

Estudio fitoquímico y actividad antioxidante del extracto metanólico de Jiotilla (*Escontria chiotilla*)

SIERRA-ZURITA, Donaji, ZULETA-PRADA, Holber; AGUIRRE-MANDUJANO, Eleazar, REYES-TREJO, Benito y GUERRA-RAMÍREZ, Diana

D. Sierra, H. Zuleta, E. Aguirre, B. Reyes y D. Guerra

‘ Posgrado de Ciencia y Tecnología Agroalimentaria. Universidad Autónoma Chapingo.

‘‘ Área de Química, Departamento de Preparatoria Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, AP 74 Oficina de Correos Chapingo. Km. 38.5 Carretera México-Texcoco. Texcoco, Estado de México, 56230, México.

F. Rérez, E. Figueroa, L. Godínez, J. Quiroz y R. García (eds.) Química, Biología y Agronomía. Handbook T-I. - ©ECORFAN, Texcoco de Mora-México, 2016.

Abstract

En el presente trabajo se logró el aislamiento y caracterización de algunos metabolitos secundarios de los frutos del extracto metanólico de Jiotilla (*Escontria chiotilla*). Además de determinar la capacidad antioxidante del extracto metanólico del fruto. Las propiedades como alimento que los frutos poseen, ha despertado el interés de realizar el estudio fitoquímico de los fruto y evaluar su actividad antioxidante. Hasta hoy, existen escasos estudios realizados. Se utilizó un extracto metanólico del jugo de jiotilla de 96.3 g de material seco liofilizado, obtenido mediante extracciones sucesivas con metanol a temperatura ambiente. La separación de los compuestos se realizó por cromatografía en columna, usando disolventes y mezclas de estos con polaridad variable: hexano, diclorometano, cloroformo, acetona, acetato de etilo y metanol. En las primeras fracciones se aislaron 6 compuestos diferentes, entre los cuales se encuentra una mezcla de ácidos grasos y dos compuestos totalmente puros. La purificación se efectuó mediante cromatografía, recristalización y filtrado de sólidos. Los compuestos aislados, se analizaron a partir del análisis de espectros de ^1H RMN, ^{13}C RMN, DEPT. A partir de los datos espectrales, se encontró que las estructuras químicas de los compuestos corresponden a una mezcla de ácidos (oleico, linoleico y linolénico), el esteroide conocido como β -sitosterol y el ácido málico. Los otros compuestos con alto potencial desde el punto de vista estructural, se encuentran en mezclas a polaridades mayores que se están estudiando actualmente. El contenido de fenoles totales, expresados como mg de EAG g^{-1} de peso seco en pulpa fue de 17.6365 (mg GAEg^{-1} bs) y para el caso del extracto metanólico fue de 7.5592 (mg GAEg^{-1} de extracto).

2 Introducción

La jiotilla (*Escontria chiotilla*) se encuentra taxonómicamente ubicada dentro de la familia Cactaceae, perteneciente al orden *Centrospermae* o *Caryophyllales*, crece en las zonas áridas y semiáridas. Se encuentra distribuida principalmente en los estados de Puebla, Oaxaca, Guerrero y Michoacán.

Actualmente la jiotilla no se cultiva ya que crece de forma silvestre, la época fructificación es en los meses de abril, mayo y junio (Franco-Zavaleta, 2004). Respecto al consumo per cápita, superficie y producción a nivel nacional no se tienen datos oficiales precisos, destacando entre las principales regiones productoras de jiotilla las ya mencionadas: Puebla, Oaxaca, Michoacán y Guerrero. Produce frutos de pulpa roja comestible de sabor agridulce. El color rojo intenso de la pulpa de este fruto. A la fecha estudios acerca de la estructura química y estabilidad de sus betalainas es escasa y no hay literatura sobre estos compuestos en el fruto (Franco-Zavaleta, 2004).

Las betalainas son pigmentos solubles en agua que contiene nitrógeno que se encuentran sólo en un número limitado de plantas, incluyendo el orden de *Caryophyllales*, con peso molecular entre 400 y 500 (Guaadaoui *et al.*, 2014; Fennema, 1995). Algunos betalainas tienen una capacidad de coloración más fuerte que las antocianinas. Curiosamente antocianinas y betalainas son mutuamente excluyentes y nunca han ambas sido halladas en la misma planta (Guaadaoui *et al.*, 2014). Estos pigmentos por lo general se localizan en un orgánulo único de la célula vegetal, la vacuola (Schoefs, 2004; Cabanes *et al.*, 2014).

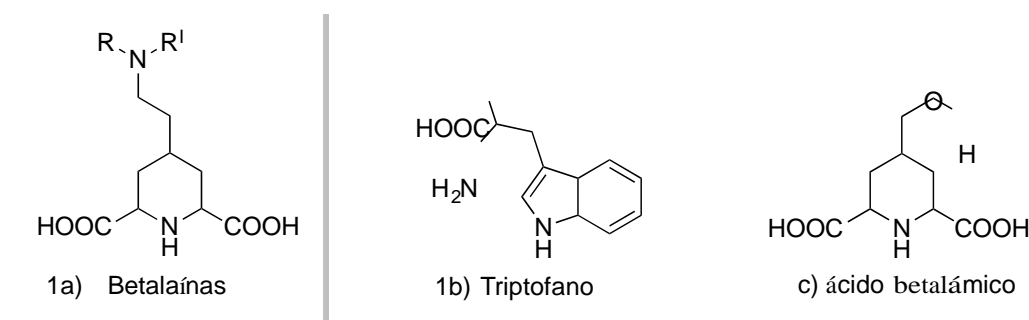
Betalainas son pigmentos solubles en agua, que se pueden dividir en dos grandes grupos: estructurales betacianinas rojo-violeta y betaxantinas amarillas (Cai, *et al.*, 2005:

Castellanos-Santos y M.-Yahia, 2008) conjugadas de la unidad estructural ácido betalámico con aminas libres o compuestos derivados de indolina. La presencia de ambos tipos de pigmentos genera la amplia variedad de tonos que van desde el amarillo pálido a violeta incluyendo el naranja, rojo, rosa y colores característicos de las flores, las frutas, y raíces de plantas que contienen betalaínas (Cabanés *et al.*, 2014).

