



UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE LA MIXTECA

**PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS DE TRES
VARIETADES DEL FRUTO DE *ANNONA
DIVERSIFOLIA***

**TESIS
PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
INGENIERO EN ALIMENTOS**

**PRESENTA:
ADRIANA PAOLA JULIÁN LOAEZA**

**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. NORMA FRANCENIA SANTOS SÁNCHEZ**

Huajuapán de León, Oaxaca, México, Noviembre del 2009

Dedico este trabajo a Dios por haberme permitido llegar hasta donde ahora me encuentro.

A mis padres, Asunción y Rodrigo, que me han brindado su cariño, amor, valores, consejos, quienes han sido mi soporte y sin quienes no hubiese podido salir adelante.

A mis hermanos, Fátima y Alex, porque hemos compartido bellos momentos, me han acompañado en este largo trayecto y me han brindado su apoyo y cariño incondicional en todos los aspectos de mi vida.

A Azael, por su comprensión, amistad, cariño, y amor sincero, por formar parte importante de mi vida en la Universidad y fuera de ella, haciéndola más bonita y agradable.

A mis sobrinas Montse, Paty y Meli por estar conmigo y ser parte importante en mi vida.

A mi abuelita Luisa por su afecto y grandes ejemplos, a toda mi familia por sus múltiples gestos de afecto y apoyo en distintas etapas de mi vida.

A mis compañeros y amigos Lucy, Fi, Diana y Ana por mantenernos siempre unidos y quienes además con amistad me ayudaron a salir adelante durante la carrera haciéndola más divertida. También a May, Gina e Irma, por darle un toque divertido a los laboratorios y por su amistad sincera.

A Itzel y Magaly, amigas incondicionales desde hace largos años.

A todos, los quiero mucho.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no hubiera sido posible sin la ayuda de muchas personas. Inicialmente agradezco a la familia Diego Mimiaga y al señor Jesús Antonio Molina del estado de Chiapas por haber ayudado en la recolección de los frutos.

Agradezco también a la I. A. Balbina S. Sánchez Guzmán, por haber colaborado en este trabajo en la realización del análisis proximal.

Agradezco a mi asesora la Dra. Norma Francenia Santos Sánchez, por haberme orientado y apoyado en el trabajo de laboratorio, así como en las múltiples revisiones de este proyecto.

Muchas gracias al Dr. Raúl Salas Coronado, por haber colaborado aportando sus puntos de vista y conocimientos sobre esta tesis.

A mis sinodales la M.C Leslie Arcila Lozano, al M.C. Carlos Guillermo Hernández y al M.I.Q. Enrique Lemus Fuentes por haber colaborado en las revisiones para la culminación de este trabajo.

A Mayra, Irma y Gina por su apoyo durante el trabajo en laboratorio durante la carrera y la realización de esta tesis.

A todos los maestros que me guiaron en mi formación profesional

Finalmente a mis padres por haberme brindado el apoyo necesario durante toda mi vida.

Este trabajo se realizó en las instalaciones del laboratorio de Ciencias Químico-Biológicas y laboratorio de Química de la Universidad Tecnológica de la Mixteca.

Parte de este trabajo fue presentado de manera oral en el 9º Taller “Jóvenes en la Investigación Química” organizado por el departamento de química del CINVESTAV, unidad Zacatenco, en el Distrito Federal el 20 de Noviembre del 2008.

Además parte de este trabajo se presentó en el 44º Congreso Mexicano de Química, en el Concurso Nacional de Carteles Estudiantiles llevado a cabo en la ciudad de Puebla, del 27 al 30 de Septiembre del 2009.

RESUMEN

Annona diversifolia es un árbol nativo de México y Centroamérica, que produce frutos blancos, rosas y rosas mexicano. Estos frutos son de temporada y de interés comercial en las regiones donde se cultivan. En el presente trabajo se abordó una caracterización física, involucrando medición de los parámetros longitud, ancho, grosor, masa y volumen del fruto. Así como densidad, diámetro geométrico promedio, esfericidad, porosidad, superficie, porcentaje de mesocarpio, epicarpio y semillas; y color de la pulpa. La caracterización química consistió en la determinación del análisis proximal, pH, acidez titulable, cuantificación de Ca, Mg, Na, K, Fe, Cu, Mn y Zn por absorción atómica, sacarosa, glucosa y fructosa mediante HPLC, vitamina C, fenoles y flavonoides totales y actividad antirradical. Los resultados de la evaluación de propiedades físicas mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en el color en los parámetros CIE L^* , a^* , b^* , ángulo hue y cromaticidad. En el análisis proximal la variedad blanca tiene diferencia significativa ($p < 0.05$), en todos los parámetros evaluados con excepción de humedad y cenizas. El macromineral encontrado en mayor concentración fue el K y el único micromineral detectado y cuantificado fue el Zn con valores entre 335-347 y 0.10-0.15 mg/100 g de pulpa, respectivamente. Se encontraron en la pulpa concentraciones, en masa fresca, de vitamina C, fenoles y flavonoides totales de 1.5-2.4 mg/100 g, 129-170 mg EAG/100 g y 107-142 mg EC/100 g, respectivamente. La mejor actividad antirradical la presentó la variedad rosa mexicano, IC_{50} de 1701 μg de pulpa/mL, por tener el mayor contenido de fenoles totales.

Índice general

	Página
Resumen	vi
Lista de figuras	ix
Lista de tablas	xi
Lista de abreviaturas	xiii
1. Introducción	1
1.1 Antecedentes	1
1.2 Hipótesis	4
1.3 Objetivos	4
1.3.1 Objetivos generales	4
1.3.2 Objetivos específicos	4
2. Análisis de fundamento	6
2.1 Generalidades del fruto de <i>A. diversifolia</i>	6
2.2 Análisis físico	8
2.2.1 Color	10
2.2.2 Medición del color	11
2.3 Análisis químico	13
2.3.1 Análisis proximal	13
2.3.2 Carbohidratos	17
2.3.3 Cuantificación de sacarosa, glucosa y fructosa	18
2.3.4 Minerales	18
2.3.5 Cuantificación de minerales	19
2.3.6 Vitamina C	20
2.3.7 Cuantificación de vitamina C	22
2.3.8 Fenoles totales	23
2.3.9 Cuantificación de fenoles totales	24
2.3.10 Flavonoides totales	26

2.3.11	Cuantificación de flavonoides totales	27
2.3.12	Actividad antirradical	27
2.3.13	Medición de la actividad antirradical	28
3.	Metodología	31
3.1	Equipos y reactivos	31
3.2	Obtención de las muestras	32
3.3	Análisis físico	33
3.3.1	Determinación de propiedades físicas	33
3.3.2	Cuantificación del color	36
3.4	Análisis químico	36
3.4.1	Determinación de pH y acidez titulable	36
3.4.2	Análisis proximal	36
3.4.3	Cuantificación de sacarosa, glucosa y fructosa	37
3.4.4	Cuantificación de minerales	38
3.4.5	Cuantificación de vitamina C	40
3.4.6	Cuantificación de fenoles totales	42
3.4.7	Cuantificación de flavonoides totales	43
3.4.8	Cuantificación de la actividad antirradical	44
3.5	Análisis estadístico	45
4.	Resultados y análisis	46
5.	Conclusiones	70
6.	Perspectivas	72
7.	Bibliografía	73
8.	Apéndices	77
9.	Anexos	85

Lista de figuras

	Página
Figura 1. Frutos de <i>A. diversifolia</i> variedad (a) blanca, (b) rosa y (c) rosa mexicano	2
Figura 2. Árbol de <i>Annona diversifolia</i>	7
Figura 3. Círculo de matices o hues del sistema Munsell	12
Figura 4. Oxidación del ácido L-ascórbico	21
Figura 5. Reacción de DCPI con la vitamina C para su cuantificación	22
Figura 6. Fenoles encontrados en <i>A. crassiflora</i> o araticum (Roesler, R. <i>et al.</i> , 2007)	23
Figura 7. Estructura del ácido gálico	26
Figura 8. Sistema heterocíclico de dos anillos, benzopirano	26
Figura 9. Reacción general de radicales libres	28
Figura 10. Reacción de descoloramiento del DPPH al ser reducido por los antioxidantes	29
Figura 11. Venta del fruto de <i>Annona diversifolia</i> en mercados de la ciudad de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas	32
Figura 12. Dimensiones lineales de frutos no esféricos (Ertekin, C. <i>et al.</i> , 2006)	34
Figura 13. Método del desplazamiento del líquido para medir el volumen del fruto	35
Figura 14. Llenado de la caja de volumen conocido con los frutos recolectados	35
Figura 15. Frutos de <i>A. diversifolia</i> variedad (a) blanca, (b) rosa y (c) rosa mexicano con madurez organoléptica	47
Figura 16. Pulpa de las variedades (a) blanca, (b) rosa y (c) rosa mexicano de los frutos de <i>A. diversifolia</i>	50
Figura 17. (a) Distribución en el espacio de color de L^* , a^* y b^* (CIE) de las variedades del fruto de <i>A. diversifolia</i> . (b) Localización de los tonos de la pulpa en la escala hue	51
Figura 18. Análisis proximal de la pulpa de tres variedades de <i>A. diversifolia</i> expresado en masa fresca	54
Figura 19. Análisis de Pearson de cenizas, Ca, Mg, Na, K y Zn	60
Figura 20. Sacarosa, glucosa y fructosa (g/100 g de pulpa fresca) en los frutos de <i>A. diversifolia</i>	61

Figura 21. Vitamina C (mg de vitamina C/100 g de pulpa fresca) en frutas comúnmente consumidas (*Dürüst, N . <i>et al.</i> , 1997) y en los frutos de <i>A. diversifolia</i>	63
Figura 22. Fenoles totales, expresado como mg equivalentes de ácido gálico (EAG)/100 g de pulpa fresca para frutas consumidas comúnmente (*Chun, O. K. <i>et al.</i> , 2005) y para las tres variedades de <i>A. diversifolia</i>	64
Figura 23. Fenoles totales expresado como mg EAG/100 g de pulpa fresca de los frutos de <i>A. cherimolia</i> (Vasco, C. <i>et al.</i> , 2008), <i>A. crassiflora</i> (**Roesler, R. <i>et al.</i> , 2006) y <i>A. diversifolia</i>	65
Figura 24. Actividad antirradical de los extractos etanólicos de la pulpa de las tres variedades del fruto de <i>A. diversifolia</i>	67
Figura 25. Producto de oxidación de un fenol (flavonoide)	69
Figura 26. Determinación de pH (NMX-F-102-S-1978)	85
Figura 27. Determinación de acidez titulable (NMX-F-102-S-1978)	86
Figura 28. Determinación de humedad, método AOAC 925.09	87
Figura 29. Determinación de cenizas, método AOAC 923.03	88
Figura 30. Determinación de proteínas, método AOAC 954.01	89
Figura 31. Determinación de grasa cruda, método AOAC 920.39	90
Figura 32. Determinación de fibra cruda, método AOAC 962.09	91

Lista de tablas

	Página
Tabla 1. Algunas características morfológicas de cinco especies de <i>Annona</i> (Cruz, E. <i>et al.</i> , 2000).	10
Tabla 2. Análisis proximal de la pulpa de <i>Annona diversifolia</i> reportada por otros autores.	16
Tabla 3. Macro y microelementos en algunos frutos, mg/100 g de pulpa fresca (*Letarme, P. <i>et al.</i> , 2006. **Duke, T. A. <i>et al.</i> , 1993).	19
Tabla 4. Fenoles totales expresados como equivalentes de ácido gálico (EAG) de los extractos orgánicos del fruto maduro araticum (*Roesler, R. <i>et al.</i> , 2007) y chirimoya (**Vasco, C. <i>et al.</i> , 2008).	24
Tabla 5. Actividad antirradical de los extractos etanólicos de <i>A. crassiflora</i> (Roesler, R. <i>et al.</i> , 2007).	30
Tabla 6. Características generales para la generación de las curvas de calibración.	39
Tabla 7. Propiedades físicas de las tres variedades del fruto de <i>A. diversifolia</i> .	48
Tabla 8. Parámetros de color obtenidos para la pulpa de las tres variedades del fruto de <i>A. diversifolia</i> en el sistema CIE.	49
Tabla 9. Análisis proximal (g/100 g de pulpa fresca), pH y acidez titulable, de la pulpa de las tres variedades del fruto de <i>A. diversifolia</i> .	52
Tabla 10. Análisis proximal de varias especies de anonas (g/ 100 g de pulpa).	52
Tabla 11. Minerales cuantificados (mg/100 g de pulpa fresca) en la pulpa de las tres variedades del fruto de <i>A. diversifolia</i> .	56
Tabla 12. Ingestas recomendadas de minerales según la FDA (1 993).	57
Tabla 13. Correlaciones lineales entre el total de cenizas y el contenido de minerales de acuerdo al análisis de correlación (<i>r</i>) de Pearson.	59
Tabla 14. Contenido de vitamina C (mg/100 g), fenoles totales (mg EAG/100 g), flavonoides (mg EC/100 g) y actividad antirradical expresada como IC ₅₀ de la pulpa fresca de los frutos de <i>A. diversifolia</i> .	62
Tabla 15. Correlaciones lineales entre la actividad antirradical, fenoles totales, flavonoides y el contenido de vitamina C de acuerdo al análisis de	68

correlación (r) de Pearson.

Tabla 16. Concentración de minerales, vitamina C y fenoles totales en los controles utilizados expresados en mg/100 g de pulpa fresca.

84

Lista de abreviaturas

AAS	Atomic Absorption Spectroscopy
AOAC	Association of Official Agricultural Chemists
ANOVA	Análisis de varianza
BHT	2,6-Di- <i>tert</i> -butil-4-metilfenol
CCD	Cromatografía en capa delgada
CIE	Comité Internacional de Iluminación
DCPI	2,6-dicloroindofenolato de sodio
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidracilo
EAG	Equivalentes de ácido gálico
EC	Equivalentes de catequina
EDTA	Etilendiaminotetraacetato disódico
ELN	Extracto libre de nitrógeno
FDA	Administración de drogas y alimentos
GC	Cromatografía de gases
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
msnm	Metros sobre el nivel del mar
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity
PCL	Photochemiluminescence
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
TRAP	Total Radical-trapping Antioxidant Parameter
UV/Vis	Ultravioleta/Visible

INTRODUCCIÓN

1.1 ANTECEDENTES

La búsqueda de nuevas fuentes de alimentos que además de proporcionar los nutrientes necesarios para el organismo tengan propiedades funcionales, cada vez es más importante. Los frutos tienen propiedades funcionales debido a sus vitaminas y minerales. Además algunos frutos contienen compuestos fenólicos y consecuentemente actividad antirradical. Esta última propiedad es de las funcionalidades más evaluadas en alimentos debido a que se ha demostrado que está relacionada con la disminución de los riesgos en enfermedades neurodegenerativas y cardiovasculares (Lule, S. U. *et al.*, 2005).

Algunos frutos del género *Annona* han presentado actividad antirradical *in vitro*, por ejemplo la *Annona crassiflora* originaria de Brasil (Roesler, R. *et al.*, 2006). Los extractos etanólicos de la pulpa, semillas y cáscara de *A. crassiflora* mostraron una actividad antirradical alta, frente al radical DPPH, con valores de IC₅₀ de 148.82 µg/mL, 31.14 µg/mL y 48.82 µg/mL, respectivamente. Adicionalmente, en el 2007 estos mismos autores, identificaron los flavonoides responsables de la actividad antirradical (Roesler, R. *et al.*, 2007).

La *Annona diversifolia*, objeto del presente estudio, es originaria del sureste de México y Centroamérica, se cultiva y se comercializa exclusivamente en los mercados regionales, por ejemplo en los estados de Chiapas, Oaxaca, Guerrero y Tabasco, principalmente. Sin embargo sus atributos sensoriales lo hacen apto para una posible comercialización mas extensiva, debido a que tiene mejores propiedades sensoriales que la chirimoya (*Annona*

cherimolia). Este último fruto es ampliamente comercializado y consumido como fruto exótico en países europeos y asiáticos.

Existen algunos reportes acerca de la composición química, así como de algunas características físicas del fruto de *A. diversifolia*. En El Salvador se realizó una comparación entre las especies más comercializadas y cultivadas del género *Annona* (Cruz, E. *et al.*, 2000). Dentro de estas especies está *A. diversifolia*, los autores obtuvieron el análisis bromatológico del fruto, así como las características morfológicas de este.

Es importante señalar que Cruz, *et al.* identificaron dos variedades del fruto, la variedad blanca y rosa, sin embargo no aclaran si los resultados obtenidos del estudio corresponden a una variedad u otra. Cabe mencionar que los consumidores de México conocen tres variedades del fruto de *A. diversifolia* y los diferencian por el color de la pulpa principalmente, Figura 1. Aunque también saben distinguir entre variedades por las diferentes tonalidades verdosas de las hojas de los árboles.

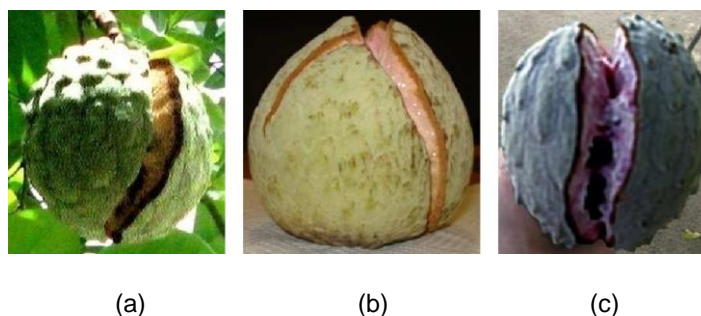


Figura 1. Frutos de *A. diversifolia* variedad (a) blanca, (b) rosa y (c) rosa mexicano

Debido a lo anterior resultó importante la caracterización física y química de las tres variedades de *A. diversifolia* (blanca, rosa y rosa mexicano). Para realizar el presente estudio se recolectaron muestras de las tres variedades de frutos en Luis Echeverría y Tuxtla

Gutiérrez, Chiapas. La adquisición de los frutos se realizó en un solo periodo de cosecha, septiembre del 2008, debido a que es un fruto de temporada que se da una vez al año. Las determinaciones se realizaron en los frutos maduros de *A. diversifolia*. Se midieron directamente las propiedades físicas masa (M_f) y volumen (V). En tanto que la obtención del diámetro geométrico promedio (D_g), densidad del fruto (ρ_f), densidad aparente (ρ_b) esfericidad (ϕ), área superficial (S) y porosidad (ϵ) se calcularon con las fórmulas correspondientes que relacionan longitud (L), ancho (W) y grosor del fruto (T) (Topuz, A. *et al.*, 2005). El color de la pulpa de cada fruto, se determinó midiendo los parámetros CIE L^* , a^* , b^* , cromaticidad y ángulo hue por métodos espectrofotométricos. Las determinaciones químicas de la pulpa fueron: humedad (método 925.09), cenizas (método 923.03), proteínas (método 954.01), grasa cruda (método 920.39), fibra cruda (método 962.09), carbohidratos totales, empleando la metodología descrita por la AOAC. Las mediciones de pH y acidez titulable se realizaron por la metodología establecida en la NMX-F-102-S-1978. La glucosa, fructosa y sacarosa fueron determinadas por HPLC. Por otro lado los minerales Ca, Mg, Na, K, Fe, Cu, Mn y Zn se midieron por absorción atómica. La cuantificación de vitamina C se realizó espectrofotométricamente. La cuantificación de fenoles totales se llevó a cabo con el reactivo de Folin-Ciocalteu. La actividad antirradical se midió *in vitro* frente a DPPH. Para las dos determinaciones anteriores se utilizaron los extractos etanólicos de la pulpa y las mediciones se hicieron por métodos espectrofotométricos. Se cuantificaron flavonoides totales en el extracto metanólico de las pulpas por métodos espectrofotométricos. Se realizó un análisis comparativo usando en análisis estadístico ANOVA y correlaciones lineales de Pearson de algunos parámetros químicos de las variedades blanca, rosa y rosa mexicano del fruto de *A. diversifolia*.

1.2 HIPÓTESIS

1. Las propiedades físicas: masa (M_f), volumen (V), diámetro geométrico promedio (D_g), densidad del fruto (ρ_f), densidad aparente (ρ_b) esfericidad (ϕ), área superficial (S), porosidad (ϵ), y color de las tres variedades de *A. diversifolia* tienen diferencia significativa a un nivel de significancia $p < 0.05$.
2. Las propiedades químicas análisis proximal, pH, acidez titulable, glucosa, fructosa, sacarosa, minerales, vitamina C, fenoles totales y flavonoides totales de las tres variedades de *A. diversifolia* tienen diferencias significativas a un nivel de significancia $p < 0.05$.
3. Las propiedades funcionales, actividad antirradical, de las tres variedades de *A. diversifolia* tienen diferencia significativa a un nivel de significancia $p < 0.05$.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo general

Realizar un análisis descriptivo y comparativo de las propiedades físicas y químicas de las variedades blanca, rosa y rosa mexicano del fruto maduro de *Annona diversifolia*.

1.3.2 Objetivos específicos

1. Medir las propiedades físicas en el fruto: masa (M_f), volumen (V), diámetro geométrico promedio (D_g), densidad del fruto (ρ_f), densidad aparente (ρ_b), esfericidad (ϕ), área superficial (S), porosidad (ϵ), y color de las variedades blanca, rosa y rosa mexicano.
2. Realizar el análisis proximal en la pulpa de las variedades blanca, rosa y rosa mexicano.

3. Cuantificar pH, acidez titulable, glucosa, fructosa, sacarosa, Ca, Mg, Na, K, Fe, Cu, Mn y Zn, vitamina C en la pulpa de las tres variedades del fruto de *Annona diversifolia*.
4. Cuantificar fenoles totales, flavonoides totales y actividad antirradical en los extractos orgánicos de la pulpa de los frutos de *Annona diversifolia*.
5. Determinar si existen diferencias estadísticamente significativas y correlaciones lineales en los parámetros medidos entre las variedades blanca, rosa y rosa mexicano del fruto maduro de *Annona diversifolia*.

ANÁLISIS DE FUNDAMENTOS

En el presente capítulo se habla sobre las generalidades de *A. diversifolia*, así como de las determinaciones llevadas a cabo para la caracterización física y química de sus frutos. Se da un panorama sobre la importancia del análisis físico en frutos, el cual involucra la determinación de diámetro geométrico promedio (D_g), densidad del fruto (ρ_f), densidad aparente (ρ_a), esfericidad (ϕ), área superficial (S), porosidad (ϵ) y color principalmente. También se habla de la importancia del análisis químico el cual aborda un análisis proximal para la determinación de humedad, cenizas, proteínas, grasa cruda, fibra cruda, carbohidratos totales así como la cuantificación de algunos minerales, carbohidratos como fructosa, glucosa y sacarosa, vitamina C, fenoles totales, flavonoides totales y actividad antioxidante. Así mismo se mencionan técnicas utilizadas para la determinación de cada propiedad química realizada en este trabajo y se describe la importancia de estas determinaciones en la funcionalidad de un alimento.

2.1 GENERALIDADES DE *A. diversifolia*

Annona diversifolia es un frutal nativo de México y Centroamérica, pertenece a la familia de las anonáceas, se le encuentra en forma silvestre o constituyendo cercas vivas en las viviendas y ocasionalmente en pequeños huertos, por tanto, es considerada como planta de recolección. El árbol de *A. diversifolia*, Figura 2, se adapta a condiciones climáticas húmedas y generalmente calurosas, la época del año en que se cosecha el fruto es entre los meses de julio a septiembre. Crece desde los 100 a 800 msnm en suelos franco arenosos y arcillosos, que permiten un buen desarrollo vegetativo y productivo del cultivo. El fruto se

comercializa en madurez plena, cuando se agrieta por la base del pedúnculo; se le considera un fruto fino y agradable al paladar (Cruz, E., 2003).



Figura 2. Árbol de *Annona diversifolia*

En México se encuentran principalmente en el sureste, y los frutos tienen un valor comercial importante por la preferencia en el mercado local, se les conoce como papauce o ilama. Las variedades del fruto más abundantes son la blanca y la rosa, comúnmente se encuentra menos la anona rosa mexicano. Esta denominación es de acuerdo al color de la pulpa.

En general los frutos de *A. diversifolia*, son ovoides elipsoidales, con la base hundida y los carpelos sobresalientes. Se clasifican como frutos carnosos compuestos por múltiples bayas fusionadas asociadas a brácteas y axis floral, similar al de la guanábana (*Annona muricata*) (Salunkhe, D. K. *et al.* 2000). Los frutos de *A. diversifolia* a pesar de poseer

buenas características sensoriales, se conoce poca información de su composición química y características físicas de cada una de las variedades.

2.2 ANÁLISIS FÍSICO

La venta de frutos frescos es la forma de comercialización más importante de éstos, por lo que preservar su calidad es de gran importancia. Las características físicas son las más importantes a la hora de elegir un producto para consumirlo o comprarlo, ya que por medio de estas podemos evaluar su calidad, como por ejemplo, la apariencia, el tamaño, forma y color son unos de los principales indicadores. Por lo que resulta importante el máximo cuidado de los frutos durante y posterior a su cosecha.

