



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE EDAFOLOGIA

CARACTERÍSTICAS NUTRACÉUTICAS DE FRAMBUESA (*Rubus ideaus* L.) EN DISTINTOS SITIOS DE MICHOACÁN Y JALISCO

DIANA ELIZABETH TRUJANO FRAGOSO

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

DICIEMBRE, 2016

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALIAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACION

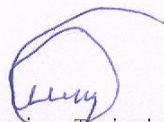
En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe Diana Elizabeth Trujano Fragoso, Alumno de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor Dr. Antonio Trinidad Santos, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis Características nutracéuticas de frambuesa (Rubus ideaus L.) en distintos sitios de Michoacán y Jalisco

y de los producto de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre el colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México, a 28 de Noviembre de 2016



Firma



Dr. Antonio Trinidad Santos

Vo. Bo. del Consejero o Director de Tesis

La presente tesis, titulada: **CARACTERÍSTICAS NUTRACÉUTICAS DE FRAMBUESA (*Rubus ideaus* L.) EN DISTINTOS SITIOS DE MICHOACÁN Y JALISCO**, realizada por la alumna: Diana Elizabeth Trujano Fragoso, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

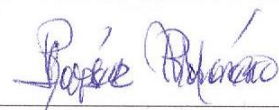
**DOCTORA EN CIENCIAS
EDAFOLOGÍA**

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:


DR. ANTONIO TRINIDAD SANTOS

ASESOR:


DRA. ROSA MA. LÓPEZ ROMERO

ASESOR:


DR. CIRO VELASCO CRUZ

ASESOR:


DR. ALBERTO ENRIQUE BECERRIL ROMÁN

ASESOR:


DRA. CONSUELO DE JESÚS CORTÉS PENAGOS

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Diciembre 2016

CARACTERÍSTICAS NUTRACÉUTICAS DE FRAMBUESA (*Rubus ideaus* L.) EN DISTINTOS SITIOS DE MICHOACÁN Y JALISCO

RESUMEN

Durante la temporada de cosecha de frambuesa 2013-2014 se colectaron frutos de los cvs. ‘Adelita’, ‘Erika’, ‘Lupita’ y ‘Polka’, en sitios de los estados de Michoacán y Jalisco, para determinar color, firmeza, sólidos solubles totales (SST), acidez titulable (AT), pH del jugo, capacidad antioxidante (CA), ácido elágico (AE) y compuestos volátiles. Como resultado se encontró que todas las variables físicas y químicas (excepto CA) presentan diferencia significativa para distintas épocas de cosecha. Se realizó un análisis de regresión para evaluar el efecto del promedio mensual de la temperatura (T) y la humedad relativa (HR) de los sitios, y se encontró que existe una relación positiva de la T promedio sobre SST, pH, AE y CA, pero negativa sobre AT. La HR sólo tuvo efecto negativo sobre las variables firmeza y SST. Se observó diferencia significativa en la concentración de AE entre cultivares; las frutas cosechadas en los meses de junio y octubre presentaron mayor concentración de este componente. La mayor concentración de AE se encontró en el cv. ‘Erika’ (3.69 µg/g de peso fresco de la fruta) y el menor, en el cv. ‘Adelita’ (2.26 µg/g). La capacidad antioxidante de todos los cultivares fue mayor a 60%, que es un valor aceptable en la neutralización de los radicales libres. También se observó que el perfil de compuestos volátiles fue distinto en cada cultivar.

Durante la temporada de cosecha de frambuesa 2014-2015, se estudió el efecto de la altitud, la época de muestreo y ciclo de producción, sobre el cv. ‘Erika’, para observar la diferencia de las características de calidad, CA y AE en función de dichos factores. Se encontró que dichas características cambian de acuerdo a las épocas de muestreo y que, en función a la altitud sólo varía la CA, además que F, AT y pH cambiaron de un ciclo a otro.

Palabras clave: cultivares, nutraceuticos, berries, polifenoles, compuestos volátiles.

NUTRACEUTICAL CHARACTERISTICS OF RASPBERRY (*Rubus idaeus* L.) IN DIFFERENT SITES OF MICHOACAN AND JALISCO

ABSTRACT

During the 2013-2014 raspberry harvesting season, fruits were harvested from the following cultivars: ‘Adelita’, ‘Erika’, ‘Lupita’, and ‘Polka’, in orchards in Michoacan and Jalisco to determine color, firmness, total soluble solids (TSS), titratable acidity (TA), juice pH, antioxidant capacity (AC), ellagic acid (EA), and volatile compounds. As a result, all the physical and chemical variables, with the exception of AC, were found to show significant differences at different harvest times. Regression analysis was performed to evaluate the effect of mean monthly temperature (T) and relative humidity (RH) in the different sites, and a positive relationship was found between mean T and TSS, pH, EA, and AC, and a negative relationship between T and TA. RH had a negative effect on firmness and TSS. A significant difference in EA concentrations among cultivars was observed; fruits harvested in June and October had higher concentrations of this component. The highest EA concentration was found in the ‘Erika’ cv. (3.69 µg/g fresh fruit weight), while the lowest concentration was in the ‘Adelita’ cv. (2.26 µg/g). The antioxidant capacity of all cultivars was greater than 60%, which is an acceptable value in the neutralization of free radicals. Also the volatile compounds profile was different for every cultivar.

During the 2014-2015 raspberry harvesting season, the altitude, harvest times and harvest years influence was studied in ‘Erika’ cultivar to analyze the effect in quality fruit, AC and EA. Those characteristics changed in every harvest season but in each altitude level just AC was different, and firmness, TA and pH changed by year.

Keywords: cultivars, nutraceutical, berries, polyphenols, volatile compounds.

AGRADECIMIENTOS

A los millones de mexicanos que pagan impuestos, quienes, a través del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y el Colegio de Postgraduados, han financiado parte de mi formación.

A la empresa Sun-Belle® por las facilidades brindadas y apoyo otorgado durante la realización de los muestreos, principalmente a: Dra. Nicole Hewstone, Sr. Manuel Quiroz Lázaro, Srita. Yadira Marilú Román Hernández, Sr. Manuel Miguel Daniel, Francisco Morales y al Ing. Martín García por su valiosa colaboración.

A las empresas que de alguna u otra forma colaboraron en esta investigación.

Al Servicio Meteorológico Nacional (SMN) por los datos proporcionados para la realización de esta investigación.

A los productores que con su disposición apoyaron la realización de esta investigación: Sr. Humberto Duarte y esposa, Sr. Rodolfo Díaz, Sr. Azael Vergara y a todos aquellos que colaboraron con las facilidades durante los muestreos.

A los Doctores integrantes de mi Consejo Particular:

Dr. Antonio Trinidad Santos: por su paciencia y dedicación.

Dra. Rosa María López Romero: por su energía, conocimiento, apoyo y consejos.

Dr. Ciro Velasco Cruz: por su conocimiento, dinamismo y apoyo.

Dr. A. Enrique Becerril Román: por su tiempo y comentarios.

Dra. Consuelo de Jesús Cortés Penagos: por su disposición y colaboración.

A Rosy Cuevas Vázquez, muy especialmente por todo su apoyo y compañerismo en todas y cada una de las actividades realizadas durante esta investigación. Rosy, ¡un gusto trabajar con usted, es una gran persona!

A mi familia que pese a todo, siempre me han apoyado incondicionalmente en todo tiempo, bueno y difícil ¡Los quiero muchísimo! Vicente Trujano Ayala, Mariana Fragoso Rivera, Keny Trujano Fragoso, Isaf Gordillo Llaven y Josué Gordillo Trujano.

A mis compañeros y amigos por hacer más amena mi estancia en el Colegio de Postgraduados: M. C. Carlos Villalba, M. C. Cesar Montoya y M. C. Miguel Peña.

Al personal, encargados y colaboradores de los laboratorios del Colegio de Postgraduados, que me ayudaron en las muchas horas de trabajo en particular: M. C. David Jaen Contreras, Sr. Arturo López Velóz, M. C. Juliana Padilla y todos quienes me apoyaron durante esta etapa.

A todos aquellos que directa e indirectamente contribuyeron a la realización de esta tesis.

Principalmente a Dios por permitirme concluir esta etapa.

DEDICATORIA

A quien más quiero:

JOSUÉ

“Sé sabio, hijo mío, y regocija mi corazón, para que pueda responder al que me está desafiando con escarnio”. Prov. 27:11.

Contenido

1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	4
2.1 Objetivo General.....	4
2.2 Objetivos específicos	4
3. HIPÓTESIS	4
3.1 Hipótesis general.....	4
3.2 Hipótesis específicas.....	4
4. REVISIÓN DE LITERATURA	5
4.1 Frambuesa (<i>Rubus idaeus</i> L.)	5
4.2 Producción de frambuesa en México.....	6
4.3 Áreas de cultivo de frambuesa en México.....	6
4.3.1 Michoacán.....	7
4.3.2 Jalisco.....	8
4.3.3 Épocas de producción en México.	8
4.4 Calidad externa	9
4.4.1 Color.	9
4.4.2 Firmeza.	10
4.4.3 Tamaño.	11
4.5 Calidad interna	11
4.5.1 Acidez/Sólidos Solubles.	11
4.5.2 Compuestos volátiles en frambuesa.....	12
4.6 Factores que influyen sobre la calidad externa, interna y contenido de volátiles.....	14
4.7 Polifenoles en berries.....	16
4.7.1 Efecto benéfico de los polifenoles en la salud.....	18
4.7.1.1 Actividad Antioxidante.	18
4.7.1.2 Afecciones hepáticas.....	19
4.7.1.3 Anticancerígeno	19
4.7.1.4 Otros.....	19
4.7.2 Ácido Elágico.....	19

4.8 Factores que afectan el contenido de compuestos bioactivos.....	22
4.8.1 Factores ambientales.....	22
4.8.2 Factor Genético.....	23
4.8.3 Manejo agronómico.....	23
4.9 Mejoramiento en ‘berries’.....	24
4.9.1 Cultivares.....	24
5. MATERIALES Y MÉTODOS	26
5.1 Sitios de muestreo.....	26
5.1.1 Altitud y ubicación geográfica.....	27
5.1.2 Clima.....	27
5.1.3 Suelo.....	27
5.1.4 Fruta.....	28
5.1.4.1 ‘Adelita’.....	28
5.1.4.2 ‘Erika’.....	28
5.1.4.3 ‘Lupita’.....	29
5.1.4.4 ‘Polka’.....	29
5.2 Datos pomológicos de las frambuesas.....	29
5.2.1 Calidad externa.....	29
5.2.1.1 Color.....	29
5.2.1.2 Firmeza (F).....	29
5.2.2 Calidad interna.....	30
5.2.2.1 Acidez Titulable (AT).....	30
5.2.2.2 Sólidos solubles totales (SST).....	31
5.2.2.3 pH.....	31
5.3 Capacidad antioxidante.....	31
5.4 Ácido elágico.....	32
5.4.1 Reactivos y materiales.....	35
5.4.1.1 Preparación de estándares.....	35
5.4.2 Instrumentación.....	36
5.4.3 Extracción de ácido elágico.....	36
5.4.3.1 Extracción en fase sólida.....	37

5.4.3.1.1 Acondicionamiento del cartucho	37
5.4.3.1.2 Adición de la muestra	38
5.4.3.1.3 Lavado de la muestra	39
5.4.3.1.4 Elución del analito	39
5.5 Pruebas preliminares	41
5.5.1 Determinación analítica.	41
5.5.2 Repetibilidad del método.	42
5.5.3 Evaluación de la Recuperación.	42
5.6 Perfil de compuestos volátiles en frambuesa	42
5.6.1 Muestras	43
5.6.1.1 Preparación de la muestra.	43
5.6.2 Materiales	43
5.6.3 Determinación de volátiles	43
5.6.4 Instrumentación.....	43
5.7 Análisis estadístico.....	44
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
6.1 Caracterización de sitios de muestreo	46
6.2 Ciclo de producción 2013-2014.....	48
6.2.1 Muestreo de los cultivares ‘Adelita’, ‘Erika’, ‘Lupita’ y ‘Polka’	48
6.2.1.1 Selección de variables.	48
6.2.1.2 Efecto de época de muestreo.....	50
6.2.1.2.1 Firmeza.	51
6.2.1.2.2 Sólidos solubles totales.....	51
6.2.1.2.3 Acidez titulable y pH.....	52
6.2.1.2.4 Capacidad antioxidante.....	52
6.2.1.2.5 Ácido elágico.....	53
6.2.1.3 Efecto del cultivar	53
6.2.1.3.1 Color.	53
6.2.1.3.2 Variables pomológicas.	54
6.2.1.3.3 Capacidad antioxidante.....	55
6.2.1.3.4 Ácido elágico.....	56

6.3 Compuestos volátiles identificados.....	58
6.4 Ciclo de producción 2013-2014.....	62
6.4.1 Muestreo en cultivar ‘Erika’ en diferentes altitudes.....	62
6.4.1.1 Selección de variables.....	62
6.4.1.2 Efecto de la altitud.....	63
6.4.1.3 Fecha de muestreo.....	65
6.4.1.3.1 Color.....	66
6.4.1.3.2 Firmeza.....	67
6.4.1.3.3 Sólidos Solubles Totales (SST), Acidez Titulable (AT) y pH.....	67
6.4.1.3.4 Capacidad Antioxidante (CA).....	68
6.4.1.3.5 Ácido Elágico (AE).....	68
6.4.1.4 Efecto del ciclo de producción.....	68
6.4.1.4.1 Color.....	68
6.4.1.4.2 Firmeza.....	69
6.4.1.4.3 SST, AT y pH.....	69
6.4.1.4.4 CA y AE.....	69
6.5 Ácido elágico.....	70
6.5.1 Curva de calibración.....	70
6.5.2 Recuperación.....	70
6.5.3 Repetibilidad.....	71
7. CONCLUSIONES.....	72
8. LITERATURA CITADA.....	74

Índice de figuras

Figura 1. Producción de los principales países productores de frambuesa	5
Figura 2. Países con mayores rendimientos promedio de frambuesa	5
Figura 3. Producción (t) de frambuesa en México (2000-2013).....	6
Figura 4. Distribución de la superficie sembrada de frambuesa en México.....	7
Figura 5. Municipios en los que se produce frambuesa en Michoacán	7
Figura 6. Municipios en los que se produce frambuesa en Jalisco	8
Figura 7. Producción de frambuesa en algunos países productores.....	9
Figura 8. Compuestos volátiles reportados en frutos de frambuesa.	12
Figura 9. Principales grupos de polifenoles en alimentos	17
Figura 10. Formación del ácido elágico a partir de elagitaninos	20
Figura 11. Conversión enzimática del ácido shikímico y dehidroshikimico hacia ácido gálico ..	20
Figura 12. Planta de frambuesa en época de producción, Tangancícuaro, México.....	25
Figura 13. Localización de los sitios en los que se realizaron los muestreos.	26
Figura 14. Muestreo y formación de muestra compuesta de suelo para su análisis.	27
Figura 15. Fruto de frambuesa cv. ‘Erika’	28
Figura 16. Firmeza de frutos de frambuesa por compresión	30
Figura 17. Refractómetro para determinación de SST.....	31
Figura 18. Reflujo de muestras de frambuesa.....	36
Figura 19. Filtrado de la muestra al vacío en embudos Büchner.....	37
Figura 20. Concentración de muestra en el rotavapor.	37
Figura 21. Acondicionamiento del cartucho con MEOH y H ₂ O.	38
Figura 22. Adición del extracto a los cartuchos Sep-Pak Plus tC ₁₈	38
Figura 23. Eluato colectado.	39
Figura 24. Eluato evaporado a sequedad.	39
Figura 25. Eluato enrasado a 10 mL.	40
Figura 26. Eluato filtrado en los acrodiscos y puesto en viales.	40
Figura 27. Cromatograma de un estándar de AE	41
Figura 28. Cromatograma de un extracto de frutos de frambuesa cv. ‘Erika’	41
Figura 29. Exposición de la fibra al espacio de cabeza, después del equilibrio de fases.	44
Figura 30. Desorción de compuestos volátiles en el cromatógrafo	44

Figura 31. Temperatura promedio durante los meses de muestreo	46
Figura 32. Humedad relativa promedio durante los meses de muestreo	48
Figura 33. Análisis de compuestos volátiles por HS-SPME-GC-MS.....	59
Figura 34. Comparación de medias de los compuestos volátiles encontrados	60
Figura 35. Curva de calibración de AE.....	70

Índice de Cuadros

Cuadro 1. Clasificación de los frutos de frambuesa por tamaño.	11
Cuadro 2. Algunos compuestos volátiles determinados en frambuesa.....	13
Cuadro 3. Concentraciones de ácido elágico total en varios alimentos hidrolizados	21
Cuadro 4 Métodos de extracción del AE.	33
Cuadro 5. Determinación de ácido elágico por HPLC.	34
Cuadro 6. Descripción de los sitios de muestreo y características del suelo.	47
Cuadro 7. Variables de respuesta en función de las covariables más importantes.	49
Cuadro 8. Efecto de la época de muestreo en las variables físicas y químicas.....	50
Cuadro 9. Efecto de temperatura (T) y humedad relativa (HR) sobre las variables pomológicas	51
Cuadro 10. Efecto del cultivar en el color de los frutos de los estados de Michoacán y Jalisco..	54
Cuadro 11. Efecto del cultivar en las variables físicas y químicas de la frambuesa.....	55
Cuadro 12. Compuestos identificados mediante HS-SPME-GC-MS en el jugos de frambuesa..	58
Cuadro 13. Variables de respuesta en función de las covariables más importantes.	62
Cuadro 14. Significancia del análisis de regresión	63
Cuadro 15. Efecto de la altitud del sitio de producción	64
Cuadro 16. Efecto de la fecha de muestreo	66
Cuadro 17. Efecto del ciclo de producción	69

1. INTRODUCCIÓN

El consumo de 'berries' tiene efecto positivo sobre algunas enfermedades crónico-degenerativas, tales como padecimientos cardiovasculares o asociados al envejecimiento, obesidad, neurodegenerativos e incluso ciertos tipos de cáncer, como el esofágico y el gastrointestinal (Seeram, 2008). Los frutos de 'berries' son buena fuente de antocianidinas, elagitaninos y proantocianidinas, flavonoles, flavones y flavonones, con potencial benéfico para la salud (Ovaskainen *et al.*, 2008; Šavikin *et al.*, 2009). Diversas investigaciones avalan el efecto nutracéutico de las 'berries', por lo que su consumo se ha incrementado. Como respuesta a este aumento, su producción se ha fortalecido.

En México las condiciones edafoclimáticas, productivas y sanitarias son apropiadas para producir y comercializar estos frutos, lo que ha favorecido el crecimiento y desarrollo de este sector productivo. De este grupo, las frambuesas son consideradas como las más populares en el mundo, son uno de los frutos de clima templado de mayor precio unitario en fresco en el mercado. En México, la superficie cultivada de frambuesa se incrementó 11 veces del año 2000 al 2014 (SIAP, 2016); además de ser uno de los países con mayores rendimientos por unidad de superficie (15.51 t ha^{-1}) (FAOSTAT, 2016).

Conjuntamente a la importancia económica, la frambuesa contiene cantidades importantes de sustancias bioactivas (Daniel *et al.*, 1989). El ácido elágico es un fito-químico contenido en las 'berries' que reduce el daño oxidativo endógeno del ADN, por lo cual se sugiere que puede prevenir y suprimir ciertos tipos de cáncer (Aiyer *et al.*, 2008), además reduce el síndrome de abstinencia a la nicotina (Pérez-Pastén *et al.*, 2006). Asimismo los frutos de esta especie tienen una alta capacidad de neutralizar los radicales libres, causantes de la oxidación de las células (Milivojević *et al.*, 2011). Comparadas con otras berries, las frambuesas, contienen mayor concentración de compuestos volátiles ($62 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), por lo que ocupan un lugar de élite en la preferencia de los consumidores, tanto por su sabor, olor y valor nutracéutico (Honkanen, 1980; Vuorela *et al.*, 2005; Ovaskainen *et al.*, 2008).

En la actualidad, los mejoradores y productores buscan combinar los componentes nutraceuticos con alta productividad y calidad sensorial de los frutos para obtener un alto valor de mercado (Milivojević *et al.*, 2011). Sin embargo tanto las características productivas, composición de volátiles, calidad interna, externa y nutraceutica, difieren en gran manera y están determinadas por el genotipo y dependen de las condiciones ambientales durante el crecimiento (Evdokimenko, 2009; Paterson *et al.*, 2013).

Chen *et al.* (2013) mostraron que las variedades influyen significativamente en la composición de fito-químicos y la capacidad antioxidante de las frambuesas; y sugieren que los mejoradores y los desarrolladores de productos pueden usar el contenido total de fenoles y antocianinas como parámetro de selección de variedades con alta capacidad antioxidante y beneficios biológicos, para cumplir con las demandas de los consumidores.

No obstante, existen diversos elementos ambientales como luz, temperatura y humedad, así como los factores internos (genéticos, hormonales y nutrimentales) que contribuyen a la síntesis de ellos (Strack, 1997; Kalt, 2005). Todos estos afectan la fisiología de las plantas, capaces de desencadenar respuestas que pueden inducir la acumulación de compuestos fenólicos y otros metabolitos secundarios (Kays, 1997).

Sin embargo, tanto los elementos ambientales como los internos impactan de distinta manera sobre el contenido de fenoles. El cultivar, así como los elementos que varían de acuerdo a la estación (agua, luz y temperatura) se destacan por su efecto sobre ellos (Salinas-Moreno *et al.*, 2009). En el caso de ácido elágico, algunos cultivares pueden tener hasta 4 veces más que otros (Anttonen y Karjalainen, 2005). De igual manera, la capacidad antioxidante tiene variaciones significativas entre cultivares (Chen *et al.*, 2013).

En las regiones de importancia productiva en México se han introducido nuevos cultivares, con altos estándares de calidad, con el fin realizar trabajo de mejoramiento genético y aumentar la productividad, en los que no se han realizado caracterización de calidad, producción de metabolitos secundarios o perfil de compuestos volátiles.

Esta investigación se realizó con el propósito de conocer los cambios en la calidad externa e interna, capacidad antioxidante y concentración de ácido elágico, en función del cultivar, altitud, época de muestreo y ciclo de producción en frutos de frambuesa en diferentes sitios de los estados de Jalisco y Michoacán. Así como mostrar un perfil de volátiles de los diferentes cultivares analizados.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

- Determinar característica de calidad, capacidad antioxidante y el ácido elágico en frutos de frambuesa producidos a diferentes altitudes, meses de cosecha, periodos de producción y genotipos.

2.2 Objetivos específicos

- Evaluar la calidad de los frutos muestreados (color, firmeza, sólidos solubles totales, acidez titulable y pH).
- Cuantificar la capacidad antioxidante de los frutos de frambuesa en los distintos meses de muestreo, altitudes y ciclos de cosecha.
- Determinar el ácido elágico en los frutos muestreados.
- Realizar el perfil de compuestos volátiles de cada cultivar.

3. HIPÓTESIS

3.1 Hipótesis general

Las características de calidad física, química, capacidad antioxidante y concentración de ácido elágico en los frutos de frambuesa dependen del genotipo y las condiciones climáticas durante los meses de muestreo.

3.2 Hipótesis específicas

- Las variables de calidad, capacidad antioxidante y concentración de ácido elágico varían en función del genotipo y los meses de muestreo.
- El perfil de compuestos volátiles es distinto en cada genotipo.
- Los cambios agroecológicos que induce la altitud, influyen sobre las características de calidad, capacidad antioxidante y contenido de ácido elágico en el cv. 'Erika'.

4. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 Frambuesa (*Rubus ideaus L.*)

En 2013 a nivel mundial la superficie cultivada fue de 578 233 ha con un rendimiento promedio de 6.06 t ha⁻¹. Entre los principales países productores estuvieron, Rusia, Polonia, Estados Unidos, Serbia y Ucrania (Figura 1).

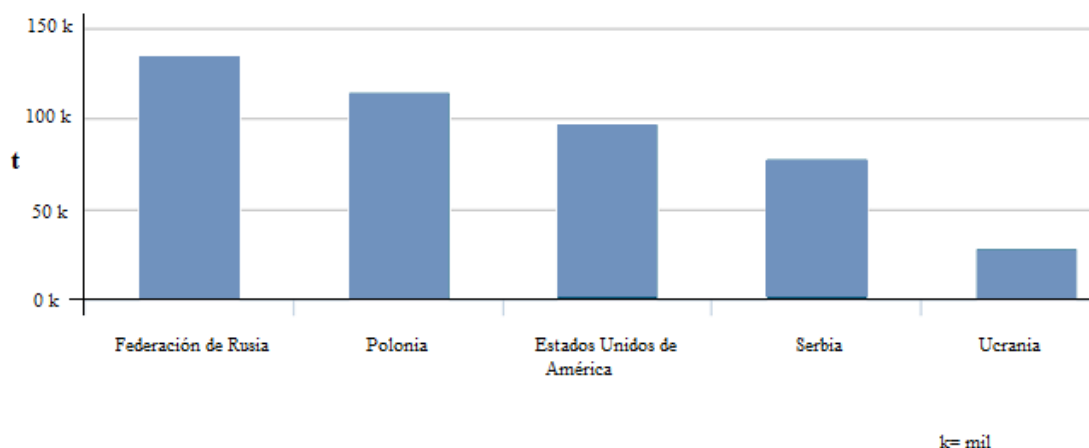


Figura 1. Producción de los principales países productores de frambuesa (Promedio 2010-2013) (<http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/S>).

México aportó 30 441 t y se encuentra entre los países con los más altos rendimientos (promedio de 15.51 t ha⁻¹) (FAOSTAT, 2016).