Al igual que otros fitoquímicos (antocianinas, carotenoides y clorofilas) las betalaínas se utilizan como sustancias colorantes en el procesamiento de alimentos debido a su amplia estabilidad de pH (pH 3-7). También han sido reportadas por sus propiedades antirradicales y una fuerte actividad antioxidante, pueden contribuir a las actividades anti-inflamatorias, en la inhibición de la oxidación de lípidos y la peroxidación y tienen efectos anticancerígenos de las células (Guaadaoui *et al.*, 2014). El principal foco de interés, ha estado recientemente en pigmentos de betalaínas como antioxidantes naturales (Castellanos-Santos y M.-Yahia, 2008).

A la fecha se conocen unas setenta betalaínas y todas ellas poseen la misma estructura básica (Figura 1a), formada por la condensación de una amina primaria o secundaria como el triptófano (Figura 1b) y un aldehído llamado ácido betalámico (Figura 2c) (Franco-Zavaleta, 2004).

Figura 2 Estructura básica de las betalaínas.



Nuestro cuerpo está constantemente expuesto a una variedad de agentes oxidantes y el cuerpo es igualmente incorporado con antioxidantes para atender a los radicales libres generados a partir de los oxidantes manteniendo un equilibrio entre la producción de radicales libres y la neutralización por los antioxidantes. Cuando existe un desequilibrio entre la formación y la neutralización de los radicales libres por los antioxidantes, resulta al estrés oxidativo. El estrés oxidativo ha sido implicado en la etiología de enfermedades tales como cardiovasculares, cáncer de pulmón, entre otras (Azeez, *et al.*, 2012).

Numerosos estudios epidemiológicos llevados a cabo en muchos países indican que una dieta rica en frutas y verduras, retrasa el proceso de envejecimiento y reduce el riesgo de varias enfermedades de estilo de vida, enfermedades cardiovasculares y cáncer, principalmente, así como trastornos, artritis reumatoide, enfermedades pulmonares, de cataratas, la enfermedad de Parkinson o de Alzheimer. Se cree que los compuestos que son en gran parte responsables para aquellos efecto protector son compuestos fitoquímicos y vitaminas C y E, que tiene propiedades antioxidantes (Szajdeck y Borowska., 2008). Este es atribuido principalmente a sus componentes antioxidantes, especialmente vitamina C, carotenoides, compuestos fenólicos, flavonoides, taninos y antocianidinas que son conocidos por poseer la capacidad de eliminar los radicales libres y la peroxidación (Carlo, *et al.*, 2012).

Por lo tanto, este estudio se enfoca en aislar, purificar e identificar estructuras químicas principales del extracto metanólico (polar) y evaluar la actividad antioxidante del mismo, presentes en frutos de jiotilla.

2.1 Materiales y métodos

Materiales

Los frutos de jiotilla se colectaron en la región de la Mixteca Baja Oaxaqueña, en la comunidad de Acaquizapan, municipio de Santiago Chazumba, Oaxaca, en estado de madurez comercial a criterio visual de los nativos del lugar (90 días después de su floración). Después de la recolección, las muestras se transportaron en refrigeración al laboratorio. Posteriormente se congelaron y almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis.

Los reactivos químicos: hexano, acetato de etilo, diclorometano, metanol y acetona, fueron adquiridos en J.T. Baker, S. A. de C. V., Edo. de México, México.

2.2 Métodos

Preparación del extracto metanólico

Se descongelaron los frutos de jiotilla a temperatura ambiente, y se separaron las cáscaras de la pulpa. Se obtuvieron 663.19 gramos de pulpa la cual se liofilizó en un equipo de liofilización LABCONCO (Figura 2.1 a), obteniéndose 96.34 gramos de liofilizado. Al producto liofilizado se le adicionó 600 mL de metanol y se dejó macerar durante tres días, posteriormente se filtró para extracción del residuo sólido, la disolución metanólica se evaporó en un rotavapor Büchi R-3 (Figura 2.1 b) a baja temperatura y alto vacío, esto se repitió cinco veces para finalmente obtener el extracto metanólico con un peso de 58.1 gramos.

Figura 2.1 (a) Liofilización de la pulpa de jiotilla, y (b) evaporación del disolvente



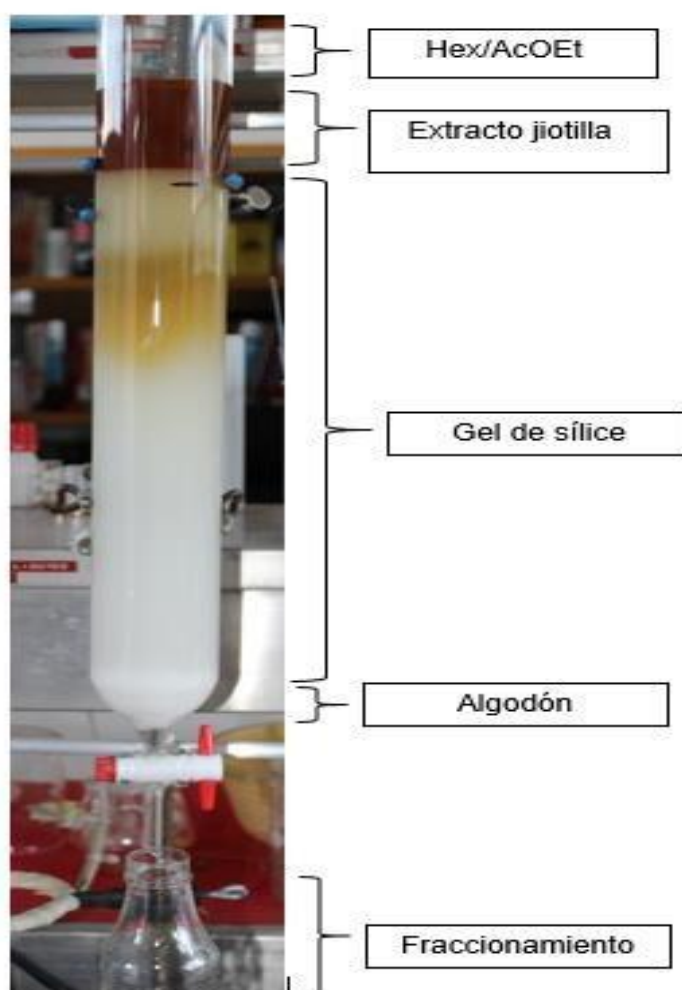
Separación por cromatografía en columna

Se empleó La cromatografía por columna a gravedad (CCG) para la separación de los compuestos del extracto por diferencia de polaridad a través de distintos disolventes. A continuación se describe la preparación de la columna (Figura 2.2):