Los frutos de *A. diversifolia* son muy delicados para su tratamiento posterior a la cosecha, ya que para que el fruto pueda cosecharse este debe estar abierto, es decir una pequeña parte de la pulpa del fruto debe ser expuesta, Figura 1. Además otras características que hay que considerar es que tienen una masa individual considerablemente grande (1 kg aproximadamente), por lo que su caracterización física es de gran importancia, ya que permitirá tener algunos parámetros que ayude n, en estudios posteriores a la generación de un empaque. Cabe recordar que un empaque es prácticamente único para un producto.

Los parámetros como diámetro geométrico promedio (D_g) y esfericidad (ϕ), podrían ser útiles para complementar, en un proyecto posterior, información para un diseño de empaques al fruto fresco. Lo que permitiría una mejor conservación física y un transporte adecuado para estos frutos. Además estos parámetros podrían ayudar para el diseño de maquinaria o utensilios que permita una mejor cosecha, evitando que estos sufran daños en el exterior, o puedan quedar golpeados o rasgados al cortarlos del árbol.

Para frutos como los de *A. diversifolia*, el volumen (V) y densidad de la fruta (ρ_f), tienen un papel importante en numerosos procesos tecnológicos y en la evaluación de la calidad del producto (Vursavu , K. *et al.*, 2006). Asimismo el peso puede ser usado para determinar el mejor tiempo de cosecha.

La determinación del área superficial (S) podrá ayudar para el diseño de películas o recubrimientos que permitan la protección de la delicada superficie del fruto, además para que una vez cosechada, se tenga una protección contra el deterioro del interior de este, pues como se mencionó antes, este fruto madura cuando una cierta parte de la pulpa es expuesta al ambiente (Ertekin, C. *et al.*, 2006; Vursavu , K. *et al.*, 2006).

En la literatura, existen algunos reportes sobre ciertas características físicas del fruto de *A. diversifolia*. Por citar un ejemplo, Cruz, E. *et al.* (2000) hicieron una recopilación y comparación de anonas de El Salvador, entre las que se encuentra el fruto de *A. diversifolia*. En la Tabla 1 se describen las características morfológicas de cinco especies de anonas.

Se observa que el análisis de la morfología del fruto no es específico sobre la variedad a la que se realizó el estudio, además que los frutos de *A. diversifolia* son los segundos más grandes entre las variedades estudiadas, algunas de estas características también se midieron en este trabajo como: la masa, el número de semillas y el color.

En este trabajo se realizaron las determinaciones de masa (M_f), volumen (V), diámetro geométrico promedio (D_g), densidad del fruto (ρ_f), densidad aparente (ρ_o), esfericidad (ϕ), área superficial (S), porosidad (ϵ), porcentaje (%) de cáscara, pulpa y huesos, así como la cuantificación del color de cada una de las variedades. A continuación se describirán los conceptos y métodos de medición de color debido a la relevancia que tiene para el presente trabajo.

Tabla 1. Algunas características morfológicas de cinco especies de *Annona* (Cruz, E. *et al.*, 2000).

Especie	Masa (g)	Número de semillas	Forma del fruto	Textura pulpa	Color pulpa	Textura cáscara	Forma de carpelos	msnm
<i>Annona squamosa</i>	322	64,6	Ovoide-esférico	Blanda, dulce	Blanca	Áspera	Muy prominente	200-700
<i>Annona cherimola</i>	453	52,4	Ovoide	Muy arenosa, blanda, dulce	Blanca	Lisa	No prominente	1000-1800
<i>Annona muricata</i>	1,319	175,0	Ovoide-elipsoidal	Arenosa, blanda, ácida o dulce	Blanca	Lisa y equinada	No prominente	200-700
<i>Annona reticulata</i>	628	80,0	Ovoide-esférico	Blanda, dulce	Blanca	Lisa	No prominente	30-700
<i>Annona diversifolia</i>	739	69,6	Ovoide-elipsoidal	Blanda, dulce	Blanca o rosa	Áspera	Prominente y no prominente	100-800

msnm, Metros sobre el nivel del mar.

2.2.1 Color. El color en los alimentos, ya sean procesados o naturales, es uno de los principales atributos sensoriales. El color, además del sabor y textura, juega un papel muy importante en la aceptación de un producto por el consumidor, ya que este es un indicador de calidad. Por otro lado, en el caso de alimentos un cambio en el color, es uno de los principales indicativos de que cambios químicos han ocurrido, o están ocurriendo en este.

El color es el resultado de la energía radiante en términos de correlación visual, y está basado en las propiedades del ojo humano. Un color puede ser descrito subjetivamente por la experiencia del observador u objetivamente, de acuerdo a su longitud de onda, parámetros L^* , a^* y b^* , cromaticidad entre otros.

Cuando un rayo de luz blanca incide sobre un objeto ocurren varios fenómenos simultáneamente: Existe una reflexión en la superficie, ocurre una refracción dentro del objeto, parte de la luz se transmite a través del objeto, parte de la luz se difunde y otra parte se absorbe.

En los alimentos el factor más importante que influye en la reflexión de la luz es la difusión debido a las características físicas de la superficie. De forma general la reflexión especular ocurre en un ángulo de 90° con respecto a la luz incidente y es la responsable principal del brillo del material, mientras la reflexión difusa ocurre a un ángulo de 45° y es la responsable principal del color.

Debido a que el color es uno de los atributos que ayudan a diferenciar a los alimentos, resulta importante la cuantificación del color en los frutos de *A. diversifolia*. Además de que no existen reportes en donde se cuantifique el color de las variedades de estos frutos. De tal forma, que en este trabajo se realizó la medición espectrofotométrica del color en la pulpa de las tres variedades lo cual servirá para establecer una diferenciación cuantitativa de estos.

2.2.2 Medición del color. Para la medición cuantitativa del color se han diseñado diversos sistemas. Entre los que se encuentran el sistema Hunter, Munsell y CIE.

El sistema Hunter transforma la reflexión o espectro de transmisión de un objeto en un espacio tridimensional de color. Este sistema está basado en el principio de tricromaticidad pero, en lugar de utilizar los tres colores primarios rojo, verde y azul, usa sus imaginarios primarios positivos X, Y y Z (MacDougall, B. D., 2002).

En el sistema Munsell todos los colores son descritos por tres atributos los cuales son matiz, valor y saturación. Este puede ser concebido en un sistema tridimensional. La escala de matiz está basada en 10 hues los cuales son distribuidos en una circunferencia del círculo hue, Figura 3. La saturación es una medida de la diferencia de un color desde un gris hasta la misma brillantez (deMan, J. M., 1999).

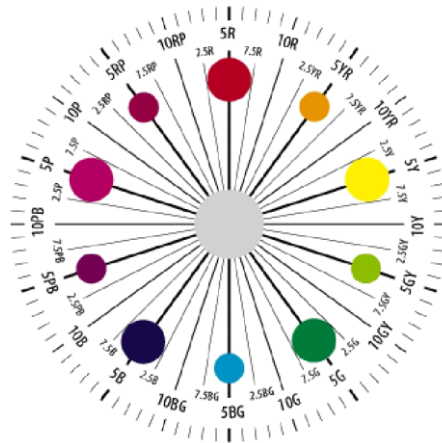


Figura 3. Círculo de matices o hues del sistema Munsell

El sistema CIE está basado en el principio de la sensibilidad del color por el ojo humano. Este acepta que el ojo contiene tres receptores sensibles a la luz, los receptores del rojo, verde y azul. En este, las escalas de color están basadas en los colores o puestos o teoría de la visión del color. Esta teoría, asume que hay una señal intermedia entre los receptores de la luz en la retina y el nervio óptico, el cual transmite las señales de color al cerebro. El sistema define tres constantes o estímulos para la cuantificación del color, L^* , a^* y b^* . En donde L^* representa la brillantez y va de 0 (oscuros) a 100 (claros), a^* los colores desde el rojo (+a) hasta el verde (-a) y b^* los colores desde el amarillo (+b) hasta el azul (-b) (deMan, J. M., 1999). Con estos tres parámetros L , a y b , podemos obtener los valores de cromaticidad (C^*) y tono o matiz (h). La cromaticidad es el grado de diferencia existente entre un color y un gris de su misma luminosidad y claridad, que corresponde con la saturación del color percibido. Mientras que el tono o matiz (h) está dado en grados por lo que cada grado nos dice el ángulo del tono, teniendo cada grado un color diferente.

Debido a que el sistema CIE es el más empleado para la cuantificación de color en el área de los alimentos, en este trabajo se usó para la medición de L^* , a^* y b^* en la pulpa de las tres variedades de los frutos de *A. diversifolia*.

2.3 ANÁLISIS QUÍMICO

El estudio de la composición química de un alimento es el punto de partida para el entendimiento de los procesos metabólicos llevados a cabo en este. De la misma manera ayuda al conocimiento del aporte energético que el alimento puede dar a la dieta diaria, y en un futuro nos indica los tipos de procesos a los que el alimento en estudio puede ser sometido sin sufrir alteraciones graves en su composición y características sensoriales. Por otra parte, el conocimiento de cierta composición química, nos da un panorama de la funcionalidad biológica que el alimento, puede dar al organismo. Por lo que a continuación se da una descripción de las determinaciones que se llevaron a cabo para la caracterización química de la pulpa de las tres variedades, blanca, rosa y rosa mexicano, de los frutos de *A. diversifolia*.

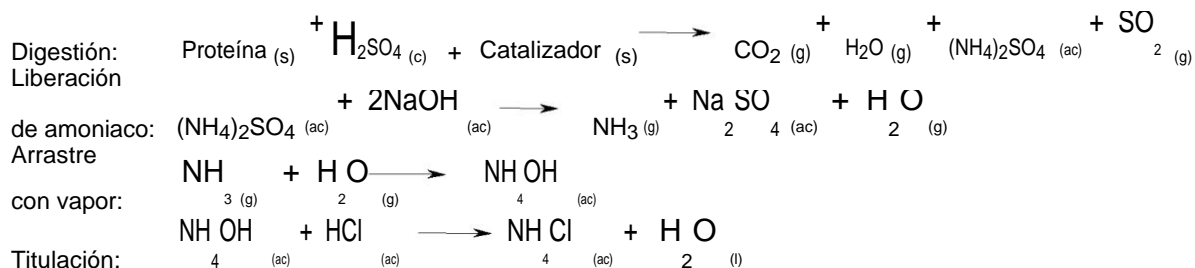
2.3.1 Análisis proximal. A este análisis se le denomina proximal porque no determina sustancias químicamente definibles sino asociaciones químicas que responden a determinadas reacciones analíticas y que por lo tanto nos da un índice nutritivo de los alimentos. Dentro de estas asociaciones encontramos:

Humedad: La cuantificación de humedad indica la cantidad de agua presente en un alimento. Para su determinación existen los métodos químicos, instrumentales, por destilación y por secado. La cuantificación de humedad por secado se basa en determinar la diferencia en peso de la muestra húmeda menos el peso de la muestra seca, obteniéndose la cantidad de agua total en el alimento. Este último método fue empleado para el presente trabajo, ya que se encuentra certificado por la AOAC (método 925.09, 1997).

Cenizas: Las cenizas son los residuos inorgánicos de los alimentos que permanecen en la muestra posterior a la ignición u oxidación completa de la materia orgánica. Estas contienen a los macro y microelementos necesarios para el buen funcionamiento del

organismo. Para la cuantificación de cenizas existen los métodos de cenizas por secado en plasma a baja temperatura, cenizas en húmedo (oxidación) para muestras con alto contenido de grasas y cenizas en seco. En este trabajo se realizó la cuantificación de cenizas en seco, en donde la muestra seca se carboniza y posteriormente se incinera a 600 °C, es un método certificado por la AOAC (método 923.03, 1997).

Proteínas: Las proteínas son moléculas formadas por unidades de aminoácidos, al igual que los carbohidratos proporcionan 4 kcal/g, y son esenciales para la formación de músculos y tiene acción en la formación de enzimas y anticuerpos. Los métodos para la determinación del contenido de proteínas de un alimento son: el Método de Biuret que se basa en la reacción química del enlace peptídico y posterior medida fotométrica. Método de Lowry, que se basa en la reacción química de determinados aminoácidos de la proteína y posterior medida fotométrica. Medida de la absorción ultravioleta a una determinada longitud de onda. Medida de la turbidez por floculación de la proteína disuelta mediante un precipitante de proteínas; y el método Kjeldahl que determina el contenido de nitrógeno (Badui, S. D., 1993). Este último método es el más utilizado y confiable para la cuantificación de nitrógeno orgánico, está aprobado por organizaciones internacionales. En esta técnica se digieren las proteínas, y otros componentes orgánicos de los alimentos, en una mezcla con ácido sulfúrico en presencia de catalizadores como sales de cobre, mercurio o selenio. El nitrógeno orgánico total se convierte en sulfato de amonio. La mezcla digerida se neutraliza con una base, se recolecta con agua para formar hidróxido de amonio y se titula con HCl estandarizado, lo cual se convierte en el nitrógeno de la muestra. Las reacciones llevadas a cabo en este método se muestran a continuación:



El resultado del análisis representa el contenido de proteína cruda del alimento ya que el nitrógeno también proviene de componentes no proteicos. Este método es el que se empleó en el presente trabajo, y es el método certificado por la AOAC (Método 954.01, 1997).

Grasa cruda: Los lípidos, al igual que los carbohidratos, son la fuente principal de energía en la dieta, 9 kcal/g, y suministran los ácidos grasos esenciales para el crecimiento y desarrollo, así como la promoción de la absorción de las vitaminas liposolubles. Para la determinación cuantitativa de lípidos existen los métodos volumétricos, de extracción por solubilización y de extracción directa con disolventes. Dentro de estos últimos se encuentra la extracción Soxhlet en donde el contenido en lípidos libres, que consisten fundamentalmente de grasas neutras (triacilglicérols) y de ácidos grasos libres, se puede determinar en los alimentos por extracción del material seco y reducido a polvo con éter de petróleo o con éter dietílico en un aparato de extracción continua. El método de extracción por Soxhlet, es un proceso de extracción eficiente que se usa comúnmente para compuestos semivolátiles. Este método genera un volumen de extracto el cual se concentra para cuantificar la porción lipídica. Este método se utilizó en este trabajo por su eficiencia, además de ser un método ampliamente utilizado y certificado por la AOAC (Método 920.39, 1997).

Fibra cruda: La fibra cruda es el remanente de la digestión ácido-alcalina de una muestra desgrasada. La fibra cruda es importante para el buen funcionamiento del intestino. Para su cuantificación existen diferentes métodos entre los que se encuentran los

gravimétricos, químicos y enzimáticos. Para este trabajo la cuantificación de fibra cruda se llevó a cabo por un método químico, en donde la muestra desgrasada se sometió a una digestión ácido-alcalina, cuantificando el remanente que es la fibra cruda. Este último método es el certificado por la AOAC (Método 962.09, 1997).

Carbohidratos totales: Los carbohidratos son la principal fuente de energía para el organismo, ya que proporcionan poco más del 55% requerido. Dada la importancia de estos compuestos se han desarrollado varios métodos para su cuantificación entre los que se encuentran: la refractometría, polarimetría, reducción de cobre, cromatografía de intercambio iónico, HPLC, espectrofotometría con reacciones enzimáticas y colorimétricas. En los análisis proximales para cuantificar carbohidratos la técnica utilizada es la cuantificación por diferencia como extracto libre de nitrógeno.

En la literatura a pesar de que existe información del análisis proximal de la pulpa del fruto de *A. diversifolia*, Tabla 2, los autores no especifican la variedad estudiada (Cruz, E. *et al.*, 2000; Duke, A. T. *et al.*, 1993).

Tabla 2. Análisis proximal de la pulpa de *Annona diversifolia* reportada por otros autores.

Análisis (base húmeda)	Cruz, E. <i>et al.</i> , 2000	Duke, A. T. <i>et al.</i> , 1993
Humedad (%)	79.60	71.15
Carbohidratos totales (%)	16.85	24.1
Proteínas (%)	1.31	2.8
Grasa (%)	0.01	0.2
Ceniza (%)	1.26	1.4
Fibra cruda (%)	0.97*	1.3
Fósforo (ppm)	300	520
Calcio (ppm)	ND*	320
Fierro (ppm)	ND*	7

ND, no determinado.

A la fecha, no hay reportes en la literatura que muestre un análisis comparativo de las características físicas y químicas de las variedades del fruto de *A. diversifolia*. Con la finalidad de describir las tres variedades del fruto de *A. diversifolia* y realizar un estudio comparativo entre estas variedades se realizó el análisis proximal de las variedades blanca, rosa y rosa mexicano.

2.3.2 Carbohidratos. Los carbohidratos están ampliamente distribuidos en la naturaleza. Estos son aislados de plantas y animales como moléculas discretas de bajo peso molecular o como polímeros (polisacáridos), el peso molecular de estos es mayor a un millón de unidades de masa atómica en algunos casos.

El análisis de carbohidratos es de mucha importancia debido a que tiene dos funciones principales:

1. Determinar el aporte nutricional de los alimentos.
2. Identificar y cuantificar el contenido de carbohidratos específicos.

El conocimiento de la cantidad y calidad de los azúcares es esencial debido a que estos compuestos son los principales constituyentes de frutas, vegetales, miel y otras matrices diferentes, y están involucrados en muchas características importantes, como el sabor, madurez, autenticidad, condiciones de almacenamiento entre otros (Martínez, C. M. *et al.*, 2004). Debido a que los carbohidratos son los principales constituyentes de las frutas y a que no existen reportes que cuantifiquen la cantidad de sacarosa, glucosa y fructosa en la pulpa del fruto de *A. diversifolia*, resultó interesante cuantificar y comparar los azúcares en la pulpa, y de esta manera saber que monosacárido es el que aporta el mayor poder edulcorante.

2.3.3 Cuantificación de sacarosa, glucosa y fructosa. Existen diversos métodos para el análisis de carbohidratos, entre los que se encuentran los métodos químicos, físicos y cromatográficos.

Dentro de los métodos cromatográficos más aplicados para la cuantificación de carbohidratos en alimentos están: la cromatografía de gases (GC) y la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

La GC se basa en la volatilización de la muestra y posterior separación en una columna cromatográfica. Esta técnica se aplica a especies que posean una apreciable volatilidad y estabilidad térmica a temperaturas de hasta 100°C. De otra manera se requiere de la aplicación de técnicas que permitan la volatilización de los componentes de la muestra de interés, un ejemplo de esto es la derivatización, que en el caso de carbohidratos sería mediante la formación de ésteres o éteres para disminuir el punto de fusión de los analitos y por lo tanto favorecer la volatilización.

La HPLC, es la técnica más utilizada, ya que se adapta a cualquier determinación cuantitativa exacta, es idónea para la separación de especies no volátiles y se aplica a sustancias que son de gran interés para la industria (Skoog, D. A. *et al.*, 2001). Por lo anterior se utilizó en este trabajo para la cuantificación de sacarosa, glucosa y fructosa.

2.3.4 Minerales. Los minerales son indispensables para el buen funcionamiento del organismo humano, y al igual que las vitaminas su deficiencia puede provocar graves problemas a la salud. Dentro de los principales minerales están: calcio, magnesio, sodio, potasio, hierro, cobre, manganeso, cobalto, cinc y molibdeno. Muchos de ellos actúan como cofactores de enzimas, para controlar la presión osmótica de fluidos celulares y el pH, o como parte constitutiva de algunas macromoléculas (Badui, S. D., 1993).

Los minerales abundan en todos los frutos Tabla 3; sin embargo, el contenido de las sales depende en gran medida del tipo de suelo y del agua utilizada en el cultivo de los frutos. Es decir, las plantas sólo contendrán aquellos elementos químicos que se les proporcione como parte de su nutrición, por el suelo o por irrigación.

En la Tabla 3 se muestra el contenido de algunos minerales en otras especies de anonas y en una variedad de *A. diversifolia*, sin embargo no existe un reporte que nos diga la diferencia entre los minerales de las tres variedades, además en dicho estudio solo se cuantificaron tres minerales. Por lo que uno de los objetivos de este trabajo fue cuantificar Ca, Mg, Na, K, Fe, Cu, Mn y Zn en la pulpa de las tres variedades del fruto de *A. diversifolia*.

Tabla 3. Macro y microelementos en algunos frutos, mg/100 g de pulpa fresca (*Letarme, P. *et al.*, 2006. **Duke, T. A. *et al.*, 1993).

Fruto		Macroelementos				Microelementos			
Nombre científico	Nombre común	Ca	Mg	Na	K	Fe	Cu	Mn	Zn
<i>Carica papaya</i> L.*	Papaya	16	10	7	85	0.37	0.01	0.03	0.09
<i>Passiflora edulis</i> Sims*	Fruta de la pasión	53	16	16	764	0.66	0.05	0.16	0.43
<i>Morinda citrifolia</i> L.*	Noni	43	17	13	374	0.57	0.11	0.28	0.21
<i>Musa acuminata</i> Colla*	Plátano	19	42	9	470	2.62	0.09	0.32	0.25
<i>Annona cherimola</i> Miller*	Chirimoya	37	21	3	414	0.56	0.11	0.15	0.20
<i>Annona squamosa</i> L.*	Anona	68	60	19	551	1.30	0.25	0.15	0.50
<i>Annona muricata</i> L.*	Guanábana	38	25	20	523	0.38	0.10	0.07	0.11
<i>Annona diversifolia</i> Saff.**	Papauce	32	ND	ND	ND	0.70	ND	ND	ND

ND, no determinado.

2.3.5 Cuantificación de minerales. Para la cuantificación de minerales en alimentos se han desarrollado métodos espectrofotométricos principalmente, los cuales difieren en la forma de atomización de la muestra. Dentro de estos métodos se encuentran: La absorción atómica con atomización electrotérmica, métodos con generación de hidruros y la absorción atómica con llama.

La espectroscopía de absorción atómica (AAS) consiste en la medición de las especies atómicas por su absorción a una longitud de onda particular. La AAS se basa en el principio que los átomos libres en estado fundamental pueden absorber la luz a una cierta longitud de onda. La absorción es específica, por lo que cada elemento absorbe a longitudes de onda únicas. La especie atómica se logra por atomización de la muestra, siendo los distintos procedimientos utilizados para llegar al estado fundamental del átomo lo que diferencia las técnicas y accesorios utilizados. La AAS es una técnica analítica aplicable al análisis de trazas de elementos metálicos en minerales, muestras biológicas, metalúrgicas, farmacéuticas, aguas, alimentos y de medio ambiente (Hardison, A. *et al.*, 2004; Pandolfi, G., 2008).

La técnica de atomización generalmente usada es la de AA con llama, en la que en un atomizador de llama la disolución de la muestra es nebulizada mediante un flujo de gas oxidante, mezclado con el gas combustible (aire acetileno u óxido nitroso-acetileno) y se transporta a una llama donde se produce la atomización. La cuantificación de los minerales Ca, Mg, Na, K, Fe, Cu, Mn y Zn en este proyecto se realizó por absorción atómica con llama.

2.3.6 Vitamina C. Las vitaminas son los componentes minoritarios de los alimentos pero juegan roles importantes en la nutrición humana. Dentro de las vitaminas más importantes se encuentra la vitamina C, ácido L-ascórbico, que la proporcionan las frutas y los vegetales. El ácido L-ascórbico es un compuesto altamente polar, soluble en agua, e insoluble en disolventes no-polares. Es una lactona caracterizada por un grupo enediol el cual le hace ser un compuesto fuertemente reductor, Figura 4.

Se oxida reversiblemente a la forma ácido L-dehidro ascórbico, quien también muestra actividad biológica, Figura 4 (Hernández, Y. *et al.*, 2006). Se considera como el agente reductor más reactivo que puede existir en forma natural en el tejido viviente, y también

como nutriente esencial para el ser humano, porque este no puede sintetizarlo por sí solo y es necesario obtenerlo a partir de frutas y verduras consideradas como la fuente principal de esta vitamina (Hernández, Y. *et al.*, 2006).

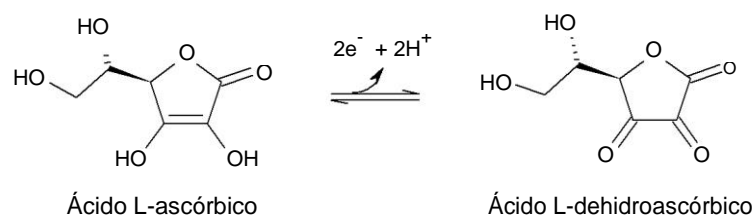


Figura 4. Oxidación del ácido L-ascórbico

El ácido ascórbico se distribuye en células de plantas donde juega muchos roles cruciales en crecimiento y metabolismo. Como un antioxidante potente, el ácido ascórbico tiene la capacidad de eliminar especies reactivas de oxígeno, mantiene el enlace membrana- α tocoferol en estado reducido, actúa como cofactor manteniendo la actividad de un número de enzimas (Hernández, Y. *et al.*, 2006).

Por otra parte la vitamina C es la menos estable de todas las vitaminas y es fácilmente destruible durante el procesamiento y almacenamiento de los alimentos. El grado de destrucción se incrementa por la acción de metales especialmente el cobre, hierro y por acción de algunas enzimas. La exposición al oxígeno, el calentamiento prolongado en presencia de oxígeno y la exposición a la luz son perjudiciales para el contenido de vitamina C en los alimentos.