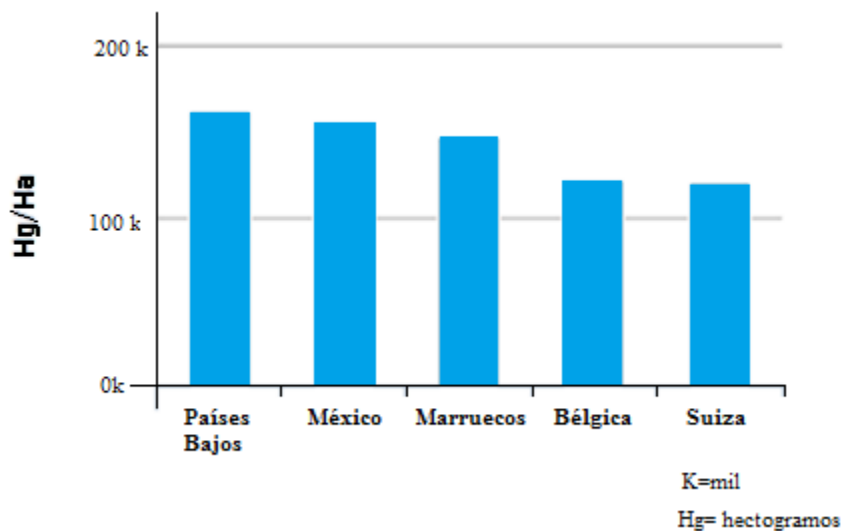


Figura 2. Países con mayores rendimientos promedio de frambuesa (2010-2013) (<http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/S>)

4.2 Producción de frambuesa en México

Actualmente la frambuesa producida en México tiene una participación importante en los mercados internacionales. Sus principales clientes son Estados Unidos, Inglaterra, Holanda, Italia y Alemania (SIAP, 2016). Su producción y cultivo se han incrementado en los últimos años, puesto que se considera muy rentable y con rápido retorno de la inversión, además genera gran cantidad de empleos y la mayor parte de la producción se destina a la exportación (Figura 3). Tan sólo en 2014, se produjeron 35627 t de frambuesa, con un valor de producción de 1,402714 miles de pesos (SIAP, 2015).

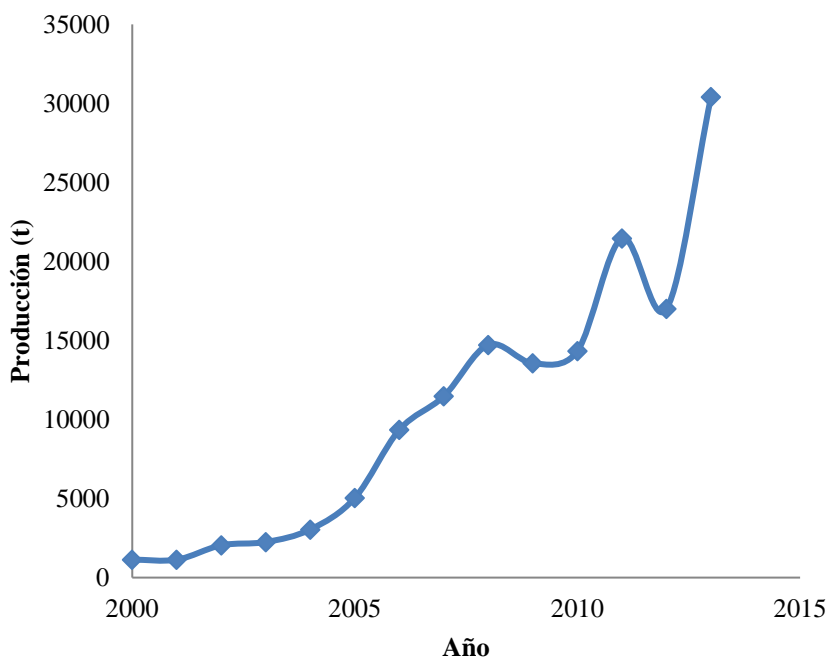


Figura 3. Producción (t) de frambuesa en México (2000-2013)
(Elaborado con datos de FAOSTAT, 2016).

4.3 Áreas de cultivo de frambuesa en México

En México, los mayores productores, definidos por el número de hectáreas plantadas y cosechadas con frambuesa, así como por su volumen de producción son Jalisco, Baja California y Michoacán, respectivamente (Figura 4) (SIAP, 2016).

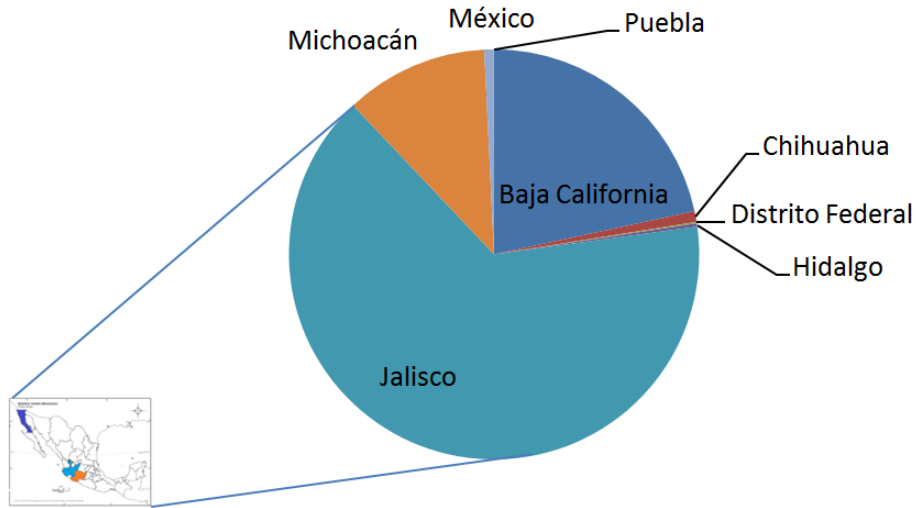


Figura 4. Distribución de la superficie sembrada de frambuesa en México (Elaborado con datos de SIAP, 2016)

4.3.1 Michoacán. Es el principal estado productor y exportador de ‘berries’ (fresa, frambuesa, zarzamora y arándano) y el tercer estado productor de frambuesa. De acuerdo con datos de SIAP (2016). Los municipios en los que se tienen plantaciones de frambuesa son Jacona, Los Reyes, Tangancícuaro, Zamora, Peribán e Irimbo (Figura 5).

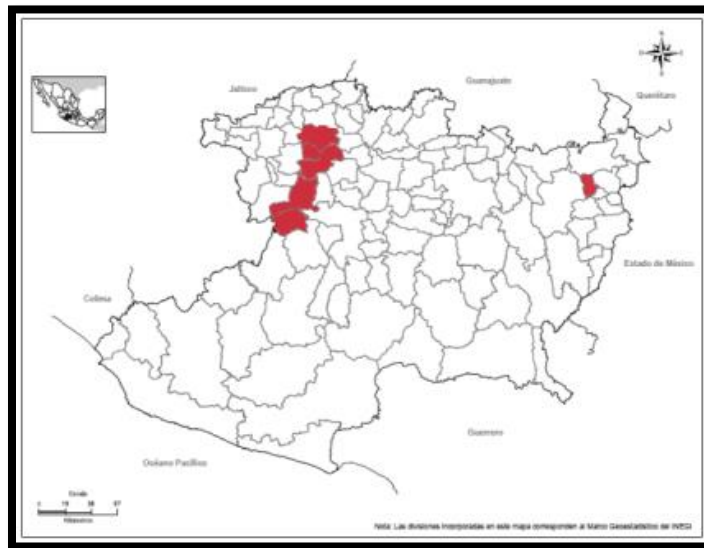


Figura 5. Municipios en los que se produce frambuesa en Michoacán (Elaborado con datos de SIAP, 2016)

4.3.2 Jalisco. Es actualmente el principal productor de frambuesa, ya que aporta 65% del volumen de la producción nacional. Algunos de los municipios en los que se tiene establecido el cultivo de frambuesa, son Cd. Guzmán, Jocotepec, Zapotiltic, Sayula, Tuxcueca, Tuxpan, Amacueca, Atotonilco el Alto, Tizapán el Alto y Tapalpa (Figura 6) (SIAP, 2016).

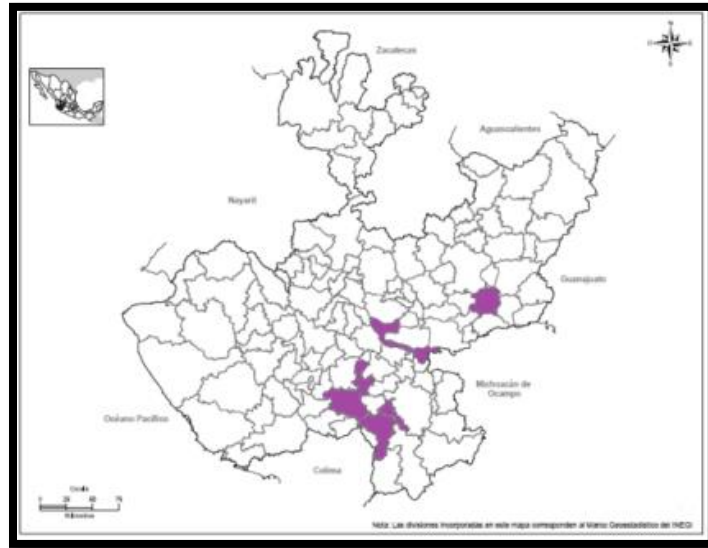


Figura 6. Municipios en los que se produce frambuesa en Jalisco (Elaborado con datos de SIAP, 2016).

4.3.3 Épocas de producción en México. La cosecha de una planta de frambuesa dura en promedio un mes, después se prepara para la ‘producción de segunda flor’, mediante poda y defoliación. Los productores realizan la programación de su producción, de tal manera que pueden tener fruta todo el año. En estas zonas productoras comienza la temporada de cosecha a mediados del mes de septiembre o principios del mes de octubre, y termina a finales del mes de junio del año siguiente (Figura 7). México posee las condiciones apropiadas de altitud, clima y suelo para obtener frutos en cualquier época del año.

Los cultivares seleccionados para ser producidos en la zona, cumplen con características de calidad externa e interna, que exige el mercado internacional. Algunos de los aspectos que suelen considerarse para evaluar los frutos son firmeza, color, contenido de sólidos solubles totales, acidez titulable y pH del fruto.

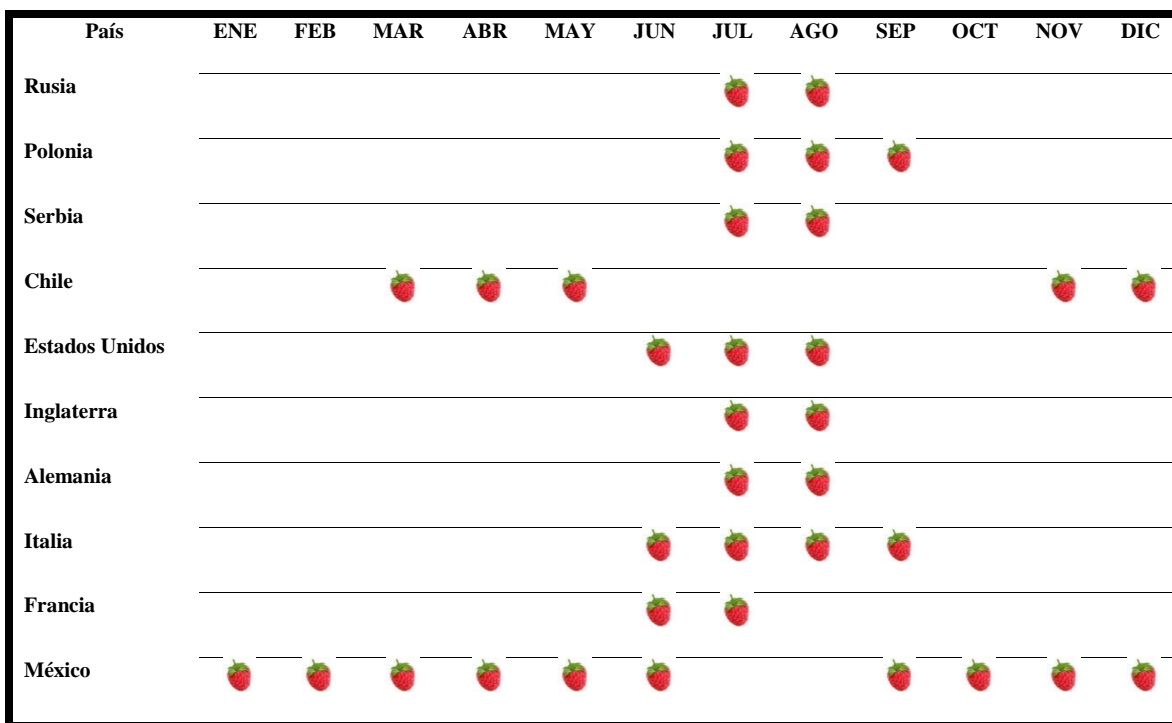


Figura 7. Producción de frambuesa en algunos países productores.
(Elaborado con base a información recopilada y citada en el presente trabajo).

4.4 Calidad externa

La pérdida de la calidad en los frutos pequeños se refleja con el oscurecimiento del color, pérdida de la firmeza y cambios en el sabor. Del grupo de los berries, la frambuesa es la que más fácilmente pierde su calidad comercial (Robbins y Sjulín, 1986). Factores ambientales como luz, temperatura y precipitación, así como prácticas agronómicas pueden contribuir a las diferencias de las características de calidad externa de los frutos (Milivojević *et al.*, 2011). Además, el cultivar provoca una amplia variabilidad de la productividad y calidad de los frutos (Nikolić *et al.*, 2009).

4.4.1 Color. Dos criterios que comúnmente se usan para determinar la etapa ideal de cosecha en frambuesa, son la adhesión de los frutos al receptáculo y su color, este último es ampliamente considerado durante la comercialización, procesamiento y almacenamiento de los frutos (Stavang *et al.*, 2015). Cambios en el color pueden indicar que están ocurriendo reacciones de degradación durante estos procesos (de Ancos *et al.*, 1999).

El color al momento de la cosecha es importante, ya que influye en la aceptación de los frutos para consumo, además puede influir en la resistencia de los frutos a la manipulación post-cosecha (empaquete, transporte y almacenamiento) (McGuire, 1992; Krüger *et al*, 2011).

El método CIELab es ampliamente utilizado para medir el color de frutos (McGuire, 1992). Los valores bajos de C^* y h^* , en frambuesa, se pueden describir como colores más azulados. Las coordenadas L^* , a^* y b^* tienden a disminuir (en relación a los materiales frescos) después de los periodos de almacenamiento, aunque las diferencias entre genotipos tienden a mantenerse (Krüger *et al*, 2011). Mazur *et al*. (2014) indican que estos valores ($L^*a^*b^*C^*$ y h^*) son significativamente afectados tanto por el genotipo (32% de la variación), como por la época de cosecha (diferencias en ambiente de crecimiento). En promedio reportaron valores de L^* (21), a^* (33), b^* (16), C^* (37) y h^* (26).

Los principales compuestos que contribuyen al color de los frutos son las antocianinas. Algunas de las que se han identificado en frambuesa son: cianidina-3-soforosido, cianidina-3-glucosilrutinosido, cianidina-3-glucosido, cianidina-3-sambubisido-5-rutinosido, cianidina-3-rutinosido, pelargonidina-3-glucosido y pelargonidina-3-rutinosido. Sin embargo, cianadina-3-glucósido es la antocianina que se encuentra en mayor concentración; en frambuesa representa el 80% del total (Chen *et al.*, 2013), en zarzamora puede comprender hasta 90% (Elisia *et al.*, 2007), sin embargo la composición de estos compuestos varía en función del cultivar.

4.4.2 Firmeza. La firmeza es uno de los parámetros que se toman en cuenta para los productos que se comercializan en fresco. Algunos autores la definen como uno de los parámetros primarios que componen la textura (Robbins y Sjulín, 1986). Un fruto firme es menos susceptible a los daños mecánicos, sobre todo cuando la comercialización implica que sea manipulado por el transporte o bien almacenado por algunos días.

Robbins y Sjulín (1986), reportaron la firmeza en diferentes estados de madurez de los frutos de frambuesa. En las etapas iniciales (cuando ya está presente el color rojo, pero 25-75% de la superficie continúa verde) fue de 2.94 N, en la etapa denominada de madurez (100% del fruto amarillo-rojizo a rojo) de 2.03 N y cuando el fruto estaba en proceso de maduración (100% de la superficie roja a rojo-

púrpura) se registraron 1.17 N. Sin embargo, existen diferencias de firmeza entre cultivares (1.09 N cv. ‘Chilcotin’ y 2.39 N en cv. ‘Glen Prosen’) aun cuando se determina la firmeza en la misma etapa (denominada en su estudio como ‘madurez’). En esta esta misma etapa se midió la firmeza de 11 cultivares, los valores registrados estuvieron entre 1.56 N en el cv. ‘Willamette’ y 2.01 N en el cv. ‘Centennial’ (Robbins and Sjulín, 1989).

Robbins y Moore (1991) reportan el valor promedio de los frutos de 78 accesiones de frambuesa (1.40 N) e indican que las características morfológicas que más influencia tienen en la firmeza de los frutos son peso, altura y número de drupelas, sin embargo otros factores como: variaciones en la madurez, condiciones climáticas al momento de cosecha, estado hídrico del fruto, sitio de producción o la localización del fruto en la planta, influyen en mayor proporción.

4.4.3 Tamaño. El tamaño es otro parámetro de calidad externa de los frutos. En frambuesa, comúnmente se expresa por el número de frutos que pueden caber en un recipiente (‘clamshell’) con capacidad para 200 g (Cuadro 1).

Cuadro 1. Clasificación de los frutos de frambuesa por tamaño.

Calibre	No. de frutos/clamshell
Más de 105 frutos	Bajo (pequeño)
80-104	Medio
Menos de 80	Grande

4.5 Calidad interna

4.5.1 Acidez/Sólidos Solubles. La aceptación de los consumidores depende en gran manera de la dulzura (relación acidez/dulzura), sabor y aroma. Tal aceptación se ve afectada por un sabor atípico producido por el poco desarrollo de la acidez (Robbins and Sjulín, 1986). Un alto contenido de azúcares en los frutos de frambuesa es generalmente deseable para el consumo en fresco y la industria, pero sin el apropiado balance de ácidos, la fruta puede percibirse como blanda e insípida. Por lo que el

contenido de sólidos solubles totales (expresado en grados Brix), acidez titulable (en porcentaje de ácido cítrico) y pH, son parámetros que comúnmente se emplean para evaluar la calidad interna de los frutos (Leposavić *et al.*, 2013).

4.5.2 Compuestos volátiles en frambuesa. El aroma de los frutos también es un componente de la calidad de los frutos ya que puede contribuir a la aceptación, o bien al rechazo de los consumidores. Muchos de los compuestos que le dan el olor y sabor característico a los frutos y que pueden servir como atrayentes o repelentes de los polinizadores y herbívoros (Pichersky and Gershenzon, 2002), se vinculan a los volátiles. Su determinación se puede realizar con microextracción en fase sólida (Steffen y Pawliszyn, 1996). Investigaciones recientes prueban que algunos de ellos pueden aportar al valor nutracéutico de los frutos (Janakiram *et al.*, 2008).

En frambuesa los compuestos volátiles principalmente comprenden: ésteres, alcoholes, aldehídos, cetonas, lactonas, terpenoides y apocarotenoides (Figura 8) (El Hadi *et al.*, 2013). Se han determinado al menos 200 compuestos de esta naturaleza. Algunos como cetonas de frambuesa, α -ionona, β -ionona, linalool, (*Z*)-3-hexenol, geraniol, nerol, α -terpineol, Furaneol, hexanal, β -ocimene, 1-octanol, β -pinene, β -damascenona, etil 2-metilpropanoate, (*E*)-2-hexenal, heptanal y benzaldehído contribuyen al aroma (Cuadro 2) (Klesk *et al.*, 2004). De los anteriores, se ha sugerido que β -ionona es uno de los principales componentes (Larsen and Poll, 1990).

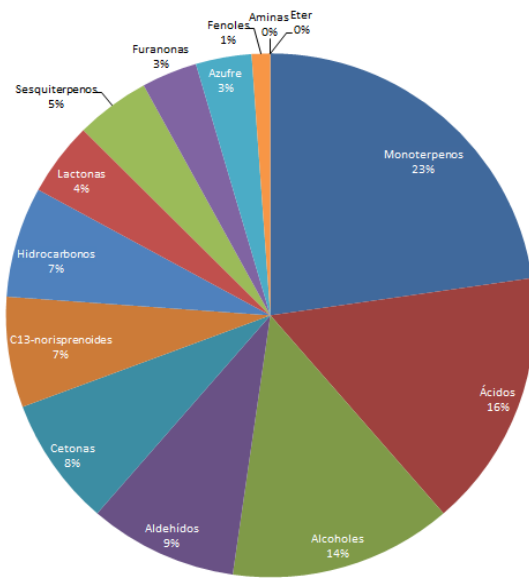


Figura 8. Compuestos volátiles reportados en frutos de frambuesa, de acuerdo a su clasificación química. (Aprea *et al.*, 2015).

Cuadro 2. Compuestos volátiles determinados en frambuesa

Compuesto	Cualidad
Etil-propanoato	Frutal
Etil-2-metilpropanoato	Frutal
Metil-butanoato	Frutal, dulce
α -pinene	Resina
β -ocimene	Herbáceo
hexanal	Hierba, pasto
Linalool	Floral, cítrico
Etil-butanoato	Frutal, manzana
Etil-2-metilbutanoato	Frutal, dulce
β -damascenona	Baya, dulce, floral
Nerolidol	Madera, floral
Geraniol	Rosa, floral
β -ionona	Almendra-seca, floral
α -ionona	Baya, cereza, madera, violeta
α -terpineol	Floral, herbal
Furaneol	Caramelo
Benzaldehído	Frutal, cereza

Wang *et al.*, 2005.

Sin embargo, las emisiones de compuestos volátiles son variables entre genotipos, tanto cualitativamente como cuantitativamente. Aunque todas las plantas son capaces de emitir compuestos volátiles orgánicos, el contenido y composición de estas moléculas muestran la variación genotípica y

plasticidad fenotípica, que explican las diferencias en sabor que son tan comunes entre cultivares (Forney, 2000).

Múltiples investigaciones en cultivares de frambuesa confirman la alta variación en el perfil de volátiles por cultivar (Malowicki *et al.*, 2008; Aprea *et al.*, 2010; Cappellin *et al.*, 2013), que no sólo se refleja en la percepción sensorial, si no que contribuye a la susceptibilidad y resistencia a patógenos. Por ejemplo, se ha destacado el potencial de los monoterpenos y sesquiterpenos en la inhibición del moho gris en frambuesa (Cappellin *et al.*, 2013).

Honkanen *et al.* (1980) realizaron una comparación de volátiles en variedades silvestres y cultivadas indicaron que en éstas últimas, los ácidos volátiles (especialmente acético y hexanóico) fueron menores que en las silvestres. También, algunos cultivares presentaron compuestos que no se observaron en el resto de los cultivares.

Por lo anterior, es importante la caracterización de estos compuestos dentro de los programas de mejoramiento. Además se destaca la relevancia de ampliar el conocimiento en la contribución que tienen los volátiles en los mecanismos de defensa de la planta (Aprea *et al.* 2010). También las diferencias que se presentan en las emisiones de compuestos volátiles sirven para la clasificación de variedades, incluso en igual ambiente de producción y manejo (Cappellin *et al.*, 2013).

4.6 Factores que influyen sobre la calidad externa, interna y contenido de volátiles

Mazur *et al.* (2014) indicaron que el genotipo y la época de cosecha influyen significativamente en características como: contenido de materia seca, pH, sólidos solubles y acidez titulable, aunque las variaciones estacionales dependen del cultivar que se esté estudiando, dado que algunos genotipos mostraron mayor variación que otros. Y señalaron a la temperatura y a la precipitación como posibles elementos climáticos con influencia sobre estas características de los frutos. Cabe mencionar que destacan la dificultad de puntualizar el efecto de cada elemento del clima, en experimentos conducidos en hábitats naturales.

El color es una característica determinada por el genotipo. Chen *et al.* (2013) indicaron que la composición de antocianinas puede considerarse como un factor de clasificación de variedades, debido a que el factor genético influye significativamente en la composición de fito-químicos y la capacidad antioxidante. Además que los frutos más oscuros tuvieron más antocianinas (2-20 veces más) que las variedades más claras y que el contenido de flavonoides fue significativamente mayor en las variedades de color más intenso.

Resultados obtenidos por Doumett *et al.* (2011), sugieren que la altitud ejerce influencia sobre azúcares y composición de ácidos orgánicos, los cuales se incrementan en las altitudes mayores (900 msnm). Sin embargo no encontraron efecto de altitud sobre los metabolitos secundarios o capacidad antioxidante.

Se han observado diferencias en volátiles, tanto por época como por método de cultivo, dichas variaciones se explican por la respuesta que tienen las plantas a estímulos externos, la cual es regulada según el genotipo (Paterson *et al.*, 2013). Diferentes climas y sitios de producción, pueden afectar la actividad y los niveles de precursores de enzimas lo que repercute en el desarrollo del sabor de los frutos (Forney *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2005). Malowicki *et al.*, (2008) observaron que las condiciones de crecimiento influyen más sobre los volátiles (más que localidad de producción). En algunas especies, se aumentan las emisiones de isopreno cuando se presentan altas temperaturas, ya que estos compuestos están envueltos en mecanismos de termo-protección. En frambuesa, se sugiere que los monotepenos y los terpenos se emiten en mayor proporción cuando las temperaturas de crecimiento de las plantas desciende (Aprea *et al.*, 2010). Igualmente conforme el fruto va madurando y va cambiando de color, la concentración de los volátiles se incrementa; compuestos como, α - y β -iononas, aparecen cuando los frutos comienzan a madurar, ya que no se encuentran en frutos verdes (Forney, 2001; Robertson *et al.*, 1995).

Asimismo las condiciones de manejo post-cosecha afectan a estos compuestos. De tal forma que después de 96 h de almacenamiento, se encontraron diferencias cualitativas y cuantitativas de los compuestos volátiles; los componentes aromáticos que presentaron mayores diferencias fueron terpenos y cetonas. De igual manera, un factor determinante es la temperatura a la que se mantienen los frutos después de ser cortados que afectan tanto la calidad como los volátiles (Giuggioli *et al.*, 2015).

También, el proceso industrial de las frutas influye sobre la composición y contenido de volátiles. Por ejemplo, cuando se maceran los frutos de frambuesa aumentan compuestos como hexanal, trans-2-hexanal y cis-3-hexanal, sin embargo en el procesamiento para la preparación de jugos, estos compuestos disminuyen (Aprea *et al.*, 2009).

