

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ALIMENTACIÓN Y
DESARROLLO, A. C.**

Inducción de antocianinas y capacidad antioxidante por
oligogalacturónidos en uvas de mesa cv. 'Flame
Seedless'

POR:

Blanca Isabel Castañeda Vázquez

Tesis aprobada por la:

Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Vegetal

Como requisito parcial para obtener el grado de

Maestría en Ciencias

HERMOSILLO, SONORA

DICIEMBRE DE 2010

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten y agradecen las citas del material contenido en esta tesis sin permiso del autor, siempre y cuando se de el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos 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 los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización del manuscrito en cuestión, del director o directora de tesis.

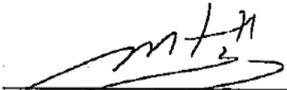


Dr. Ramón Pacheco Aguilar

Director General

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de Blanca Isabel Castañeda Vázquez, la han encontrado satisfactoria y recomiendan sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.



Dr. Miguel Ángel Martínez Téllez
Director de tesis



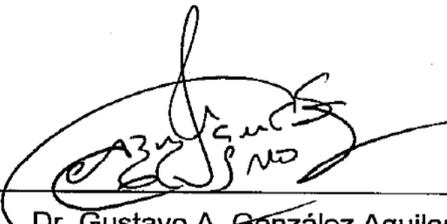
Dra. María A. Islas Osuna
Asesor



Dr. Jesús Fernando Ayala Zavala
Asesor



Dra. Irasema Vargas Arispuro
Asesor



Dr. Gustavo A. González Aguilar
Asesor

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. (CIAD), por haberme aceptado en el programa de maestría en ciencias

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo financiero en este proyecto de investigación.

Al Dr. Miguel Ángel Martínez Téllez, por aceptarme como su estudiante y fungir como asesor en esta investigación y haber confiado en que podía sacar este proyecto, por todas las oportunidades brindadas, su apoyo académico y su paciencia.

A mi comité de tesis, los doctores Jesús Fernando Ayala Zavala, María Auxiliadora Islas Osuna, Irasema Vargas Arispuro y Gustavo González Aguilar, por su disposición y atención brindada.

A todos los que pertenecen a la Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Vegetal (CTAOV), que día con día compartieron una sonrisa conmigo por los pasillos.

A los integrantes del Laboratorio de Fisiología Vegetal (LFV), QB. Francisco Soto, por su apoyo técnico en el análisis de HPLC así como la obtención de oligogalacturónidos. A la M.C. Adriana Valenzuela por el apoyo técnico brindado en los análisis fisiológicos y fisicoquímicos. Al M.C. Abel Cerón García por auxiliarme en dudas y técnicas de laboratorio. A la QB. Olivia Briceño, aunque ya no esté en el laboratorio, sigue siendo parte de él.

Continuando con el LFV, agradezco a la M.C. Marisol Ochoa Villarreal por su apoyo técnico en la extracción y cuantificación de antocianinas así como instruirme a redactar mejor para poder expresar mis ideas con más claridad. Gracias por su amistad y por adentrarme al mundo de las antocianinas.

Así mismo, al M.C. Emmanuel Aispuro Hernández, gracias por auxiliarme en el trabajo en campo, por apoyo técnico en los análisis fisiológicos y fisicoquímicos, ya que sin él, hubiera tenido que dormir en CIAD en cada muestreo. Así mismo, gracias por auxiliarme en la técnica de TEAC.

Quiero agradecer también a la M.C. Consuelo Guadalupe Corrales, por su apoyo en la cuantificación de antocianinas por HPLC así como las agradables charlas que compartimos dentro y fuera del laboratorio de Ecología Química. Así mismo, a la QB. Soco Vallejo por su simpatía conmigo.

También, a la M.C. Mariana Rodríguez le agradezco su apoyo técnico ofrecido en la realización y determinación de fenoles y capacidad antioxidante. Así mismo, gracias por su paciencia y atención.

Al M.C. Jorge Mercado por su apoyo técnico para los análisis fisiológicos y fisicoquímicos y el préstamo de equipos.

Al personal de la biblioteca, Gerardo Reyna, Luis Conde y Fernando Leyva, quienes me auxiliaron en la búsqueda y obtención de artículos.

A mis maestros durante la maestría, que me ayudaron a entender mejor y a introducirme al mundo de la investigación.

A mis compañeros de maestría así como a todas las personas que conocí aquí en CIAD (mi segunda casa), gracias por compartir conmigo muchos momentos.

Y muy especial, gracias a...

La Vanee (por su enorme amistad y por compartir su vida conmigo..así como su comida jeje), Enrique (por su amistad sincera y por ayudarme con mi muestreo así como con las antocianinas y los cálculos, sin él, seguiría perdida), Tania y Aldo (sin ellos mi compu ya no existiría, también gracias por alimentarme), Gaby Gabus y Linda (las mejoras vecina que pude tener, gracias por todo), Magda (por su linda y sincera amistad), Bertha (que siempre me recordó el amor de Dios), Alejandro, Alfredo y a mi roomie Mayra (que aparte de ser mi roomie se convirtió en una muy buena amiga casi hermana)...

Y por último pero no menos importante a mis amigas de la facu (clan): Azy, Jaz, Nuby, Marisol, Sandy y Reyna, que a pesar de la distancia, estuvieron conmigo.

A mi comunidad de Koinonia, que siempre me apoyaron con sus oraciones y buenos deseos, recordándome que Dios está siempre conmigo.

A Pedro, por su enorme paciencia y ser mi apoyo en muchas ocasiones, por ser mi mejor amigo y ... gracias por hacer que mi corazón lata tan rápido y profundo cuando estamos juntos y cuando no lo estuvimos, nunca te sentí lejos, estuviste siempre en mi ♥. TAM!!

Y le doy gracias a mis padres, que nunca han dejado de apoyarme en mis decisiones a pesar de que a veces no son muy acertadas, gracias por su amor, por confiar en mí y por sus palabras de aliento. Y a mis hermanos, Román, Diana, Juan y Chuyín, que siempre han estado ahí con su todo cariño y amor fraternal sin condiciones.

Y agradezco enormemente a Dios porque en todo momento estuvo conmigo y me dio la seguridad en que podía lograr este reto personal y profesional.

Gracias!!

DEDICATORIA

A mi Dios, que ha sido mi luz cada día

A mis padres, Jesús Castañeda y Blanca Vázquez, a quienes les debo todo lo que soy y me han guiado a ser mejor persona. A mis hermanos, que vivir y crecer con ustedes ha sido uno de los mejores regalos.

A Pedro, que me ha animado a seguir siempre adelante.

Contenido	Páginas
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE CUADROS	x
RESUMEN	xii
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES.....	3
Compuestos Antioxidantes en Uvas de Mesa (<i>Vitis vinifera</i> L.).....	3
Fenoles y Flavonoides	4
Antocianinas.....	7
Mecanismos de Acción de los Antioxidantes Fenólicos	12
Función de las Antocianinas.....	14
Contribución a la Salud Humana.....	16
Contribución a la Coloración en Frutos	17
Color en Uvas de Mesa (<i>Vitis vinifera</i> L.).....	20
Temperatura.....	20
Luminosidad	21
Inductores de Color en Frutos	22
Hormonas Vegetales.....	23
Productos Químicos.....	25
Oligogalacturónidos	26
Capacidad inductora de Mecanismos de Defensa en Plantas	27
Efectos en el Color de la Uva de Mesa	28
HIPÓTESIS.....	30

OBJETIVO GENERAL	30
OBJETIVOS PARTICULARES	30
MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
Material Vegetal.....	31
Obtención de la Mezcla de Oligogalacturónidos (OGA's)	31
Aplicación de los Tratamientos.....	32
Determinación de Color	33
Cuantificación de Compuestos Fenólicos y Capacidad Antioxidante	34
Antocianinas.....	34
Fenoles Totales	35
Capacidad Antioxidante	36
Capacidad Antioxidante Equivalente Trolox (TEAC).....	36
Método de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH')	37
Análisis Estadístico.....	38
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
Obtención de Oligogalacturónidos.....	39
Color	41
Cuantificación de Compuestos Fenólicos y Capacidad Antioxidante	47
Antocianinas.....	47
Fenoles Totales	58
Capacidad Antioxidante	62
TEAC	62
Inactivación del Radical DPPH.....	67
CONCLUSIÓN	72
BIBLIOGRAFÍA.....	73

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Partes principales de la uva.....	4
2	Estructura general de los flavonoides.....	7
3	Ruta general de las antocianinas.....	10
4	Ruta biosintética de las antocianinas individuales.....	12
5	Cromatograma de la mezcla de OGA's (GP de 2-20).....	40
6	Índice de color para uvas rojas (CIRG) en epicarpio de uva cultivar 'Flame Seedless' a los 0, 5, 10 y 15 días después de la aplicación.....	42
7	Cambio expresado como incremento en el color, evaluado con en el índice CIRG de las bayas del cultivar 'Flame Seedless' a los 15 días después de la aplicación de los tratamientos.....	44
8	Contenido de antocianinas totales expresado en mg/100 g de PF en extractos de epicarpio de uva cultivar 'Flame Seedless' a los 0, 5, 10 y 15 días después de la aplicación.....	48

9	a)Antocianinas monoglucosiladas en extracto de epicarpio de uva cv. 'Flame Seedless' tratado con 2.5 mg/mL de OGA's 15 días después de la aplicación del tratamiento. b)Cromatograma de estándares de antocianinas monoglucosiladas delfinidina (Df), cianidina (Cy), petunidina (Pt), peonidina (Pn) y malvidina (Mv).....	54
10	Contenido de fenoles totales expresados en mg equivalentes de ácido gálico/100 g de PF en cv. 'Flame Seedless' al día 0 y los 15 días después de la aplicación.....	59
11	Capacidad antioxidante expresada en mmoles equivalentes trolox/100 g de PF, en cv. 'Flame Seedless' al día 0 y a los 15 días después de la aplicación.....	63
12	Porcentaje de inhibición del radical DPPH* por efecto de los extractos de epicarpio de uva [0.0193 g/mL] en cv. 'Flame Seedless' a los 15 días después de la aplicación.....	68

LISTA DE CUADROS

Tabla		Página
1	Relación estructura-actividad antioxidante de 4 antocianinas y antocianidinas.....	14
2	Contenido de antocianinas individuales expresadas en mg/100 g de PF a los 0, 5, 10 y 15 días después de la aplicación en el cv. 'Flame Seedless'.....	52

RESUMEN

En las uvas de mesa (*Vitis vinifera* L.) de variedad roja el color es conferido por las antocianinas, y según su proporción individual, influirá en la coloración total de las bayas. Se destacan cinco antocianinas principales: delphinidina, cianidina, petunidina, peonidina y malvidina, las cuales por su estructura, brindan actividad antioxidante. No obstante, los excesos de temperatura, durante el envero, pueden provocar que la síntesis y acumulación de estos compuestos sea afectada, ocasionando mala uniformidad en el color. El empleo de oligogalacturónidos (OGA's) en uva de mesa ha generado respuestas positivas al incrementar la coloraciones rojas. El objetivo del trabajo fue identificar y cuantificar el contenido en antocianinas totales e individuales, así como la capacidad antioxidante total en epicarpios de uva cv. 'Flame Seedless' tratadas con una mezcla de OGA's con grado de polimerización (GP) de 2-20. Los tratamientos constaron de: 1.5, 2.0 y 2.5 mg/mL de OGA's y 0.5 mg/mL de Ethrel[®], producto comercial utilizado en la uva de mesa para inducir color. Los resultados confirmaron que la aplicación de OGA's a 1.5, 2.0 y 2.5 mg/mL, incrementa la coloración de las bayas ($p \leq 0.05$) un 23.93, 17.91 y 19.31 % respectivamente. Así mismo, el tratamiento de 2.5 mg/mL de OGA's mostró un aumento ($p \leq 0.05$) en el contenido de antocianinas totales, con una tendencia marcada en inducir antocianinas metoxiladas. En la capacidad antioxidante, las bayas tratadas con 1.5 mg/mL de OGA's fueron superiores al resto de los frutos tratados ($p \leq 0.05$). Con estos resultados se demuestra que los OGA's generan una respuesta en la planta, induciendo la acumulación de antocianinas y otros compuestos fenólicos que favorecen la actividad antioxidante de las uvas de mesa.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, el consumo de uvas de mesa (*Vitis vinifera* L.) ha ido en aumento debido a que poseen propiedades importantes que contribuyen a la buena salud (Balík y cols., 2008; Kris-Etherton y cols., 2004). La ingesta de estos frutos aporta efectos benéficos debido a su alto contenido de antioxidantes, como los ácidos fenólicos, taninos, estilbenos, flavonoides y antocianinas (Huang y cols., 2005; Pellegrini y cols., 2003; Xia y cols., 2010).

Las antocianinas aparte de actuar como agentes antioxidantes, brindan coloraciones rosas, rojas, moradas o azules a las uvas de mesa. En *Vitis vinifera* L. se han identificado 5 antocianinas principales que son delphinidina, cianidina, petunidina, peonidina y malvidina, las cuales se difieren entre ellas por la localización de sus grupos hidroxilo o metoxilo en el anillo B de la estructura (Leguizamón y cols., 2005). La coloración de la baya dependerá de la proporción de cada una de ellas (Carreño y cols., 1997), además de contribuir en cierta medida con la capacidad antioxidante total del fruto debido a su estructura (Romero y cols., 2008).

La síntesis de las antocianinas es influenciada por factores exógenos como el clima, temperatura, tipo de suelo, nutrientes, prácticas culturales, entre otros, afectando la coloración del fruto (Esteban y cols., 2001). Por otra parte, las antocianinas proporcionan protección contra efectos de la temperatura, rayos UV y patógenos, entre otros (Burdulis y cols., 2009; Delgado-Vargas y Paredes-López, 2003; Zeng y cols., 2010). Se ha observado que ante un estrés importante en la planta, se lleva a cabo la síntesis de estos compuestos, los cuales forman parte del metabolismo secundario.

Investigaciones realizadas han evaluado el incremento en la coloración en cultivares rojos de uvas de mesa, para la cual emplearon productos químicos como Ethrel[®] o ABA (ácido abscísico) entre otros (Human y Bindon, 2008; Peppi y cols., 2006). Actualmente, se ha dado importancia al empleo de compuestos biológicos para inducir coloraciones en frutos y mejorar su calidad. Dentro de los compuestos biológicos se encuentran los oligogalacturónidos (OGA's), los cuales son formados a partir del ácido poligalacturónico, compuestos principalmente por residuos de D-ácido galacturónico unidos con enlaces α -1-4 (Spiro y cols., 1993). El empleo de los OGA's en las plantas genera respuestas de desarrollo y defensa de estas misma.

En investigaciones recientes, se ha empleado el uso de OGA's con un grado de polimerización (GP) de 3-20 para incrementar la coloración en uvas de mesa de cultivares rojos por la acumulación de antocianinas (Ochoa, 2008). Pero se desconoce el aporte y proporción de cada una de las antocianinas individuales inducidas por una mezcla de OGA's respecto a la coloración total y el efecto en la capacidad antioxidante total del fruto. Por lo que en esta investigación se evaluó el efecto de la aplicación de una mezcla de OGA's de 2-20 GP respecto a la acumulación individual de las antocianinas así como el aporte a la capacidad antioxidante de las uvas de mesa cv 'Flame Seedless'.

ANTECEDENTES

Compuestos Antioxidantes en Uvas de Mesa (*Vitis vinifera* L.)

Diversos frutos y vegetales poseen una gran variedad de compuestos biológicos que pueden brindar efectos benéficos a la salud (Kris-Etherton y cols., 2004). En estos compuestos se incluyen los antioxidantes, los cuales se encuentran una gran gama en los frutos, como la vitamina C, las antocianinas, los carotenoides, los compuestos fenólicos como taninos, los estilbenos y ácidos fenólicos (Huang y cols., 2005; Pellegrini y cols., 2003).

Frutos como los arándanos, frambuesas, moras y uvas han sido ampliamente estudiados por su alto contenido de antioxidantes (Szajdek y Borowska, 2008). Particularmente, las uvas de mesa (*Vitis vinifera* L.) son conocidas por ser ricas en antocianinas y compuestos fenólicos, los cuales confieren color y sabor, brindando actividad antioxidante (Conde y cols., 2007). Esta actividad antioxidante es dada principalmente por la estructura de los compuestos fenólicos, los cuales poseen grupos reactivos como los hidroxilos que reaccionan con los radicales libres, inactivándolos. Los compuestos fenólicos de las uvas se encuentran en casi toda la baya, principalmente en el epicarpio, como taninos y pigmentos (antocianinas), y en las semillas, que están compuestas principalmente de taninos (Figura 1). En cambio en la pulpa, para la mayoría de los cultivares, solo contienen ácidos orgánicos, siendo el ácido tartárico y málico los que se encuentran en mayor proporción (Adams, 2006; Conde y cols., 2007).

Existen dos formas básicas para clasificar a los compuestos fenólicos dependiendo de sus unidades estructurales, los fenoles simples y los

polifenoles. Estos grupos se encuentran presentes mayormente de manera soluble en el epicarpio de las bayas o en el mesocarpio, como los hidroxicinamatos (Adams, 2006). En los fenoles simples se encuentran algunos compuestos no-flavonoides como ácidos hidroxibenzoicos y ácidos hidroxicinámicos. En cuanto a los fenoles complejos o polifenoles, se encuentran algunos no-flavonoides (como los estilbenos) y los flavonoides que son los mayoritarios en las plantas, en los que se incluyen los flavonoles, flavanoles y antocianinas (Adams, 2006; Marinova y cols., 2005).

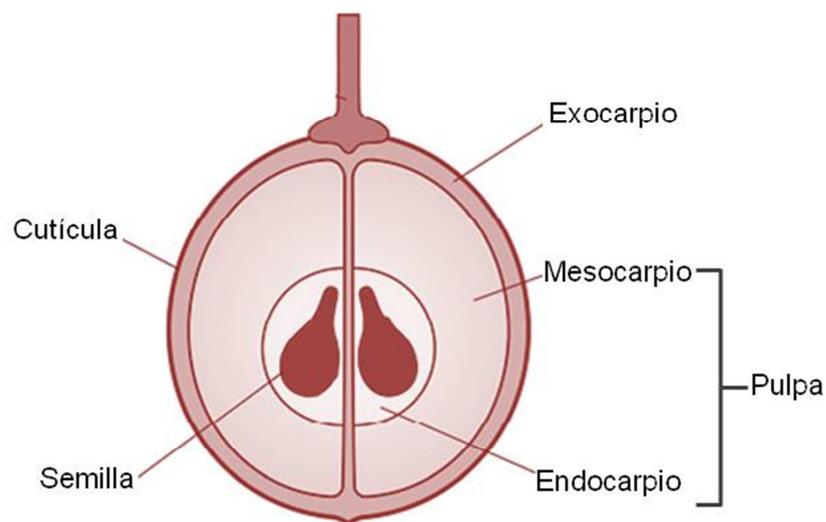


Figura 1. Partes principales de la uva (Modificado de Conde y cols., 2007)

Fenoles y Flavonoides

Los compuestos fenólicos forman parte del metabolismo secundario de las plantas, son encontrados ampliamente distribuidos en el epicarpio, semillas,

hojas y tallos de las uvas. Se ha reportado que en semillas y en epicarpio el contenido de fenoles es alrededor de 2178.8 y 374.6 mg/g EAG (equivalentes de ácido gálico) respectivamente (Xia y cols., 2010).

Los compuestos fenólicos son solubles en agua y son sintetizados en su mayoría en el cloroplasto o citoplasma de la célula, y posteriormente son glicosilados y transportados a las vacuolas en donde son almacenados (Solovchenko y Merzlyak, 2008; Xia y cols., 2010). Se forman gracias a la activación de la ruta del shikimato, en donde la condensación de dos productos como la eritrosa 4-fosfato y el fosfo-enol-piruvato conducen a la formación de fenilalanina. Posteriormente, la síntesis de fenoles empieza gracias a la acción de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) que es inducida por la luz o por situaciones de estrés (Adams, 2006; Conde y cols., 2007; Taiz y Zeiger, 2002). Se han hecho diversas investigaciones respecto a la activación de PAL en las plantas, siendo una forma de responder ante un ataque o estrés como falta de agua, infecciones, radiaciones UV, frío, microorganismos, etc., (Aziz y cols., 2007; Aziz y cols., 2004; Downey y cols., 2006; Guo y cols., 2008; Jaakola y cols., 2004; Leguizamón y cols., 2008; Mori y cols., 2005; Ochoa 2007).

Cuando la síntesis de fenoles inicia, diversos grupos hidroxilo y otros sustituyentes empiezan a adicionarse a la molécula, promoviendo la formación de compuestos no-flavonoides, taninos o la activación de la ruta de los fenilpropanoides (Adams, 2006) . En el grupo de los no-flavonoides, se incluyen desde fenoles simples como los derivados de ácidos hidroxibenzoicos, hidroxicinamatos, y fenoles complejos, como los estilbenos. Uno de los ácidos hidroxibenzoicos principales es el gálico, mientras que de los hidroxicinamatos (encontrados comúnmente en el epicarpio y mesocarpio de la uva) los más comunes son los ácidos caftárico, coutárico y fertárico. Mientras que en el grupo de los estilbenos, el compuesto más común es el resveratrol, el cual se acumula mayormente cuando existe alguna infección en la uva (Balík y cols., 2008). Por

tal motivo existe poca información acerca de la presencia de estilbenos en frutos de plantas sanas que de aquellas que han sido infectadas (Ali y Strommer, 2003).

En cuanto a los compuestos fenólicos más abundantes, son los flavonoides, los cuales se derivan de la ruta de los fenilpropanoides. Están formados por dos anillos bencénicos (A y B) unidos por un puente de 3 carbonos y que están ciclados por un oxígeno (Figura 2). Son localizados en las capas hipodermales del epicarpio de la uva, así como también en el parénquima de la semilla. Comúnmente se dividen en tres clases, los flavanoles, flavonoles y antocianinas, siendo los flavanoles los más abundantes en las uvas, seguidos de las antocianinas y en menor cantidad los flavonoles (Adams, 2006; Taiz y Zeiger, 2002).