Se tiene reporte del contenido de vitamina C en la pulpa del fruto de *A. diversifolia*, 14 mg/100 g de pulpa (Duke, A. T. *et al.*, 1993), sin embargo no hay información de que variedad fue estudiada. Por lo anterior, uno de los objetivos de este trabajo fue la

cuantificación de la vitamina C en la pulpa de las tres variedades del fruto y una comparación posterior entre estas.

2.3.7 Cuantificación de vitamina C . Para la cuantificación de vitamina C se han reportado métodos diversos tales como titulación, fluorimetría, cromatografía, métodos electroquímicos y espectrofotométricos (Torregrosa, F. D., 2006).

Los métodos espectrofotométricos se basan en medir la cantidad de luz absorbida por las sustancias. Estos métodos se diferencian entre los que usan un indicador redox y los que incluyen la formación de un cromóforo por derivatización. En este trabajo la cuantificación de vitamina C se realizó por un método espectrofotométrico, empleando la sal DCPI. La reacción se muestra en la Figura 5. La sal DCPI se reduce por el ácido ascórbico, y conforme el DCPI es reducido, la coloración azul característica del DCPI disminuye, esto se cuantifica a 520 nm.

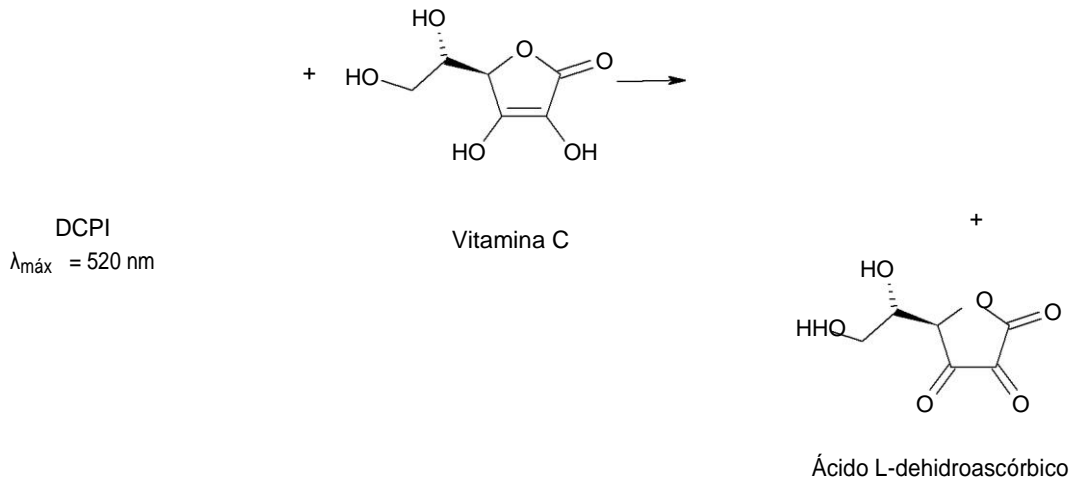


Figura 5. Reacción de DCPI con la vitamina C para su cuantificación

2.3.8 Fenoles totales. Los compuestos fenólicos son un grupo de compuestos orgánicos con uno o más grupos hidroxilos en el anillo o anillos aromáticos. Pueden ser fenoles simples hasta aquellos complejos conocidos como polifenoles. Los fenoles simples son el resultado de la descarboxilación de ácidos fenólicos, degradación térmica de lignina o de la actividad antimicrobiana. Solo algunos fenoles son considerados con importancia en alimentos, como el ácido cafeico, ferúlico, gálico y sus derivados, y los flavonoides y sus derivados. Los flavonoides son pigmentos importantes en una gran variedad de frutos y vegetales. Estos compuestos pueden ser clasificados como solubles en agua o solubles en lípidos, dependiendo en como ellos actúen primeramente en una fase acuosa o en una región lipofílica en membranas celulares. Los compuestos fenólicos pueden contribuir con el aroma y sabor, proporcionando amargura y acidez a algunos frutos, así como el color de numerosos productos alimenticios de origen vegetal o animal. Asimismo estos compuestos presentan actividad biológica como antimicrobianos, antivirales, antiinflamatorios, antitumorales, anticancerígenos y antioxidantes principalmente (Lule, S. U. *et al.*, 2005). Algunos fenoles encontrados en frutos del mismo género de *A. diversifolia* se muestran en la Figura 6.

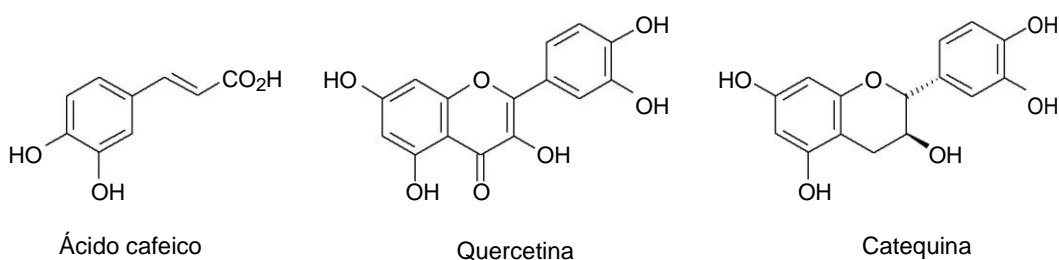


Figura 6. Fenoles encontrados en *A. crassiflora* o *araticum* (Roesler, R. *et al.*, 2007)

Existen estudios publicados sobre el contenido de fenoles totales de algunas especies de anonas. Tal es el caso de araticum (*Annona crassiflora*), en la cual se estudió el contenido de fenoles totales en la cáscara, la pulpa y las semillas del fruto. Los autores encontraron que la mayor cantidad se encontraba en los extractos etanólicos de las semillas seguida de la cáscara y finalmente la pulpa, Tabla 4. También se han cuantificado los fenoles totales de chirimoya (*Annona cherimolia*) en los extractos orgánicos polares (acetona-agua, metanol-agua) de la pulpa de esta especie de anona, Tabla 4.

Tabla 4. Fenoles totales expresado como equivalentes de ácido gálico (EAG) de los extractos orgánicos del fruto maduro araticum (*Roesler, R. *et al.*, 2007) y chirimoya (**Vasco, C. *et al.*, 2008).

Especie de anona	Fenoles totales (mg EAG/100 g) ^a	Fenoles totales (mg EAG/100 g) ^b
<i>Annona crassiflora</i> pulpa*	652.64	2030 ± 352
<i>Annona crassiflora</i> cáscara*	3821.13	9072 ± 499
<i>Annona crassiflora</i> semilla*	9456.40	13699 ± 756
<i>Annona cherimolia</i> Mill pulpa**	323 ± 83	ND

^a Expresado como masa fresca. ^b Expresado como masa seca. ND, no determinado.

Como se observa en la Tabla 4, especies de anona presentan concentraciones importantes de fenoles totales, y dado que estos compuestos son un parámetro relevante para evaluar la funcionalidad de un alimento. En este trabajo se hizo la cuantificación de fenoles totales en los extractos etanólicos de la pulpa de los frutos y se realizó una comparación de esta concentración entre las variedades.

2.3.9 Cuantificación de fenoles totales. La cuantificación e identificación de los componentes fenólicos en la dieta ha despertado un gran interés por su importancia

funcional. Además, la gran diversidad de compuestos fenólicos dispersos en los tejidos vegetales, así como sus diferentes estructuras químicas, han generado la necesidad de desarrollar un gran número de técnicas analíticas para su cuantificación e identificación (Martínez-Valverde, I. *et al.*, 2000). Dentro de las técnicas analíticas para la cuantificación e identificación de compuestos fenólicos se encuentran las técnicas cromatográficas y métodos espectrofotométricos (Martínez-Valverde, I. *et al.*, 2000). A continuación se detallan los métodos espectrofotométricos.

En los métodos espectrofotométricos se encuentran los ensayos ultravioleta, en donde cada grupo de compuestos fenólicos se caracteriza por tener una o varias absorbancias máximas a distintas longitudes de onda dentro del espectro ultravioleta. Así, los fenoles simples tienen una absorbancia máxima entre 220 y 280 nm, mientras que los compuestos fenólicos tales como ácido clorogénico, flavonoides, glicósidos derivados de flavonoides entre otros presentan una variación amplia (200 a 450 nm) en la longitud de onda a la cual presentan una absorbancia máxima. Una de las técnicas más empleadas dentro de este grupo es la determinación del ácido clorogénico, el cual se cuantifica después de su extracción con etanol y su posterior lectura de la absorbancia máxima a una longitud de onda de 325-328 nm (Martínez-Valverde, I. *et al.*, 2000). Otra técnica usada comúnmente para determinar fenoles en alimentos es el ensayo de la vainillina para la determinación de compuestos flavan-3-ol, dihidrochalconas y proantocianidinas (Martínez-Valverde, I. *et al.*, 2000). Por otro lado está el ensayo de Folin-Ciocalteu para cuantificación de fenoles totales, esta técnica es la más utilizada para determinar de manera cuantitativa a los fenoles. Esta prueba consiste en mezclar tungstato y molibdato en un medio básico. Los fenoles son fácilmente oxidables en medio básico quienes reaccionan con el molibdato formando óxido de molibdeno MoO₃, este compuesto puede ser identificado y cuantificado por espectroscopía de UV/vis debido a que absorbe a una longitud de 750 nm. El contenido de fenoles totales generalmente, se expresa en equivalentes de ácido gálico, Figura 7.

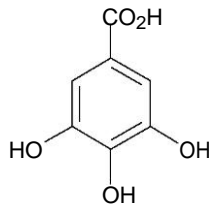


Figura 7. Estructura del ácido gálico

Debido a que el método de Folin-Ciocalteu cuantifica el contenido total de fenoles y a que este es el más utilizado, se eligió para la realización de este trabajo. Además este método también se empleó por Roesler, R.*et al.* (2007) para la cuantificación de fenoles totales en *A. crassiflora*.

2.3.10 Flavonoides totales. Los flavonoides son compuestos fenólicos abundantes en la naturaleza, producto del metabolismo de las plantas. Estos metabolitos secundarios se encuentran principalmente en las partes aéreas de estas, ya que necesitan la luz del sol para sintetizarse. Por lo que estos compuestos se concentran en frutos, vegetales, semillas y flores. Los flavonoides son compuestos aromáticos, constituidos por un sistema heterocíclico de dos anillos fusionados, llamado benzopirano, Figura 8.

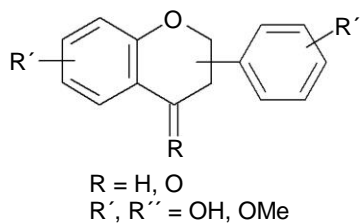


Figura 8. Sistema heterocíclico de dos anillos, benzopirano.

Dada su capacidad para capturar radicales libres y de crear complejos con iones metálicos tienen una actividad antioxidante muy alta. La actividad de los flavonoides como antioxidantes depende de las propiedades redox de sus grupos hidroxifenólicos y de la relación estructural entre las diferentes partes de la estructura química.

2.3.11 Cuantificación de flavonoides totales. Dada la importancia de los flavonoides por su gran capacidad antioxidante, existen diversos métodos para su cuantificación entre los que se encuentran: Los métodos cromatográficos, colorimétricos y espectrofotométricos. Si nuestro interés es determinar los flavonoides presentes en nuestra muestra o determinar la estructura de estos los métodos cromatográficos permiten la caracterización de estos compuestos. En cambio, los métodos espectrofotométricos de extractos permiten cuantificar flavonoides con estructuras similares. Las flavonas y flavonoles, desde el punto de vista reactivo, forman complejos estables con el $AlCl_3$ y son susceptibles de analizar mediante espectrofotometría UV/Vis, entre tanto, las flavanonas y flavanoles reaccionan mejor con el 2,4-dinitrofenilhidrazina (Salamanca, G. G. *et al.*, 2007). Para la cuantificación de flavonoides, se utilizó el método espectrofotométrico, usando $AlCl_3$ para la formación de complejos coloridos que presentan absorbancias a 510 nm (Won Lee, K. *et al.*, 2003).

2.3.12 Actividad antirradical. El énfasis en evaluar la capacidad antioxidante de los alimentos se sustenta en que el estrés oxidativo es un proceso biológico propuesto como un factor etiológico de las enfermedades crónicas no transmisibles. Esto ocurre cuando la velocidad de formación de los radicales libres es superior a la actividad de los sistemas protectores. En condiciones fisiológicas, los compuestos agresores son controlados por la acción integrada y armónica de enzimas generadas por la evolución de miles de años y que

depende de nutrientes antioxidantes de los alimentos de origen vegetal, como las vitaminas E y C y compuestos bioactivos antioxidantes llamados fitoquímicos. El grupo de fitoquímicos más importante es el de los polifenoles, que actúan directa e independiente del sistema enzimático. Las propiedades de fitoquímicos de frutos y vegetales se han investigado extensamente. Los más investigados son flavonoides, vitaminas A, B, C y E, tocoferoles y selenio (Bradford, F. *et al.*, 2007).

Existen reportes sobre la actividad antirradical en especies de anona, sin embargo no hay información sobre esta actividad en la pulpa de los frutos de *A. diversifolia*, por lo que se llevó a cabo esta cuantificación en el presente trabajo.

2.3.13 Medición de la actividad antirradical. Existen métodos empleados para medir la actividad antirradical que se basan en que un sustrato se oxida, y se cuantifica el consumo de oxígeno, productos de oxidación, o la pérdida del sustrato (Fukumoto, L. R. *et al.*, 2000). Otros métodos involucran la generación de especies radicales y se determina la concentración del radical en presencia de los antioxidantes evaluados (Kolayli, S. *et al.*, 2004). En la Figura 9 se observa la reacción general de los radicales libres con los antirradicales o antioxidantes. En donde el radical libre R^\bullet , reacciona con el antioxidante A-H por transferencia de un hidrógeno, formando otro radical libre más estable deteniendo la propagación de los radicales libres.

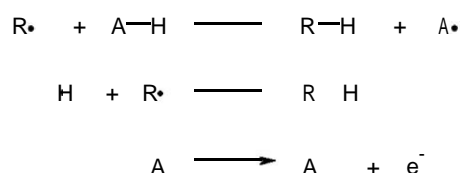


Figura 9. Reacción general de radicales libres

Entre los métodos desarrollados para medir la actividad antirradical se encuentran: La actividad antioxidante equivalente a trolox (TEAC), la capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC), la absorción total de radicales potenciales (TRAP), la fotoquimioluminiscencia (PCL) y el método de descoloramiento del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) (Schlesier, K. *et al.*, 2002). Este último método consiste en hacer reaccionar cantidades conocidas tanto de DPPH como del antioxidante a evaluar. El DPPH antes de la reacción con el antioxidante muestra un color morado intenso, que al ser reducido adquiere una coloración amarilla Figura 10.



$$\lambda_{\text{máx}} = 517 \text{ nm}$$

Figura 10. Reacción de descoloramiento del DPPH al ser reducido por los antioxidantes

Este decremento en la coloración se cuantifica a 517 nm y se calcula el IC₅₀ que es la concentración de pulpa a la cual reduce en un 50% la concentración de radical DPPH (Allothman, M. *et al.*, 2009; Du, G. *et al.*, 2009).

Se ha estudiado la actividad antirradical de otras especies de *Annona*, tal es el caso de araticum (*Annona crassiflora*) de la cual se hizo el análisis de la actividad antirradical de la cáscara, pulpa y semillas del fruto. Se encontró que la mejor actividad antirradical la poseían los extractos etanólicos de las semillas, debido a su contenido en fenoles, seguidos de la cáscara y finalmente la pulpa, Tabla 5.

Tabla 5. Actividad antirradical de los extractos etanólicos de *A. crassiflora* (Roesler, R. *et al.*, 2007).

	IC ₅₀ ^a (µg/mL) DPPH ^b	IC ₅₀ ^a (µg/mL) DPPH ^c
<i>Annona crassiflora</i> pulpa	148.82	219.34
<i>Annona crassiflora</i> cáscara	48.82	71.95
<i>Annona crassiflora</i> semilla	31.14	45.89

^a Actividad antirradical expresada como IC₅₀ (concentración final del extracto en las cubetas definido como µg/mL de extracto requerida para decrecer la concentración inicial de DPPH en un 50%). ^b Expresado en masa seca. ^c Expresado en masa húmeda.

En este trabajo se llevó a cabo la determinación de la actividad de secuestro de radicales libres de los extractos etanólicos de la pulpa del fruto de *A. diversifolia* por el método del DPPH, debido a que es uno de los más empleados.

METODOLOGÍA

3.1 EQUIPOS Y REACTIVOS

Báscula Torrey modelo MFQ-20, balanza granataria Oh aus de 2610g, balanza analítica Sartorius BL210S, congelador General Electric modelo FUM 17DRBRWIT, refrigerador Acros-Whirlpool modelo ARM07NP, calibrador vernier digital electrónico General (± 0.1 mm), estufa Fisher científico, mufla Thermolyne 1400, potenciómetro Conductronic pH 10, desionizador Barnstead megapure system D2, sonicador-degasificador Branson 8510, centrífuga IEC HN-SII, espectrofotómetro de absorción atómica GBC 932 AA equipado con lámparas de cátodo hueco, colorímetro espectrofotómetro HunterLab UltraScanVIS, lector de microplacas Biotec LX-808, espectrofotómetro de UV/Vis PerkinElmer Lambda 35, placas de 96 pozos Costar de media área, celdas de 4 mL de metacrilato y poliestireno, parrillas de calentamiento Barnstead Thermolyne CIMAREC e IKA C-MAG HS4, licuadora Osterizer modelo 465-42 de 3 velocidades, vórtex Barnstead International Type 16700 Mixer e IKA vortex 3, rotavapor Heidolph Laborota 4000 efficient, bomba de vacío vacuumbrand MZ2C, HPLC GBC LC 1445, detector GBC de Índice de refracción LC124, bomba GBC LC1150, columna MetaCarb 87C Varian, calentador para columna eppendorf CH-30, cronómetro Cole Parmer.

Material de vidrio en general, filtros con membrana de $0.20 \mu\text{m}$ Sartorius minisart.

2,6-dicloroindofenolato de sodio (DCPI), ácido meta fosfórico, reactivo de Folin-Ciocalteu, ácido gálico, catequina, 2,6-di-*tert*-butil-4-metilfenol (BHT), 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH), óxido de lantano, D-(+)-glucosa, D-(-)-fructosa, sacarosa (todos marca

Sigma-Aldrich). Acetato de sodio, ácido acético glacial, estándar de Fe 1000 ppm, estándar de Cu 1000 ppm, estándar de Na 1000 ppm, estándar de Mg 1000 ppm, estándar de Mn 1000 ppm, cloruro de cesio, ácido clorhídrico, ácido nítrico, cloruro de aluminio, etilendinitrilotetracetato disódico y agua grado HPLC (todos de la marca J.T. Baker). Nitrito de sodio, carbonato de sodio e hidróxido de sodio (todos de la marca Reactivos químicos Monterrey). Ácido ascórbico (Reasol), etanol (Omnichem), estándar de Zn 1000 ppm (Hycel), estándar de Ca 1000 ppm (Merck), estándar de K 1000 ppm (Buck Scientific) y metanol grado HPLC (EMD), nitrógeno de alta pureza (INFRA). Todos los reactivos y disolventes usados fueron grado ACS, si no se menciona otra pureza.

3.2 OBTENCION DE LAS MUESTRAS

En las fechas 6 y 7 de septiembre del 2008 se acudió a los mercados Díaz Ordaz, San Juan y de Los Ancianos, localizados al centro de la ciudad de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas en donde se compraron los frutos de *A. diversifolia*, Figura 11.



Figura 11. Venta del fruto de *Annona diversifolia* en mercados de la ciudad de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas

Cabe señalar que la fruta de estos mercados provenía de la población de Luis Echeverría, Chiapas, la cual está localizada a 100 km al sureste de la ciudad de Tuxtla Gutiérrez. En Luis Echeverría los árboles de *Annona diversifolia* crecen de manera silvestre formando cercas vivas en los hogares, de aquí también se compraron muestras aleatoriamente, de aquellas casas en donde se tuvieran frutos con madurez organoléptica, es decir que estuvieran abiertos y en condiciones de ser ingeridos por los consumidores, como se muestra en las Figuras 1 y 11. Se obtuvieron de 6 a 10 kg de frutos libres de plagas de cada variedad.

Después de adquirir los frutos se colocaron en recipientes de tal forma que estos no se dañaran por el peso, fueron transportados en un automóvil a temperatura de aire acondicionado hasta los laboratorios de ciencias Químico-Biológicas, UTM. Antes de separar la pulpa de la cáscara y las semillas, se realizaron las determinaciones de las propiedades físicas: longitud (L), ancho (W) grosor (T), masa (M_f) volumen (V) y densidad aparente (ρ_b). La pulpa de cada variedad se separó manualmente de la cáscara y de las semillas, se mezcló y se guardó en frascos de vidrio a -20°C , resguardada de la luz, hasta su análisis.

3.3 ANÁLISIS FÍSICO

3.3.1 Determinación de propiedades físicas. Las propiedades físicas de las variedades de *A. diversifolia* se determinaron de la manera siguiente:

Las dimensiones lineares: longitud (L), ancho (W) y grosor (T), Figura 12, se determinaron con un calibrador digital electrónico.

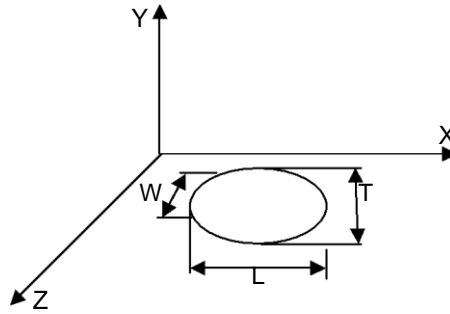


Figura 12. Dimensiones lineales de frutos no esféricos (Ertekin, C. *et al.*, 2006)

El diámetro geométrico promedio (D_g), la esfericidad (Φ) y el área superficial (S) se calcularon con el uso de las siguientes ecuaciones (Topuz, A. *et al.*, 2005):

$$D_g = \sqrt[3]{LWT} \quad (1)$$

$$\Phi = \frac{D_g}{L} \quad (2)$$

$$S = \pi D_g^2 \quad (3)$$

donde W es la longitud de la parte más ancha del fruto y T la longitud de la parte más delgada. Esto debido a que los frutos no son completamente esféricos y presentan una forma ligeramente elíptica.

La masa (M_f) del fruto de cada variedad recolectada se midió en una balanza granataria. El volumen (V) se determinó por el método del desplazamiento delíquido, se usó tolueno ya que este no se absorbe por los frutos (Topuz, A. *et al.*, 2005), Figura 13. Con los valores de volumen y masa de cada fruto se pudo obtener la densidad de la fruta (ρ_f).

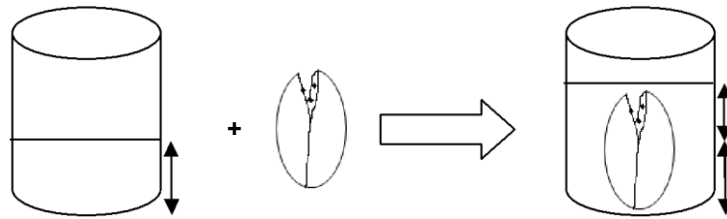


Figura 13. Método del desplazamiento del líquido para medir el volumen del fruto

La densidad aparente (ρ_b) de los frutos se determinó colocando una cantidad de frutos necesarios para llenar una caja de masa y volumen conocidos, dejando la menor cantidad de espacios vacíos, como se muestra en la Figura 14. Después, la caja con los frutos dentro, se pesó en una báscula, con la masa de los frutos y el volumen de la caja se calculó la densidad aparente de los frutos.

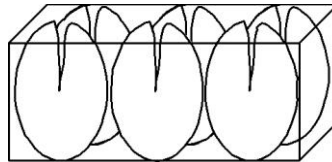


Figura 14. Llenado de la caja de volumen conocido con los frutos recolectados
La porosidad (ϵ) se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{\rho}{\rho_f} = \frac{m}{V} \times 100 \quad (4)$$

en donde ρ_b es la densidad aparente y ρ_f es la densidad de la fruta (Topuz, A. *et al.*, 2005; Özcan, M. *et al.*, 2005; Vursavu, K. *et al.*, 2006).

3.3.2 Cuantificación del color. Se llenó una celda de cuarzo de 25 mL con la pulpa homogeneizada de cada una de las variedades del fruto de *A. diversifolia*. Posteriormente se realizó la medición del color en el espectrofotómetro con reflectancia especular excluida, utilizando el iluminante D65, un ángulo de observación y un diámetro de observación de 10° y 1.25 cm, respectivamente. Los parámetros obtenidos fueron L^* , a^* y b^* en la escala CIE. Estos parámetros se utilizaron para calcular la saturación o cromaticidad (C^*) y el tono o hue (h°). Estos valores se calcularon mediante las siguientes fórmulas:

$$C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{0.5} \dots\dots\dots (5)$$

$$h^\circ = \tan^{-1} b^*/a^* \dots\dots\dots (6)$$

Estas mediciones se realizaron por triplicado.

