

ASCORBIC ACID, PHENOLIC CONTENT, AND ANTIOXIDANT CAPACITY OF RED, CHERRY, YELLOW AND WHITE TYPES OF PITAYA CACTUS FRUIT (*Stenocereus stellatus* Riccobono)

ÁCIDO ASCÓRBICO, CONTENIDO FENÓLICO, Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LAS VARIEDADES ROJA, CEREZA, AMARILLA Y BLANCA DEL FRUTO DEL CACTUS DE LA PITAYA (*Stenocereus stellatus* Riccobono)

M. Carmen Beltrán-Orozco*, Tzatzil G. Oliva-Coba, Tzayhri Gallardo-Velázquez, Guillermo Osorio-Revilla

¹Departamento de Graduados en Investigación en Alimentos. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional. Prolongación de Carpio y Plan de Ayala. Colonia Santo Tomás. 11340. Delegación Miguel Hidalgo. México D. F., México. (cbeltran@encb.ipn.mx)

ABSTRACT

In order to sustain the growing interest in the consumption of pitaya cactus (*Stenocereus stellatus* Riccobono) fruit as potential neutraceutical food, the total phenolics and ascorbic acid contents were determined in four pitaya cactus fruit types (red, cherry, yellow and white). Total phenol and ascorbic acid concentrations were correlated to the antioxidant capacity ($\mu\text{mol Trolox eq g}^{-1}$ fresh sample). The results showed that the white and yellow types contained a higher amount of phenol compounds and ascorbic acid than the cherry and red types. A linear relationship was found between the fruit antioxidant capacity and the total phenol content ($R^2=0.97$) and ascorbic acid content ($R^2=0.79$), indicating that both of them contribute together to its antioxidant properties, but the contribution of ascorbic acid accounts only for 4-6 % of antioxidant capacity. The antioxidant capacity displayed by the four pitaya types are similar to those reported for some fruits of the *Vaccinium* genus, regarded as the fruits having the highest antioxidant capacity. The consumption of pitaya fruits could provide the same protecting effect against free radicals than berries of the *Vaccinium* genus, reducing risk of chronic diseases; thus pitaya fruits can be considered as potential neutraceutical food.

Keywords: *Stenocereus stellatus* Riccobono, antioxidant capacity, ascorbic acid, nutraceutic, pitaya, total phenolic content.

INTRODUCTION

Evaluation of nutritional components of a food product is not sufficient to understand and evaluate the effects of that food on the organism. It is required as well, to consider a series of microcomponents (phytonutrients), previously known as non-nutritional or secondary components, which include antioxidant compounds (Moure *et al.*, 2001;

RESUMEN

Con el fin de mantener el creciente interés en el consumo del fruto de la pitaya (*Stenocereus stellatus* Riccobono) como alimento nutracéutico potencial, se determinó el contenido fenólico y de ácido ascórbico total en cuatro variedades de frutos de pitaya (roja, cereza, amarilla y blanca). Las concentraciones fenólicas y de ácido ascórbico totales se correlacionaron con la capacidad antioxidante (mmol Trolox eq g^{-1} muestra fresca). Los resultados mostraron que las variedades blanca y amarilla tuvieron mayor contenido de fenoles y de ácido ascórbico que la cereza y la roja. Se encontró una relación lineal entre la capacidad antioxidante del fruto y el contenido de fenoles totales ($R^2=0.97$) y de ácido ascórbico ($R^2=0.97$), lo que indica que ambos contribuyen en sus propiedades antioxidantes; sin embargo, dicha contribución representa sólo 4-6 % de la capacidad antioxidante. La capacidad antioxidante mostrada por las cuatro variedades de pitaya es similar a la de algunos frutos del género *Vaccinium*, considerados como los de mayor capacidad antioxidante. El consumo de frutos de pitaya podría proporcionar el mismo efecto protector contra radicales libres que las bayas del género *Vaccinium*, reduciendo el riesgo de enfermedades crónicas; así, los frutos de la pitaya pueden considerarse como alimento nutracéutico potencial.

Palabras clave: *Stenocereus stellatus* Riccobono, capacidad antioxidante, ácido ascórbico, nutraceutico, pitaya, contenido fenólico total.

INTRODUCCIÓN

L a evaluación de los componentes nutricionales de un producto alimenticio no es suficiente para entender y evaluar los efectos del mismo en el organismo. También es necesario considerar una serie de microcomponentes (fitonutrientes), conocidos previamente como componentes no-nutricionales o secundarios, los cuales incluyen a los compuestos antioxidantes (Moure *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 1996).

* Author for correspondence ♦ Autor responsable.

Received: September, 2007. Approved: November, 2008.

Published as ARTICLE in Agrociencia 43: 153-162. 2009.

Wang *et al.*, 1996). Secondary plant metabolites are found in most of the fruits, vegetables, and teas (Amakura *et al.*, 2000). Plants are the basis of all traditional medicinal therapy (Zheng and Wang, 2001) and in 1992 the positive effect of antioxidants was found in fruit and vegetables (Ames *et al.*, 1993; Hertog *et al.*, 1992, 1993, 1995). Free radicals are the leading cause of degenerative diseases such as several forms of cancer, cardiovascular disease, and neurological diseases (Halliwell, 1994; Yu, 1994). Vegetables and fruits antioxidants work as singlet and triplet oxygen quenchers, free radical scavengers, peroxide decomposers, and enzyme inhibitors (Wang and Lim, 2000). Many of their protective biological effects are derived from their antioxidants functions (Velioglu *et al.*, 1998). There is an increasing interest to know the antioxidant capacity of fruits and vegetables in order to use their potential as nutraceuticals or functional foods.

Pitayo (*Stenocerus stellatus Riccobono*) is a columnar cactus very resistant to drought, which produces edible fruits locally known as pitayas that represent a valuable economic alternative for farmers living in Mexico's semiarid regions. The pitayas commercially available includes the genera: *Hylocereus*, *Pachycereus*, *Stenocereus*, *Carnegiea*, *Machaerocereus* and *Echinocereus* (Bravo and Sánchez, 1991).

