333, 188 y 64.5 mg ác. ascórbico/Kg

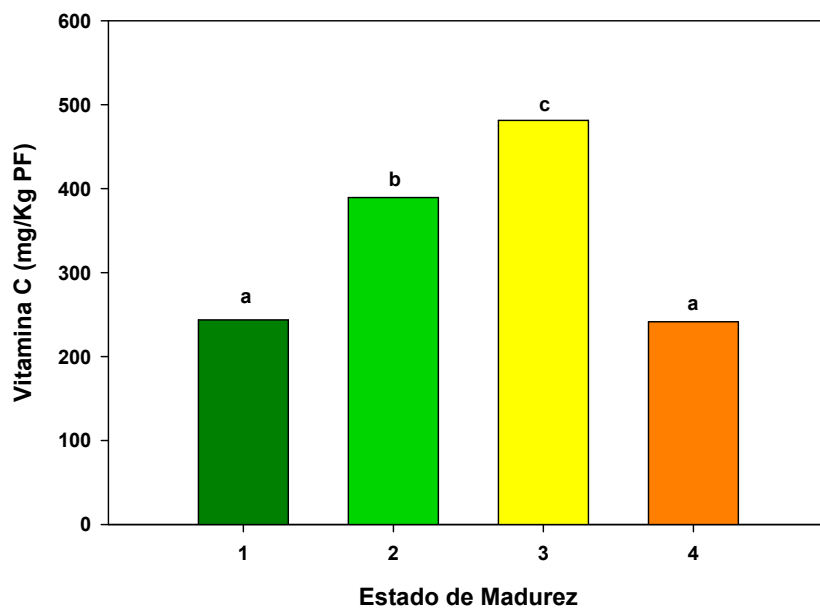


Figura7.Contenido de Vitamina C en pulpa de piña cv. “Esmeralda” en cuatro estados de madurez. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$), $n = 12$.

peso fresco, respectivamente (Kongsuwan, Suthiluk, Theppakorn, Srilaong, & Setha, 2009; Montero-Calderón et al., 2010b) e inferior a lo reportado por Marrero y Kader (2006) en piña “Premium Select”.

La tendencia del contenido de vitamina C a aumentar durante las primeras etapas de maduración puede deberse al incremento en la concentración de azúcares durante la maduración, los azúcares predominantes en la piña son sacarosa, glucosa y fructosa, siendo éstas dos últimas las precursoras de la síntesis de esta vitamina (Robles-Sánchez et al., 2007). Sin embargo, el decremento observado en el EM4 puede explicarse a partir de que las reservas energéticas en el fruto en ese EM se están agotando como consecuencia de los procesos metabólicos característicos, o bien, puede ser un indicativo de que en el EM4 la producción de radicales libres es mayor, como consecuencia del estrés oxidativo del que está siendo objeto el fruto, de manera tal, que la vitamina C esté actuando de manera sinérgica con los compuestos fenólicos (regenerándolos) (Hidalgo, Sánchez-Moreno, & de Pascual-Teresa, 2010) y debido a ello se observe una disminución en su concentración.

β-caroteno

El estado de madurez influyó de manera significativa ($p < 0.05$) en el contenido de β-caroteno en pulpa de piña cv. “Esmeralda” (**Figura 8**). La concentración de este compuesto bioactivo aumentó gradualmente con la maduración del fruto y la concentración máxima fue observada en el EM4 (186.2 μg de β-caroteno/Kg de peso fresco). Estudios realizados por Kongsuwan et al. (2009) en piña “Pulae” y “Nanglae” en estado de madurez comercial demuestran que el contenido de β-caroteno en estas dos variedades asiáticas es inferior al encontrado en piña “Esmeralda” en el EM3 (144.8 μg de β-caroteno/Kg de peso

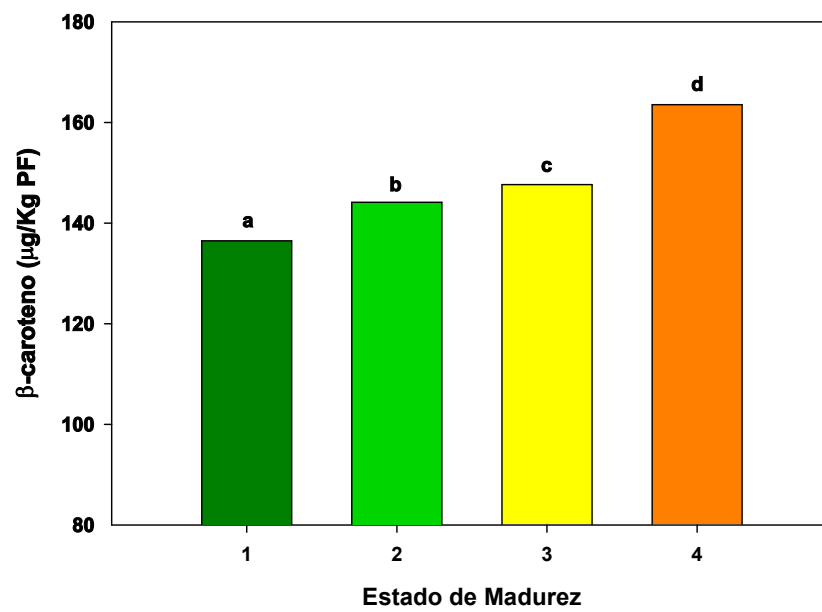


Figura 8. Contenido de β -caroteno en pulpa de piña cv. “Esmeralda” en cuatro estados de madurez. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$), $n = 12$.

fresco). Sin embargo, este valor es dos veces menor al reportado por Marrero y Kader (2006) en la variedad "Premium Select".

El aumento en la concentración de β -caroteno puede deberse a que los carotenoides actúan de manera conjunta con la clorofila en el proceso de fotosíntesis (Maiani, Periago Castón, Catasta, Toti, Cambrodón, Bysted, Granado Lorenzo, Olmedilla Alonso, Knuthsen, & Valoti, 2009). Su función es ayudar en la captación de energía luminosa, extendiendo de esta manera el rango de luz absorbida por los pigmentos fotosintéticos, sobre todo en el rango de longitud de onda azul-verde, que se transfiere a los centros de reacción fotosintéticos. Cuando la absorción de luz es mayor a la capacidad de fotosíntesis, la energía de excitación conlleva a la formación de clorofila excitada y reactiva al oxígeno singlete (Kopsell & Kopsell, 2010). Durante la maduración, el etileno producido en la piña causa la degradación de la clorofila, promoviéndose la síntesis del ácido mevalónico, precursor de los carotenoides (Robles-Sánchez et al., 2007), los cuales disipan el exceso de energía para inhibir el daño oxidativo estabilizando al oxígeno singlete y trayendo consigo la formación de pigmentos que van del amarillo a naranja (Kopsell & Kopsell, 2010).

Compuestos Fenólicos

Los compuestos fenólicos (fenoles y flavonoides) son compuestos bioactivos que han sido relacionados con el decremento de diferentes procesos deteriorativos en el cuerpo humano. La **Figura 9** muestra el contenido de fenoles y flavonoides totales en pulpa de piña cv. "Esmeralda" en cuatro estados de madurez. En general, el EM afectó de manera significativa ($p < 0.05$) el contenido de fenoles totales en la pulpa de piña cv. "Esmeralda",

observándose un incremento en su concentración durante el proceso de maduración y alcanzando una concentración máxima en el EM4 (83 mg EAG/100 g de peso fresco). Estudios realizados por Ayala-Zavala et al. (2010) y Montero-Calderón et al. (2010b) en piña “Cayena” y “Gold” arrojaron que el contenido de fenoles totales encontrado en estas dos variedades es hasta un 40 % menor al encontrado en piña “Esmeralda” en el EM3 (64 mg EAG/100 g de peso fresco). Estos cambios podrían estar relacionados con las variaciones genéticas de los cultivares o bien al estado de madurez del fruto, prácticas agronómicas y el manejo y tratamientos poscosecha.

El contenido de flavonoides totales mostró una tendencia similar a la presentada por fenoles totales. El estado de madurez influyó de manera significativa ($p < 0.05$) en su concentración, incrementándose gradualmente de 44 mg EQ/100 g de peso fresco en el EM1 a 78 mg EQ/100 g de peso fresco en el EM4. El incremento en las concentraciones de los compuestos fenólicos pueden deberse a que durante el proceso de maduración, el almidón, principalmente abundante en frutos no climatéricos es hidrolizado a azúcares de manera muy rápida, viéndose favorecida la síntesis del ácido chiquímico y del ácido mevalónico, precursores de los fenilpropanoides (Robles-Sánchez et al., 2007), o bien, puede deberse a que durante la maduración se lleva a cabo la hidrólisis de taninos, aumentando con ello las concentraciones de fenoles libres y por tanto la capacidad antioxidante del fruto (Di Vaio, Graziani, Marra, Cascone, & Ritieni, 2008). De la misma forma, los fenoles podrían estarse sintetizando como una medida preventiva del fruto contra diferentes tipos de estrés a los cuales es sometido.