1. Se utilizaron 55.1 gramos de extracto metanólico, el cual se diluyó en metanol en un matraz bola.

2. Para la preabsorción en sílice, se agregó gel de sílice 60 (0.063-0.200 mm, Merck) y se mezcló dejando la muestra homogénea, posteriormente se evaporó el disolvente en un rotavapor a presión reducida, dejando el extracto seco e impregnando en su totalidad en la sílice
3. El extracto preabsorbido se pulverizó en un mortero para obtener partículas finas.
4. La columna cromatográfica, se preparó colocando un pedazo de algodón en el fondo, para evitar el escape de gel de sílice.
5. La columna de vidrio se empacó aproximadamente hasta la mitad con sílice preabsorbida en hexano aproximadamente en una relación 2:1 p/p (sílice:extracto).
6. Se agregó el extracto impregnado en sílice a la columna.
7. Se empezó la elución, colectando fracciones de 250 mL, usando como eluyente inicial hexano (hex) 100 % y posteriormente mezclas hexano/acetato de etilo (AcOEt) hasta llegar a 100 % AcOEt.
8. La observación de la composición de las fracciones se realizó por cromatografía en placa delgada (CCD), cuando ya no se observaba alguna mancha de interés, se aumentaba la polaridad.

Figura 2.2 Fraccionamiento de extracto de jiotilla en columna cromatográfica, con mezcla de disolvente Hex/AcOEt.



El volumen final fue colocado en tubos de resonancia y se introdujo el tubo con la muestra en el imán del equipo de resonancia magnética nuclear para la toma de espectros de H-RMN y C-RMN. Las estructuras y los perfiles de los compuestos se identificaron por el análisis de las señales y desplazamientos químico observado en el espectro.

Determinación de actividad antioxidante del extracto metanólico

Las muestras de jiotilla fueron molidas en un mortero para homogenizar 0.5 gramos se utilizaron, se mezclaron con metanol al 80 % (10 mL) y se acidificó con HCl al 10 % hasta alcanzar un pH de 3.0 para favorecer su extracción. Posteriormente se sometieron a agitación en un vortex durante 3 minutos a temperatura ambiente, todo el procedimiento se llevó a cabo sin presencia de luz con el fin de evitar la degradación de los compuestos antioxidantes. Después se sometieron a sonicación durante 15 minutos, se colocaron en una incubadora a 150 rpm por 30 minutos, por último se sometieron a centrifugación a 2500 rpm durante 15 minutos, el sobrenadante fue filtrado y aforado a 10 mL con la solución metanol al 80 % y fueron guardados en frascos ámbar para su próximo análisis.

Cuantificación de fenoles totales

La cuantificación de compuestos fenólicos se llevó a cabo mediante el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, llevándose a cabo una oxidación en solución alcalina entre los fenoles presentes de la muestra y el reactivo, dando como resultado una coloración azul (Cicco *et al.*, 2009).

El ácido gálico, compuesto polifenólico, se utilizó como estándar para la elaboración de la curva de calibración. Se utilizó 12.5 mg de ácido gálico y se disolvieron con 1 mL de etanol, se aforó a 25 mL con agua destilada. En una microplaca se prepararon 12 placas con diferentes cantidades de ácido gálico: 0, 40, 80, 120, 160, 200, 240, 280, 320, 360, 400 y 440 y se llevó a un volumen de 1 mL con agua destilada.

En cada uno de los pozos restantes se colocó, 25 μ L de los extractos metanólicos de cada tratamiento de jiotilla, 125 μ L de agua destilada, 20 μ L del reactivo de Folin Ciocalteu diluido y 30 μ L de carbonato de sodio al 30 %. Las muestras se dejaron reposar durante 30 min y posteriormente se leyeron las absorbancias en un equipo Biotek synergy 2 a una longitud de onda de 760 nm. El contenido de fenoles totales se expresó en mg equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra (mg EAG g^{-1}).

2.3 Resultados y discusión

Estudio fitoquímico

De las fracciones de columna (Fracción 13-45) de menor polaridad (1:9) acetato de etilo-hexano se obtuvo una mezcla oleosa translúcida denominado DOJI-C1-F-14. El espectro de resonancia magnética nuclear de protón (1H RMN, 400 MHz, $CDCl_3$) de la mezcla DOJI-C1-F-14. (Figura 5), presenta 11 señales con intensidades significativas, estas señales son características a las que presentan los hidrógenos de los principales componentes en los óleos, o en los triglicéridos. Una comparación con datos reportados en la literatura (Sachi, *et al.*, 1996) demuestra la existencia en la mezcla de las señales características de los aceites vegetales con sus respectivos protones (figura 6). Como puede observarse, en la Tabla 1, los desplazamientos para los diferentes tipos de hidrógenos característicos en las mezclas oleosas de los ácidos insaturados, oleico, linoléico y linolénico, de análisis de diferentes aceites coinciden con las señales encontradas en la mezcla DOJI-C1-F-14.

La atribución general de las señales para este tipo de mezclas han sido bastante estudiadas (Miyake *et al.* 1998), (Knothe y Kenar 2004) y (Kirby *et al.* 2011).