In México, the genus *Stenocereus spp.* is represented by about 19 species distributed from Baja California peninsula, along the Pacific basin to the state of Chiapas, and also along the Gulf basin from the state of Tamaulipas to Veracruz. The genus *Stenocereus* is most abundant in the south and southeast of the Trans-Mexican Volcanic Belt. The most important species of this genus, from an economic point of view are: *S. marginatus*, *S. stellatus*, *S. treleasei*, *S. griseus*, *S. fricii*, *S. queretaroensis* and *S. quevedonis* (Granados *et al.*, 1999). The pulp of this fruit is a fresh and sweet food, the nutritional importance of which derives from its high sugar content plus considerable amounts of vitamins B, C and E (Bravo and Scheinvar, 1998).

A number of applications have been developed for the fruit pigments, mainly betalains, and mucilage present in the pulp and mesocarp of these types of fruits (Stintzing *et al.*, 2002). There are reports about the antioxidant capacity and quantification of phenol compounds in pitahaya (*Hylocereus undatus*) (Wybraniec and Mizrahi, 2002). However, few reports were found for the genus *Stenocereus*, which is the most cultivated and popular pitaya-producing cactus in México.

The present study was carried out to quantify the total phenolic and ascorbic acid contents in the pulp of four pitaya types of the genus *Stenocereus stellatus*

Los metabolitos secundarios de las plantas se encuentran en la mayoría de las frutas, verduras, y té (Amakura *et al.*, 2000). Las plantas son la base de toda terapia de medicina tradicional (Zheng y Wang, 2001) y en 1992 se descubrió el efecto positivo de los antioxidantes en frutas y verduras (Ames *et al.*, 1993; Hertog *et al.*, 1992, 1993, 1995). Los radicales libres son la principal causa de enfermedades degenerativas como diversas formas de cáncer y enfermedades cardiovasculares y neurológicas (Halliwell, 1994; Yu, 1994). Los antioxidantes de las frutas y verduras funcionan como supresores del oxígeno singlete y triplete, depuradores de radicales libres, descomponedores de peróxido, inhibidores enzimáticos (Wang and Lim, 2000). Muchos de sus otros efectos biológicos protectores se derivan de sus funciones antioxidantes (Velioglu *et al.*, 1998). Hay un interés creciente por conocer la capacidad antioxidante de frutas y verduras para usar su potencial como alimentos nutracéuticos o funcionales.

El pitayo (*Stenocerus stellatus Riccobono*) es un cactus columnar muy resistente a la sequía, que produce frutos comestibles conocidos localmente como pitayas, los cuales representan una alternativa económica valiosa para los campesinos de las regiones semiáridas de México. Las pitayas disponibles comercialmente incluyen a las de los géneros: *Hylocereus*, *Pachycereus*, *Stenocereus*, *Carnigea*, *Machaerocereus* y *Echinocereus* (Bravo y Sánchez, 1991).

En México, el género *Stenocereus spp.* está representado por aproximadamente 19 especies distribuidas desde la península de Baja California, pasando por la cuenca del Pacífico al estado de Chiapas, y a lo largo de la cuenca del Golfo desde el estado de Tamaulipas hasta Veracruz. El género *Stenocereus* es más abundante en el sur y sureste del Cinturón Volcánico Trans-Mexicano. Las especies más importantes de este género, desde un punto de vista económico, son: *S. marginatus*, *S. stellatus*, *S. treleasei*, *S. griseus*, *S. fricii*, *S. queretaroensis* y *S. quevedonis* (Granados *et al.*, 1999). La pulpa de este fruto es un alimento fresco y dulce, cuya importancia nutricional proviene de su alto contenido de azúcar así como de las cantidades considerables de vitaminas B, C y E (Bravo and Scheinvar, 1998).

Se han desarrollado varias aplicaciones para los pigmentos de los frutos, principalmente betalaínas, y mucílago presentes en la pulpa y el mesocarpo de estos frutos (Stintzing *et al.*, 2002). Existen reportes de la capacidad antioxidante y cuantificación de compuestos fenólicos en la pitaya (*Hylocereus undatus*) (Wybraniec and Mizrahi, 2002). No obstante, se encontraron pocos reportes del género *Stenocereus*, que es el cactus productor de pitaya más cultivado y popular en México.

Riccobono, and to correlate them with the antioxidant capacity of these fruits, to sustain the growing interest about these fruits as potential nutraceuticals foods.

MATERIALS AND METHODS

Fruits

Four types of pitaya were used: yellow, red, cherry and white pulp. Fruits were randomly collected from a commercial orchard in Acatlán de Osorio, state of Puebla, México, 25 d after flower opening, considered by the grower as the best time of harvest maturity. In this mature state the fruits of each type showed the following values: pH (Yellow: 4.09, Red: 4.14, Cherry: 4.30 and White: 4.12); °Brix (Yellow: 9.33, Red: 9.33, Cherry: 9.67 and White: 9.33); and % of reducing sugars (Yellow: 9.50, Red: 8.86, Cherry: 8.93 and White: 9.91).

Ten kilograms of fruit were collected, peeled and the pulp classified by color into yellow, red, cherry and white pulp. The fruit pulp of each color (including seeds) was homogenized and separated in portions of 150 g which were stored at -20 °C in sealed plastic bags until further analysis. Three pulp sample bags of each type were unfrozen overnight and each one analyzed in triplicate, as described below, and averaged. The results for the three sample bags were averaged again and the standard deviation calculated for each type.

Ascorbic acid determination

Ascorbic acid content was determined through xylene-extraction (Ranganna, 1986), using a Perkin Elmer UV/VIS lambda 3 spectrophotometer.