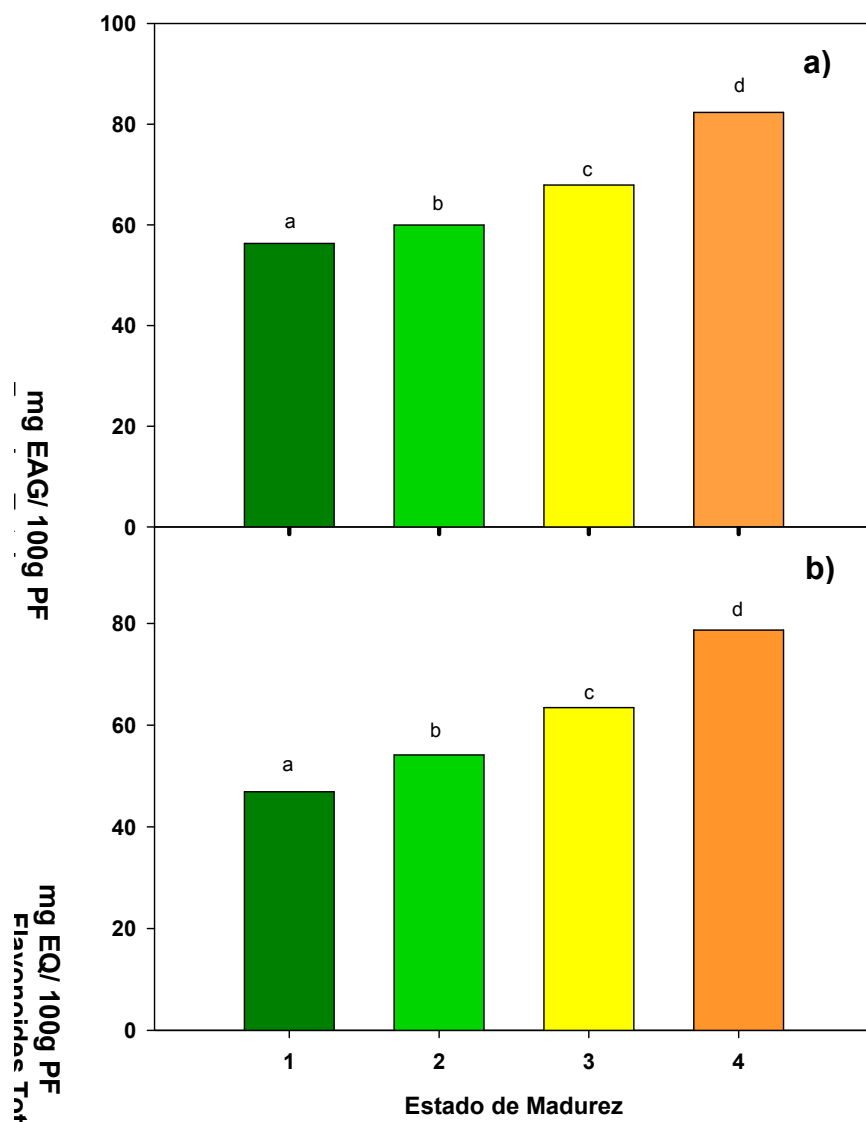


Figura 9. Contenido de Fenoles totales (a) y Flavonoides totales (b) en pulpa de piña cv. “Esmeralda” en cuatro estados de madurez. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$), $n=12$.

Ensayos de Capacidad Antioxidante

La capacidad antioxidante de pulpa de piña cv. “Esmeralda” en cuatro estados de madurez evaluada por medio de las técnicas de DPPH y TEAC se muestra en la **Figura 10**. El estado de madurez influyó de manera significativa ($p < 0.05$) en la capacidad antioxidante del fruto. El porcentaje de inhibición presentado por los extractos hidrofílicos y lipofílicos hacia los radicales DPPH y ABTS mostraron un comportamiento similar, aumentando durante el proceso de maduración, siendo notable que la capacidad antioxidante del fruto parece ser que está dada por los compuestos de carácter hidrofílico. En el caso específico de la inhibición del radical DPPH, los extractos hidrofílicos mostraron porcentajes que fueron desde 20.27 al 38.98 %. Porcentajes inferiores fueron reportados en piña “Cayena” y piña “Gold”, con 35.87 y 43.1 %, respectivamente (Ayala-Zavala et al., 2010; Montero-Calderón et al., 2010b). Mientras que los extractos lipofílicos presentaron porcentajes de inhibición de alrededor del 2 %. Hasta el momento no se han encontrado en la literatura investigaciones en las cuales se evalúe la capacidad antioxidante de la piña por medio de la técnica de TEAC. Sin embargo, si hay reportes para otros frutos tropicales como mango “Ataulfo”, papaya “Maradol” y aguacate “Hass” con valores de 868, 300 y 270 $\mu\text{m ET}/100 \text{ g}$ de peso fresco, respectivamente (Corral-Aguayo, Yahia, Carrillo-López, & González-Aguilar, 2008; Robles-Sánchez et al., 2009), dichos valores son superiores a los presentados en piña “Esmeralda” en el EM3 (14 $\mu\text{m ET}/100 \text{ g}$ de peso fresco).

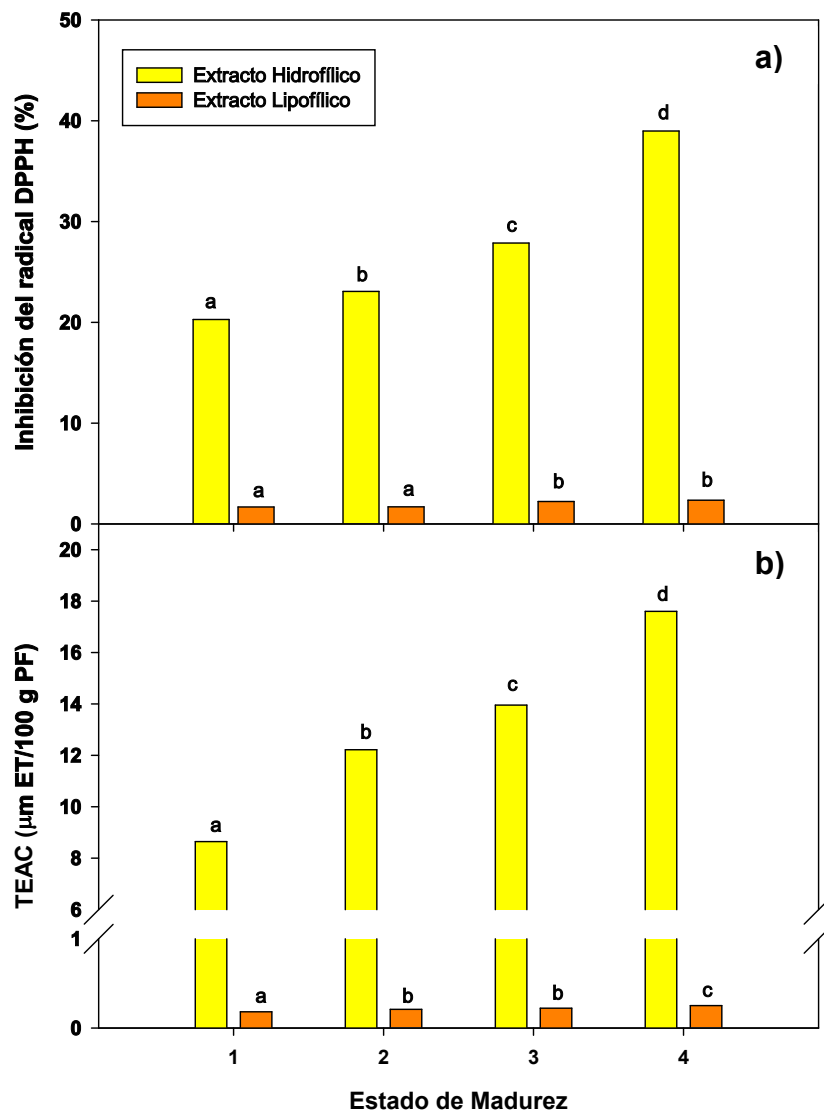


Figura 10. Inhibición del radical DPPH (a) y TEAC (b) en pulpa de piña cv. "Esmeralda" en cuatro estados de madurez. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$), $n = 12$.

Perfil de Compuestos Fenólicos

El cromatograma del perfil de compuestos fenólicos en pulpa de piña cv. “Esmeralda” a lo largo del proceso de maduración se muestra en la **Figura 11**. Ácido gálico, catequina, epicatequina, ácido vanílico, ácido 2-hidroxicinámico y miricetina fueron los compuestos fenólicos identificados. La información acerca del tipo y contenido de fenilpropanoides en la pulpa de piña es muy limitada, y lo es aún más si se trata de evaluar sus cambios durante la maduración. Según datos publicados por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, 2007), los flavonoides encontrados en mayor concentración en el pulpa de piña en estado de madurez comercial son apigenina, luteolina, kamferol y miricetina, de los cuales sólo la miricetina fue encontrada dentro del perfil fenólico realizado en el presente estudio. Lo anterior puede deberse a que el tipo y concentración de este tipo de compuestos es dependiente de múltiples factores, como por ejemplo la variedad, condiciones ambientales, factores pre y pos-cosecha, así como a diferentes tipos de estrés de los que son objeto la planta y el fruto.