3.4 ANÁLISIS QUÍMICO

3.4.1 Determinación de pH y acidez titulable. Se determinaron de acuerdo a la NMX-F-102-S-1978 (Anexo 1 y 2). Para acidez titulable los resultados se expresaron como g de ácido cítrico por 100 g de pulpa. El pH se determinó, cada 15 días, durante el periodo en que las pulpas de cada variedad permanecieron congeladas (octubre 2008 – junio 2009), para determinar la viabilidad de las muestras, cabe señalar que la pulpa de las frutas no presentaron cambios en este valor. Cada medición se realizó por triplicado.

3.4.2 Análisis proximal. Para el análisis proximal de la pulpa del fruto de *A. diversifolia* se utilizaron los métodos siguientes: Determinación de humedad, método AOAC

925.09 (Anexo 3); determinación de cenizas, método AOAC 923.03 (Anexo 4); determinación de proteínas, método AOAC 954.01 (Anexo 5); determinación de grasa cruda, método AOAC 920.39 (Anexo 6); determinación de fibra cruda, método AOAC 962.09 (Anexo 7); determinación de carbohidratos totales, se calculó por diferencia en % del resto de los componentes y está expresado como extracto libre de nitrógeno.

3.4.3 Cuantificación de sacarosa, glucosa y fructosa a. Preparación de

soluciones: Solución de EDTA cálcico de 50 ppm: se pesaron 0.0050 g de Ca(OH)_2 y 0.0249 g de EDTA disódico y se disolvieron en 500 mL de agua grado HPLC, la mezcla se filtró a través de algodón y se desgasificó durante 30 minutos. Estándares de sacarosa, glucosa y fructosa: Se pesaron 0.020, 0.065, 0.110, 0.155 y 0.200 g de cada carbohidrato y se disolvieron en agua HPLC a un volumen de 10 mL.

Extracción : La extracción de los carbohidratos se realizó de acuerdo a la metodología empleada por Ong, B. T. *et al.* (2006). Se pesó 1 g de pulpa de cada una de las muestras en un matraz bola de 100 mL, se adicionó 20 mL de metanol acuoso grado HPLC al 85 % (v/v), y se calentó en baño de agua a 80 °C a reflujo durante 30 minutos con agitación de una barra magnética. Después la mezcla obtenida se filtró a través de un papel filtro Whatman del número 1 y el residuo se re-extrajo dos veces más con 15 mL de metanol al 85 % bajo las mismas condiciones. El filtrado se evaporó a vacío en rotavapor a 45 °C hasta sequedad. Finalmente el extracto obtenido se disolvió en agua grado HPLC, se filtró a través de filtros con membrana de 0.20 μm , se lavó el filtro con agua grado HPLC y se aforó hasta un volumen final de 10 mL. El extracto se guardó en viales y cada extracto se obtuvo por triplicado.

Cuantificación : La fase móvil fue una solución de EDTA cálcico de 50 ppm y la columna se mantuvo a 85 °C. El volumen inyectado de la muestra de extracto fue de 20 µL. Los azúcares en la muestra se cuantificaron comparando las áreas de los picos de las muestras con las de los estándares. Los estándares utilizados fueron sacarosa, glucosa y fructosa en concentraciones de 0.20, 0.65, 1.10, 1.55 y 2.00 % (p/v). Se obtuvo una curva de calibración para cada uno de los estándares (Apéndice 1) (Ong, B. T. *et al.*, 2006).

3.4.4 Cuantificación de minerales. *Preparación de soluciones* : Solución de cesio al 2.5 %: Se pesaron 3.167 g de cloruro de cesio y se mezclaron con 100 mL de agua desionizada. Solución de lantano al 5 %: se mezclaron 5.9 g de óxido de lantano con 10 mL de agua desionizada, después se agregaron lentamente 25 mL de HCl concentrado, y se aforó a 100 mL con agua desionizada. Se prepararon controles para Ca, Mg y Zn en la variedad blanca: A 10 g de pulpa se le adicionaron 10, 500 y 20 µg de cada mineral respectivamente, y se le dio el mismo tratamiento que a las demás muestras.

Tratamiento del material de vidrio: El material de vidrio que se utilizó para la cuantificación de minerales, se lavó con agua de llave y con una solución de jabón alcalino usando una esponja, se enjuagó y se dejó sumergido en HNO₃ al 10 % por 1 h y se enjuagó con agua destilada. Después se sumergió nuevamente en agua destilada a 40 °C durante 1 h. Posteriormente se volvió a sumergir en HNO₃ al 2 %, se enjuagó con agua desionizada y se sumergió en agua desionizada a 40 °C durante 30 min, para finalmente secarlo y usarlo.

Preparación de la muestra : Las cenizas obtenidas del análisis proximal se utilizaron para la determinación de minerales. Estas cenizas se disolvieron en 10 mL HCl al 20 % (v/v) calentado cuidadosamente por 30 min con una ebullición lenta. La solución clara obtenida se

aforó con agua desionizada a 25 mL en un matraz aforado (Dürüst, N. *et al.*, 1997). Cada muestra se realizó por triplicado.

Cuantificación : Inicialmente se construyeron gráficas de calibración (Apéndice 2) para cada mineral, de acuerdo a los requerimientos del equipo de absorción atómica. Las características generales para la generación de cada curva de calibración se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Características generales para la generación de las curvas de calibración.

Mineral	Longitud de onda (nm)	Ancho de rendija (nm)	Intervalo óptimo de detección (µg/mL)	Sensibilidad (µg/mL)
Ca	422.7	0.5	0.40 – 1.50	0.008
Mg	285.2	0.5	0.10 – 0.40	0.003
Na	589.0	0.5	0.18 – 0.70	0.004
K	766.5	0.5	0.40 – 1.50	0.008
Fe	248.3	0.2	2.00 – 9.00	0.050
Cu	324.7	0.5	1.00 – 5.00	0.025
Mn	279.5	0.2	1.00 – 3.60	0.020
Zn	213.9	0.5	0.40 – 1.50	0.008

Nota: Todos los minerales se leyeron con una flama de aire-acetileno.

De las soluciones obtenidas previamente para la cuantificación de minerales en las muestras se realizaron diluciones de acuerdo a las concentraciones requeridas por las curvas de calibración de cada mineral y se realizaron las lecturas en el espectrofotómetro de absorción atómica. El blanco de cada muestra se obtuvo con el mismo tratamiento empleado para la muestra pero sin las cenizas. Para la determinación de calcio y magnesio tanto a las muestras como a los estándares se les adicionaron 2 000 ppm de la solución de lantano, y para evitar posibles interferencias y para la determinación de sodio y potasio, 2000 ppm de la solución de cloruro de cesio. Cada lectura se realizó por triplicado.

3.4.5 Cuantificación de vitamina C. *Preparación de soluciones:* Solución de ácido metafosfórico-acético: Se mezclaron 3 g de ácido metafosfórico, 8 mL de ácido acético glacial y la mezcla se aforó con agua desionizada a 100 mL. Buffer de acetato de sodio: Se mezclaron 4.5 g de acetato de sodio pentahidratado, 10.5 mL de agua desionizada y 15 mL de ácido acético glacial. Solución de DCPI: Se preparó una solución patrón de 600 ppm de DCPI en 10 mL de agua, para la cual se pesaron 0.0060 g de DCPI y se mezclaron con agua desionizada a un volumen de 10 mL, a partir de esta se preparó la solución de DCPI de 12 ppm. Estándares de ácido ascórbico de 2, 4, 6, 8 y 10 ppm: Inicialmente se preparó una solución patrón de 100 ppm de ácido ascórbico para la cual se pesaron 0.0010 g de ácido ascórbico y se mezclaron con la solución de ácido metafosfórico-acético hasta un volumen final de 10 mL, a partir de esta se prepararon los estándares en las concentraciones antes mencionadas. Para la preparación de los controles, a 10 g de la pulpa de cada variedad se les adicionó 600 µL de una solución patrón de ácido ascórbico de 100 ppm y se le dio el mismo tratamiento que a las muestras.

Extracción: La extracción se realizó de acuerdo a la metodología empleada por Hernandez, Y. *et al.* (2006). Se tomaron 10 g de la pulpa de cada una de las variedades del fruto de *A. diversifolia* y se mezclaron con 20 mL de una solución de ácido metafosfórico al 3 % (p/v) y de ácido acético al 8 % (v/v) en un mezclador casero durante 2 min a máxima velocidad, la mezcla resultante se centrifugó a 4000 rpm durante 5 min, se separó el sobrenadante y el restante se reextrajo dos veces más bajo las condiciones anteriormente descritas. Finalmente todo el extracto obtenido se mezcló bien, y se filtró a través de algodón y se guardó en frascos ámbar hasta su análisis. Toda la extracción se realizó a 4 °C y se resguardó de la luz. El extracto de cada variedad se realizó por triplicado.

Cuantificación: La cuantificación de ácido ascórbico se realizó de acuerdo a la metodología utilizada por Dürüst, N. *et al.* (1997). Inicialmente el espectrofotómetro de

UV/Vis se ajustó a cero usando agua desionizada. El valor de L_1 se obtuvo de la absorbancia medida de la solución utilizada para extraer (0.5 mL) + la solución buffer de acetato de sodio (0.5 mL) + la solución de DCPI (4 mL) al final de 15 segundos. Después, el instrumento se ajustó nuevamente a cero con una mezcla de la solución estándar de ácido ascórbico de 2 ppm (0.5 mL), la solución buffer de acetato (0.5 mL) y agua desionizada (4 mL). Inmediatamente después, la absorbancia de la solución estándar de ácido ascórbico (0.5 mL) + la solución buffer de acetato (0.5 mL) + DCPI (4 mL) se registró como L_2 . Aquí L_1 es la absorbancia de todo el DCPI, y L_2 es el valor de la absorbancia del remanente de DCPI después de su reacción con el ácido ascórbico. Los valores de L_2 fueron igualmente registrados para todas las soluciones estándar de ácido ascórbico (2, 4, 6, 8 y 10 ppm). Los valores de L_1-L_2 son las absorbancias de cada solución estándar de trabajo. La curva de calibración se construyó graficando los valores de absorbancia contra la concentración (ppm) de las soluciones estándar de ácido ascórbico (Apén dice 3).

Para la medición de las absorbancias de las soluciones de las muestras, el ajuste a cero del equipo se realizó con el extracto de la muestra (0.5 mL), el buffer de acetato (0.5 mL), y agua desionizada (4 mL). La absorbancia de la solución de la muestra (0.5 mL) + el buffer de acetato (0.5 mL) + DCPI (4 mL) se registró exactamente después de 15 segundos de la adición del DCPI. Este fue el valor de L_2 de la solución de la muestra. Los valores de L_1-L_2 representan la absorbancia de la muestra. La concentración de ácido ascórbico en las muestras se determinó mediante la gráfica de calibración. Todas las medidas fueron registradas a 520 nm en el espectrofotómetro de UV/Vis. Todas las soluciones se prepararon el mismo día y se utilizó agua desionizada y degasificada. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

3.4.6 Cuantificación de fenoles totales. *Preparación de soluciones* : Etanol acuoso al 90 %: Se mezclaron 90 mL de etanol purificado con 10 mL de agua desionizada, posteriormente la mezcla se desgasificó durante 30 min. Na₂CO₃ al 2 %: Se pesaron 0.2 g de Na₂CO₃ y se disolvieron en 10 mL de agua desionizada y desgasificada. Estándares de ácido gálico de 25, 50, 75, 100, 125 y 150 ppm: Inicialmente se preparó una solución patrón de 500 ppm de ácido gálico para la cual se pesaron 0.0055 g de ácido gálico y se mezclaron con etanol al 90 % purificado y desgasificado hasta un volumen final de 10 mL, a partir de esta se prepararon los estándares en las concentraciones antes mencionadas. Para la preparación de los controles, a 2 g de la pulpa de las variedades rosa y blanca se les adicionaron 500 µL de la solución patrón de ácido gálico de 500 ppm y a la variedad rosa mexicano se le adicionaron 1000 µL y se les dio el mismo tratamiento que a las muestras.

Extracción : De acuerdo a la metodología empleada por Roesler, R. *et al.* (2006) se pesaron 2 g de pulpa de cada una de las muestras y se mezclaron con 25 mL de etanol al 90 % (purificado y desgasificado previamente) en un mezclador casero durante 1 min a máxima velocidad. La mezcla obtenida se filtró a través de algodón y se guardó en frascos ámbar hasta su análisis. Todo el proceso se realizó a 4 ° C y se resguardó de la luz. El extracto de cada variedad se preparó por triplicado. Este mismo extracto se utilizó para la actividad antirradical.

Cuantificación : De acuerdo a la metodología empleada por Ercisli, S. *et al.* (2007), del extracto obtenido previamente se tomó 0.1 mL y se mezcló con 4.6 mL de agua desionizada (desgasificada) y 0.1 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu, se mezcló cuidadosamente, y se dejó reposar durante 3 min en ausencia de luz, posteriormente se adicionaron 0.3 mL de Na₂CO₃ al 2 % se agitó en vórtex y se inyectó nitrógeno a los tubos de reacción. Después de 30 min de incubación a 40 °C en un baño de agua y en reposo, se midió la absorbancia a 760 nm. Como estándar espectrofotométrico se utilizó ácido gálico en concentraciones de 25

a 150 ppm (Apéndice 4) y el contenido de fenoles totales, de los extractos de cada variedad de fruta, se expresó como miligramos de equivalentes de ácido gálico en 100 g de pulpa fresca (mg EAG/100 g). Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

3.4.7 Cuantificación de flavonoides totales. *Preparación de soluciones:* AlCl_3 al 10 % (p/v): Se pesaron 1.818 g de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y se disolvieron en 10 mL de agua desionizada y desgasificada. NaNO_2 al 5 % (p/v): Se pesaron 0.5 g de NaNO_2 y se mezclaron con agua desionizada y desgasificada hasta un volumen final de 10 mL. NaOH 1 M: Se pesaron 0.4 g de NaOH y se mezclaron con 10 mL de H_2O desionizada y desgasificada. Estándares de catequina de 50, 100, 200, 300, 400 y 500 ppm: Inicialmente se preparó una solución patrón de catequina de 500ppm para la cual se pesaron 0.0050 g de catequina y se disolvieron en metanol desgasificado hasta un volumen de 10 mL, a partir de esta solución se prepararon los estándares en las concentraciones antes mencionadas.

Extracción: Se midió 1 g de pulpa y se agregaron 5 mL de metanol destilado y desgasificado, la mezcla se sonicó por 30 min a temperatura ambiente, se centrifugó por 30 min a 3000 rpm. El sobrenadante se filtró a través de algodón.

Cuantificación: De acuerdo a la metodología empleada por Won Lee, K. *et al.* (2003), del extracto obtenido previamente se tomó 0.1 mL y se adicionó a 2 mL de agua desionizada (desgasificada) y se mezclaron con 0.150 mL de NaNO_2 al 5 % (p/v) (desgasificado), esta mezcla se agitó por 5 min en vórtex, después se adicionó 0.150 mL de AlCl_3 (acuoso) al 10 % (p/v) y la mezcla se agitó por 1 min en vórtex. Se adicionó 1 mL de NaOH 1 M y se mezcló en vórtex por 1 min. Las muestras y los estándares se leyeron en un lector de microplacas con un filtro de 490 nm. Para la curva de calibración se utilizó catequina como estándar (Apéndice 5).

3.4.8 Cuantificación de la actividad antirradical. *Preparación de las*

soluciones: Solución de DPPH 0.004 % (p/v): Se preparó un patrón de DPPH al 0.1 %, para la cual se pesaron 0.0100 g de DPPH y se disolvieron en 10 mL de etanol purificado y degasificado, a partir de esta solución se preparó la solución etanólica de DPPH al 0.004 %, la solución se mantuvo resguardada de la luz, y en refrigeración a 4 °C entre mediciones.

Para los estándares de ácido ascórbico, BHT y ácido gálico se midió la masa exacta de cada sustancia para obtener una solución patrón de 200 ppm y se disolvió en etanol acuoso al 90 % (v/v). A partir de estas soluciones patrón se prepararon los estándares respectivos. Estándares de ácido ascórbico: 2, 4, 6, 8 y 10 ppm. Estándares de BHT: 10, 20, 30, 50 y 100 ppm. Estándares de ácido gálico: 1, 2, 3, 4 y 5 ppm .

Cuantificación : La actividad antirradical se determinó mediante el ensayo con DPPH de acuerdo a la metodología utilizada por Roesler, R. *et al.* (2006). Del extracto etanólico obtenido previamente (extracto fenoles totales), se prepararon diferentes disoluciones etanólicas (con etanol purificado y degasificado al 90 %), con las concentraciones siguientes: 500, 1000, 1500, 2000, 2500 y 3000 µg de pulpa/mL para las tres variedades. A 2500 µL de cada concentración se les adicionaron 2500 µL de la solución etanólica de DPPH (0.004 % w/v), y cada tubo se incubó por 30 min a temperatura ambiente en la oscuridad con agitación en vórtex. El mismo procedimiento anterior se aplicó al ácido ascórbico, BHT y ácido gálico como controles (Apéndice 6). El control negativo se preparó sin extracto, y se usó etanol para corregir la línea base. La solución de DPPH se preparó el mismo día, y se guardó en un frasco ámbar cubierto con papel aluminio, almacenado en la oscuridad a 4 °C.

El porcentaje de disminución de la absorbancia se graficó para cada concentración y el porcentaje del DPPH consumido se calculó con base en el decremento observado en la absorbancia del radical DPPH. Los cambios en la absorbancia de las muestras se midieron a 517 nm en el espectrofotómetro de UV/Vis. La actividad antirradical se expresó como porcentaje de inhibición y se calculó usando la fórmula siguiente (Yen, G. C. *et al.*, 1994):

$$\frac{A - A_{DPPH}}{A_{DPPH}} \times 100 \quad (7)$$

donde:

A_{DPPH} = valor de la absorbancia de la muestra blanco con DPPH

A_{EXTR} = valor de la absorbancia del extracto a evaluar

Los valores IC_{50} se reportan como la concentración final del extracto, en μg de pulpa/mL, requerido para disminuir al 50% la concentración inicial de DPPH. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los valores presentados son un promedio \pm la desviación estándar (σ) de siete réplicas para el análisis físico, y de tres réplicas para el análisis químico con el programa Microsoft Excel. Se realizó un análisis de varianza de ANOVA con un nivel de significancia, para $p < 0.05$. Así mismo se realizó un análisis para comparación de medias por el método de rangos múltiples de Duncan para $p < 0.05$ (Montgomery, D., 1991) el programa empleado para la realización del análisis estadístico fue el Desing Expert 6.0. Para encontrar la relación entre variables se realizaron correlaciones lineales por el método de Pearson (Martín, A. A. *et al.*, 2004), con el programa Agricolae: Statistical procedures for agricultural research, versión 1.0-7, 2009.

RESULTADOS Y ANÁLISIS

México es un país con gran diversidad de flora y fauna. Principalmente el sureste del país, ya que cuentan con las condiciones climáticas óptimas para el crecimiento de un gran número de especies vegetales. Para la recolección de los frutos de *A. diversifolia*, se investigaron los lugares en donde estos árboles crecían, y se encontró que principalmente abundan en los estados de Chiapas, Guerrero, Tabasco y Oaxaca, por lo que inicialmente se planteó adquirir frutos del estado de Oaxaca. Nuestras fuentes señalaron que la *A. diversifolia* es un fruto común en la población de Unión Hidalgo localizada en el Istmo del estado de Oaxaca. Sin embargo al acudir a este lugar nos percatamos que los árboles no crecían en cantidades suficientes para hacer un muestreo representativo, y esta población reducida de árboles se atribuye a que el fruto ya no se consume. Por lo tanto, la recolección se decidió realizar en el estado de Chiapas, en donde el fruto se comercializa ampliamente. En este estado se recolectaron entre 6 y 10 kg de cada variedad de los frutos de *A. diversifolia*, de los mercados locales de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, así como de la localidad Luis Echeverría en donde se cosechan los frutos para venderse en dichos mercados. En esta localidad los árboles de *A. diversifolia* crecen de forma silvestre formando cercas vivas en los hogares o como plantas de traspatio. Se escogieron aquellos frutos que no estuvieran golpeados, raspados o con algún daño causado por plagas. Se seleccionaron frutos con madurez organoléptica, es decir aquellos que estuvieran abiertos, con una porción de la pulpa expuesta, y en condiciones de ser ingeridos por los consumidores, como se muestra en la Figura 15. Cabe señalar que los frutos de *A. diversifolia* son cosechados y consumidos cuando la cáscara se abre, de lo contrario los frutos no maduran y prácticamente todos se descomponen.



(a) (b) (c)
Figura 15. Frutos de *A. diversifolia* variedad (a) blanca, (b) rosa y (c) rosa mexicano con madurez organoléptica

Las propiedades físicas de las tres variedades del fruto de *A. diversifolia* evaluadas en el presente trabajo mostraron no tener diferencias significativas entre ellas a un 5 % de significancia, Tabla 7. La ausencia de diferencias significativas de las propiedades físicas mostradas en la Tabla 7, se atribuyen a que los frutos fueron recolectados en el mismo lugar, con el mismo estado de madurez y en una sola época del año, además que son frutos de la misma especie. Particularmente el color fue la única propiedad física que presentó diferencias estadísticamente significativas entre las variedades estudiadas.

En cuanto a la masa del fruto (M_f), este parámetro se encontró en un intervalo desde 686.00 ± 100.0 a 757.20 ± 122.40 g. De acuerdo a lo reportado por Cruz, E. *et al.* (2000), la masa encontrada para estos frutos fue de 739 g, lo cual va de acuerdo con los valores obtenidos en este trabajo.

La densidad de los frutos (ρ_f) se encuentra entre el intervalo desde 1.18 ± 0.03 hasta 1.40 ± 0.10 g/mL. Estos valores nos indican, que los frutos, al tener una densidad mayor a uno son densos, es decir la cantidad de espacios vacíos dentro del fruto son pocos.

En cuanto a la esfericidad (ϕ), a simple vista estos frutos no son completamente esféricos, lo cual queda demostrado con los valores obtenidos para este parámetro, todos < 1 . La más esférica es la variedad rosa mexicano con un valor de 0.90 ± 0.08 , seguida de la

variedad rosa con un valor de 0.89 ± 0.05 y finalmente la variedad blanca con un valor de 0.85 ± 0.04 .

Tabla 7. Propiedades físicas de las tres variedades del fruto de *A. diversifolia*.

Propiedad física	Variedad*		
	Blanca	Rosa	Rosa mexicano
Masa, M_f (g)	686.0 ± 100.0	757.2 ± 122.4	718.1 ± 106.5
Longitud, L (cm)	11.60 ± 1.43	11.03 ± 1.08	11.41 ± 1.23
Grosor, T (cm)	8.78 ± 1.06	8.55 ± 1.24	8.97 ± 0.71
Ancho, W (cm)	10.04 ± 1.28	10.19 ± 0.98	10.42 ± 0.54
Volumen, V (mL)	482.0 ± 182.0	604.0 ± 158.9	510.0 ± 49.0
Densidad de la fruta ρ_f (g/mL)	1.18 ± 0.03	1.19 ± 0.12	1.40 ± 0.10
Densidad aparente, ρ_b (g/mL)	0.47 ± 0.01	0.50 ± 0.001	0.55 ± 0.002
Diámetro geométrico promedio, D_g (cm)	10.33 ± 0.88	9.90 ± 0.85	10.10 ± 0.43
Esfericidad, Φ	0.85 ± 0.04	0.89 ± 0.04	0.90 ± 0.08
Porosidad, ϵ	59.80 ± 1.10	57.80 ± 4.33	60.90 ± 2.95
Superficie S (cm ²)	335.50 ± 51.47	311.50 ± 54.17	319.00 ± 27.80
Epicarpio (%)	36.8 ± 5.5	32.5 ± 5.1	27.8 ± 4.1
Mesocarpio (%)	53.2 ± 4.9	56.7 ± 5.4	59.7 ± 1.2
Semillas (%)	9.9 ± 3.8	10.8 ± 2.1	12.5 ± 3.7

Promedio de siete mediciones \pm desviación estándar.

*No existen diferencias significativas ($p < 0.05$) empleando el método de rangos múltiples de Duncan.

La porosidad (ϵ) nos dice la cantidad de espacios entre los frutos. En las variedades estudiadas la variedad rosa mexicano mostró la mayor porosidad con 60.90 ± 2.95 , debido a que es la más redonda, seguida de la variedad blanca con un valor de 59.80 ± 1.10 y finalmente la variedad rosa con 57.80 ± 4.33 . Para el cálculo de la porosidad fue necesario la densidad del fruto (ρ_f) y la densidad aparente (ρ_b), ecuación 4. Dado que la ρ_b se calculó con una caja de volumen y masa conocidos, los espacios vacíos en la caja determinan en gran

medida la porosidad entre los frutos. Mientras más grandes y esféricos son los frutos mayor cantidad de espacios vacíos hay en la caja.