Standard curve

Test tubes were prepared with 0.0, 0.5, 0.75, 1, 1.5 and 2 mL of standard ascorbic acid solution in 3 % H₃PO₄ (0.1 mg mL⁻¹) and made up to 2 mL with 3 % H₃PO₄ solution. Then 2 mL of acetate buffer (pH 4), 3 mL of 2, 6 dichlorophenol indophenol solution (0.0007 M) and 15 mL of xylene were added in rapid succession. Tubes were capped and stirred for 10-15 s. Phase separation was allowed. The xylene phase was extracted and absorbance was measured at 520 nm using xylene as blank.

Sample analysis

From each pitaya pulp type 100 g were ground in 3 % H₃PO₄, making up the volume to 200 mL. This solution was filtered and 2 mL aliquot was transferred to a test tube, adding 2 mL of the acetate buffer solution (pH 4), 3 mL of 2, 6 dichlorophenol indophenol solution (0.0007 M) and 15 mL of xylene in a rapid succession. The tube was capped and stirred for 10-15 s. The xylene phase was extracted and absorbance was read at 520 nm. The absorbance of the sample was measured against a blank prepared as described above, but adding

Este estudio se realizó para cuantificar el contenido fenólico total y de ácido ascórbico en la pulpa de cuatro variedades de pitaya del género *Stenocereus stellatus* Riccobono, así como para correlacionarlas con la capacidad antioxidante de estos frutos, con el fin de mantener el creciente interés en estos frutos como alimentos nutracéuticos potenciales.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se usaron cuatro variedades de pitayas: amarilla, roja, cereza y blanca. Los frutos se seleccionaron aleatoriamente de un huerto comercial en Acatlán de Osorio, estado de Puebla, México, 25 d después de su florecimiento, considerado por el cultivador como el mejor momento de madurez del cultivo. En este estado de maduración los frutos de cada variedad mostraron los siguientes valores: pH (Amarilla: 4.09, Roja: 4.14, Cereza: 4.30 y Blanca: 4.12); °Brix (Amarilla: 9.33, Cereza: 9.67 y Blanca: 9.33); y % de azúcares reductores (Amarilla: 9.50, Roja: 8.86, Cereza: 8.93 y Blanca: 9.91).

Se seleccionaron y pelaron diez kilos de frutos y su pulpa se clasificó según el color en amarilla, roja, cereza y blanca. La pulpa de cada color (incluyendo las semillas) se homogeneizó y separó en porciones de 150 g que se almacenaron a -20 °C en bolsas de plástico selladas para su análisis. Durante la noche se descongelaron tres bolsas muestra de pulpa de cada variedad y cada una se analizó por triplicado, como se describe a continuación, y se promediaron. Los resultados de las tres bolsas muestra se promediaron nuevamente y se calculó la desviación estándar de cada tipo.

Determinación de ácido ascórbico

El contenido de ácido ascórbico se determinó mediante extracción de xileno (Ranganna, 1986), usando un espectrómetro Perkin Elmer UV/VIS lambda 3.

Curva normal estándar

Los tubos de ensayo se prepararon con 0.0, 0.5, 0.75, 1, 1.5 y 2 mL de solución de ácido ascórbico estándar en H₃PO₄ al 3 % (0.1 mg mL⁻¹) y se llevó a 2 mL con una solución de H₃PO₄ al 3 %. Luego Posteriormente, se agregaron 2mL de amortiguador de acetato (pH 4), 3 mL de solución de 2, 6 diclorofenol indofenol (0.0007 M) y 15 mL de xileno en una rápida sucesión. Los tubos se taparon y agitaron 10-15 s. Hubo una fase de separación. La fase de xileno se extrajo y la absorbencia se midió a 520 nm usando xileno como blanco.

Análisis de la muestra

Se trituraron 100 g de pulpa de cada variedad de pitaya en H₃PO₄ al 3 %, llevando el volumen a 200 mL. Esta solución se filtró y la alícuota de 2 mL se transfirió a un tubo de ensayo, añadiendo 2 mL de la solución de amortiguador de acetato (pH 4), 3 mL de solución de 2, 6 diclorofenol indofenol (0.0007 M) y 15 mL de

distilled water instead of the 2,6 dichlorophenol indophenol solution. The ascorbic acid content was expressed in mg acid 100 g⁻¹ sample.

Total phenolic compounds

This determination was carried out according to Singleton and Rossi (1965), using a Perkin Elmer UV/VIS lambda 3 spectrophotometer.

Standard curve

Solutions containing 100, 200, 300, 400 and 500 mg L⁻¹ galic acid were prepared. From each solution 100 µL were transferred to a test tubes adding 100 µL of deionized water, 1mL of the Folin Ciocalteu reagent and 0.8 mL of sodium carbonate solution (7.5 %). Tubes were stirred and allowed to stand in the dark for 30 min. Absorbance at 765 nm was measured against a blank prepared in the same way substituting the galic acid solution by distilled water.

Sample analysis

From each pitaya type 20 g pulp were ground and extracted in 2 % HCl in methanol for 24 h in the dark at room temperature. The extracts were diluted with the same solvent used for extraction in 100 mL and filtered; 100 µL aliquots were transferred to a test tube, adding 100 µL of deionized water, 1 mL of the Folin Ciocalteu reagent and 0.8 mL of sodium carbonate solution (7.5 %). Tubes were stirred and then left to stand for 30 min in the dark. The absorbance was determined at 765 nm against a blank prepared as described above, but changing the Folin Ciocalteu reagent by distilled water. Since the ascorbic acid also shows reaction with the Folin Ciocalteu reagent, the absorbance obtained as explained before, was corrected by the ascorbic acid content as follows: solutions of ascorbic acid with the same concentration found in 20 g of each type of fruit were prepared and the total phenols technique was applied to them. The absorbance obtained corresponding to the ascorbic acid was subtracted from that obtained for the fruit, an the total phenolic content was then calculated and expressed as galic acid equivalent (GAE) per 100 g of dry sample.