La gran variedad de compuestos fenólicos hace posible su amplia distribución en el reino vegetal. Estudios realizados por Palafox-Carlos (2011) en mango “Ataulfo” en cuatro estados de madurez demuestran que los compuestos fenólicos mayoritarios presentes en la pulpa y responsables de contribuir con la mayor capacidad antioxidante al fruto son ácido gálico, clorogénico, protocateico y vanílico. Villa-Rodríguez (2011) reportó que los compuestos fenólicos presentes en mayor concentración en aguacate “Hass” son quercetina, ácido clorogénico, protocateico y vanílico, respectivamente. Mientras tanto, Gayosso-García Sancho et al. (2010) reportaron solo trazas de compuestos fenólicos en pulpa de papaya “Maradol”, atribuyendo la capacidad

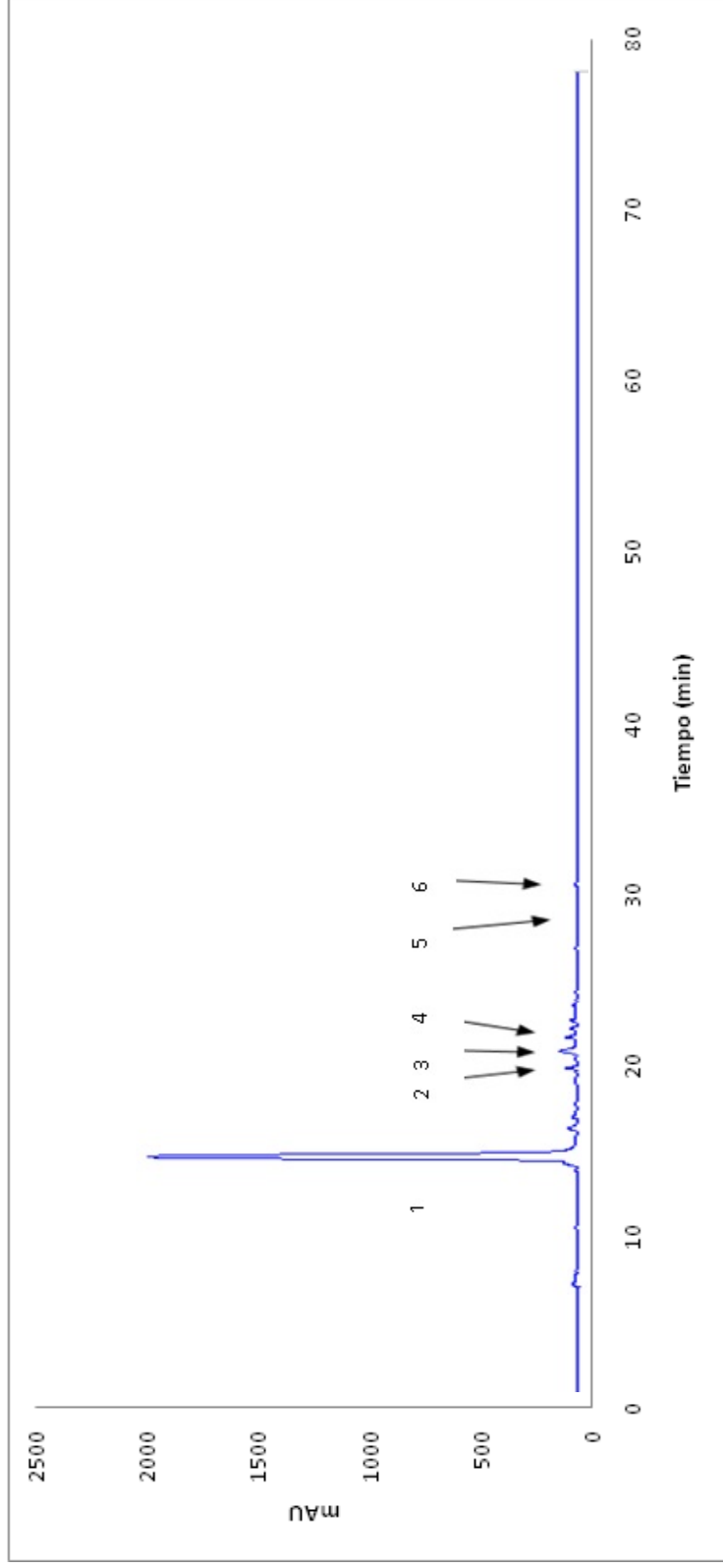



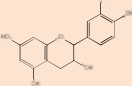
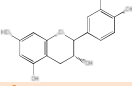
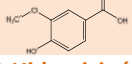
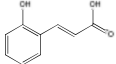
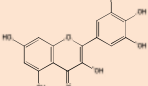
Figura 11. Perfil típico de compuestos fenólicos de extractos hidrolizados de pulpa de piña cv. “Esmeralda”. El pico 1 corresponde a ácido gálico; 2, catequina; 3, epicatequina; 4, ácido vanílico; 5, ácido 2-hidroxicinámico; 6 miricetina.

antioxidante mostrada por la pulpa de este fruto principalmente a los carotenoides.

Las variaciones en el contenido de compuestos fenólicos durante la maduración de piña cv. “Esmeralda” se muestran en la **Tabla 2**. El estado de madurez influyó de manera significativa ($p < 0.05$) en el contenido de los compuestos identificados. El ácido gálico fue el compuesto mayoritario, seguido por la catequina, epicatequina, ácido vanílico, miricetina y ácido 2-hidroxicinánico respectivamente. Terpinic y Abramovic (2009) y Choe y Min (2009) reportaron que los ácidos fenólicos son antioxidante muy eficaces debido al ácido carboxílico presente en su estructura, el cual es capaz de ionizarse fácilmente, donando de forma rápida un átomo de hidrogeno. Mientras tanto, flavonoides como la catequina, epicatequina y miricetina, son considerados buenos antioxidantes debido al número y posición de grupos hidroxilos adyacentes a la estructura carbonada, constituyendo algunos de los antioxidantes conocidos más potentes (Rivera-Pastrana et al., 2010). Estudios sobre modelos de oxidación *in vitro* demuestran que los flavonoides son antioxidantes más poderosos que algunas vitaminas tradicionales (Vitamina C y E) y debido a lo anterior a veces se refieren a ellos como “Super Antioxidantes” (Miean & Mohamed, 2001) .

Los beneficios a la salud de los compuestos fenólicos han sido asociados con su rol en la prevención de diversos desordenes relacionados con el efecto del daño causado por radicales libres y especies reactivas de oxígeno (Gayosso-García Sancho et al., 2010). El ácido gálico es un componente abundante en los alimentos de origen vegetal, el cual se ha demostrado tener propiedades antimutagénicas, anticarcinogénicas y antiinflamatorias (Shahrzad, Aoyagi, Winter, Koyama, & Bitsch, 2001). Polifenoles como la catequina y epicatequina están implicadas en la prevención de enfermedades cardiovasculares e interfieren en diversas etapas del proceso inflamatorio

Tabla 2. Variaciones en el contenido de compuestos fenólicos durante la maduración de piña cv. “Esmeralda”.

Extracto de Piña Hidrolizado			EM1	EM2	EM3	EM4	Longitud de onda max (nm)
Num. Pico	Tiempo Ret. min	Compuesto Fenólico	mg/g ps	mg/g ps	mg/g ps	mg/g ps	
1	13.7	Ác. Gálico	0.9684 ^d	0.9548 ^c	0.9442 ^b	0.7941 ^a	210,274
							
2	19.9	Catequina	0.1606 ^c	0.1572 ^b	0.1780 ^d	0.1456 ^a	210,279
							
3	20.8	Epicatequina	0.0464 ^b	0.0440 ^a	1.0700 ^c	1.0915 ^d	210, 279
							
4	21.9	Ác. Vanílico	0.0117 ^a	0.0119 ^b	0.0170 ^c	0.0289 ^d	210, 264
							
5	28.8	Ác. 2-Hidroxicinámico	0.0011 ^a	0.0019 ^c	0.0014 ^b	0.0021 ^d	210,279
							
6	30.5	Miricetina	0.0116 ^d	0.0025 ^a	0.0084 ^c	0.0047 ^b	255, 280
							

Diferente literal en el mismo renglón indica diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las medias, $n=12$.

implicado en la aterosclerosis, además, pueden influir en los índices de hemostasia y reducir la trombosis (Arts, Hollman, Feskens, Bueno de Mesquita, & Kromhout, 2001). Por lo tanto, la presencia de estos compuestos fenólicos en pulpa de piña “Esmeralda”, incluso en pequeñas cantidades la hace una fuente potencial de compuestos bioactivos. De la misma forma, los compuestos fenólicos juegan un papel fisiológico importante durante la maduración del fruto. En las primeras etapas de maduración se encuentran en forma polimerizada y forman parte natural de las defensas del fruto contra el ataque de patógenos (Limem et al., 2008). Además, su papel como antioxidantes es bien conocido y su presencia puede ayudar a prevenir los procesos de oxidación del metabolismo normal del fruto, ya sea estabilizando especies reactivas de oxígeno o como protectores contra diferentes tipos de estrés (Singh, Rastogi, & Dwivedi, 2010).

Contribución de los Compuestos Bioactivos a la Capacidad Antioxidante

La contribución de los compuestos bioactivos a la capacidad antioxidante varía considerablemente, dependiendo del tipo y concentración de compuesto que se encuentra en los diferentes estados de maduración del fruto. La **Figura 12** muestra la contribución de los compuestos bioactivos a la capacidad antioxidante durante la maduración de piña cv. “Esmeralda”. Los compuestos fenólicos fueron los que contribuyeron en mayor proporción a la capacidad antioxidante del fruto, presentando porcentajes superiores al 40% en los 4 EM evaluados. Mientras tanto, a pesar de que la vitamina C fue el compuesto bioactivo encontrado en mayor concentración, su mayor contribución a la capacidad antioxidante se presentó en el EM3 (38.93 %). Por último, el β -caroteno contribuyó con el porcentaje más bajo, de solo el 10 %.