Los factores que influyen en la calidad de los frutos también pueden intervenir en la producción de metabolitos secundarios, considerados de alto beneficio para los consumidores. Como se mencionó anteriormente, en la actualidad se producen y consumen mayor cantidad de berries. Este incremento, en parte se debe a la concientización de la población mundial para aumentar la ingesta de productos que contrarresten el riesgo de desarrollar enfermedades crónico-degenerativas (Kalt, 2005). Estudios epidemiológicos han comprobado que alimentos de origen vegetal pueden prevenir enfermedades cardiovasculares, cáncer y enfermedades neurodegenerativas (Tomás-Barberán, 2003). Especialmente se ha dado énfasis a sustancias como los polifenoles, por su bioactividad.

4.7 Polifenoles en berries

Los polifenoles (también conocidos como sustancias o compuestos fenólicos), son metabolitos secundarios de las plantas que poseen en su estructura al menos un anillo aromático al que está unido uno o más grupos hidroxilo (Mercado-Mercado, 2013). Constituyen un grupo numeroso de sustancias que incluyen familias de compuestos con estructuras diversas (Figura 9) (Tomás-Barberán, 2003).

Estos compuestos tienen numerosas funciones, que son parte de un arreglo de defensa en las plantas, para su sobrevivencia ante las amenazas ambientales, con distintas propiedades estructurales y funcionales (Reyes *et al.*, 2007).

Por ejemplo, los tejidos vegetales tienen sistemas naturales antioxidantes para regular la producción de especies reactivas de oxígeno que resultan de la cascada de reacciones durante el metabolismo celular normal o bien inducido por el estrés, ya que contribuyen a la defensa de las plantas al estrés oxidativo (Reyes *et al.*, 2007).

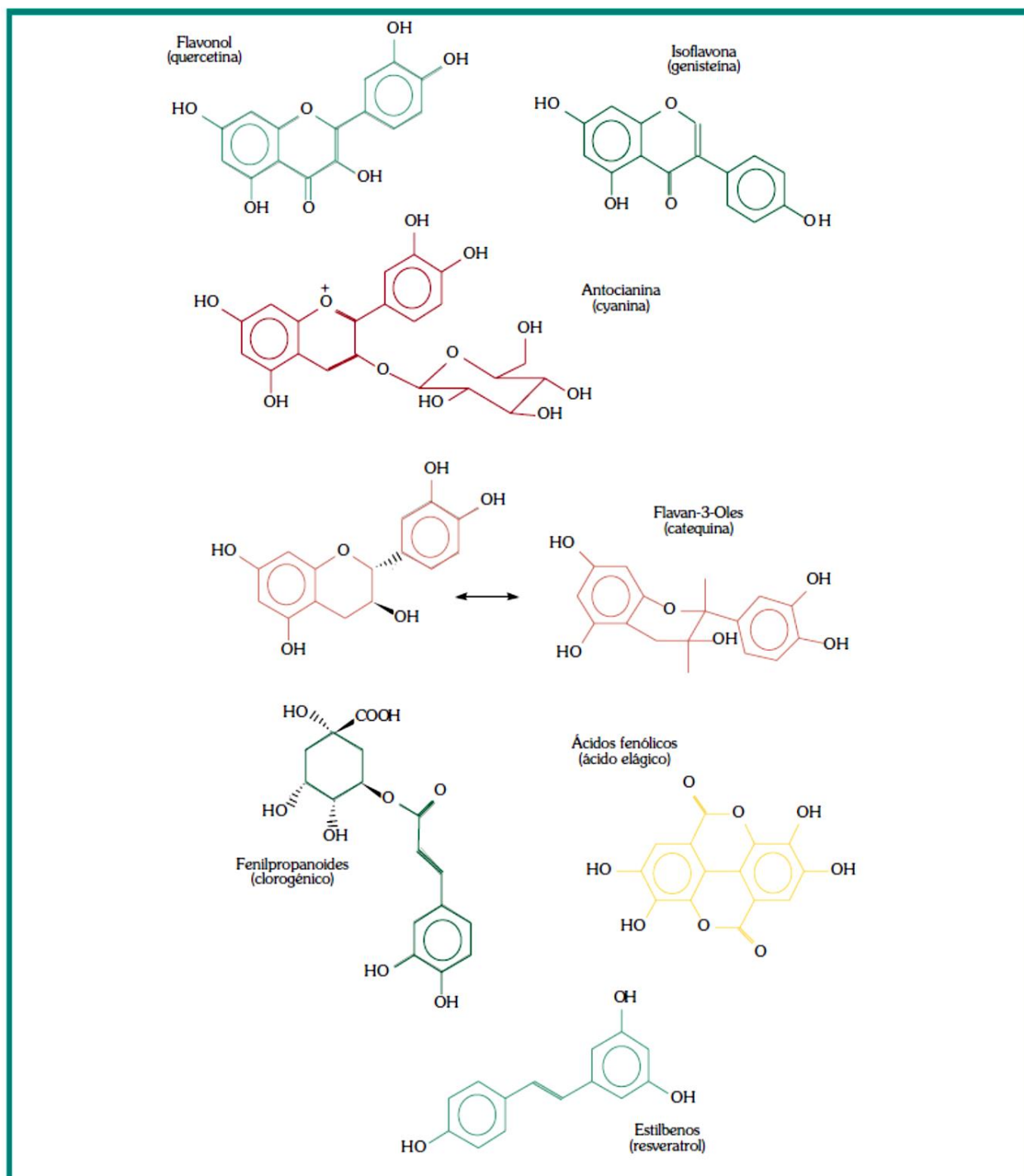


Figura 9. Principales grupos de polifenoles en alimentos (Tomás-Barberán, 2003).

Los antioxidantes impiden que otras moléculas se unan al oxígeno, al reaccionar e interactuar más rápido con los radicales libres del oxígeno y las especies reactivas del oxígeno que con el resto de las moléculas presentes, en un determinado microambiente (membrana plasmática, citosol, núcleo o líquido extracelular). La acción del antioxidante es de sacrificio de su propia integridad molecular para evitar alteraciones de moléculas (lípidos, proteínas, ADN y otros) funcionalmente vitales o más importantes. Actúan como eliminadoras (scavengers), con el objetivo de mantener el equilibrio prooxidante/antioxidante a favor de estos últimos (Venereo Gutiérrez, 2002).

4.7.1 Efecto benéfico de los polifenoles en la salud. Estos compuestos se encuentran en altas concentraciones en los tejidos vegetales, son componentes importantes de la calidad como, apariencia y sabor y tienen diversos efectos positivos sobre la salud humana. (Seeram, 2008; Seeram *et al.*, 2006; Mass *et al.*, 1991).

4.7.1.1 Actividad Antioxidante. Los avances en el estudio de los radicales libres, estrés oxidativo y su participación en el desarrollo de enfermedades, han permitido identificar sus mecanismos de acción; así como el de moléculas con capacidad de inhibir o modular sus efectos en la célula. Y se ha propuesto que la dieta rica en antioxidantes puede prevenir o disminuir el deterioro celular y funcional del organismo, generado por el exceso de estrés oxidativo (Sánchez-Valle y Méndez-Sánchez, 2013).

El estrés oxidativo se da de manera natural por el daño molecular de los lípidos, proteínas y ADN del cuerpo. Inevitablemente ocurre a consecuencia del ambiente, la respiración mitocondrial es el principal contribuyente, cuando se da una incompleta reducción del oxígeno (Kalt, 2005). El cuerpo humano posee sistemas que protegen las moléculas celulares del daño que provocan en el cuerpo las especies reactivas de oxígeno (ROS) o los radicales libres (sistemas antioxidantes compuestos de enzimas antioxidativas que incluyen glutatión peroxidasa (GPx), superóxido dismutasa (SOD), y catalasa) (Lassen *et al.*, 2008). Los radicales libres son producidos en gran cantidad de procesos fisiológicos. Cuando estos mecanismos de defensa son insuficientes para proteger a las células del daño severo que produce el estrés oxidativo, se requieren medios auxiliares, como los antioxidantes para complementar las deficiencias en el sistema. La insuficiencia de mecanismos de defensa antioxidantes están asociados a las patologías de desórdenes crónicos como son, enfermedades cardiovasculares, inflamación y diabetes (Paredes-López *et al.*, 2010).

Beneficios en la salud se reportan cuando un producto de consumo tiene una alta capacidad antioxidante total y alto contenido de fenoles. Dada la alta capacidad antioxidante de las frambuesas, consumirlas significa ingerir una alta cantidad de sustancias antioxidantes que neutralizan los radicales libres (Milivojević *et al.*, 2011).

La capacidad antioxidante depende de características estructurales como el número disponible de grupos hidroxilo. Por lo tanto, la capacidad antioxidante dependerá de los compuestos que estén presentes en los tejidos analizados (Reyes *et al.*, 2007).

4.7.1.2 Afecciones hepáticas. Choi *et al.* (2015), realizaron un estudio que mostró el efecto que tienen los extractos de semillas de frambuesas negras sobre la disminución de ROS en modelos *in vivo*. Para lo cual indujeron daño hepático en ratones, con sobredosis de acetaminofén. Sus resultados sugieren que los ácidos fenólicos y la quercetina contenidos en el licor de semillas de frambuesa tienen potencial terapéutico sobre la hepatotoxicidad.

4.7.1.3 Anticancerígeno. El daño al ADN es un pre-requisito para la iniciación del cáncer, y los agentes que reducen este daño son útiles en la prevención de esta enfermedad. Aiyer *et al.* (2008) evaluaron la habilidad de los frutos de berries, y ácido elágico (fitoquímico contenido en las berries), para reducir el daño oxidativo endógeno del ADN. Sus resultados sugieren que la frambuesa roja y el ácido elágico reducen este daño, mediante mecanismos que implica el incremento en la reparación del ADN.

4.7.1.4 Otros. El ácido elágico de las frambuesas, reduce el síndrome de abstinencia de nicotina (Pérez-Pastén *et al.*, 2006).

Uno de los polifenoles de gran interés, contenido en los frutos de berries, es el ácido elágico, ya que es un compuesto inhibidor de la carcinogénesis (Daniel *et al.*, 1989). A continuación se abordará en mayor detalle.

4.7.2 Ácido Elágico. Es el principal compuesto fenólico en ‘berries’ (Williner *et al.*, 2002) y es considerado un importante fito-químico. Se forma a partir de los elagitaninos, compuestos fenólicos

solubles en agua, de alto peso molecular y se concentran en las vacuolas, su hidrólisis produce ácido hexahidroxidifenico (HHDP), el cual se reordena espontáneamente en ácido elágico (Seeram, 2008) (Figura 10).

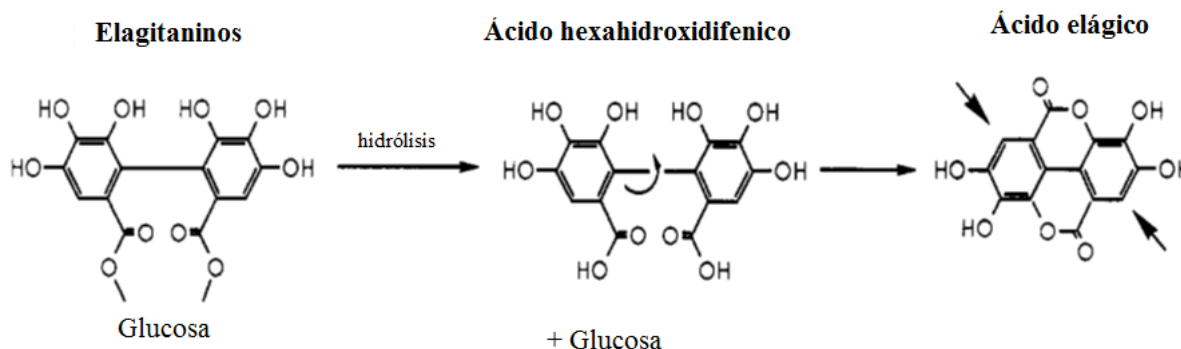


Figura 10. Formación del ácido elágico a partir de elagitaninos (Wilson y Hagerman, 1990).

Algunos autores afirman que la biosíntesis de los elagitaninos comienza con el acoplamiento de una molécula de ácido gálico a un núcleo de glucosa formando 1-*O*-galoilglucosa. La formación de elagitaninos es el resultado de la oxidación molecular de los residuos de galoil-*t*-pentagaloil glucosa, generando de este modo la formación de HHDP, que es la unidad básica de los elagitaninos (Aguilar González, 2015).

El ácido elágico se forma mediante la oxidación y dimerización del ácido gálico. Se han postulado dos rutas para la formación del ácido gálico; a través de B-oxidación del fenilpropanoide y a través de la dehidrogenación del ácido shikímico (Figura 11) (Mass *et al.*, 1991). Sin embargo, Mass *et al.* (1991) dicen que la posible ruta de síntesis, en frutos de fresa sea la de fenilalanina hacia ácido cinámico, vía ácido fenilacético.

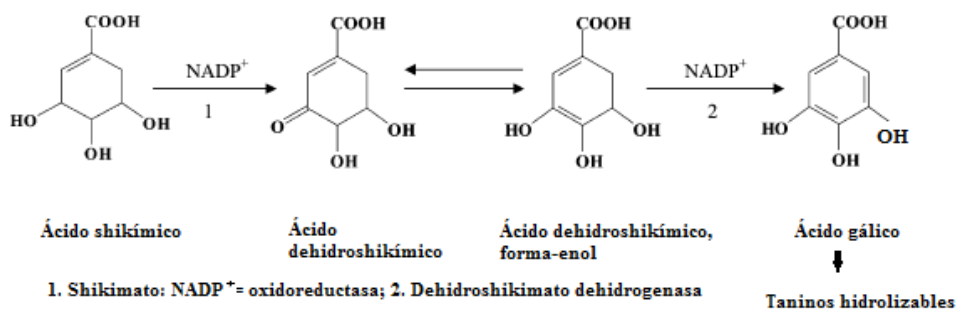


Figura 11. Conversión enzimática del ácido shikímico y dehidroshikímico hacia ácido gálico, a partir del cual se forman los elagitaninos (Modificado de Ossipov *et al.*, 2003).

El ácido elágico es de particular interés desde el punto de vista nutracéutico, especialmente como anticarcinogénico y antimutagénico (Daniel y Stoner, 1991; Mass *et al.*, 1991). Se encuentra naturalmente en diversas especies de plantas, especialmente frutos y nueces. Sin embargo, las berries contienen más ácido elágico que distintas clases de nueces (Cuadro 3).

Cuadro 3. Concentraciones de ácido elágico total en varios alimentos hidrolizados

Nombre común	Género especie	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de AE base peso seco
Fresa	<i>Fragaria ananassa</i>	630 \pm 90
Frambuesa	<i>Rubus ideaus</i>	1500 \pm 100
Zarzamora	<i>Rubus ursinus</i>	1500 \pm 140
Arándano rojo	<i>Vaccinium</i>	120 \pm 4
Nuez	<i>Juglans nigra</i>	590 \pm 1
Manzana roja	<i>Malus pumila</i>	< 100
Naranja	<i>Citrus cinensis</i>	< 100
Uva roja	<i>Vitis</i>	< 100
Kiwi	<i>Actinidia chinensis</i>	< 100

(Daniel *et al.*, 1989).

En frambuesa, el ácido elágico libre comprende sólo una mínima parte del ‘pool’ de ácido elágico total, y los elagitaninos son la principal fuente de ácido elágico liberado por la hidrólisis ácida (Anttonen y Karjalainen, 2005).

En vista de la importancia nutracéutica de este compuesto, se han desarrollado diversas metodologías para su cuantificación. En el punto 5.4 se aborda más ampliamente este aspecto.

Tanto el contenido de fenoles totales, ácido elágico, contenido de antocianinas y capacidad antioxidante varía en función de diversos elementos, que se abordan a continuación.

4.8 Factores que afectan el contenido de compuestos bioactivos

Existe una gran variedad de factores que influyen en la síntesis de los compuestos bioactivos. El ambiente (luz, temperatura y humedad), factores internos de la planta (genéticos, de madurez del fruto, localización del fruto en la planta (Rutz *et al.*, 2012), tiempo y condiciones de almacenamiento (Arancibia y Ávila *et al.*, 2012; Haffner *et al.*, 2002) técnicas de producción y otros (Anttonen y Karjalainen, 2005; Anttonen *et al.*, 2006).

Estreses provocados por los factores antes mencionados afectan la fisiología de las plantas, provocando respuestas que pueden inducir la acumulación de compuestos fenólicos y otros metabolitos secundarios (Kays, 1997). Por ejemplo, después de provocar un daño físico a los frutos de diversas especies, se aumentó la capacidad antioxidante, al mismo tiempo se observó una tendencia similar en los fenoles solubles, lo que sugiere que son éstos los que principalmente contribuyen a los cambios de la capacidad antioxidante (Reyes *et al.*, 2007).

4.8.1 Factores ambientales. Existen factores ambientales que tienen un efecto más notable que otros, sobre los polifenoles. Nikolić *et al.* (2009) resaltaron que diferencias en sus resultados, con respecto a otras investigaciones pueden explicarse por la influencia de las condiciones climáticas, en los años durante los que se llevó a cabo la investigación.

La disponibilidad de agua, calidad de luz y temperatura (factores que varían estacionalmente) se destacan por su efecto sobre ellos (Salinas-Moreno *et al.*, 2009). En fresa, las altas temperaturas incrementan el contenido de flavonoles y antocianinas (Wang and Zheng, 2001). De igual manera, cambios de temperatura, longitud del día, prácticas culturales y nutrición mineral pueden modular el contenido de ácido elágico (Williner *et al.*, 2003).

En frambuesa, el aumento de la temperatura provoca aumento en la cantidad de fenoles, flavonoides y antocianinas (Anttonen y Karjalainen, 2005).

Mazur *et al.* (2014) reportaron el promedio de contenido total de fenoles en algunos cultivares de frambuesa (234 mg ácido gálico/100g de peso fresco), sin embargo señalaron que existen variaciones de hasta 1.6 veces entre genotipos. Este contenido aumenta en los cultivares tardíos. Además

detectaron variación en este parámetro entre épocas de cosecha (años), en la composición de fenoles, antocianinas y contenido de quercitina.

De igual manera, Anttonen y Karjalainen (2005), analizaron el efecto del cultivar y del ambiente sobre los compuestos fenólicos. Identificaron influencia significativa del genotipo sobre fenoles totales (192-359 mg/100 g de peso fresco) y ácido elágico (38-118 mg/100 g de peso fresco). Indicaron que sobre dichos compuestos influye la época y sitio de producción, dado que las condiciones de crecimiento de una planta (luz, temperatura y suelo) afectan la composición de compuestos fenólicos en frambuesa, pero que cada cultivar responde de diferente manera a tales cambios.

4.8.2 Factor Genético. En diversas investigaciones se destaca la influencia del genotipo sobre la concentración de polifenoles, antocianinas y ácido elágico (Chen *et al.*, 2013; Bobinaité *et al.*, 2012; Häkkinen and Törrönen, 2000). Esto principalmente porque los mecanismos de defensa, producto de la respuesta de las plantas a factores externos, varían en función del cultivar, por lo que el contenido de compuestos fenólicos difiere cuantitativamente y cualitativamente entre especies y entre genotipos dentro de la misma especie (Reyes *et al.*, 2007).

En el estudio realizado por Chen *et al.* (2013) se muestra claramente que las variedades influyen significativamente en la composición de fito-químicos y la capacidad antioxidante de las frambuesas. Compuestos como las antocianinas puede ser un buen indicador clasificatorio de variedades; por lo tanto, la determinación de estos parámetros pueden indirectamente evaluar el beneficio potencial a la salud, lo cual sugiere que los mejoradores y los desarrolladores de productos pueden usar el contenido de polifenoles totales, y contenido total de antocianinas como parámetro de selección de variedades con alta capacidad antioxidante y beneficios biológicos, para cumplir con las demandas de los consumidores.

Conocer las diferencias en contenido de compuestos fenólicos por variedad permite seleccionar aquellos materiales para mejoramiento. Ya que es posible incrementar sus propiedades nutraceuticas sin disminuir productividad (Milivojević *et al.*, 2011).

4.8.3 Manejo agronómico. Las diferentes prácticas de manejo pueden influir en la cantidad y tipo de fenoles. Por ejemplo, Ordidge *et al.* (2009) plantean que el tipo de plástico de los macrotúneles,

empleado en algunos sistemas de producción, puede afectar la concentración de estos compuestos fitoquímicos, en este caso la intensidad de la radiación solar influye en su concentración.

De igual manera se ha observado que las dosis de fertilización pueden provocar diferencias en los compuestos fenólicos. Anttonen *et al.* (2006) reportaron que el contenido de flavonoides y ácido elágico se incrementa cuando se emplean dosis bajas de fertilización. Estos mismos autores recalcan el efecto del manejo (acolchado, túnel, fertilización, fecha de plantación), genotipo y ambiente de producción; sin embargo, también destaca que el orden de los frutos en la planta, influye sobre el contenido de este polifenol, encontrándose menor contenido en los frutos de orden primario (los que se localizan en las puntas) y aumenta en los frutos más cercanos a la base.

4.9 Mejoramiento en ‘berries’

Los objetivos del mejoramiento más importantes en frambuesa son: obtener genotipos con altos rendimientos, frutos grandes de buena calidad y con facilidad de ser cosechados, además que las variedades generadas tengan resistencia a plagas y enfermedades. El tamaño de los frutos está considerado uno de los más importantes componentes del rendimiento, por lo que son preferidos por el mercado en fresco, además de que se facilita para la cosecha manual (Nikolić *et al.*, 2009).

Algunas de las características que se emplean para evaluar la productividad en las plantas de frambuesa son número de frutos en las ramas laterales del tallo, número de órganos reproductivos, peso de los frutos, número de brotes productivos en la planta, entre otras. Estas características difieren en gran manera y están determinadas por el genotipo y dependen de las condiciones ambientales durante el crecimiento (Evdokimenko, 2009).

Actualmente la investigación a nivel mundial en el mejoramiento de ‘berries’ está encaminado a aumentar la producción y calidad, además de producir frutos con alto contenido de compuestos bioactivos (Bobinaité *et al.*, 2012).

4.9.1 Cultivares. Las empresas dedicadas a la producción y comercialización de ‘berries’, en México, emplean varios cultivares que satisfacen las demandas del mercado internacional, en cuanto a calidad

física y organoléptica; además, esos cultivares tienen buenas características de productividad (Figura 12), con el fin de brindar ventajas competitivas a los agricultores que las establecen y que a su vez ofrezcan la posibilidad de exportar la fruta a corto plazo. Para cumplir este objetivo, las empresas realizan evaluaciones de algunos genotipos y su respuesta a las condiciones climáticas y de manejo en México. Esto les ha permitido seleccionar, establecer y comercializar aquellos caracterizados como constantes en los aspectos evaluados. Además se está realizando un importante trabajo de mejoramiento para la obtención de nuevos materiales.

Los genotipos considerados en este trabajo son conocidos por la buena calidad de los frutos (organoléptica y física), necesaria para su aceptación en el mercado y manipulación para exportación.



Figura 12. Planta de frambuesa en época de producción, Tangancícuaro, México.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Sitios de muestreo

Los sitios de muestreo corresponden a plantaciones comerciales de frambuesa seleccionadas con base a la información de los cultivares de interés, áreas de cultivo y accesibilidad de los productores (Figura 13). Se tomaron datos generales de altitud, pendiente del terreno, ubicación geográfica, condiciones de vegetación natural y orden del suelo.

Durante el primer año de muestreo se colectaron frutos en los sitios donde se tenían establecidas las variedades de interés. En el segundo año se muestrearon en sitios donde se tenía establecido el cv. 'Erika', a diferentes altitudes.

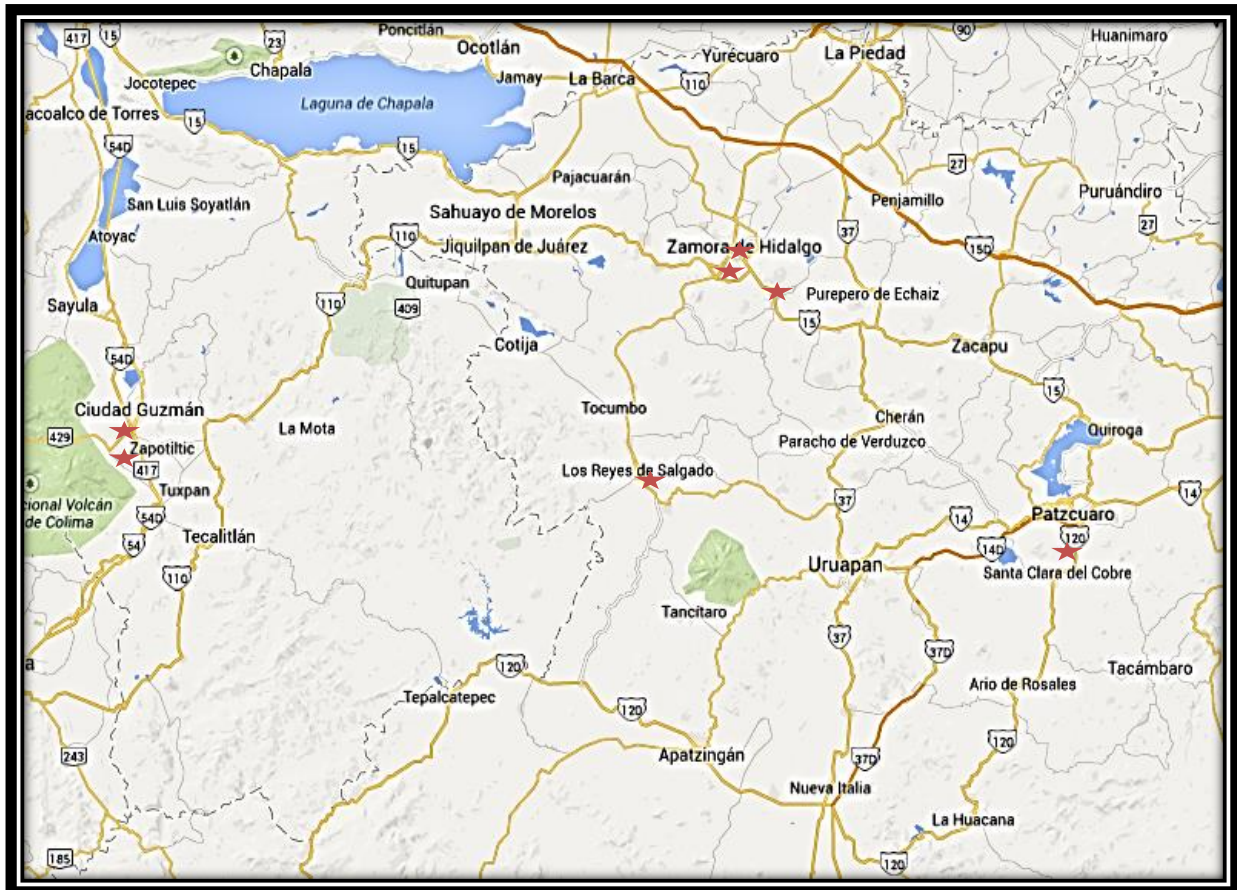


Figura 13. Localización de los sitios en los que se realizaron los muestreos.