Los flavanoles se encuentran de manera condensada en polímeros de flavan-3-ol, integrados de varias subunidades de catequinas, epicatequinas y epigallocatequinas dando a la formación de taninos condensados o proantocianidinas (Adams, 2006; Downey y cols., 2006). En relación a los flavonoles presentes en uvas, los más abundantes son el kaempferol, quercetina, mirecítina e isoramnetina en forma de glucósidos, galactósidos y glucurónidos. Estos compuestos son altamente dependientes de la luz, siendo excelentes indicadores cuando hay exposiciones al sol de los racimos (Conde y cols., 2007; Downey y cols., 2006) Así mismo tienen relación en el incremento de color al relacionarse en la estabilización de las antocianinas a través de la copigmentación (Rein, 2005).

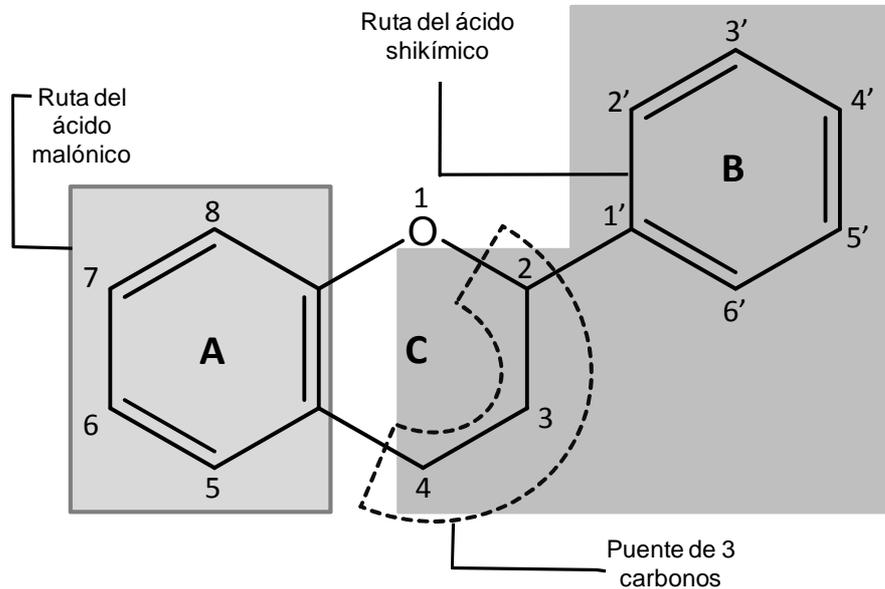


Figura 2. Estructura general de los flavonoides, proveniente de los productos de la ruta del ácido shikímico y el ácido malónico. La numeración es de acuerdo a la posición de los sustituyentes de cada flavonoide (Modificado de Taiz y Zeiger, 2002).

Antocianinas

Las antocianinas son compuestos fenólicos que pertenecen a la familia de los flavonoides y forman parte del metabolismo secundario. Estos compuestos son sintetizados en el citoplasma pero almacenados y concentrados en las vacuolas a nivel subcelular de las 3 ó 4 primeras capas del epicarpio (Combe, 1992; Leguizamón y cols., 2005). Son acumuladas en vesículas esféricas conocidas como antocianoplastos o inclusiones vacuolares las cuales se encuentran unidas a las proteínas de membrana. Estas inclusiones antociánicas vacuolares se ha observado tienen selectividad por las antocianinas aciladas (Zhang y cols., 2004).

Las antocianinas poseen una estructura basada en una molécula del ion flavilium, que comúnmente tiene por nombre antocianidina, debido a la ausencia de un azúcar. Las moléculas de antocianinas están compuestas por dos anillos aromáticos (A y B) unidos por una cadena de 3 carbonos ciclada en un heterociclo oxigenado (Figura 2). En el carbono 3 (o en algunos casos en el carbono 5) las antocianinas se encuentran unidas a un azúcar por medio de un enlace α - y β -glucósidos, principalmente en *Vitis vinifera* L. (De Pascual-Teresa y Sánchez-Ballesta, 2008). Puede estar unida a monosacáridos (glucosa, galactosa, ramnosa), o un disacárido (gentibiosa, rutinosa y soforosa). También se ha observado que pueden estar acetiladas con ácidos fenólicos, p-cumárico, caféicos y ferúlicos, uniéndose a la antocianina por medio de hidroxilos de los azúcares. La unión de la molécula de antocianidina con el azúcar le confiere estabilidad y solubilidad convirtiéndose en una antocianina estable, brindando así colores característicos a los frutos o flores. (Kong y cols., 2003; Leguizamón y cols., 2005).

Se han identificado 6 antocianinas principales en las plantas superiores, pelargonidina (Pg), cianidina (Cy), peonidina (Pn), delphinidina (Df), petunidina (Pt) y malvidina (Mv), pero debido a la ausencia de la enzima dihidroflavonol 4-reductasa en *Vitis vinifera* L. solo se presentan 5 antocianinas principales, la proporción que comúnmente se encuentran es: 7% de Pt, 7% de Mv, 12% de Pn, 12% de Df y 50% de Cy, siendo esta última la precursora de las otras antocianinas (Leguizamón y cols., 2005). Cada una de ellas difieren en el grado de hidroxilación y grupos metoxilo que se encuentren unidos a la molécula (Pomar y cols., 2005). La proporción y distribución de cada una de las antocianinas es dependiente del tipo de cultivar (Pomar y cols., 2005).

La síntesis de antocianinas se lleva a cabo en el citoplasma de la célula en donde se requiere la activación de la expresión de varios genes que codifican enzimas para que se lleve a cabo. Boss y cols. (1996), mostraron que la

acumulación de las antocianinas, en frutos de vid, es incrementada a las 16 semanas después de la floración (en cv. 'Shiraz'). Los precursores son *p*-coumaril-CoA y malonil-CoA originados de la ruta de los fenilpropanoides y acetato. Estos precursores provienen de la activación de la enzima PAL, inducida por estrés, que es clave para convertir la fenilalanina en *p*-coumaril-CoA (Figura 3). Posteriormente, la enzima chalcona sintasa (CHS), inducida por luz y ataque de patógenos, condensa a malonil CoA y *p*-coumaril-CoA formando naringenina-chalcona. Después, la chalcona isomerasa (CHI), cataliza la isomerización de la naringenina chalcona de color amarillo a naringenina de color más claro (Andersen y Markham, 2006; Boss y cols., 1996; Holton y Cornish, 1995).

La naringenina es convertida a dihidrokaempferol (DHK) por la flavonona 3-hidroxilasa (F3H), catalizando la hidroxilación del carbono 3 en el anillo C de naringenina (Holton y Cornish, 1995; Leguizamón y cols., 2005). El kaempferol obtenido puede hidroxilarse por la flavonoide 3' hidroxilasa (F3'H) y producir dihidroquercetina (DHQ) o con la enzima flavonoide 3'5'-hidroxilasa (F3'5'H), producirá la dihidromirecina (DHM). Estas enzimas, adicionan grupos hidroxilo en la posición 3' o dos grupos hidroxilos en la posición 3' y 5' en el anillo B de la molécula, orientando la síntesis a la Cy y Df (Castellarin y cols., 2006; Mattivi y cols., 2006). Posteriormente para convertir a los dihidroflavonoles (DHK, DHQ y DHM) a antocianidinas, se requiere la acción de dos enzimas importantes: La leucoantocianidina oxidasa (LDOX) y la dihidroflavonol 4-reductasa (DFR). Estas enzimas se expresarán a las 4 semanas después de la floración (Boss y cols., 1996), ellas oxidarán y reducirán a la molécula, respectivamente (Holton y Cornish, 1995).

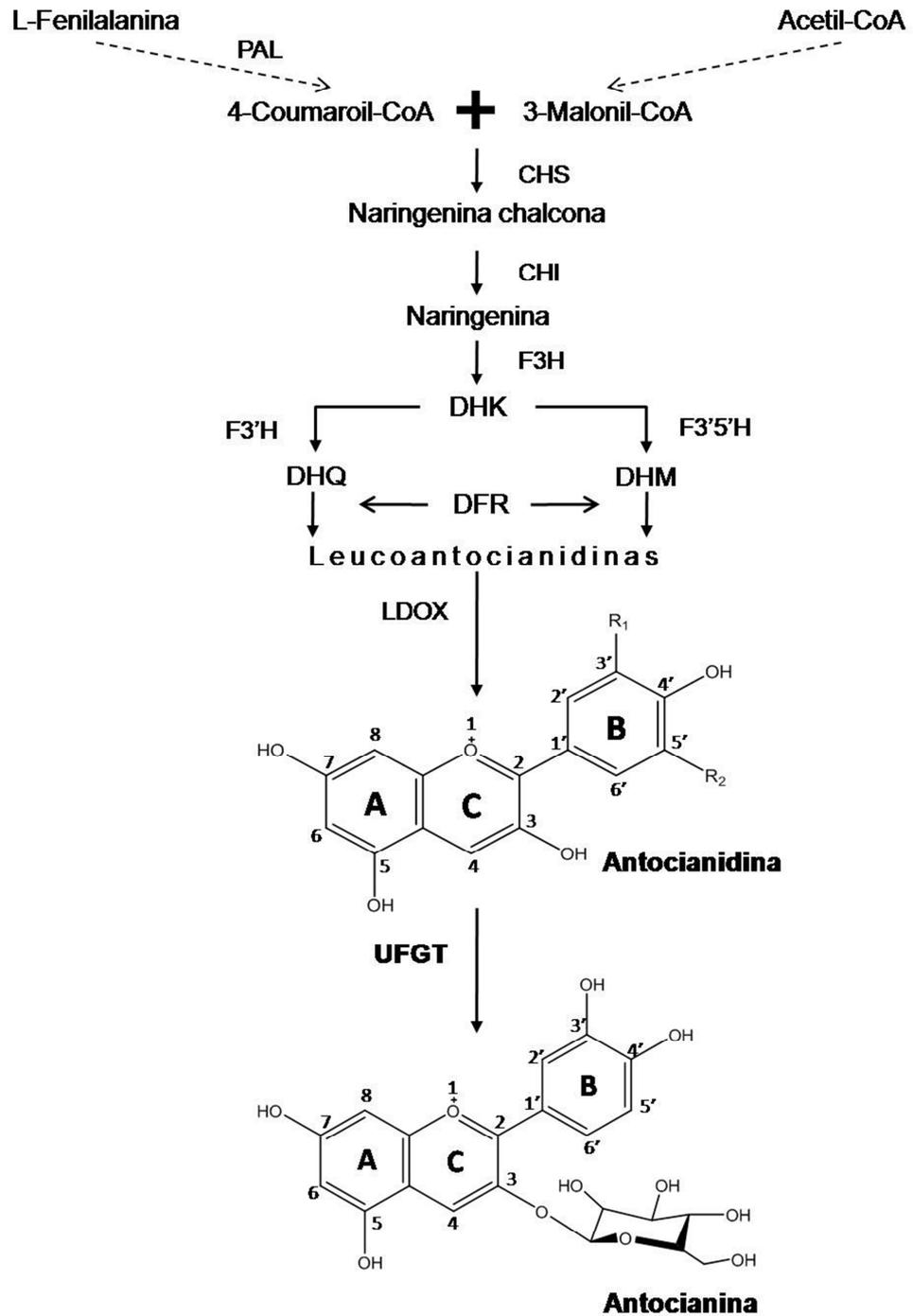


Figura 3. Ruta general de las antocianinas (Modificado de Boss y cols., 1996)

Por último, se producirá la glucosilación de la antocianidina catalizada por la enzima UDP glucosa-flavonoide glucosil transferasa (UFGT), proporcionando estabilidad y color a la molécula ante ataques nucleofílicos y a la degradación enzimática. En la vid, la UFGT se sintetiza en el envero y es regulada por el gen *VvMybA* en el transporte de flujo de flavonoides intermedios, F3'H y F3',5'H. La glucosilación solo se presenta en bayas coloreadas, ya que en el genoma de uvas blancas no se encuentra el gen de la enzima UFGT (Jeong y cols., 2004), al igual que en la pulpa y en semillas de las bayas (Braidot y cols., 2008).

Conforme las bayas van madurando, se presentan metilaciones en los hidroxilos en el anillo B de la molécula. La 3'-O-metil transferasa (3'-OMT) se encarga de convertir a Cy en Pn y la 3'5'-O-metil transferasa (3'5'-OMT) transforma a la a Df en Pt y Mv (Pomar y cols., 2005) (Figura 4). Singh Brar y cols. (2008) reportaron que Cy 3-glucósido es incrementada en etapas tempranas de maduración en el cv. 'Crimson Seedless'. De igual forma, se prosigue con acetilaciones en las posiciones donde están glucosiladas (Boss y cols., 1996; Leguizamón y cols., 2005). Las antocianinas difieren en su conformación debido a los sustituyentes 3' y 5' en el anillo B en la molécula, observándose también diferencias en la coloración que desarrollan y en la capacidad antioxidante que presentan.

Las antocianinas pueden llegar a ser potentes antioxidantes debido a su estructura. Tienen un alto poder reductor al prevenir o detoxificar procesos que generan radicales libres y muerte celular, por lo que están consideradas como protectoras de las plantas de daños producidos por especies reactivas de oxígeno (Bell y Gochenaur, 2006; Kuskoski y cols., 2004; Yilmaz y Toledo, 2004).

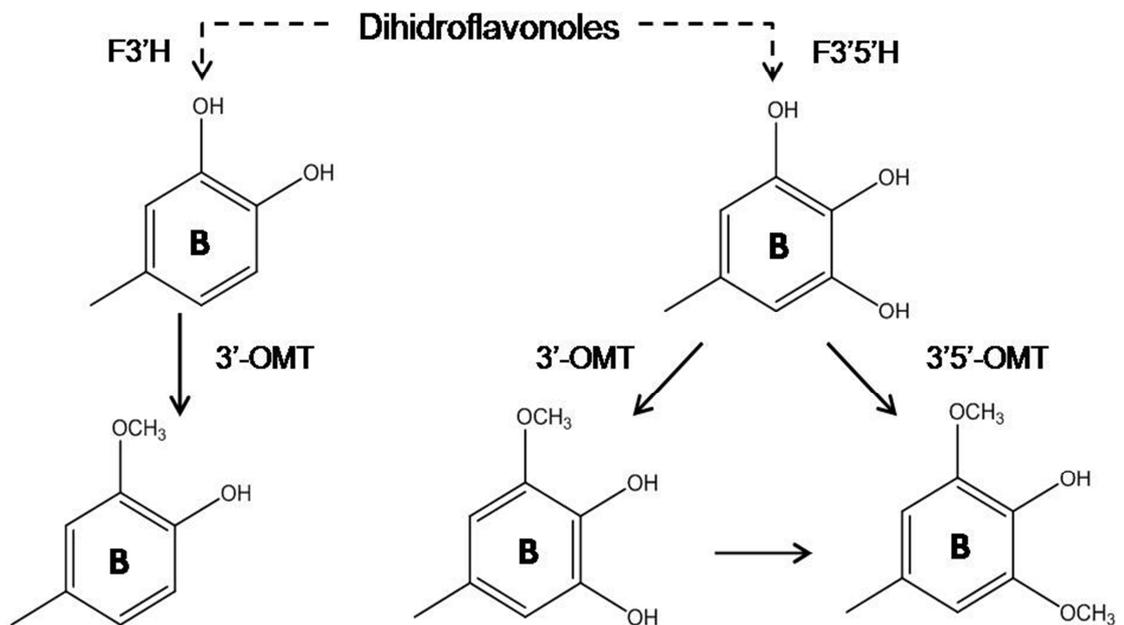


Figura 4. Ruta biosintética de las antocianinas individuales. Líneas punteadas indican simplificación de la ruta (Modificado de Boss y cols. 1996 citado por Shiraiishi y cols., 2007).

Mecanismos de Acción de los Antioxidantes Fenólicos

Uno de los principales atributos que confieren los compuestos fenólicos es que tienen la capacidad de actuar como antioxidantes debido a la forma de su estructura. Un antioxidante (AH) es definido como cualquier sustancia que a bajas concentraciones puede prevenir la autooxidación o la oxidación de radicales libres (R^\bullet), generando radicales estables (A^\bullet) intramolecularmente a través de puentes de hidrógeno en las oxidaciones posteriores (Gutteridge, 1994 citado por Apak y cols., 2007; Rice-Evans y cols., 1996).



La actividad antioxidante para los flavonoides se puede llevar a cabo por varias vías como: secuestrar radicales libres o especies reactivas de oxígeno (ROS) del tipo $\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2\cdot^-$, $^1\text{O}_2$ y el secuestro de radicales lipídicos peroxidados como $\text{R}\cdot$, $\text{RO}\cdot$, y $\text{ROO}\cdot$. Este secuestro de radicales se efectúa por medio de transferencia de átomos de hidrógeno en la molécula así como la donación de electrones (Apak y cols., 2007). Los flavonoides también pueden capturar o atrapar a los radicales libres para así desplazarlos a través de la estructura aromática (Kuskoski y cols., 2004). Del mismo modo, los flavonoides actúan sobre la transición de metales, previniéndola a través de la quelación (Apak y cols., 2007).

Las antocianinas son consideradas buenos agentes antioxidantes por su estructura. Estos compuestos pueden donar hidrógenos a los radicales libres ya que poseen hidroxilos en las posiciones 3' y 4' en el anillo B disponibles para estabilizar radicales desplazando al electrón del radical formado. También los hidroxilos en la posición 5 y 7 del anillo A pueden contribuir a la actividad antioxidante, pero en menor medida (Figura 3) (Kuskoski y cols., 2004; Rice-Evans y cols., 1996). No obstante, la actividad antioxidante disminuye cuando la molécula de la antocianidina (forma agliconada de la antocianina) posee sustituyentes glucosilados, específicamente en el carbono 3 (De Lima y cols., 2007; Kuskoski y cols., 2004; Rice-Evans y cols., 1996).

Por otra parte, la conformación individual de cada antocianina, juega un rol importante en la actividad antioxidante. La posición y número de hidroxilaciones y metilaciones en el anillo B influirá en la actividad antioxidante (Kähkönen y Heinonen, 2003). Conforme aumentan los sustituyentes metoxilados en el anillo B de la antocianina, la actividad antioxidante se puede mostrar disminuida (Tabla 1) (De Lima y cols., 2007; Romero y cols., 2008).

Tabla 1. Relación estructura-actividad antioxidante de 4 antocianinas y antocianidinas (Rice-Evans y cols., 1996; Romero y cols., 2008).

Antocianina	R1	R2	TEAC (3-OH)	TEAC (3-O-Gluc)
Cianidina	OH	--	4.4	1.89
Peonidina	OCH ₃	--	2.2	1.73
Delfinidina	OH	OH	4.44	6.99
Malvidina	OCH ₃	OCH ₃	1.8	1.37

Función de las Antocianinas

Las antocianinas presentan diferentes funciones fitoprotectoras en las plantas, ya que por ser parte del metabolismo secundario, juegan un papel importante en la defensa ante alguna situación de estrés (Gould y cols., 2009). Una de sus funciones principales es que son las responsables de impartir coloraciones a las plantas (Tanaka y cols., 2008). Debido a que aportan colores llamativos, sirven para atraer a insectos para la polinización y dispersión de las semillas (Kong y cols., 2003).

Otra de las funciones de protección que imparten las antocianinas, es que funcionan como antioxidantes ante situaciones que generen radicales libres en la planta. Esta generación de radicales o de especies reactivas de oxígeno (ROS) puede ser debida a los periodos fuertes o largos de luz solar en las plantas y a temperaturas extremas (Delgado-Vargas y Paredes-López, 2003; Peng y cols., 2003). Zeng y cols. (2010) encontraron que extractos de antocianina procedente de la papa morada, tuvieron la capacidad de secuestrar

los radicales libres (ROS) formados por excesos de temperatura elevada en hojas de *Arabidopsis*. Es por esto que las antocianinas funcionan como fotoprotectores y evitan la fotooxidación, protegiendo a las hojas senescentes o también fungen como barrera protectora de los cloroplastos jóvenes y que son vulnerables a la luz (Gould y cols., 2009; Zeng y cols., 2010). Así mismo reducen la fotoinhibición en las plantas, debido a que las antocianinas y la clorofila *b* absorben en la misma región entre 520-530 nm. De igual forma las antocianinas pueden proteger a las membranas vacuolares de las temperaturas bajas (Delgado-Vargas y Paredes-López, 2003).

Por otro parte, la evaluación del efecto antimicrobiano de extractos antociánicos, ha demostrado su capacidad antimicrobiana. Se han hecho estudios microbiológicos probando extractos antociánicos como antimicrobianos. Burdulis y cols. (2009) probaron extractos de arándanos contra el crecimiento de *Citrobacter freundii* y *Enterobacter faecalis*, bacterias Gram (-) y (+), respectivamente. Estas bacterias mostraron ser sensibles al inhibir su crecimiento en presencia de extractos de epicarpio o de bayas de arándanos.

Debido que en la actualidad se buscan alternativas más naturales en cuanto al consumo de alimentos, los extractos de antocianinas están siendo empleados como colorantes naturales. Anteriormente se habían utilizado en la industria de bebidas, pero en la actualidad, se están empleando como colorantes en la confitería, en los lácteos, helados, productos farmacéuticos, cosméticos, etc. Solo los extractos de antocianinas provenientes de uvas, están aprobados por el departamento de drogas y alimentos de los Estados Unidos (FDA). Últimamente se ha tratado de sustituir el colorante sintético rojo No. 40, ya que se ha relacionado con modificaciones en la hiperactividad de niños de edad escolar (Garzón, 2008). Se ha propuesto que los extractos de antocianinas podrían reemplazar al colorante sintético No. 40 (Delgado-Vargas y Paredes-López, 2003).

Contribución a la Salud Humana

En los últimos años, el consumo de las uvas de mesa (*Vitis vinifera* L.) ha aumentado considerablemente debido a que son ricas en compuestos fenólicos así como flavonoides y antocianinas (Balík y cols., 2008). La ingesta de frutos como las berries (uvas de mesa, fresas, frambuesas, moras, arándano, entre otros) pueden aportar beneficios a la salud ya que se ha observado que ejercen actividad antioxidante en el organismo al actuar como secuestradores de radicales libres (Kris-Etherton y cols., 2004).