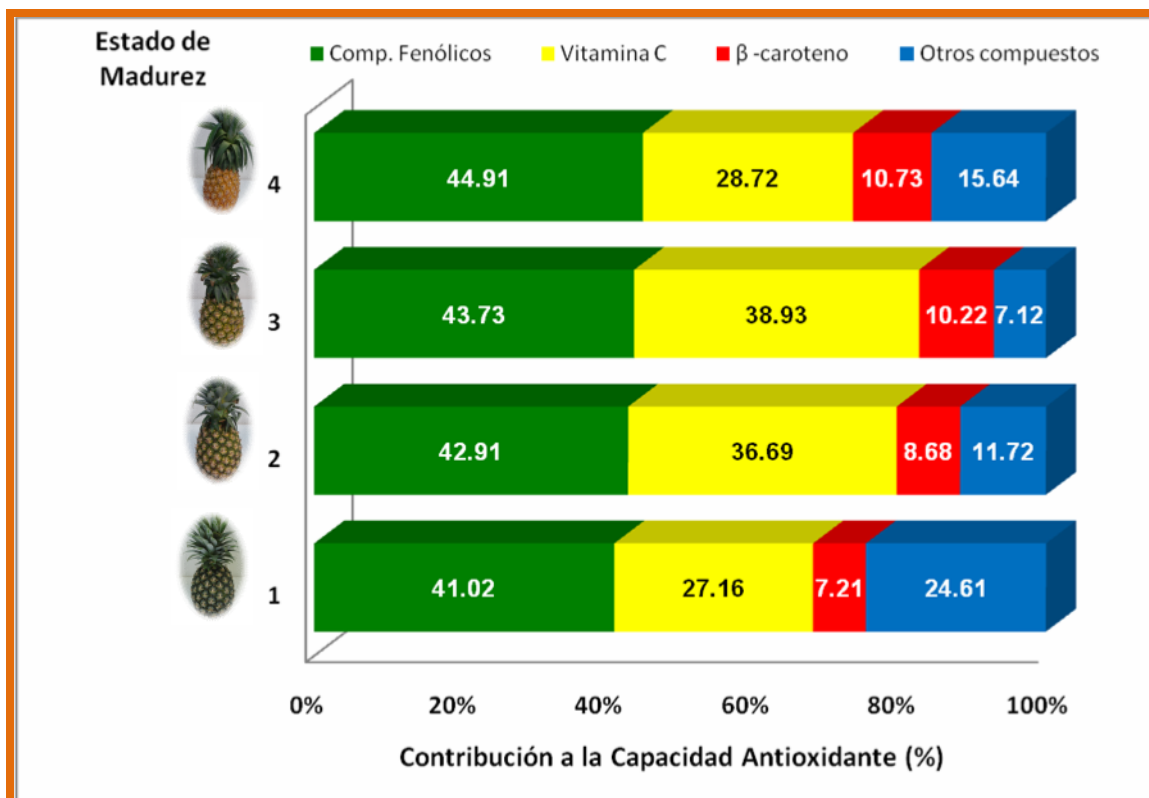


Figura 12. Contribución de compuestos bioactivos a la capacidad antioxidante durante la maduración de piña cv. “Esmeralda”, n=12.

Los resultados obtenidos en el presente estudio concuerdan con lo reportado por Martínez-Flores et al. (2002) y Escamilla-Jiménez et al. (2009), pues aún cuando las concentraciones de compuestos fenólicos presentes en la pulpa de la piña cv. “Esmeralda” fueron inferiores a las concentraciones de vitamina C, los fenilpropanoides ejercieron un mayor potencial antioxidante al demostrado por los otros dos compuestos bioactivos (vitamina C y β -caroteno). Hasta el momento no hay reportes de investigaciones en las cuales se evalúe la contribución de los compuestos bioactivos a la capacidad antioxidante durante la maduración de la piña y otros frutos tropicales. La literatura se limita a trabajos realizados en fresa, papas y vinos, donde la mayor contribución a la capacidad antioxidante es proporcionada por la vitamina C (24 %) en el caso de la fresa y los compuestos fenólicos en papas y vinos, respectivamente (Aaby, Ekeberg, & Skrede, 2007; Reddivari, Hale, & Miller, 2007; Soleas, Tomlinson, Diamandis, & Goldberg, 1997).

Debido a que los fenilpropanoides fueron el grupo de compuestos bioactivos que contribuyeron en mayor proporción a la capacidad antioxidante, se evaluaron los porcentajes de inhibición del radical DPPH de los compuestos fenólicos identificados en pulpa de piña a diferentes concentraciones (**Figura 13**), con la finalidad de entender el papel que juega cada uno de ellos en la capacidad antioxidante. El ácido gálico fue el compuesto que mostró mayor efectividad, pues a la concentración de 0.1 mg/mL inhibió en un 93.2% al radical DPPH, seguido de epicatequina, miricetina y catequina, compuestos que mostraron el mayor porcentaje de inhibición a una concentración de 0.2 y 0.3 mg/mL, respectivamente. Mientras tanto, el ácido vanílico y el ácido 2-hidroxicinámico solamente inhibieron un 7.7 y 2% al radical DPPH en la concentración más alta evaluada.

Diversos estudios han demostrado que la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos depende del número y posición de los grupos hidroxilo en la estructura, así como de los grupos sustituyentes presentes en el compuesto

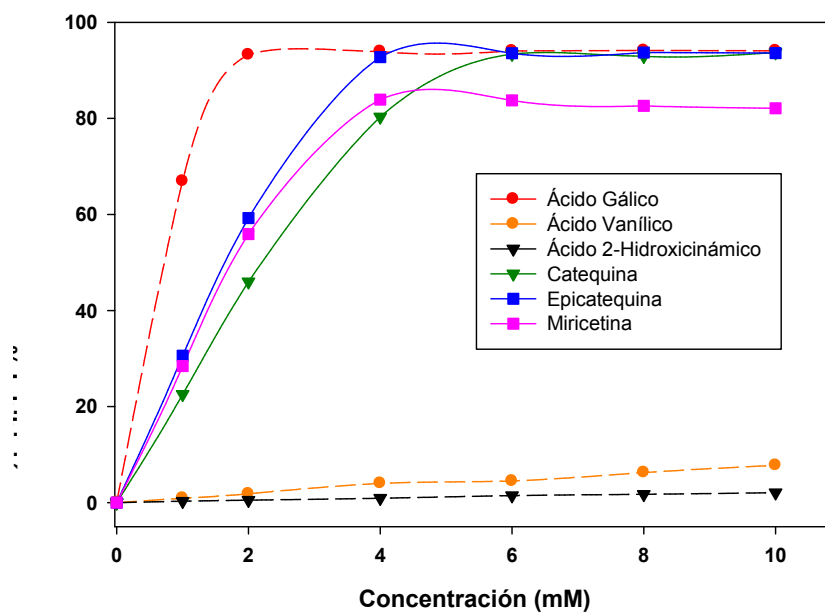
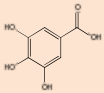
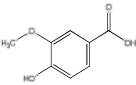
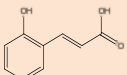
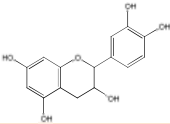
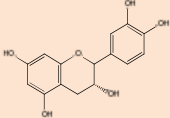
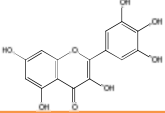


Figura 13. Inhibición (%) del radical DPPH de los compuestos fenólicos identificados en pulpa de piña cv. “Esmeralda”.

(Manach, Scalbert, Morand, Rémésy, & Jiménez, 2004). De los compuestos fenólicos identificados, ácido gálico fue el que se encontró en mayor concentración y el que contribuyó con un mayor porcentaje a la capacidad antioxidante, sin embargo, a pesar de que su concentración se mantuvo constante durante las primeras etapas de madurez, descendió en el EM4, aún cuando el contenido de compuestos fenólicos y su contribución a la capacidad antioxidante siguió aumentando. El elevado potencial antioxidante del ácido gálico es atribuido a los tres grupos hidroxilos disponibles en su estructura (**Tabla 3**), así como a la facilidad de su grupo carboxilo de ionizarse para donar un átomo de hidrogeno (Rice-Evans, Miller, & Paganga, 1996). Mientras tanto, el aumento en el contenido de fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante podría deberse a que durante el proceso de maduración aumenta la concentración de epicatequina, la cual al igual que otros flavonoides como catequina y miricetina han mostrado elevada capacidad antioxidante, incluso superior a la presentada por el ácido ascórbico y el β -caroteno a las mismas concentraciones, atribuyendo esta capacidad antioxidante a los grupos OH presentes en el anillo A y B (Mendoza-Wilson & Glossman-Mitnik, 2006; Yilmaz, 2006), o bien podría deberse a efectos sinérgicos entre fenilpropanoides o entre fenilpropanoides y otros compuestos bioactivos (Heo, Kim, Chung, & Kim, 2007). Estudios realizados por Reber, Eggett y Parker (2011) muestran un aumento en la capacidad antioxidante al evaluar diferentes combinaciones de compuestos fenólicos encontrados en fresas, sin embargo, no se observó el mismo sinergismo en todas las combinaciones evaluadas, concluyendo que los efectos sinérgicos entre fenilpropanoides que conllevan a un aumento en la capacidad antioxidante dependen del potencial de reducción de cada compuesto, de su concentración relativa en el fruto y de la ausencia o presencia del grupo catecol. Por último, la baja capacidad de inhibir al radical DPPH mostrada por el ácido vanílico y el ácido 2-hidroxicinámico puede deberse a que solamente tienen un grupo hidroxilo, el cual puede estar interaccionando con el

Tabla 3. Número y localización de los grupos sustituyentes presentes en compuestos fenólicos identificados en pulpa de piña cv. “Esmeralda”.

Compuesto Fenólico	-OH (a)	-COOH (b)	CH ₃ O- (c)	C=O (d)	Posición (No. Carbono)
Ác. Gálico 	3	1			a=3,4,5 b=1
Ác. Vanílico 	1	1	1		a=4 b=1 c=5
Ác. 2-Hidroxicinámico 	1	1			a=6 b=9
Catequina 	5				a=4',5',3,5,7
Epicatequina 	5				a=4',5',3,5,7
Miricetina 	6			1	a=3',4',5',3,5,7 b=4

grupo metoxilo o carbonilo, respectivamente, impidiendo la donación del átomo de hidrógeno.