Figura 2.4 Espectro de RMN de ^1H de la mezcla DOJI-C1-F-14

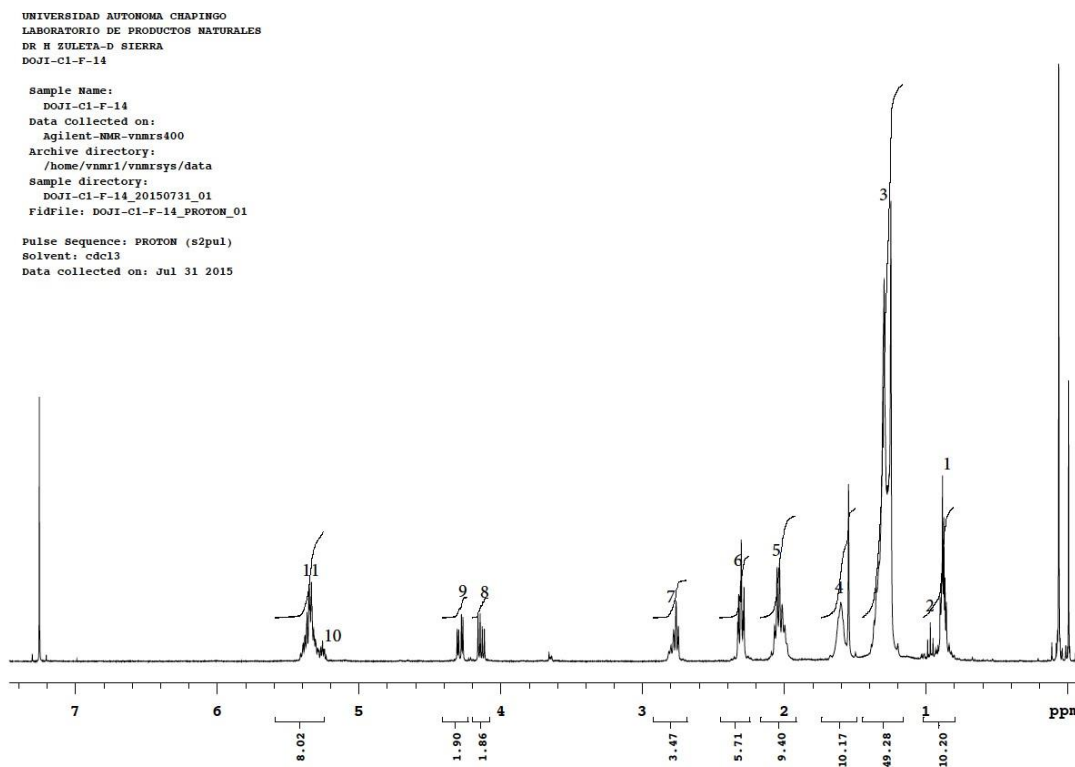


Figura 2.5 Espectro de RMN de ^1H del aceite de andiroba

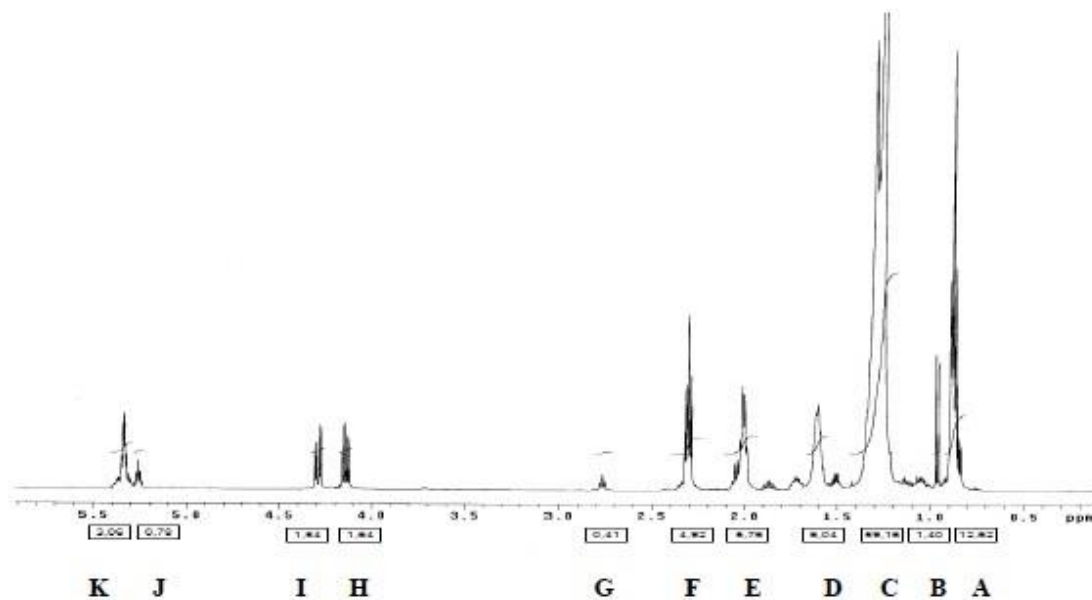


Tabla 2 Desplazamiento químico (δ) y asignación de las principales señales de resonancia en el espectro de ^1H RMN de la mezcla DOJ-C1-F-14.

Señal	(δ) ppm doji-c1-f14	(δ) ppm literatura	Protón (h)	Grupo funcional
A	0.85-0.90	0.83-0.93	$-\text{CH}_3$	Hidrógenos metílicos
B	0.90-1.04	0.93-1.03	$-\text{CH}_3$	Hidrógenos metílicos del
C	1.24-1.36	1.22-1.42	$-(\text{CH}_2)_n-$	Hidrógenos metilénicos de ácidos grasos de
D	1.54-1.60	1.52-1.70	$-\text{OCO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$	Hidrógenos β -carboxílicos
E	1.99-2.06	1.94-2.14	$-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}-$	Hidrógenos alílicos
F	2.28-2.33	2.23-2.36	$-\text{OCO}-\text{CH}_2-$	Hidrógenos α -carboxílicos
G	2.74-2.78	2.70-2.84	$=\text{HC}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{}$	Hidrógenos alílicos internos
H	4.11-4.16	4.10-4.25	$-\text{CH}_2\text{OCOR}-$	Hidrógenos metílicos del
I	4.26-4.30	4.25-4.32	$-\text{CH}_2\text{OCOR}-$	Hidrógenos metílicos del
J	5.32-5.34	5.20-5.26	$-\text{CHOCOR}$	Hidrógenos H-2 metílicos
K	5.32-5.38	5.26-5.40	$-\text{CH}=\text{CH}-$	Hidrógenos olefínicos