5.1.1 Altitud y ubicación geográfica. Se determinaron mediante un receptor de sistema de posicionamiento global portátil (GPS-12 Channel. eTrex- Garmin®). La altitud se registró en metros sobre el nivel del mar (msnm). La ubicación geográfica se reportó en grados de latitud norte y longitud oeste.

5.1.2 Clima. El clima de cada uno de los sitios se reporta de acuerdo a la clasificación al sistema Köppen, modificado por Enriqueta García (2004). Los datos de temperatura y humedad relativa fueron proporcionados por el Servicio Meteorológico Nacional (SMN).

5.1.3 Suelo. Se tomaron 8 muestras de suelo en las camas donde se hizo el muestreo de fruta; y con ellas se hizo una muestra compuesta (Figura 14). Se identificó el orden de suelo (USDA, 1999) y se determinaron sus características físicas (densidad aparente, método del terrón; textura, método Boyoucos), y químicas (pH en agua, 1:2; conductividad eléctrica, en el extracto del suelo relación 1:5 con puente de conductividad eléctrica; materia orgánica, método Walkey y Black; N total, método Kjeldahl; P extractable, por espectrofotometría; CIC, con acetato de amonio 1N pH 7.0; cationes intercambiables, Ca, Mg, K y Na por espectrofotometría de absorción atómica (SEMARNAT, 2003).



Figura 14. Muestreo y formación de muestra compuesta de suelo para su análisis.

5.1.4 Fruta. Se colectaron 8 muestras de fruta (aproximadamente 50 g por planta) para formar una muestra compuesta en cada uno de los huertos (sitios). La fruta se muestreó en las fajas del huerto que medían entre 80 a 100 m de longitud. Las colectas se realizaron mensualmente en el periodo de cosecha 2013-2014 y bimestralmente en el periodo de cosecha 2014-2015. Para mantener la calidad de los frutos, las muestras se transportaron con hielo, hasta los laboratorios del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, para las determinaciones físicas, químicas, capacidad antioxidante (CA), ácido elágico (AE) y volátiles. Las propiedades pomológicas y CA se determinaron en material fresco, después de lo cual, las muestras se mantuvieron a -18°C, hasta la determinación de AE y perfil de compuestos volátiles.

Durante el muestreo del primer año, se colectaron 4 cultivares establecidos comercialmente, algunas de sus características de muestran a continuación:

5.1.4.1 ‘Adelita’. Este genotipo es uno de los cultivares desarrollados por Planasa®. Las plantas son de porte bajo y tienen facilidad de manejo por ser “primocane”, poseen un gran potencial productivo. En general, no tiene problemas importantes fitopatológicos, ni en la parte aérea, ni en el suelo. La fruta tiene buen tamaño y es atractiva visualmente, además es homogénea y se destaca por su sabor dulce ligeramente ácido. Adicionalmente tiene vida de anaquel prolongada (Planasa, 2016).

5.1.4.2 ‘Erika’. Las plantas son anuales (frutos en yemas nuevas cada año) y el rendimiento varía según la región de cultivo. El color de la fruta varía entre el naranja y el rojo, además tienen gran estabilidad en el almacenamiento y transporte por largos trayectos. El sabor se describe como “fresco y frutal”, con un contenido de sólidos solubles totales promedio de 8.6 °Bx (Figura 15) (Hargreaves plants, 2016).



Figura 15. Fruto de frambuesa cv. ‘Erika’.

5.1.4.3 ‘Lupita’. Es creación varietal obtenida por Planasa®. Las plantas son de gran porte y tienen grandes ramilletes florales, lo que significa una producción considerable. Por su rusticidad, no se han observado problemas importantes con insectos, hongos o ácaros en particular.

Los frutos se describen de tamaño medio-grande, rojo claro, muy brillante, buena consistencia y vida comercial, con sabor ‘dulce matices ácidos’ (Planasa, 2016).

5.1.4.4 ‘Polka’. Es un cultivar anual desarrollado en Polonia. El tamaño de sus frutos es grande (en promedio 6.6 g), con forma cónica regular, de color rojo medio y buena vida postcosecha, el sabor se describe como ‘limpio y afrutado’. Las pruebas de sólidos solubles totales reportan un promedio de 11.7 °Bx (Hargreaves plants, 2016).

5.2 Datos pomológicos de las frambuesas

5.2.1 Calidad externa

5.2.1.1 Color. El color de la fruta se determinó con un colorímetro Hunter Lab D25-PC2. Para calibrar el equipo se utilizó una placa blanca estándar CIE (Commission Internationale de l’Eclairage). La coordenada L* (luminosidad), puede registrar valores desde 0-100. Un valor de L*=0 indica no reflectancia (negro) y el valor más alto, L*=100, una perfecta reflectancia difusa (blanco). La escala empleada para los valores a* y b*, puede registrar valores negativos y positivos. Los valores negativos de a* indican colores verdes, mientras que los valores positivos se refieren al color rojo. Cuando los valores de b* son negativos indican un color azul y los positivos colores amarillos (Robbins and Moore, 1990).

Con ellos se calcularon los valores de croma ($C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$) y hue ($h^\circ = \arctan\left(\frac{b^*}{a^*}\right)$) (McGuire, 1992).

5.2.1.2 Firmeza (F). Se determinó con un texturómetro (Force Five), por compresión. A cada fruto se le aplicó fuerza hasta causar el cierre del orificio de la fruta que queda cuando éste se

desprende del receptáculo, y se registró el resultado en Newtons (N) (Robbins y Moore, 1991) (Figura 16).



Figura 16. Firmeza de frutos de frambuesa por compresión

5.2.2 Calidad interna

5.2.2.1 Acidez Titulable (AT). Se pesaron 10 g de fruta en un vaso de precipitados de 100 mL, se agregaron 50 mL de agua, se licuó, se registró el volumen total y se filtró. Se tomó una alícuota de 5 mL del filtrado y se agregaron 2 gotas de fenoftaleína, como indicador y se tituló con NaOH 0.1 N hasta que se observó el vire a color rosa (Garner *et al.*, 2008a). Se registró el gasto de NaOH y para calcular el porcentaje de ácido cítrico (acidez titulable) se utilizó la siguiente fórmula.

$$\% AT = \frac{((\text{mL de NaOH gastados}) * (0.1 N) * (\text{factor de ácido cítrico}) * (\text{volumen total}) * (100))}{(\text{g de muestra}) * (\text{mL de alícuota})}$$

dónde:

% AT= acidez titulable.

mL NaOH= mililitros gastados en la titulación.

N= normalidad del NaOH.

Factor del ácido cítrico= 0.064 miliequivalentes.

Volumen total= gramos de muestra licuada, más 50 mL de agua.

5.2.2.2 Sólidos solubles totales (SST). Para determinar esta variable, se extrajo el jugo de los frutos, colocándolos en una tela (tipo tergal) para comprimirlos hasta extraer el jugo. Éste se analizó en un refractómetro digital (Atago PR-32α; Brix 0~32%) (Figura 17). El contenido de sólidos solubles fue registrado en grados Brix (Garner *et al.*, 2008b).



Figura 17. Refractómetro para determinación de SST.

5.2.2.3 pH. Del filtrado que se obtuvo para determinar acidez titulable se midió el pH con un potenciómetro Beckman Φ 40 (Garner *et al.*, 2008a).

5.3 Capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante (CA) se determinó usando el radical DPPH^{*} (2,2-Difenil-1-picril-hidrazil, Sigma-Aldrich, Alemania). Esta especie, al ser reducida por un compuesto antirradical, disminuye su absorbancia (Brand-Williams *et al.*, 1995). La solución de DPPH^{*} 100 μ M se preparó empleando como disolvente metanol (MEOH) al 80%.

Las muestras se prepararon según lo descrito por Gutiérrez-Zavala *et al.* (2007). Los frutos frescos se molieron con un procesador de alimentos (Oster ® 2614 2-speed 250 Watts). Una vez homogeneizada la mezcla se pesaron 5 g en un tubo de ensaye de 10 mL y se agregaron 5 mL de agua. Los tubos se agitaron por 15 minutos en un agitador rotatorio Glas-Col (1.5 Amps, 120 Volts, 60%. Terre Haute, USA). Posteriormente se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 min (Centrífuga- Optima II, BHG). En un vial ámbar de 8 mL se colocaron 100 μ L del sobrenadante y se le agregaron 3.9 mL de la solución de DPPH^{*}, se agitó en un agitador intermitente (Vortex,

MS1 Minishaker IKA®) y se dejó en reposo durante 30 min (Kuskoski *et al.*, 2005). Posteriormente en un espectrofotómetro HP-8453 UV-visible con arreglo de diodos (Agilent, California, USA), se registró a 517 nm A_0 como valor del blanco y A_{30} como la absorbancia de las muestras (Kim *et al.*, 2002). Para calcular el porcentaje de inhibición de los radicales libres, se empleó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición del DPPH} = \frac{(A_0 - A_{30})}{A_0} * 100$$

dónde: A_0 es la absorbancia del DPPH' 100 μ M al tiempo cero y A_{30} la absorbancia de las muestras a los 30 minutos. Los resultados se reportaron como porcentaje de inhibición de radicales libres del DPPH' (Faller y Fialho, 2010).

5.4 Ácido elágico

Existen diferentes métodos que se han desarrollado para la determinación de los metabolitos secundarios con propiedades benéficas sobre la salud. Generalmente, el primer paso que se lleva a cabo para realizar dichos análisis es la extracción de compuestos contenidos en la matriz de interés. El segundo comprende la limpieza del extracto para eliminar analitos co-extraíbles; y el tercero corresponde a la determinación de los compuestos por cromatografía de líquidos o cromatografía de gases.

El procedimiento analítico más utilizado para determinar ácido elágico (AE) es la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés). En ésta los tiempos de retención de los picos cromatográficos de las muestras y los de los estándares, así como el área de cada pico cromatográfico se emplean para la cuantificación mediante una curva de calibración realizada con cantidades crecientes del analito de interés.

En el Cuadro 4 se presentan algunos métodos propuestos para la extracción del AE en frambuesa. Como se observa, se emplearon desde 0.5 g hasta 50 g de muestra y diversos disolventes, tales como: metanol (MEOH), acetato de etilo y mezclas de acetona-agua y MEOH-agua, en diferentes proporciones. El volumen del disolvente empleado osciló de 30 a 200 mL. Los aspectos anteriores son importantes al elegir la técnica de extracción, por la cantidad de

muestra disponible y el recurso económico destinado para el estudio, dado que emplear altas cantidades de solvente incrementa considerablemente el costo de los análisis.

Cuadro 4 Métodos de extracción del AE por HPLC.

Peso de muestra	Extractantes	Vol. extractante	Referencias
(g)		(mL)	
1	Acetona: H ₂ O	50	Daniel et al., 1989
0.5	MEOH [†]	50	Häkkinen <i>et al.</i> , 1998 y 1999
10	MEOH	30	Amakura <i>et al.</i> , 2000
50	MEOH	200	Zafrilla <i>et al.</i> , 2001
5	MEOH:H ₂ O (50:50, v/v)	50	Anttonen & Karjalainen, 2005
5	MEOH:H ₂ O (80:20, v/v)	50	Šavikin <i>et al.</i> , 2009
50	Acetato de etilo	60	Salinas-Moreno <i>et al.</i> , 2009
5	MEOH:H ₂ O (90:10, v/v)	50	Bobinaitė <i>et al.</i> , 2012

[†]MEOH: metanol.

Es importante mencionar que en la determinación de metabolitos hay diversos factores que se toman en cuenta, como: naturaleza del compuesto, método de extracción, tamaño de partícula, muestra y otros, por lo que, es importante realizar una revisión de los métodos que hayan sido empleados en otros estudios. El Cuadro 5 muestra las condiciones cromatográficas de las referencias del Cuadro 4.

Cuadro 5. Condiciones cromatográficas para la determinación de ácido elágico por HPLC.

Fase móvil [†]	Columna	Detección (nm)	Recuperación (%)	Curva de calibración (µg/mL)	Referencias
(A) NH ₄ H ₂ PO ₄ 30 mM en MEOH 50% (pH 3) (B) NH ₄ H ₂ PO ₄ 10 mM 30:70 (v/v)	C-18 RP (250 x 4.6mm, 5µm)	254	-	0.5 a 50	Daniel <i>et al.</i> , 1989.
(A) NH ₄ H ₂ PO ₄ 50 mM (pH 2.6) (B) H ₃ PO ₄ 0.2 mM (pH 1.5) (C) Solvente A:ACN 20:80 Gradiente	ODS-Hypersil (100 mm x 4 mm, 3.5µm)	260	82-96	1-240	Häkkinen <i>et al.</i> , 1998 y 1999.
(A) ACN (B) KH ₂ PO ₄ 5 mM (pH 2.5) 41:9 (v/v)	L-ODS (250 x 4.6 mm, 5µm)	360	90.1-97.9	0.1–100	Amakura <i>et al.</i> , 2000.
(A) Ácido fórmico en H ₂ O al 5% (B) MEOH	Lichrocart 100 RP-18 (250 mm x 4 mm, 5µm)	360	-	-	Zafrilla, <i>et al.</i> , 2001.
(A) Ácido fórmico 1% (B) ACN Gradiente	LiChroCART RP (125 x 3mm, 5µm)	260	97	-	Anttonen y Karjalainen, 2005.
(A) MeCN (B) H ₂ O (1% H ₃ PO ₄) Gradiente	LiChrospher RP-18 (250 x 4 mm, 5µm)	255	-	0-100	Savikin <i>et al.</i> , 2009.
(A) H ₂ O (pH 2.4) (B) MEOH 60% (pH 2.4) Gradiente	Spherisorb ODS (250 x 4.6 mm x 5 µm)	252	-	-	Salinas-Moreno <i>et al.</i> , 2009.
(A) CH ₂ O ₂ (B) ACN/MEOH 85:15 (v/v)	LiChroCART LiChrospher 100 RP-18 (125 x 4 mm, 5µm)	254	-	5-100	Bobinaité <i>et al.</i> , 2012.

[†]MEOH, metanol; ACN, acetonitrilo; THF, tetrahidrofurano; TFA, ácido trifluoroacético.

Como se observa, se emplearon diferentes columnas y fases móviles y la detección del compuesto se realizó de 252 a 360 nm. En cuanto a la recuperación del analito se reporta de 82% hasta 97.9%, estas variaciones están en función de la cantidad de estándar que se adiciona a la muestra. Lo anterior da una idea del alcance de las técnicas analíticas, así es deseable usar los procedimientos que reporten mayor recuperación.

Aspecto importante a determinar lo constituye la validación de la técnica, que comprende entre otros el límite de detección, el límite de cuantificación y la linealidad del método. Häkkinen *et al.* (1998) reportaron 0.1 ng/ μ L como cantidad mínima detectable de AE y respuesta lineal en el intervalo de la curva estudiado (1-240 μ g/mL). Amakura *et al.* (2000) reportaron 0.015 μ g/g como el límite de detección, y 0.05 μ g/g como el límite de cuantificación de este compuesto.

En este trabajo se empleó el método desarrollado por Amakura *et al.* (2000) con algunas modificaciones; estos autores desarrollaron un método simple y rápido, en el que se utiliza poca cantidad de muestra y de disolvente, y reportan un porcentaje de recuperación de 90-97% (Cuadros 4 y 5).

5.4.1 Reactivos y materiales. Tanto el MEOH y el acetonitrilo (ACN) utilizado en esta investigación fueron grado HPLC y se adquirieron con J. T. Baker (Estados Unidos). El HCl (34.7%) se adquirió con Fermont (México). Todos los estándares se conservaron a 4°C. El fosfato de potasio monobásico (KH₂PO₄) grado analítico fue obtenido de Merck (Naucalpan, Estado de México, México). Para limpiar los extractos se utilizaron cartuchos de extracción en fase sólida Sep-Pak Plus tC₁₈ (900 mg) (Macherey-Nagel, Cromabond, Bethlehem, PA, USA). El agua utilizada fue obtenida mediante un sistema de desionización Simplicity® UV (Millipore, Darmstadt Alemania).

5.4.1.1 Preparación de estándares. Amakura *et al.* (2000) emplearon un estándar de AE dihidratado (Wako, Osaka, Japón) disuelto en MEOH. El proveedor del estándar empleado en este estudio recomendaba disolverlo en NaOH 1M, sin embargo se formaba un precipitado. Bobinaité *et al.* (2012) usaron tetrahidrofurano y Häkkinen *et al.* (1999) dimetilsulfóxido. En esta investigación se empleó este último para la preparación de la disolución patrón, por ser menos tóxico que el tetrahidrofurano. La cuantificación del AE se realizó mediante calibración absoluta, para ello se preparó una disolución

patrón de 842 $\mu\text{g/g}$ de AE ($\geq 95\%$, Sigma-Aldrich, Alemania) en dimetil sulfoxido (99.9% ACS Meyer, México). A partir de ésta se prepararon estándares de concentración creciente (1– 20 $\mu\text{g/g}$) diluidos en metanol y preparados diariamente. Los estándares se inyectaron por triplicado (10 μL).

5.4.2 Instrumentación. Un cromatógrafo de líquidos Waters Mod. 2695 (Massachusetts, USA), acoplado a un detector de absorbancia dual λ Waters Mod. 2487, fue utilizado para el análisis de AE. La separación se realizó en una columna ACE5 C₁₈ de 5 μm (150 x 4.6 mm d. i.) acoplada a una pre-columna de la misma fase estacionaria, ambas ACE (Aberdeen, Escocia). El análisis se realizó en modo isocrático, la determinación se efectuó a una longitud de onda de 360 nm y la temperatura del horno a $40 \pm 2^\circ\text{C}$. Como fase móvil se usó ACN y KH_2PO_4 5 mM (pH 2.5) 82:18 (v/v) a un flujo de 1 mL/min. El procesamiento de los datos se realizó con el Software Empower 2 (Built 2154-Waters, 2005).

5.4.3 Extracción de ácido elágico. En un matraz balón de 100 mL, se pesaron 10 g de frutos molidos previamente descongelados y homogeneizados; se agregaron 30 mL de MEOH y se reflujo 1 h (Figura 18). Posteriormente la muestra se filtró al vacío (papel filtro Whatman No. 2) y se lavó con 10 mL de agua. Fue necesario realizar una segunda filtración al observarse partículas en suspensión (Figura 19).



Figura 18. Reflujo de muestras de frambuesa.



Figura 19. Filtrado de la muestra al vacío en embudos Büchner.

Posteriormente se evaporó el MEOH en un rotavapor a 70°C y 140 rpm (Hahn Shin Scientific Co. Mod. HS-2001NS), quedando aproximadamente 10 mL (Figura 20). A continuación a la fase acuosa, se le agregó 100 μ L de HCl 0.1M. Inmediatamente se procedió a realizar la limpieza del extracto en cartuchos de extracción en fase sólida, procedimiento que consta de 4 pasos básicos y que se describe a continuación.



Figura 20. Concentración de muestra en el rotavapor.

5.4.3.1 Extracción en fase sólida

5.4.3.1.1 Acondicionamiento del cartucho

Para realizar la extracción en fase sólida se emplea un sistema de filtración al vacío como el que se muestra en la figura 21.



Figura 21. Acondicionamiento del cartucho con MEOH y H₂O.

En el primer paso de la extracción en fase sólida se emplean disolventes para equilibrar y limpiar el lecho. El cartucho C₁₈ utilizado en esta investigación se acondicionó agregando 10 mL de MEOH, a continuación y sin dejar secar el cartucho, se agregaron 10 mL de agua.

5.4.3.1.2 Adición de la muestra

Ya acondicionado el cartucho y mediante una pipeta Pasteur se adicionó todo el extracto que contenía tanto el AE como sustancias co-extraídas (Figura 22).

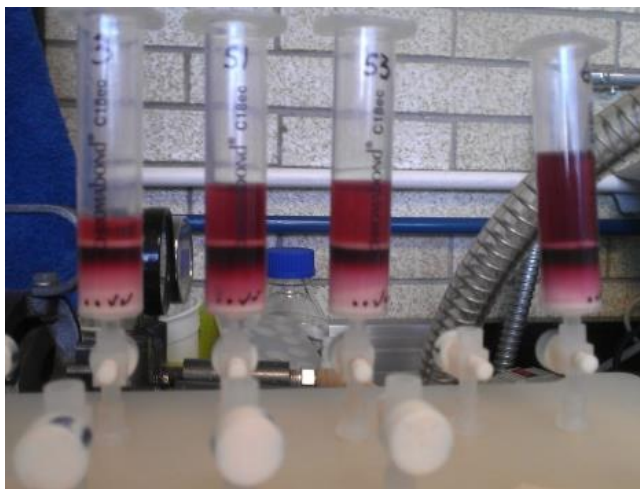


Figura 22. Adición del extracto a los cartuchos Sep-Pak Plus tC₁₈.

5.4.3.1.3 Lavado de la muestra

Después de pasar la muestra por el cartucho, las sustancias interferentes se eluyeron con 10 mL de agua, mientras que los analitos de interés permanecieron en el lecho adsorbente. Posteriormente se eliminó el resto de agua retenida en el cartucho mediante vacío.

5.4.3.1.4 Elución del analito

Finalmente, el AE ya concentrado y purificado se eluyó con 10 mL de MEOH (Figura 23). Con una pipeta Pasteur se adicionó al matraz del rotavapor y se evaporó a sequedad (Figura 24).

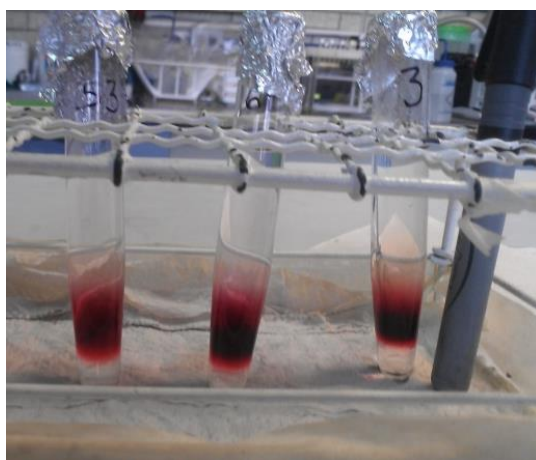


Figura 23. Eluato colectado.



Figura 24. Eluato evaporado a sequedad.

Posteriormente, el eluato evaporado se re-disolvió con MEOH, se trasvasó con una pipeta Pasteur en un matraz aforado de 10 mL y se enrasó con la finalidad de obtener datos precisos (Figura 25), a

diferencia de la redisolución con 5 mL de MEOH propuesta por Amakura *et al.* (2000). Los resultados se reportaron en $\mu\text{g/g}$ de AE base peso fresco (PF).



Figura 25. Eluato enrasado a 10 mL.

Previa inyección automática en el cromatógrafo, el eluato se filtró en un acrodisco (Titan3, 17 mm, 0.2 μm , Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos), y se colocó en un vial de 1.8 mL con tapa *pre-slit* (Waters) (Figura 26). Al igual que los estándares, todas las muestras se inyectaron por triplicado (10 μL).

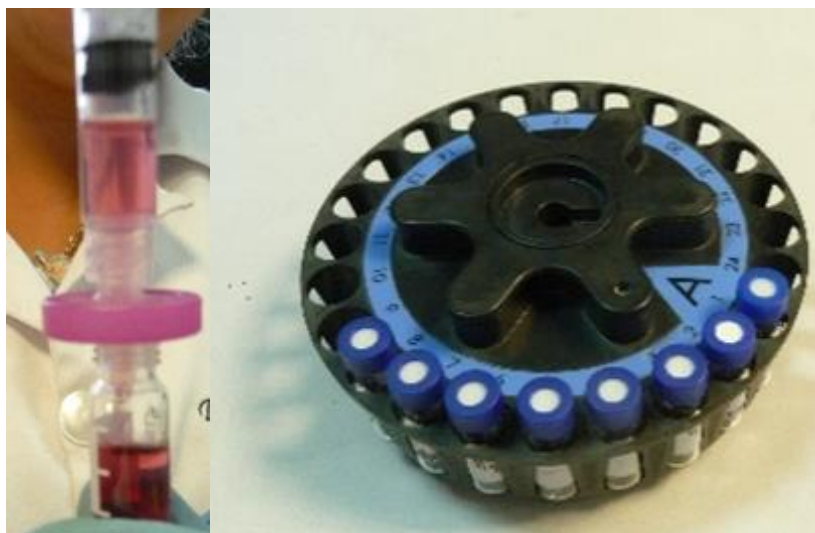


Figura 26. Eluato filtrado en los acrodiscos y puesto en viales.

5.5 Pruebas preliminares

5.5.1 Determinación analítica. Primero se inyectó un estándar de AE de 3.047 $\mu\text{g/g}$ en el cromatógrafo, para determinar su tiempo de retención (Figura 27), y posteriormente una muestra real (Figura 28) para determinar el tiempo de análisis cromatográfico y asegurar que no se quedaran compuestos retenidos en la columna y así evitar presencia de picos fantasma en cromatogramas posteriores.