Karakaya y cols. (2001) reportaron un valor de capacidad antioxidante expresado como TEAC para uvas rojas de 6.84 mM, siendo unos de los alimentos con mayor actividad antioxidante, comparando con otros frutos que muestran valores más bajos. Cada tejido de la uva posee capacidad antioxidante diferente. Xia y cols. (2010) presentaron un trabajo en el que citan valores TEAC de los tres tejidos principales de la uva, los cuales son semilla, pulpa y epicarpio, siendo el mayor en semilla, seguido del epicarpio y por último de la pulpa. Debido a que en el epicarpio de las uvas se encuentran una gran variedad de flavonoides, entre ellas las antocianinas, se ha puesto mayor interés en los beneficios del consumo de estos frutos.

Se ha reportado que las antocianinas juegan un papel importante en la salud, ya que aparte de contribuir a las coloraciones de los frutos, podrían aportar efectos benéficos a la salud. Anteriormente se había considerado que las antocianinas no eran absorbidas en humanos en su forma glucosilada. Sin embargo, Cao y cols. (2001) demostraron lo contrario al encontrar la presencia de estos compuestos en plasma y en orina en mujeres de edad avanzada a las cuales se les incluyó extractos de berries en su alimentación. Actualmente se ha visto que las antocianinas son absorbidas en el estómago y en el intestino delgado (He y Giusti, 2010). Algunos de los efectos positivos al organismo que

conlleva el consumo de estos frutos son que actúan como antiinflamatorios, antidiabéticos, anti-virales y antitumorales, previniendo de algunas enfermedades como cardiovasculares y neurológicas (Bell y Gochenaur, 2006; Kris-Etherton y cols., 2004; Lee y cols., 2009; Touriño Eirin, 2009; Zern y cols., 2003).

Contribución a la Coloración en Frutos

Las antocianinas son las responsables de impartir coloraciones naranjas, rojas, moradas y azules a diversos frutos, flores, hojas y semillas (Tanaka y cols., 2008). En las uvas, las antocianinas son localizadas en uvas solo en cultivares de color o pigmentados, aportando colores desde el rosado al azul violeta. La síntesis de estos pigmentos regularmente comienza cuando la baya se va desarrollando, disminuyendo sus niveles de clorofila, etapa conocida como envero (Callejas, 2005).

La evolución de la coloración en las uvas va cambiando en conjunto con el crecimiento de la baya, el cual se divide en tres fases. En la primera fase comienza con división y elongación celular, alrededor de 7 semanas después de la floración (Boss y cols., 1996), en donde el contenido de clorofila y ácidos orgánicos (tartárico y málico) son muy altos. Posteriormente en la segunda fase, el crecimiento disminuye, y el contenido de clorofila en las bayas empieza a reducirse y a tener cambios en el color al dar inicio a la síntesis de antocianinas. Así mismo empieza el ablandamiento del tejido, síntesis de azúcares y disminución de la acidez (Wheeler, 2006). La transición de la fase 2 a la 3 es conocida como la etapa de envero, en donde el 10 % de las bayas empiezan a presentar color. La inducción de enzimas involucradas en la síntesis de

antocianinas como UFGT, estimulan la coloración. Por último, las células vuelven a elongarse, aumentando su tamaño, continúa con la disminución de acidez e incrementa la acumulación de azúcares y antocianinas, dando inicio a la maduración (Boss y cols., 1996; Callejas, 2005; Combe, 1992).

En los frutos como uvas blancas, van tomando un color amarillo verdoso, mientras que en las variedades de uvas rojas, el color se torna rosado a azul violeta, según el tipo y la antocianina predominante (Fournand y cols., 2006; Singh Brar y cols., 2008). Dependiendo de la cantidad de grupos metoxilados o hidroxilados en el anillo B de la molécula de antocianina, serán las coloraciones que brindarán al fruto. De tal forma que si hay mayor número de antocianinas con sustituyentes hidroxilados, el color tiende ser azulado, pero si hay un mayor número de antocianinas con sustituyentes metoxilados, las coloraciones presentaran tonos rojizos (Delgado-Vargas y Paredes-López, 2003).

El color de la Cy, tiende a ser rojo tenue, y al transformarse en Df, ocurrirá un cambio en el color, de rojo a morado/azul (Castellarin y cols., 2006; Delgado-Vargas y Paredes-López, 2003). Singh Bar y cols. (2008) encontraron que la coloración total de uvas cv. 'Crimson Seedless' está relacionada con la concentración relativa de Cy 3-glucósido y de Mv 3-glucósido que se encuentra almacenada en el epicarpio. Por otra parte, Fournand y cols. (2006) observaron que en el cv. 'Shiraz' la Pn y Mv aumentaban conforme empezaba la acumulación de azúcares en la pulpa (aumento de sólidos solubles), cuando la baya empezaba a madurar. También observaron que la Df, Cy y Pt aumentaban antes que Pn y Mv alcanzaran sus niveles más altos, ya que la actividad de las enzimas 3'-OMT y 3'5'-OMT aumentó conforme empezaban a madurar. Es por eso que la proporción predominante de las antocianinas que se encuentren almacenadas en las vacuolas del epicarpio de las uvas dependerá de su estado de madurez (Fournand y cols., 2006).

Otro punto importante de acuerdo a la coloración característica de la uva es que dependiendo de la variedad, habrá una tendencia mayor en la síntesis de ciertos grupos de antocianinas, por consiguiente, diferente coloración (Carreño y cols., 1997; Tanaka y cols., 2008). En el cv. 'Monastrell' la antocianina predominante es Mv 3-glucósido, seguida de Pn y Pt, todas ellas metoxiladas, presentando coloraciones azuladas oscuras. Mientras que en la variedad 'Flame Seedless', la antocianina predominante es Cy 3-glucósido, mostrando coloraciones rojas más tenues (Fernández-López y cols., 1998). Sin embargo, los factores clave que tienen influencia en la síntesis y proporción de las antocianinas, están dados por los factores ambientales como el tipo de suelo, clima, prácticas culturales, fertilización, exposición al sol y riego (Arozarena y cols., 2002; Castellarin y cols., 2006; Esteban y cols., 2001). Leguizamón (2006) mencionan que la síntesis de Df, Pt y Mv puede disminuir en uvas expuestas con poca luz, mientras que la síntesis de Cy y Pn podría aumentar.

La variabilidad de color de las antocianinas también puede verse influenciada por los ácidos aromáticos esterificados unidos a la molécula y el pH vacuolar de la célula en la que se encuentren almacenadas (De Pascual-Teresa y Sánchez-Ballesta, 2008; Tanaka y cols., 2008). Existen 4 formas principales en que las antocianinas están en equilibrio dependiendo del pH: el catión flavilium (pH 1-3) de color rojo, base carbinol (pH 4-7) sin color, base chalcona (pH 7-8) amarillo y base quinonoidal (pH 6-8) azul (Gould y cols., 2009). La variabilidad de color en relación a la unión de las antocianinas con otras moléculas, se sabe que pueden generar compuestos con colores más intensos. Este fenómeno tiene por nombre copigmentación, el cual puede ser influenciado por otros flavonoides como flavonas y flavonoles, los cuales se unen a las antocianinas para estabilizarlas.

Color en Uvas de Mesa (*Vitis vinifera* L.)

La coloración es uno de los atributos más importantes que destacan a un fruto, ya que es un factor significativo de calidad que el consumidor observa a primera vista. En frutos como las uvas de mesa (*Vitis vinifera* L.) la coloración es aportada principalmente por las antocianinas. En regiones con climas muy calientes provocan que el desarrollo de color en las uvas (*Vitis vinifera* L.) no se logre satisfactoriamente. En Sonora, donde más del 50% de la producción de uva de mesa es exportada mundialmente (AALPUM), el clima suele no ser el adecuado para obtener buenos rendimientos en la coloración del fruto. En ocasiones, la coloración puede no ser la adecuada para su comercialización, provocando que existan pérdidas económicas al no alcanzar los estándares de calidad.

Las condiciones ambientales, el tipo de suelo, prácticas culturales, la luz y entre otros factores que se presentan durante su desarrollo, juegan un papel importante en la coloración final del fruto. Es por eso que se emplean técnicas agrícolas o se utilizan productos químicos para mejorar la coloración en estos frutos y hacerlos más atractivos al consumidor.

Temperatura

Factores como la temperatura influyen en la síntesis de antocianinas durante el desarrollo de la uva (Leguizamón y cols., 2008), afectándose la síntesis de flavonoides como quercetina y flavonoles (Downey y cols., 2006). Leguizamón y cols. (2008) observaron que los racimos adquirirían buenas

coloraciones a pesar de las altas temperaturas diurnas, ya que las temperaturas nocturnas eran más bajas. Mori y cols. (2005) señalan que cuando las temperaturas nocturnas son arriba de 30 °C durante el invierno, la coloración será inferior, disminuyendo el contenido de antocianinas. Esto se debe a que las enzimas involucradas en la síntesis de antocianinas son inactivadas a temperaturas mayores de 30 °C, tal es el caso de UFGT, la cual se ve afectada a esas temperaturas (Mori y cols., 2005). En cambio en uvas 'Kyoho' cultivadas bajo temperaturas alrededor de 25 °C durante el día y por la noche alrededor de 15 °C, presentaron coloraciones mayores así como un mayor contenido de antocianinas (Mori y cols., 2005). Por lo tanto, las temperaturas elevadas diurnas y nocturnas inhiben algunas enzimas relacionadas con la síntesis de antocianinas.

Por otra parte, las antocianinas ya formadas pueden verse afectadas por los excesos de temperatura, provocando una hidrólisis de la glucosa en el carbono 3, haciendo a la molécula inestable y fácil de degradar. Además, durante el crecimiento de las bayas, las elevadas temperaturas pueden provocar estrés oxidativo en la planta, incrementando los niveles de H₂O₂ a nivel celular. Esto ocasiona que aumente la actividad de algunas enzimas como peroxidases (presentes en las vacuolas) las cuales pueden ocasionar una degradación de las antocianinas presentes (Mori y cols., 2007).

Luminosidad

La luminosidad es otro de los factores abióticos que intervienen en la síntesis de antocianinas, ya que ejerce un papel importante en la formación de color. Por tal motivo, en el cultivo de uva de mesa se emplean técnicas como

defoliación para incrementar la incidencia de luz en las variedades de uva roja y aumentar su coloración (Callejas, 2005). De esa forma, la luz provocará que se lleven a cabo la activación de las rutas del metabolismo secundario.

Las antocianinas ejercen cierta protección contra los rayos UV provocados por el sol, al igual que otros flavonoides y ácidos fenólicos (Jaakola y cols., 2004), por lo que es necesaria la exposición de los racimos a la luz para que se lleve a cabo una síntesis mayor de antocianinas. Spayd y cols. (2002) obtuvieron un incremento en las concentraciones de glucósidos con sustituyentes en el carbono 3 de algunos flavonoides como quercetina, kaempferol y mirectina, en racimos expuestos a la luz solar.

Inductores de Color en Frutos

Actualmente se conocen algunas técnicas que son utilizadas para mejorar la coloración en uvas de mesa, como el sombreado (controlando la intensidad lumínica), aplicación de hormonas, nutrientes o productos químicos, irrigaciones especiales, entre otros (El-Kereamy y cols., 2003; Esteban y cols., 2001; Human y Bindon, 2008; Leguizamón y cols., 2008; Peppi y cols., 2006). Todas esas técnicas tienen un efecto significativo en la biosíntesis de las antocianinas, la cual empieza en la etapa del envero, por consiguiente, es importante aplicarlas en el momento adecuado.

La temperatura en conjunto con la radiación solar o intensidad lumínica son factores fundamentales para el desarrollo del color en la uva, ya que intervienen con la actividad de algunas enzimas en la biosíntesis de antocianinas. Cuando esos factores ocasionan una disminución en la coloración, o simplemente no

son suficientes para obtener un color deseado, se utilizan otros medios que lo incrementen. Se han empleado otras formas para retribuir ese problema, como la aplicación de compuestos que mejoren diversos atributos del fruto, como es el color.

El uso de productos liberadores de etileno ha sido muy utilizado actualmente por la agricultura, ya que inducen el color y estimulan la síntesis de antocianinas en uvas (El-Kereamy y cols., 2003). Además, se han hecho investigaciones en las que se ha empleado otras hormonas vegetales (como el ácido abscísico) para mejorar la coloración, mostrándose efectos positivos (Peppi y cols., 2006).

Hormonas Vegetales

Existen diferentes hormonas que se sintetizan en cada una de las etapas de crecimiento del fruto, interviniendo en su maduración. Tal es el caso del etileno, hormona presente en las últimas etapas del desarrollo del fruto, el cual está relacionado comúnmente con la maduración. El etileno es una molécula volátil estimulada cuando el fruto comienza a madurar, siendo los frutos climatéricos los que presentan un aumento elevado de esta hormona. En cambio en los frutos no climatéricos, tienen una tasa baja de respiración de CO₂/etileno y no sufren cambios considerables si son expuestos al etileno (Osborne y McManus, 2005; Salisbury y Ross, 1994).

El uso de técnicas para inducir o aumentar la maduración empleando hormonas, se ha vuelto más recurrente para mejorar el rendimiento de los cultivos en frutas y hortalizas. Debido a las observaciones generadas respecto a

la relación que existe en la maduración de la uva con el etileno exógeno, se ha puesto una atención especial en su estudio.

Se ha encontrado que aplicar etileno exógeno, puede promover la maduración comercial en uvas de mesa o en otros casos, inhibirla; esto depende de la etapa de desarrollo en la que se encuentre la uva. Por ejemplo si es aplicado al finalizar la segunda fase de crecimiento, se promoverá la acumulación de sólidos solubles totales en la etapa del envero (Callejas, 2005). Trabajos realizados durante el envero, demostraron un aumento en la producción de etileno en uvas de mesa, al monitorear la actividad *in vivo* de la enzima 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico oxidasa (ACC oxidasa) (Chervin y cols., 2004). Así mismo, encontraron una coincidencia entre el tiempo de incremento de la síntesis de etileno con la actividad de la enzima. Debido a esto, puede haber una asociación en la maduración de frutos no climatéricos a las respuestas de etileno (Chervin y cols., 2004).

Al igual que el etileno, se ha empleado el uso de otras hormonas que puedan incrementar el color en los frutos, tal es el caso del ácido abscísico (ABA), que es una hormona vegetal que suele incrementarse al final del desarrollo del fruto, como el etileno. La aplicación exógena de ABA puede iniciar la maduración si es aplicado en el envero. Hiratsuka y cols. (2001) observaron que al actuar en conjunto con ramnosa, actúan sinérgicamente, aumentando la síntesis de antocianinas. También observaron un aumento en la actividad de chalcona flavonona isomerasa. Por otra parte, el ABA puede llegar a producir ROS a nivel vacuolar, como peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y superóxido ($O_2^{\bullet-}$) aumentando el metabolismo secundario de la planta, generando así una acumulación de antocianinas (Taiz y Zeiger, 2002). Cantín y cols. (2007) aplicaron ABA a cv. 'Crimson Seedless', y observaron una maduración más rápida del fruto, en comparación con las uvas tratadas con Ethephon (compuesto liberador de etileno). En ese mismo estudio, las uvas

tratadas con ABA en etapas avanzadas de la maduración, incrementaron las coloraciones, además, redujeron el encafecimiento del raquis durante el almacenamiento.

Otro tratamiento utilizado es con metil jasmonato (MeJA), en donde se ha observado que pueden llegar a inducir respuesta de defensa en las plantas. Belhadj y cols. (2008) encontraron que al aplicar metil jasmonato en combinación con un azúcar a cultivos celulares de uvas, incrementa la expresión de los genes de estilbeno sintasa, PAL, CHS y UFGT. Tomando en cuenta lo anterior, se observa que existe un efecto sinérgico de MeJA en combinación con un azúcar al igual que ABA.

Productos Químicos

El uso de liberadores de etileno como el ácido 2-cloroetilfosfónico (2-CEPA) o comercialmente conocido como Ethrel[®] o etefón, incrementa la acumulación de antocianinas totales en la cutícula de las bayas con el consecuente aumento del color. El-Kereamy y cols. (2003), observaron que las aplicaciones de etileno en el envero incrementan la acumulación de los transcritos de chalcona sintasa (CHS) y flavonoide 3' hidroxilasa (F3'H). Al elevarse la activación de los genes que codifican a CHS y F3'H, aumenta la biosíntesis de las antocianinas. Human y Bindon (2008) aplicaron etefón en cv. 'Crimson Seedless' y obtuvieron que las proporciones de 3-monoglucósidos de antocianinas incrementaban considerablemente, en donde Pn 3-glucósido fue la más relevante.

Sin embargo, el uso de etileno a veces suele ser no tan efectivo, ya que podría presentar efectos no deseados. Por ejemplo el desgrane o abscisión de las bayas de los racimos y una senescencia acelerada de los tejidos que puede

generar un colapso prematuro de los racimos al momento de almacenarse (Callejas, 2005). En cuanto a la importancia de saber acerca de la percepción de etileno en las bayas, Chervin y cols. (2004) utilizaron un inhibidor de los receptores de etileno (1-MCP) a diferentes tiempos en los que era esperada la salida del pico de etileno. El resultado fue que las bayas presentaron un atraso en el incremento de su tamaño, por lo que condujo a que el etileno podría tener un papel importante en el alargamiento celular.

Por otra parte, debido a que últimamente las condiciones climáticas no son favorables para el crecimiento y desarrollo de un fruto, se ha visto la necesidad de emplear diversas técnicas para su mejoramiento en el rendimiento de los cultivos. Pero a veces no son totalmente suficientes y se ha optado por buscar nuevas opciones que sean redituables y que no afecten al medio ambiente.

Oligogalacturónidos

Experimentalmente se ha empezado a utilizar compuestos que actúan como inductores para mejorar el rendimiento y la calidad en diversos frutos o vegetales (García Sahagún y cols., 2009). Tal es el caso de los oligogalacturónidos (OGA's), los cuales son oligosacarinas que tienen una actividad biológica en las plantas actuando como moléculas señalizadoras.

Los OGA's son compuestos por unidades de D-ácido galacturónico, unidos con enlaces α -1-4 que regulan el crecimiento, exhibiendo efectos en procesos de desarrollo y defensa de las plantas (Spiro y cols., 1993). Los OGA's provienen de la degradación de paredes celulares de plantas o del ácido poligalacturónico que ha sido tratado con enzimas hidrolíticas (pectinasas) o por hidrólisis ácida. Se ha observado que estos compuestos tienen la característica

de actuar como elicitores, ya que inducen una respuesta de defensa en las plantas (Darvill y cols., 1992; Spiro y cols., 1993). Tomando en cuenta su actividad biológica, se muestra que tienen un efecto similar a una hormona, ya que se ha visto que inhiben la elongación del tallo (como se ha observado en las auxinas) y el estímulo para la floración (Marfa y cols., 1991).

Algunos estudios han revelado que hay una fuerte relación en la maduración de frutos con la aplicación exógena de OGA's. Los OGA's han mostrado fungir como elicitores en la producción de etileno en calabaza zucchini (*Cucurbita pepo* L.) incrementando su respiración (Balandrán-Quintana y cols., 2002) y en discos de tomate (Campbell y Labavitch, 1991), cambiando su coloración. Esto sugiere que los OGA's podrían estar relacionados con el proceso de maduración (Ridley y cols., 2001). Un estudio reciente señala la capacidad de los OGA's derivados de ácido poligalacturónico en inducir el color en uvas de mesa rojas (Ochoa, 2008), además de que pueden tener un efecto positivo en el rendimiento y calidad del tomate tipo bola (García Sahagún y cols., 2009).

Capacidad inductora de Mecanismos de Defensa en Plantas

La aplicación exógena de una mezcla de OGA's a una planta, puede inducir la formación de especies reactivas de oxígeno (H_2O_2 y O_2) induciendo la expresión de genes relacionados con la defensa de la planta. Posteriormente, se da inicio a una cascada de rutas bioquímicas alternas para la producción de fitoalexinas o metabolitos secundarios, lignina, quitinasas y β 1-3 glucanasas (Aziz y cols., 2004). En cotiledones de frijol, al inducir a las fitoalexinas, la ruta de los fenilpropanoides se verá favorecida, promoviendo la actividad de

chalcona sintasa e induciendo así a la maduración de los frutos (Simpson y cols., 1998; Ridley y cols., 2001). También es importante recalcar que según el grado de polimerización (GP) de los oligogalacturónidos, será la actividad biológica que tendrá sobre la planta. Se ha encontrado que moléculas de 9 a 15 GP han mostrado ser activos al formar complejos multioligómeros con Ca^{+2} , estabilizando la estructura de los OGA's (Cabrera y cols., 2008; Ridley y cols., 2001; Simpson y cols., 1998)

Así también, se ha reportado que la aplicación de OGA's individuales de 2-6 GP son capaces de inducir la acumulación de proteínas inhibidoras de proteasas y elicitar la producción de etileno (Baladrán-Quintana y cols., 2002; Cabrera y cols., 2008; Ridley y cols., 2001; Simpson y cols., 1998). Se ha sugerido que tamaños de rangos definidos en cadenas cortas de OGA's, podrían inducir la producción de etileno y la expresión de 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico oxidasa en plantas de tomate. Por lo tanto se ha observado que los GP de 4, 5 y 6 pueden mostrar las características ya mencionadas (Simpson y cols., 1998).