Es importante señalar que los aceites vegetales, presentan diferentes proporciones de ácidos grasos saturados (AGS), ácido oleico(omega-9), ácido linoléico (omega-6) y linolénico (omega-3), de manera que las señales resultantes son consecuencia de la sobreposición de protones, formando diferentes desplazamientos químicos y presentan tamaños distintos dependiendo de la proporción de ácidos grasos. Existen métodos analíticos para determinar las proporciones de los diferentes ácidos grasos, a partir del espectro de RMN de ^1H , sin embargo es más útil determinar esta concentración por métodos cromatográficos, esencialmente la cromatografía de masas acoplada a un equipo de espectrometría de masas (CG-EM). Las similitudes se confirman para esta mezcla analizando el espectro de RMN de ^{13}C (figura 2.6). El espectro de carbono 13 (^{13}C RMN 100 MHz, CDCl_3), muestra entre 16 y 19 señales que corresponden al número de carbonos en el rango de la composición de estos en la mezcla oleosa, nuevamente comparando con el espectro RMN de ^{13}C del aceite de andiroba (figura 2.6) podemos confirmar en este perfil por RMN, la presencia de la mezcla de ácidos grasos insaturados mencionadas anteriormente.

Figura 2.6 Espectro de RMN de ^{13}C de la mezcla DOJ-C1-F-14

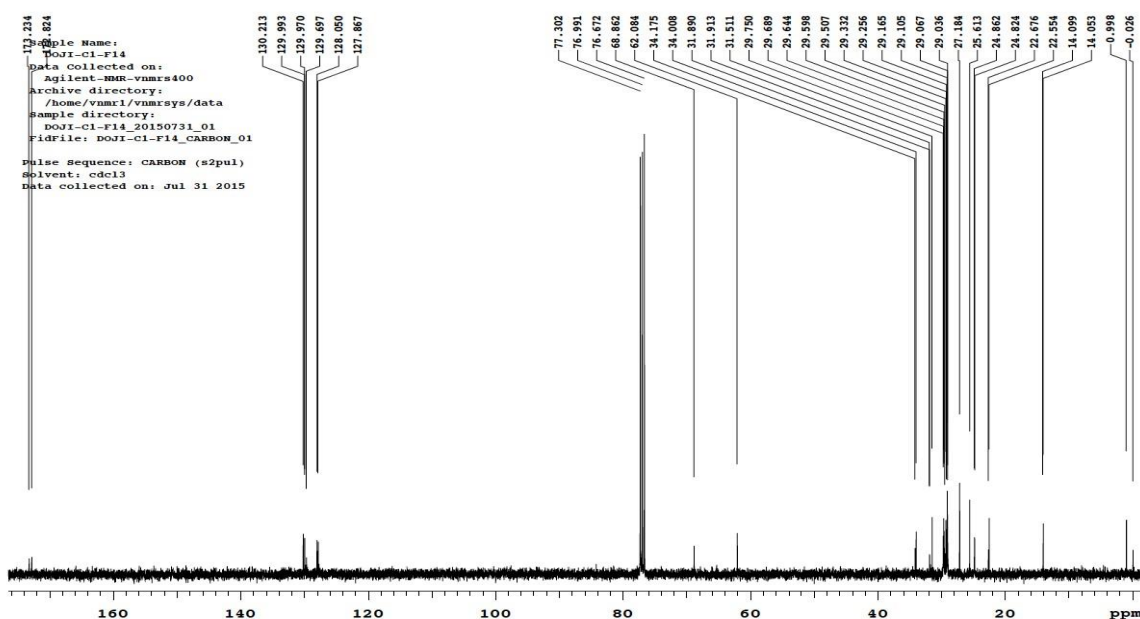
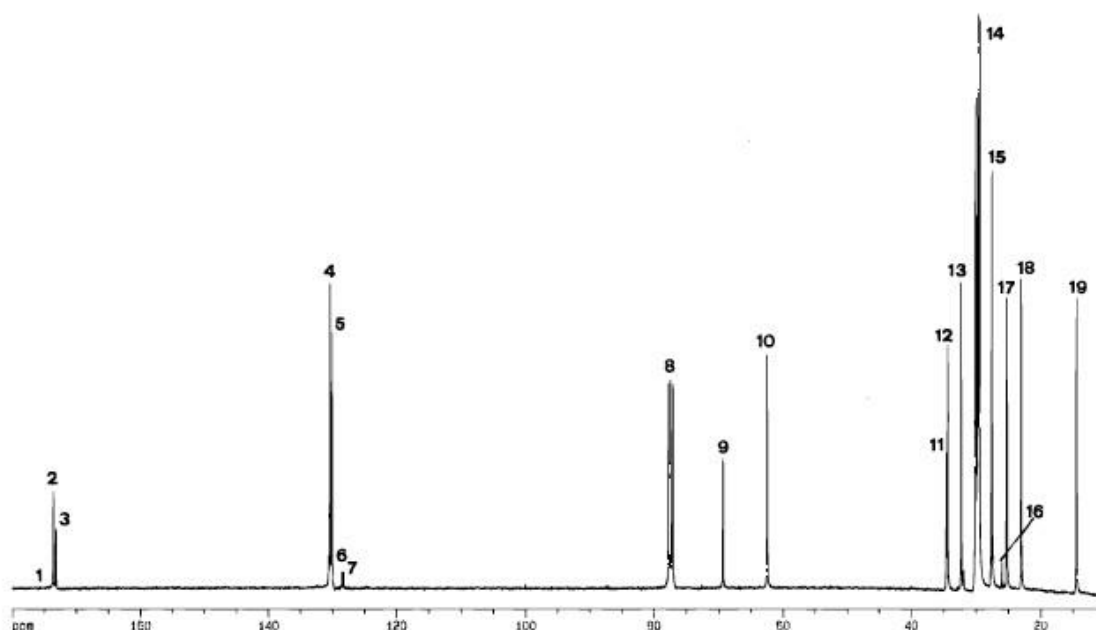
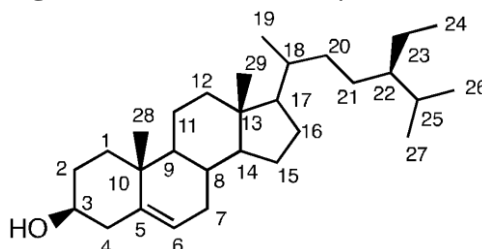