Sin lugar a dudas la evaluación de la contribución de los compuestos bioactivos a la capacidad antioxidante de los frutos es un campo en la investigación que apenas se está abriendo camino y que debido a la importancia de los antioxidantes naturales en la dieta humana presenta un futuro prometedor. Durante muchos años se creyó que la vitamina C era el principal antioxidante de frutas y hortalizas. Sin embargo, los estudios de los años 80s, demostraron que otros fitoquímicos presentes en los vegetales, jugaban un papel muy importante en la fisiología y maduración del fruto. Adicionalmente, a pesar de no ser vitaminas o nutrientes, tenían roles fisiológicos muy importantes una vez que los frutos eran consumidos. Es por ello, que hoy en día que los estudios enfocados a la caracterización e identificación de estos compuestos en alimentos de origen vegetal, ha ido en aumento. Además, los estudios epidemiológicos llevados a cabo en las últimas 2 décadas, soportan y apoyan la hipótesis que es posible prevenir diferentes enfermedades crónico-degenerativas con el consumo de al menos 5-9 porciones, las cuales contienen una gran variedad de compuestos bioactivos benéficos para la salud humana y que en forma conjunta, contribuyen en diferente proporción a la reducción de los procesos de deterioro de los tejidos vegetales y de las células.

Enzimas Involucradas en la Biosíntesis y Degradación de Compuestos

Fenólicos

La actividad de PAL varió de manera significativa ($p < 0.05$) durante la maduración de piña cv. "Esmeralda" (**Figura 14a**). Su actividad en el EM1 fue de 3.6 $\mu\text{moles de } \acute{\text{a}}\text{c. cinámico/g de peso fresco}$, la cual fue aumentando de manera paulatina hasta alcanzar un valor de 6.16 $\mu\text{moles de } \acute{\text{a}}\text{cido cinámico/ g de peso fresco}$ en el EM4. Ha sido bien documentado que la actividad de PAL varía con el estado de desarrollo y madurez del fruto (Assís et al., 2001). En el caso de piña "Esmeralda", durante el proceso de maduración se sintetizan compuestos fenólicos que desempeñan importantes funciones de defensa en la planta y fruto contra depredadores, tienen efectos fotoprotectores y actúan como moléculas de señalización interna (Singh, Kumar, Rani, Gulati, & Ahuja, 2009). Sin embargo, diversos estudios han reportado un incremento en la actividad de PAL como respuesta a diferentes tipos de estrés, incluyendo tratamientos con CO_2 (Assís et al., 2001; Romero, Fernandez Caballero, Sanchez-Ballesta, Escribano, & Merodio, 2009), etileno (Heredia & Cisneros-Zevallos, 2009), almacenamiento a bajas temperaturas (Lafuente et al., 2003), tratamientos térmicos (Roura et al., 2008), irradiación, deficiencia de nutrientes, tratamientos herbicidas, entre otros (Morelló et al., 2005). Esta enzima ha sido catalogada como uno de los principales factores de respuesta que tienen los tejidos vegetales contra distintos tipos de estrés, ya que es la enzima clave de la ruta de los fenilpropanoides (Limem et al., 2008).

En el presente estudio se observó un aumento de actividad de PAL durante el proceso de maduración con una buena correlación ($r=0.98$ y $r=0.97$) con el contenido de fenoles y flavonoides totales, respectivamente. Resultados similares han sido encontrados durante la maduración de manzana "Golden Delicious" (Blankenship & Richard-Unrath, 1988), almacenada a altas y bajas

humedades relativas (Yingsanga et al., 2008), en zanahoria expuesta a metil jasmonato y etileno exógeno (Heredia & Cisneros-Zevallos, 2009) y en uvas en diferentes estados de madurez tratadas con diferentes concentraciones de CO₂ (Romero et al., 2009). Por lo tanto, la activación del metabolismo de los fenilpropanoides es un mecanismo de defensa que participa en la acumulación de compuestos fenólicos y éste aumento en los niveles de fenoles, está estrechamente relacionada con una mayor capacidad antioxidante en los tejidos vegetales (Romero et al., 2009).

Los compuestos fenólicos son sustratos de la enzima PPO y POD durante las reacciones de oscurecimiento (García-Rodríguez et al., 2011). En el presente estudio no se encontró actividad de PPO en ninguno de los EM de piña evaluados. Estos resultados coinciden con los publicados por Montero-Calderón et al. (2010b) en la variedad “Gold”. Sin embargo, ya se ha reportado actividad de esta enzima en otros cultivares (González-Aguilar, Ruíz-Cruz, Soto-Valdez, Vázquez-Ortiz, Pacheco-Aguilar, & Wang, 2005). La ausencia de actividad de PPO en piña “Esmeralda” puede deberse a los altos niveles de potasio en los fertilizantes aplicados a los cultivos, los cuales incrementan la acidez y el contenido de ácido ascórbico de la pulpa de la piña. Al ser el ácido ascórbico un compuesto antioxidante en los frutos, puede disminuir los síntomas de oscurecimiento o al menos retrasar su aparición mediante la reducción de quinonas producidas por la oxidación de los fenoles (Raimbault et al., 2011). Es por ello, que la baja presencia endógena de los sustratos de la PPO podría ser uno de los factores por los cuales se presentó una baja actividad de la enzima. Cabe mencionar que el fruto no presentó problemas de oscurecimiento, posiblemente debido a que no se produjeron los metabolitos suficientes para tener un efecto visible en el tejido del fruto en los distintos estados de madurez.

El estado de madurez influyó de manera significativa ($p < 0.05$) en la actividad de POD (**Figura 14b**). La actividad más baja la presentó el EM1 con

0.85 μmol de guayacol/min mg de proteína y aumentó gradualmente hasta alcanzar una concentración de 2.27 μmol de guayacol/min mg de proteína en el EM4. El aumento en la actividad de POD durante el proceso de maduración se correlacionó de manera significativa con el contenido de fenoles y flavonoides totales ($r=0.83$ y $r=0.88$, respectivamente). Resultados similares fueron encontrados por Soler (1994) en piña, donde la actividad de POD aumentó durante la maduración para posteriormente disminuir cuando la fruta estaba muy madura. Sin embargo, los aumentos en la actividad de esta enzima no se dan solamente en la maduración, ya que en otras frutas, hortalizas y hojas de plantas se han encontrado incrementos en su actividad cuando el tejido en cuestión ha sido sometido a un determinado tipo de estrés (Gaspar, Penel, Castillo, & Greppin, 1985). Lo anterior puede ser resultado de la reacción de la planta o el fruto por proteger a la célula del estrés oxidativo generado y tiene como objetivo frenar la degradación celular (principalmente la integridad de la membrana celular) que puede ser la responsable de hacer que los compuestos fenólicos sean sustratos disponibles para POD (Raimbault et al., 2011). Estudios realizados por García et al. (2011) confirman que los mejores sustratos para peroxidasa son aquellos compuestos fenólicos que tienen un mayor número de grupos hidroxilo en su estructura.

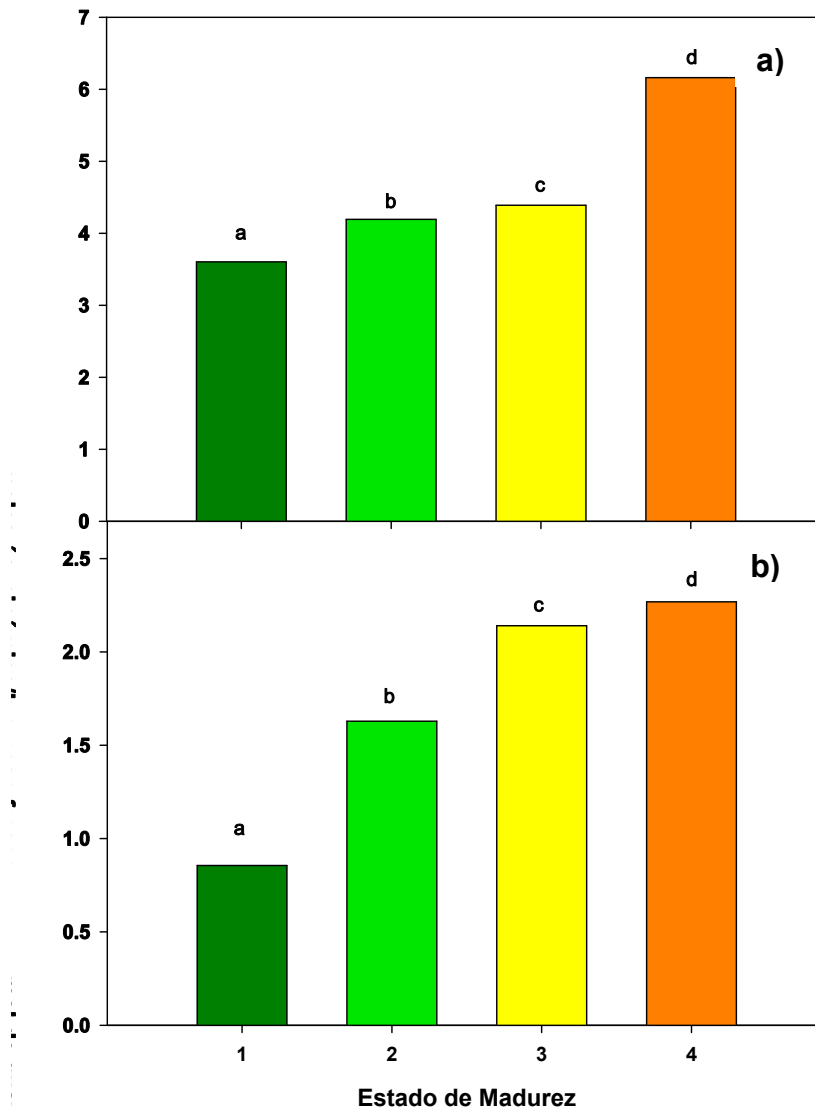


Figura 14. Variaciones en la actividad de PAL (a) y POD (b) durante la maduración de piña cv. “Esmeralda”. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$), $n = 12$.