Efectos en el Color de la Uva de Mesa

En los cultivares de uva de mesa Flame Seedless, existe una mayor proporción de la antocianina cianidina y en menor proporción de malvidina y petunidina (Carreño y cols., 1997). Sin embargo, en el estudio realizado por Ochoa (2008), se encontraron diferencias al aplicar una mezcla de oligogalacturónidos de 3 a 20 GP. Se observó que se favorecía la inducción del color en las bayas y se encontró un incremento en la proporción de malvidina, la cual confiere una mayor coloración rojiza en la uva ya que posee grupos

metoxilo en su estructura a diferencia de cianidina. No obstante la coloración completa de la baya está dada por 5 antocianinas principales y hasta la fecha no se sabe la proporción de cada una de ellas al ser inducidas por la aplicación de OGA's. Así mismo, se desconoce su aporte a la actividad antioxidante de las bayas, así como la contribución individual a la coloración total del fruto después de ser tratadas con oligogalacturónidos.

Se presume que las antocianinas petunidina y delfidina juegan un papel importante en el aporte del color total. Por tal motivo, el conocer el aporte de cada una de estas moléculas al color total de las uvas se torna indispensable. Es necesario evaluar el efecto de la aplicación de OGA's en cuanto a la cuantificación del contenido de cada una de las antocianinas, así como su coloración. También determinar el efecto sobre la capacidad antioxidante en las bayas del cv. 'Flame Seedless' después de haber sido tratadas con OGA's.

HIPÓTESIS

La aplicación de una mezcla de oligogalacturónidos con un grado de polimerización de 2 a 20, promueve la capacidad antioxidante de uvas de mesa mediante la acumulación de antocianinas.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la aplicación de los oligogalacturónidos (OGA's) en los niveles de antocianinas, coloración y capacidad antioxidante de uva de mesa cultivar 'Flame Seedless'.

OBJETIVOS PARTICULARES

- ✓ Evaluar el efecto de la aplicación de OGA's en la coloración total de uvas de mesa cultivar 'Flame Seedless'.
- ✓ Identificar y cuantificar el contenido individual de antocianinas inducidas en el epicarpio de las uvas tratadas.
- ✓ Evaluar el efecto de los OGA's sobre la capacidad antioxidante de las uvas tratadas y la contribución de las antocianinas a dicha actividad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal

La aplicación de los tratamientos se llevó a cabo en campo en un viñedo comercial ubicado en Pesqueira, Sonora, (latitud 29°23'2.35"N; longitud 110°55'59.76"O). Como material vegetal se utilizaron racimos de uva de mesa (*Vitis vinifera* L.) del cultivar 'Flame Seedless'. Durante el experimental se registraron las temperaturas del viñedo mediante un sistema de monitoreo automático (registro cada 15 minutos) utilizando la tecnología Adcon Telemetry, las cuales se adjuntan a una base de datos de acceso remoto (www.agrienlace.com). Para la aplicación de cada tratamiento se seleccionaron cinco racimos al inicio del envero (06/05/2009). La toma de muestras se llevó a cabo cada cinco días después de la primera aplicación, realizando cuatro muestreos (día 0, 5, 10 y 15 respectivamente). Después de cada muestreo, los racimos se trasladaron al Laboratorio de Fisiología Vegetal del CIAD para el análisis de color. Posteriormente se almacenaron a -20 °C para los análisis de antocianinas, fenoles totales y capacidad antioxidante total.

Obtención de la Mezcla de Oligogalacturónidos (OGA's)

Para la obtención de la mezcla de OGA's se utilizó la técnica descrita por Torres (2005), donde a partir de ácido poligalacturónico (SIGMA-ALDRICH), se disolvió en un buffer de ácido acético glacial con acetato de sodio ambos a 20 mM a pH 5 y posteriormente se llevó a cabo una hidrólisis enzimática, utilizando

la enzima Endo-Poligalacturonasa de *Aspergillus niger* (SIGMA-ALDRICH) a 23 °C durante 15 minutos. Posteriormente se detuvo la reacción a 121 °C, autoclavando la solución durante 15 minutos. Al término de esa etapa, la solución de OGA's se pasó a través de un ultrafiltrador, utilizando membranas Milipore® de tamaños 3kDa, 5kDa y 10kDa, La mezcla de oligogalactorónidos que fue separada en las membranas de 5kDa y 10kDa se analizó en un cromatógrafo de intercambio aniónico con detector de pulsos amperométricos (HPAEC-PAD) para corroborar la obtención de la mezcla de oligogalacturónidos (OGA's) con un grado de polimerización de 2 a 20. La solución de OGA's fue liofilizada, empleando un liofilizador marca Virits Sentir Freezemobile 12 SL, para posteriormente ser utilizada en la preparación de los tratamientos.

Aplicación de los Tratamientos

La aplicación de los tratamientos se llevó a cabo por medio de aspersion sobre cada uno de los racimos seleccionados al azar durante el inicio del envero. Se hicieron dos aplicaciones para cada uno de los tratamientos, siendo a las 0 y 24 horas posteriores.

Los tratamientos aplicados constaron de:

- Testigo (agua)
- Ethrel® a 0.5 mg/mL
- Mezcla de OGA's a 1.5 mg/mL
- Mezcla de OGA's a 2.0 mg/mL
- Mezcla de OGA's a 2.5 mg/mL

Se utilizó Break Thru® al 0.05% como agente tensoactivo en todos los tratamientos. Los muestreos se realizaron a los días 0, 5, 10 y 15 después de la aplicación de los tratamientos.

Determinación de Color

La evaluación de color se llevó a cabo mediante la técnica descrita por Carreño y cols. (1995) utilizando un colorímetro Minolta CR-300. Se emplearon los valores L*, a*, b* para evaluar °Hue y Chroma* y posteriormente se usaron en la ecuación de *Índice de Color para Uvas Rojas* (CIRG). En el cual el color verde-amarillo corresponde a un CIRG <2; el color rosa corresponde de >2 a <4; el color rojo de 4 a 5; y el color rojo oscuro de 5 a 6. Debido a que se quiso observar el efecto en el aumento de la coloración (en valores de índice CIRG) para cada tratamiento, se graficó el incremento o diferencia en valores CIRG (Δ CIRG). El Δ CIRG es la diferencia de los valores del día inicial (antes de la aplicación de los tratamientos) contra los valores del índice CIRG al día final (15 días posteriores a la aplicación). Con esto, se disminuye el error en la variabilidad de cada planta respecto al estado inicial en el que se encontraban.

$$\text{CIRG} = (180 - \text{hue}) / (L^* + C^*)$$

Incremento en CIRG:

$$\Delta \text{ CIRG} = \text{CIRG}_f - \text{CIRG}_i$$

Donde f = 15 días después de la aplicación
i = día del envero (día 0)

Cuantificación de Compuestos Fenólicos y Capacidad Antioxidante

Antocianinas

Para la determinación de antocianinas se utilizaron las muestras de los días 0, 5, 10 y 15 para su análisis. Se utilizó la técnica descrita por Carreño y cols. (1997) para la obtención del extracto, en donde a partir de 1 g de epicarpio de uva triturada con nitrógeno líquido se adicionaron 10 mL de una solución de extracción que contenía metanol:HCl 1% (Sigma-Aldrich). Las muestras estuvieron en agitación por aproximadamente 12 horas en oscuridad a 4 °C. Después fueron centrifugadas a 10,400 rpm a 4 °C durante 10 minutos, se filtraron y almacenaron a -20 °C para su análisis posterior en HPLC.

Para la identificación y cuantificación individual y total de las antocianinas monoglucosiladas, se empleó la técnica de Hebrero y cols. (1989) con algunas modificaciones. Para la cuantificación de antocianinas totales se utilizó 1 mL del extracto previamente purificado con un filtro Acrodisc CR 4mm marca Pall® con membrana PTFE a 0.45 µm. Se empleó la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplada con un detector de arreglo de diodos para la separación, identificación y cuantificación de compuestos antociánicos. Se empleó una columna de 25 cm x 0.46 cm de diámetro interno, empacada con nucleosil C₁₈, con un tamaño de partícula de 5µm. La fase móvil utilizada consistió en A) ácido fórmico al 10% (Sigma-Aldrich) y B) acetonitrilo grado HPLC (Sigma-Aldrich). El gradiente empleado fue de 5 al 9 % B/15 min; 9 al 11 % de B/10 min; 11 al 15 % de B/25 min; 15 al 20% de B /10 min; y del 20 al 30 % de B /15 min. La velocidad del flujo fue de 1 mL/min y la longitud de onda utilizada fue de 520 nm. Los picos de las antocianinas detectadas fueron comparados y confirmados utilizando estándares comerciales de antocianinas

obtenidos de la casa comercial Polyphenols Laboratory. Para determinación de la concentración de las antocianinas se realizó una curva de calibración de los estándares comerciales de Delfinidina 3-glucósido, Cianidina 3-glucósido, Petunidina 3-glucósido, Peonidina 3-glucósido y Malvidina 3-glucósido.

Fenoles Totales

La determinación de fenoles totales se llevó a cabo mediante la técnica descrita por Singleton y Rossi (1965) con algunas modificaciones. Para el análisis de fenoles totales y capacidad antioxidante se utilizaron las muestras del día 0 y del día 15 de las bayas almacenadas a -20 °C. Las muestras fueron extraídas a partir de 2 gramos de epicarpio de uva, adicionándose 4 mL de metanol grado reactivo al 80 % (Sigma-Aldrich). Las muestra se homogenizaron por 30 segundos en un homogenizador de tejidos marca Ultra-Turrax, posteriormente los extractos fueron expuestos a ultrasonido durante 30 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron a 14 000 rpm a 4 °C por 15 minutos. Los sobrenadantes se filtraron con papel Whatman No.1 y fueron recolectados en tubos. El residuo se separó y se extrajo nuevamente con el mismo solvente repitiendo los pasos anteriores hasta quedar sin color. Los extractos se almacenaron a -20 °C para su análisis. Se calculó la concentración del extracto en base al peso inicial divididos entre el volumen final de la muestra, expresándose en g/mL.

Para su determinación se tomaron 50 µL del extracto metanólico antes descrito y se adicionaron 3 mL de H₂O destilada y 250 µL del reactivo Folin-Ciocalteu 1N (Sigma-Aldrich). Se dejó reposar por 5 minutos, posteriormente se adicionaron 750 µL de Na₂CO₃ al 20 % y 950 µL de H₂O destilada. Se agitaron

vigorosamente y se dejaron reposar durante 30 minutos para leerse en un espectrofotómetro (Cary 100 BIO Varian) a una longitud de onda de 765 nm. Para la evaluación del contenido de fenoles totales se realizó una curva de calibración a diferentes concentraciones empleando al ácido gálico como estándar, expresando los resultados como mg equivalentes de ácido gálico por 100 g de peso fresco.

Capacidad Antioxidante

Debido a la gran variedad de antioxidantes presentes en los frutos y a la gran diversidad de radicales libres y fuentes oxidantes, no se tiene un método oficial para evaluar la capacidad antioxidante total. Por esa razón, en nuestro estudio, se tomó en cuenta la naturaleza de la muestra y se optó por utilizar el mecanismo de transferencia de electrones (SET) (Prior y cols. 2005). Se emplearon las técnicas TEAC y DPPH (EC₅₀), las cuales son descritas a continuación:

Capacidad Antioxidante Equivalente Trolox (TEAC)

Para el análisis de TEAC se siguió el método descrito por Re y cols. (1999), en el cual se reduce la coloración azul/verde del radical ABTS^{•+} (2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) Diammonium SALT) utilizando persulfato de potasio. Para preparar el radical, se pesan 19.3 mg de radical ABTS y se disuelven en 5 mL de agua destilada. Por otra parte, se prepara el persulfato de potasio pesando 37.8 mg y disueltos en 1 mL de agua destilada. Posteriormente se utilizan 88 µL del persulfato de potasio (37.5 g/mL) y se

agregan a la solución de ABTS descrita anteriormente. Se deja incubar bajo oscuridad durante 16 horas a temperatura ambiente. En seguida, se da la formación del radical ABTS^{•+}, el cual se diluye con etanol puro hasta obtener un valor de absorbancia entre 0.7 ± 0.2 a una longitud de onda de 734 nm.

Posteriormente, para la determinación de capacidad antioxidante de los extractos, se colocaron 2970 μ L del radical preparado y se tomó una lectura inicial en un espectrofotómetro (Cary 100 BIO Varian) a una longitud de onda de 734 nm. Después se adicionaron 30 μ L del extracto metanólico del epicarpio de las uvas, se homogeneizó y se incubó por un minuto. Después de ese tiempo, se midió la absorbancia de forma continua durante 6 minutos hasta obtener una absorbancia final. El valor de TEAC se calculó al medir la disminución de la absorbancia relacionándola con el Trolox (un análogo de la vitamina E) y se expresó como mmoles de equivalentes Trolox por 100 g de peso fresco. Se llevó a cabo una curva de calibración utilizando al Trolox como estándar de referencia.

Método de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)

Para el análisis de DPPH[•] se siguió la técnica descrita por Molyneux y cols. (2004) con algunas modificaciones. Se preparó la solución pesando 2.5 mg DPPH[•] (Sigma-Aldrich) y se diluyó en 100 mL de metanol puro grado reactivo (Sigma-Aldrich). Se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro (Cary 100 BIO Varian) a una longitud de onda de 515 nm para ajustar el radical a 0.7 ± 0.02 . Se tomaron 3.9 mL de la solución de DPPH[•] y se adicionó 0.1 mL del extracto metanólico del epicarpio de las uvas, homogeneizándose vigorosamente. Se dejó reposar a 27 °C por 30 minutos en oscuridad. Posteriormente se midió espectrofotométricamente a 515 nm y se expresó la actividad de secuestro de radicales libres como % de inhibición empleando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ RSA} = \frac{(\text{Abs control} - \text{Abs muestra})}{\text{Abs control}} \times 100$$

Donde: RSA = Actividad de secuestro de radicales libres

Abs = Absorbancia

Por otra parte, se evaluó el EC₅₀ (concentración del antioxidante requerido para disminuir el 50 % de la absorbancia con respecto al control) para las muestras del día inicial (día 0) y se compararon con los extractos ajustados de las muestras del día final (día 15 o día de la cosecha) para calcular el % de actividad de secuestro de radicales libres a la concentración del inicial.

Análisis Estadístico

El diseño experimental fue completamente al azar en donde se tomaron en cuenta como variables de respuesta al color, antocianinas, fenoles totales y la capacidad antioxidante (TEAC y DPPH). Se consideró como unidad experimental 3 racimos por tratamiento y se hicieron triplicados por cada tratamiento. En caso de presentarse diferencias significativas se utilizó la prueba de Duncan con $p \leq 0.05$ para la comparación de medias. Se empleó el paquete estadístico NCSS 2007 para su análisis.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Obtención de Oligogalacturónidos

La preparación de la mezcla de oligogalacturónidos (OGA's) aplicados en este trabajo, se llevó a cabo mediante hidrólisis enzimática de acuerdo a la técnica descrita por Torres (2005). La mezcla de OGA's, obtenida por hidrólisis del ácido poligalacturónico con la enzima endo-poligalacturonasa (endo-PG) de *Aspergillus Niger* (Sigma Aldrich), se analizó por cromatografía de intercambio aniónico con detector de pulsos amperométricos (HPAEC-PAD) para determinar el grado de polimerización (GP) de los OGA's generados. En la Figura 5 se presenta la mezcla de OGA's de 2-20 GP la cual fue utilizada para la aplicación de los diferentes tratamientos a las uvas del cultivar 'Flame Seedless'.

El grado de polimerización de los OGA's es importante para mediar la actividad biológica en las plantas. Los OGA's con un GP menor a 9, podrían no ejercer una acción biológica óptima (Reymond y cols., 1995). Para el caso de nuestro estudio, se obtuvo un rango de polimerización de 2-20 el cual es similar al obtenido por Ochoa (2008) que obtuvo una mezcla de OGA's de 3 a 20 GP. Se sabe que ya que OGA's con grado de polimerización de 9 y 15 producen una mejor respuesta de defensa en las plantas que los OGA's de menor GP (Cabrera y cols., 2008; Spiro y cols., 1998). Aunque también se ha reportado que OGA's con GP menor a 5 producen actividad en tomate, sugiriendo que dependiendo del tejido, el GP requerido tendrá una actividad biológica diferente (Enríquez-Guevara y cols., 2010).

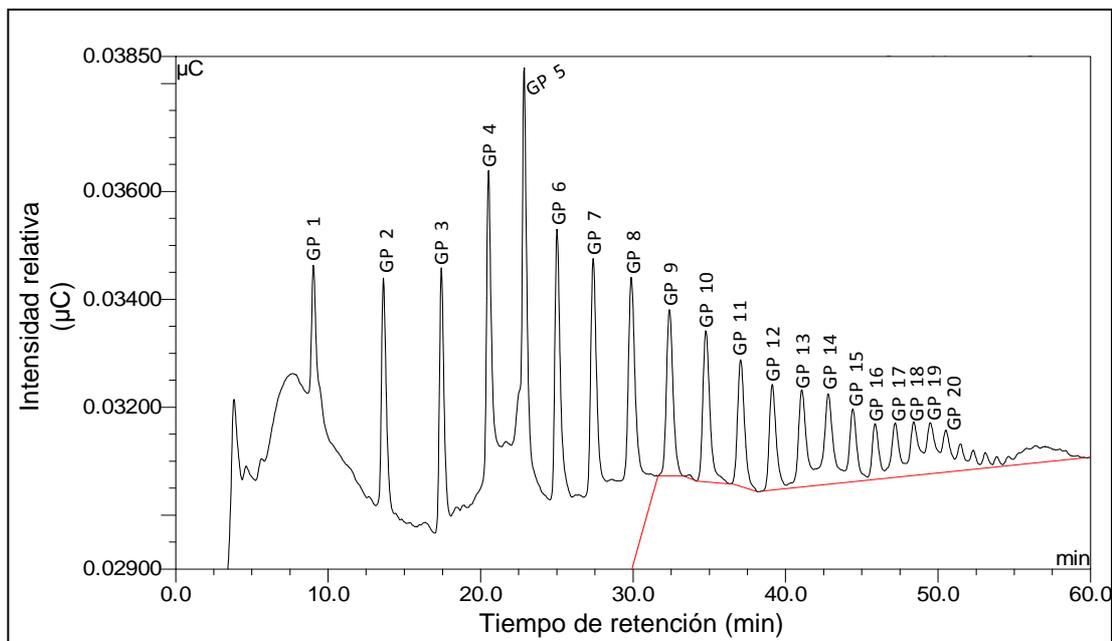


Figura 5. Cromatograma de la mezcla de OGA's (GP de 2-20) preparada mediante hidrólisis enzimática con poligalacturonasa de *Aspegillus Niger*, analizado por cromatografía de intercambio aniónico acoplado a un detector de pulsos amperométricos (HPAEC-PAD) utilizando una columna CarboPac PA-1.

Este efecto se comprobó por Ochoa (2008), en la inducción de color en uvas del cv. 'Flame Seedless', con la aplicación de una mezcla de OGA's de 3 a 20 GP. La mezcla de OGA's de 2-20 GP obtenida es la que se utilizó para evaluar su acción biológica en la inducción de color, acumulación de antocianinas individuales, contenido de fenoles y la actividad antioxidante de las uvas del cv. 'Flame Seedless'.

Color

El color es un atributo fundamental para determinar el estado de madurez y la calidad visual de las uvas rojas, el cual es definido en la última etapa de su crecimiento debido a la acumulación de antocianinas en el epicarpio de la baya (Conde y cols., 2007). En el presente estudio, la coloración de las bayas fue analizada como el índice de color para uvas rojas (CIRG, por sus siglas en inglés) (Carreño y cols., 1995).

En la Figura 6 se presenta el color en unidades CIRG en el epicarpio del cv. 'Flame Seedless' con respecto al tiempo, durante el envero (día 0) y a los 5, 10 y 15 días posteriores de la aplicación de los tratamientos de OGA's y Ethrel. El valor de CIRG en el envero, definido este cuando el 10 % de las bayas del racimo presenta inicio de coloración, fue de 0.7. Seguido de la aplicación, se mostró el efecto de los OGA's sobre el incremento en la coloración y para el día 10 un incremento significativo ($p \leq 0.05$) con respecto a las uvas testigo. A los 15 días posteriores a la aplicación, la coloración alcanzó valores CIRG entre 3.1 y 3.2 para las bayas tratadas con OGA's. Las bayas tratadas con las tres concentraciones de OGA's mostraron diferencia estadística en el color mayor que los frutos testigo ($p \leq 0.05$) al presentar una coloración mejor.

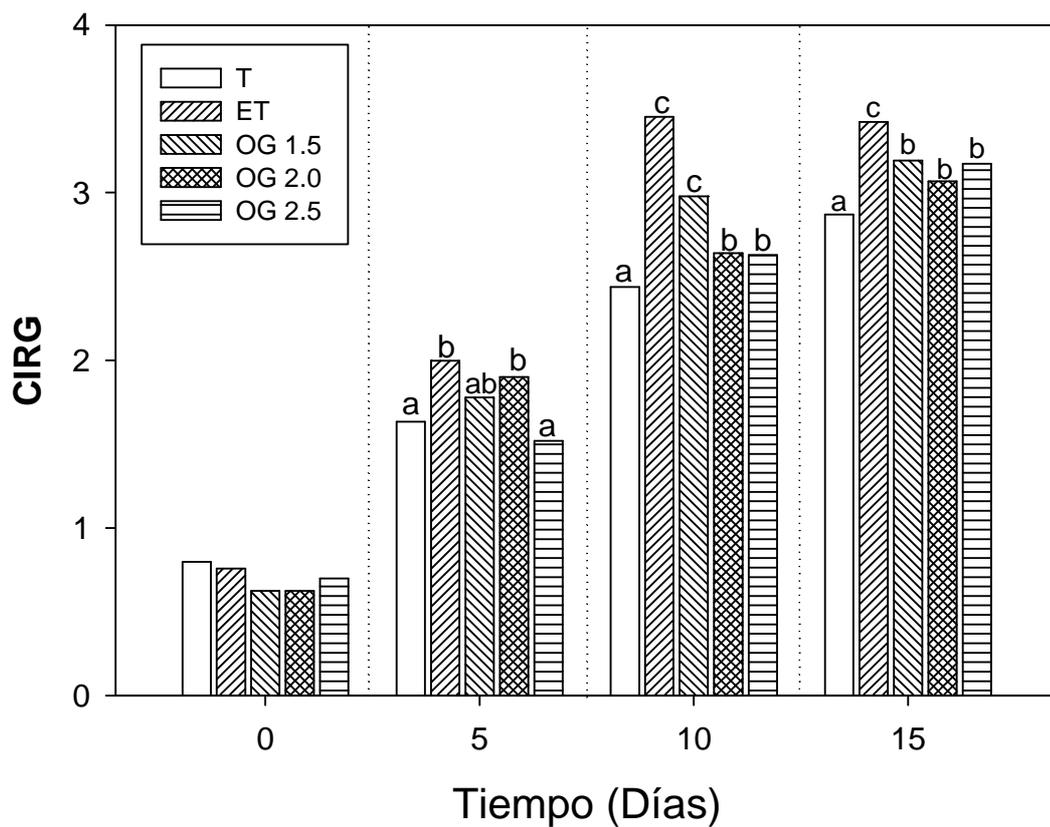


Figura 6. Índice de color para uvas rojas (CIRG) en epicarpio de uva cultivar 'Flame Seedless' a los 0, 5, 10 y 15 días después de la aplicación. Tratamientos: testigo-Agua (T), Ethrel® 0.5 mg/mL (ET), OGA's 1.5 mg/mL (OG 1.5), OGA's 2.0 mg/mL (OG 2.0) y OGA's 2.5 mg/mL (OG 2.5). Barras con literales diferentes indican diferencias significativas a $p \leq 0.05$.