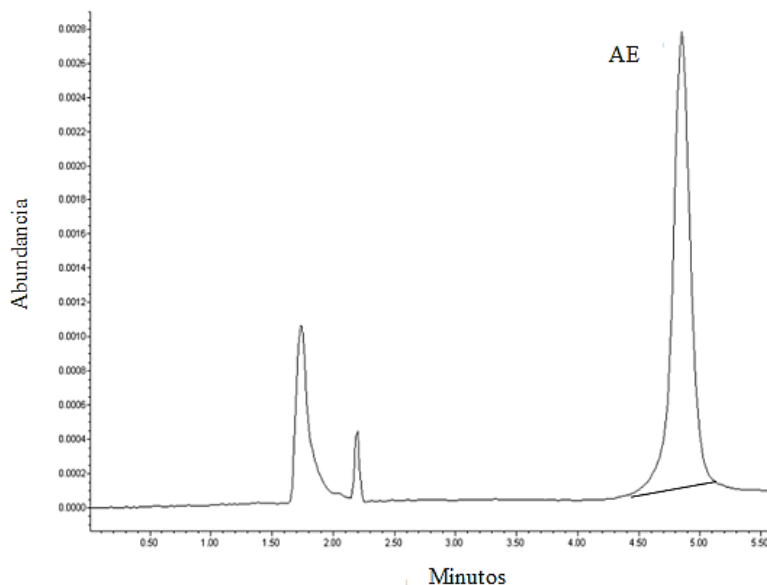


Figura 27. Cromatograma de un estándar de AE de 3.047 $\mu\text{g/g}$, t_R 4.8 \pm 0.13 (n=24).

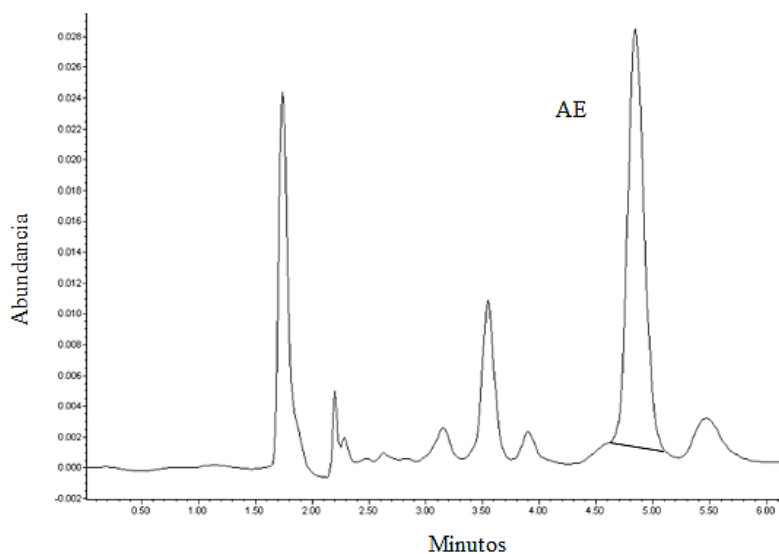


Figura 28. Cromatograma de un extracto de frutos de frambuesa cv. 'Erika' de Sta. Clara del Cobre, Michoacán, México. Condiciones de análisis, descritas en el punto 5.4.

Como ya se ha mencionado, la validación de la metodología analítica es sumamente importante, sin embargo, por el tiempo disponible para esta investigación solamente se evaluaron la repetibilidad y la recuperación del método.

5.5.2 Repetibilidad del método. Cuando un método se utiliza por primera vez por un analista, hay que evaluar la variación de los resultados con el método empleado, antes de usarlo en la totalidad de las muestras (FAO, 1996). En este trabajo, a una muestra de la variedad ‘Erika’ proveniente del Rancho ‘La Laguna’, Cd. Guzmán, Jalisco, se le realizó la extracción y análisis por triplicado en el HPLC.

5.5.3 Evaluación de la Recuperación. La tarea de recuperación de un analito es complicada, sobre todo en matrices naturales, como los frutos por su alta actividad enzimática, lo cual requiere aún más cuidado en el proceso de extracción, de tal manera que no se generen cambios químicos del metabolito que se analiza (Antolovich *et al.*, 2000), y permita que los resultados sean precisos (+++++). Esto último forma parte del control de calidad en los análisis, ya que refleja la exactitud de los datos que se obtienen. Las recuperaciones pueden comprender entre el 50 y 110% con coeficientes de variación menores a 15% (FAO, 1996).

En esta investigación, la recuperación se evaluó en muestras de concentración conocida de AE que oscilaban de 2.4- 5.6 µg/g. Una vez realizada la extracción a las muestras se les adicionó entre 3-6 µg/g de AE. El extracto ya fortificado se pasó a través del cartucho de extracción en fase sólida, como ya se describió en el punto 5.4.3.1.

Una vez evaluada la recuperación y la repetibilidad, se inició el procesamiento de todas las muestras.

5.6 Perfil de compuestos volátiles en frambuesa

Hasta donde se sabe, en México no hay reportes de los compuestos volátiles en las variedades establecidas de frambuesa en las principales regiones productoras, por lo que se determinó el perfil de compuestos volátiles en esta especie en cuatro cultivares mediante microextracción en fase sólida (SPME, por sus siglas en inglés) y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. A

continuación se describen tanto los materiales como el proceso empleado para el análisis de dichos compuestos.

5.6.1 Muestras. Se analizaron frambuesas de los siguientes cultivares: Adelita (A), Erika (E), Lupita (L) y Polka (P).

5.6.1.1 Preparación de la muestra. Para la extracción de compuestos volátiles se utilizó el método empleado por Tiitinen *et al.* (2006), con algunas modificaciones. En un horno de microondas, se descongelaron \approx 50 g de frambuesa por 20 segundos. Se trituraron en un mortero y homogeneizaron; posteriormente se filtró en una tela (tipo tergal) para obtener el jugo.

5.6.2 Materiales. Se empleó una fibra de polidimetilsiloxano (PDMS, Supelco) de 100 μm , acondicionada de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Se utilizaron viales de rosca HS, (del inglés headspace) de 20 ml, con un septo de PTFE (politetrafluoroetileno).

5.6.3 Determinación de volátiles. En el método propuesto por Tiitinen *et al.* (2006) se sugiere el uso de un matraz Erlenmeyer y 20 g de jugo, sin embargo, dado que no se menciona el volumen, en el presente estudio se emplearon viales Headspace (“espacio de cabeza”) de 20 mL, en los cuales directamente se pesaron 8 g de jugo previamente homogeneizado. El vial tapado se dejó en reposo 20 minutos para alcanzar el equilibrio de las fases. Los autores sugieren un tiempo de exposición de la fibra de 40 min., pero al aumentar la adsorción a 90 min se observó un incremento en la proporción de los compuestos. Por lo tanto, la aguja del holder se introdujo al vial a través del septo y se expuso la fibra durante ese tiempo (Figura 29). Posteriormente se retrajo y se inyectó inmediatamente al cromatógrafo. Previo al inyectado de las muestras, se analizaron blancos de la fibra y del vial.

5.6.4 Instrumentación. El análisis de los compuestos volátiles se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 5975A, acoplado a un detector selectivo de masas 5975C. Se utilizó una columna HP-5ms (30 m x 0.25 mm, 0.50 μm).



Figura 29. Exposición de la fibra al espacio de cabeza, después del equilibrio de fases.

Tanto la temperatura del inyector (modo splitless 2 min) como la del detector fue de 250 °C. La rampa de temperatura empleada fue la siguiente: 35 °C durante 12 min, 10 °C min⁻¹ hasta 105 °C, 1 °C min⁻¹ hasta 135 °C y 20 °C min⁻¹ hasta 230 °C y se mantuvo esta temperatura por 5 min (Tiitinen *et al.*, 2006). Los compuestos se monitorearon en modo scan (m/z 40-350). Para desorber los compuestos de la fibra, ésta se introdujo en el inyector durante 10 min (Figura 30).



Figura 30. Desorción de compuestos volátiles en el cromatógrafo

5.7 Análisis estadístico

El análisis estadístico que permitió observar diferencias significativas de las variables dependientes, se basó en un modelo de regresión lineal (Weisberg, 2005). Las respuestas de interés se transformaron a logaritmo o raíz cuadrada con el fin de satisfacer las suposiciones del modelo. Se utilizó un método

de selección de variables (stepwise con criterio SBC) para identificar las variables independientes más influyentes (covariables) sobre las variables dependientes, y así lograr modelos simples que permiten una mejor interpretación. Con ellas, se ajustó un modelo para cada variable de interés, mediante el procedimiento GLIMMIX del software SAS 9.4 (Copyright © 2002-2012 by SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), con el propósito de determinar diferencias entre los promedios por ‘variedad’, ‘fecha de muestreo’, altitud y ciclo de producción. La separación de medias se hizo mediante la instrucción: LS-means de GLIMMIX con las opciones “lines” y “adjust= Tukey”, para asignar ‘letras’ automáticamente y facilitar la comparación de medias, además controlar el problema de multiplicidad. Las covariables asumieron su promedio aritmético para la separación de medias.

Para determinar el efecto que tienen las variables independientes temperatura (T, °C) y humedad relativa (HR, %) en las características físicas y químicas de la frambuesa, se realizó un análisis de regresión simple mediante el procedimiento REG del software SAS 9.4. La relación entre una variable respuesta de interés y HR o T la resume la pendiente de la regresión simple, y su significancia se evalúa mediante las hipótesis: $H_0: \beta_1 = 0$ versus $H_a: \beta_1 \neq 0$. Si H_0 se rechaza a un $\alpha=0.1$, se concluye que la HR o T, según sea el caso, tiene un efecto significativo en la variable dependiente.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Sitios de muestreo

En cada sitio de muestreo se registró la localización y se determinaron características del suelo, para considerarlas en el análisis estadístico como covariables. La caracterización de los sitios y los cultivares disponibles en ellos se presentan en el Cuadro 6.

Como puede observarse, los sitios se localizaron en altitudes desde 1277 msnm (Zapotiltic, Jalisco) hasta 2480 msnm (Sta. Clara del Cobre). Mosiño (1974) comenta que los factores del clima son altitud, orografía, distribución de tierras y aguas, corrientes marinas y tormentas, en orden de importancia. Considerando las diferencias de altitud por sitios, se observan diferencias en las condiciones agroclimáticas, entre las localidades de observación. Esto se confirmó con la temperatura promedio mensual, calculada con datos proporcionados por el Servicio Meteorológico Nacional. En la figura 31 se observa que Zamora, Cd. Guzmán y Jocotepec tuvieron las temperaturas promedio más altas, y Sta. Clara la más baja.

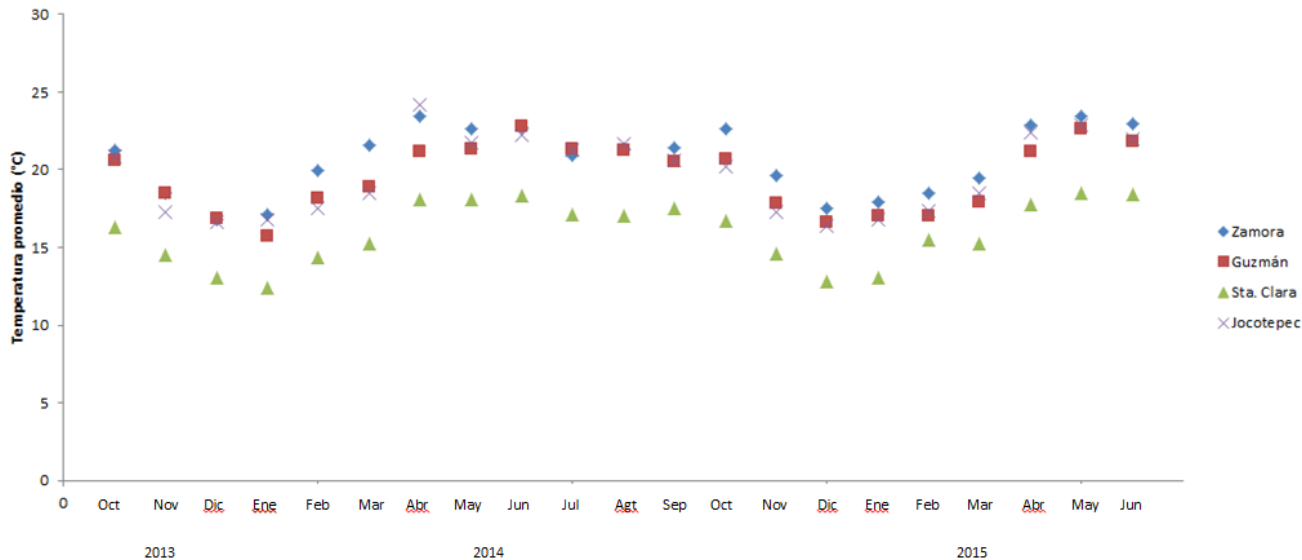


Figura 31. Temperatura promedio durante los meses de muestreo (Octubre, 2013- Junio, 2015)

Cuadro 6. Descripción de los sitios de muestreo de frambuesa y características del suelo.

Sitio	Ubicación	Alt [†] msnm	cvs	Orden del suelo	Textura	pH	Da g cm ⁻³	CE dS m ⁻¹	CIC meq 100g ⁻¹	MO %	P K		Clima
											mg kg ⁻¹		
Municipio, Estado, Huerto													
Zamora, Mich., Las Águilas	20°01'28.5"N 102°16'36.5"W	1568	Adelita Lupita Polka	Vertisol	Arcillosa	7.2	1.1	0.34	42	4.72	66.25	1053	((A) C (w0))
Salvador Escalante, Mich., Araucarea	19°22'58.3"N 101°37'45.1"W	2413	Erika	Andisol	Franco	5.6	0.9	0.18	36.8	8.8	6.18	234	Cwb
Tangancicuaro, Mich., R. Castilla	19°52'47.2"N 102°13'52.7"W	1808	Erika	Vertisol	Arcillosa	6.6	0.9	0.10	41.3	4.04	6.83	507	((A) C (w ¹) (w)bi)
Tangancicuaro, Mich., Castilla	19°52'59.2"N 102°13'42.8"W	1748	Erika	Vertisol	Arcillosa	7.1	1.0	0.19	48.8	2.9	10.34	741	((A) C (w ¹) (w)bi)
Tangancicuaro, Mich., El Pejo	19°51'07.7"N 102°12'23.6"W	1748	Erika	Molisol	Arcillosa	6.8	1.0	0.53	20.7	4.98	20.86	546	((A) C (w ¹) (w)bi)
Tangancicuaro, Mich., El llano	19°50'50.7"N 102°12'34.3"W	1746	Adelita	Molisol	Arcillosa	6.8	1.0	0.13	25.2	4.04	6.6	507	((A) C (w ¹) (w)bi)
Jacona, Mich., Tamándaro	19°56'46.2"N 102°16'54.8"W	1608	Adelita Lupita	Vertisol	Arcillo- arenosa	7.2	1.1	1.25	40.4	4.1	48.17	585	((A) C (w0))
Los Reyes, Mich., El Establo	19°34'32.7"N 102°29'11.4"W	1297	Erika	Vertisol	Franco- arcillo- arenosa	7.2	1.1	0.64	46.2	3.0	53.83	546	((A) C (w ¹) (w)bi)
Atecucario, Zamora, Mich., Las Moras	20°03'33"N 110°13'26.2"W	1631	Adelita Lupita	Molisol	Arcillosa	6.9	1.0	0.16	22	1.2	11.43	468	((A) C (w0))
Zapotiltic, Jalisco, Los 35.	19°07'38.5"N; 103°24'10.5"W	1277	Erika	Entisol	Franco- arenoso	6.4	1.0	0.10	24.4	1.0	52.69	351	((A) C (w0))
Cd. Guzmán, Jal., La Laguna	19°45'30.4"N 103°27'29.2"W	1513	Erika	Entisol	Franco- arcillo- arenosa	7.6	1.1	0.18	20.2	1.8	78.05	702	((A) C (w0))
Jocotepec, Jal., Los Gigantes	20°15'56.7"N 103°26'43.0"W	1567	Erika	Vertisol	Arcillo- arenoso	6.8	1.2	0.32	38.3	1.7	78.05	975	((A) C (w0))
Zapotitán, Jocotepec, Jal., Agromexza	20°19'02.3"N 103°28'33.4"W	1600	Erika	Vertisol	Arcillosa	6.7	1.1	0.22	33.9	2.4	46	663	((A) C (w0))

[†]Alt., altitud; cvs., cultivares; Da, densidad aparente; CE, conductividad eléctrica; CIC, capacidad de intercambio de cationes; MO, materia orgánica; P, fósforo; K, potasio

En cuanto a las condiciones de humedad de los sitios, la figura 32 muestra la humedad relativa durante los meses en los que se muestrearon los frutos. Se puede apreciar que la localidad de Sta. Clara, Michoacán, tuvo la mayor humedad en casi todos los meses. Cabe aclarar que en los análisis de regresión, los elementos temperatura y humedad relativa fueron considerados como covariables en la selección de variables (este procedimiento permite la identificación de las covariables que más influencia tienen en las variables respuesta). Además los elementos arriba mencionados caracterizan la definición del clima de un sitio. Como resultado, cada sitio o localidad observados tiene su propio clima, tal como se puede apreciar en el Cuadro 6.

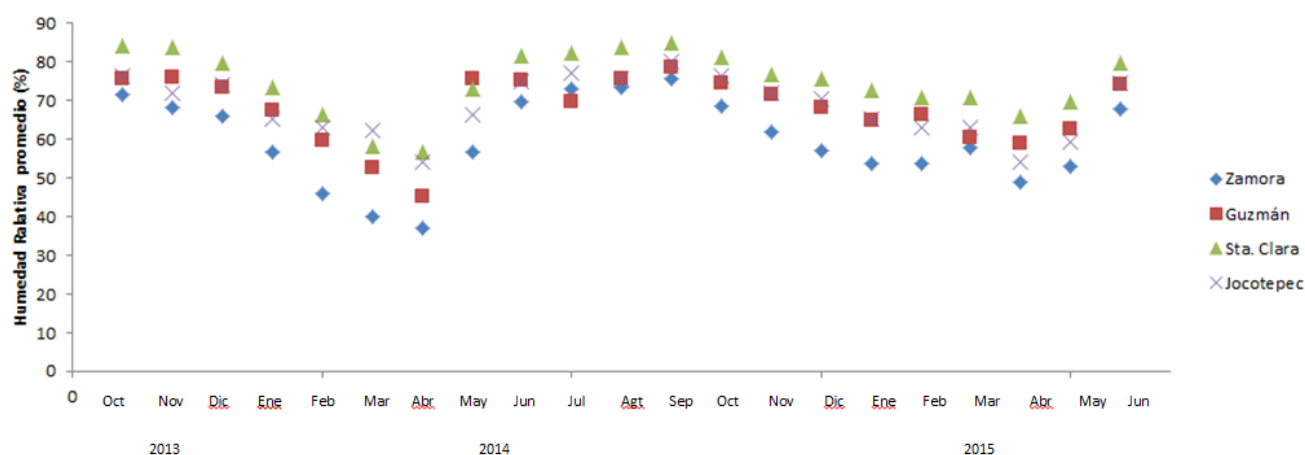


Figura 32. Humedad relativa promedio durante los meses de muestreo (Octubre, 2013- Junio, 2015).

6.2 Ciclo de producción 2013-2014

6.2.1 Muestreo de los cultivares ‘Adelita’, ‘Erika’, ‘Lupita’ y ‘Polka’.

6.2.1.1 Selección de variables. Para lograr la identificación de los factores más influyentes en la explicación de las variables respuesta en el contexto de regresión lineal múltiple, se utilizó el procedimiento conocido como Selección de Variables. Las características intrínsecas de sitios y cultivar, así como la fecha de los muestreos, se tomaron como factores potencialmente determinantes en la explicación de las variables respuesta. El Cuadro 7 muestra la lista de algunas covariables consideradas en la selección de variables (filas de la tabla), para la temporada de cosecha del ciclo 2013-2014. Como resultado, para cada respuesta estudiada (columnas de la tabla) se presentan las covariables que sí tienen efecto significativo en ellas.

Por ejemplo, la variable de color a* depende fuertemente de las covariables temperatura, precipitación y de los cultivares. Conclusiones similares se pueden obtener para las otras variables que fueron estudiadas. Una vez construidos los modelos se realizaron las comparaciones de medias para determinar el efecto de la época de muestreo y de los frutos del cultivar en el ciclo productivo 2013-2014.

Cuadro 7. Variables respuesta en función de las covariables más importantes.

Var.Ind.	Variable dependientes										
	L*	a*	b*	C*	h*	F	AT	SST	pH	CA	AE
Intercepto	3.15	4.22	3.06	3.14	2.35	1.16	1.42	2.34	1.33	4.41	2.05
Temperatura	-	-0.03	-	-	0.03	-	-	-	-	-	-
Precipitación	-	-0.00	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Humedad	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Altitud	-	-	-0.00	-	-	-	-	-	-	0.00	-
cv.	Adelita	-	0.17	-	0.22	-	-	-	-	-	-
	Erika	-	0.23	-	0.25	-	-	-	-	-	-
	Lupita	-	0.31	-	0.36	-	-	-	-	-	-
	Polka	-	0.00	-	0.00	-	-	-	-	-	-
S	Molisol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-0.35
	Entisol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.03
	Vertisol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.00
	CE	-	-	-	-	-	0.07	-	-	-	-
	N	-	-	-	-	-	-	0.05	-	-	-
	K	-	-	-0.11	-	-	-	-	0.09	-	-
	Na	-	-	-	-	-	-	-	-0.19	-	-
M	Oct	-	-	-	-	-	0.00	0.00	0.00	-	-
	Nov	-	-	-	-	-	-0.00	-0.25	-0.09	-	-
	Dic	-	-	-	-	-	0.06	-0.23	-0.09	-	-
	Feb	-	-	-	-	-	-0.11	0.02	-0.04	-	-
	Mar	-	-	-	-	-	-0.08	0.06	0.13	-	-
	Abr	-	-	-	-	-	-0.22	0.06	-0.01	-	-
	May	-	-	-	-	-	0.06	0.05	-0.04	-	-
	Jun	-	-	-	-	-	0.01	0.59	-0.10	-	-

†a*, (rojo (+)/verde (-)); coordenada b* (amarillo (+)/azul (-)); F, firmeza; AT, acidez titulable; CA, capacidad antioxidante; AE, ácido eláxico; SST, sólidos solubles totales. Var. Ind., variables independientes. cv., cultivar. S, Características del suelo del sitio de colecta: N, nitrógeno total; CE, conductividad eléctrica; K, potasio intercambiable; Na, sodio intercambiable; M, mes de muestreo (octubre 2013-junio2014).

6.2.1.2 Efecto de época de muestreo. Se observaron diferencias estadísticas significativas entre los meses de muestreo (Cuadro 8). Esto indica que la época de cosecha tiene influencia en las características físicas y químicas de la fruta, incluido AE, pero no en la capacidad antioxidante de la fruta.

Distintos factores pueden influir en las características físicas, químicas, capacidad antioxidante y contenido de AE. Los elementos ambientales como luz, temperatura, amplitud del día y precipitación, varían de acuerdo a la época de cosecha y pueden provocar diferencias en las características físicas, el contenido de ácidos fenólicos, flavonoides y taninos como lo señalan Robbins y Moore (1991), Wang *et al.* (1993), Anttonen *et al.* (2006), Milivojević *et al.* (2011) y Mazur *et al.* (2014). Anttonen y Karjalainen (2005) mencionan que en la frambuesa las condiciones de luz, temperatura y suelo afectan el crecimiento y la composición de los fenoles en la fruta.

Cuadro 8. Efecto de la época de muestreo en las variables físicas y químicas⁺.

Mes	F (N) ^r	SST (°Bx) ^{log}	AT (%) ^r	pH del fruto ^r	CA ⁺⁺ (%) ^{log}	AE (μg g ⁻¹ PF ⁺⁺⁺) ^r
Oct	1.04±0.06 b	10.72±0.08ab	2.12±0.06abc	3.83±0.07ab	65.08±0.18a	4.43±0.14ab
Nov	1.34±0.08ab	8.05±0.03 b	2.06±0.02abc	3.45±0.00 b	62.67±0.11a	3.10±0.17ab
Dic	1.55±0.03ab	8.25±0.02 b	2.29±0.01a	3.47±0.01 b	60.57±0.04a	2.63±0.12ab
Feb	1.11±0.04 b	10.33±0.01ab	1.80±0.03 bc	3.66±0.00 b	59.95±0.07a	2.04±0.10 b
Mar	1.20±0.06ab	10.90±0.02a	1.86±0.03 bc	4.35±0.00a	60.44±0.11a	3.07±0.13ab
Abr	1.45±0.01ab	10.62±0.02ab	1.57±0.03 c	3.75±0.00 b	62.90±0.07a	3.02±0.14ab
May	1.27±0.07ab	10.18±0.05ab	2.39±0.02a	3.64±0.01 b	61.62±0.07a	2.81±0.08ab
Jun	1.83±0.05a	10.96±0.05a	2.22±0.03ab	3.42±0.00 b	62.11±0.11a	4.70±0.13a

⁺ Medias con letras diferentes son estadísticamente diferentes ($\alpha=0.05$). La separación de medias fue realizada con los datos en escala logarítmica (log) o raíz cuadrada (r). Los datos se presentan en la escala en que fueron medidos. Las letras asignadas fueron determinadas mediante la instrucción lines en el comando LS-means de GLIMMIX de SAS 9.4. F, firmeza; SST, sólidos solubles totales; AT, acidez titulable; CA, capacidad antioxidante; AE, ácido elágico. ⁺⁺ Porcentaje de inhibición del radical DPPH. ⁺⁺⁺ Peso fresco.

Dadas las diferencias presentes en los meses de muestreo, se determinó el efecto de la temperatura (T) y la humedad relativa (HR), en las variables evaluadas (Cuadro 9).

Cuadro 9. Efecto de temperatura (T) y humedad relativa (HR) sobre las variables pomológicas en frambuesa[†].

	F ^{††} (N)	AT (%)	SST (°Bx)	pH del fruto	CA (%)	AE μg g ⁻¹ PF
T	NS [‡]	-0.01	0.03	0.01	0.01	0.05
HR	-0.0077	NS	-0.004	NS	NS	NS

[†]Por cada aumento unitario de la T y la HR. [‡]NS: Pendiente no significativa $\alpha=0.1$. ^{††}F, firmeza; SST, sólidos solubles totales; AT, acidez titulable; CA, capacidad antioxidante; AE, ácido elálgico.