Antioxidant capacity

The antioxidant capacity (AC) of the four types of pitaya, was determined as Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) equivalent AC (TEAC) and ascorbic acid equivalent AC (AEAC), following the method described by Fogliano *et al.* (1999) which is based on the formation of a colored cationic DMPD⁺ (N-N-dimethyl-phenylenediamine) radical (purple) in the presence of an oxidizing solution (Fe³⁺). This free radical becomes colorless as a result of the transfer of an hydrogen atom from an antioxidant compound (pitaya sample) or antioxidant standard as Trolox.

DMPD solution (100 mM), was prepared dissolving 209 mg of DMPD in 10 mL of deionized water; 1 mL of this solution was added to 100 mL of 0.1 acetate buffer (pH 5.25), and the colored

xileno en una rápida sucesión. El tubo se tapó y agitó 10-15 s. La fase de xileno se extrajo y la absorbencia se leyó a 520 nm. La absorbencia de la muestra se midió contra un blanco preparado como se descubrió, pero añadiendo agua destilada en lugar de la solución de 2,6 díclorofenol indofenol. El contenido de ácido ascórbico se expresó en mg de ácido 100 g⁻¹ muestras.

Compuestos fenólicos totales

Esta determinación se realizó de acuerdo con Singleton y Rossi (1965), usando un espectrofotómetro UV/VIS Perkin Elmer lambda 3.

Curva normal estándar

Se prepararon soluciones con 100, 200, 300, 400 y 500 mg L⁻¹ de ácido gálico. Se transfirieron 100 µL de cada solución a tubos de ensayo, agregando 100 µL de agua desionizada, 1 mL de reagente de Folin Ciocalteu y 0.8 mL de solución de carbonato de sodio (7.5 %). Los tubos se agitaron y se dejaron reposar 30 min en la oscuridad. La absorbencia a 765 nm se midió contra un blanco preparado de la misma forma, sustituyendo la solución de ácido gálico por agua destilada.

Análisis de la muestra

Se trituraron 20 g de pulpa de cada variedad de pitaya y se extrajeron en HCl al 2 % en metanol por 24 h en la oscuridad a temperatura ambiente. Los extractos se diluyeron con los mismos solventes usados para la extracción en 100 mL y se filtraron aliquotas de 100 µL y se transfirieron de a un tubo de ensayo, añadiendo 100 µL de agua desionizada, 1 mL de reagente de Folin Ciocalteu y 0.8 mL de solución de carbonato de sodio (7.5 %). Los tubos se agitaron y se dejaron en reposo 30 min en la oscuridad. La absorbencia se determinó a 765 nm contra un blanco preparado como ya se describió, pero sustituyendo al reagente de Folin Ciocalteu por agua destilada. Dado que el ácido ascórbico también reacciona con el reagente Folin Ciocalteu, la absorbencia obtenida como ya se explicó, se corrigió con el contenido de ácido ascórbico de la siguiente manera: se prepararon soluciones de ácido ascórbico con la misma concentración encontrada en 20 g de cada variedad de fruto y se les aplicó la técnica de fenoles totales. La absorbencia obtenida correspondiente al ácido ascórbico se sustrajo de la obtenida para el fruto, y el contenido de fenoles totales se calculó y se expresó como equivalente de ácido gálico (GAE) por 100 g de muestra seca.

Capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante (AC) de las cuatro variedades de pitaya se determinó como AC equivalente al Trolox (TEAC) (6-Hidrox-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico) y AC equivalente a ácido ascórbico (AEAC), siguiendo el método descrito por Fogliano *et al.* (1999) que se basa en la formación de un radical catiónico coloreado (morado) de DMPD⁺ (N-N-dimetil-p-fenylenediamina) en presencia

radical cation (DMPD^+) was obtained by adding 0.2 mL of ferric chloride solution (0.05 M).

From this solution 1 mL was directly placed in 1 cm cuvette and its absorbance at 505 nm was measured, corresponding to the uninhibited signal (A_0). Solutions of the antioxidant standard Trolox were prepared diluting with methanol a solution of 1 mg mL^{-1} of Trolox (0.1 g in 100 mL of methanol) to suitable concentrations. 50 mL of the Trolox standard solutions were added to 950 mL of the colored radical DMPD^+ solution. The mixture was stirred for 10 min, and the absorbance at 505 nm was measured (A_f). A dose-response curve was derived for Trolox, by plotting the absorbance at 505 nm as percentage of the absorbance of the uninhibited radical cation solution (blank) using the following equation: Inhibition of A_{505} (%) = $(1-A_f/A_0) \times 100$, where A_0 is the absorbance of the uninhibited radical cation and A_f is the absorbance measured 10 min after the addition of the antioxidant standard solutions of Trolox or the antioxidant in the extract of pitaya samples.

For the AEAC, ascorbic acid standard solutions were prepared in deionized water and used in the same way as described for Trolox standard solutions.

Sample analysis

5 g of sample were ground and extracted with water for 1 h at room temperature in an orbital stirrer. The extract was diluted to 100 mL, and then centrifuged for 15 min at 40 g. An aliquot (50 μL) was taken from the supernatant and were added to 950 μL of the colored DMPD^+ solution in a 10 mm cuvette. This was stirred for 10 min and absorbance was measured at 505 nm (A_f). The total AC of the pulp from the 4 pitaya types was reported as $\mu\text{mol Trolox eq g}^{-1}$ sample.

The results obtained for the TEAC were correlated with both, galic acid equivalent (GAE) as an indicator for the total phenolic content and ascorbic acid content to obtain the contribution of each one to the total AC.

RESULTS AND DISCUSSION

Results of ascorbic acid content in the pulp of the four pitaya types studied are shown in Table 1. The ascorbic acid content in the pitaya types, per 100 g edible pulp, accounts for 21 % of the recommended daily intake of ascorbic acid in adults (60 mg d^{-1}) (Muñoz *et al.*, 2002).