Figura 2.7 Espectro de RMN de ^{13}C del aceite de andiroba

En la fracción de polaridad media, (69-80) se observó un precipitado amorfo de color blanco denominado F-69-80. El compuesto se obtuvo por filtración y se obtuvo como un sólido blanco. De acuerdo al punto de fusión (135-137 °C) y R_f (índice de retención). Se propuso como posible estructura el β -sitosterol (Figura 2.8).

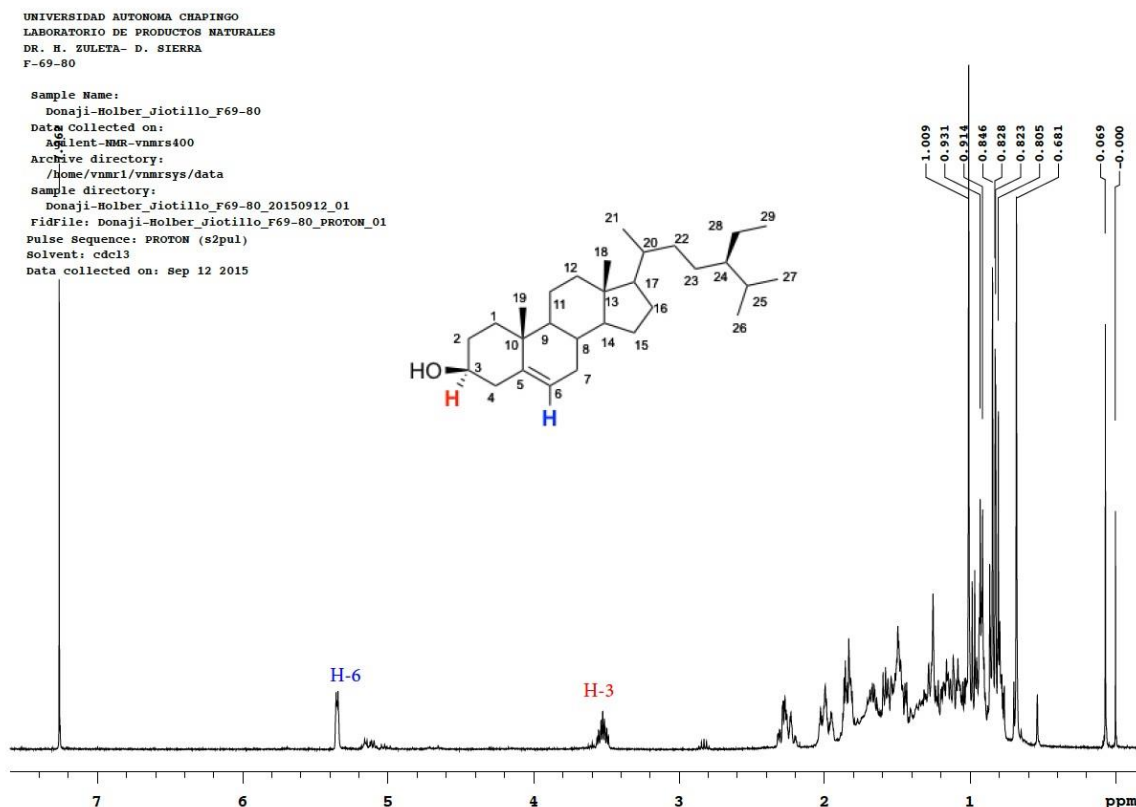
Figura 2.8 Estructura del β -sitosterol.

Este compuesto es muy común en los extractos menos polares de la mayoría de las plantas. Normalmente el procedimiento inicial consiste en comparar el sólido obtenido con una muestra pura, por lo que se realizó una cromatografía de capa delgada (CCD) comparativa, donde se usó como referencia una muestra auténtica de β -sitosterol (marca Sigma-Aldrich). Como se suponía los valores R_f de las muestras fueron exactamente iguales. La confirmación de la estructura se logró totalmente mediante el análisis espectroscópico de ^1H RMN Y ^{13}C RMN.

El espectro de resonancia magnética nuclear de ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) (figura 10) muestra a alta frecuencia dos señales importantes: a δ 5.35 (m, 1H), para un protón vinílico H-6, esta señal es característica de los esteroides, la otra señal relevante es el multiplete a δ 3.52 (m, 1H), asociado al protón base de carbono oxigenado H-3, de nuevo una señal característica en ^1H RMN para los esteroides. El resto de señales presentadas entre 2.32 y 1.41 ppm son asignadas a los protones de los ciclos y los fragmentos de cadena. Se pueden observar las señales de 6 metilos (CH_3), las cuales dos aparecen como singuletes a δ 1.00 (3H, s) y 0.68 (3H, s) correspondientes a los protones de los metilos 18 y 19, en δ 0.92 (3H, d), 0.83 (3H, d) y 0.81 (3H, d) aparecen los dobletes asociados a los metilos 21, 26 y 27.

Finalmente una señal a δ 0.84 (3H, t) corresponde al metilo (CH₃) 29. Estas asignaciones, están de acuerdo para la estructura del β -sitosterol (Chaturvedula y Prakash, 2012).

Figura 2.9 Espectro de RMN de ¹H para el β -sitosterol.