Los resultados al día del envero en conjunto con los del día 15, se utilizaron para elaborar la siguiente figura, mostrándose el incremento total de color inducido por los tratamientos.

La Figura 7 presenta el incremento total del Índice de Color para Uvas Rojas (Δ CIRG) en el cv. 'Flame Seedless' evaluado 15 días después de la aplicación de los tratamientos de 1.5, 2 y 2.5 mg/mL de OGA's y de 0.5 mg/mL de Ethrel[®] utilizado como control (+). Las uvas tratadas con las tres concentraciones de OGA's mostraron un incremento significativo ($p \leq 0.05$) del CIRG respecto a las bayas testigo. El tratamiento con 1.5 mg/mL de OGA's presentó la mayor diferencia de color con respecto al testigo y a su vez este tratamiento fue significativamente superior a la aplicación de 2.0 y 2.5 mg/mL de OGA's. El tratamiento de 1.5 mg/mL de OGA's alcanzó un valor de 0.48 unidades de CIRG superiores al testigo, correspondiendo a un incremento del 23.9 % del CIRG en comparación con el testigo. La aplicación de OGA's en las concentraciones de 2.0 y 2.5 mg/mL a los 15 días después de la aplicación de los tratamientos, presentaron 0.37 y 0.40 unidades de CIRG estadísticamente superiores al testigo, correspondiendo esto a un incremento del CIRG de 17.9 y 19.3 % con respecto al testigo.

Los racimos tratados con 1.5 mg/mL de OGA's mostraron valores de Δ CIRG estadísticamente iguales ($p \leq 0.05$) a los tratados con 0.5 mg/mL de Ethrel[®], tratamiento comercial utilizado actualmente en los viñedos en Sonora para el desarrollo del color en uvas. El efecto en la inducción de color en este trabajo, fue inverso a la concentración de OGA's aplicada a las bayas, no guardando consistencia con los resultados obtenidos por Ochoa (2008), quien reportó un incremento proporcional del CIRG con respecto a incrementos en la concentración de OGA's aplicada.

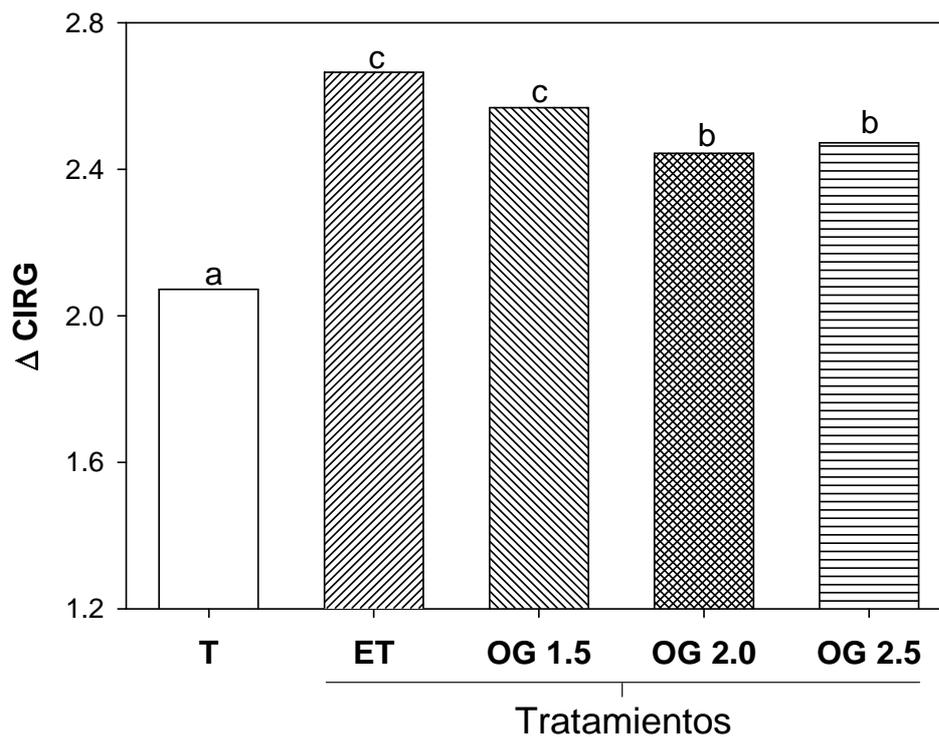


Figura 7. Cambio expresado como incremento en el color, evaluado con el índice CIRG de las bayas del cultivar 'Flame Seedless' a los 15 días después de la aplicación de los tratamientos: testigo-Agua (T), Ethrel® 0.5 mg/mL (ET), OGA's 1.5 mg/mL (OG 1.5), OGA's 2.0 mg/mL (OG 2.0) y OGA's 2.5 mg/mL (OG 2.5). Barras con literales diferentes indican diferencias significativas a $p \leq 0.05$.

Aun cuando el rango del GP de la mezcla de OGA's utilizada por Ochoa (2008) fue similar al aplicado en este trabajo, las concentraciones aplicadas fueron diferentes, siendo superiores a las de nuestra evaluación que la aplicada por Ochoa (2008). Flores-Villavicencio y cols. (2004) evaluaron el efecto de la aplicación de diferentes concentraciones de OGA's de 7 a 13 GP, en la acumulación de faseolina en embriones de frijol. Ellos determinaron que la concentración óptima para la activación de un metabolito no es necesariamente lineal, es decir, que la máxima producción del metabolito puede resultar a partir de una dosis intermedia o baja. De acuerdo a esto, es probable que a partir de la baja concentración de 1.5 mg/mL de OGA's se presentaran bayas con un índice de CIRG superior a las bayas inducidas a concentraciones más elevadas (2.0 y 2.5 mg/mL). A parte de ello, es importante considerar el grado de polimerización de los OGA's, ya que según el rango será una respuesta diferente que produzca a la planta así como en el tejido donde se aplique (Enríquez-Guevara y cols., 2010).

El trabajo realizado por Ochoa (2008) en la temporada 2007, en el cual aplicó 1.5 mg/mL de OGA's a las bayas del cultivar 'Flame Seedlees' (en la misma área experimental) obtuvo un CIRG de 3.53. En este trabajo el CIRG obtenido por la misma dosis de OGA's fue de 3.19 (Figura 6), este valor es menor, posiblemente se deba a los diversos factores ambientales o culturales que intervienen con el desarrollo final de la coloración. En la temporada de nuestro estudio (2009), las temperaturas medias registradas durante el período experimental, fueron 31 °C en el día y 21 °C en la noche. En la investigación realizada por Ochoa (2008), las temperaturas promedio fueron de 27 °C (día) y 19 °C (noche), mostrando ser más bajas que las presentadas durante nuestro estudio. Por lo que atribuimos que la diferencia en la coloración está relacionada a estas condiciones de temperatura, más que a las concentraciones de OGA's utilizadas, que en el caso de Ochoa (2008) fueron de 1.5, 1.0 y 0.5

mg/mL, no presentando diferencias significativas entre ellas en el índice de color.

Diversos estudios señalan que el desarrollo de la coloración de las uvas puede ser afectado por los excesos de temperaturas durante la noche o en el día. Esto es debido a que la síntesis de los pigmentos responsables del color es altamente influenciada por las condiciones ambientales (Kong y cols., 2003; Winkler y cols., 1974). Mori y cols. (2005) señalaron que las temperaturas nocturnas cercanas a los 30 °C pueden provocar disminución de la síntesis de antocianinas, pigmentos responsables de la coloración. Esto es debido a un descenso en la actividad de la enzima PAL (Mori y cols., 2005) así como una reducción en la expresión del gen que codifica para la UFGT, enzima clave de la síntesis de antocianinas (Boss y cols., 1996).

Otros trabajos realizados en vid de mesa en la misma región del Desierto Sonorense, donde las temperaturas suelen ser muy altas durante el desarrollo de color en las uvas, muestran el efecto del sombreado y la luminosidad sobre el color de los racimos del mismo cultivar, obteniendo un índice CIRG de 3.18 (Leguizamón y cols., 2008). Estos resultados son similares a los encontrados en nuestro experimental por efecto de la aplicación de OGA's para la inducción de color en uvas del cv. 'Flame Seedless'. En base a lo anterior se comprueba que una buena coloración del fruto puede ser influenciada por los excesos de temperaturas tanto diurnas como nocturnas, afectándose la acumulación de antocianinas. Con el empleo de OGA's se obtuvieron mejores coloraciones comparadas con las uvas testigo a pesar de las temperaturas presentadas en el viñedo durante el desarrollo de la coloración.

Cuantificación de Compuestos Fenólicos y Capacidad Antioxidante

Antocianinas

En las uvas rojas o negras, la síntesis de antocianinas se inicia con el envero y continúa junto con el crecimiento y maduración de las bayas. Regularmente esto ocurre de 9 a 10 semanas después de la floración (Boss y cols., 1996). En este trabajo se inicio el análisis del contenido de antocianinas totales del epicarpio de las bayas a partir del envero (día 0) y a los 5, 10 y 15 días posteriores de la aplicación de los tratamientos, utilizando la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para su estudio.

En la Figura 8 se presenta el contenido de antocianinas totales expresadas en mg/100 g de peso fresco al día 0, 5, 10 y 15 días después de la aplicación de los tratamientos de 1.5, 2.0 y 2.5 mg/mL de OGA's y de 0.5 mg/mL de Ethrel[®]. En el día 0 (envero), antes de aplicar los tratamientos, no se detectaron antocianinas cuantificables a pesar de la sensibilidad del equipo (Figura 8 a). Se puede observar que las bayas tratadas con OGA's presentaron niveles de antocianinas totales significativamente superiores ($p \leq 0.05$) a partir de los 5 y 10 días después de la aplicación en comparación con las uvas testigo (Figura 8 b y c). Al día 15 después de la aplicación de los tratamientos (Figura 8 d), continuaron tendencias similares en relación a las uvas tratadas con OGA's, presentando mayor acumulación de antocianinas comparando con las testigo (10.58 mg/100 g PF).

La concentración más alta de OGA's utilizada (2.5 mg/mL), fue el tratamiento que indujo una acumulación significativamente superior ($p \leq 0.05$) (89.63 mg/100 g PF) en comparación a las concentraciones de 1.5 y 2.0 mg/mL de OGA's (52.95 y 39.40 mg/100 g PF), respectivamente.

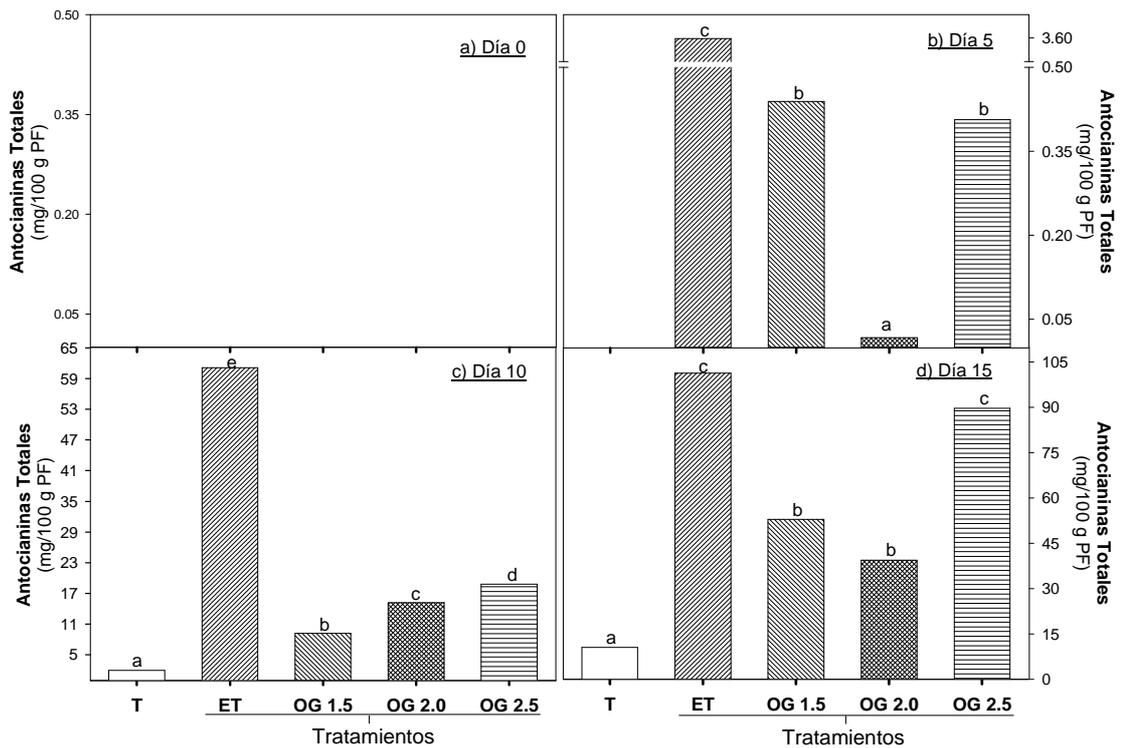


Figura 8. Contenido de antocianinas totales expresado en mg/100 g de peso fresco (PF) en extractos de epicarpio de uva cultivar 'Flame Seedless' a los 0 (a), 5 (b), 10 (c) y 15 días (d) después de la aplicación. Tratamientos: testigo-Agua (T), Ethrel® 0.5 mg/mL (ET), OGA's 1.5 mg/mL (OG 1.5), OGA's 2.0 mg/mL (OG 2.0) y OGA's 2.5 mg/mL (OG 2.5). Barras con literales diferentes indican diferencias significativas a $p \leq 0.05$.

La acumulación de antocianinas en el epicarpio tratado con 2.5 mg/mL de OGA's fue estadísticamente igual a las uvas tratadas con Ethrel® (101.31 mg/100 g PF). Los tratamientos de 1.5, 2.0 y 2.5 mg/mL de OGA's incrementaron 5, 3.72 y 8.46 veces la acumulación de antocianinas, respectivamente, en comparación con las uvas testigo evaluados a los 15 días después de la aplicación.

Una de las enzimas activadoras de la ruta de las antocianinas es la fenilalanina amonio-liasa (PAL), la cual empieza a mostrar actividad a las 8 semanas después de la floración al inicio del envero (Boss y cols., 1996). Al aumentar la actividad de esta enzima, se aumenta la biosíntesis de las antocianinas. En nuestro estudio, la acción de los OGA's fue notable al presentarse un incremento en la acumulación de antocianinas a partir del quinto día después de la aplicación de los tratamientos (Figura 8 b). Pudiendo deberse a la acción de los OGA's sobre la ruta de los fenilpropanoides, ya que previamente se demostró que el mRNA del gen de la PAL, se incrementa por la aplicación de OGA's (Ochoa, 2008). Este efecto conlleva la acumulación de las antocianinas en las bayas tratadas con OGA's en mayor proporción que las uvas testigo.

En España, en un estudio realizado por Carreño y cols. (1997), llevaron a cabo una clasificación quimicotaxonomica basada en el perfil de antocianinas y el color externo en uvas rojas de mesa. Ellos reportaron que el cv. 'Flame Seedless' presenta una coloración rojiza tenue, con un contenido de antocianinas totales de 14.8 mg/100 g PF, considerado un nivel bajo, aun cuando es un valor superior que el valor de 10.57 mg/100 g PF presentado por las uvas testigo en esta investigación.

En la temporada 2007, Ochoa (2008) reportó un incremento dos veces mayor en la acumulación de antocianinas en uvas tratadas con 1.5 mg/mL de

OGA's en comparación con las testigo, utilizando un método analítico distinto al utilizado en este trabajo. Sin embargo, esta misma tendencia se presentó en nuestro estudio, temporada 2009, al utilizar concentración similar de 1.5 mg/mL de OGA's, incrementándose cinco veces más a las antocianinas acumuladas que las uvas testigo ($p \leq 0.05$). Leguizamón y cols. (2008), reportaron un contenido de antocianinas de 68.8 mg/100 g equivalentes de malvidina 3-O glucósido para cv. 'Flame Seedless' utilizando el efecto del sombreado y la luminosidad en regiones cercanas a nuestro experimental. Estos valores mostraron ser más bajos que los obtenidos en nuestro estudio con el empleo de OGA's a 2.5 mg/mL. Con estos resultados se comprueba la reproducibilidad de respuesta de los OGA's para inducir la coloración y acumulación de antocianinas totales en las uvas de mesa.

No obstante, los resultados de este trabajo no presentaron una tendencia proporcional al aumento en la concentración de OGA's como fue señalado por Ochoa (2008), pero si se obtuvo mayor acumulación de antocianinas que en las uvas testigo. Debido a que este experimental fue realizado en campo, la probabilidad de observar una tendencia lineal en el contenido de antocianinas al aumentar la concentración de los OGA's puede resultar algo diferente. Es probable que tanto los factores culturales como ambientales (Bergqvist y cols., 2001) influyan en la acumulación total de las antocianinas, teniendo respuestas diferentes para cada planta. Sin embargo, la respuesta de las uvas tratadas con OGA's siempre se mantuvo significativamente mayor que los frutos testigo.

Por otra parte el incremento en el color de las bayas en relación al aumento en la concentración de OGA's, no fue proporcional (Figura 6), como lo fue el contenido de antocianinas. Las uvas tratadas con 2.5 mg/mL de OGA's presentaron una mayor acumulación de antocianinas en comparación con las testigo, al igual que una mejor coloración ($p \leq 0.05$). El incremento en la coloración de las uvas tratadas con OGA's 2.5 mg/mL fue menor que el

presentado por las uvas tratadas con Ethrel[®], pero con igualdad estadística en la acumulación de antocianinas. Peppi y cols. (2006) señalaron que el contenido de antocianinas no es lineal con respecto al color de las bayas. Esto podría indicar que la coloración del fruto (en escala CIRG) no es completamente dependiente al contenido de antocianinas. Más bien, se debe al aporte de pigmentación que proporciona cada una de las antocianinas y su forma de actuar en conjunto. En base a lo anterior, la coloración total podría depender de la cantidad de grupos hidroxilos y metoxilos en el anillo B de la molécula que ocasionan el cambio en la absorbancia a 520 nm.

Por lo anterior se llevo a cabo un análisis de correlaciones (Pearson) para evaluar la relación entre los valores de CIRG y antocianinas totales. Se observó una correlación lineal positiva moderada ($r=0.67$, $p\leq 0.05$) entre estas dos variables, mostrándose que conforme aumente el contenido de antocianinas, el valor CIRG se incrementará proporcionalmente. No obstante, a pesar de presentarse una linealidad positiva entre los valores, la correlación fue moderada, siendo así que la concentración individual de cada una de las antocianinas podría estar más relacionada con la intensidad del color que el contenido total de antocianinas.

La composición individual de las antocianinas es dependiente de cada cultivar y es determinado mayormente por los factores genéticos. En cultivares como 'Flame Seedless', solo se detectan cinco antocianinas monoglucosiladas, las cuales son delphinidna (Df), cianidina (Cy), petunidina (Pt), peonidina (Pn) y malvidina (Mv) (Fernández-López y cols., 1998). Por lo que se cuantificaron individualmente las 5 antocianinas identificadas en extractos de epicarpio de uva cv. 'Flame Seedless', expresadas en mg/100 g de peso fresco (PF) a los 0, 5, 10 y 15 días posteriores de la aplicación de los tratamientos, las cuales se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Contenido de antocianinas individuales expresadas en mg/100 g de PF a los 5, 10 y 15 días después de la aplicación en el cv. 'Flame Seedless'. Df-3-glu (delfinidina-3-glucósido), Cy-3-glu (cianidina-3-glucósido), Pt-3-glu (petunidina-3-glucósido), Pn-3-glu (peonidina-3-glucósido) y Mv-3-glu (malvidina-3-glucósido).

Día	Tratamiento	Antocianinas monoglucosiladas (mg/100 g de PF)				
		Df-3-glu	Cy-3-glu	Pt-3-glu	Pn-3-glu	Mv-3-glu
0	Testigo	ND	ND	ND	ND	ND
	Ethrel	ND	ND	ND	ND	ND
	OGA's 1.5	ND	ND	ND	ND	ND
	OGA's 2.0	ND	ND	ND	ND	ND
	OGA's 2.5	ND	ND	ND	ND	ND
5	Testigo	ND	ND	ND	ND	ND
	Ethrel	0.53 ^b	1.49 ^b	ND	1.58 ^b	ND
	OGA's 1.5	0.40 ^b	0.08 ^a	ND	ND	ND
	OGA's 2.0	ND	ND	ND	0.02 ^a	ND
	OGA's 2.5	0.15 ^a	ND	ND	0.25 ^a	ND
10	Testigo	ND	0.56 ^a	ND	0.75 ^a	0.67 ^a
	Ethrel	11.70 ^d	11.76 ^c	2.77 ^b	25.9 ^c	9.03 ^c
	OGA's 1.5	0.21 ^a	1.70 ^b	ND	1.81 ^a	5.57 ^b
	OGA's 2.0	3.10 ^b	1.66 ^b	0.52 ^a	4.87 ^b	5.01 ^b
	OGA's 2.5	7.88 ^c	2.88 ^b	0.90 ^a	5.82 ^b	8.41 ^c
15	Testigo	2.71 ^a	3.09 ^a	0.22 ^a	2 ^a	2.57 ^a
	Ethrel	13.96 ^{bc}	26.75 ^b	3.75 ^c	32.31 ^b	24.54 ^c
	OGA's 1.5	8.97 ^{ab}	21.97 ^b	2.40 ^b	14.66 ^{ab}	4.96 ^a
	OGA's 2.0	5.71 ^{ab}	9.30 ^{ab}	0.81 ^a	6.58 ^a	17.02 ^b
	OGA's 2.5	20.20 ^c	15.64 ^{ab}	4.09 ^c	27.77 ^b	21.94 ^c

Literales diferentes indican diferencias significativas a $p \leq 0.05$.