CONCLUSIONES

El estado de madurez influyó de manera significativa en la mayoría de los parámetros evaluados, con excepción del pH. El contenido de compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante del fruto aumentó a lo largo del proceso de maduración. Dentro de los compuestos fenólicos identificados, el ácido gálico, catequina y epicatequina fueron los que se encontraron en mayor concentración. Además, el presente trabajo demostró que a pesar de que los compuestos fenólicos se encontraban en menor concentración que la vitamina C, contribuyeron en mayor proporción a la capacidad antioxidante del fruto, presentando porcentajes superiores al 40 %. Por último, la actividad de PAL y POD, incrementó con la maduración del fruto, mostrando correlaciones positivas con el contenido de compuestos fenólicos. Por todo lo anterior, la piña “Esmeralda” representa una buena fuente de compuestos, los cuales han sido relacionados con promover efectos benéficos en la salud. Por lo que su consumo moderado puede ayudar a complementar la dieta rica en compuestos antioxidantes y así reducir en forma conjunta con los compuestos presentes en otros alimentos, a la prevención de diferentes procesos de oxidación de las células.

REFERENCIAS

- Aaby, K., Ekeberg, D., & Skrede, G. (2007). Characterization of phenolic compounds in strawberry (*Fragaria× ananassa*) fruits by different HPLC detectors and contribution of individual compounds to total antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(11), 4395-4406.
- AOAC. (1990). Association of Official Agricultural Chemist. Official Methods of Analysis of the AOAC. Whashington D.C. USA 12 th. 43-45.
- Arts, I. C. W., Hollman, P. C. H., Feskens, E. J. M., Bueno de Mesquita, H. B., & Kromhout, D. (2001). Catechin intake might explain the inverse relation between tea consumption and ischemic heart disease: the Zutphen Elderly Study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 74(2), 227.
- Assís, J. S., Maldonado, R., Muñoz, T., Escribano, M. I., & Merodio, C. (2001). Effect of high carbon dioxide concentration on PAL activity and phenolic contents in ripening cherimoya fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 23(1), 33-39.
- Atta-Aly, M. A., Brecht, J. K., & Huber, D. J. (2000). Ripening of tomato fruit locule gel tissue in response to ethylene. *Postharvest Biology and Technology*, 19(3), 239-244.
- Ayala-Zavala, J. F., Rosas-Domínguez, C., Vega-Vega, V., & González-Aguilar, G. A. (2010). Antioxidant Enrichment and Antimicrobial Protection of Fresh Cut Fruits Using Their Own Byproducts: Looking for Integral Exploitation. *Journal of Food Science*, 75, 175-181.
- Badui, D. S. (2006). *Química de los alimentos. Cuarta edición. Ed. Pearson. México D.F.* p 388.
- Bahn, S. C., Chung, Y. S., Shin, J. S., Lee, C. H., & Hyung, N. I. (1999). Characterization of PPO (polyphenol oxidase) cDNA in sweet persimmon (*Diospyros kaki*). *Journal of Plant Biology*, 42(1), 16-22.
- Barrett, D. M., Beaulieu, J. C., & Shewfelt, R. (2010). Color, flavor, texture, and nutritional quality of fresh-cut fruits and vegetables: desirable levels, instrumental and sensory measurement, and the effects of processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50(5), 369-389.
- Bhonwong, A., Stout, M. J., Attajarusit, J., & Tantasawat, P. (2009). Defensive role of tomato polyphenol oxidases against cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*) and beet armyworm (*Spodoptera exigua*). *Journal of Chemical Ecology*, 35(1), 28-38.
- Blankenship, S. M., & Richard-Unrath, C. (1988). PAL and ethylene content during maturation of red and golden delicious apples. *Phytochemistry*, 27(4), 1001-1002.

- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT- Food Science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Burns, J., Fraser, P. D., & Bramley, P. M. (2003). Identification and quantification of carotenoids, tocopherols and chlorophylls in commonly consumed fruits and vegetables. *Phytochemistry*, 62(6), 939-947.
- Carlin, F. (1990). Modified Atmosphere Packaging of Fresh, "Ready to use" Grated Carrots in Polymeric Films. *Journal of Food Science*, 55(4), 1033-1038.
- Carratú, B., & Sanzini, E. (2005). Sostanze biologicamente attive presenti negli alimenti di origine vegetale. *Annali dell Istituto Superiore di Sanità*, 41(1), 7-16.
- Cieslik, E., Greda, A., & Adamus, W. (2006). Contents of polyphenols in fruit and vegetables. *Food Chemistry*, 94(1), 135-142.
- Corral-Aguayo, R. D., Yahia, E. M., Carrillo-López, A., & González-Aguilar, G. (2008). Correlation between some nutritional components and the total antioxidant capacity measured with six different assays in eight horticultural crops. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(22), 10498-10504.
- COVECA. (2002). Comisión Veracruzana de Comercialización Agropecuaria. Available from: <http://portal.veracruz.gob.mx>. Accessed March 2010.
- Crespy, V., Morand, C., Besson, C., Cotelle, N., Vezin, H., Demigne, C., & Remesy, C. (2003). The splanchnic metabolism of flavonoids highly differed according to the nature of the compound. *American Physiological Society*, 284(6), 980.
- Chen, N. J., & Paull, R. E. (1995). *Effects of waxing and storage on pineapple fruit quality*. Paper presented at the Symposium on Postharvest Science and Technology of Horticulture Crops.
- Choe, E., & Min, D. B. (2009). Mechanisms of antioxidants in the oxidation of foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8(4), 345-358.
- Das, J. R., Bhat, S. G., & Gowda, L. R. (1997). Purification and characterization of a polyphenol oxidase from the Kew cultivar of Indian pineapple fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(6), 2031-2035.
- De la Rosa, L. A., Álvarez-Parrilla, E., & González-Aguilar, G. A. (Eds.). (2010). *Shyntesis and metabolism of phenolic compounds. In Fruit and vegetable phytochemicals: chemistry, nutritional value, and stability*. Iowa, USA, 89-100.
- De Morais, P. L. D., Filgueiras, H. A., de Pinho, J. L. N., Alves, R. E., & de Assis, J. S. (2003). Vida útil de mangos cv. Tommy Atkis recolectados en el estadio de maduración comercial. *Revista Iberoamericana de Tecnología Poscosecha*, 5(1), 26-32.

- Decker, E. A. (2009). The role of phenolics, conjugated linoleic acid, carnosine, and pyrroloquinoline quinone as nonessential dietary antioxidants. *Nutrition Reviews*, 53(3), 49-58.
- Di Vaio, C., Graziani, G., Marra, L., Cascone, A., & Ritieni, A. (2008). Antioxidant capacities, carotenoids and polyphenols evaluation of fresh and refrigerated peach and nectarine cultivars from Italy. *European Food Research and Technology*, 227(4), 1225-1231.
- Doner, L. W., & Hicks, K. B. (1981). High-performance liquid chromatographic separation of ascorbic acid, erythorbic acid, dehydroascorbic acid, dehydroerythorbic acid, diketogulonic acid, and diketogluconic acid. *Analytical Biochemistry*, 115(1), 225-230.
- Dreosti, I. E. (2000). Antioxidant polyphenols in tea, cocoa, and wine. *Nutrition*, 16(7-8), 692-694.
- Escamilla-Jiménez, C. I., Cuevas-Martínez, E. Y., & Guevara-Fonseca, J. (2009). Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Revista de la Facultad de Medicina*, 52(002), 73-75.
- FAOSTAT. (2004). Statistical Databases Agriculture. Available from: <http://faostat.fao.org>. Accessed March 2010.
- Fenema, O. R. (1993). *Introducción a la ciencia de los alimentos*. Barcelona España. p 787-880.
- Flurkey, W. H., & Jen, J. J. (1978). Peroxidase and polyphenol oxidase activities in developing peaches. *Journal of Food Science*, 43(6), 1826-1828.
- Fonseca, S. C., Oliveira, F. A. R., & Brecht, J. K. (2002). Modelling respiration rate of fresh fruits and vegetables for modified atmosphere packages: a review. *Journal of Food Engineering*, 52(2), 99-119.
- Fraser, P. D., Truesdale, M. R., Bird, C. R., Schuch, W., & Bramley, P. M. (1994). Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development (evidence for tissue-specific gene expression). *American Society of Plant Biology*, 105(1), 405-413.
- García-Rodríguez, R., Romero-Segura, C., Sanz, C., Sanchez-Ortiz, A., & Perez, A. G. (2011). Role of polyphenol oxidase and peroxidase in shaping the phenolic profile of virgin olive oil. *Food Research International*, 44(2), 629-635.
- Gaspar, T., Penel, C., Castillo, F. J., & Grappin, H. (1985). A two step control of basic and acidic peroxidases and its significance for growth and development. *Physiology Plant*, 64(3), 418-423.
- Gaspar, T., Penel, C. L., & Grappin, H. (1991). Peroxidases in plant growth, differentiation and developmental processes. In T. Gaspar, C. L. Penel, D. Hagage & H. Grappin (Eds.), *In Biochemical, Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases* (pp. 249-280). University de Geneve: Geneva, Switzerland.
- Gayosso-García Sancho, L. E., Yahia, E. M., Martínez-Téllez, M. A., & González-Aguilar, G. A. (2010). Effect of Maturity Stage of Papaya