6.2.1.2.1 Firmeza.

La temperatura (T) que oscila, entre 17.5-22.8°C no tuvo efecto en esta variable. La humedad relativa (HR) sí. De lo anterior se observó que un aumento unitario de la humedad relativa, la firmeza de los frutos disminuyó en 0.0077 N. El mes de octubre fue en el que se registró mayor HR en el ambiente (72% promedio) con una firmeza de 1.04 N, y el mes de junio fue el de menor humedad (50% promedio) con una firmeza de 1.83 N. Esto indica que, de los elementos ambientales considerados, la HR tuvo mayor influencia sobre la firmeza de la fruta.

La pérdida de la firmeza, en los frutos de frambuesa se da por múltiples factores. La firmeza comienza a disminuir conforme los frutos maduran ya que se dan una serie de cambios fisiológicos (Sexton *et al.*, 1997). Kevers *et al.* (2014) comentan que otros factores climáticos, como intensidad de luz y horas luz, pueden provocar diferencias en la firmeza de los frutos y que otros elementos, como la etapa productiva de la planta, también son significativos.

6.2.1.2.2 Sólidos solubles totales.

Los valores de SST señalan el porcentaje de sólidos de la materia seca que quedan en suspensión al extraer el jugo de la fruta. En las evaluaciones estadísticas realizadas para determinar la significancia de los factores T y HR sobre el contenido de SST (Cuadro 9), se encontró que tanto la temperatura como la humedad relativa son factores que influyen sobre esta característica ($\alpha=0.1$). La T afecta de manera positiva, es decir, cuando aumenta la T en un grado centígrado, los SST aumentan en 0.03°Bx. La HR afecta de manera negativa, por cada unidad que aumenta en % de HR hay una disminución de 0.004°Bx), lo que indica que al aumentar la HR disminuyen los SST. En los meses más fríos y húmedos (noviembre y

diciembre), los valores de SST fueron los más bajos, con un promedio de 8.15°Bx (Cuadro 8). Los mayores valores de SST se encontraron en los muestreos correspondientes a los meses de marzo y junio con un promedio de 10.93°Bx. Estos meses son más cálidos y menos húmedos. La diferencia en grados Brix de SST entre los meses cálidos y fríos fue de 2.78°Bx que representa el 25.50%.

6.2.1.2.3 *Acidez titulable y pH.*

La temperatura fue un factor que influyó sobre la acidez titulable (disminución en 0.01%, si la T sube un grado) y pH del fruto (aumento de 0.01 por unidad de ascenso de T), no así con la HR (Cuadro 9). Durante el mes de abril se tuvo el valor más bajo de AT (1.57 %), y durante el mes de marzo con T alta, el pH más alto (4.35).

Como se observó en el análisis anterior, los factores T y HR influyen en las características físicas y químicas de los frutos en distinta proporción, sin embargo, su efecto no provoca diferencias que afecten drásticamente sus características pomológicas y contenido de AE (Cuadro 9), lo que indica la estabilidad que tuvieron los genotipos en los intervalos de T y HR considerados en esta investigación. Tanto para el consumo en fresco como para la industria, los genotipos que se prefieren son aquellos que producen frutos con características estables de producción y calidad, independientemente de las condiciones climáticas (Mazur *et al.*, 2014), considerando que éstas no varían dramáticamente.

6.2.1.2.4 *Capacidad antioxidante.*

La capacidad antioxidante fue la única variable, en la que la fecha de muestreo no tuvo efecto, dado que el porcentaje de inhibición de radicales libres fue igual estadísticamente en todos los meses (Cuadro 8). Sin embargo, el análisis para determinar el efecto de las variables climáticas mostró que la temperatura es un factor que influye sobre CA (aumento de 0.01 % por cada grado de ascenso de temperatura) (Cuadro 9). El Cuadro 8 muestra que durante los meses de diciembre, febrero y marzo, los valores de CA fueron menores respecto al resto de los meses, que estadísticamente fueron no significativas.

6.2.1.2.5 Ácido elágico.

La T es un elemento climático que influye sobre el contenido de AE (aumento de 0.05 $\mu\text{g/g}$ peso fresco (PF) por cada grado que incrementa la T) (Cuadro 9). Wang y Zheng (2001) reportan que las altas temperaturas (diurnas y nocturnas) en fresa provocan aumento en el contenido de fenoles y antocianinas. De las variables físicas y químicas medidas en los frutos de frambuesa, la temperatura tuvo mayor efecto sobre contenido de AE. En el mes de febrero se registró el valor más bajo de AE (2.04 $\mu\text{g/g}$ PF) y el contenido más alto (4.70 $\mu\text{g/g}$ PF) en el mes de junio (más cálido) (Cuadro 8). Cabe mencionar que este último valor, corresponde a la fruta de la última cosecha (mes de junio). Pantelidis *et al.* (2007) observaron que en las últimas cosechas aumentó significativamente el contenido de fenoles.

Milivojević *et al.* (2011) señalan que las prácticas agronómicas que se llevan a cabo en el cultivo de frambuesa influyen notoriamente en la calidad organoléptica y física de la fruta, por lo que se tendría que considerar el efecto individual de cada factor de manejo y otros elementos climáticos sobre la composición química del fruto por las interacciones de los cultivares, el ambiente y prácticas de manejo.

6.2.1.3 Efecto del cultivar

6.2.1.3.1 Color.

Los valores de luminosidad estuvieron entre 23.40-24.62 y los de hue de 19.62-22.06. Tanto luminosidad como hue, no presentaron diferencias estadísticas significativas (Cuadro 10). Estos valores indican que los cuatro cultivares son de rojo poco intenso; tales tonos, son los colores visualmente más atractivos para los consumidores (Mazur *et al.* 2014).

En el Cuadro 10, se muestran los valores de la escala de color CIEL*a*b*, y se observa que hubo diferencias estadísticas significativas por cultivar en las coordenadas a* (21.94-31.41), b*(8.48-11.14) y chroma (23.52-33.37), aunque todos los frutos se cosecharon tomando en cuenta el color como referencia para determinar el estado de madurez. Las diferencias en esta variable confirman que el color está determinado genéticamente y es específico para cada cultivar. En frambuesa, el color, se usa para establecer el estado de madurez y frescura, aunque está definido por el genotipo y también está sujeto a cambios durante el desarrollo y

maduración. Un incremento en la intensidad del color significa que hay cambios en el estado de madurez de la fruta, los cuales influyen en el número y concentración de componentes fitoquímicos, como las antocianinas (Krüger *et al.*, 2011; Stavang *et al.*, 2015).

Conforme disminuyen los valores de L* se espera que el color del fruto sea más oscuro; asimismo, los colores intensos se observan cuando se registran valores bajos de a* y b* (se observaría un color menos rojo y más azul), si los tres valores (L* a* y b*) son bajos, chroma y hue, serán bajos. Aunque después de un periodo de almacenamiento pueden disminuir significativamente, en relación a los materiales frescos, las diferencias por cultivar se mantienen (Krüger *et al.*, 2011). Puede observarse que los cultivares ‘Polka’ y ‘Lupita’, en la escala CIEL*a*b*, son diferentes en color entre ellos (Cuadro 10).

Cuadro 10. Efecto del cultivar en el color de los frutos de los estados de Michoacán y Jalisco, México.

Cultivar	Color ⁺				
	L*	a*	b*	Chroma ⁺⁺	Hue
	Coordenadas ¹				
Erika	23.60±0.03a	27.59±0.02ab	11.07±0.04ab	29.95±0.02ab	22.06±0.05a
Lupita	23.95±0.04a	31.41±0.02a	11.14±0.03a	33.37±0.02a	19.62±0.04a
Polka	24.62±0.04a	21.94±0.08 b	8.48±0.08 b	23.52±0.08 b	21.21±0.02a
Adelita	23.40±0.02a	27.59±0.04ab	9.85±0.03ab	29.32±0.04ab	19.94±0.03a

⁺ Medias con letras diferentes son estadísticamente diferentes ($\alpha=0.05$). La separación de medias se realizó en escala logarítmica en todos los parámetros de color, sin embargo los resultados se presentan con los datos sin transformar.

¹Valores correspondientes a las coordenadas del sistema CIEL*a*b (L* (luminosidad, 0-100); a* (rojo (+)/verde (-)); b* (amarillo (+)/azul (-)).

⁺⁺ Valores calculados: chroma ($C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$); hue ($h^\circ = \arctan\left(\frac{b^*}{a^*}\right)$).

6.2.1.3.2 Variables pomológicas.

En el Cuadro 11 se observa el efecto de los cultivares sobre el resto de las variables evaluadas. Se puede destacar que CA, F, AT, SST y pH, no tuvieron diferencias estadísticas significativas, lo cual indica que los frutos presentaron características similares. El mercado de frutos en fresco exige elevados estándares de calidad, sobre todo cuando se trata de productos destinados a la exportación. Lo cual ha obligado a los productores a establecer cultivares que cumplan con tales esquemas, para poder acceder al mercado.

La firmeza es una característica importante del fruto, puesto que se relaciona con la resistencia para el empaquetado y vida de anaquel. La firmeza puede estar influenciada por otros factores morfológicos como tamaño y número de las drupelas, y profundidad de la cavidad del receptáculo; dichas características están determinadas genéticamente (Robbins y Moore, 1991). No se observaron diferencias por cultivar en la firmeza, esto puede indicar que los materiales tienen características morfológicas parecidas que además sirvieron para seleccionar aquellos genotipos que satisfacen las normas de exportación y las preferencias de los consumidores.

Cuadro 11. Efecto del cultivar en las variables físicas y químicas de la frambuesa cultivada en los estados de Michoacán y Jalisco, México⁺.

Cultivar	F (N) ^r	AT (% de acidez) ^r	SST (°Brix) ^{log}	pH del fruto ^r	CA ⁺⁺ (%) ^{log}	AE (µg g ⁻¹ PF ⁺⁺⁺) ^r
Erika	1.41±0.03a	1.94±0.02a	10.37±0.02a	3.75±0.01a	61.58±0.01a	3.69±0.07a
Lupita	1.48±0.04a	2.07±0.05a	9.43±0.05a	3.57±0.01a	60.54±0.01a	3.13±0.14ab
Polka	1.00±0.04a	2.05±0.03a	11.03±0.05a	3.92±0.04a	65.83±0.03a	3.02±0.21ab
Adelita	1.36±0.03a	1.98±0.03a	9.34±0.03a	3.66±0.01a	61.31±0.01a	2.26±0.07 b

⁺ Medias con letras diferentes son estadísticamente diferentes ($\alpha=0.05$). La separación de medias fue realizada con los datos en escala logarítmica (log) o raíz cuadrada (r). Los datos se presentan sin transformar. F, firmeza; SST, sólidos solubles totales; AT, acidez titulable; CA, capacidad antioxidante; AE, ácido eláxico. ⁺⁺Porcentaje de inhibición del radical DPPH. ⁺⁺⁺Peso fresco.

Los resultados de acidez titulable (AT) estuvieron entre 1.94-2.07% y SST de 9.34-11.03 °Bx. Estas características pueden variar ampliamente entre cultivares. Stavang *et al.* (2015) señalan que al estado correcto para la cosecha del cv. ‘Glen Ample’, los frutos cumplen con las siguientes características: 9.95% de sólidos solubles y 2.7% de acidez titulable. Los valores de acidez, en este primer muestreo, estuvieron un poco más altos que los reportados por estos autores en esta etapa de madurez (es decir, la etapa óptima de cosecha); sin embargo, de Ancos *et al.* (1999) mencionan que frutos con un bajo pH y alta acidez titulable, están relacionados con mejores características de color.

6.2.1.3.3 Capacidad antioxidante.

Los porcentajes de capacidad antioxidante estuvieron entre 60.54% (‘Lupita’) y 65.83% (‘Polka’). Estos resultados no mostraron diferencias estadísticas entre variedades. Una

comparación de la capacidad antioxidante en diferentes tipos de ‘berries’ se menciona que la frambuesa presentó $51.23 \pm 0.38\%$ y que sólo fue superada por cereza (*Prunus virginiana*) que reportó $78.86 \pm 0.54\%$ (Li *et al.*, 2009). En el cv. Polka se han reportado valores de CA de $42.2 \pm 2.3\%$ (Bobinaité *et al.*, 2012). Los resultados obtenidos muestran que todos los cultivares tuvieron porcentajes de CA mayores a 60, por lo que se pueden considerar satisfactorios en la inhibición de radicales libres. La capacidad antioxidante puede variar en función del tipo de compuestos fenólicos contenidos en el fruto, la regulación de la síntesis de éstos puede alterar, su cantidad y calidad, pues cada tipo de sustancia tiene una capacidad antioxidante específica debido a su estructura química (Rice-Evans *et al.*, 1997). El tipo y cantidad de compuestos presentes en las plantas depende del genotipo y del estado de desarrollo.

6.2.1.3.4 Ácido elágico.

Fue la única variable que estuvo influenciada por el cultivar (Cuadro 5). Se encontró que Adelita y Erika son diferentes estadísticamente en esta característica. Estos resultados concuerdan con distintos autores que señalan que el genotipo es el factor más influyente en la cantidad de polifenoles en ‘berries’ (Siriwoharn and Wrolstad, 2004; Anttonen y Karjalainen, 2005; Pantelidis *et al.*, 2007; Çekiç y Özgen, 2010; Milivojević *et al.*, 2011; Bobinaité *et al.*, 2012; Mazur *et al.*, 2014).

Sin embargo también se observaron variaciones por época de cosecha (Cuadro 8) que afectan la expresión de los genotipos, en cuanto a la concentración de AE. Existen diferentes situaciones tales como intensidad de luz, temperatura, deficiencias de agua, daños físicos, entre otros, que pueden estimular el metabolismo secundario y de esta manera provocar una mayor síntesis de compuestos fenólicos, como mecanismo de defensa y protección de las plantas, en todas ellas la enzima fenilalanina amoniliasa (PAL) desempeña un papel importante en la producción de fenoles, puesto que se ha observado mayor síntesis de dichos compuestos cuando hay un aumento en su actividad; aun así, su activación es diferente en modo y proporción, según la especie debido a las variaciones genéticas (Reyes *et al.*, 2007; Faller y Fialho, 2010).

Los procedimientos y condiciones de extracción, determinación e hidrólisis que se emplean para determinar los diferentes compuestos que se encuentran en las matrices biológicas son muy diversos, de tal manera que no es posible hacer una comparación con trabajos en donde se han empleado técnicas distintas. Los elagitaninos pueden ser hidrolizados y formar hexahidroxidifenol, el cual forma el ácido elágico. Muchas investigaciones han determinado el contenido de AE después de una hidrólisis, ácida o alcalina, lo que aumenta el contenido de ácido elágico reportado pues se ha provocado el rompimiento de los elagitaninos. Con 20 h de hidrólisis ácida, se reportaron 122.4 mg·100g⁻¹ de AE en el cv. ‘Norna’ (Bobinaité *et al.*, 2012), a diferencia de Mullen *et al.* (2002) que reportaron 3.5 nanomoles/g empleando un método más simple (metanol acidificado).

El AE puede reportarse como el ácido elágico libre, que comprende una parte del AE total, por lo que una hidrólisis incompleta se reflejaría en una menor cantidad del compuesto. Incluso, algunos autores señalan la importancia de considerar o no a las semillas en la extracción y cuantificación, ya que también contienen cantidades importantes del compuesto. Pero ello requiere contar con homogeneizadores de 20000 rpm para triturarlas semillas. Asimismo las determinaciones pueden realizarse en frutos frescos o secos, lo cual debe especificarse (Siriwoharn y Wrolstad, 2004; Bobinaité *et al.*, 2012).

Con el método de determinación empleado en este trabajo para frambuesa fresca, Amakura *et al.* (2000) reportaron 4 µg g⁻¹ de AE libre; este método fue desarrollado con el fin de determinar el AE en frutos frescos y procesados, de una manera simple y rápida con una recuperación del analito de 90.1-97.9 % (Amakura *et al.*, 2000). En esta investigación se obtuvieron valores entre 2.26 µg/g en el cv. ‘Adelita’ (valor más bajo) y 3.69 µg/g en el cv. ‘Erika’ (valor más alto), lo cual indica que los cultivares evaluados, producidos en México, son una buena fuente de AE.

Cabe resaltar que aunque existieron diferencias en el contenido de AE por cultivar, no hubo diferencias estadísticas en la capacidad antioxidante, esto indica que este compuesto influye en la actividad inhibidora de radicales libres, pero no es el compuesto más determinante sobre dicha capacidad, dado que las sustancias fenólicas en los diferentes cultivares tienen diversos grados de contribuciones a la actividad antioxidante. Los fenoles pueden presentar distintas

actividades biológicas a través de diversos mecanismos moleculares, y no todos ellos están directamente relacionados con la función molecular como antioxidante (Zafrilla *et al.*, 2001; Reyes *et al.*, 2007; Dragišić Maksimović, 2013).

En esta investigación se muestra que la época de cosecha tuvo mayor influencia (Cuadro 8) que el mismo cultivar (Cuadro 11) sobre las variables firmeza, sólidos solubles totales, acidez titulable y pH del fruto, y que también afectaron el contenido de AE. Sin embargo, tales variaciones pueden causar diferentes respuestas que tienen los genotipos a las condiciones ambientales.

6.3 Compuestos volátiles identificados

Considerando los espectros de masas, presumiblemente se identificaron 6 compuestos (Cuadro 12), varios de ellos relacionados con el aroma de los frutos (Paterson *et al.*, 2013). Honkanen *et al.* (1980) reportó que la mezcla de la distribución de tales compuestos da como resultado el aroma característico de la frambuesa.

Cuadro 12. Compuestos volátiles identificados mediante HS-SPME-GC-MS en el jugo de frambuesa.

Pico No.	Compuestos identificados	Cultivar [†]
1	Aldheído C-9 (Nonanal)	A, E, L, P
2	6-octen-1-ol, 3, 7-dimetil- (β -Citronelol)	A, E, L
3	2-buten-1-ona, 1-(2,6,6-trimetil-1,3-ciclohexadieno-1-il) (β damacenona)	A, E, L, P
4	3-buten-2-ona, 4-(2,6,6-trimetil-2-ciclohexeno-1-il) (α -ionona)	A, E, L, P
5	2-butanona, 4-(2,6,6-trimetil-1-ciclohexeno) (Dihidro- β -ionona)	A, E, L, P
6	3-buten-2-ona, 4-(2,6,6-trimetil-1 ciclohexeno-1-il) (β -ionona)	A, E, L, P

[†]Cultivares: Adelita (A); Erika (E); Lupita (L); Polka (P).

Únicamente el compuesto identificado como β -Citronelol (2), no se encontró en el cv. 'Polka'. Y en mayor cantidad en los cultivares 'Lupita' y 'Erika', lo cual indica las diferencias

cualitativas de los compuestos entre cultivares. Tales variaciones son empleadas frecuentemente para su clasificación e incluso identificación de genotipos (Aprea *et al.*, 2010).

Se presentaron diferencias en la abundancia de los picos, por cultivar. La Figura 33 muestra los cromatogramas de los cuatro cultivares, los cuales mostraron variaciones en el número de compuestos encontrados y en el tamaño de los mismos. El cromatograma del cultivar Erika (Figura 33A) presentó el mayor número de compuestos (37 picos) y el cultivar Polka (Figura 33B) la menor cantidad (18 picos). El cromatograma de la variedad Lupita (Figura 33C) mostró 32 compuestos y el de la variedad Adelita (Figura 33D) 23 picos.

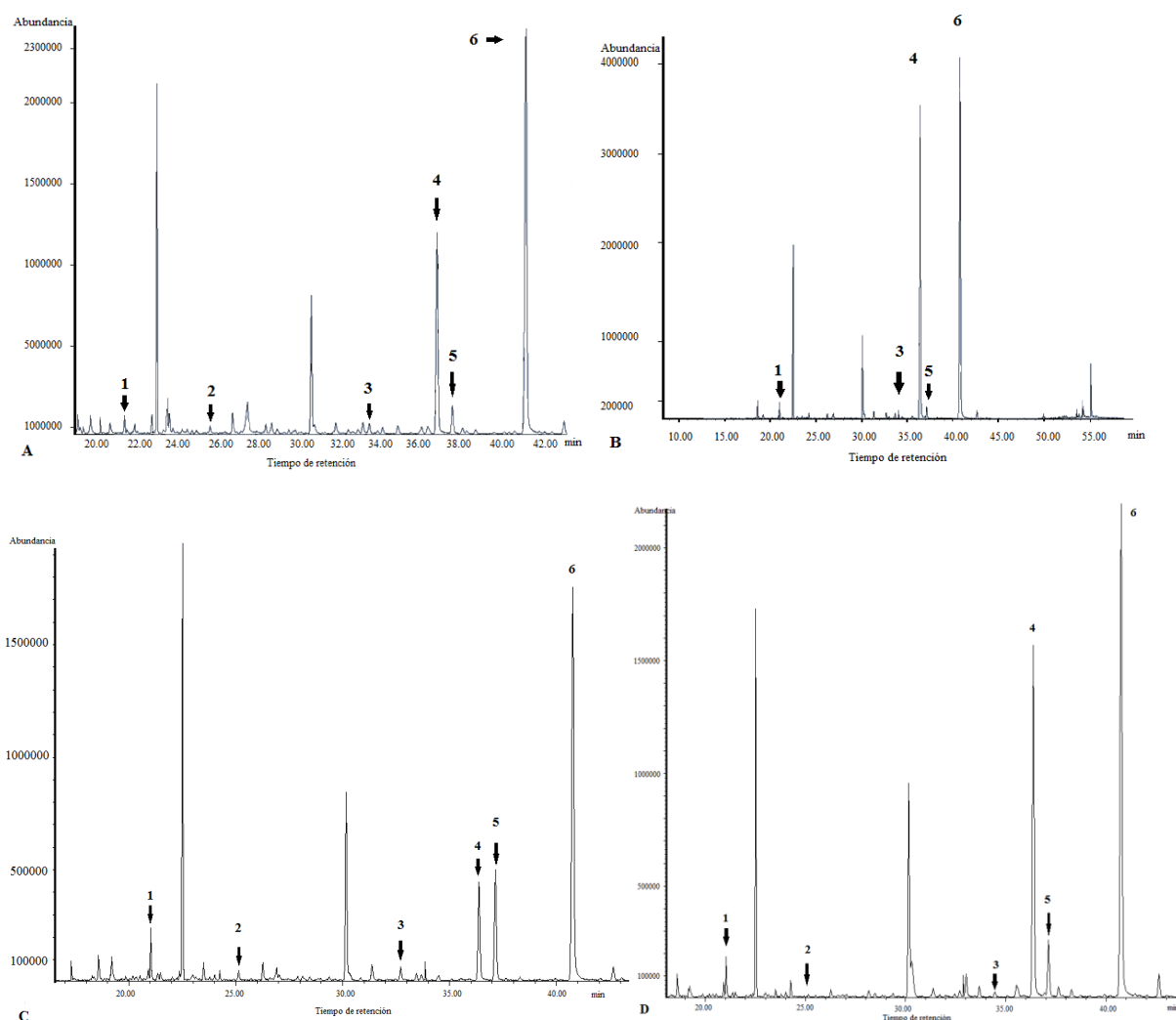


Figura 33. Análisis de compuestos volátiles por HS-SPME-GC-MS en los cultivares Erika (A), Polka (B), Lupita (C) y Adelita (D). (1) Nonanal, (2) β -citronelol, (3) β -damascenona, (4) α -ionona, (5) dihidro- β -ionona, (6) β -ionona.

Los resultados sugieren que estas diferencias se deben principalmente al efecto del cultivar. En este experimento se controló la fecha de cosecha y la etapa de madurez en la que los frutos fueron cosechados, que son factores que puede influir sobre el perfil de volátiles en los frutos (Salas *et al.*, 2011). Sin embargo, para puntualizar el efecto de cualquier factor es preciso controlar el mayor número de fuentes de variación para llegar a conclusiones más acertadas.

En la Figura 34A se observa que la α -ionona, dihidro- β -ionona y β -ionona se presentaron en mayor proporción. Aprea *et al.* (2009) mencionan que α y β - ionona, son los compuestos con mayor concentración en los cultivares que estudiaron ('Polka' y 'Tulameen'), y que tales compuestos son los más relevantes en el aroma tan característico de las frambuesas, sin embargo, tanto el cultivar 'Polka' como el cultivar 'Tulameen' presentaron cantidades similares de ambos compuestos. En esta investigación, se encontraron diferencias entre la abundancia de estos tres compuestos en cada cultivar. El cv. 'Polka' se encontró mayor cantidad de α y β - ionona, pero la menor cantidad de dihidro- β -ionona. En el cv. 'Lupita' se observó la mayor cantidad de dihidro- β -ionona, pero presentó el menor contenido de α y β - ionona.

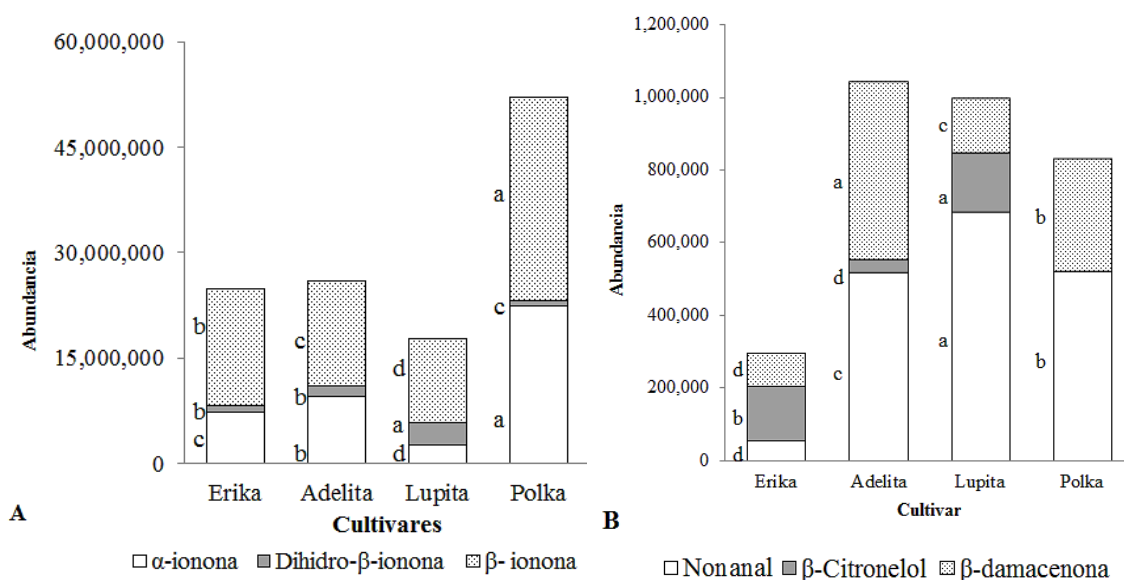


Figura 34. Comparación de medias de los compuestos volátiles encontrados A) en mayor proporción B) en menos proporción en cuatro cultivares de frambuesa. Medias de cultivares con letras diferentes dentro de compuestos volátiles detectados son estadísticamente diferentes ($\alpha \leq 0.05$).