Para la superficie (S) los valores encontrados fueron para la variedad blanca $335.50 \pm 51.47 \text{ cm}^2$, seguida de la variedad rosa mexicano y finalmente la rosa, con $319.00 \pm 27.80 \text{ cm}^2$ y $311.50 \pm 54.17 \text{ cm}^2$, respectivamente.

Al observar las proporciones de la pulpa (mesocarpio), semillas y cáscara (pericarpio) se tiene que la mayor parte del fruto es pulpa (53.19 ± 4.96 hasta 59.72 ± 1.24 %), sin embargo, en conjunto la cáscara (27.78 ± 4.11 hasta 36.81 ± 5.54 %) y las semillas (9.99 ± 3.77 hasta 12.51 ± 3.70 %) representan un gran porcentaje también.

A diferencia de las propiedades físicas mostradas en la Tabla 7, solamente el color mostró diferencias significativas entre la pulpa de los frutos de *A. diversifolia* estudiados, Tabla 8. Esto puede observarse a simple vista ya que la diferencia en color, entre cada variedad es muy notoria Figura 16.

Tabla 8. Parámetros de color obtenidos para la pulpa de las tres variedades del fruto de *A. diversifolia* en el sistema CIE.

Variedad	L^*	a^*	b^*	Tono (h)	Cromaticidad (C^*)
Blanca	65.14 ^a	2.32 ^a	17.78 ^a	82.57 ^a	17.93 ^a
Rosa	58.12 ^b	6.68 ^b	10.68 ^b	57.98 ^b	12.60 ^b
Rosa mexicano	47.36 ^c	18.92 ^c	-0.48 ^c	358.53 ^c	18.92 ^c

Promedio de tres mediciones. ^{a,b,c} Valores con la misma letra no son estadísticamente significativos ($p < 0.05$) por el método de rangos múltiples de Duncan.

La variedad blanca fue la que presentó una mayor luminosidad, es decir obtuvo el valor más alto de L^* con 65.14, seguida de la variedad rosa con un valor de L^* igual a 58.12 y la rosa mexicano tuvo el menor valor, 47.36.

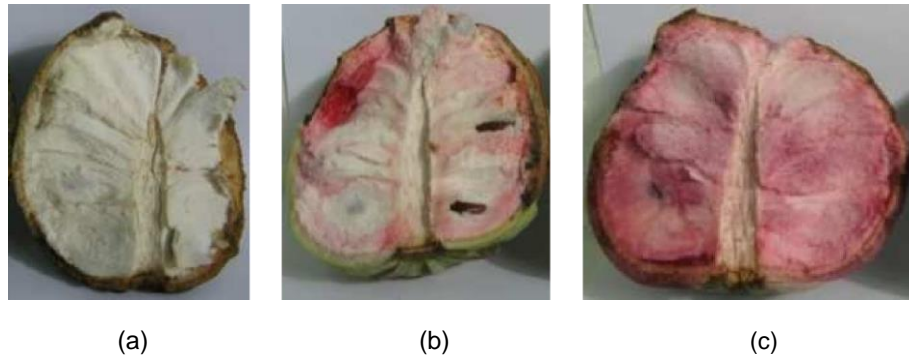


Figura 16. Pulpa de las variedades (a) blanca, (b) rosa y (c) rosa mexicano de los frutos de *A. diversifolia*

En cuanto a los valores de a^* y b^* , obtenidos para las pulpas, la variedad blanca se encuentra dentro de los colores amarillos teniendo valores más altos y positivos de b^* , mientras que la variedad rosa tiende a los rojos, ya que, tuvo valores positivos de a^* y de b^* y la variedad rosa mexicano hacia los azules ya que presentó una ligera coloración morada por lo que los valores de a^* fueron positivos mientras que los obtenidos para el parámetro b^* fueron negativos. La distribución de los colores encontrados en el espacio de color L^* , a^* y b^* se muestran en la Figura 17 (a).

Los valores del ángulo hue (h) definieron el color de cada variedad. La variedad blanca cae dentro de los amarillos, ya que tiene un valor h de 85.7° , la variedad rosa está entre los amarillos y rojos con un valor de h de 57.98° por lo que se percibe como rosa, finalmente la variedad rosa mexicano tuvo un valor de h de 358.53° percibiéndose como roja Figura 17 (b).

Por otra parte, la cromaticidad (C^*) de las anonas blancas y rosa mexicano presentaron un valor parecido, 17.92 y 18.93, respectivamente. Mientras que la anona rosa tuvo un valor menor a estas, 12.60. Lo anterior se puede interpretar de la siguiente manera: Las anonas blancas y rosa mexicano se perciben con colores más intensos que la anona rosa.

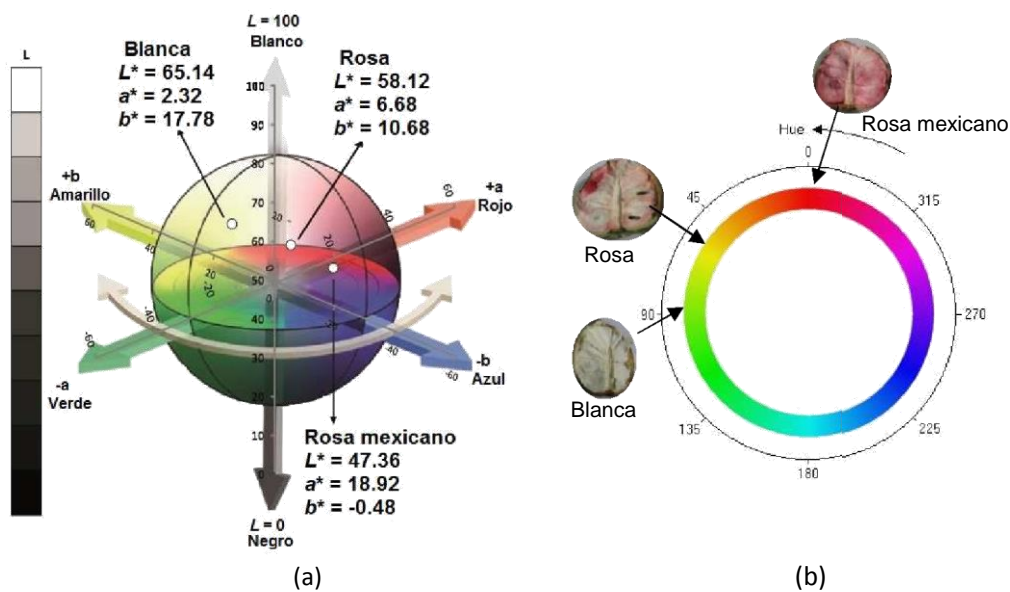


Figura 17. (a) Distribución en el espacio de color de L^* , a^* y b^* (CIE) de las variedades del fruto de *A. diversifolia*. (b) Localización de los tonos de la pulpa en la escala hue.

Respecto a las determinaciones químicas, se encontró que el análisis proximal mostró las primeras diferencias cuantificables ($p < 0.05$) entre las tres variedades de *A. diversifolia*, Tabla 9. Estas diferencias estadísticas se observaron en los porcentajes de proteínas, grasa cruda, fibra cruda y extracto libre de nitrógeno. Para los tres primeros componentes fue la variedad blanca la que presentó diferencias con las otras dos variedades, en cambio en el ELN las tres variedades fueron diferentes entre sí. Esta diferencia en el ELN sugiere que existe un componente que no considera el análisis proximal y que probablemente pueda ser el contenido de fibra soluble.

Cuando se compara el contenido de proteína en la pulpa de las tres variedades de *A. diversifolia* se observa que la variedad blanca tiene un valor (1.14 ± 0.01 g/100 g de pulpa) cercano al descrito por Cruz, E. et al. (2000) (1.31 g/100 g de pulpa). Las variedades rosa y rosa mexicano no tuvieron diferencias significativas entre sí, mostraron un contenido de proteína cruda de 0.92 ± 0.01 y 0.89 ± 0.03 g/100 g de pulpa fresca respectivamente.

Tabla 9. Análisis proximal (g/100 g de pulpa fresca), pH y acidez titulable, de las tres variedades del fruto de *A. diversifolia*.

Variedad	Determinación							Acidez titulable**
	Proteína	Grasa cruda	Fibra cruda	Cenizas	Humedad	ELN*	pH	
Blanca	1.14±0.01 ^a	0.31±0.01 ^a	4.44±0.16 ^a	0.94±0.01 ^a	79.61±0.02 ^a	13.55±0.19 ^a	4.99±0.02 ^a	0.16±0.00 ^a
Rosa	0.92±0.01 ^b	0.22±0.03 ^b	0.63±0.02 ^b	0.92±0.03 ^a	78.94±0.06 ^a	18.36±0.06 ^b	5.19±0.05 ^b	0.17±0.01 ^b
Rosa	0.89±0.03 ^b	0.20±0.03 ^b	0.66±0.01 ^b	0.89±0.01 ^a	77.11±0.02 ^a	20.25±0.06 ^c	4.79±0.06 ^c	0.34±0.00 ^c

^{a,b,c} Valores con la misma letra no son estadísticamente significativos (p<0.05) por el

mexicano

Promedio de tres mediciones ± desviación estándar.
método de rangos múltiples de Duncan.

* ELN, extracto libre de nitrógeno. ** Expresado como mg de ácido cítrico por 100 g de pulpa.

Si se comparan las concentraciones de proteína cruda encontradas para *A. diversifolia* con otras especies de anonas, Tabla 10, se observa que el contenido es similar al de la guanábana, *A. muricata* (1 g/100 de pulpa fresca). Por otro lado, el resultado obtenido para este componente en la pulpa de las tres variedades de *A. diversifolia* se encuentra dentro de los intervalos descritos para los frutos (0.1 a 1.5 %).

Tabla 10. Análisis proximal de varias especies de anonas (g/100 g de pulpa fresca)

Especie	Determinación					
	Humedad	Proteína	Grasa cruda	Fibra cruda	Cenizas	ELN
<i>Annona cherimolia</i> Mill. ^a	68.7	1.5	0.1	2.5	0.7	29.0
<i>Annona squamosa</i> L. ^b	73.8	1.3	0.4	1.3	0.8	23.7
<i>Annona muricata</i> L. ^a	83.2	1.0	0.2	0.6	0.5	15.1
<i>Annona reticulata</i> L. ^a	60-80	2.4	0.2-0.6	0.9-6.6	0.5-1.1	18.5-25.2
<i>Annona crassiflora</i> M. ^c	67.85±0.59	1.80±0.06	3.22±0.73	ND	0.77±0.01	27.20±4.18
<i>Annona diversifolia</i> Saff. ^a	71.15	2.8	0.2	1.30	1.4	24.1
<i>Annona diversifolia</i> Saff. ^d	79.6	1.31	0.01	0.97	1.26	ND

^a Duke, A. T. et al., 1993. ^b Díaz, R. J. et al., 2004. ^c Roesler, R. et al., 2006. ^d Cruz, E., et al., 2000.
ND, no determinado.

Los valores de grasa cruda (0.20 a 0.31 g/100 g de pulpa fresca) encontrados en este trabajo para *A. diversifolia* son similares con el reportado por Duke, A. T. *et al.* (1993) (0.2 g/100 g de pulpa fresca). Respecto al contenido de grasa cruda para otras especies de anonas, los frutos de *A. diversifolia* se encuentran dentro del intervalo descrito para estas anonas que es de 0.01 a 3.22 g/100 g de pulpa fresca. También se puede observar que el contenido de grasa cruda en todos los casos siempre es menor que el correspondiente de proteína cruda.

Uno de los componentes de mayor importancia en los frutos, debido a que se encuentra principalmente en estos alimentos y por el beneficio en al tránsito intestinal, es la fibra. En esta tesis se cuantificó la fibra cruda, en donde la variedad blanca mostró el contenido más alto de las tres variedades con 4.44 ± 0.16 g/100 g de pulpa fresca, Tabla 9. Después se encuentran las variedades rosa y rosa mexicano las cuales no tienen diferencias significativas entre ellas, con valores de 0.63 ± 0.02 y 0.66 ± 0.01 g/100 g de pulpa, respectivamente. Los valores reportados para este componente en *A. diversifolia* por Cruz, E. *et al.* (2000) y por Duke, A. T. *et al.* (1993) son de 0.97 g/100 g de pulpa y de 1.30 g/100 g de pulpa, respectivamente. Estos valores no concuerdan con lo reportado por esta tesis ya que la variedad blanca tiene contenido más alto respecto a lo reportado, mientras que en las otras dos variedades se encuentra en menor cantidad. Estas diferencias encontradas en los análisis puede deberse a que el grado de madurez utilizado en los estudios no fue el mismo. Por otro lado, al comparar el contenido de fibra cruda de otras especies de anona con la *A. diversifolia* de pulpa blanca esta variedad es la segunda en este componente después de *Annona reticulata* (6.6 g/100 g de pulpa). Con lo anterior se puede decir que la variedad blanca es una buena fuente de fibra cruda.

La cuantificación del extracto libre de nitrógeno (ELN) representa los carbohidratos digeribles como almidón, azúcares reductores y no reductores así como ácidos orgánicos, por lo que se excluye la fibra cruda. Los valores obtenidos para este componente fueron

diferentes en las tres variedades ($p < 0.05$). El mayor contenido de ELN lo tuvo la variedad rosa mexicano con 20.25 ± 0.06 g/100 g de pulpa, seguido de la variedad rosa con 18.36 ± 0.06 g/100 g de pulpa y finalmente la blanca con 13.55 ± 0.19 g/100 g de pulpa, Tabla 9 y Figura 18. La variedad blanca mostró el menor contenido de ELN, esto puede atribuirse a que el contenido de fibra cruda es alto respecto a las otras dos variedades.

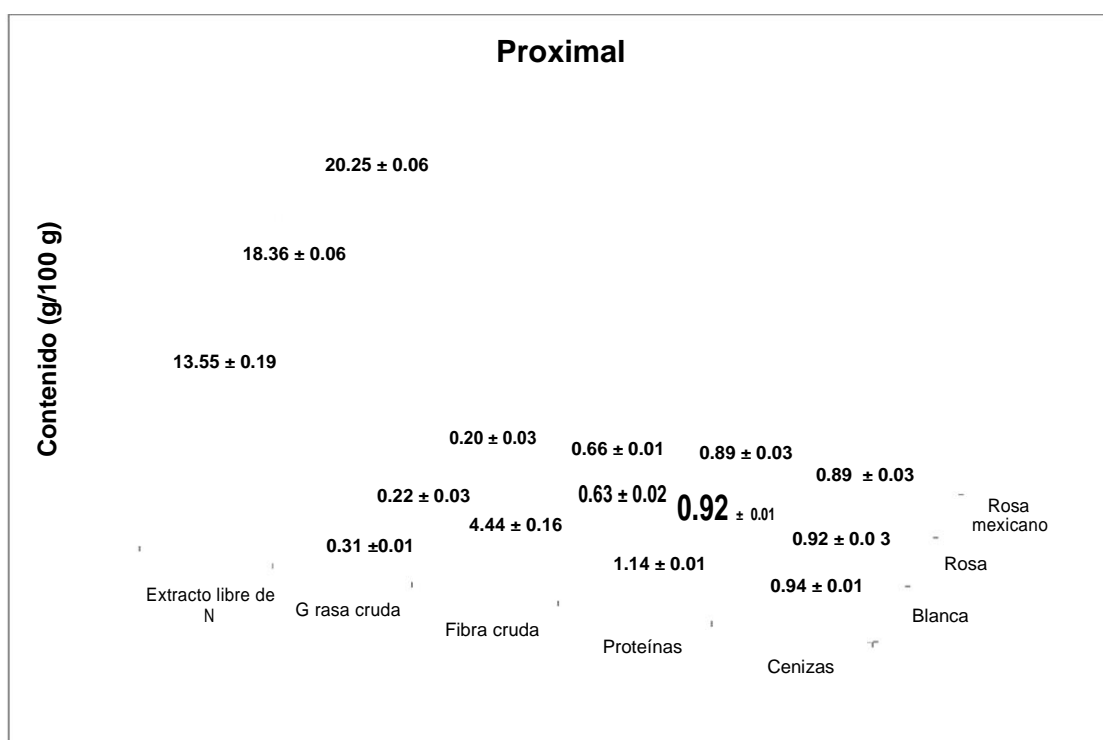


Figura 18. Análisis proximal de la pulpa de tres variedades de *A. diversifolia* expresada en masa fresca.

Si se comparan los valores obtenidos de ELN en esta tesis con los reportados por Duke, A. T. *et al.* (1993) (24.1 g/100 g de pulpa fresca) las tres variedades de *A. diversifolia* tienen un contenido menor. Las diferencias en el contenido de ELN se deben principalmente al estado de madurez del fruto y al contenido de fibra cruda. El ELN en otras especies de

anona, Tabla 10, varía desde 15.49 g/100 g de pulpa hasta 29 g/100 g de pulpa por lo que los valores encontrados en este trabajo para la variedad rosa y rosa mexicano se hallan dentro del intervalo, mientras que la variedad blanca tiene el menor contenido de ELN. El ELN en los frutos de *A. diversifolia* podría dar un indicio de la aceptación entre la población de estos frutos, es decir, podría indicarnos que variedad sería la más aceptada, ya que generalmente mientras más dulce sea su sabor tendrá una mejor preferencia. Con base en el ELN, la preferencia de los frutos podría proponerse en orden creciente de la siguiente forma: rosa mexicano>rosa>blanca.

El pH medido para todos los frutos, indica que los frutos son ácidos lo que es característico de prácticamente todas las frutas. El pH menos ácido lo tuvo la variedad rosa con 5.19 ± 0.05 , seguido de la variedad blanca con 4.99 ± 0.02 y la variedad más ácida fue la rosa mexicano con 4.79 ± 0.06 , existiendo diferencias significativas ($p < 0.05$) entre estos valores. Este valor de pH también puede determinar la preferencia del consumidor por alguna variedad. La acidez titulable cuantificada para cada variedad fue mayor en la variedad rosa mexicano con 0.34 ± 0.002 g de ácido cítrico, se guía de la variedad rosa con 0.17 ± 0.01 g de ácido cítrico y por último la variedad blanca con 0.16 ± 0.004 g de ácido cítrico/100 g de pulpa.

Por otra parte, las determinaciones del análisis proximal en las cuales no se encontraron diferencias significativas entre las variedades fueron el contenido de humedad y cenizas. El contenido de humedad encontrado para las tres variedades del fruto de *A. diversifolia* es muy similar al descrito por Cruz, E. *et al.* (2000) que fue de 79.6 g/100 g de pulpa. En los resultados obtenidos por este trabajo la humedad para las tres variedades tuvo un promedio de 78.55 %. Comparando con los valores reportados para otras especies de anona, Tabla 10, podemos observar que los frutos de *A. diversifolia* son de los más jugosos, ya que el contenido de agua es aproximadamente del 80 %, siendo un porcentaje característico de los frutos.

En cuanto al contenido de cenizas la ausencia de diferencias significativas ($p < 0.05$) se debe principalmente a que el área en donde se cultivaron los frutos fue la misma, por lo que las características del suelo fueron similares, por lo tanto el contenido de cenizas en las tres variedades fue muy parecido. El intervalo de cenizas para las tres variedades es desde 0.89 ± 0.01 a 0.94 ± 0.01 g/100 g de pulpa fresca. Los valores reportados por Cruz, E. *et al.* (2000) y por Duke, A. T. *et al.* (1993) fueron 1.26 y 1.4 g/100 g de pulpa fresca, respectivamente, y son diferentes estadísticamente a los encontrados en esta tesis. Esta diferencia se debe a que los frutos analizados no fueron cultivados en el mismo lugar y las condiciones de cultivo así como del suelo determinan y condicionan este parámetro. Por otro lado, comparando el contenido de cenizas de los frutos de *A. diversifolia* con otras especies de anonas, este valor se encuentra dentro del intervalo que es desde 0.5 g/100 g de pulpa fresca hasta 1.24 g/100 g de pulpa fresca, Tabla 10.

Con la finalidad de dar una descripción más completa de los frutos de *A. diversifolia*, en cuanto al contenido de minerales, se realizó su determinación en la pulpa de los frutos. Se cuantificaron por absorción atómica los macrominerales Ca, Mg, Na, y K, y los microminerales Fe, Cu, Mn y Zn, Tabla 11.

Tabla 11. Minerales cuantificados (mg/100 g de pulpa fresca) en la pulpa de las tres variedades del fruto de *A. diversifolia*.

Variedad	Macroelementos				Microelementos*
	Ca	Mg	Na	K	Zn
Blanca	0.86 ± 0.04^a	8.00 ± 0.26^a	2.15 ± 0.22^a	$347 \pm 8.80.75^a$	0.13 ± 0.004^a
Rosa	22.93 ± 0.51^b	12.71 ± 0.22^b	2.96 ± 0.05^b	335.95 ± 7.11^a	0.15 ± 0.005^b
Rosa mexicano	14.17 ± 0.58^c	14.01 ± 0.44^c	3.18 ± 0.07^b	347.40 ± 10.00^a	0.10 ± 0.005^c

Promedio de tres mediciones \pm desviación estándar. ^{a,b,c} Valores con la misma letra no son estadísticamente significativos ($p < 0.05$) por el método de rangos múltiples de Duncan.

* Fe, Cu, y Mn no fueron detectados en alguna de las variedades.

Generalmente los frutos se caracterizan por tener un alto contenido en K (deMan, J. M., 1999). Lo cual se corroboró, ya que fue el mineral cuantificado en mayor cantidad en las tres variedades y estos contenidos no tuvieron diferencia significativa ($p < 0.05$). Este mineral contribuye en el buen funcionamiento de los impulsos nerviosos en el organismo. El promedio en este mineral para las tres variedades fue de 343.72 mg/100 g de pulpa. La FDA establece que aquellos alimentos que aporten arriba del 20 % de la ingesta diaria recomendada de algún mineral son considerados de alto aporte, la ingesta de K de un adulto recomendado por la FDA (1993) es de 1000 mg/día (Tabla 12). Dado que la cantidad de K que aporta una porción de 100 g de pulpa de los frutos de *A. diversifolia* es del 34 % en promedio este fruto se considera de alto aporte en este macromineral.

Tabla 12. Ingestas recomendadas de minerales según la FDA (1993).

Mineral	Ingesta diaria
	(mg/día)
Ca	1000
Mg	400
Na	2400
K	1000
Zn	15

En cuanto al Na, estos frutos no se caracterizaron por tener un alto contenido en este mineral, se encontraron cantidades muy similares para la variedad rosa mexicano y rosa con 3.18 ± 0.07 y 2.96 ± 0.05 mg/100 g de pulpa respectivamente, siendo la variedad blanca la diferente estadísticamente con 2.15 ± 0.22 mg/100 g de pulpa. El Ca fue el mineral más abundante después del K. La variedad rosa fue la que presentó la cantidad más alta de este mineral con 22.93 ± 0.51 mg/100 g de pulpa seguida de la variedad rosa mexicano con 14.17 ± 0.58 mg/100 g de pulpa y finalmente la blanca con 0.86 ± 0.04 mg/100 g de pulpa. Las

diferencias encontradas en este elemento son muy grandes por lo que las tres variedades son diferentes estadísticamente ($p < 0.05$). Estas diferencias encontradas principalmente con la variedad blanca, pueden atribuirse principalmente a que los árboles de esta variedad producen una cantidad mayor de frutos que los árboles de las variedades rosa o rosa mexicano por lo que la concentración de Ca en los frutos se diluye. Otra posible explicación podría ser que la velocidad de crecimiento de los frutos de la variedad blanca es rápida, lo que origina que las concentraciones de calcio también se diluyan (Saure, M. C., 2004). En cuanto al contenido de Mg las tres variedades mostraron diferencias significativas, en orden creciente están la variedad blanca (8.00 ± 0.26 mg/100 g de pulpa) < variedad rosa (12.71 ± 0.22 mg/100 g de pulpa) y finalmente la variedad rosa mexicano con 14.01 ± 0.44 mg/100 g de pulpa. Aunque las diferencias son numéricamente significativas se puede argumentar que nutricionalmente pueden no serlo por la biodisponibilidad de estos en el alimento. (Miller-Ihli, N. J., 1996)

En cuanto al contenido de Zn se observaron diferencias significativas entre las tres variedades. El mayor contenido de este mineral se encontró a la variedad rosa con 0.15 ± 0.005 mg seguida de la variedad blanca con 0.13 ± 0.004 mg y con el menor contenido la variedad rosa mexicano con 0.10 ± 0.005 mg/100 g de pulpa. Cabe mencionar que este mineral es esencial para el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas. La cuantificación de Fe, Cu y Mn no fue posible, debido a que se encuentran en concentraciones menores al límite de detección en todas las muestras estudiadas o a que el metabolismo de la planta hace que estos minerales estén ausentes en los frutos.

Para encontrar alguna correlación entre las cenizas y los minerales determinados en la pulpa de los frutos, se realizaron correlaciones (r) de Pearson, los resultados se muestran en la Tabla 13. La mejor correlación encontrada fue entre las concentraciones de Mg y Na, ya que tienen una $r = 1$, Figura 19, esto quiere decir que a medida que aumenta la concentración de Mg en la pulpa, aumenta la concentración de Na, cabe señalar que en la

literatura no existen correlaciones similares descritas para frutos, pero esta dependencia puede atribuirse a que el metabolismo de la planta hace que se requieran relaciones proporcionales de estos minerales . También se observan buenas correlaciones entre la concentración de Cenizas-Mg y Cenizas-Na, sin embargo estas no son significativas para una $p < 0.05$, Figura 19.