- Maradol on Physiological and Biochemical Parameters. *American Journal of Agricultural and Biological Science*, 5, 194-203.
- Giovannoni, J. J. (2004). Genetic regulation of fruit development and ripening. *Plant Cell*, 16, 170-180.
- González-Aguilar, G., Ruíz-Cruz, S., Soto-Valdez, H., Vázquez-Ortiz, F., Pacheco-Aguilar, R., & Wang, C. Y. (2005). Biochemical changes of fresh cut pineapple slices treated with antibrowning agents. *International Journal of Food Science & Technology*, 40(4), 377-383.
- González-Aguilar, G. A., Gardea, A., & Cuamea-Navarro, F. (Eds.). (2005). *Tecnologías de conservación de productos frescos cortados*. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Hermosillo, Sonora, México.
- González-Aguilar, G. A., Villa-Rodríguez, J. A., Ayala-Zavala, J. F., & Yahia, E. M. (2010). Improvement of the antioxidant status of tropical fruits as a secondary response to some postharvest treatments. *Trends in Food Science & Technology*, 21, 475-482.
- Gui, F., Wu, J., Chen, F., Liao, X., Hu, X., Zhang, Z., & Wang, Z. (2006). Change of polyphenol oxidase activity, color, and browning degree during storage of cloudy apple juice treated by supercritical carbon dioxide. *European Food Research and Technology*, 223(3), 427-432.
- Harker, F. R., Marsh, K. B., Young, H., Murray, S. H., Gunson, F. A., & Walker, S. B. (2002). Sensory interpretation of instrumental measurements 2: sweet and acid taste of apple fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 24(3), 241-250.
- Heo, H. J., Kim, Y. J., Chung, D., & Kim, D. O. (2007). Antioxidant capacities of individual and combined phenolics in a model system. *Food Chemistry*, 104(1), 87-92.
- Heredia, J. B., & Cisneros-Zevallos, L. (2009). The effect of exogenous ethylene and methyl jasmonate on pectinase activity, phenolic profiles and antioxidant capacity of carrots (*Daucus carota*) under different wounding intensities. *Postharvest Biology and Technology*, 51(2), 242-249.
- Hernández, Y., González, M., & Lobo, G. (2007). *Importancia del grado de madurez en el procesado mínimo de frutas*. Paper presented at the Congreso Iberoamericano de Tecnología Poscosecha y Agroexportaciones.
- Hernández, Y., Lobo, M. G., & González, M. (2006). Determination of vitamin C in tropical fruits: a comparative evaluation of methods. *Food Chemistry*, 96(4), 654-664.
- Hidalgo, M., Sánchez-Moreno, C., & de Pascual-Teresa, S. (2010). Flavonoid-flavonoid interaction and its effect on their antioxidant activity. *Food Chemistry*, 121(3), 691-696.
- Hulme, A. C. (1989). The mango. In the biochemistry of fruit and their products. *Academic Press. London and New York*, 675-683.

- Kader, A. A. (1997). Fruit maturity, ripening, and quality relationships. *Acta Horticulturae*, 203-208.
- Kader, A. A. (2002). Quality parameters of fresh-cut fruit and vegetable products. In O. Lamikanra (Ed.), *Fresh-cut fruits and vegetables; science, technology and market* (pp. 11-20). New York: CRC Press.
- Kader, A. A. (2009). Pineapple: recommendations for maintaining postharvest quality. UC Davis: Postharvest technology, maintaining produce quality and safety, U.S. Available form: <http://postharvest.ucdavis.edu/PFfruits/Pineapple/>. Accessed may 18, 2011.
- Kähkönen, M. P., Heinämäki, J., Ollilainen, V., & Heinonen, M. (2003). Berry anthocyanins: isolation, identification and antioxidant activities. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(14), 1403-1411.
- Kajiwara, T., Matsui, K., Akakabe, Y., Murakawa, T., & Arai, C. (2007). Antimicrobial browning-inhibitory effect of flavor compounds in seaweeds. *Journal of Applied Phycology*(18), 187-196.
- Kalt, W. (2005). Effects of production and processing factors on major fruit and vegetable antioxidants. *Journal of Food Science*, 70(1), R11-R19.
- Kalt, W., Forney, C. F., Martin, A., & Prior, R. L. (1999). Antioxidant capacity, vitamin C, phenolics, and anthocyanins after fresh storage of small fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(11), 4638-4644.
- Ke, D., & Salveit, M. (1986). Effects of calcium and auxin on russet spotting and phenylalanine ammonia-lyase activity in iceberg lettuce. *American Society for Horticultural Science* 21(5), 1169-1171.
- Kongsuwan, A., Suthiluk, P., Theppakorn, T., Srilaong, V., & Setha, S. (2009). Bioactive compounds and antioxidant capacities of phulae and nanglae pineapple. *Asian Journal of Food and Agro-Industry*, 44-50.
- Kopsell, D. A., & Kopsell, D. E. (2010). Carotenoids in Vegetables: Biosynthesis, Occurrence, Impacts on Human Health, and Potential for Manipulation. In *Bioactive Foods in Promoting Health* (pp. 645-662). San Diego: Academic Press.
- Krinsky, N. I., & Johnson, E. J. (2005). Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Molecular Aspects of Medicine*, 26(6), 459-516.
- Lafuente, M. T., Zacarías, L., Martínez-Téllez, M. A., Sanchez-Ballesta, M. T., & Granell, A. (2003). Phenylalanine ammonia-lyase and ethylene in relation to chilling injury as affected by fruit age in citrus. *Postharvest Biology and Technology*, 29(3), 309-318.
- Limem, I., Guedon, E., Hehn, A., Bourgaud, F., Chekir Ghedira, L., Engasser, J. M., & Ghoul, M. (2008). Production of phenylpropanoid compounds by recombinant microorganisms expressing plant-specific biosynthesis genes. *Process Biochemistry*, 43(5), 463-479.

- Liu, C., Liu, Y., Yi, G., Li, W., & Zhang, G. (2011). A comparison of aroma components of pineapple fruits ripened in different seasons. *African Journal of Agricultural Research*, 6(7), 1771-1778.
- Lizada, C. (1993). Mango. In B. Seymour, J. E. Taylor & G. A. Tucker (Eds.), *Biochemistry of fruit ripening* (pp. 255-271). New York.
- Maiani, G., Periago Castón, M. J., Catasta, G., Toti, E., Cambrodón, I. G., Bysted, A., Granado Lorenzo, F., Olmedilla Alonso, B., Knuthsen, P., & Valoti, M. (2009). Carotenoids: actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53(S2), S194-S218.
- Manach, C., Mazur, A., & Scalbert, A. (2005). Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. *Current Opinion in Lipidology*, 16(1), 77.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5), 727.
- Marrero, A., & Kader, A. A. (2001). Factors affecting the post-cutting life and quality of minimally processed pineapple. *Acta Horticulturae*, 553, 705-706.
- Marrero, A., & Kader, A. A. (2006). Optimal temperature and modified atmosphere for keeping quality of fresh-cut pineapples. *Postharvest Biology and Technology*, 39(2), 163-168.
- Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J. M., & Tuñón, M. J. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*, 17(6), 271-278.
- Martínez-Valverde, I., Periago, M. J., Provan, G., & Chesson, A. (2002). Phenolic compounds, lycopene and antioxidant activity in commercial varieties of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(3), 323-330.
- Mejia, L. A., Hudson, E., Mejia, E. G., & Vazquez, F. (1988). Carotenoid Content and Vitamin A Activity of Some Common Cultivars of Mexican Peppers (*Capsicum annuum*) as Determined by HPLC. *Journal of Food Science*, 53(5), 1440-1443.
- Mendoza-Wilson, A. M., & Glossman-Mitnik, D. (2006). Theoretical study of the molecular properties and chemical reactivity of (+)-catechin and (-)-epicatechin related to their antioxidant ability. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 761(1-3), 97-106.
- Miean, K. H., & Mohamed, S. (2001). Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible tropical plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(6), 3106-3112.
- Montero-Calderón, M., & Cerdas-Araya, M. (2009). *Fruits and Vegetables for the Fresh-Cut Processing Industry*. Boca Raton, FL: CRC Press.

- Montero-Calderón, M., Rojas-Graü, M. A., & Martín-Belloso, O. (2010a). Aroma profile and volatiles odor activity along gold cultivar pineapple flesh. *Journal of Food Science*, 75(9), S506-S512.
- Montero-Calderón, M., Rojas-Graü, M. A., & Martín-Belloso, O. (2010b). Mechanical and chemical properties of Gold cultivar pineapple flesh (*Ananas comosus*). *European Food Research and Technology*, 230(4), 675-686.
- Morelló, J. R., Romero, M. P., Ramo, T., & Motilva, M. J. (2005). Evaluation of L-phenylalanine ammonia-lyase activity and phenolic profile in olive drupe (*Olea europaea* L.) from fruit setting period to harvesting time. *Plant Science*, 168(1), 65-72.
- Naczek, M., & Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography*, 1054, 95-111.
- Nie, L. C., Sun, J. S., & Huang, R. H. (2004). The Biosynthesis and Affecting Factors of Aroma in Some Fruits [J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 21(5), 631-637.
- Nugroho, L. H., Verberne, M. C., & Verpoorte, R. (2002). Activities of enzymes involved in the phenylpropanoid pathway in constitutively salicylic acid-producing tobacco plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40(9), 755-760.
- Olmedilla, B. F., & Granada, i. (2001). Carotenoides y salud humana. Fundación Española de Nutrición. Madrid, España.
- Palafox-Carlos, H. (2011). *Evaluación de compuestos fenólicos antioxidantes durante la maduración de mango "Ataulfo". Un enfoque molecular y bioquímico*. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C, Hermosillo, Sonora.
- Parent, C., Capelli, N., & Dat, J. (2008). Formes réactives de l'oxygène, stress et mort cellulaire chez les plantes. *Comptes Rendus Biologies*, 331(4), 255-261.
- Paull, R. E. (1997). Pineapple. In S. K. Mitra (Ed.), *Postharvest physiology and storage of tropical and subtropical fruits* (pp. 123-143). New York: CAB INTERNATIONAL.
- Pellegrini, N., Re, R., Min, Y., & Rice-Evans, C. (1999). Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2, 2'-azinobis (3-ethylenebenzothiazoline-6-sulfonic acid radical cation decolorization assay. *Methods in Enzymology*, 299, 379-389.
- Pérez-Tello, G. O., Martínez-Téllez, M. A., Vargas-Arispuro, I., & González-Aguilar, G. A. (2009). Chilling injury in mamey sapote fruit (*Pouteria sapota*): biochemical and physiological responses. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 4(2), 137-145.
- Prior, R. L., & Cao, G. (2000). Antioxidant phytochemicals in fruits and vegetables: diet and health implications. *American Society for Horticultural Science*, 35(4), 588-592.