También se identificaron los compuestos: nonanal, β -Citronelol y β damascenona, pero en menor proporción (Figura 34B). Al igual que en el caso anterior se observó variación en la proporción de los compuestos por cultivar. De estos tres, el β -Citronelol fue el compuesto encontrado en menor proporción en todos los cultivares, y en el cv. 'Polka' no se detectó. Tanto en la comparación de medias (Figura 34) como en los cromatogramas (Figura 33) se puede observar las diferencias en cantidad y presencia de compuestos en los diferentes cultivares evaluados.

Aunque se han identificado más de 200 compuestos volátiles en frambuesa, se destaca que sólo algunos están relacionados con el aroma de los frutos: α -, β iononas, α -ionol, β -damascenona, linalol, geraniol, (Z)-3-hexenol, benzil alcohol, acetoina, cetona de frambuesa y ácidos acético y hexanóico. De estos en la presente investigación se detectaron: α -, β iononas y β -damascenona.

Para incrementar la eficiencia del proceso de SPME, se pueden modificar una serie de variables experimentales. Uno de éstos se relaciona a la cubierta de la fibra empleada en el análisis (Granada *et al.*, 2011). Por ejemplo, Tiitinen *et al.* (2006) detectaron 44 analitos con una fibra de divinilbenzeno/carboxeno/polimetilsiloxano. En este estudio con un material de PDMS se lograron identificar 6 compuestos. Malowicki *et al.* (2008) mencionan que algunos con la fase de PDMS obtuvieron bajos porcentajes de recuperación en compuestos como cetonas y zingeronas, por lo que recomienda emplearla junto con otras fases. Es de esperarse que no se detectaran todos los compuestos reportados en otras investigaciones, dada la naturaleza química de la fibra utilizada en esta investigación.

Además del uso de fibras con diferentes fases es deseable optimizar parámetros como: tiempo de exposición de la fibra, tiempo de equilibrio de las fases, tiempo de desorción de la fibra, entre otros.

Finalmente, es importante destacar que los compuestos más abundantes no son necesariamente los más importantes contribuyentes del aroma, esto debido a que otros se encuentran en cantidades muy pequeñas y que pueden no detectarse, pero que en conjunto

contribuyen al aroma y sabor de los frutos. Además, considerando las diferencias entre cultivares se resalta la importancia de la determinación del perfil de compuestos volátiles como bio-marcadores de autenticidad.

6.4 Ciclo de producción 2013-2014

6.4.1 Muestreo en cultivar ‘Erika’ en diferentes altitudes.

6.4.1.1 Selección de variables. El cultivar ‘Erika’ se muestreó durante los dos ciclos de cosecha en diferentes sitios localizados desde 1277 hasta 2413 msnm. En el Cuadro 13 se muestran las covariables de interés con las cuales se ajustaron los modelos, para realizar el análisis estadístico de los frutos muestreados en diferentes épocas, durante ambas temporadas de cosecha.

Cuadro 13. Variables de respuesta en función de las covariables más importantes.

Var.Ind.		Variable dependientes										
		L*	a*	b*	C*	h*	F	AT	SST	pH_f	CA	AE
Intercepto		2.87	2.93	1.40	2.43	3.03	0.93	2.37	2.30	1.56	4.43	2.33
Humedad		-	-0.00	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MO		0.02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S	Na	-	-	-	0.01	-	-	-	-	-	-	-
	Ca	-	-	-	-	-	-	-	-	-0.00	-	-
	pH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-0.19
Ciclo	2013-2014	-	-	-	-0.00	-	-	-0.38	-	-	-0.19	-
	2014-2015	-	-	-	0.00	-	-	0.00	-	-	0.00	-
Muestreo		-	-	-	-	-	-	-	-	0.00	0.02	0.03

†L*, luminosidad; a*, (rojo (+)/verde (-)); coordenada b* (amarillo (+)/azul (-)); C*, Chroma; h*, hue; F, Firmeza; AT, acidez titulable; SST, sólidos solubles totales; CA, capacidad antioxidante; AE, ácido elágico; SST, sólidos solubles totales. Var. Ind., variables independientes. S, Características del suelo del sitio de colecta: MO, materia orgánica; Na, sodio; Ca, calcio intercambiable; pH, reacción del suelo.

El cuadro 14 presenta el efecto de las variables independientes (altitud, época de cosecha y ciclo de producción) sobre las características evaluadas en los frutos del cv. ‘Erika’. La altitud provocó diferencias en la CA de los frutos. La fecha de muestreo es la variable independiente que influyó en todas las características físicas y químicas en el cv. ‘Erika’. El ciclo de producción tuvo influencia sobre las características C*, F, AT y pH.

Cuadro 14. Significancia del análisis de regresión de las variables físicas y químicas de los frutos de frambuesa cv. ‘Erika’ en función de altitud, época de muestreo y ciclo de producción[†].

Variables	Altitud	Época de muestreo	Ciclo de producción
L	0.50NS	0.16*	0.69NS
A	0.57NS	2.25*	2.26NS
B	0.81NS	2.6**	0.22NS
C	0.93NS	0.65*	4.26*
H	1.01NS	7.63**	1.13NS
F	2.44NS	33.17**	20.43**
SST	0.64NS	47.19**	0.38NS
AT	1.8NS	19.56**	17.78**
pH	0.89NS	9.0**	20.85**
CA	1.95*	33.84**	0.61NS
AE	1.24NS	15.64**	2.06NS

[†] NS, no significativo; *, ** Diferente de cero a una probabilidad de 0.05 y 0.01, respectivamente. L, luminosidad; a, coordenada a*(rojo (+)/verde (-)); b, coordenada b* (amarillo (+)/azul (-)); C, chroma; h, hue; F, Firmeza; SST, sólidos solubles totales; AT, acidez titulable; pH, pH del fruto; CA, capacidad antioxidante; AE, ácido eláxico.

6.4.1.2 Efecto de la altitud. En el Cuadro 15 se observa que no hubo variación de las características físicas y químicas de los frutos del cv. ‘Erika’, provocadas por la altitud de los sitios en los que fueron producidos. En el caso de las coordenadas de color y firmeza indican que la calidad externa de los frutos se mantuvo pese a las diferencias por localidad de producción. Estos datos muestran que los frutos se ven con el mismo color (rojo-claro) y con la misma consistencia (en promedio, 1.39 N), características deseables para los consumidores.

De igual manera, las características químicas de calidad interna de los frutos no tuvieron diferencias significativas. La menor variación se observó en AT (1.8-1.9%) y en pH de los frutos (3.2-3.8), los SST oscilaron entre 9.2-10.8° Bx.

Cuadro 15. Efecto de la altitud del sitio de producción en las variables físicas y químicas de los frutos de frambuesa cv. ‘Erika’[†].

Altitud msnm	L*	a*	b*	C*	h*	F	SST	AT	pH	CA	AE
1277	23.13a	29.9a	10.3a	31.8a	20.4a	1.0a	9.2a	1.8a	3.6a	88.45a	3.9a
1297	23.13a	29.7a	11.2a	32.0a	19.5a	1.4a	9.9a	1.8a	3.5a	81.29ab	3.8a
1316	24.84a	29.7a	11.3a	31.6a	20.1a	1.4a	9.3a	1.9a	3.6a	80.34abc	5.7a
1513	22.14a	29.7a	10.2a	31.9a	20.0a	1.3a	10.5a	1.8a	3.6a	69.21 bc	4.1a
1567	21.33a	29.7a	10.2a	31.8a	20.4a	1.6a	10.3a	1.8a	3.4a	75.09abc	4.4a
1600	21.65a	29.6a	9.7a	32.2a	20.2a	1.3a	10.8a	1.8a	3.4a	73.95abc	3.7a
1621	20.99a	29.4a	9.9a	30.8a	19.2a	1.1a	10.6a	1.8a	3.3a	71.08abc	3.0a
1748	22.86a	29.6a	11.1a	31.8a	19.5a	1.7a	9.9a	1.8a	3.2a	72.00abc	4.1a
1808	23.59a	29.9a	10.2a	31.9a	20.2a	1.3a	10.2a	1.8a	3.5a	74.69abc	4.7a
2413	27.65a	29.7a	10.6a	32.0a	20.5a	1.8a	10.1a	1.9a	3.8a	59.46 c	4.9a

[†] Medias con letras diferentes son estadísticamente diferentes ($\alpha=0.05$). La separación de medias fue realizada con los datos en escala logarítmica o raíz cuadrada. Los datos se presentan en la escala en que fueron medidos. F, firmeza (N); SST, sólidos solubles totales (°Brix); AT, acidez titulable (%); pH, pH de fruto; CA, capacidad antioxidante (%); AE, ácido eláxico ($\mu\text{g g}^{-1}$).

El contenido de AE no mostró diferencias estadísticas significativas; los frutos colectados a 1621 msnm (Jocotepec, Jalisco) reportaron $3 \mu\text{g g}^{-1}$, y los producidos a 1316 msnm (Los Reyes, Michoacán) $5.7 \mu\text{g g}^{-1}$ de peso fresco. Doumet *et al.* (2011), reportaron que en frutos de fresa, la altitud tuvo influencia sobre azúcares y composición de ácidos orgánicos, pero no sobre metabolitos secundarios.

Los resultados obtenidos indican que la altitud no es un factor que influya significativamente sobre las características que se midieron en los frutos del cv. ‘Erika’. Vera (1995) reportó que los distintos niveles altitudinales pueden influir sobre los periodos fenológicos de algunas especies, lo que repercute en la aceleración o bien el retraso de alguno de ellos en función de dichos niveles. Los resultados de esta investigación muestran que las características de los frutos de frambuesa cv. ‘Erika’ no se ven afectados por la variación de altitud, aunque no se

evaluó su influencia sobre el desempeño fenológico de este cultivar y rendimiento, que sí pudieran estar siendo afectados por este factor.

Estos resultados destacan la estabilidad del cultivar en cuanto a la calidad externa e interna de sus frutos, al ser cultivada a diferentes altitudes. Además es potencialmente adaptable a distintas condiciones edáficas y de manejo (Mazur *et al.*, 2014).

La CA fue la única característica, medida en los frutos, que tuvo variaciones en función de la altitud en los que se localiza el sitio de producción. El mayor porcentaje (88.45%) se presentó en la menor altitud (1277 msnm), que corresponde al sitio ubicado en el municipio de Zapotiltic, Jalisco. Por otra parte, la menor neutralización de radicales libres (59.46%) se registró en los frutos provenientes del sitio con mayor altitud (Salvador Escalante, Michoacán, 2413 msnm). Sin embargo no se detectó una disminución sistemática en el porcentaje de CA por cada metro de aumento de la altitud. Lo anterior se presenta porque existen diferentes elementos en las condiciones de cultivo, crecimiento y desarrollo de los frutos que pueden modificarse para aumentar los valores de los compuestos nutraceuticos que determinan la CA (Anttonen *et al.*, 2006).

En este segundo muestreo, el contenido de AE en los frutos no fue afectado por las variaciones de altitud en los sitios de producción, pero las diferencias en CA muestran que otros compuestos con mayor influencia sobre la capacidad de la neutralización de radicales libres, sí son afectados. Bursać *et al.* (2009) encontraron mayor correlación entre las antocianinas ($R^2=0.81$) y CA de los frutos. La biosíntesis de estos metabolitos secundarios se favorece cuando existe alta intensidad de luz, como mecanismo de foto-protección (Kalt, 2005), lo cual podría explicar que se hayan encontrado diferencias en CA, pero no en AE.

6.4.1.3 Fecha de muestreo. La fecha en la que se muestreó tuvo influencia en color, firmeza, sólidos solubles totales, acidez titulable, pH, capacidad antioxidante y ácido elálgico (Cuadro 16).

6.4.1.3.1 Color.

Existieron diferencias de color en los frutos en relación al mes en el que fueron cosechados. Durante la primera época de cosecha, se observó el menor valor de luminosidad (17.4), el resto de los frutos, en esta coordenada de color estuvieron entre 21.1-26.5. Durante el décimo muestreo se registró el valor más alto de a^* (36.0) y C^* (42.4), y el menor de b^* (7.6) y de h^* (16.9), estos valores indican que en esta colecta el color de los frutos fue más intenso (menos verde y más azul). Robbins y Moore (1990) mencionan que las coordenadas L^* a^* b^* están correlacionadas negativamente con el contenido de antocianinas. Estos compuestos se sintetizan como respuesta de las plantas a ciertos elementos climáticos, lo que explica la variación entre fechas de muestreo. Pese a las variaciones reportadas, los frutos del cv. ‘Erika’ se caracterizan por ser de color rojo-claro (más rojo y menos azules). Estos colores se asocian a una mayor aceptación por parte de los consumidores (Stavang *et al.*, 2015).

Cuadro 16. Efecto de la fecha de muestreo en las variables físicas y químicas de los frutos de frambuesa cv. ‘Erika’[†].

	L^*	a^*	b^*	C^*	h^*	F	SST	AT	pH	CA	AE
1	17.4d	34.1ab	9.4abc	35.4ab	17.1bc	1.04bc	8.4 c	1.8d	3.4d	64.01ab	2.71bcd
2	26.0ab	26.6ab	9.6abc	28.5ab	21.2abc	1.19abc	8.5 c	2.3b	3.5c	61.46 b	2.51d
3	26.5ab	28.1ab	11.3ab	30.6ab	23.2ab	1.01cd	10.2abc	1.9cd	3.6b	58.77 b	2.66cd
4	26.8a	25.6b	11.2ab	27.8b	22.7ab	1.10bc	10.7ab	1.9cd	4.36a	61.35 b	3.41bcd
5	23.6bc	27.8ab	10.2ab	31.3ab	24.0ab	1.20ab	11.2a	1.6d	3.9ab	63.78 b	4.03bc
6	23.6bc	26.6b	9.7ab	28.7ab	21.7ab	1.36a	10.0abc	2.1bc	3.4dc	63.39 b	5.71ab
7	22.5c	26.3b	10.7ab	28.4ab	22.2ab	0.89cd	9.4 c	3.1a	3.2e	65.24ab	2.82bcd
8	25.5ab	29.2ab	10.6ab	31.1ab	20.0abc	0.84d	10.5abc	2.8a	3.7b	86.49a	3.27bcd
9	21.1bc	30.8ab	9.3bc	31.3ab	17.2bc	1.22ab	9.8 bc	1.9cd	3.4dc	94.81a	4.53b
10	21.6bc	36.0a	7.6c	42.4a	16.9c	1.55a	9.7bc	1.9cd	3.0f	89.16a	7.36a
11	23.02c	29.9ab	12.6a	33.0ab	25.1a	1.34ab	10.2abc	2.3b	3.0f	93.07a	5.17ab

[†] Medias con letras diferentes son estadísticamente diferentes ($\alpha=0.05$). La separación de medias fue realizada con los datos en escala logarítmica o raíz cuadrada. Los datos se presentan sin transformar. 1, noviembre-2013; 2, diciembre-2013; 3, febrero-2014; 4, marzo-2014; 5, abril-2014; 6, mayo-2014; 7, octubre-2014; 8, diciembre-2014; 9, febrero, 2015; 10, abril-2015; 11, junio-2015. F, firmeza (N); SST, sólidos solubles totales ($^{\circ}\text{Bx}$); AT, acidez titulable (%); pH, pH de fruto; CA, capacidad antioxidante (%); AE, ácido elálgico ($\mu\text{g g}^{-1}$).

6.4.1.3.2 Firmeza.

La mayor F en frutos se registró en el último muestreo de la primera temporada (2013-2014), y el penúltimo de la segunda (2014-2015). Basiouny y Chen (1988) encontraron que en las primeras cosechas de arándano, los frutos tienen mayor F, y va disminuyendo conforme avanza el periodo de cosecha. A diferencia de sus resultados, los frutos de frambuesa mostraron mayor F en los últimos muestreos de la temporada. Los frutos con menor firmeza fueron muestreados en los meses de febrero de 2013, octubre y diciembre de 2014. La edad de la plantación, el tamaño, la forma y el peso de los frutos, así como el manejo son otros elementos que pueden contribuir a la firmeza de la fruta (Basiouny y Chen, 1988; Robbins y Moore, 1991). Aún con las variaciones por fecha de cosecha, los resultados en cuanto a F son aceptables para frutos comercializables (Stavang *et al.*, 2015).

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

Los valores de SST en el cv. 'Erika', oscilaron entre 8.4-11.2. El menor contenido se registró en los frutos de noviembre y diciembre (2013), y el mayor en el mes de abril (2014). La AT registró valores más altos en octubre y diciembre 2015 (inicio de cosecha y meses fríos), y los menores en noviembre 2013 (mes frío con baja humedad relativa) y abril 2014 (mes cálido con baja humedad relativa). El pH más alto se midió en los frutos colectados en marzo 2014 y los menores en junio 2015 (ambos meses cálidos y con baja humedad relativa) (Cuadro 16). Otros estudios destacan la relevancia que tiene el factor climático sobre la calidad interna, externa y nutracéutica de los frutos, y se enfatiza el efecto que desempeñan la luz, temperatura y humedad relativa sobre tales características (Basiouny y Chen, 1988; Anttonen *et al.*, 2006). La variabilidad observada en este estudio en SST, AT y pH en los frutos recolectados en las distintas épocas de muestreo, confirman la interacción que tiene el genotipo con el ambiente. Sin embargo, los datos analizados no muestran que haya un efecto determinante, por sí sólo, de alguno de los elementos climáticos. Lo anterior se puede explicar por los diversos factores que influyen sobre estas características y de la misma interacción entre ellos, tanto climáticos, de manejo (Anttonen *et al.*, 2006) y edad de la plantación (Basiouny y Chen (1988).

6.4.1.3.4 Capacidad Antioxidante (CA).

La CA de los frutos mostró gran variación por época de cosecha (58.7-94.8%). El mayor incremento de la actividad antioxidante de los frutos se observó en los últimos 3 muestreos. Tanto el contenido de fenoles totales como el contenido de antocianinas tienen alta correlación con la capacidad antioxidante (Bursac et al., 2009; Kalt, 2005). Alteraciones en el tipo de compuestos fenólicos puede cambiar la capacidad antioxidante total, lo que puede explicar los cambios en los porcentajes de neutralización de radicales libres en los frutos colectados. Es decir, los cambios de las condiciones climáticas alteran el metabolismo secundario de las plantas, aumentando o disminuyendo la cantidad de polifenoles que contribuyen a la CA de los frutos.

6.4.1.3.5 Ácido Elágico (AE).

A diferencia de las otras características, AE muestra una tendencia a aumentar su contenido en las últimas cosechas de las temporadas estudiadas (ie. 4.04 y 5.71 $\mu\text{g/g}$ en abril y mayo, respectivamente, de la temporada 2013-2014, y abril y junio de la temporada 2014-2015 con 7.36 y 5.17 $\mu\text{g/g}$) (Cuadro 16). Anttonen *et al.* (2006) estudiaron diversos factores que pueden modificar el contenido de AE, entre los que destacan: manejo (acolchado, túnel, fertilización, fecha de plantación), genotipo y ambiente de producción; y también destacan que el orden de los frutos en la planta influye sobre el contenido de este polifenol, encontrándose menor contenido en los frutos de orden primario (los que se localizan en las puntas) y aumenta en los frutos más cercanos a la base. En la variación de AE, en esta investigación, los factores antes mencionados pudieron haber influido, sumado a la inducción del metabolismo secundario, provocado por el término del ciclo de la planta.

6.4.1.4 Efecto del ciclo de producción. En el Cuadro 17 se observa que el ciclo de producción provocó diferencias sobre F, AT y pH. Estas características mostraron una disminución en el segundo ciclo. Se observó mayor contenido de SST cuando la AT fue menor.

6.4.1.4.1 Color.

Esta variable no estuvo influenciada por el ciclo de cultivo. En ambos ciclos de cosecha se pudieron apreciar frutos de color rojo claro, con valor promedio, de ambos ciclos, de $C^* = 31.8$

y $h^* = 20.05$. La no significancia estadística de color en ambos ciclos de cultivo indica la estabilidad del cultivar a través del tiempo, pese a la edad de la planta. El color es una característica determinada genéticamente; cuando existen valores bajos de C^* y h^* (cerca de cero), se apreciarían colores azulados (Krüger *et al.*, 2011). En el caso de los frutos del cv. ‘Erika’ tienen un color que visualmente indica fresca (rojo-poco intenso, poco azulados).

Cuadro 17. Efecto del ciclo de producción en las variables físicas y químicas de los frutos de frambuesa cv. ‘Erika’[†].

Ciclo	L*	a*	b*	C*	h*	F	SST	AT	pH	CA	AE
1	23.29a	29.94a	10.7a	31.6a	20.1a	1.45a	9.7a	1.9a	3.8a	71.61a	4.7a
2	23.67a	29.55a	10.3a	32.0a	20.0a	0.95b	10.4a	1.7b	3.2b	70.44a	3.8a

[†] Medias con letras diferentes son estadísticamente diferentes ($\alpha=0.05$). La separación de medias fue realizada con los datos en escala logarítmica o raíz cuadrada. Los datos se presentan sin transformar. F, firmeza (N); SST, sólidos solubles totales ($^{\circ}\text{Bx}$); AT, acidez titulable (%); pH, pH de fruto; CA, capacidad antioxidante (%); AE, ácido eláxico ($\mu\text{g/g}$); Ciclo 1: temporada 2013-2014; Ciclo 2: temporada 2014-2015.

6.4.1.4.2 Firmeza.

De acuerdo a los análisis estadísticos, esta variable mostró diferencias entre ciclos productivos. Durante el primero, que corresponde a la cosecha 2013-2014, fue mayor (1.45 N). Estas variaciones se deben a que la F es una característica sobre la que influye otros factores, como el genético, ambiental, edad de la planta, estado hídrico y nutricional de los frutos al momento de la cosecha, morfológicos, tamaño del fruto y manejo. (Robbins y Moore, 1991).

6.4.1.4.3 SST, AT y pH.

Sólo la AT se vio afectada por el ciclo de producción. En promedio de ambos ciclos, los SST fueron de 10.05°Bx . Aún con las variaciones de AT por ciclo, se mantuvo una buena relación de azúcares/acidez, 5.1 en el primer ciclo y 6.1 en el segundo.

6.4.1.4.4 CA y AE.

En ambos ciclos, los frutos tuvieron importantes cantidades de AE y porcentaje de CA. Y no hubo variación entre ciclo de cosecha. El porcentaje de inhibición de radicales libres en ambas

temporadas fue superior a 70%. El contenido de AE osciló entre 3.8-4.7 $\mu\text{g/g}$, el mayor contenido se registró en la primer temporada.

6.5 Ácido elágico

Antes de comenzar con el análisis de todas las muestras colectadas, se realizaron algunas pruebas preliminares las cuales se presentan a continuación.

6.5.1 Curva de calibración. Para la cuantificación del AE se realizaron curvas de calibración externa con estándares en concentraciones crecientes. A manera de ejemplo en la Figura 35 se muestra una curva de calibración de AE de 0.87-19.92 $\mu\text{g/g}$ ($R^2=0.9999$).

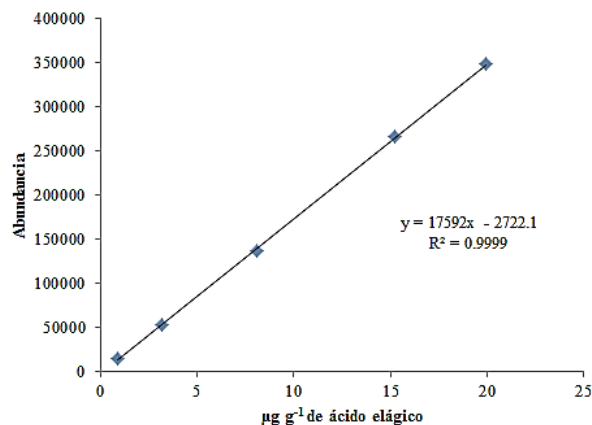


Figura 35. Curva de calibración de AE.

6.5.2 Recuperación. Antes de comenzar con los análisis de todas las muestras se realizó la recuperación empleando el cv. 'Erika' en el que se realizaron tres mediciones. El promedio fue de $89.82 \pm 1.83\%$. Este porcentaje corresponde a un valor aceptable y con un coeficiente de variación menor a 2% (FAO, 1996). Para evaluar la recuperación, normalmente se adicionan concentraciones bajas, medias y altas del estándar. Amakura *et al.* (2000) agregaron 25 $\mu\text{g/g}$ del estándar y obtuvieron una recuperación de 90.1%. En la presente investigación se adicionaron concentraciones cercanas a la concentración que tenían los frutos ($<6 \mu\text{g/g}$) y la recuperación obtenida (89.82%) se consideró suficiente para los fines de la investigación.

6.5.3 Repetibilidad. Después de realizar por triplicado la determinación de AE en una muestra del cv. 'Erika', proveniente de la Laguna, Cd. Guzmán, Jalisco, se calculó el coeficiente de variación que fue de 0.52%. Puesto que es un valor menor de 1%, se comenzó con el análisis de la totalidad de las muestras.

7. CONCLUSIONES

En el ciclo de muestreo 2013-2014 de los cultivares ‘Adelita’, ‘Erika’, ‘Lupita’ y ‘Polka’ los resultados permitieron llegar a las siguientes conclusiones:

El color de la fruta fue diferente dentro del rojo claro detectado por el colorímetro según los parámetros de a^* , b^* y C^* , en cada uno de los cultivares, en la etapa de madurez comercial.