Tabla 13. Correlaciones lineales entre el total de cenizas y el contenido de minerales de acuerdo al análisis de correlación (r) de Pearson.

Variables	Cenizas	Ca	Mg	Na	K	Zn
Cenizas	1	-0.50	-0.91	-0.91	-0.09	0.68
Ca	-0.50	1	0.82	0.82	-0.82	0.29
Mg	-0.91	0.82	1	1.000	-0.34	-0.32
Na	-0.91	0.82	1.00	1	-0.34	-0.31
K	-0.09	-0.82	-0.34	-0.34	1	-0.78
Zn	0.68	0.29	-0.32	-0.31	-0.78	1

Los valores en negritas son estadísticamente significativos ($p < 0.05$).

En los controles cuantificados se tuvo un porcentaje de recuperación de entre el 107 y el 123 %, lo cual nos indica que los métodos empleados para la destrucción de la materia orgánica y cuantificación de minerales, fueron reproducibles y permitieron una cuantificación total, sin pérdida de estos componentes durante la realización del análisis, Apéndice 7.

Se observó que la suma total de los minerales en cada una de las variedades, no corresponde al total de cenizas cuantificadas mediante el análisis proximal, esto se debe a que en las cenizas encontramos a los minerales en forma de óxidos, no como elementos, por lo que también se debe considerar la cantidad de oxígeno presente en el óxido de cada mineral. Otra causa es que no se cuantificó el fósforo, mineral que se encuentra en cantidades importantes en los frutos, por lo que las diferencias pueden atribuirse a estos dos factores.

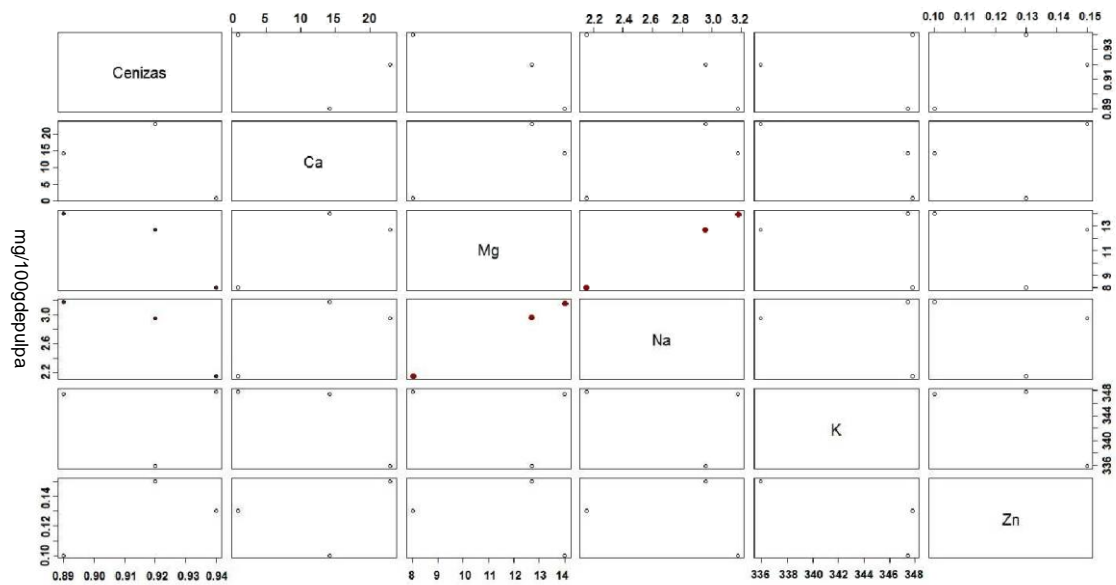


Figura 19. Análisis de Pearson de cenizas, Ca, Mg, Na, K y Zn

Dentro de los carbohidratos que se encuentran principalmente en las frutas, están la sacarosa, glucosa y fructosa, los cuales fueron cuantificados por HPLC en este proyecto, Figura 20. La variedad rosa mexicano presentó las concentraciones más altas de los tres carbohidratos, de sacarosa 9.33 ± 0.31 g, de glucosa 3.54 ± 0.08 y de fructosa 4.81 ± 0.09 g, todas las concentraciones por 100 g de pulpa fresca, Figura 20.

Como se observa en la Figura 20, las concentraciones de los tres azúcares varían entre las tres variedades, encontrando, que existe diferencia significativa entre ellas ($p < 0.05$). Debido a la estructura de los azúcares, estos proporcionan diverso poder edulcorante o diferente nivel de dulzura, tomando como base a la sacarosa asignándole un valor de 1 se ha descrito que la fructosa es 1.8 veces más dulce que la sacarosa, mientras que la glucosa es menos dulce con un valor de 0.7 (Badui, S. D., 1993). Con base en lo anterior el dulzor es debido a la sacarosa en todos los frutos, ya que las concentraciones en la pulpa de este carbohidrato es mayor en las tres variedades, mientras que la concentración de la fructosa no es lo suficientemente alta para superar el dulzor proporcionado por la sacarosa.

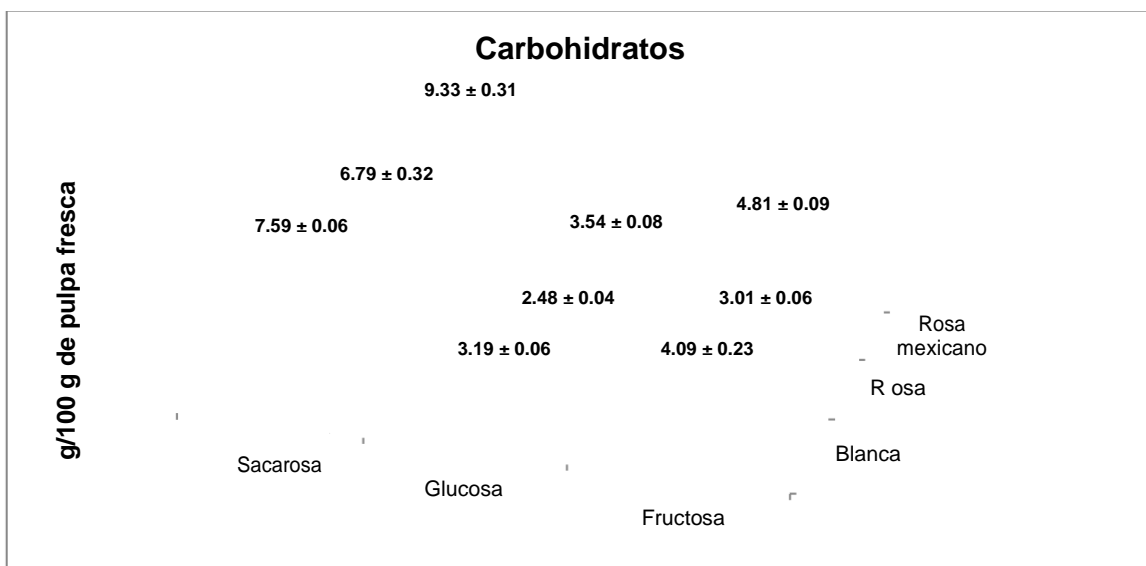


Figura 20. Sacarosa, glucosa y fructosa (g/100 g de pulpa fresca) en los frutos de *A. diversifolia*

La vitamina C es una de las principales vitaminas presente en alimentos como los frutos, por lo que en este proyecto se cuantificó como mg de vitamina C por 100 g de pulpa fresca, Tabla 14. Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que la variedad blanca tuvo la concentración más alta de esta vitamina con 2.38 ± 0.18 mg/100 g de pulpa fresca. Las variedades rosa y rosa mexicano no presentaron una diferencia significativa entre ellas, pero si con la variedad blanca ($p < 0.05$). Los datos obtenidos en este trabajo no concuerdan con lo reportado con otros autores, 14 mg/100 g de pulpa fresca (Duke, A. T. *et al.*, 1993). Cabe señalar que Duke, A. T. *et al.* (1993) no indica la variedad del fruto estudiada.

Por otro lado Moreno-Velásquez, D. *et al.* (2008) encontraron concentraciones de 8.2 mg/100 g de pulpa blanca y de 8.6 mg de ácido ascórbico/ 100 g de pulpa rosa. Esta diferencia de los contenidos descritos para la vitamina C tanto en este trabajo como en la literatura se puede atribuir a que el método empleado por Moreno-Velásquez, D. *et al.* (2008) no fue el mismo al utilizado en este trabajo, pues los autores describen el uso de titulación mientras que en esta investigación fue mediante un método espectroscópico. También esta

diferencia se puede explicar a que el estado de madurez de los frutos no es el mismo, ya que Moreno-Velásquez, D. *et al.* (2008), señalaron que los frutos empezaban a abrirse, mientras que para este trabajo los frutos ya estaban en plena madurez organoléptica. Es importante mencionar que los mismos autores antes citados describen que las concentraciones de vitamina C disminuyen a medida que aumenta la madurez del fruto (Moreno-Velásquez, D. *et al.*, 2008).

Tabla 14. Contenido de vitamina C (mg/100 g), fenoles totales (mg EAG/100 g), flavonoides (mg EC/100 g) y actividad antirradical expresada como IC₅₀ de la pulpa fresca de los frutos de *A. diversifolia*.

Variedad	Vitamina C (mg/100 g)	Fenoles totales (mg EAG/100 g) ^{* **}	Flavonoides (mg EC/100 g) ^{***}	Actividad antirradical IC ₅₀ (µg/mL) ^{* ,****}
Blanca	2.38 ± 0.18 ^a	170.16 ± 4.44 ^a	152.04 ± 5.39	1714.99 ± 61.82 ^a
Rosa	1.64 ± 0.10 ^b	129.27 ± 1.32 ^b	107.41 ± 5.15	1998.19 ± 63.14 ^b
Rosa mexicano	1.51 ± 0.25 ^b	170.88 ± 2.19 ^a	142.56 ± 2.55	1701.07 ± 47.42 ^a
Ácido ascórbico	--	--	--	4.27 ± 0.28 ^d
Ácido gálico	--	--	--	1.63 ± 0.06 ^d
BHT	--	--	--	23.89 ± 0.67 ^d

Promedio de tres mediciones ± desviación estándar. ^{a,b,c} Valores con la misma letra no son estadísticamente significativos (p<0.05) por el método de rangos múltiples de Duncan. ^d IC₅₀ de los controles utilizados para medir actividad antirradical. * Cuantificados en los extractos etanólicos de la pulpa. ** Equivalentes de ácido gálico (EAG). *** Cuantificado en los extractos metanólicos de la pulpa, equivalentes de catequina (EC). **** IC₅₀ (concentración final del extracto en las cubetas definido como µg/mL de los extractos requerida para decrecer la concentración inicial de DPPH en un 50%).

Por otro lado cuando se compararon las concentraciones de vitamina C en la pulpa de los frutos de *A. diversifolia*, obtenidos en este trabajo, con frutos del mismo género, se encontró que tienen concentraciones menores a los reportados para otras anonas.

Sin embargo al comparar las concentraciones de vitamina C en la pulpa de los frutos de *A. diversifolia*, con otros frutos consumidos comúnmente, se encontró que es similar al reportado para las ciruelas con 1 mg/100 g de pulpa fresca y las peras con 3 mg/100 g de pulpa fresca (Dürüst, N. *et al.*, 1997), Figura 21.

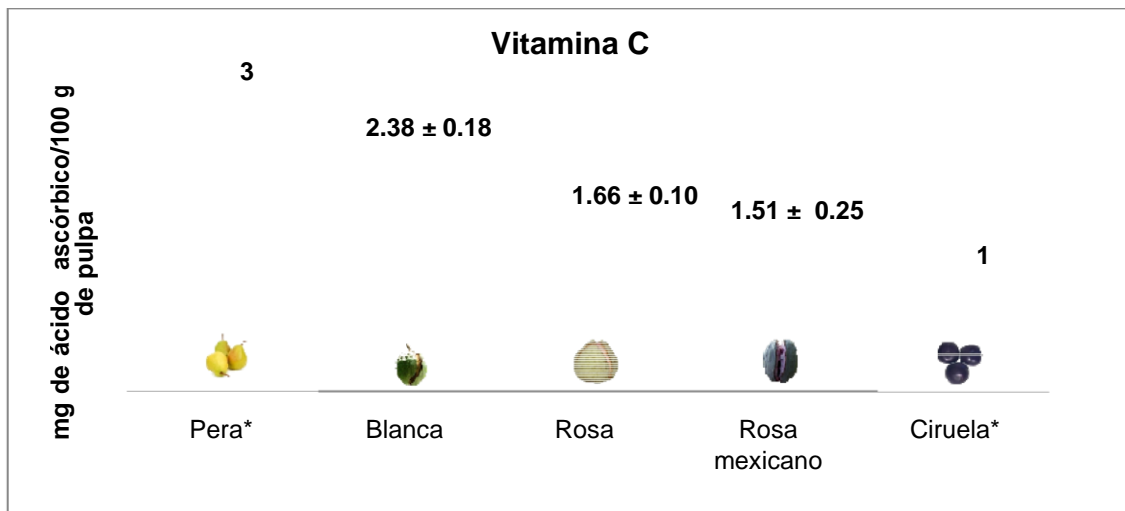


Figura 21. Vitamina C (mg de vitamina C/100 g de pulpa fresca) en frutas comúnmente consumidas (*Dürüst, N. *et al.*, 1997) y de los frutos de *A. diversifolia*

Actualmente se ha investigado sobre la funcionalidad de los alimentos sobre el organismo, principalmente de los frutos. Por lo que en este trabajo se cuantificó la cantidad de fenoles totales en la pulpa de los frutos de *A. diversifolia*, ya que estos metabolitos secundarios son los compuestos principales que aportan propiedades funcionales biológicas a los productos vegetales. Las concentraciones de fenoles totales obtenidos para cada variedad se muestran en la Tabla 14 y están expresados como mg equivalentes de ácido gálico (EAG). La variedad con mayor concentración de fenoles fue la variedad rosa mexicano con 170.88 ± 2.19 mg EAG /100 g de pulpa, seguido de la variedad blanca, la cual tuvo un valor muy similar con 170.16 ± 4.44 mg EAG/100 g de pulpa y por último se encontró la variedad rosa con 129.27 ± 1.32 mg EAG/100 g de pulpa. De acuerdo al análisis estadístico realizado se determinó que no existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre la variedad blanca y rosa mexicano, mientras que la variedad rosa tiene diferencia significativa respecto a las otras dos.

Los compuestos fenólicos disminuyen conforme la madurez es mayor en el fruto, sin embargo aumentan con el estrés producido durante su almacenamiento por magulladuras o

infecciones con hongos (Badui, S. D, 1993). Debido a lo anterior el análisis de compuestos fenólicos se llevó a cabo en pulpa de frutos sanos, como se mencionó anteriormente.

En la Figura 22 se muestra el contenido de fenoles totales de las tres variedades de *A. diversifolia* estudiadas, así como los valores obtenidos por Chun, O. K. *et al.* (2005) para otros frutos consumidos comúnmente por la población. Como se observa, la cantidad de fenoles totales contenidos en la pulpa de los frutos de *A. diversifolia* es comparable con frutos como las fresas con 225 mg EAG/100 g de pulpa y el pomelo con 161.73 mg EAG/100 g de pulpa en la caso de la variedad blanca y rosa mexicano, y con las manzanas con una concentración de 118.3 mg EAG/100 g de pulpa y naranjas con 112.29 mg EAG/100 g de pulpa para el caso de la variedad rosa.

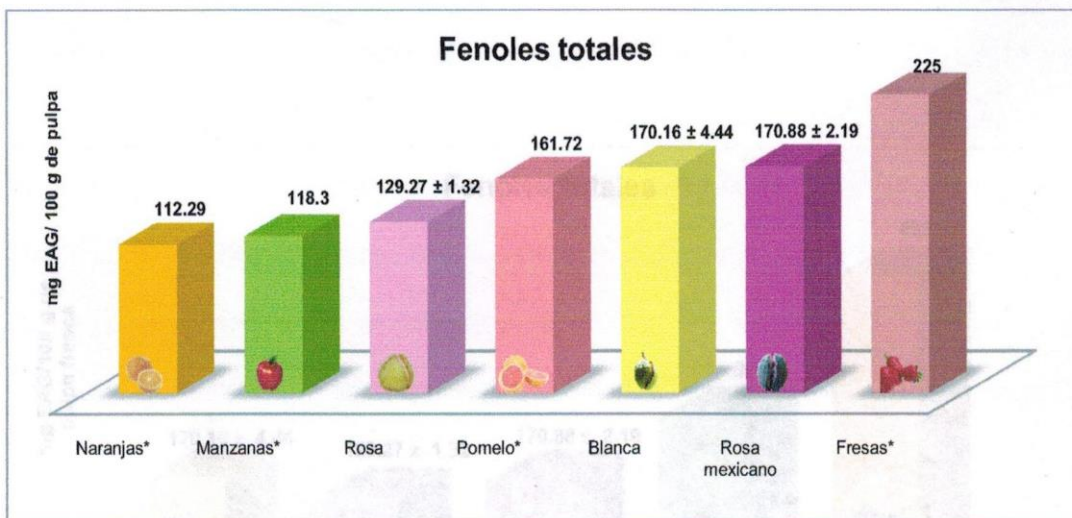


Figura 22. Fenoles totales, expresado como mg equivalentes de ácido gálico (EAG)/100 g de pulpa fresca, para frutas consumidas comúnmente (*Chun, O. K. *et al.*, 2005) y para las tres variedades de *A. diversifolia*.

De acuerdo al trabajo realizado por Vasco, C. *et al.* (2008), se tiene una clasificación para los frutos de acuerdo a su contenido de fenoles totales. Esta clasificación incluye a los alimentos de bajo contenido fenólico como aquellos que poseen menos de 100 mg/100 g de

pulpa, como alimentos intermedios a aquellos que tuvieran un contenido de entre 101-1000 mg/100 g de pulpa, y dentro de los de alto contenido fenólico a aquellos que estuvieran por arriba de 1001 mg/100 g de pulpa. Con base en esta clasificación los frutos de *A. diversifolia* están dentro del intervalo de alimentos intermedios, por tener mas de 100 mg EAG/100 g de pulpa.

Por otro lado existen reportes o estudios, en frutos del género *Annona*, como *A. crassiflora* (Roesler, R. *et al.*, 2006) y *A. cherimolia* Mill (Vasco, C. *et al.*, 2008). Los autores encontraron una cantidad importante de fenoles totales en los extractos etanólicos de la pulpa de *A. crassiflora*, 652.25 mg EAG/100 g de pulpa fresca, mientras que para *A. cherimolia* Mill encontraron una concentración de 323 mg/100 g de pulpa fresca. Comparando estos valores con los de los frutos de *A. diversifolia* se tiene que las tres variedades muestran menores concentraciones, Figura 23.

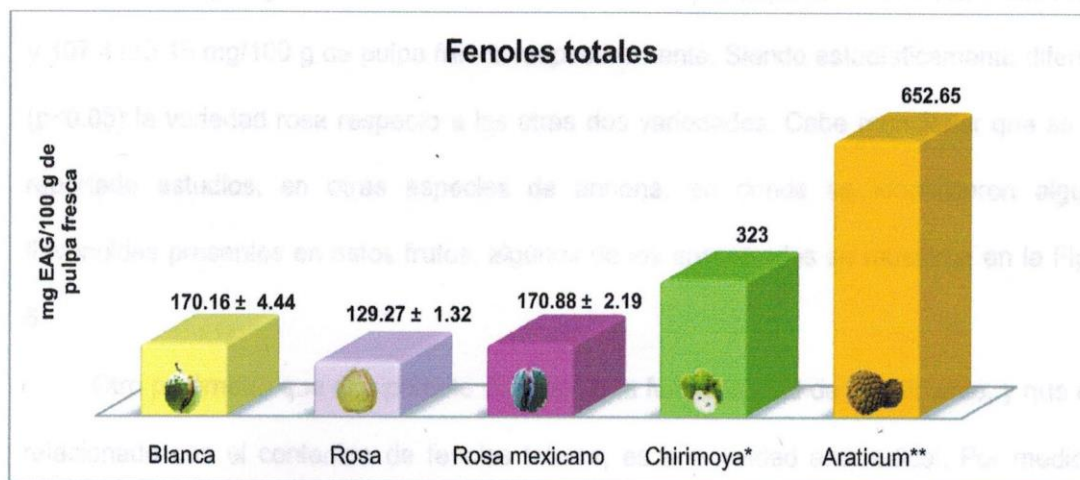


Figura 23. Fenoles totales expresado como mg EAG/100 g de pulpa fresca de los frutos *A. cherimolia* (*Vasco, C. *et al.*, 2008), *A. crassiflora* (**Roesler, R. *et al.*, 2006) y de *A. diversifolia*.

La cantidad de fenoles varía enormemente entre frutos del mismo género. Estas diferencias puede atribuirse a los métodos utilizados para la extracción y cuantificación de

fenoles, para este trabajo se tomaron diferentes condiciones entre las que están, la desgasificación de los disolventes y la inyección de nitrógeno en los tubos de reacción, lo cual minimiza la concentración de oxígeno. Cabe señalar que cuando hay cantidades importantes de oxígeno en el medio de reacción las concentraciones de fenoles totales se sobreexpresan para las pulpas estudiadas. Aunque también esta diferencia se puede atribuir al propio metabolismo secundario de la especie. En los controles cuantificados se tuvo una recuperación del 99 al 105 %, lo que nos indica que los métodos empleados para la extracción y cuantificación, fueron reproducibles y permitieron una cuantificación total, sin pérdida de fenoles durante la realización del análisis, Apéndice 7.

Dentro de los fenoles totales, están los flavonoides, metabolitos secundarios que también tienen gran capacidad para atrapar radicales libres. En este proyecto se cuantificaron los flavonoides en los extractos metanólicos de la pulpa de los frutos de *A. diversifolia*, Tabla 14. La variedad blanca mostró el contenido más alto (152.04 ± 5.39 mg/100 de pulpa fresca), seguido de la variedad rosa mexicano y finalmente la rosa con 142.56 ± 2.55 y 107.41 ± 5.15 mg/100 g de pulpa fresca respectivamente. Siendo estadísticamente diferente ($p < 0.05$) la variedad rosa respecto a las otras dos variedades. Cabe mencionar que se han reportado estudios, en otras especies de *annona*, en donde se identificaron algunos flavonoides presentes en estos frutos, algunos de los encontrados se muestran en la Figura 6.

Otro parámetro que nos permite determinar la funcionalidad de un alimento, y que está relacionado con el contenido de fenoles totales, es la actividad antirradical. Por medio de esta, podemos determinar la capacidad de un alimento *in vitro*, en este caso de los frutos de *A. diversifolia*, para inhibir la acción de los radicales libres, principales causantes de la degradación oxidativa en el organismo. En este trabajo se cuantificó la actividad antirradical frente al radical DPPH de los extractos etanólicos de la pulpa. Los valores obtenidos de la actividad antirradical evaluada en los frutos de *A. diversifolia* se muestran en la Tabla 14. La

actividad antirradical está expresada como IC_{50} que es la concentración de la pulpa del fruto necesaria para inhibir al 50 % la actividad del radical DPPH, por lo que a menor concentración mejor IC_{50} o mejor actividad antirradical. La variedad con una mejor IC_{50} fue la rosa mexicano con $1701.07 \pm 47.42 \mu\text{g/mL}$, con un valor similar la variedad blanca $1714.99 \pm 61.82 \mu\text{g/mL}$, finalmente la variedad rosa tuvo un IC_{50} de $1998.19 \pm 63.14 \mu\text{g/mL}$.

En la Figura 24 se graficó el % de inhibición del radical DPPH a 0.004 % (p/v) contra la concentración del extracto, en $\mu\text{g/mL}$, de la pulpa del fruto de las tres variedades de *A. diversifolia*.

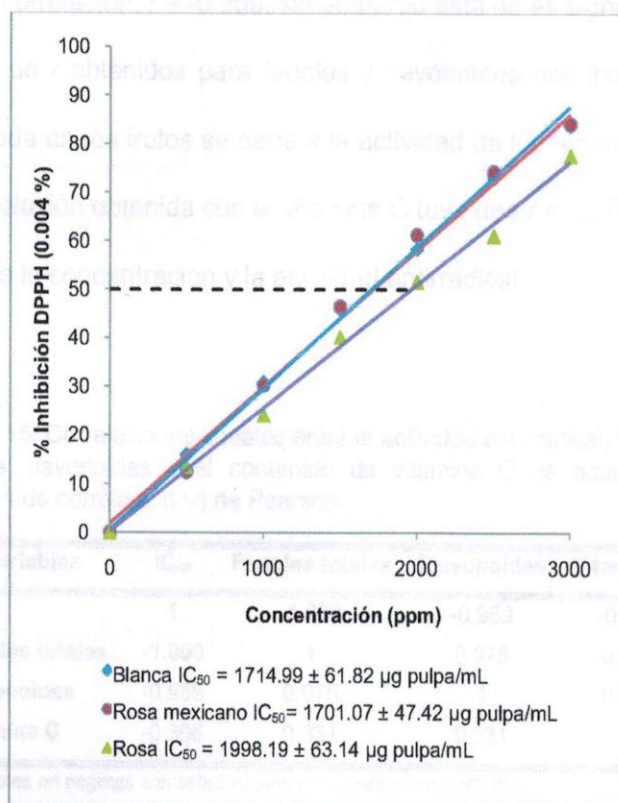


Figura 24. Actividad antirradical de los extractos etanólicos de la pulpa de las tres variedades del fruto de *A. diversifolia*

Como se observa en la Figura 24 las variedades blanca y rosa mexicano prácticamente inhibieron al radical DPPH con las mismas concentraciones. Este comportamiento se puede

atribuir a que la naturaleza química de los fenoles totales y a que sus concentraciones son prácticamente las mismas. En relación a la variedad rosa fueron necesarias concentraciones más altas del extracto para inhibir el 50 % del radical DPPH, por lo que mostró una IC_{50} más alta.