- Raimbault, A. K., Marie-Alphonsine, P. A., Horry, J. P., Francois-Haugrin, M., Romuald, K., & Soler, A. (2011). Polyphenol Oxidase and Peroxidase Expression in Four Pineapple Varieties (*Ananas comosus* L.) after a Chilling Injury. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*, 342-348.
- Reber, J. D., Eggett, D. L., & Parker, T. L. (2011). Antioxidant capacity interactions and a chemical/structural model of phenolic compounds found in strawberries. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, *62*(5), 445-452.
- Reddivari, L., Hale, A. L., & Miller, J. C. (2007). Determination of phenolic content, composition and their contribution to antioxidant activity in specialty potato selections. *American Journal of Potato Research*, *84*(4), 275-282.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, *20*(7), 933-956.
- Rivera-Pastrana, D. M., Yahia, E. M., & González-Aguilar, G. A. (2010). Phenolic and carotenoid profiles of papaya fruit (*Carica papaya* L.) and their contents under low temperature storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *90*, 2358-2365.
- Robles-Sánchez, M. (2008). *Mango (Mangifera indica L.) procesado mínimamente y su efecto sobre el perfil de lípidos y actividad antioxidante in vivo*. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C, Hermosillo, Sonora.
- Robles-Sánchez, M., Gorinstein, S., Martín-Belloso, O., Astiazarán-García, H., González-Aguilar, G., & Cruz-Valenzuela, R. (2007). Frutos tropicales mínimamente procesados: Potencial antioxidante y su impacto en la salud. *Interciencia*, *32*(004), 227-232.
- Robles-Sánchez, M., Islas-Osuna, M. A., Astiazarán-García, H., Vázquez-Ortiz, F. A., Martín-Belloso, O., Gorinstein, S., & González-Aguilar, G. A. (2009). Quality Index, Consumer Acceptability, Bioactive Compounds, and Antioxidant Activity of Fresh-Cut Ataulfo Mangoes (*Mangifera Indica* L.) as Affected by Low-Temperature Storage. *Journal of Food Science*, *74*(3), S126-S134.
- Romero, I., Fernandez Caballero, C., Sanchez-Ballesta, M. T., Escribano, M. I., & Merodio, C. (2009). Influence of the stage of ripeness on phenolic metabolism and antioxidant activity in table grapes exposed to different CO₂ treatments. *Postharvest Biology and Technology*, *54*(2), 118-121.
- Roura, S. I., Pereyra, L., & Del Valle, C. E. (2008). Phenylalanine ammonia lyase activity in fresh cut lettuce subjected to the combined action of heat mild shocks and chemical additives. *LWT-Food Science and Technology*, *41*(5), 919-924.
- Saltveit, M. E. (1999). Effect of ethylene on quality of fresh fruits and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, *15*(3), 279-292.

- Sams, C. E. (1999). Preharvest factors affecting postharvest texture. *Postharvest Biology and Technology*, 15(3), 249-254.
- Sams, C. E., Conway, W. S., Abbott, J. A., Lewis, R. J., & Ben-Shalom, N. (1993). Firmness and decay of apples following postharvest pressure infiltration of calcium and heat treatment. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 118, 623-627.
- Scott, K. J., & Rodríguez, D. (2000). Pro-vitamin A carotenoid conversion factors: retinol equivalents—fact or fiction? *Food Chemistry*, 69, 125-127.
- Shahzad, S., Aoyagi, K., Winter, A., Koyama, A., & Bitsch, I. (2001). Pharmacokinetics of gallic acid and its relative bioavailability from tea in healthy humans. *Journal of Nutrition*, 131(4), 1207-1210.
- Singh, K., Kumar, S., Rani, A., Gulati, A., & Ahuja, P. S. (2009). Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and cinnamate 4-hydroxylase (C4H) and catechins (flavan-3-ols) accumulation in tea. *Functional & Integrative Genomics*, 9(1), 125-134.
- Singh, R., Rastogi, S., & Dwivedi, U. N. (2010). Phenylpropanoid metabolism in ripening fruits. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(4), 398-416.
- Singleton, V. L., & Rossi Jr, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
- Soleas, G. J., Tomlinson, G., Diamandis, E. P., & Goldberg, D. M. (1997). Relative contributions of polyphenolic constituents to the antioxidant status of wines: development of a predictive model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(10), 3995-4003.
- Soler, A. (1994). Déviation de la maturation chez l'ananas: le jaune ou translucidité. II: Caractérisation enzymatique du fruit translucide. *Fruits*, 49(2), 83-91.
- Stevenson, D. E., & Hurst, R. D. (2007). Polyphenolic phytochemicals—just antioxidants or much more? *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64(22), 2900-2916.
- Terpinc, P., & Abramovic, H. (2009). A kinetic approach for evaluation of the antioxidant activity of selected phenolic acids. *Food Chemistry*, 121(2), 366-371.
- Toivonen, G. A., & De Ell, J. R. (2002). Physiology of fresh-cut fruit and vegetables. In O. L. (Ed.), *Fresh-cut fruits and vegetables: science, technology and market* (pp. 91-118). Boca Raton, Florida; London.
- Tulipani, S., Mezzetti, B., Capocasa, F., Bompadre, S., Beekwilder, J., de Vos, C. H. R., Capanoglu, E., Bovy, A., & Battino, M. (2008). Antioxidants, phenolic compounds, and nutritional quality of different strawberry genotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(3), 696-704.
- USDA. (2007). Database for the flavonoid content of selected foods, US. Available from:

- <http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/12354500/Data/Flav/Flav02-1.pdf>. Accessed may 24, 2011.
- Villa-Rodriguez, J. A. (2011). *Capacidad antioxidante, perfil de ácidos grasos, carotenoides, tocoferoles y esteroides durante la maduración de aguacate "Hass" (Persea americana)*. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C, Hermosillo, Sonora.
- Villa-Rodriguez, J. A., Molina-Corral, F. J., Ayala-Zavala, J. F., Olivas, G. I., & Gonzalez-Aguilar, G. A. (2010). Effect of maturity stage on the content of fatty acids and antioxidant activity of "Hass" avocado. *Food Research International*, doi: 10.1016/j.foodres.2010.1011.1012.
- Wada, L., & Ou, B. (2002). Antioxidant activity and phenolic content of Oregon caneberrries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(12), 3495-3500.
- Watada, A. E., & Massie, D. R. (1981). A compact automatic system for measuring CO₂ and C₂H₄ evolution by harvested horticultural crops. *HortScience*, 16, 39-41.
- Watkins, C. B. (2006). The use of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on fruits and vegetables. *Biotechnology Advances*, 24(4), 389-409.
- Wolfe, K., Wu, X., & Liu, R. H. (2003). Antioxidant activity of apple peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(3), 609-614.
- Yahia, E. M. (2010). The contribution of fruit and vegetable consumption to human health. In L. A. De la Rosa, E. Alvarez-Parrilla & G. González-Aguilar (Eds.), *Fruit and vegetable phytochemicals* (pp. 3-51). Iowa, USA: Wiley-Blackwell.
- Yilmaz, Y. (2006). Novel uses of catechins in foods. *Trends in Food Science & Technology*, 17(2), 64-71.
- Yingsanga, P., Srilaong, V., Kanlayanarat, S., Noichinda, S., & McGlasson, W. B. (2008). Relationship between browning and related enzymes (PAL, PPO and POD) in rambutan fruit (*Nephelium lappaceum* Linn.) cvs. Rongrien and See-Chompoo. *Postharvest Biology and Technology*, 50(2-3), 164-168.
- Yoldi, M., Sánchez, R. J. R., Ochoa, B. R., Rodríguez, C. F., Roque, Z. J., Ortega, C. R., Palacios, F. H., & Carrillo, T. L. A. (2000). La piña, un sabor reconocido en el mundo. *Claridades Agropecuarias. Ed. Abriendo Surcos. Octubre. México D.F., Octubre*.
- Yoruk, R., & Marshall, M. R. (2003). Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: a review¹. *Journal of Food Biochemistry*, 27(5), 361-422.
- Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64(4), 555-559.
- Zulueta, A., Esteve, M. J., Frasset, I., & Frigola, A. (2007). Vitamin C, vitamin A, phenolic compounds and total antioxidant capacity of new fruit juice

and skim milk mixture beverages marketed in Spain. *Food Chemistry*, 103(4), 1365-1374.