ND: No detectadas

Al día inicial, no se detectaron antocianinas individuales para ninguna de las uvas tratadas y no tratadas. A partir del quinto día después de la aplicación de los tratamientos de 1.5, 2.0 y 2.5 mg/mL de OGA's y 0.5 mg/mL de Ethrel®, fueron detectadas por HPLC, tres antocianinas monoglucosiladas, siendo Cy, Pn y Df. Posterior a los 10 días, se detectaron dos antocianinas más, las cuales corresponden a Pt y Mv, para casi todas las uvas tratadas con OGA's y Ethrel® a excepción de las testigo, observándose cambios visuales en la coloración de las bayas.

Después de los 15 días, la acumulación de las antocianinas individuales en las uvas tratadas con OGA's fue mayor significativamente comparadas con las uvas testigo, detectándose el perfil completo de las antocianinas para el cv. 'Flame Seedless' (Figura 9 a). Esto coincide con lo reportado por Fernández-López y cols. (1998) y Cantos y cols. (2002) para este mismo cultivar. Los picos detectados en el cromatograma de los extractos, coincidieron en el orden y tiempo de retención de los estándares utilizados, mostrando que Df como compuesto más polar eluyó primero, seguida por Cy, Pt, Pn y por último Mv, misma tendencia reportada por Hebrero y cols. (1989) y Pomar y cols. (2005) (Figura 9b).

Como se mencionó anteriormente, las uvas tratadas con 1.5, 2.0 y 2.5 mg/mL de OGA's y 0.5 mg/mL de Ethrel®, incrementaron significativamente la acumulación de antocianinas en comparación con las bayas testigo ($p \leq 0.05$). Las uvas tratadas con 2.5 mg/mL de OGA's y 0.5 mg/mL de Ethrel® presentaron una cuantificación estadísticamente igual ($p \leq 0.05$) a los 15 días después de la aplicación de los tratamientos (Tabla 2).

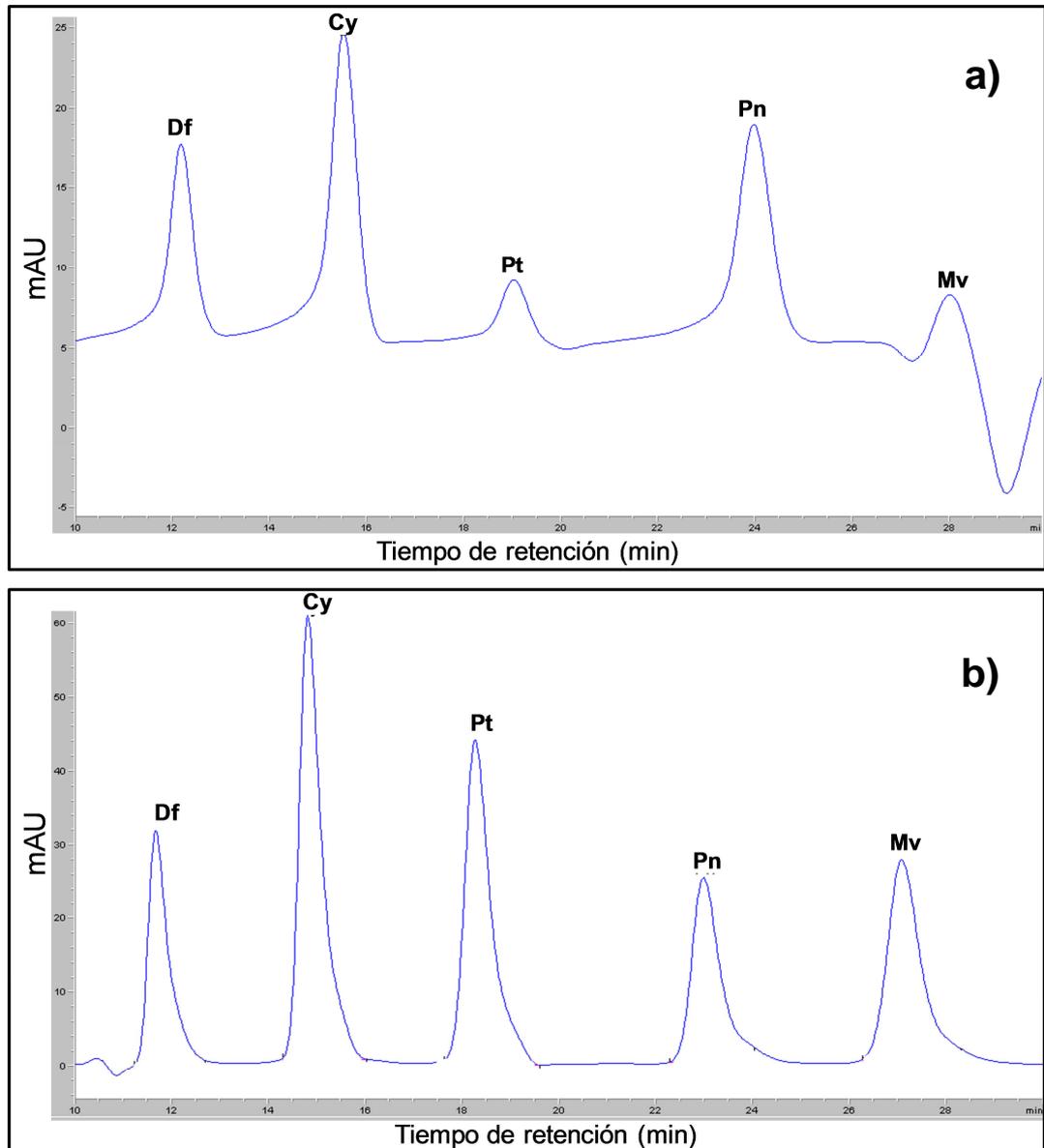


Figura 9. a) Antocianinas monoglucosiladas presentes en extracto de epicarpio de uva cv. 'Flame Seedless' tratado con 2.5 mg/mL de OGA's 15 días después de la aplicación del tratamiento. b) cromatograma de estándares de antocianinas monoglucosiladas delfinidina (Df), cianidina (Cy), petunidina (Pt), peonidina (Pn) y malvidina (Mv), evaluadas por HPLC con detector de arreglo de diodos (DAD) equipado con una columna C18 a 520 nm.

Se presentó mayor acumulación de Pn para las bayas tratadas con 2.5 mg/mL de OGA's al igual que las tratadas con Ethrel[®]. Mientras que la acumulación de Cy fue mayoritaria para las bayas tratadas con 1.5 mg/mL de OGA's al igual que con las de Ethrel[®]. La Mv se acumuló en la misma proporción ($p \leq 0.05$) en las uvas tratadas con 2.5 mg/mL de OGA's y Ethrel[®]. En relación a la acumulación de Df y Pt, fue mayoritaria para las uvas tratadas con 2.5 mg/mL de OGA's. Las bayas tratadas con 2.0 mg/mL de OGA's presentaron mayor acumulación de Mv, mostrando ser estadísticamente superiores a las bayas tratadas con 1.5 mg/mL de OGA's y al testigo.

En nuestro estudio, la Cy y Df fueron de las primeras antocianinas en formarse por efecto de la aplicación de los tratamientos. Esteban y cols. (2001) señalan que Cy es de las primeras antocianinas en ser sintetizada durante el desarrollo de color del cv. 'Tempranillo', y aumenta conforme va madurando, pero sufre una disminución gradual al finalizar su desarrollo. Del mismo modo, Fernández-López y cols. (1998) y Pomar y cols. (2005) señalan esta misma tendencia en el cv. 'Flame Seedless', proponiendo que a partir de Cy se derivan las antocianinas con tres sustituyentes como Df. En nuestro estudio, esta tendencia no se presentó, al contrario, la Cy fue en aumento conforme maduraron los racimos. Esto podría indicar que no necesariamente la síntesis de las antocianinas con tres sustituyentes parte de la Cy. Lo anterior también lo señala Boss y cols. (1996) en el cv. 'Shiraz', quienes no encontraron evidencia en la conversión de Cy a Df.

En nuestro estudio, la acumulación de Pn fue mayoritaria a los 15 días después de la aplicación de los tratamientos, presentándose una tendencia de los OGA's por acumular en mayor proporción esta antocianina en comparación con las bayas testigo. Esto difiere con lo que reportado para el cv. 'Flame Seedless', sin ser tratadas con OGA's por Fernández-López y cols. (1998). En cambio, Cantos y cols. (2002) que evaluaron el perfil de antocianinas en uvas

de mesa sin tratar como 'Flame Seedless', encontraron a Pn como la antocianina principal de ese cultivar. Los cultivares de baja pigmentación como 'Crimson Seedless' por lo regular contienen en mayor concentración a la Pn (Human y Bindon, 2008). Debido a lo anterior, las coloraciones del cv. 'Flame Seedless', son de baja pigmentación, situándose en el rango de color de rosa a rojo.

En cuanto a la acumulación de Pt, se presentó en menor concentración al resto de las antocianinas individuales cuantificadas después de los 15 días de la aplicación de los tratamientos. Esto se podría deber a que la Pt se sintetiza de manera intermedia en la biosíntesis de las antocianinas entre delphinidina y malvidina (Fournand y cols., 2006).

Por otra parte se observó una tendencia en la acumulación de Mv (antocianina metoxilada) conforme fue aumentando la concentración de OGA's. Posiblemente se deba a que exista una tendencia de los OGA's en incrementar la actividad de enzimas como la 3'5'-O-metiltransferasa (3'5'-OMT). La enzima 3'5'-OMT se ha observado que es responsable de agregar grupos metoxilados en los carbonos 3' y 5' del anillo B de la molécula (Mattivi y cols., 2006; Pomar y cols., 2005). Esta tendencia también la señala Ochoa (2008) al aplicar 1.5 mg/mL de OGAs a bayas del mismo cultivar. Es posible que, conforme aumenta la concentración de OGA's, aparte de incrementar la acumulación de las antocianinas, ayuda a que la síntesis continúe hacia la producción de las antocianinas finales de la ruta biosintética. Sin embargo, se necesitan hacer estudios más profundos en donde se evalúe la influencia de los OGA's en la expresión genética de las enzimas involucradas en las etapas finales de la biosíntesis de las antocianinas como la 3'5'-OMT.

La aplicación de OGA's incrementó significativamente la coloración y la acumulación de las antocianinas en comparación con las uvas testigo. No obstante, el patrón del perfil individual de las antocianinas no fue idéntico para

todas las bayas tratadas con OGA's, pero si se pudo observar una tendencia en su acumulación. El incremento de la coloración en las uvas tratadas con 1.5 mg/mL de OGA's mostraron ser estadísticamente iguales a las tratadas con Ethrel[®], pero el contenido de antocianinas totales fue menor. Sin embargo, el perfil individual de antocianinas fue similar, a excepción en la acumulación de Pt y Mv. Por otra parte, las uvas tratadas con 2.0 y 2.5 mg/mL de OGA's que incrementaron la coloración estadísticamente igual en las bayas, mostraron acumulación de antocianinas de manera diferente.

Por consiguiente, el aporte individual de cada antocianina debido a su estructura química así cómo su forma de actuar en conjunto entre ellas, tendrán una expresión en la coloración total del fruto, tomando en cuenta el pH a las se encuentren presentes (Hurtado y cols., 2009). Es por eso que podría considerarse que la relación entre el contenido de antocianinas y el color de las uvas no es completamente lineal (Peppi y cols., 2006). Singh Brar y cols. (2008) señalan que el color de las uvas está más relacionado a la concentración relativa de las antocianinas iniciales (Cy) y finales (Mv) de la biosíntesis de las antocianinas en el epicarpio de uvas 'Crimson Seedless'.

Por lo anterior, se relacionaron los valores de índice CIRG con el contenido individual de cada antocianina obteniéndose valores de r de 0.64, 0.61, 0.59, 0.54 y 0.37 para Cy, Pn, Pt, Mv y Df respectivamente, en donde la correlación de Df con CIRG no fue significativa ($p \geq 0.05$). Se observó que antocianinas con dos sustituyentes (Cy y Pn) presentaron mayor correlación entre la variable de CIRG que las antocianinas con 3 sustituciones. Diversos autores como Carreño y cols. (1997) han coincidido en que los cultivares que presentan acumulación de antocianinas individuales con tres sustituciones en el anillo B (Df, Pt y Mv) poseen coloraciones más intensas (rojo oscuro, violeta o azulado). En nuestro estudio, hubo mayor acumulación de Cy y Pn, lo cual concuerda con lo reportado por Carreño y cols. (1997) y Cantos y cols. (2002). Estas antocianinas

son las que se encuentran comúnmente en cultivares con coloraciones bajas, como 'Flame Seedless'. Así mismo, a parte de las antocianinas, las uvas se componen de otros polifenoles que pudieran involucrarse en la coloración de las bayas.

Fenoles Totales

En la Figura 10 se presentan los resultados del contenido de fenoles totales para epicarpio de uva 'Flame Seedless' después de 15 días del tratamiento con diferentes concentraciones de OGA's. Se observó una disminución significativa ($p \leq 0.05$) en el contenido de fenoles para todos los tratamientos y frutos testigo durante el tiempo después del tratamiento. Sin embargo, tal disminución se llevó en diferente grado para cada tratamiento.

El contenido de fenoles totales en los frutos tratados con OGA's presentó la menor disminución, notándose con el mayor contenido de fenoles. Al aumentar la concentración de OGA's se observó una disminución del contenido de fenoles, sin encontrarse diferencias significativas entre la concentración intermedia, alta y los frutos testigos. Mientras que los frutos tratados con Ethrel[®] presentaron el contenido más bajo.

En las uvas, el contenido de fenoles, por lo general disminuye conforme el fruto empieza a madurar, debido a que son degradados y utilizados en la biosíntesis de otros compuestos (Adams, 2006).

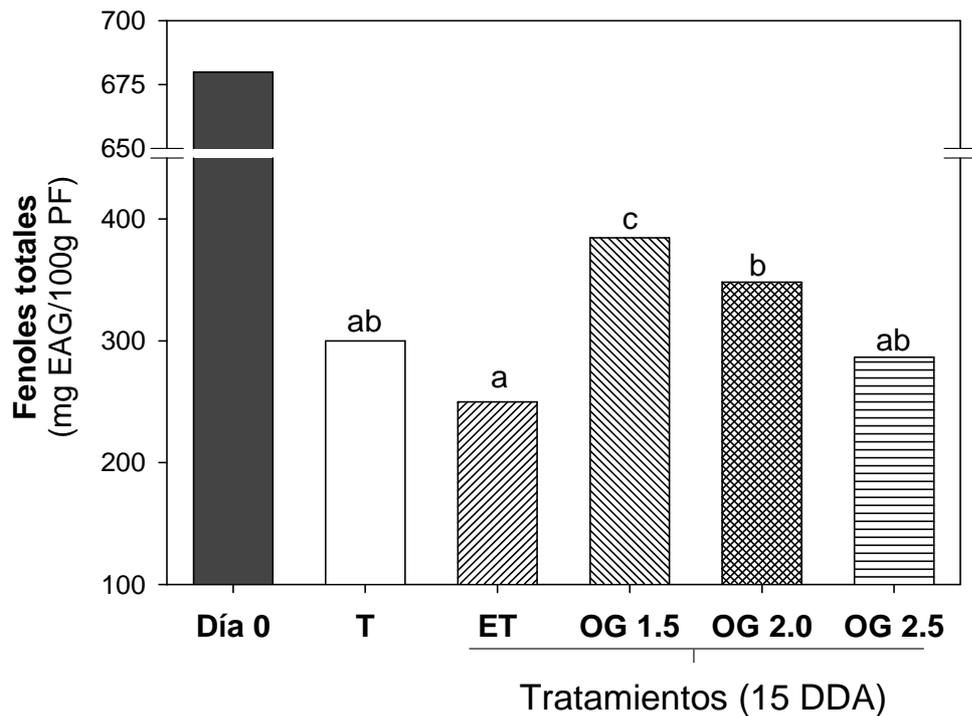


Figura 10. Contenido de fenoles totales expresados en mg equivalentes de ácido gálico/100 g de peso fresco (PF), en cultivar 'Flame Seedless' al día inicial (día 0) y 15 días después de la aplicación (15 DDA). Tratamientos: Testigo-Agua (T), Ethrel[®] 0.5 mg/mL (ET), OGA's 1.5 mg/mL (OG 1.5), OGA's 2.0 mg/mL (OG 2.0) y OGA's 2.5 mg/mL (OG 2.5). Barras con literales diferentes indican diferencias significativas a $p \leq 0.05$.

En nuestro estudio, el contenido inicial de fenoles totales en las uvas antes del tratamiento fue de 679 mg EAG/100 g de peso fresco, mientras que después de ser tratadas, la concentración de fenoles disminuyó conforme las bayas empezaron a madurar y a desarrollar color. Esto coincide con los resultados presentados por Alonso-Borbalán y cols. (2003) que reportaron una disminución en el contenido total de polifenoles durante la maduración en bayas de cultivares rojos. Esta misma tendencia se presentó en el cv. 'Flame Seedless' en un estudio realizado en Sonora en donde observaron una disminución del contenido de fenoles conforme avanzó la madurez de las bayas (Leguizamón, 2006).

Las uvas testigo a los 15 días presentaron una ligera disminución del contenido de fenoles totales en comparación a las que se les aplicó Ethrel[®], pero su contenido de antocianinas y la coloración fue baja. En cambio, la aplicación de 1.5 mg/mL de OGA's provocó una leve disminución del contenido de fenoles totales e incrementó el contenido de antocianinas totales en el epicarpio de las bayas. Las uvas tratadas a concentraciones elevadas de OGA's (2.5 mg/mL) como las tratadas con Ethrel[®] mostraron menor contenido de fenoles totales aun cuando estos dos tratamientos presentaron mayor acumulación de antocianinas. Esto se pudo deber a que tanto la concentración elevada de OGA's (2.5 mg/mL) como la aplicación de Ethrel[®] ocasionan una rápida maduración del fruto y durante este proceso, los fenoles presentes pudieron ser utilizados como sustratos para la síntesis de antocianinas, en las etapas finales de la maduración (Adams, 2006).

En cultivares de 'Flame Seedless', los compuestos fenólicos que se han reportado en mayor proporción son el ácido gálico, seguido de la rutina y el resveratrol (Molina-Quijada y cols., 2010). Aziz y cols. (2004) observaron que la aplicación de una mezcla de OGA's en hojas de plantas de vid, redujeron la infección provocada por *Botrytis cinerea*, debido a la inducción de la síntesis de

compuestos fenólicos que inhiben el crecimiento del fitopatógeno. Así mismo se ha encontrado que el resveratrol, presente en el epicarpio de las uvas, inhibe el crecimiento de hongos (Szajdek y Borowska, 2008). Por lo anterior, se pudiera pensar que la aplicación de OGA's aparte de inducir color en las uvas con la acumulación de antocianinas, mantiene niveles altos de otros compuestos fenólicos comparando con los frutos testigo y los tratados con Ethrel[®].

Particularmente el contenido de fenoles totales en este estudio al día de la cosecha, resultaron superiores (384.57 mg EAG/100 g PF) ($p \leq 0.05$) en las bayas tratadas con 1.5 mg/mL de OGA's en comparación al resto de los tratamientos. Estos valores son más altos comparando con 561 mg/kg de fenoles totales reportado por Cantos y cols. (2002) cuantificados en bayas enteras de cv. 'Flame Seedless'. Así mismo, Leguizamón (2006) reportaron para el mismo cultivar un contenido de fenoles totales de 101 mg EAG/100 g. El alto contenido de fenoles totales que presentaron las bayas tratadas, podría suponer que los OGA's a concentraciones menores, contribuyen a mantener el contenido de fenoles evitando una disminución progresiva por efecto de la maduración. Es importante recalcar que las diferencias observadas hasta el momento en el contenido de antocianinas y fenoles totales podrían tener un efecto sobre la capacidad antioxidante de los frutos.

Capacidad Antioxidante

TEAC

En la Figura 11 se presentan el efecto de los tratamientos con OGA's en comparación con Ethrel® y los frutos testigo en los valores de la capacidad antioxidante TEAC del epicarpio de uva cv. 'Flame Seedless'. Los valores de TEAC de los frutos tratados al día de la cosecha fueron significativamente menores que los encontrados en frutos muestreados al inicio del experimento. Sin embargo, las bayas tratadas con OGA's a concentraciones de 1.5 y 2.0 mg/mL mostraron valores TEAC de 16.91 y 8.18 % más altos respectivamente, a los frutos testigo. Las bayas tratadas con 1.5 mg/mL de OGA's presentaron el valor TEAC más alto ($p \leq 0.05$) comparado con el resto de los tratamientos. Así mismo, la aplicación de 2.0 mg/mL de OGA's presentó valores TEAC estadísticamente superiores ($p \leq 0.05$) en las bayas que las tratadas con Ethrel®. Los extractos provenientes de las bayas tratadas con Ethrel® y las testigo mostraron un valor TEAC más bajo, siendo estadísticamente igual a los extractos provenientes del tratamiento 2.5 mg/mL de OGA's.