Con la finalidad de relacionar la concentración de fenoles totales y flavonoides con la actividad antirradical, se realizó una correlación de Pearson por mínimos cuadrados, y se encontró que existe una correlación lineal, $r = -1$, para los fenoles y la actividad antirradical, mientras que para el contenido de flavonoides con la actividad antirradical también se observó una buena correlación, $r = -0.969$, sin embargo esta no es significativa ($p < 0.05$).

Estos valores de r obtenidos para fenoles y flavonoides nos indican que la actividad antirradical encontrada en los frutos se debe a la actividad de los fenoles de forma sinérgica. Por otro lado la correlación obtenida con la vitamina C tuvo una $r = -0.306$, esto indica que no hay correlación entre la concentración y la actividad antirradical.

Tabla 15. Correlaciones lineales entre la actividad antirradical, fenoles totales, flavonoides y el contenido de vitamina C de acuerdo al análisis de correlación (r) de Pearson.

Variables	IC_{50}	Fenoles totales	Flavonoides	Vitamina C
IC_{50}	1	-1.000	-0.969	-0.306
Fenoles totales	-1.000	1	0.975	0.331
Flavonoides	-0.969	0.975	1	0.531
Vitamina C	-0.306	0.331	0.531	1

Los valores en negritas son estadísticamente significativos ($p < 0.05$).

Con respecto a la relación de fenoles totales con la actividad antirradical, es congruente dado que los fenoles totales son componentes orgánicos que estructuralmente deslocalizan radicales fácilmente y posteriormente se estabilizan como derivados de quinolinas, Figura 25. Además existen reportes en la literatura donde los extractos etanólicos

de frutos conteniendo fenoles totales se correlacionan con la actividad antirradical (Du, G. *et al.*, 2009).

CONCLUSIONES

- La masa medida en los frutos de *A. diversifolia* de entre 660.0 a 757.2 g cosechada que son de los más grandes del género *Amorpha*, después de *A. canescens* (1.216 g).
- Las propiedades físicas: masa, longitud, grosor, área superficial, densidad de la

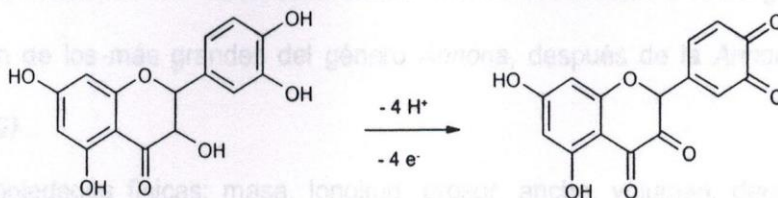


Figura 25. Producto de oxidación de un fenol (flavonoide).

De acuerdo a las características químicas encontradas en la pulpa de cada variedad, se considera que la mejor de ellas, como fuente de energía, es la variedad rosa mexicano ya que posee el mayor contenido de carbohidratos. Como fuente de minerales las tres variedades son consideradas de alto aporte en cuanto al potasio, ya que las tres aportan más del 20% de la ingesta diaria recomendada para este mineral. Finalmente, en cuanto a considerarlos como alimento funcional, las mejores variedades fueron la blanca y rosa mexicano, por poseer el mayor contenido de fenoles totales y flavonoides totales, así como contar con la mejor actividad antirradical.

Las propiedades que marcaron la diferencia entre las tres variedades de frutos fueron las químicas, ya que en ellas se observaron mayores diferencias significativas ($p < 0.05$).

CONCLUSIONES

- La masa medida en los frutos de *A. diversifolia*, de entre 686.0 a 757.2 g, demuestra que son de los más grandes del género *Annona*, después de la *Annona muricata* (1,319 g).
- Las propiedades físicas: masa, longitud, grosor, ancho, volumen, densidad de la fruta, densidad aparente, diámetro geométrico promedio, esfericidad, porosidad y superficie no tuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre las tres variedades de los frutos de *A. diversifolia*.
- El color cuantificado espectrofotométricamente arroja que la anona blanca ($h = 82.57^\circ$) presentó una coloración amarilla, la rosa ($h = 57.98^\circ$) una amarilla-rojiza y la rosa mexicano ($h = 358.53^\circ$) una coloración roja. Siendo el único parámetro físico con diferencias significativas ($p < 0.05$).
- El análisis proximal mostró que la variedad blanca tuvo el mayor contenido de fibra con 4.4 g/100 g de pulpa, por lo tanto también mostró la menor cantidad de ELN.
- El macromineral encontrado en mayor concentración en la pulpa de los frutos de *A. diversifolia* fue el K con valores desde 335 a 347 mg/100 g de pulpa fresca, mientras que el único micromineral detectado y cuantificado fue el Zn en concentraciones desde 0.10 a 0.15 mg/100 g de pulpa fresca.
- De los fenoles cuantificados la mayoría corresponden a flavonoides en la pulpa de las tres variedades.
- Los extractos orgánicos polares de la pulpa de las tres variedades del fruto de *A. diversifolia* presentaron un contenido intermedio de fenoles totales, flavonoides y una actividad antirradical proporcionada por los fenoles totales.

- Las propiedades que marcaron la diferencia entre las tres variedades de frutos fueron las químicas, ya que en ellas se observaron mayores diferencias significativas ($p < 0.05$).

PERSPECTIVAS

Como perspectivas para este trabajo se proponen los siguientes puntos que tienen como fin, formar un conocimiento más completo sobre los frutos de *A. diversifolia*.

- Determinar la estructura química de los compuestos fenólicos y flavonoides encontrados en la pulpa de los frutos de *A. diversifolia* y evaluarlos frente al radical DPPH para saber si la actividad antioxidante es sinérgica o no.
- Cuantificar la concentración de fenoles totales y flavonoides en las semillas y hojas de *A. diversifolia*.
- Evaluar la actividad antioxidante mediante poder reductor de los extractos etanólicos de la pulpa de los frutos de *A. diversifolia*.

PERSPECTIVAS

Como perspectivas para este trabajo se proponen los siguientes puntos que tienen como fin, formar un conocimiento más completo sobre los frutos de *A. diversifolia*.

- Determinar la estructura química de los compuestos fenólicos y flavonoides encontrados en la pulpa de los frutos de *A. diversifolia* y evaluarlos frente al radical DPPH para saber si la actividad antirradical es sinérgica o no.
- Cuantificar la concentración de fenoles totales y flavonoides en las semillas y hojas de *A. diversifolia*.
- Evaluar la actividad antioxidante mediante poder reductor en los extractos etanólicos de la pulpa de los frutos de *A. diversifolia*.

BIBLIOGRAFÍA

- Alothman, M.; Bhat, R.; Karim, A. A. **2009**. Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents. *Food Chemistry*. 115, 785-788.
- AOAC. **1997**. Official methods of analysis association of official analytical chemists. 15th ed. William Horwitz. Washington D.C. USA.
- Badui Dergal, S. Química de los alimentos. **1993**. Editorial Pearson Educación. 3^a ed. México.
- Benlloch, R.; Farré, R.; Frigola, A. M. **1993**. A quantitative estimate of ascorbic and isoascorbic acid by high performance liquid chromatography. Application to citric juices. *Journal of Liquid Chromatography*. 16 (14), 3113-3122.
- Bradford, F; Sanjay, G. **2007**. A review of antioxidants and Alzheimer's disease. *Annals of Clinical Psychiatry*. 17 (4), 269-286.
- Chun, O. K.; Kim, D-O.; Smith, N.; Shroeder, D.; Han, J. T.; Lee, C. Y. **2005**. Daily consumption of phenolics and total antioxidant capacity from fruit and vegetables in the American diet. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 85 (10), 1715-1724.
- Cruz, E. **2003**. Cultivo de anona. Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal. *Boletín técnico*. 7, 7-35.
- Cruz, E.; Deras, H. **2000**. Colecta y establecimiento de anonáceas en El Salvador. *Agronomía Mesoamericana*. 11, 91-95.
- deMan, J. M. Principles of food chemistry. **1999**. Editorial Aspen Publishers. 3^a ed. USA.
- Davies, M. B.; Austin, J.; Partridge, D. A. Vitamin C: It's Chemistry and Biochemistry. **1991**. Editorial Royal Society of Chemistry. UK.
- Díaz, R. J. Descubre los frutos exóticos. **2004**. Editorial Capitel. España.
- Du, G.; Li, M.; Ma, F.; Liang, D. **2009**. Antioxidant capacity and the relationship with polyphenol and vitamin C in *Actinidia* fruits. *Food Chemistry*. 113 (2), 557-562.
- Duke, A. T.; duCellier, J. L. CRC Handbook of alternative cash crops. **1993**. 1^a ed. CRC Press. USA.
- Dürüst, N.; Sümengen, D.; Dürüst, Y. **1997**. Ascorbic acid and element contents of foods of Trabzon (Turkey). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 45 (6), 2085-2087.
- Ertekin, C.; Gozlekci, S.; Kabas, O.; Sonmez, S.; Akinci, I. **2006**. Some physical, pomological and nutritional properties of two plum (*Prunus domestica* L.) cultivars. *Journal of Food Engineering*. 75 (4), 508-514.

- Ercisli, S.; Akbulut, M.; Ozdemir, O.; Sengul, M.; Orhan, E. **2008**. Phenolic and antioxidant diversity among persimmon (*Diospyrus kaki* L.) genotypes in Turkey. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 59 (6), 477-482.
- FDA (1993). Section 101.54 Nutrient content claims for "good source," "high", and "more". Code of Federal Regulations, Title 21 pp. 84-85.
- Fukumoto, L. R.; Mazza, G. **2000**. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 48 (8), 3597-3604.
- Hardisson, A.; Rubio, C.; Baez, A.; Martin, M.; Alvarez, R.; Díaz, E. **2001**. Mineral composition of the banana (*Musa acuminata*) from the island of Tenerife. *Food Chemistry*. 73 (2), 153-161.
- Hernández, Y.; Lobo, M. G.; González, M. **2006**. Determination of vitamin C in tropical fruits: A comparative evaluation of methods. *Food Chemistry*. 96 (4), 654-664.
- Kolayli, S.; Küçük, M.; Duran, C.; Candan, F.; Dinçer, B. **2004**. Chemical and properties of *Laurocerasus officinalis* Roem. (Cherry laurel) fruit grown in the Black Sea region. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 51 (25), 7489-7494.
- Letarme, P.; Buldgen, A.; Estrada, F.; Londoño, A. M. **2006**. Mineral content of tropical fruits and unconventional foods of the Andes and the rain forest of Colombia. *Food Chemistry*. 95 (4), 644-652.
- Lule, S. U.; Xia, W. **2005**. Food phenolics, pros and cons: A review. *Foods Reviews International*. 21 (4), 367-388.
- MacDougall, B. D. Color in food. Improving quality. **2002**. Editorial CRS Press LLC. 1^a ed. USA.
- Martín, A. A.; Luna, C. J. D. Bioestadística para las ciencias de la salud. **2004**. Editorial Capitel. España.
- Martínez, C. M.; Rodríguez, M. C. D.; Guillé, D. A. S.; Barroso, C. G. **2004**. Analysis of low molecular weight carbohydrates in food and beverages: A review. *Chromatographia*. 59 (1-2), 15-30.
- Martínez-Valverde, I.; Periago, M. J.; Ros, G. **2000**. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 50 (1), 5-18.
- Mendiburu, F. **2009**. Agricolae: Statistical procedures for agricultural research. R. package versión 1.0-7.
- Miller-Ihli, N. J. **1996**. Atomic absorption and atomic emission spectrometry for the determination of trace element content of selected fruits consumed in the United States. *Journal of Food Composition and Analysis*. 9, 301-311.
- Montgomery, D. Diseño y análisis de experimentos. **1991**. Editorial Iberoamericana, 2^a ed. México.
- Moreno-Velásquez, D.; Saucedo-Veloz, C.; Arévalo-Galarza, L.; Peña-Valdivia, C. B.; Soto-Hernández, M.; Cruz-Lagunas, B. **2008**. Cambio bioquímicos, biofísicos y fisiológicos

- Vasco durante el crecimiento y maduración del fruto de ilama (*Annona diversifolia* Saff.). *Agrociencia*. 42 (4), 407-414.
- Nakasone, H. Y.; Paull, E. R. Tropical Fruits. 1998. Cabi Publishing. New York. USA.
- Nie H. Y.; Peng S. H. 1984. Determination of total ascorbic acid in food using microfluorometric method. *Acta Nutrimenta Sinica*. 6 (3), 293-297.
- Norma Oficial Mexicana NMX-F-102-S-1978. Determinación de la acidez titulable en productos elaborados a partir de frutas y hortalizas. Dirección general de normas.
- Ong, B. T.; Nazimah, S. A. H.; Osman, A.; Quek, S. Y.; Voon, Y. Y.; Mat Hashim, D.; Chew, P. M.; Kong, Y. W. 2006. Chemical and flavor changes in jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) cultivar J3 during ripening. *Postharvest Biology and Technology*. 40 (3), 297-286.
- Özcan, M.; Haciseferoğulları, H.; Marakoğlu, T.; Arslan, D. 2005. Hawthorn (*Crataegus* spp.) fruit: Some physical and chemical properties. *Journal of Food Engineering*. 69 (4), 409-413.
- Pandolfi, G. Aplicaciones de la absorción atómica. URL: <http://www.iaca.com.ar/publicaciones/Absorcionatomica.html>. Fecha de consulta: 3 de Julio del 2008.
- Roesler, R.; Malta, L. G.; Carrasco, L. C.; Pastore, G. 2006. Evaluation of the antioxidant properties of brazilian cerrado fruit *Annona crassiflora* (araticum). *Journal of Food Sciences*. 76 (2), 102-107.
- Roesler, R.; Catharino, R. R.; Malta, L. G.; Eberlin, M. N.; Pastore, G. 2007. Antioxidant activity of *Annona crassiflora*: Characterization of major components by electrospray ionization mass spectrometry. *Food Chemistry*. 104 (3), 1048-1054.
- Salunkhe, D. K.; Bolin, R. H.; Reddy, R. N. Storage, processing, and nutritional quality of fruits and vegetables. 2000. Editorial CRC Press, 2ª ed. USA.
- Salamanca, G. G.; Correa, C. I. L.; Principal, J. 2007. Perfil de flavonoides e índices de oxidación de algunos propóleos colombianos. *Zootecnia*. 25 (2), 95-102.
- Saure, M. C. 2004. Calcium translocation to fleshy fruit: Its mechanism and endogenous control. *Journal of Scientia Horticulturae*. 105, 65-89.
- Schlesier, K.; Harwat, M.; Böhm, V.; Bitsch, R. 2002. Assessment of antioxidant activity by using different *in vitro* methods. *Free Radical Research*. 36 (2), 177-178.
- Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Nieman, T. A. Principios de análisis instrumental. 2005. Editorial Mc Graw Hill. 5ª Ed. México.
- Topuz, A.; Topakci, M.; Canakci, M.; Akinci, I.; Ozdemir, F. 2005. Physical and nutritional properties of four orange varieties. *Journal of Food Engineering*. 66 (4), 519-523.
- Torregrosa, V. F. Determinación de vitamina C y carotenoides en zumos de frutas y hortalizas frescos, tratados por calor por pulsos eléctricos de alta intensidad (PEAI). Servei publicacions. 2006. I.S.B.N.:84-370-6487-2. España.

Vasco, C.; Ruales, J.; Kamal-Eldin, A. **2008**. Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. *Food Chemistry*. 111 (4), 816-823.

Vursavuş, K.; Kelebek, H.; Selli, S. **2006**. A study on some chemical and physico-mechanic properties of three sweet cherry varieties (*Prunus avium* L.) in Turkey. *Journal of Food Engineering*. 74 (4), 568-575.

Won Lee, K.; Jun Kim, Y.; Joo Lee, H.; Yong Lee, C. **2003**. Cocoa has more phenolic phytochemicals and higher antioxidant capacity than teas and red wine. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 51, 7292-7295.

Yen, G. C.; Duh, P. D. **1994**. Scavenging effect of methanolic extracts of peanut hulls on free-radical and active-oxygen species. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 42 (3), 629-632.

Curvas de calibración obtenidas mediante HPLC a partir de los estándares de sacarosa, glucosa y fructosa (0,20, 0,35, 1,10, 1,55 y 2,10 g/L).

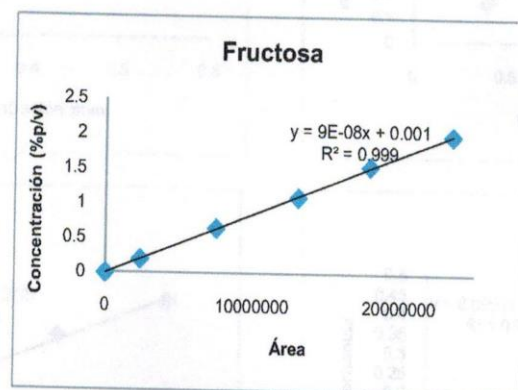
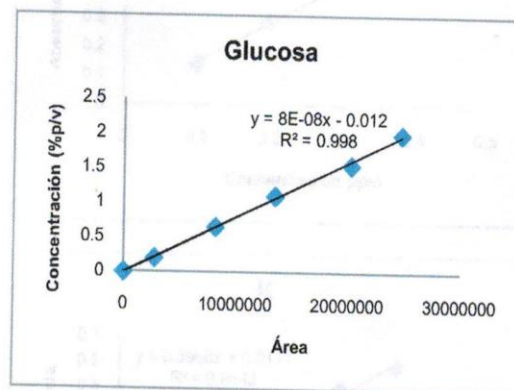
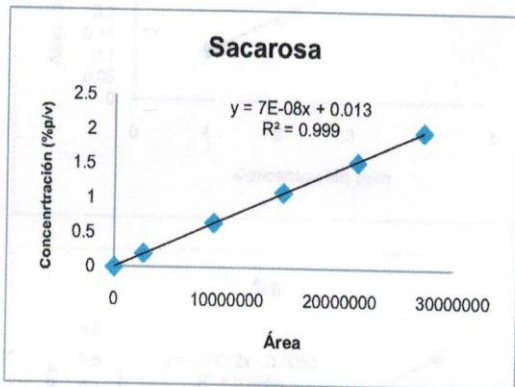


APÉNDICES

Curvas de calibración de los estándares de Ca, Mg, Na, K, Fe, Cu, Mn y Zn para la cuantificación de minerales, en las concentraciones correspondientes en ppm, por emisión atómica.

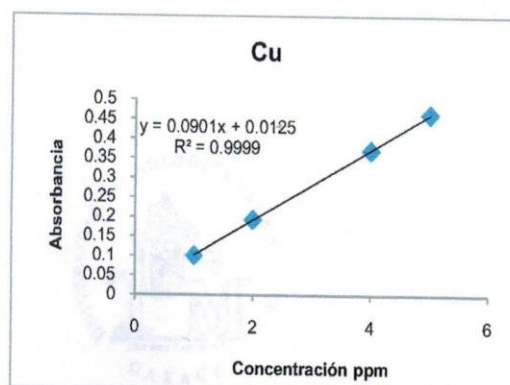
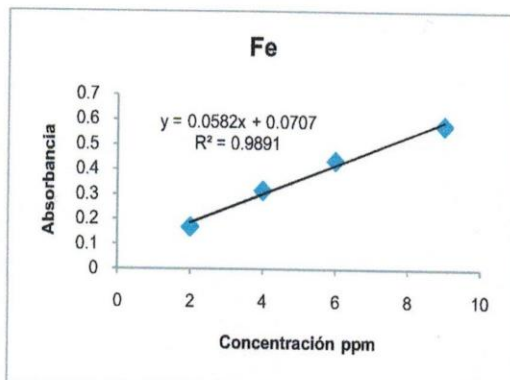
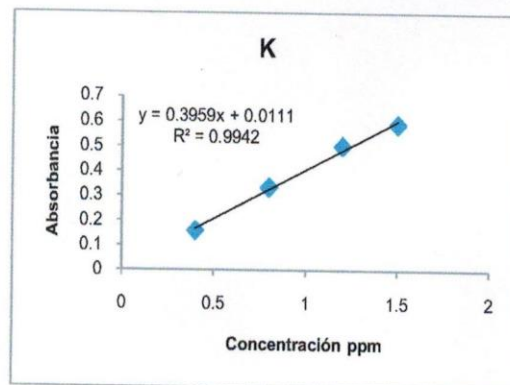
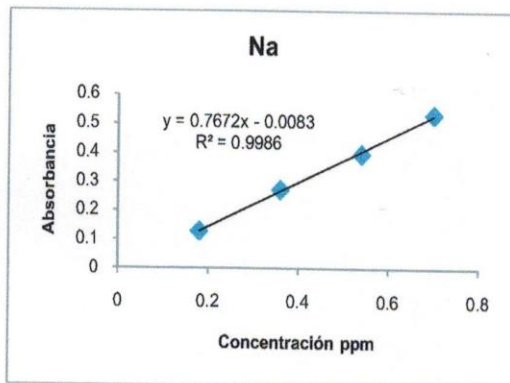
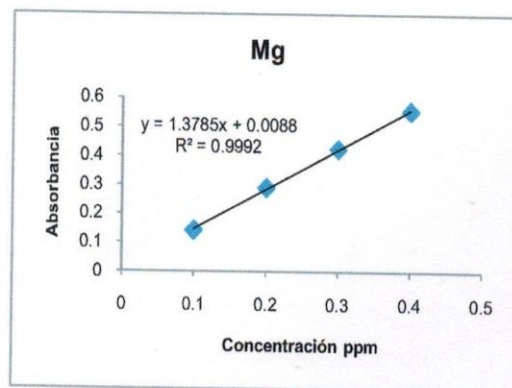
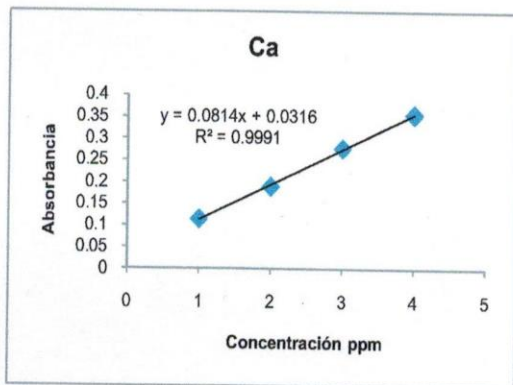
APÉNDICE 1

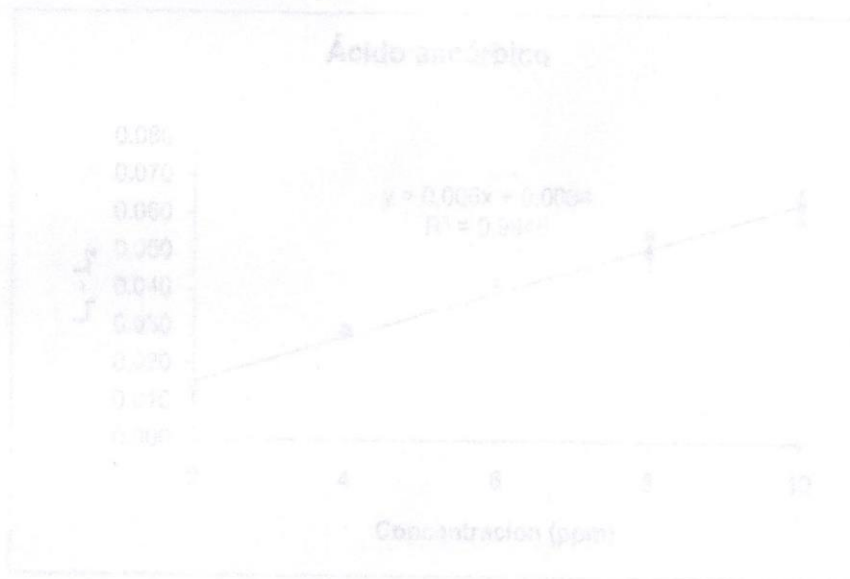
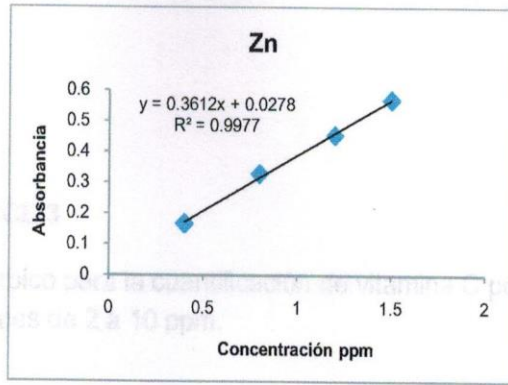
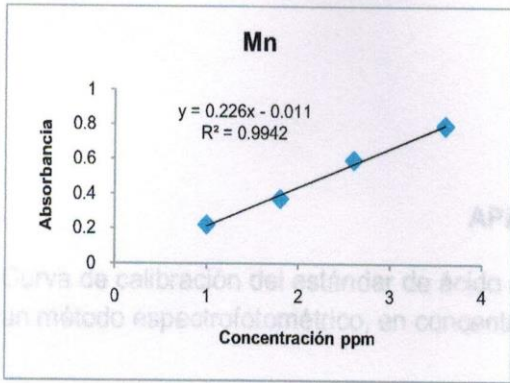
Curvas de calibración obtenidas mediante HPLC a partir de los estándares de sacarosa, glucosa y fructosa (0.20, 0.65, 1.10, 1.55 y 2.00 % p/v).