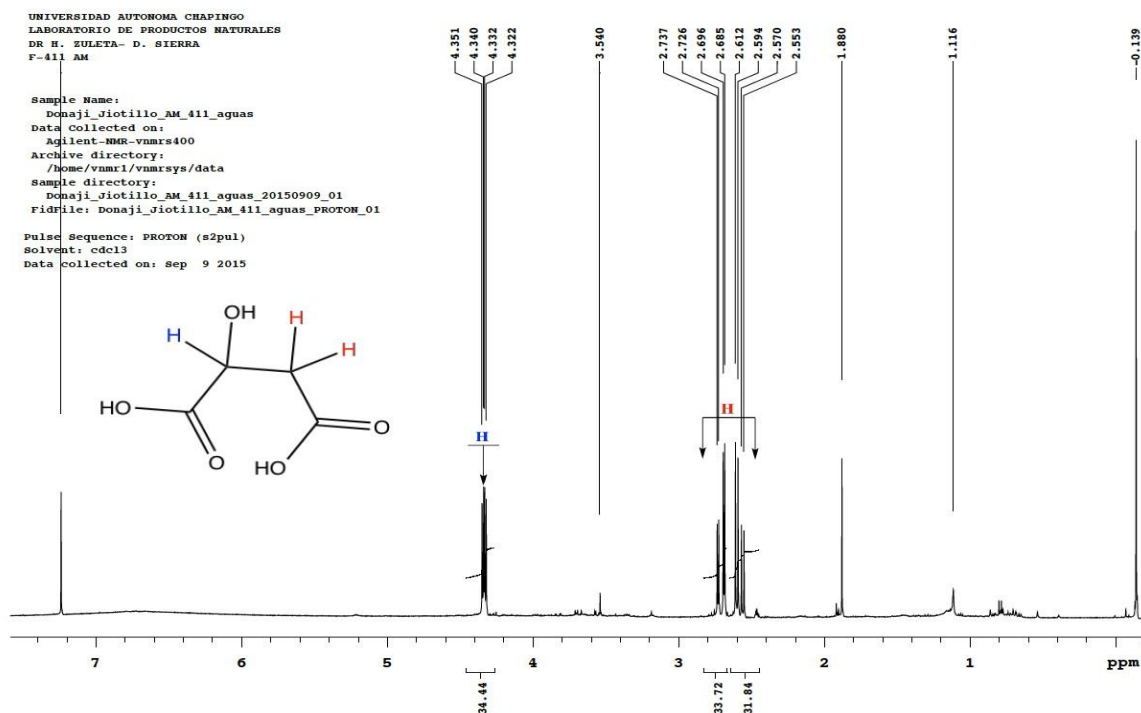


Cabe mencionar que no se profundizara en el análisis del espectro del, carbono ¹³C RMN para el β -sitosterol dado que ya es una estructura conocida y con muchos estudios de este tipo. Por lo tanto con los datos de punto de fusión, R_f y ¹H RMN, se considera suficiente para no tener duda de la estructura propuesta.

De otra de las fracciones eluidas a polaridad media (F-411) de la columna cromatográfica se extrajo un sólido de elución se obtuvo otro sólido de color blanco, el cual se denominó F-144-AM. El sólido amorfo se obtuvo por filtración se obtuvo como un sólido blanco con un punto de fusión de 129-131°C.

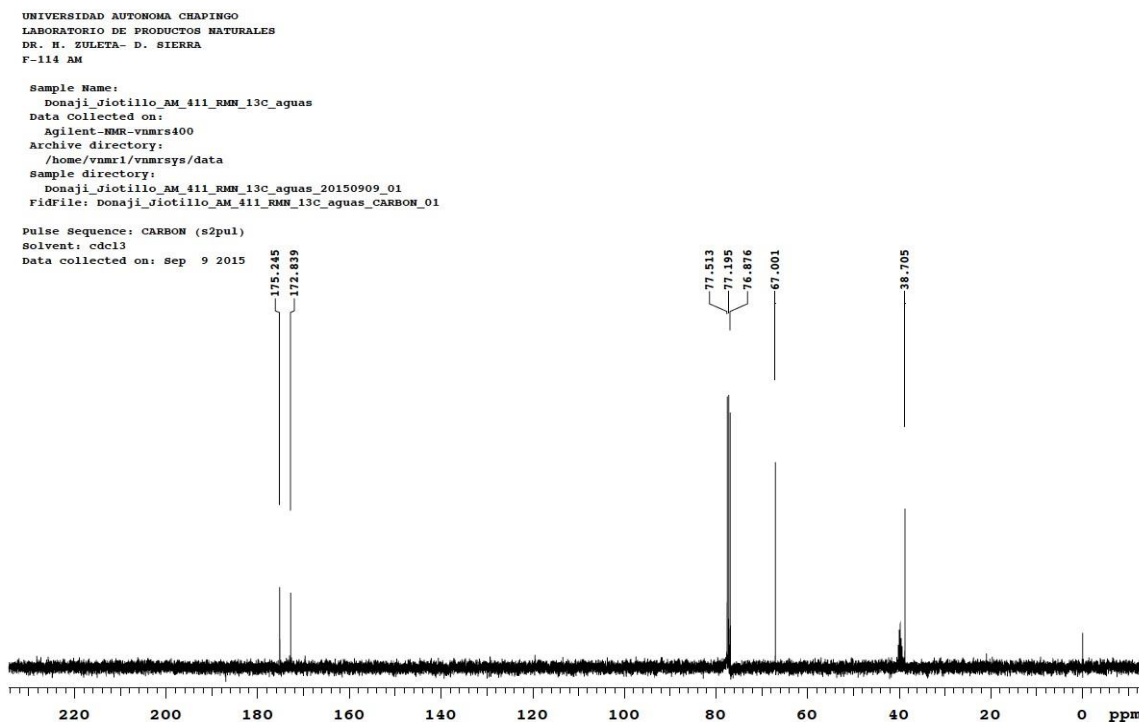
El espectro de resonancia magnética nuclear de ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) (figura 11) muestra 3 conjuntos de señales importantes: a δ 4.33 (m, 1H), para un protón base de alcohol, esta señal es característica de los hidrógenos sobre un carbono que contiene un grupo hidroxilo, otra señal relevante es el multiplete a δ 2.69. (m, 1H), asociado al protón de CH₂ en posición alfa a un carbonilo y la señal a δ 2.57 corresponde a otro protón del CH₂ estas señales son características del ácido málico dada su simplicidad y el número de protones involucrados.