Ascorbic acid content for the four pitaya types varied between 8 and 14 mg 100 g^{-1} with a mean of 13 mg 100 g^{-1} , which is similar to the following fruits: capulin (*Prunus serotina* Cav.) 13 mg 100 g^{-1} ; chicozapote (*Manilkara sapota* L.) 12 mg 100 g^{-1} ; banana (*Musa paradisiaca* L.) 13 mg 100 g^{-1} ; and yellow plum (*Prunus domestica* L.) 12 mg 100 g^{-1} . The vegetables with a similar ascorbic acid supply include: zucchini (*Cucurbita pepo* L. var melopepo) 13 mg 100 g^{-1} ; chayote (*Sechium edule* L.) 12 mg 100 g^{-1} ; cucumber

de una solución oxidante (Fe^{3+}). Este radical libre se vuelve incoloro como resultado de la transferencia de un átomo de hidrógeno de un compuesto antioxidante (muestra de pitaya) o estándar antioxidante como Trolox.

La solución de DMPD (100 mM) se preparó disolviendo 209 mg de DMPD en 10 mL de agua desionizada; se agregó 1 mL de esta solución a 100 mL de amortiguador de acetato 0.1 (pH 5.25), y el catión radical coloreado (DMPD^+) se obtuvo al agregar 0.2 mL de solución de cloruro férrico (0.05 M).

Se colocó 1 mL de esta solución directamente en una cubeta de 1 cm y se midió su absorbencia a 505 nm, correspondiente a la señal no inhibida (A_0). Las soluciones estándar del antioxidante Trolox se prepararon diluyendo con metanol una solución de 1 mg mL^{-1} de Trolox (0.1 g en 100 mL de metanol) a concentraciones adecuadas. Se añadieron 50 mL de las soluciones estándar de Trolox a 950 mL de la solución del radical coloreado DMPD^+ . La mezcla se agitó 10 min y se midió la absorbencia a 505 nm (A_f). Se derivó una curva de dosis-respuesta para Trolox, determinando la absorbencia a 505 nm como porcentaje de la absorbencia de la solución del catión radical no inhibido (blanco) con la siguiente ecuación: Inhibición de A_{505} (%) = $(1-A_f/A_0) \times 100$, donde A_0 es la absorbencia del catión radical no inhibido y A_f es la absorbencia medida 10 min después de haber agregado las soluciones estándar del antioxidante Trolox o el antioxidante en el extracto de las muestras de pitaya.

Para la AEAC, las soluciones estándar de ácido ascórbico se prepararon en agua desionizada y se usaron de la misma manera como se hizo con las soluciones estándar de Trolox.

Análisis de la muestra

Se trituraron y extrajeron 5 g de muestra con agua por 1 h a temperatura ambiente en un agitador orbital. El extracto se diluyó a 100 mL, y se centrifugó 15 min a 40 g. Se tomó una alícuota (50 μL) del supernatante y se añadieron a 950 μL de la solución del DMPD^+ coloreado en una cubeta de 10 mm. Esto se agitó 10 min y la absorbencia se midió a 505 nm (A_f). La AC total de la pulpa de las cuatro variedades de pitaya se presentó como $\mu\text{mol Trolox eq g}^{-1}$ muestra.

Los resultados obtenidos para TEAC se correlacionaron con el equivalente de ácido gálico (GAE) como indicador para el contenido de fenoles totales, así como con el contenido de ácido ascórbico para obtener la contribución de cada uno de éstos en la AC total.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados del contenido de ácido ascórbico en la pulpa de las cuatro variedades de pitaya estudiadas se muestran en el Cuadro 1. El contenido de ácido ascórbico en las variedades de pitaya, por 100 g de pulpa comestible, representa 21 % de la ingesta diaria de ácido ascórbico recomendada para adultos (60 mg d^{-1}) (Muñoz *et al.*, 2002).

El contenido de ácido ascórbico para las cuatro variedades de pitaya varió entre 8 y 14 mg 100 g^{-1} con

Table 1. Ascorbic acid content in red, cherry, yellow and white types of pitaya (*Stenocereus stellatus* Riccobono).**Cuadro 1.** Contenido de ácido ascórbico en las variedades de pitaya roja, cereza, amarilla y blanca.

Types	Ascorbic acid (mg 100 g ⁻¹) [†]
Red	10.25 ± 0.25
Cherry	8.49 ± 0.25
Yellow	17.04 ± 0.30
White	14.56 ± 0.25

[†]Data expressed as mg 100 g⁻¹ of fresh pulp (mean ± SD; n=3) ♦ Información expresada como mg 100 g⁻¹ de pulpa fresca (media ± SD; n=3).

(*Cucumis sativus* L.) 13 mg 100 g⁻¹; white onion (*Allium cepa* L.) 12 mg 100 g⁻¹; and avocado (*Persea americana* L.) 14 mg 100 g⁻¹ (Muñoz *et al.*, 2002). Besides, the cherry and yellow types of pitaya show the lowest and highest ascorbic acid content.

The total phenolic content corrected by ascorbic acid showed considerably variation between the four fruit types (Table 2). Opposed to what it was expected, the red and cherry types showed a lower total phenolic compounds than the yellow and white types. Thus the red and cherry types have similar content of total phenols (1384-1552 GAE) are at the lower end; the yellow and white types also have similar total phenols content (2129-2395 GAE) but considerably higher.

The total phenolic content in the red and cherry types (1384 to 1552 GAE) is similar to that of fruits with a high antioxidant activity derived from their content of phenol compounds: apple (*Malus pumila*) 1300-1310 GAE, and strawberry (*Fragaria ananassa*) 1600 to 1800 GAE. The yellow and white types (2129 and 2395 GAE) are similar to cranberry (*Vaccinium oxycoccus*) 2200 GAE, raspberry (*Rubus idaeus*) 2700-2900 GAE, being lower than bilberry (*Vaccinium myrtillus*) 3003-3800 GAE, which is regarded as one

Table 2. Total phenolic content in red, cherry, yellow and white types of pitaya (*Stenocereus stellatus* Riccobono).**Cuadro 2.** Contenido fenólico total en las variedades de pitaya roja, cereza, amarilla y blanca (*Stenocereus stellatus* Riccobono).