APÉNDICE 2

Curvas de calibración de los estándares de Ca, Mg, Na, K, Fe, Cu, Mn y Zn para la cuantificación de minerales, en las concentraciones correspondientes en ppm, por absorción atómica.

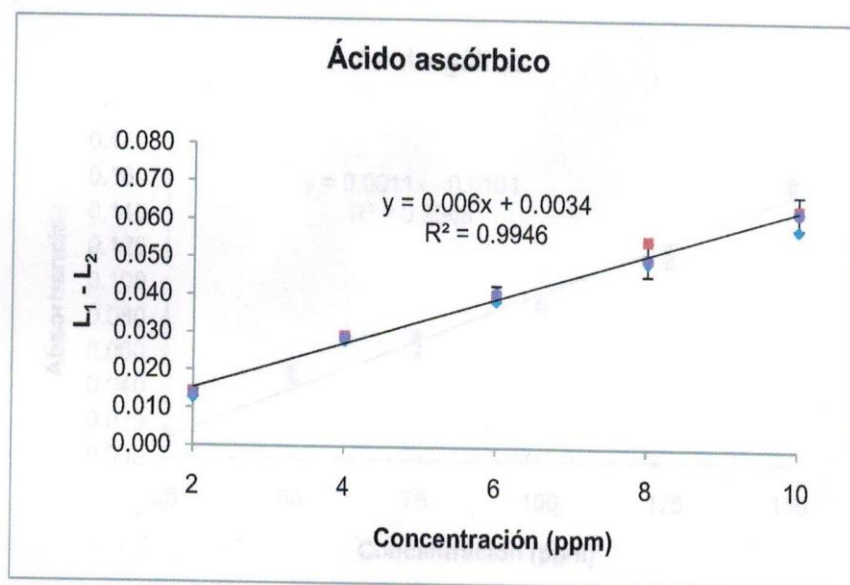




BIBLIOTECA

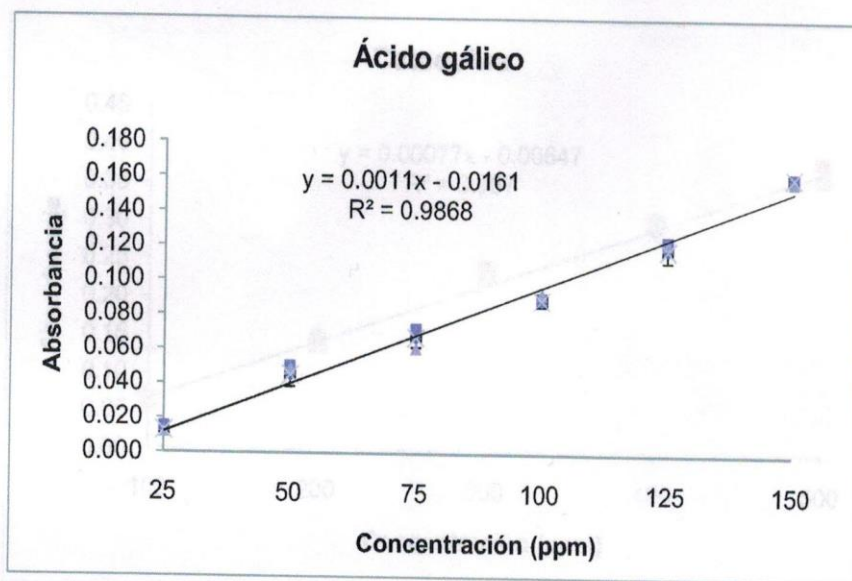
APÉNDICE 3

Curva de calibración del estándar de ácido ascórbico para la cuantificación de vitamina C por un método espectrofotométrico, en concentraciones de 2 a 10 ppm.



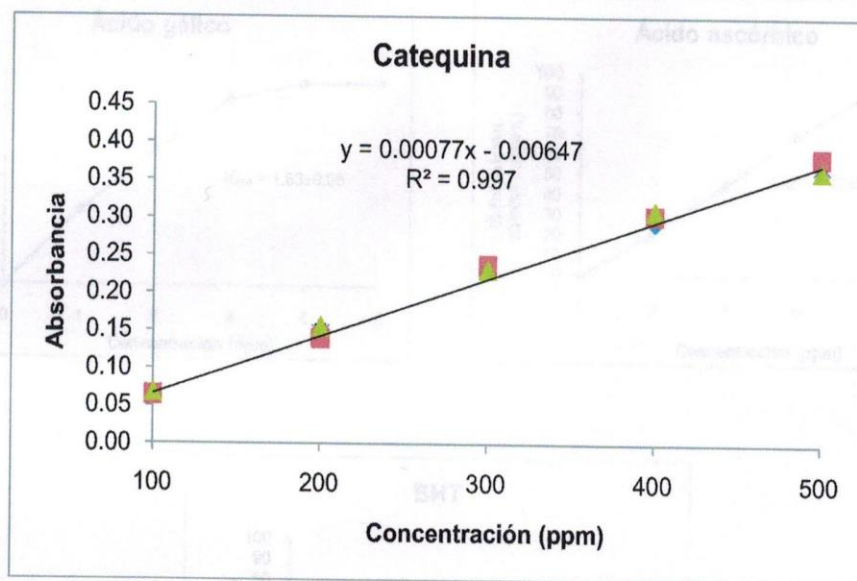
APÉNDICE 4

Curva de calibración del estándar de ácido gálico para la cuantificación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu, en concentraciones de 25 a 150 ppm.



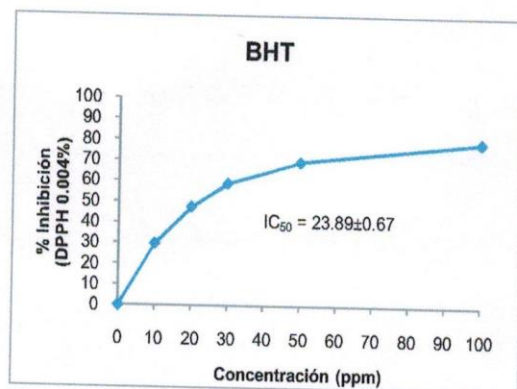
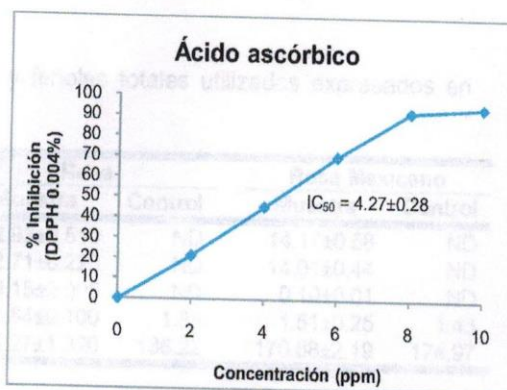
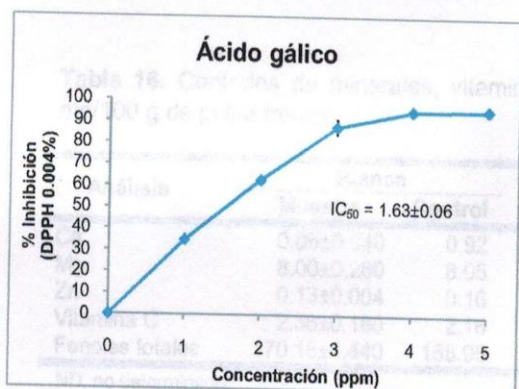
APÉNDICE 5

Curva de calibración del estándar de catequina para la cuantificación de flavonoides totales por un método espectrofotométrico, en concentraciones de 100 a 500 ppm.



APÉNDICE 6

Curvas de los controles en concentraciones de 1 a 5 ppm para ácido gálico, de 2 a 10 ppm para ácido ascórbico y de 10 a 100 ppm para BHT, para actividad antirradical utilizando el radical DPPH.



APÉNDICE 7

Anexo 1

Tabla 16. Controles de minerales, vitamina C y fenoles totales utilizados expresados en mg/100 g de pulpa fresca.

Análisis	Blanca		Rosa		Rosa Mexicano	
	Muestra	Control	Muestra	Control	Muestra	Control
Ca	0.86±0.040	0.92	22.93±0.510	ND	14.17±0.58	ND
Mg	8.00±0.260	8.95	12.71±0.220	ND	14.01±0.44	ND
Zn	0.13±0.004	0.16	0.15±0.005	ND	0.10±0.01	ND
Vitamina C	2.38±0.180	2.16	1.64±0.100	1.85	1.51±0.25	1.43
Fenoles totales	170.16±4.440	168.98	129.27±1.320	136.22	170.88±2.19	174.97

ND, no determinado.

Medir el pH de la solución

Figura 78. Determinación de pH (NMX F-102-S-1978)

ANEXOS

Anexo 1

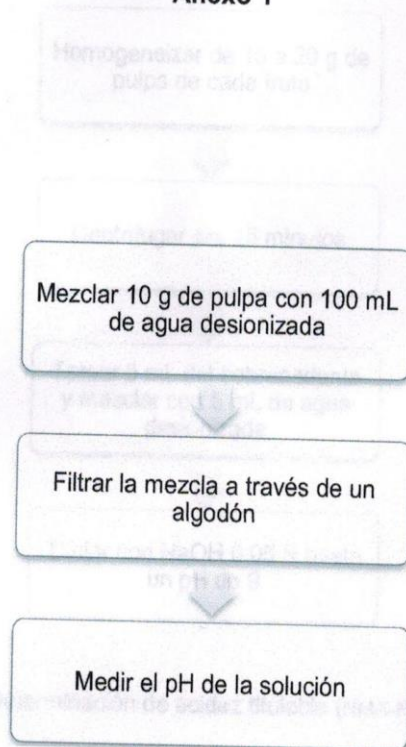


Figura 26. Determinación de pH (NMX-F-102-S-1978)

Anexo 2

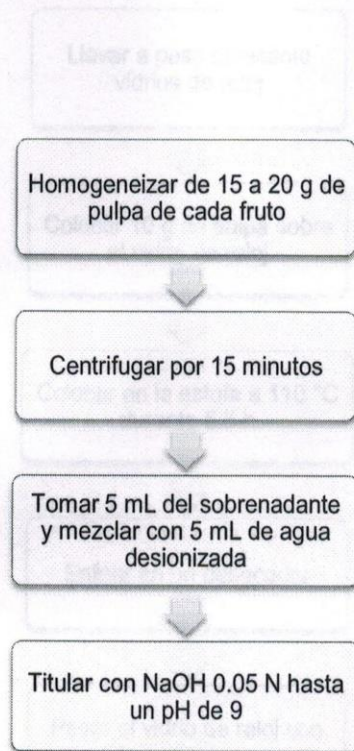


Figura 27. Determinación de acidez titulable (NMX-F-102-S-1978)

Figura 28. Determinación de humedad, método AOAC 820.05

Peso de la muestra (g) = W_1

Pérdida de peso (g) = W_2

$$\% \text{ Humedad} = \frac{W_1 - W_2}{W_1} \times 100$$

Anexo 3

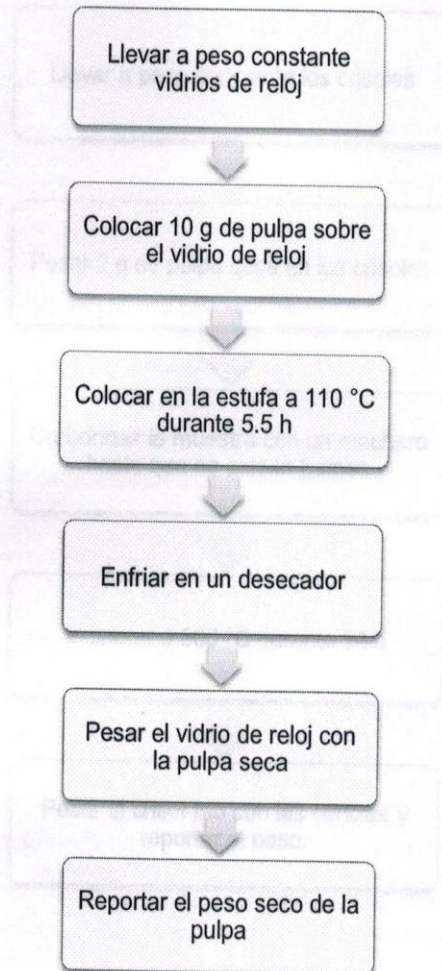


Figura 28. Determinación de humedad, método AOAC 925.09

Peso de la muestra (g) = W_1

Pérdida de peso (g) = W_2

$$\% \text{ Humedad} = \frac{W_2}{W_1} \times 100$$

Anexo 4

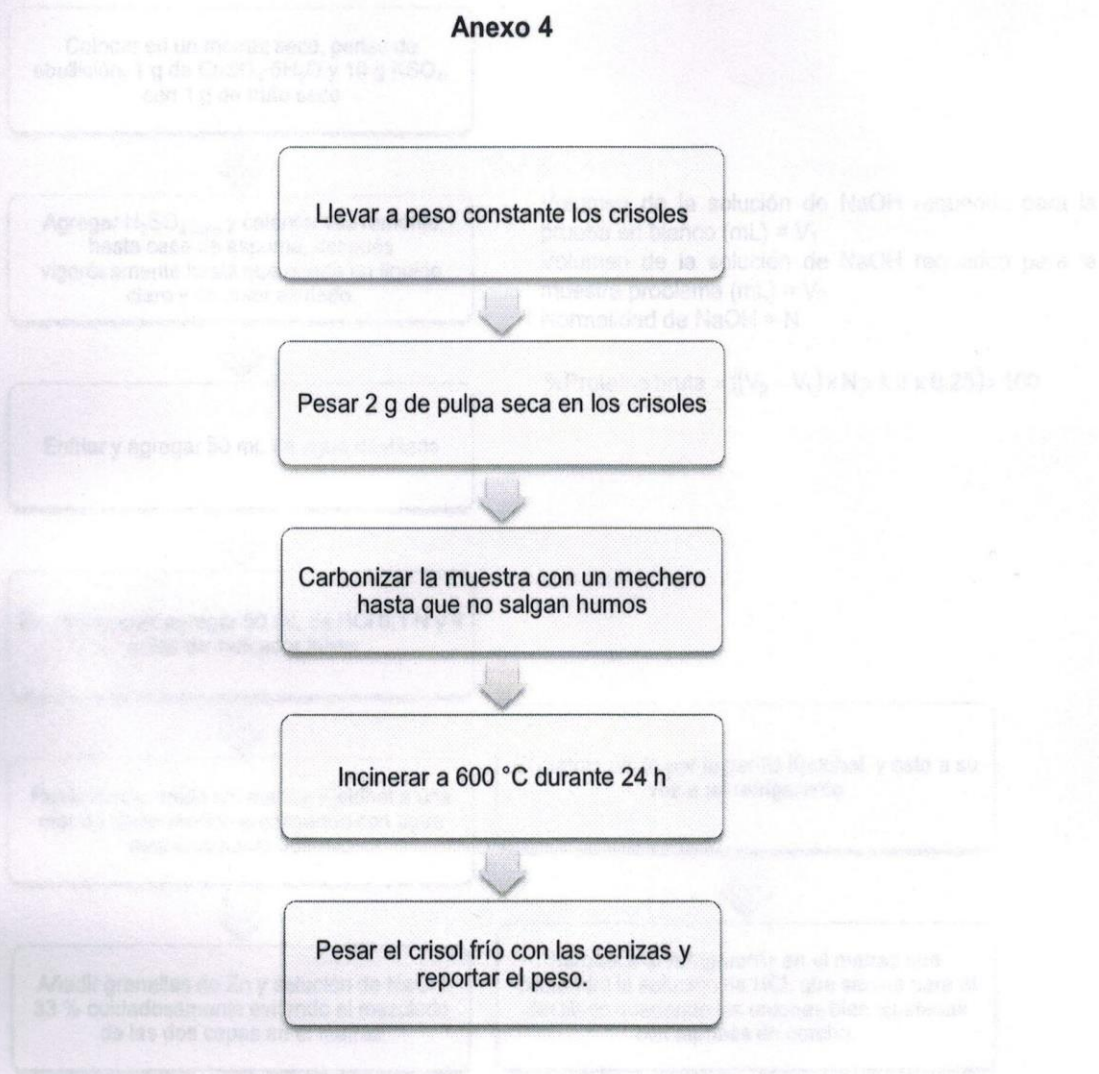


Figura 29. Determinación de cenizas, método AOAC 923.03

Masa del crisol vacío (g) = W_1

Masa del crisol con la muestras después de la incineración (g) = W_2

Peso de la muestra (g) = P

$$\% \text{Cenizas} = \left(\frac{W_2 - W_1}{P} \right) \times 100$$

Anexo 5

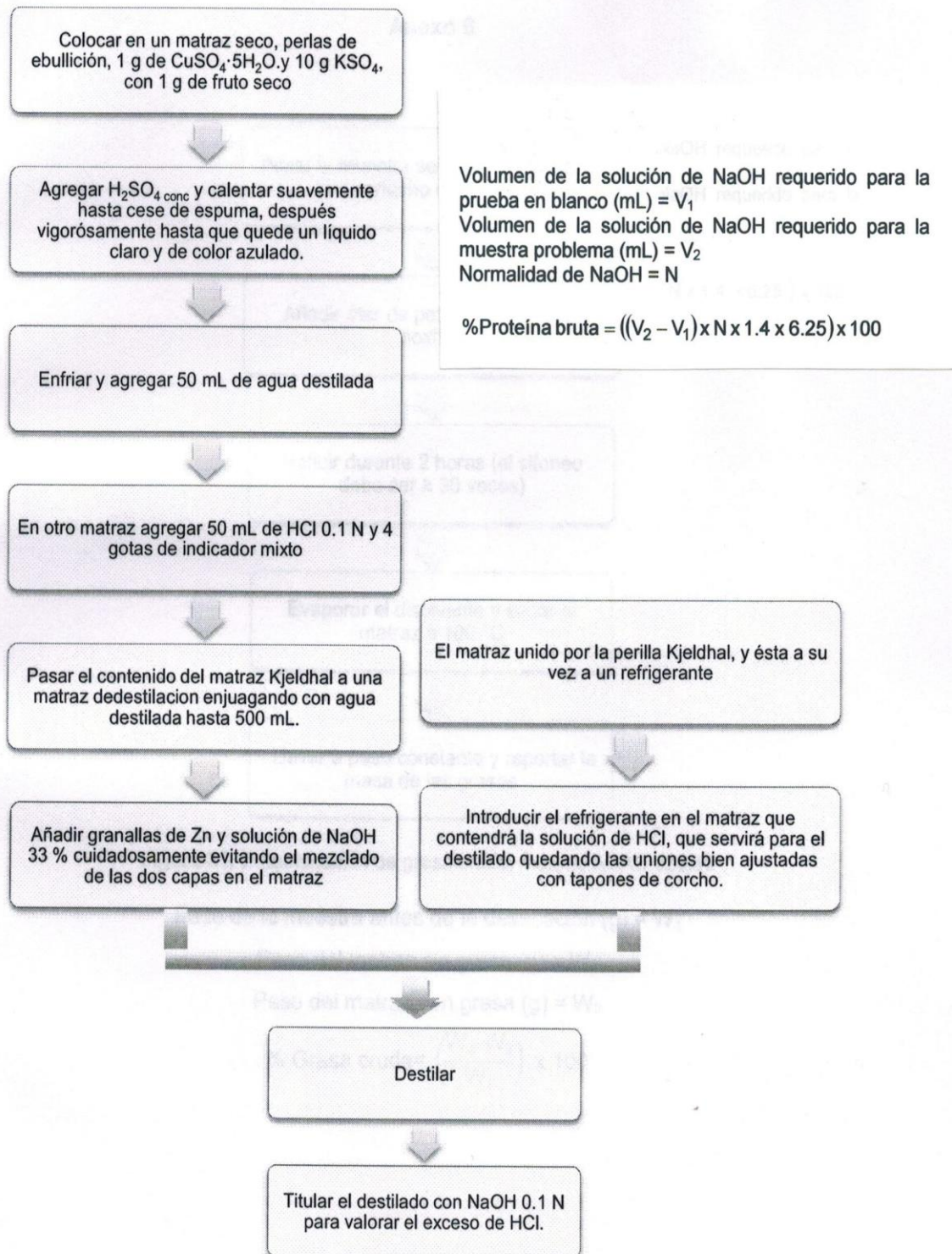


Figura 30. Determinación de proteínas, método AOAC 954.01

Anexo 6

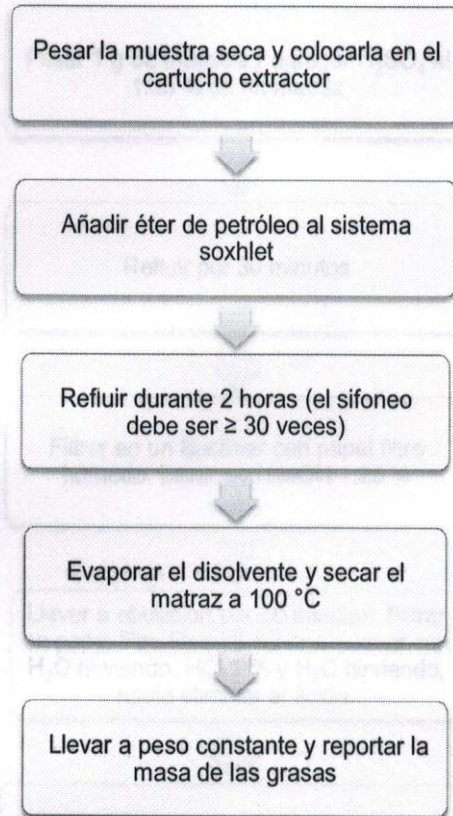


Figura 31. Determinación de grasa cruda, método AOAC 920.39

Peso de la muestra antes de la desecación (g) = W_1

Peso del matraz sin grasa (g) = W_2

Peso del matraz con grasa (g) = W_3

$$\% \text{ Grasa cruda} = \left(\frac{W_3 - W_2}{W_1} \right) \times 100$$

Anexo 7

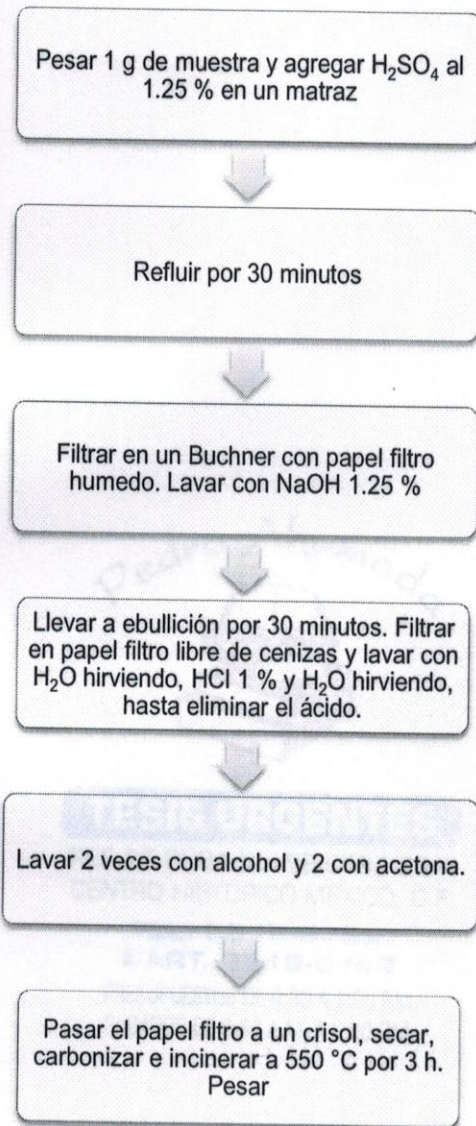


Figura 32. Determinación de fibra cruda, método AOAC 962.09

Peso de la muestra (g) = W_1

Peso de la materia soluble (g) = W_2

Peso de las cenizas (g) = W_3

$$\% \text{ Fibra cruda} = \left(\frac{W_3 - W_2}{W_1} \right) \times 100$$