Entre épocas de muestreo se encontraron diferencias en la firmeza de los frutos. Una mayor firmeza, cuyo valor fue de 1.83 N, ocurrió en el mes de junio y el menor 1.04 en el mes de octubre.

Los sólidos solubles totales más bajos, en promedio fueron de 8.15°Bx y ocurrieron en los meses de noviembre y diciembre, y los más altos, en los meses de marzo y junio que fueron en promedio de 10.93°Bx . Los valores bajos se relacionaron con menor temperatura y mayor humedad relativa y los valores altos con mayor temperatura y menor humedad relativa.

La acidez titulable osciló de 1.57-2.39% y fue mayor cuando se registraron bajas temperaturas. El pH varió de 3.45-4.35 fue mayor cuando aumentó la temperatura.

Un aumento de la temperatura provocó un incremento en la capacidad antioxidante y concentración de ácido elágico en la fruta de frambuesa.

En general, todos los cultivares presentaron un porcentaje mayor de 60% de capacidad antioxidante utilizando la metodología DPPH, que favorece la neutralización de los radicales libres producto del metabolismo biológico.

La mayor concentración de ácido elágico, reportada en $\mu\text{g/g}$ de fruta fresca, se encontró en el cultivar ‘Erika’ (3.69) y la menor en ‘Adelita’ (2.26), determinado con la metodología de Amakura.

En el cultivar ‘Erika’, que reportó la mayor concentración de ácido elágico ($3.69 \mu\text{g/g}$ de fruta fresca), se estudió el efecto de la altitud y la época de muestreo en el ciclo 2014-2015, para observar la diferencia de las características de calidad, capacidad antioxidante y el contenido de ácido elágico en función de dichos factores.

El color de la fruta a la madurez comercial, la firmeza, los sólidos solubles totales, la acidez titulable, el pH, la capacidad antioxidante y el contenido de ácido elágico, cambian de acuerdo a las épocas de muestreo. Esto significa que la calidad de la fruta del cv. 'Erika' cambia de acuerdo a las épocas de producción.

La variable, capacidad antioxidante varió en función a la ubicación de los huertos, cuyas altitudes oscilaron de 1277-2413 msnm. La mayor capacidad antioxidante se observó a menor altitud.

La concentración de ácido elágico varió de 3.0-5.7 $\mu\text{g/g}$, sin embargo no se observaron diferencias estadísticas significativas entre estos valores, pero la tendencia general muestra que a mayores altitudes los valores de la concentración de ácido elágico son superiores que a menores altitudes.

El cultivar 'Erika' mostró diferencias estadísticas entre los dos ciclos de muestreo en firmeza, acidez titulable y pH, lo cual señala que algunos parámetros de calidad de la fruta pueden no ser iguales de un ciclo de producción a otro.

8. LITERATURA CITADA

- Aguilar González, C. N. (2015)** Hidrólisis microbiana de taninos, clave para la acumulación de compuestos bioactivos. *BioTecnología* 19 (1): 4-6.
- Aiyer, H. S., C. Srinivasan and R. C. Gupta (2008)** Dietary berries and ellagic acid diminish estrogen-mediated mammary tumorigenesis in ACI rats. *Nutritional Cancer* 60(2): 227-234.
- Amakura, Y., M. Okada, S. Tsuij and Y. Tonogai (2000)** High-performance liquid chromatographic determination with photodiode array detection of ellagic acid in fresh and processed fruits. *Journal of Chromatography A*. 896: 87-93.
- Antolovich, M., P. Prenzler, K. Robards and D. Ryan (2000)** Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. *Analyst* 125: 989-1009.
- Anttonen M. J. and R. O. Karjalainen (2005)** Environmental and genetic variation of phenolic compounds in red raspberry. *Journal of Food Composition and Analysis* 18: 759-769.
- Anttonen M. J., K. I. Hoppula, R. Nestby, M. J. Verheul and R. O. Karjalainen (2006)** Influence of fertilization, mulch color, early forcing, fruit order, planting date, shading, growing environment, and genotype on the contents of selected phenolics in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54: 2614-2620.
- Apra, E., F. Biasioli and F. Gasperi (2015)** Volatile compounds of raspberry fruit: from analytical methods to biological role and sensory impact. *Molecules* 20: 2445-2474.
- Apra, E., F. Biasioli, S. Carlin, I. Endrizzi and F. Gasper (2009)** Investigation of volatile compounds in two raspberry cultivars by two headspace techniques: solid-phase microextraction/gas chromatography-mass spectrometry (SPME/GC-MS) and proton-transfer reaction-mass spectrometry (PTR-MS). *Food Chemistry* 57: 4011-4018.
- Apra, E., F. Biasiolo and F. Gasperi (2010)** Volatile compounds of raspberry fruit: from analytical methods to biological role and sensory impact. *Molecules* 20: 2445-2474.
- Arancibia-Avila, P., J. Namiesnik, F. Toledo, E. Werner, A. L. Martinez-Ayala, N. E. Rocha-Guzmán, J. A. Gallegos-Infante and S. Gorinstein (2012)** The influence of different time durations of thermal processing on berries quality. *Food Control* 26: 587-593.

- Basiouny F. M. and Y. Chen (1988)** Effects of harvest date, maturity and storage intervals on postharvest quality of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei* reade). *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 101:281-284.
- Bobinaitė R., P. Viškelis and P. R. Venskutonis (2012)** Variation of total phenolics, anthocyanins, ellagic acid and radical scavenging capacity in various raspberry (*Rubus* spp.) cultivars. *Food Chemistry* 132: 1405-1501.
- Brand-Williams, W., M. E. Cuevelier and C. Berset (1995)** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology* 28: 25-30.
- Bursać K. D., B. Levaj and V. Dragović-Uzelac (2009)** Free Radical Scavenging Activity and Phenolic Content in Strawberry Fruit and Jam. *Agriculturae Conspectus Scientificus* 74(3): 155-159.
- Cappellin L., E. Aprea, P. Granitto, A. Romano, F. Gasperi and F. Biasioli (2013)** Multiclass methods in the analysis of metabolomics datasets: The example of raspberry cultivar volatile compounds detected by GC-MS and PTR-MS. *Food research international* 54: 1313-1320.
- Çekiç Ç. and M. Özgen (2010)** Comparison of antioxidant capacity and phytochemical properties of wild and cultivated red raspberries (*Rubus idaeus* L.). *Journal of Food Composition and Analysis* 23: 540-544.
- Chen, L., X. Xin, H. Zhang and Q. Yuan. (2013)** Phytochemical properties and antioxidant capacities of commercial raspberry varieties. *Journal of functional foods* 5:508-515.
- Choi, Mi-H., S-M. Shim and G-H. Kim (2015)** Phenolic acids and quercetin from Korean black raspberry seed protected against acetaminophen-induced oxidative stress in mice. *Journal of functional foods* 19: 404-416.
- Daniel, E. M., A. S. Krupnick, Y. Heur, J. A. Blinzler, R. W. Nims and G. D. Stoner (1989)** Extraction, stability and quantitation of ellagic acid in various fruits and nuts. *Journal of food composition and analysis* 2: 338-349.
- Daniel, E. M. and G. D. Stoner (1991)** The effects of ellagic acid and 13-*cis*-retinoic acid on *N*-nitrosobenzylmethylamine-induced esophageal tumorigenesis in rats. *Cancer Letters* 56(2): 117–124.
- de Ancos, B., E. Gonzalez and P. M. Cano (1999)** Differentiation of raspberry varieties according to anthocyanin composition. *Z Lebensm Unters Forsch A* 208:33-38.

- Doumett, S., D. Fibbi, A. Cincinelli, E. Giordani, S. Nin and M. Del Bubba (2011)** Comparison of nutritional and nutraceutical properties in cultivated fruits of *Fragaria vesca* L. produced in Italy. *Food research International* 44: 1209-1216.
- Dragišić Maksimović J. J., J. M. Milivojević, M. M. Poledica, M. D. Nikolić and V. M. Maksimović (2013)** Profiling antioxidant activity of two primocane fruiting red raspberry cultivars (Autumn bliss and Polka). *Journal of Food Composition and Analysis* 31:173-179.
- El Hadi M.A.M., F. J. Zhang, F.F. Wu, C. H. Zhou and J. Tao (2013)** Advances in fruit aroma volatile research. *Molecules* 18: 8200–8229.
- Elisia, I., C. Hu, D. G. Popovich and D. D. Kitts (2007)** Antioxidant assessment of an anthocyanin-enriched blackberry extract. *Food Chemistry* 101: 1052-1058.
- Evdokimenko, S. N. (2009)** Use of the productivity potential of remontant forms of raspberry in breeding. *Russian Agricultural Sciences*. 35(3): 160-162.
- Faller A. L. K. and E. Fialho (2010)** Polyphenol content and antioxidant capacity in organic and conventional plant foods. *Journal of Food Composition and Analysis* 23: 561-568.
- FAO, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (1996)** Manual para el control de calidad de los alimentos. La garantía de la calidad en el laboratorio químico de los alimentos. FAO 14/14. Roma. pp. 144.
- FAOSTAT, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Statistics Division (2016)** Production, Crops, 2013. Disponible en: <<http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/S>> (Consultado agosto, 2016).
- Forney, C. F. (2001)** Horticultural and other factors affecting aroma volatile composition of small fruit. *Horttechnology* 11 (4): 529-538.
- Forney, C. F., W. Kalt and M. A. Jordan (2000)** The composition of strawberry aroma is influenced by cultivar, maturity, and storage. *HortScience* 35(6):1022-1026.
- García, E. (2004)** Modificaciones al Sistema de clasificación climática de Köppen. Serie de Libros Número 6. 5ª Ed. Instituto de Geografía, Universidad Nacional Autónoma de México. México. pp. 91.
- Garner D., C. H. Crisosto, P. Wiley and G. M. Crisosto (2008a)** Measurement of pH and titratable acidity. *Central Valley Postharvest Newsletter* 17: 2.

- Garner D., C. H. Crisosto, P. Wiley, and G. M. Crisosto (2008b)** Measurement of soluble solids content. *Central Valley Postharvest Newsletter* 17: 4.
- Giuggioli, N. R., R. Briano, C. Baudino and C. Peano (2015)** Effects of packing and storage conditions on quality and volatile compounds of raspberry fruits. *Journal of Food* 13: 512-521.
- Granada, F., S. Valencia, J. M. Marín and G. Restrepo (2011)** Optimización del método de microextracción en fase sólida acoplada a cromatografía gaseosa para análisis de metanol en agua. *Rev. Colomb. Quím.*, 40: 201-210.
- Gutiérrez Zavala, A., L. Ledesma Rivero, I. García García and O. Grajales Castillejos (2007)** Capacidad antioxidante total en alimentos convencionales y regionales de Chiapas, México. *Revista Cubana de Salud Pública*. 33(1). Recuperado de REDALyC: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=21433108>
- Haffner, K., H. J. Rosenfeld, G. Skrede and L. Wang (2002)** Quality of red raspberry (*Rubus idaeus* L.) cultivars after storage in controlled and normal atmospheres. *Postharvest Biology and Technology*. 24: 279–289.
- Häkkinen, S. H. and A. R. Törrönen (2000)** Content of flavonols and selected phenolic acids in strawberries and *Vaccinium* species: influence of cultivar, cultivation site and technique. *Food Research International*. 33: 517-524.
- Häkkinen, S. H., S. O. Kärenlampi, I. M. Heinonen, H. M. Mykkänen and R. Törrönen (1998)** HPLC method for screening of flavonoids and phenolic acids in berries. *J. Sci. Food Agric* 77: 543-551.
- Häkkinen, S., M. Heinonen, S. Kärenlampi, H. Mykkänen, J. Ruuskanen and R. Törrönen (1999)** Screening of selected flavonoids and phenolic acids in 19 berries. *Food. Research International*. 32: 345–353.
- Hargreaves plants (2016)** Frambuesa Erika. Disponible en: www.erikaframbuesa.com (Consultado: agosto, 2016).
- Hargreaves plants (2016)** Frambuesa Polka. Disponible en: www.polkaframbuesa.com (Consultado: agosto, 2016).
- Honkanen, E., T. Pyysalo and T. Hiviri (1980)** The aroma of Finnish wild raspberries, *Rubus idaeus*, L. *Z. Lebensm. Unters. Forsch* 180-182.

- Janakiram N. B., I. Cooma, A. Mohammed, V. E. Steele and C. V. Rao (2008)** β -ionone inhibits colonic aberrant crypt foci formation in rats, suppresses cell growth, and induces retinoid X receptor- α in human colonic cancer cells. *Mol Cancer Ther* 7:181–190.
- Kalt, W. (2005)** Effects of production and processing factors on major fruit and vegetable antioxidants. *Journal of food science* 70(1): 11-19.
- Kays, S. J. (1997)** Stress in harvested products. In S. J. Kays (Ed.), *Postharvest physiology of perishable plant products*. Athens, GA: Exon Press. pp. 335–407.
- Kevers C., J. Pincemail, J. O. Defraigne and J. Dommes (2014)** Antioxidant capacity of small dark fruits: Influence of cultivars and harvest time. *Journal of Berry Research* 4: 97-105.
- Kim D-O., K. W. Lee, H. J. Lee and C. Y Lee (2002)** Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolics phytochemicals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 3713-3717.
- Klesk, K., M. Qian and R. Martin (2004)** Aroma extract dilution analysis of cv. Meeker (*Rubus idaeus* L.) red raspberries from Oregon and Washington. *J. Agric. Food Chem.* 52: 5155–5161.
- Krüger E., H. Dietrich, E. Schöpplein, S. Rasim and P. Kürbel (2011)** Cultivar, storage conditions and ripening effects on physical and chemical qualities of red raspberry fruit. *Postharvest Biology and Technology* 60: 31-37.
- Kuskoski E. M., A. G. Asuero, A. M. Troncoso, J. Mancini-Filho y R. Fett (2005)** Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 25: 726-732.
- Larsen, M. and L. Poll (1992)** Odour thresholds of some important aroma compounds in raspberries. *Z Lebensm Unters Forsch* 191: 129-131.
- Lassen, N., W.J. Black, T. Estey and V. Vasiliou (2008)** The role of corneal crystallins in the cellular defense mechanisms against oxidative stress. *Semin. Cell Dev. Biol.* 19: 100-112.
- Leposavić, A., D. Đurović, Z. Keserović, B. Popović, O. Mitrović, N. Miletić and N. Magazin (2013)** Evaluation of raspberry cultivars grown in the western Serbia region. *Hort. Sci. (Prague)* 40(1): 1-7.

- Li W., A. W. Hydamaka, L. Lowry and T. Beta (2009)** Comparison of antioxidant capacity and phenolic compounds of berries, chokecherry and seabuckthorn. *Central European Journal of Biology* 4: 499-506.
- Maas, J.L., G. J. Galletta and G. D. Stoner (1991)** Ellagic acid, an anticarcinogen in fruits, especially in strawberries: a review. *HortScience*. 26: 10–14.
- Malowick, S. M. M., R. Martin and M. C. Qian (2008)** Volatile composition in raspberry cultivars grown in the pacific northwest determined by stir bar sorptive extraction- gas chromatography- mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 56: 4128-4133.
- Mazur S. P., A. Nes, A. B. Wold, R. S. Fagertun and K. Aaby (2014)** Quality and chemical composition of ten red raspberry (*Rubus ideaus* L.) genotypes during three harvest seasons. *Food Chemistry* 160: 233-240.
- McGuire, R. G. (1992)** Reporting of objective color measurements. *HortScience* 27 (12): 1254-1255.
- Mercado-Mercado, G., L. dl Rosa-Carrillo, A. Wall-Medrano, J. A. López Díaz y E. Álvarez-Parrilla (2013)** Compuestos polifenólicos y capacidad antioxidante de especias típicas consumidas en México. *Nutrición Hospitalaria*. 28(1): 36-46.
- Milivojević J., M. Nikolić, J. Dragišić Maksimović and D. Radivojević (2011)** Generative and fruit quality characteristics of primocane fruiting red raspberry cultivars. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 35: 289–296.
- Mosiño, P. A. (1974)** Los climas de la República Mexicana. En Zoltan de Cserna: El escenario geográfico. SEP-INAH. México. pp. 57-172.
- Mullen, W., A. J. Stewart, M. E. J. Lean, P. Gardner, G. G. Duthie and A. Crozier (2002)** Effect on freezing and storage on the phenolics, ellagitannins, flavonoids, and antioxidant capacity of red raspberries. *J. Agric. Food Chem.* 50: 5197:5201.
- Nikolić, M., A. Radović, M. Fotirić, J. Milivojević and D. Nikolić (2009)** Pomological properties of promising raspberry seedlings with yellow fruit. *Genetika* 4(3): 255-262.
- Ordidge, M., P. García-Macías, N. H. Battey, M. H. Gordon, P. Hadley, P. John, J. A. Lovegrove, E. Vysini and A. Wagstaffe (2010)** Phenolic contents of lettuce, strawberry, raspberry, and blueberry crops cultivated under plastic films varying in ultraviolet transparency. *Food Chemistry* 119: 1224–1227.

- Ossipov, V., J-P. Salminen, S. Ossipova, E. Haukioja and K. Pihlaja (2003)** Gallic acid and hydrolysable tannins are formed in birch leaves from an intermediate compound of shikimate pathway. *Biochemical Systematics and Ecology* 31:3-16.
- Ovaskainen, M. L., R. Törrönen, J. M. Koponen, H. Sinkko, J. Hellström and H. Reinivuo (2008)** Dietary intake and major food sources of polyphenols in Finnish adults. *The Journal of Nutrition*. 138: 562–566.
- Pantelidis G. E., M. Vasilakakis, G. A. Manganaris and Gr. Diamantidis (2007)** Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and Cornelian cherries. *Food Chemistry* 102: 777-783.
- Paredes-López, O., M. L. Cervantes-Ceja, M. Vigna-Pérez, T. Hernández-Pérez (2010)** Berries: Improving human health and healthy aging, and promoting quality life. *Plant Foods Hum Nutr* 65: 299-308.
- Paterson A., A. Kassim, S. McCallum, M. Woodhead, K. Smith, D. Zait and J. Graham (2013)** Environmental and seasonal influences on red raspberry flavor volatiles and identification of quantitative trait loci (QTL) and candidate genes. *Theor. Appl. Genet.* 126: 33-48.
- Pérez-Pastén, R., A. Atilán-Gil, F. Santiago- Kerstupp, C. Zúñiga-Pérez and G. Chamorro-Cevallos (2006)** Edible raspberry composition poder containing high levels of ellagic acid reduced nicotine-induced place preference in mice. Disponible en: 10.1016/j.toxlet.2010.03.392 (Noviembre, 2014).
- Pichersky E. and J. Gershenzon (2002)** The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5:237–243.
- Planasa (2016)** Investigación vegetal, frambuesa, variedades. Disponible en: <http://www.planasa.com/index.php?m=66&prod=542> (Consultado: agosto, 2016).
- Reyes L. F., J. E. Villareal and L. Cisneros-Zevallos (2007)** The increase in antioxidant capacity after wounding depends on the type of fruit or vegetable tissues. *Food Chemistry* 101:1254-1262.
- Rice-Evans C., N. Miller and G. Paganga (1997)** Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science* 2: 152-159.

- Robbins, J. A. and P. Moore (1990)** Color Change in fresh red raspberry fruits stored at 0, 4.5, o 20C. *HortScience* 25(12): 1523-1524.
- Robbins, J. A. and T. M. Sjulín (1989)** Fruit morphology of red raspberry and its relationship to fruit strength. *HortScience* 24: 776-778.
- Robbins, J. and Moore, P. (1991)** Fruit morphology and fruit strength in a seedling population of red raspberry. *HortScience* 26 (3): 294-295.
- Robbins, J. and T. Sjulín (1986)** A comparison or two methods for mesurement of fruit strength in red raspberry. *Hortscience* 21: 1054-1055.
- Robertson, G. W., D. W. Griffiths, J. A. T Woodford and A. N. E. Birch (1995)** Changes in the chemical composition of volatiles released by the flowers and fruits of the red raspberry (*Rubus idaeus*) cultivar Glen prosen. *Phytochemistry* 38 (5):1175-1179.
- Rutz, J. K., G. B. Voss and R. C. Zambiasi (2012)** Influence of the degree of maturation on the bioactive compounds in blackberry (*Rubus* spp.) cv. Tupy. *Food and Nutrition Science* 3: 1453-1460.
- Salas Salazar., N. A., F. J. Molina Corral, D. I. Berlanga Reyes, A. Romo Chacón y G. I. Olivas (2011)** La fecha de cosecha y la síntesis de compuestos volñátiles en frutos almacenados de mazanos ‘Golden Delicious’ y ‘Red Delicious’. *Rev. Fitotec. Mex.* 34: 257-267.
- Salinas-Moreno, Y., G. Almaguer-Vargas, G. Peña-Varela y R. Ríos-Sánchez (2009)** Ácido elágico y perfil de antocianinas en frutos de frambuesa (*Rubus idaeus* L.) con diferente grado de maduración. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 15(1): 97-101.
- Sánchez-Valle V. y N. Méndez-Sánchez (2013)** Estrés oxidativo, antioxidantes y enfermedad. *Rev. Invest. Med. Sur Méx.* 20 (3):161-168.
- Šavikin, K., G. Zdunic, T. Jankovic, S. Tasic, N. Menkovic, T. Stevic and B. Dordevic (2009)** Phenolic content and radical scavenging capacity of berries and related jams from certificated area in Serbia. *Plant Foods Hum. Nutr.* 64:212-217.
- Seeram, N. P. (2008)** Berry Fruits: Compositional Elements, Biochemical Activities and the Impact of Their Intake on Human Health, Performance and Disease. *J. Agric and Food Chem.* 56: 627-629.
- Seeram, N. P., L. S. Adams, Y. Zhang, R. Lee, D. Sand, H. Scheuller and D. Heber (2006)** Blackberry, Black Raspberry, Blueberry, Cranberry, Red Raspberry, and Strawberry

- extracts Inhibit Growth and Stimulate Apoptosis of Human Cancer Cells In Vitro. *J. Agric. Food Chem.* 54: 9329-9339.
- SEMARNAT, Secretaría de Medioambiente y Recursos Naturales (2003)** Norma Oficial Mexicana (NOM-021-RECNAT 2000), que establece especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis. Diario Oficial (Segunda Sección), 23 de abril de 2003. México, D.F. 75 p.
- Sexton R., J. M. Palmer, N. A. Whyte and S. Littlejohns (1997)** Cellulase, fruit softening and abscission in red raspberry *Rubus idaeus* L. cv Glen Clova. *Annals of Botany* 80: 371-376.
- SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (2016)** Cierre de la producción agrícola por año, estado y por cultivo (<http://www.siap.gob.mx> Consultado: Febrero, 2016).
- Siriwoharn, T. and R. E. Wrolstad (2004)** Polyphenolic composition of Marion and Evergreen blackberries. *Journal of Food Science.* 69(4): 233-240.
- Stavang, J. A., S. Freitag, A. Foito, S. Verrall, O. M. Heide, D. Stewart and A. Sønsteby (2015)** Raspberry fruit quality changes during ripening and storage as assessed by colour, sensory evaluation and chemical analyses. *Scientia Horticulturae* 195: 216-225.
- Steffen, A. and J. Pawliszyn (1996)** Analysis of flavor volatiles using headspace solid-phase microextraction. *J. Agric. Food Chem.* 44: 2187-2193.
- Strack, D. (1997)** Phenolic metabolism. In: Dey, P. M. and J. B. Harborne (eds.). Plant biochemistry. Acad. Press, London, UK. pp. 387-389.
- Tiitinen K., M. Hakala and H. Kallio (2006)** Headspace volatiles from frozen berries of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) varieties. *Eur Food Res Technol* 223: 455–460.
- Tomás-Barberán, F. A. (2003)** Los polifenoles de los alimentos y la salud. *Alim. Nutri. Salud* 10(2): 41-53.
- USDA, United States Department of Agriculture (1999)** Natural Resources Conservation Service. Soil Taxonomy, a basic system of soil classification for making and interpreting soils surveys. 2nd Ed. 871 p.
- Venereo Gutiérrez, J. R. (2002)** Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev. Cubana Med. Milit.* 31 (2):126-133.

- Vera, M. L. (1995)** Efecto de la altitud en la fenología de la floración en especies arbustivas del norte de España. *Lagasalia* 18(1): 3-14.
- Vuorela, S., K. Kreander, M. Karonen, R. Nieminen, M. Hämäläinen, A. Galkin, L. Laitinen, J. P. Salminen, E. Moilanen, K. Pihlaja, H. Vuorela, P. Vuorela and M. Heinonen (2005)** Preclinical evaluation of rapeseed, raspberry, and pine bark phenolics for health related effects. *J. Agric. Food Chem.* 53: 5922-5931.
- Wang, S. Y. and W. Zheng (2001)** Effect of plant growth temperature on antioxidant capacity in strawberry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 49: 4977–4982.
- Wang, S. Y., J. L. Maas, J. A. Payne and G. Galleta (1993)** Ellagic acid content in small fruits, mayhaws, and other plants. *Journal of Small Fruits & Viticulture* 2 (4): 39-49.
- Wang, Y., C. Finn, M. C. Qian (2005)** Impact of growing environmental on Chickasaw blackberry (*Rubus* L.) aroma evaluated by gas chromatography olfactometry dilution analysis. *J. Agric. Food Chem.* 53: 3563-3571.
- Weisberg S. (2005)** Applied linear regression. 3rd Ed. John Wiley & sons, Inc. Minnesota, USA. 336 p.
- Williner, M. R., M. E. Pirovani and D. R. Güemes (2003)** Ellagic acid content in strawberries of different cultivars and ripening stages. *J. Sci. Food Agric.* 83: 842-845.
- Williner, M. R., M. E. Pirovani y D. R. Güemes (2002)** Contenido de ácido elágico en frutillas de Coronada (Santa Fe). *Revista FABICIB* 6:189-194.
- Wilson, T. C. and Hagerman (1990)** Quantitative determination of ellagic acid. *J. Agric. Food Chem.* 38: 1678-1683.
- Zafrilla P., F. Ferreres and F. A. Tomás-Barberán (2001)** Effect of processing and storage on the antioxidant ellagic acid derivatives and flavonoids of red raspberry (*Rubus ideaus*) jams. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 3651-3655.