Types	GAE (mg galic acid eq 100 g ⁻¹ dry sample) [†]
Red	1384.3 ± 10.4
Cherry	1552.2 ± 37.0
Yellow	2129.1 ± 5.5
White	2395.3 ± 42.6

[†]Concentration based upon galic acid as standard (mean±SD for n=3) ♦Concentración basada en ácido gálico como estándar (media ± SD for n=3).

una media de 13 mg 100 g⁻¹, el cual es semejante al de los siguientes frutos: capulín (*Prunus serotina* Cav.) 13 mg 100 g⁻¹; chicozapote (*Manilkara sapota* L.) 12 mg 100 g⁻¹; banano (*Musa paradisiaca* L.) 13 mg 100 g⁻¹; y ciruela amarilla (*Prunus domestica* L.) 12 mg 100 g⁻¹. Los vegetales con aporte similar de ácido ascórbico incluyen: calabacín (*Cucurbita pepo* L. Var melopepo) 13 mg 100 g⁻¹; chayote (*Sechium edule* L.) 12 mg 100 g⁻¹; pepino (*Cucumis sativus* L.) 13 mg 100 g⁻¹; cebolla blanca (*Allium cepa* L.) 14 mg 100 g⁻¹; y aguacate (*Persea americana* L.) 14 mg 100 g⁻¹ (Muñoz *et al.*, 2002). Además, las variedades de pitaya cereza y amarilla muestran el menor y mayor contenido de ácido ascórbico.

El contenido fenólico total corregido por ácido ascórbico mostró una variación considerable entre cuatro variedades del fruto (Cuadro 2). Contrario a lo esperado, las tipos roja y cereza mostraron compuestos fenólicos totales más bajos que los variedades amarilla y blanca. Así, las variedades roja y cereza tienen contenidos de fenoles totales similares que se ubican en el extremo inferior (1384-1552 GAE); las variedades amarilla y blanca tienen también contenidos de fenoles totales semejantes (2129-2395 GAE), pero considerablemente más elevados.

El contenido fenólico total en las variedades roja y cereza (1384 a 1552 GAE) es similar al de los frutos de alta actividad antioxidante proveniente de su contenido de compuestos fenólicos: manzana (*Malus pumila*) 1600 a 1800 GAE y fresa (*Fragaria ananassa*) 1600 a 1800 GAE. Las variedades amarilla y blanca (2129 y 2395 GAE) son semejantes al arándano (*Vaccinium myrtillus*) 3003-3800 GAE, considerado como uno de los frutos con mayor poder antioxidante por su alto contenido fenólico (Kähkönen *et al.*, 2001).

La CA para las cuatro variedades de pitaya estudiadas, expresada como TEAC, fue considerablemente mayor (16.8-17.3 µmol g⁻¹) para las variedades amarilla y blanca que para las variedades roja y cereza (11-12.2 µmol g⁻¹) de acuerdo con el contenido fenólico total (Cuadro 3). Para las cuatro variedades de pitaya, TEAC varió entre 11 y 17.3 µmol g⁻¹, que es comparable a: muestra comestible de col (*Brassica oleracea*) 17.7 µmol Trolox eq g⁻¹; muestra comestible de fresa (*Fragaria ananassa*) 15.4 µmol Trolox eq g⁻¹ de; y muestra comestible de espinaca (*Spinacia oleracea*) 12.6 µmol Trolox eq g⁻¹ (Pellegrini *et al.*, 2003). Comparados con la baya de género *Vaccinium*, considerado como el fruto con la mayor CA, las variedades de pitaya amarilla y blanca mostraron una CA (16.8-17.3 µmol g⁻¹) equivalente al valor más bajo reportado para *Vaccinium corymbosum* (17.0 µmol g⁻¹ ± 1.0 µmol Trolox eq g⁻¹), mientras que la CA de las variedades de pitaya roja y cereza (11-12.2 µmol g⁻¹)

of the fruits with the highest antioxidant power due to its high phenolic content (Kähkönen *et al.*, 2001).

The AC for the four pitaya types studied, expressed as TEAC, was considerably higher ($16.8\text{--}17.3 \mu\text{mol g}^{-1}$) for the yellow and white types than that of the red and cherry types ($11\text{--}12.2 \mu\text{mol g}^{-1}$) in agreement with the total phenolic content in (Table 3). For the four pitaya types TEAC varied between 11 and $17.3 \mu\text{mol g}^{-1}$ which is comparable to: cabbage (*Brassica oleracea*) $17.7 \mu\text{mol Trolox eq g}^{-1}$ of edible sample; strawberry (*Fragaria ananassa*) $15.4 \mu\text{mol Trolox eq g}^{-1}$ edible sample; and spinach (*Spinacia oleracea*) $12.6 \mu\text{mol Trolox eq g}^{-1}$ edible sample (Pellegrini *et al.*, 2003). Compared to the *Vaccinium* genus berry, considered the fruit with the highest AC, the yellow and white pitaya types showed an AC ($16.8\text{--}17.3 \mu\text{mol g}^{-1}$) equivalent to the lowest value reported for *Vaccinium corymbosum* ($17.0 \mu\text{mol g}^{-1} \pm 1.0 \mu\text{mol Trolox eq g}^{-1}$), whereas the AC of the red and cherry pitaya types ($11\text{--}12.2 \mu\text{mol g}^{-1}$) was similar to the Climax type of *Vaccinium ashei* (13.9 ± 4.1) (Prior *et al.*, 1998).