Estudios previos reportan una disminución de la capacidad antioxidante así como el contenido de fenoles totales durante el curso de la maduración, (Alonso-Borbalán y cols., 2003; Leguizamón, 2006) en cultivares de uvas rojas. El epicarpio de las bayas, antes de ser tratadas, presentó valores altos de TEAC alrededor de 7.4 mmoles ET/100 g de peso fresco. Quince días después de la aplicación se observó un efecto significativo en la capacidad antioxidante de los extractos de epicarpio de las bayas tratadas con 1.5 y 2.0 mg/mL de OGA's.

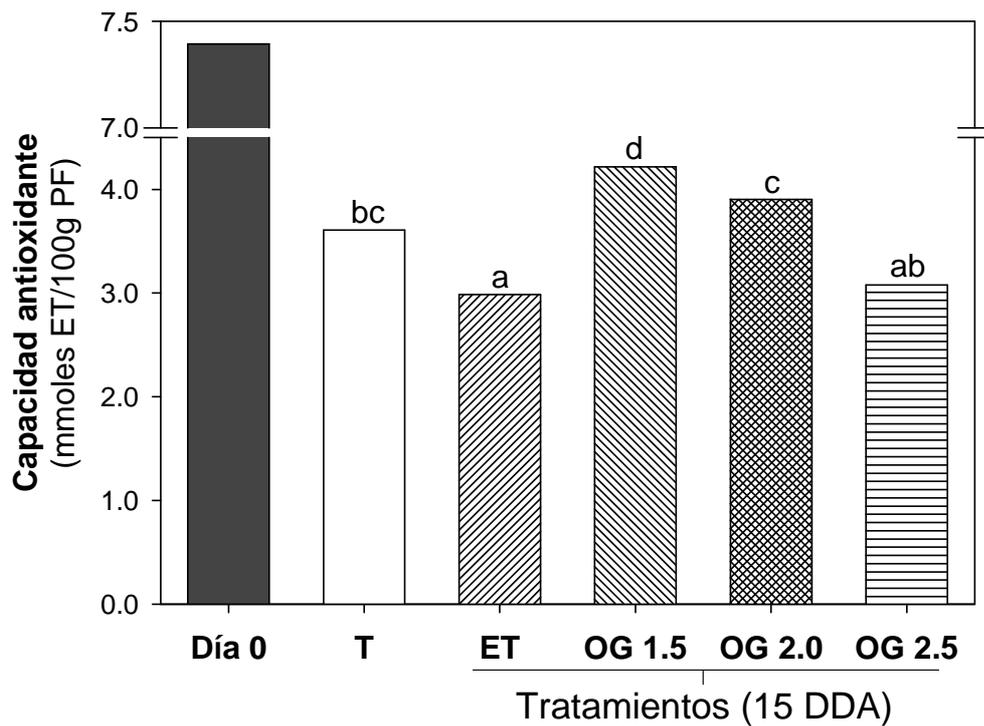


Figura 11. Capacidad antioxidante expresada en mmoles equivalentes trolox/100 g de peso fresco (PF), en cultivar 'Flame Seedless' al día 0 (inicial) y 15 días después de la aplicación (15 DDA). Tratamientos: Testigo-Agua (T), Ethrel® 0.5 mg/mL (ET), OGA's 1.5 mg/mL (OG 1.5), OGA's 2.0 mg/mL (OG 2.0) y OGA's 2.5 mg/mL (OG 2.5). Barras con literales diferentes indican diferencias significativas a $p \leq 0.05$.

Estos tratamientos mostraron una tendencia en evitar la disminución progresiva de la capacidad antioxidante por efecto de la maduración. Se presentó un efecto contrario con las uvas tratadas con Ethrel[®] al mostrar valores TEAC por debajo de las tratadas con OGA's y de los frutos testigo ($p \leq 0.05$). Comportamiento similar al que se observó con el contenido de fenoles en las bayas tratadas con 1.5 y 2.0 mg/mL de OGA's fue superior ($p \leq 0.05$) al de las tratadas con Ethrel[®] y 2.5 mg/mL de OGA's.

Existe una gran variedad de compuestos fenólicos presentes en las uvas, razón por la cual se han considerado un alimento rico en antioxidantes (Adams, 2006). Se sabe que los compuestos fenólicos son considerados excelentes compuestos antioxidantes debido a la localización de sus grupos OH en el anillo A y B de la molécula (Rice-Evans y cols., 1996) Romero y cols. (2008) evaluaron la capacidad antioxidante de 4 estándares de las antocianinas 3-glucósido, de los cuales obtuvieron valores TEAC de 1.37, 1.73, 1.89 y 6.99 mM para Mv, Pn, Cy y Df respectivamente. El valor de Pt no fue evaluado en el artículo. Se observa que la Mv y Pn 3-glucósido tiene el valor TEAC más bajo comparado con las demás antocianinas, debido a su estructura. En el caso de nuestro estudio, la Pn fue la antocianina mayoritaria en los extractos de bayas tratadas con Ethrel[®] y 2.5 mg/mL de OGA's. Esta antocianina posee un hidroxilo y un metoxilo en el anillo B de la molécula. Así mismo la Mv, segunda antocianina mayoritaria en bayas tratadas con 2.5 mg/mL de OGA's, posee 3 sustituyentes metoxilados en el anillo B de su estructura, ocasionado una baja actividad para reducir al radical ABTS^{*+}, contribuyendo poco a la capacidad antioxidante total.

Leguizamón (2006) señala que el patrón de metoxilación del anillo B influye sobre la capacidad antioxidante, ya que pueden interconvertirse en compuestos con menor actividad. Además, las moléculas de antocianinas, al estar glucosiladas en el carbono 3 muestran una disminución en su capacidad

antioxidante, comparando con su forma agliconada (Apak y cols., 2007; Kähkönen y cols., 2003). Esto es debido a que puede existir un impedimento estérico conferido por los azúcares (De Lima y cols., 2007). Es por esto que se puede mostrar una baja relación entre la capacidad antioxidante y las antocianinas.

Se ha demostrado que las antocianinas aportan capacidad antioxidante debido a su estructura que permite la deslocalización de electrones o donación de sus hidrógenos para estabilizar a los radicales libres (Rice-Evans y cols., 1996). No obstante, la capacidad antioxidante total que confieren las uvas está dada por la contribución de otros compuestos además de las antocianinas, entre los que se destacan los compuestos fenólicos.

Por lo anterior, se realizó una correlación entre los valores de TEAC con fenoles totales (FT) y antocianinas (AT), para inferir cuales compuestos atribuyeron mayor capacidad antioxidante así como la relación que existe entre la actividad antioxidante con el color (CIRG) del fruto en este estudio. El análisis presentó una correlación negativa alta entre las variables del color con la capacidad antioxidante ($r=-0.91$, $p\leq 0.05$), lo cual coincide con lo reportado por Leguizamón (2006) al encontrar una correlación negativa ($r=-0.61$) entre esas variables. Esto nos indica que cuando las bayas empezaron a incrementar su coloración, la capacidad antioxidante fue disminuyendo, demostrando que una buena coloración del fruto no necesariamente aportará mejor capacidad antioxidante.

En cuanto a la correlación que existe entre AT y TEAC, la tendencia mostró ser negativa ($r=-0.67$, $p\leq 0.05$), concordando con lo obtenido en la correlación con CIRG. Existen otros compuestos que imparten mayor capacidad antioxidante que no necesariamente están relacionados con la madurez del fruto y su coloración. En el estudio realizado por Leguizamón (2006) en donde obtuvieron una $r=-0.91$ en la relación de antocianinas con capacidad

antioxidante, sugieren que las antocianinas al actuar como antioxidantes pierden su color, por consiguiente una relación negativa. No obstante, en nuestro estudio, las bayas tratadas con Ethrel[®] y 2.5 mg/mL de OGA's a pesar de haber acumulado un mayor contenido de antocianinas en el epicarpio ($p \leq 0.05$), presentaron los valores TEAC más bajos en este estudio. Posiblemente estos dos últimos tratamientos indujeron la síntesis de otros flavonoides con menor capacidad antioxidante.

Es posible que las uvas tratadas con OGA's a concentraciones de 1.5 y 2.0 mg/mL estimularan otras rutas de síntesis de ácidos fenólicos, generando así productos con mayor capacidad antioxidantes que las antocianinas. Por esta razón se analizó la relación entre las variables de TEAC con FT en donde se obtuvo una correlación altamente significativa ($r=0.95$, $p \leq 0.05$). Leguizamón (2006) reporta una correlación baja ($r=0.69$) de los valores de TEAC con FT, comparado a nuestro estudio. Esto nos indica que existen compuestos fenólicos con mayor capacidad antioxidante y a parte de las antocianinas, que estén ejerciendo esa correlación mayor, en uvas tratadas previamente con OGA's.

La capacidad antioxidante no es proporcionada solamente por un tipo de compuesto, más bien es un efecto provocado por la acción en conjunto de cada uno de los antioxidantes presentes en el fruto que podrían generar una respuesta sinérgica que incremente su actividad antioxidante (Kuskoski y cols., 2005). Es posible que la aplicación de los OGA's pudiera mantener un contenido alto de algunos compuestos fenólicos con mayor capacidad antioxidante en el epicarpio de las uvas (comparados con las tratadas con Ethrel[®] y las testigo) e influir en su incremento.

Inactivación del Radical DPPH

Se analizaron los extractos de epicarpio de las bayas sin tratamiento (al día inicial) a la concentración de 0.25 g/mL al día inicial, obteniendo una inactivación del radical DPPH^{*} alrededor del 91.4%. Posteriormente se calculó la concentración a la cual se inhibe el radical al 50% (EC₅₀). El EC₅₀ de los extractos de epicarpio al día inicial fue 0.019 g/mL, en base a esta concentración se llevó a cabo la dilución de los extractos de epicarpio a los 15 días posteriores a la aplicación y se evaluó la variación del % de inhibición del radical.

En la figura 12, se presentan los resultados de inhibición del radical DPPH^{*} por extractos de epicarpio de las bayas de 15 días después de la aplicación de los tratamientos a la concentración de 0.019 g/mL a los 15 días después de la aplicación de los tratamientos. Se observó una disminución en el % de inhibición en todos los tratamientos comparando con el día inicial. No obstante, la disminución resultó menor para las bayas tratadas con OGA's a concentración baja e intermedia (1.5 y 2.0 mg/mL).

Las bayas tratadas con 1.5 mg/mL de OGA's presentaron un % de inhibición más elevado en comparación con las bayas testigo, presentando una capacidad antioxidante significativamente superior en comparación con el resto de los tratamientos. En las uvas tratadas con 2.0 mg/mL de OGA's que presentaron un 28.91% de inhibición mostraron una tendencia similar en el análisis de TEAC teniendo un valor de 3.9 mmoles ET/100 g de PF. Las uvas tratadas con Ethrel[®] presentaron porcentajes de inhibición del radical más bajos, misma tendencia presentada en el contenido de fenoles así como en el análisis de TEAC. No se observaron diferencias significativas en el % de inhibición del radical entre las bayas tratadas con 2.5 mg/mL de OGA's, Ethrel[®] y las testigo.

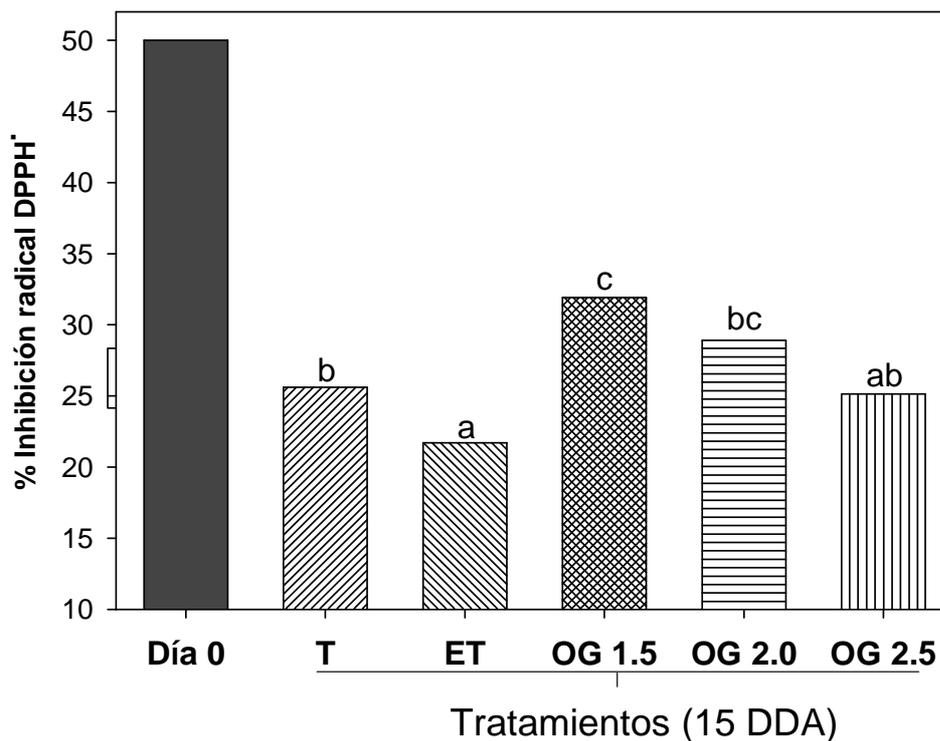


Figura 12. Porcentaje de inhibición del radical DPPH* por efecto de los extractos de epicarpio de uva [0.0193 g/mL] en cultivar 'Flame Seedless' 15 días después de la aplicación (15 DDA) de los tratamientos: Testigo-Agua (T), Ethrel® 0.5mg/mL (ET), OGA's 1.5mg/mL (OG 1.5), OGA's 2.0mg/mL (OG 2.0) y OGA's 2.5 mg/mL (OG 2.5). Barras con literales diferentes indican diferencias significativas a $p \leq 0.05$.

La disminución en la capacidad antioxidante en los frutos ocurre de manera natural por efecto de la maduración, disminuyendo el contenido de fenoles e incrementando la formación de antocianinas (Leguizamón, 2006). Coincidiendo con los resultados de este trabajo, observando que a la concentración del EC₅₀ (0.019 g/mL), las bayas disminuyeron su actividad antioxidante por efecto de la maduración. Sin embargo, los tratamientos de OGA's inhibieron el radical en un % mayor que el testigo, destacando el tratamiento de 1.5 mg/mL de OGA's que estabilizaron al radical en un 31.90%. En un trabajo realizado en uvas cv. 'Red Globe' se obtuvo un EC₅₀ (0.00024 g/mL) menor al obtenido en el presente estudio para el cv. 'Flame Seedless', lo que refleja una capacidad antioxidante mayor. La variedad de uva 'Red Globe', presenta una capacidad antioxidante más elevada debido a que contienen un mayor contenido de fenoles totales en comparación con el cv. 'Flame Seedless' (Molina-Quijada y cols., 2010).

Por otro lado se sabe que las antocianinas contribuyen de cierta forma al aporte de la capacidad antioxidante de los frutos y dependiendo de su estructura, será el modo de actuar sobre los radicales. Kähkönen y Heinonen (2003), midieron los % de inhibición del radical DPPH^{*} a diversos estándares de antocianinas y sus agliconas. Estos autores reportaron para Pt, Mv y Pn un porcentaje de inhibición de 23, 26 y 26 respectivamente, mostrando ser más bajos que Cy y Df con una inhibición del 32 y 42 % respectivamente. En lo que respecta a nuestro estudio, los tratamientos como Ethrel[®] y OGA's a 2.5 mg/mL, que acumularon un contenido mayor de antocianinas con sustituyentes metoxilados en el carbono 3' y 5' del anillo B (Mv y Pn), mostraron menor poder antioxidante. Mientras que en las bayas tratadas con 1.5 mg/mL se reportó una mayor capacidad antioxidante, las cuales acumularon en mayor porcentaje a Cy y Pn.

Sin embargo, la correlación de los % de inhibición del radical DPPH con el contenido de antocianinas mostró ser negativa ($r=-0.60$, $p\leq 0.05$) al igual que la

obtenida con los valores de TEAC ($r=-0.67$, $p\leq 0.05$). Así mismo, se obtuvo una correlación negativa ($r=-0.96$, $p\leq 0.05$) con el índice CIRG. Kallithrakaa y cols. (2005) obtuvieron en variedades de uva para vino, una correlación baja y no significativa ($r=0.0724$, $p\geq 0.05$) en el contenido de antocianinas totales con la actividad del radical DPPH. Ellos sugirieron esa baja correlación a que existen otros compuestos con poder antioxidante mayor que las antocianinas, como flavanoles, flavonoles o proantocianidinas. En nuestro estudio, la correlación mayor de la capacidad antioxidante, fue dada por el contenido de fenoles totales, dando una $r=0.93$ ($p\leq 0.05$), sugiriendo que otros compuestos fenólicos, contribuyeron en mayor medida a la capacidad antioxidante que las antocianinas.

Es importante resaltar que a pesar de la correlación inversa que se obtuvo en este estudio, entre las variables de antocianinas con la capacidad antioxidante, las antocianinas contribuyen con la actividad antioxidante, al ser partícipes de secuestrar radicales libres o donar hidrógenos. Pero, debido a factores externos como los excesos de temperatura, pueden influir en la capacidad antioxidante de las antocianinas debido a que intervienen en su síntesis y acumulación (Mori y cols., 2005). Leguizamón (2006) reportó que la capacidad antioxidante en el epicarpio de cv. 'Flame Seedless' está relacionada ($R^2=0.72$) a las bajas temperaturas de los racimos. Esto debido a que las temperaturas mayores a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ aumentan la tasa respiratoria del fruto provocando la pérdida del azúcar de la antocianina, haciendo que se degrade y sirva de sustrato a peroxidasas, obteniendo una baja contribución a su actividad antioxidante (Leguizamón, 2006). En relación a nuestro estudio, las temperaturas máximas oscilaron alrededor de $36\text{ }^{\circ}\text{C}$, provocando que se obtuvieran una relación menor de las antocianinas con la capacidad antioxidante a las que comúnmente se reporta en uvas de mesa.

Los resultados de inhibición del radical DPPH[•] obtenidos hasta el momento concuerdan con los obtenidos anteriormente de fenoles totales y de TEAC, al presentarse la misma tendencia de los datos. Con esto se demuestra que los tratamientos de OGA's a concentraciones de 1.5 mg/mL inducen compuestos que contribuyen o mantienen la capacidad antioxidante del fruto, debido a que se obtuvieron porcentajes de inhibición mayores a los encontrados en frutos tratados con Ethrel[®] y en los frutos testigo. En este contexto el contenido de fenoles totales tuvo un mayor impacto sobre la capacidad antioxidante de los frutos en general que las antocianinas. Considerando que los frutos tratados con OGA's mantuvieron niveles más altos de fenoles al final del estudio esto se reflejó en una mayor capacidad antioxidante.

Como se pudo observar cada compuesto fenólico, ya sean ácidos fenólicos, flavonoides o antocianinas contribuyen en conjunto a la capacidad antioxidante total de los frutos (De Beer y cols., 2006; Kalt y cols., 1999;). Kuskoski y cols. (2005) señalan que existe una correlación mayor en la capacidad antioxidante con el contenido de fenoles en frutos que son ricos en antocianinas. Es por esto que el empleo de tratamientos con OGA's aparte de aumentar el color a las uvas, puedan aportar frutos con mayor capacidad antioxidante debido al incremento en la acumulación de antocianinas y a mantener el contenido de otros compuestos fenólicos que aportan a la acción antioxidante.

CONCLUSIÓN

La aplicación de una mezcla de oligogalacturónidos con grado de polimerización de 2 a 20 al inicio del envero de las bayas de vid de mesa del cv. 'Flame Seedlees', promueve la acumulación de antocianinas y fenoles en el epicarpio de las bayas y la inducción de color. La capacidad antioxidante de las bayas de uva de mesa cv. 'Flame Seedlees' se incrementó por la aplicación de OGA's y podría ser atribuida mayoritariamente a la presencia de compuestos fenólicos diferentes a las antocianinas individuales que fueron cuantificadas.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, D. O. 2006. Phenolics and ripening in grape berries. *American Journal of Enology and Viticulture*. 57: (3): 249-256.
- Ali, A. y J. Strommer. 2003. A simple extraction and chromatographic system for the simultaneous analysis of anthocyanins and stilbenes of *Vitis* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51: 7246–7251.
- Alonso-Borbalán, A. M., L. Zorro, D. A. Guillen y C. Garcia Barroso. 2003. Study of the polyphenol content of red and white grape varieties by liquid chromatography-mass spectrometry and its relationship to antioxidant power. *Journal of Chromatography A*. 1012: 31-38.
- Andersen, Ø. M. y K. R. Markham. 2006. *Flavonoids. Chemistry, biochemistry and applications*. CRC Press. Taylor & Francis Group. Boca Ratón, Florida. 1.
- Apak, R., K. Güçlü, B. Demirata, M. Özyürek, S. E. Çelik, B. Bektaşoğlu, K. I. Berker y D. Özyurt. 2007. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules*. 12: 1496-1547.
- Arozarena, I., B. Ayestarán, M. J. Cantalejo, M. Navarro, M. Vera, I. Abril y A. Casp. 2002. Anthocyanin composition of Tempranillo, Garnacha and Cabernet Sauvignon grapes from high- and low-quality vineyards over two years. *European Food Research and Technology*. 214: 303–309.
- Aziz, A., A. Gauthier, A. Bézier, B. Poinssot, J.-M. Joubert, A. Pugin, A. Heyraud y F. Baillieul. 2007. Elicitor and resistance-inducing activities of b-1,4 cellodextrins in grapevine, comparison with b-1,3 glucans and a-1,4 oligogalacturonides. *Journal of Experimental Botany*. 58: (6): 1463–1472.
- Aziz, A., A. Heyraud y B. Lambert. 2004. Oligogalacturonide signal transduction, induction of defense-related responses and protection of grapevine against *Botrytis cinerea*. *Planta*. 218: 767-774.
- Balandrán-Quintana, R. R., A. M. Mendoza-Wilson, G. Alvarez-Manilla, C. W. Bergmann, I. Vargas-Arispuro y M. A. Martínez-Téllez. 2002. Effect of pectic oligomers on physiological responses of chilling injury in discs

- excised from Zucchini (*Cucurbita pepo* L.). *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 290: (1): 577-584.
- Balík, J., M. Kyseláková, N. Vrchotová, J. Tříška, M. Kumšta, J. Veverka, P. Híc, J. Totušek y D. Lefnerová. 2008. Relations between polyphenols content and antioxidant activity in vine grapes and leaves. *Czech Journal of Food Sciences*. 26: S25–S32.
- Bell, D. R. y K. Gochenaur. 2006. Direct vasoactive and vasoprotective properties of anthocyanin-rich extracts. *Journal of Applied Physiology*. 100: 1164–1170.
- Belhadj, A., N. Telef, C. Saigne, S. p. Cluzet, F. o. Barrieu, S. Hamdi y J.-M. Mérillon. 2008. Effect of methyl jasmonate in combination with carbohydrates on gene expression of PR proteins, stilbene and anthocyanin accumulation in grapevine cell cultures. *Plant Physiology and Biochemistry*. 46: 493-499.
- Bergqvist, J., N. Dokoozlian y N. Ebisuda. 2001. Sunlight Exposure and Temperature Effects on Berry Growth and Composition of Cabernet Sauvignon and Grenache in the Central San Joaquin Valley of California. *American Journal of Enology and Viticulture*. 52: (1): 1-7.
- Boss, P. K., C. Davies y S. P. Robinson. 1996. Analysis of the expression of anthocyanin pathway genes in developing *Vitis vinifera* L. cv Shiraz grape berries and the implications for pathway regulation. *Plant Physiology*. 111: 1059-1066.
- Braidot, E., M. Zancani, E. Petrusa, C. Peresson, A. Bertolini, S. Patui, F. Macri y A. Vianello. 2008. Transport and accumulation of flavonoids in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Plant Signaling & Behavior*. 3: (9): 626-632.
- Burdulis, D., A. Sarkinas, I. Jasutienė, E. Stackevičienė, L. Nikolajevs y V. Janulis. 2009. Comparative study of anthocyanin composition, antimicrobial and antioxidant activity in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) and blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) fruits. 66: (4): 399-408.
- Cabrera, J. C., A. Boland, J. Messiaen, P. Cambier y P. V. Cutsem. 2008. Egg box conformation of oligogalacturonides: The time-dependent stabilization of the elicitor-active conformation increases its biological activity. *Glycobiology*. 18: (6): 473–482.