Figura 2.10 Espectro de RMN de ^1H para el ácido Málico



El espectro de carbono 13 (^{13}C RMN 100 MHz, CDCl_3) (figura 2.11), muestra 4 señales, dos señales a δ 175 y δ 172 ppm correspondientes a los carbonilos de los grupos ácidos, una señal a δ 67 ppm corresponde al C-H de metino base de oxígeno, y una señal a δ 38.7 ppm indica la presencia de carbono CH_2 en posición α al carbono que contiene el alcohol y al carbonilo de un grupo ácido, las señales anteriores permiten proponer con precisión la estructura del ácido málico presente en el extracto metanólico de los frutos de Jiotilla.

Figura 2.11. Espectro de RMN de ^{13}C para el ácido Málico



2.4 Conclusiones

Derivado del estudio fitoquímico del extracto metanólico de los frutos de jiotilla se lograron purificar completamente 2 compuestos el β -sitosterol y el ácido málico, por otro lado se obtuvo una mezcla oleosa pura, en donde se pudo detectar mezcla de ácidos oleico, linoleico y linolenico.

En cuanto al contenido de fenoles totales, en pulpa fue de 17.6365 (mg GAEg⁻¹ bs) y para el caso del extracto metanólico fue de 7.5592 (mg GAEg⁻¹ de extracto). El valor de fenoles totales obtenido en pulpa de jiotilla es similar al de pitaya (*Stenocereus stellatus* Riccobono) en diferentes variedades encontrándose en roja (13.843 mg GAE g⁻¹), cereza (15.522 mg GAE g⁻¹), amarilla (21.291 mg GAE g⁻¹) y blanca (23.953 mg GAE g⁻¹) (Beltrán, *et al.*, 2009), indicando que el fruto de jiotilla posee una alta concentración de estos metabolitos secundarios.

2.5 Referencias

- Azeez, L., Adeoye, M. D., Majolagbe, T. A., Lawal, A. T. y Baduri, R. (2012). Antioxidant Activity and Phytochemical Contents of Some Selected Nigerian Fruits and Vegetables. *American Journal of Chemistry*, 2(4): 209-213.
- Beltrán, O., M. C., Oliva, C. T. G., Gallardo, V. T. y Revilla O. G. (2009). Ascorbic acid, phenolic content, and antioxidant capacity of red, cherry, yellow and white types of pitaya cactus fruit (*Stenocereus stellatus* Riccobono). *AGROCIENCIA*, 43: 153-162.
- Cabnes, J., Gandía, H. F., Escribano, J., García C. F. y Jiménez, A. M. (2014). One-Step Synthesis of Betalains Using a Novel Betalamic Acid Derivatized Support. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.
- Cai, Y., Sun, M., y Corke, H. (2005). HPLC Characterization of Betalains from Plants in the Amaranthaceae. *Journal of Chromatographic Science*, Vol. 43.
- Carlo, Tenore, Gian; Novellino, Ettore y Basile, Adriana. 2012. Nutraceutical potential and antioxidant benefits of red pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) extracts. *Journal of functional foods* 4: 129 –136.
- Castellanos, S. E. y M. Y. E. (2008). Identification and Quantification of Betalains from the Fruits of 10 Mexican Prickly Pear Cultivars by High-Performance Liquid Chromatography and Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 56: 5758–5764.
- Cicco, N., Lanorte, M. T., Paraggio, M., Viggiano, M. y Lattanzio, V. (2009). A reproducible, rapid and inexpensive Folin–Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. *Microchemical Journal* 91: 107–110.
- Chaturvedula, V. S. P. and Prakash, I. 2012. “Isolation of Stigmasterol and β -Sitosterol from the dichloromethane extract of *Rubus suavissimus*”. *International Current Pharmaceutical Journal*. (1)9:239-242.
- Fennema O.R. 1995. Química de los alimentos. Segunda edición. Editorial Acribia, Zaragoza, España. Capítulo 10. pp. 773-849.

Franco, Zavaleta, Miriam, E. 2004. Caracterización parcial del pigmento rojo del fruto de la jiotilla (*Escontria chiotilla*); una cactácea subexplotada. Tesis de Maestría en Biotecnología. UAM. México.

Guaadaoui, A., Saddik, R., Bouali, A., Boukhatem, N., Benchat, N. E. y Hamal, A. (2014). Betalains, polyacetylenes and tocopherols as bioactive compounds: A concise review for enriching the bioactivity concept. *International Journal of Nutrition and Food Sciences*.

Kirkby, J. et al. 2011. Role of sulphuric acid, ammonia and galactic cosmic rays in atmospheric aerosol nucleation. *Nature*, 476: 429–433 (25 August 2011) doi:10.1038/nature10343

Knothe, G. and Kenar, J.A. Determination of the fatty acid profile by ^1H NMR spectroscopy. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **106**, 88-96 (2004).

Miyake, Y. Yokomizo, K. and Matsuzaki, N. (1998). Determination of unsaturated fatty acid composition by high-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **75**, 1091-1094.

Sachi, R., Patumi, M., Fontanazza, G., P., Barone, P., Fiordiponti, P., Mannina, L., Rossi, E. y Segre, A.L. (1996). A high field ^1H -nuclear magnetic resonance study of the minor components in virgin olive oils. *J Am Oil Chem Soc*, 73(6):747-58.

Schoefs, B. (2004). Determination of pigments in vegetables. *Journal of Chromatography A*, 1054: 217–226.

Szajdek, A. y Borowska, E. J. (2008). Bioactive Compounds and Health-Promoting Properties of Berry Fruits: A Review. *Plant Foods Hum Nutr*: 63:147–156.