Based on the results obtained for ascorbic acid, total phenols and AC, pitaya fruits can be regarded as functional food, since besides their nutrients, they have an excellent AC. Therefore, consumption of these fruits could provide protecting effects against free radicals, reducing risk of chronic diseases. According to Bickford *et al.* (1997), fruits rich in antioxidant phytochemicals, like strawberry and *Vaccinium* berries, have a beneficial effect delaying the deficiencies in the central nervous system that occur when these cells age, besides protecting the organism from oxidizing stress (Bickford *et al.*, 1997). Thus pitaya consumption, with an AC within the range reported for *Vaccinium* berries, may have the potential of producing the same effect. However, further *in vivo* studies on the pitaya AC are required. Prior *et al.* (1998) also reported that an increase in the blood plasma AC occurs with an intake of 3–4 mmol Trolox eq d⁻¹, equivalent to a daily intake of 4 to 5 cherry or red pitaya fruits, or 3 to 4 white or yellow pitaya fruits.

A linear relationship ($R^2=0.97$) was found between the total phenolic content of the four pitaya types and the AC of the fruit (Figure 1). This high coefficient suggests that phenol components represent a significant contribution to the pitaya. This regression equation (Figure 1) can be used to calculate the antioxidant capacity of this fruit from its phenol content. In Figure 1, the cherry and red types lie at the lower end of the total phenol content, and hence of TEAC, whereas the yellow and white types show the highest TEAC concentrations corresponding to the higher AC.

There was a linear relationship ($R^2=0.79$) between ascorbic acid content and the AC for the four pitaya

Table 3. Antioxidant capacity (TEAC) in red, cherry, yellow and white types of pitaya (*Stenocereus stellatus* Riccobono).

Cuadro 3. Capacidad antioxidante (TEAC) en las variedades de pitaya roja, cereza, amarilla y blanca (*Stenocereus stellatus* Riccobono).

Types	TEAC (mg g ⁻¹) [†]	TEAC (mmol g ⁻¹) [†]
Red	2763.2 ± 50.7	11.0 ± 0.20
Cherry	3047.1 ± 38.2	12.2 ± 0.15
Yellow	4202.1 ± 52.1	16.8 ± 0.21
White	4336.8 ± 36.3	17.3 ± 0.14

[†] Concentration based upon Trolox as standard (mean \pm SD; n=3)

◆ Concentración basada en Trolox como estándar (media \pm SD para n=3).

fue similar al tipo Climax de *Vaccinium ashei* (13.9 ± 4.1) (Prior *et al.*, 1998).

A partir de los resultados obtenidos para ácido ascórbico, fenoles totales y CA, los frutos de pitaya pueden considerarse como alimento funcional, ya que además de sus nutrientes, tienen una CA sobresaliente. Por ello, el consumo de estos frutos puede proporcionar efectos de protección contra radicales libres, reduciendo el riesgo de enfermedades crónicas. Según Bickford *et al.* (1997), los frutos ricos en fitoquímicos antioxidantes, como la fresa y las bayas *Vaccinium*, tienen un efecto benéfico que retrasa las deficiencias en el sistema nervioso central que tienen lugar cuando estas células envejecen, además de que protegen al organismo del estrés oxidante (Bickford *et al.*, 1997). Por tanto, el consumo de pitaya, con una CA dentro de la variación reportada para las bayas *Vaccinium*, puede tener el potencial para producir el mismo efecto. Sin embargo, se requieren más estudios *in vivo* acerca

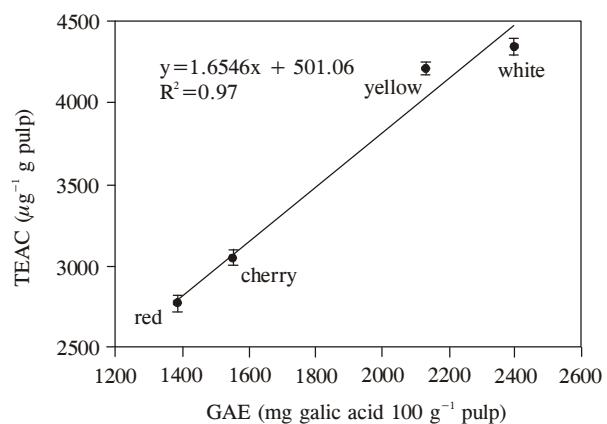


Figure 1. Antioxidant capacity and total phenolics content of red, cherry, white and yellow types of pitaya (*Stenocereus stellatus* Riccobono).

Figura 1. Capacidad antioxidante y contenido fenólico total de los variedades de pitaya roja, cereza, blanca y amarilla (*Stenocereus stellatus* Riccobono).

types studied (Figure 2). This coefficient suggests that pitaya's ascorbic acid contents makes a lower contribution to the fruit AC as compared that of the total phenolic content. This assumption can be corroborated if the ascorbic acid content of each pitaya type (Table 2) is subtracted from the total AC expressed as AEAC (Table 4).

The ascorbic acid content in each fruit type accounts only for about 4 to 6 % of the total AC (Table 4), corroborating the assumption that the main contribution to the total AC is due to phenols and other compounds. Based on this, those fruit types with larger concentrations of phenols will show a higher AC as is the case of the yellow and white fruit types.

In Figure 2 it is shown that the cherry and red types, which contain less concentration of ascorbic acid,

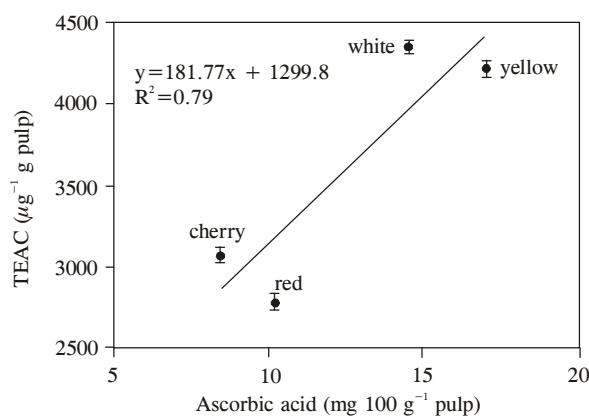


Figure 2. Antioxidant capacity and ascorbic acid content of red, cherry, white and yellow types of pitaya (*Stenocereus stellatus* Riccobono).