- Callejas, R. 2005. Incremento del color de cubrimiento en variedades rojas. Centro de Estudio de la Vid.
- Campbell, A. D. y J. M. Labavitch. 1991. Induction and regulation of ethylene biosynthesis and ripening by pectic oligomers in tomato pericarp discs. *Plant Physiology*. 97: 706-713.
- Cantín, C. M., M. W. Fidelibus y C. H. Crisosto. 2007. Application of abscisic acid (ABA) at veraison advanced red color development and maintained postharvest quality of 'Crimson Seedless' grapes. *Postharvest Biology and Technology*. 46: 237-241.
- Cantos, E., J. C. Espín y F. A. Tomás-Barberán. 2002. Varietal differences among the polyphenol profiles of seven table grape cultivars studied by LC-DAD-MS-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50: (20): 5691-5696.
- Carreño, J., L. Almela, A. Martínez y J. A. Fernández-López. 1997. Chemotaxonomical classification of red table grapes based on anthocyanin profile and external colour. *Lebensmittel-Wissenschaft and Technology*. 30: 259-265.
- Carreño, J., A. Martínez, L. Almela y J. A. Fernández-López. 1995. Proposal of an index for the objective evaluation of the colour of red table grapes. *Food Research International*. 28: (4): 373-377.
- Castellarin, S. D., G. D. Gaspero, R. Marconi, A. Nonis, E. Peterlunger, S. Paillard, A. F. Adam-Blondon y R. Testolin. 2006. Colour variation in red grapevines (*Vitis vinifera* L.): genomic organisation, expression of flavonoid 3'-hydroxylase, flavonoid 3',5'-hydroxylase genes and related metabolite profiling of red cyanidin-/blue delphinidin-based anthocyanins in berry skin. *BMC Genomics*. 7: 12.
- Cao, G., H. U. Muccitelli, C. Sánchez-Moreno y R. L. Prior. 2001. Anthocyanins are absorbed in glycosylated forms in elderly women: a pharmacokinetic study. *American Journal of Clinical Nutrition*. 73: 920-926.
- Combe, B. G. 1992. Research on development and ripening of the grape berry. *American Journal of Enology Viticulture*. 43: (1): 101-110.
- Conde, C., P. Silva, N. Fontes, A. C. P. Dias, R. M. Tavares, M. J. Sousa, A. Agasse, S. Delrot y H. Gerós. 2007. Food. Biochemical changes throughout grape berry development and fruit and wine quality.

- Chervin, C., A. El-Kereamy, J.-P. Roustan, A. Latché, J. Lamon y M. Bouzayen. 2004. Ethylene seems required for the berry development and ripening in grape, a non-climacteric fruit. *Plant Science*. 167: 1301–1305.
- Darvill, A., C. Augur, C. Bergmann, R. W. Carlson, J.-J. Cheong, S. Eberhard, M. G. Hahn, V.-M. Lo, V. Marfa, B. Meyer, D. Mohnen, M. A. O'Neill, M. D. Spiro, H. v. Halbeek, W. S. York y P. Albersheim. 1992. Oligosaccharins—oligosaccharides that regulate growth, development and defence responses in plants. *Glycobiology*. 2: 181-198.
- De Beer, D., E. Joubert, J. Marais y M. Manley. 2006. Unravelling the total antioxidant capacity of pinotage wines: contribution of phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54: (8): 2897-2905.
- De Lima, A. A., E. M. Sussuchi y W. F. de Giovanni. 2007. Electrochemical and antioxidant properties of anthocyanins and anthocyanidins. *Croatia Chemica Acta*. 80: (1): 29-34.
- De Pascual-Teresa, S. y M. T. Sánchez-Ballesta. 2008. Anthocyanins: from plant to health. *Phytochemical Review*. 7: 281-299.
- Delgado-Vargas, F. y O. Paredes-López. 2003. Natural colorants for food and nutraceutical uses. CRC Press LLC. Boca Ratón, Florida.
- Downey, M. O., N. K. Dokoozlian y M. P. Krstic. 2006. Cultural practice and environmental impacts on the flavonoid composition of grapes and wine: a review of recent research. *American Journal of Enology and Viticulture*. 57: (3): 257-268.
- El-Kereamy, A., C. Chervin, J.-P. Roustana, V. Cheynier, J.-M. Souquet, M. Moutounet, J. Raynala, C. Ford, A. Latché, J.-C. Pech y M. Bouzayen. 2003. Exogenous ethylene stimulates the long-term expression of genes related to anthocyanin biosynthesis in grape berries. *Physiologia Plantarum*. 119: 175–182.
- Enríquez-Guevara, E. A., E. Aispuro-Hernández, I. Vargas-Arispuro, M. A. Martínez-Téllez. 2010. Oligosaccharinas derivadas de pared celular: actividad biológica y participación en la respuesta de defensa de plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 28(2):144-155.

- Esteban, M. A., M. J. Villanueva y J. R. Lissarrague. 2001. Effect of irrigation on changes in the anthocyanin composition of the skin of cv Tempranillo (*Vitis vinifera* L.) grape berries during ripening. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 81: 409-420.
- Fernández-López, J. A., L. Almela, J. A. Muñoz, V. Hidalgo y J. Carreño. 1998. Dependence between colour and individual anthocyanin content in ripening grapes. *Food Research International*. 31: (9): 667-672.
- Flores-Villavicencio, L. L., A. Richards y E. L. Soriano-Bello. 2004. Phytoalexin production induced by a glucuronide elicitor during elongation of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) embryos. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 22: (3): 333-337.
- Fournand, D., A. Vicens, L. Sidhoum, J.-M. Souquet, M. Moutounet y V. Cheynier. 2006. Accumulation and extractability of grape skin tannins and anthocyanins at different advanced physiological stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54: 7331–7338.
- García Sahagún, M. L., V. Martínez Juárez, A. N. Avendaño López, M. d. C. Padilla Sahagún y H. Izquierdo Oviedo. 2009. Acción de oligosacáridos en el rendimiento y calidad de tomate. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 32: (4): 295-301.
- Garzón, G. A. 2008. Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: revisión. *Acta biol. Colomb*. 13: (3): 27-36.
- Gould, K., K. Davies y C. Winefield. 2009. *Anthocyanins: Biosynthesis, functions, and applications*. Springer New York. New York.
- Guo, J., W. Han y M.-H. Wang. 2008. Ultraviolet and environmental stresses involved in the induction and regulation of anthocyanin biosynthesis: A review *African Journal of Biotechnology*. 7: (25): 4966-4972.
- Gutteridge, J. M. C. 1994. Free Radicals and Aging. *Review Clinical Gerontology*. 4: 279-288.
- He, J. y M. M. Giusti. 2010. Anthocyanins: natural colorants with health-promoting properties. *Annual Review of Food Science and Technology*. 1: (1): 163-187.
- Hebrero, E., C. García-Rodríguez, C. Santos-Buelga y J. C. Rivas-Gonzalo. 1989. Analysis of anthocyanins by high performance liquid

- chromatography-diode array spectroscopy in a hybrid grape variety (*Vitis vinifera* X *Vitis berlandieri* 41B). . American Journal of Enology and Viticulture. 40: (4): 283-291.
- Hiratsuka, S., H. Onodera, Y. Kawai, T. Kubo, H. Itoh y R. Wada. 2001. ABA and sugar effects on anthocyanin formation in grape berry cultured in vitro. *Scientia Horticulturae*. 90: 121-130.
- Holton, T. A. y E. C. Cornish. 1995. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. *The Plant Cell*. 7: 1071-1083.
- Huang, D., B. Ou y R. L. Prior. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53: 1841–1856.
- Human, M. A. y K. A. Bindon. 2008. Interactive effect of ethephon and shading on the anthocyanin composition of *Vitis vinifera* L. cv. Crimson Seedless. *South African journal for enology and viticulture*. 29: 50-58.
- Hurtado, N. H., A. L. Morales, M. L. González-Miret, M. L. Escudero-Gilete y F. J. Heredia. 2009. Colour, pH stability and antioxidant activity of anthocyanin rutinosides isolated from tamarillo fruit (*Solanum betaceum* Cav.). *Food Chemistry*. 117: (1): 88-93.
- Jaakola, L., K. Määtä-Riihinen, S. Kärenlampi y A. Hohtola. 2004. Activation of flavonoid biosynthesis by solar radiation in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) leaves. *Planta*. 218: 721–728.
- Jeong, S. T., N. Goto-Yamamoto, S. Kobayashi y M. Esaka. 2004. Effects of plant hormones and shading on the accumulation of anthocyanins and the expression of anthocyanin biosynthetic genes in grape berry skins. *Plant Science*. (164): 247-252.
- Kähkönen, M. P. y M. Heinonen. 2003. Antioxidant Activity of Anthocyanins and Their Aglycons. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51: 628–633.
- Kähkönen, M. P., J. Heinämäki, V. Ollilainen y M. Heinonen. 2003. Berry anthocyanins: isolation, identification and antioxidant activities. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 83: 1403–1411.
- Kalt, W., C. F. Forney, A. Martin y R. L. Prior. 1999. Antioxidant capacity, vitamin c, phenolics, and anthocyanins after fresh storage of small fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47: 4638–4644.

- Kallithrakaa, S., A. A.-A. Mohdalya, D. P. Makris y P. Kefalas. 2005. Determination of major anthocyanin pigments in Hellenic native grape varieties (*Vitis vinifera* sp.): association with antiradical activity. *Journal of Food Composition and Analysis*. 18: 375–386.
- Karakaya, S., S. N. El y A. A. Tas. 2001. Antioxidant activity of some food containing phenolic compounds. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 52: 501–508.
- Kong, J.-M., L.-S. Chia, N.-K. Goh, T.-F. Chia y R. Brouillard. 2003. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*. 64: 923–933.
- Kris-Etherton, P. M., M. Lefevre, G. R. Beecher, M. D. Gross, C. L. Keen y T. D. Etherton. 2004. Bioactive compounds in nutrition and health-research methodologies for establishing biological function: The antioxidant and anti-inflammatory effects of flavonoids on atherosclerosis. *Annual Review of Nutrition*. 24: (1): 511-538.
- Kuskoski, E. M., A. G. Asuero, M. C. García-Parilla, A. M. Troncoso y R. Fett. 2004. Actividad antioxidante de pigmentos antocianicos. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas. 24: (4): 691-693.
- Kuskoski, E. M., A. G. Asuero, A. M. Troncoso, J. Mancini-Filho y R. Fett. 2005. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas. 25: (4): 726-732.
- Lee, S. J., S. K. Choi y J. S. Seo. 2009. Grape skin improves antioxidant capacity in rats fed a high fat diet. *Nutrition Research and Practice*. 3: (4): 279-285.
- Leguizamón, G. 2006. Influencia de luminosidad y temperatura sobre capacidad antioxidante y color en uvas de mesa (*Vitis vinifera* L.). Doctorado en Ciencias. Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Vegetal. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Hermosillo.
- Leguizamón, G., A. González-León y R. Báez-Sañudo. 2005. Antocianinas en uva (*Vitis vinifera* L.) y su relación con el color. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 28: 359-368.
- Leguizamón, G., A. González, R. Sotelo, M. Islas, E. Bringas, J. M. García, T. Carvallo y R. Báez. 2008. Efecto del sombreado de racimos sobre color y

- calidad en uvas rojas para mesa (*Vitis vinifera* L.). Revista Fitotecnia Mexicana. 31: 2-17.
- Marfa, V., D. J. Gollin, S. Eberhard, D. Mohnen, A. Darvill y P. Albersheim. 1991. Oligogalacturonides are able to induce flowers to form on tobacco explants. *The Plant Journal*. 1: (2): 217-225.
- Marinova, D., F. Ribarova y M. Atanassova. 2005. Total phenolics and total flavonoids in bulgarian fruits and vegetables. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy*. 40: (3): 255-260.
- Mattivi, F., R. Guzzon, U. Vrhovsek, M. Stefanini y R. Velasco. 2006. Metabolite profiling of grape: flavonols and anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54: 7692–7702.
- Molina-Quijada, D. M. A., L. A. Medina-Juárez, G. A. González-Aguilar, R. M. Robles-Sánchez y N. Gámez-Meza. 2010. Compuestos fenólicos y actividad antioxidante de cáscara de uva (*Vitis vinifera* L.) de mesa cultivada en el noroeste de México. *CyTA - Journal of Food*. 8: (1): 57 - 63.
- Molyneux, P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarinn Journal of Science and Technology*. 26(2): 211-219.
- Mori, K., N. Goto-Yamamoto, M. Kitayama y K. Hashizume. 2007. Loss of anthocyanins in red-wine grape under high temperature. *Journal of Experimental Botany*. 58: 1935–1945.
- Mori, K., S. Sugaya y H. Gemma. 2005. Decreased anthocyanin biosynthesis in grape berries grown under elevated night temperature condition. *Scientia Horticulturae*. 105: 319-330.
- Ochoa, M. 2008. Efecto de la aplicación de oligogalacturónidos en la inducción de color de mesa de cv 'Flame Seedless' y 'Red Globe'. Maestría en Ciencias. Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Vegetal. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Hermosillo.
- Osborne, D. J. y M. T. McManus. 2005. Hormones, Signals and Target Cells in Plant Development. Hormones and signals: identification and description of signalling molecules. J. Bard, P. Barlow y D. Kirk. Cambridge University Press. UK. 1.

- Pellegrini, N., M. Serafini, B. Colombi, D. D. Rio, S. Salvatore, M. Bianchi y F. Brighenti. 2003. Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *The Journal of Nutrition*. 133: 2812-2819.
- Peng, Z. F., D. Strack, A. Baumert, R. Subramaniam, N. K. Goh, T. F. Chia, S. N. Tan y L. S. Chia. 2003. Antioxidant flavonoids from leaves of *Polygonum hydropiper* L. *Phytochemistry*. 62: 219-228.
- Peppi, M. C., M. W. Fidelibus y N. Dokoozlian. 2006. Abscisic acid application timing and concentration affect firmness, pigmentation, and color of 'Flame Seedless' grapes. *HortScience*. 41: (6): 1440-1445.
- Pomar, F., M. Novo y A. Masa. 2005. Varietal differences among the anthocyanin profiles of 50 red table grape cultivars studied by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1094: 34-41.
- Prior, R. L., X. Wu y K. Schaich. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53: 4290-4302.
- Re, R., N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, y C. Rice-Evans. 1999. Antioxidant activity applying and improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology Medicine*. 26:1231-1237
- Rein, M. 2005. Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins. PhD. Department of Applied Chemistry and Microbiology. University of Helsinki Helsinki.
- Reymond, P., S. Grünberger, K. Paul, M. Müller y E. E. Farmer. 1995. Oligogalacturonide defense signals in plants: Large fragments interact with the plasma membrane in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 92: 4145-4149.
- Rice-Evans, C. A., N. J. Miller y G. Paganga. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*. 20: (7): 933-956.

- Ridley, B. L., M. A. O'Neill y D. Mohnen. 2001. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*. 57: (6): 929-967.
- Romero, I., M. T. Sanchez-Ballesta, M. I. Escribano y C. Merodio. 2008. Individual anthocyanins and their contribution to total antioxidant capacity in response to low temperature and high CO₂ in stored Cardinal table grapes. *Postharvest Biology and Technology*. 49: 1-9.
- Salisbury, F. B. y C. W. Ross. 1994. *Fisiología Vegetal*. Iberoamericana. México.
- Shiraishi, M., M. Yamada, N. Mitani y T. Ueno. 2007. A rapid determination method for anthocyanin profiling in grape genetic resources. *J. Japan Soc. Hort. Sci.* 76: (1): 28-35.
- Simpson, S. D., D. A. Ashford, D. J. Harvey y D. J. Bowles. 1998. Short chain oligogalacturonides induce ethylene production and expression of the gene encoding aminocyclopropane 1-carboxylic acid oxidase in tomato plants. *Glycobiology*. 8: (6): Glycobiology.
- Singh Brar, H., Z. Singh y E. Swinny. 2008. Dynamics of anthocyanin and flavonol profiles in the 'Crimson Seedless' grape berry skin during development and ripening. *Scientia Horticulturae*. 117: (4): 349-356.
- Singleton V. L., y J. A. Rossi. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*. 16:144-158.
- Solovchenko, A. y M. Merzlyak. 2008. Screening of visible and UV radiation as a photoprotective mechanism in plants. *Russian Journal of Plant Physiology*. 55: (6): 719-737.
- Spayd, S. E., J. M. Tarara, D. L. Mee y J. C. Ferguson. 2002. Separation of sunlight and temperature effects on the composition of *Vitis vinifera* cv. Merlot berries. *American Journal of Enology and Viticulture*. 53: (3): 171-182.
- Spiro, M. D., K. A. Kates, A. L. Koller, M. A. O'Neill, P. Albersheim y A. G. Darvill. 1993. Purification and characterization of biologically active 1,4-linked α -D-oligogalacturonides after partial digestion of polygalacturonic acid with endopolygalacturonase. *Carbohydrate Research*. 247: 9-20.

- Spiro, M. D., B. L. Ridley, S. Eberhard, K. A. Kates, Y. Mathieu, M. A. O'Neill, D. Mohnen, J. Guern, A. Darvill y P. Albersheim. 1998. Biological activity of reducing-end-derivatized oligogalacturonides in tobacco tissue cultures. *Plant Physiology*. 116: 1289–1298.
- Szajdek, A. y E. Borowska. 2008. Bioactive compounds and health-promoting properties of berry fruits: a review. *Plant Foods for Human Nutrition (Formerly Qualitas Plantarum)*. 63: (4): 147-156.
- Taiz, L. y E. Zeiger. 2002. *Plant Physiology. Plant cells* Ed. Sinauer Associates. Estados Unidos. 3.
- Tanaka, Y., N. Sasaki y A. Ohmiya. 2008. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *The Plant Journal*. 54: 733-749.
- Torres, G. G. 2005. Inducción de respuestas de defensa en plantas de tabaco y vid mediante la aplicación de oligogalacturónidos. Doctorado en Ciencias. Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Vegetal. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo. . Hermosillo, Sonora.
- Touriño Eirin, S. 2009. Contribución al establecimiento de las bases científicas para el uso de fracciones polifenólicas y fibra dietética antioxidante en la prevención del cáncer Doctorat. Nutrició I Bromatología Universitat de Barcelona.
- Winkler, A. J., J. A. Cook, W. M. Kliwer y L. A. Lider. 1974. *General Viticulture*. California. USA.
- Wheeler, S. F. 2006. The role of abscisic acid in grape berry development. Doctor in Philosophy. School of Agriculture and Wine Discipline of Horticulture, Viticulture and Oenology. The University of Adelaide.
- Xia, E.-Q., G.-F. Deng, Y.-J. Guo y H.-B. Li. 2010. Biological activities of polyphenols from grapes. *International Journal of Molecular Sciences*. 11: 662-646.
- Yilmaz, Y. y R. T. Toledo. 2004. Health aspects of functional grape seed constituents. *Trends in Food Science & Technology*. 15: (9): 422-433.
- Zeng, X.-Q., W. S. Chow, L.-J. Su, X.-X. Peng y C.-L. Peng. 2010. Protective effect of supplemental anthocyanins on *Arabidopsis* leaves under high light. *Physiologia Plantarum*. 138: (2): 215-225.

- Zern, T. L., K. L. West y M. L. Fernandez. 2003. Grape polyphenols decrease plasma triglycerides and cholesterol accumulation in the aorta of ovariectomized guinea pigs. *The Journal of Nutrition*. 133: 2268-2272.
- Zhang, W., C. Franco, C. Curtin y S. Conn. 2004. To stretch the boundary of secondary metabolite production in plant cell-based bioprocessing: anthocyanin as a case study. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 5: 264-271.