Figura 2. Capacidad antioxidante y contenido de ácido ascórbico de las variedades de pitaya roja, cereza, blanca y amarilla (*Stenocereus stellatus* Riccobono).

Table 4. Contribution of ascorbic acid and other compounds to the total antioxidant capacity.

Cuadro 4. Contribución del ácido ascórbico y otros compuestos a la capacidad antioxidante total.

Type	AEAC [†] (mg 100 g ⁻¹)	Ascorbic acid content (mg 100 g ⁻¹) [‡]	Antioxidant capacity due to compounds other than ascorbic acid (mg 100 g ⁻¹)
Red	207.88±27.53	10.25	197.63
Cherry	229.29±23.09	8.49	220.80
Yellow	302.10±28.03	17.04	285.06
White	321.37±14.01	14.56	306.81

[†] Total antioxidant capacity expressed as ascorbic acid equivalent (mean ± SD; n=3) [‡]Capacidad antioxidante por compuestos distintos al ácido ascórbico (mean ± SD; n=3).

[†] Data from Table 1.

de la CA de la pitaya. Prior *et al.* (1998) también reportaron que con el consumo de 3-4 mmol Trolox eq d⁻¹, equivalente a un consumo diario de 4 a 5 frutos de pitaya cereza o roja, o 3 o 4 frutos de pitaya blanca o amarilla, se da un incremento en la CA del plasma sanguíneo.

Se encontró una relación lineal ($R^2=0.97$) entre el contenido fenólico total de las cuatro variedades de pitaya y la CA del fruto (Figura 1). Este elevado coeficiente sugiere que los componentes fenólicos constituyen una contribución importante para la pitaya. Esta ecuación de regresión (Figura 1) puede usarse para calcular la capacidad antioxidante de este fruto a partir de su contenido fenólico. En la Figura 1, las variedades cereza y roja se sitúan en el extremo inferior de contenido fenólico total y por lo tanto de TEAC, mientras que las variedades amarilla y blanca muestran las mayores concentraciones de TEAC que corresponden a la CA superior.

Hubo una relación lineal ($R^2=0.79$) entre contenido de ácido ascórbico y la CA para las cuatro variedades de pitaya estudiadas (Figura 2). Este coeficiente sugiere que la contribución del contenido de ácido ascórbico de la pitaya a la CA del fruto es menor si se compara con la del contenido fenólico total. Esta suposición puede corroborarse si el contenido de ácido ascórbico de cada variedad de pitaya (Cuadro 2) se sustraen de la CA total expresada como TEAC (Cuadro 4).

El contenido de ácido ascórbico en cada variedad del fruto representa aproximadamente sólo 4 a 6% de la CA total (Cuadro 4), lo que corrobora la suposición de que la principal contribución a la CA total proviene de los fenoles y otros compuestos. Con base en esto, las variedades de frutos con concentraciones más altas de fenoles mostrarán una CA superior, como en el caso de los frutos de las variedades amarilla y blanca.

En la Figura 2 se muestra que las variedades cereza y roja, que contienen menos concentración de ácido ascórbico, se ubican en la línea de correlación inferior. Las variedades amarilla y blanca, con las mayores concentraciones de ácido ascórbico, muestran la TEAC más elevada que corresponde a las capacidades antioxidantes superiores.

CONCLUSIONES

Las variedades de *Stenocereus stellatus* Riccobono estudiadas (roja, cereza, amarilla y blanca) mostraron una capacidad antioxidante similar a las del género *Vaccinium*, consideradas como los frutos con mayor capacidad antioxidante. Por lo tanto, el consumo de estos frutos podría proporcionar una protección contra radicales libres semejante a la de las bayas del género

lie at the lower end of correlation line. The yellow and white types, with the highest concentrations of ascorbic acid, show the highest TEAC corresponding to the higher antioxidant capacities.

CONCLUSIONS

The *Stenocereus stellatus* Riccobono types studied (red, cherry, yellow and white) showed an antioxidant capacity similar to that of the *Vaccinium* genus, considered the fruits with the highest antioxidant capacity. Therefore, the consumption of these fruits could provide a similar protection against free radicals than berries of the *Vaccinium* genus. Thus, they could be considered as nutraceutical food.

White and yellow pitaya types showed higher phenolic content than cherry and red types, showing a higher antioxidant capacity. Likewise, the ascorbic acid content of white and yellow pitaya types was higher than the other two pitaya types.

ACKNOWLEDGEMENTS

Financial support is acknowledged to the Secretaría de Investigación y Posgrado del Instituto Politécnico Nacional, México, and grants (EDD, COFAA) given to the authors that made this workpossible.

LITERATURE CITED

- Amakura, Y., Y. Umino, S. Tsuji, and Y. Tonogai. 2000. Influence of jam processing on the radical scavenging activity and phenolic content in berries. *J. Agric. Food Chem.* 48: 6292-6297.
- Ames, B. M., M. K. Shigenaga, and T. M. Hagen. 1993. Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proc. of the National Academy of Sci. U.S.A.* 90: 7915-7922.
- Bickford, P. C., K. Chadman, G. Taglialata, B. Shukitt-Hale, R. L. Prior, G. Cao, and J. A. Joseph. 1997. Dietary strawberry supplementation protects against the age-accelerated CNS effects of oxidative stress. *Fed. Am. Soc. Exp. Biol. J.* 11: A176.
- Bravo, H. H., y M. H. Sánchez. 1991. Las Cactáceas de México, 2nd. ed. UNAM. México, D. F. México. pp: 501-518.
- Bravo, H. H., y L. Scheinvar. 1998. Donde crecen las cactáceas. In: Retif, A. (ed). El Interesante Mundo de las Cactáceas. CONACYT y Fondo de Cultura Económica, México. pp: 9-22.
- Fogliano V., V. Verde, G. Randazzo, and A. Ritieni. 1999. Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines. *J. Agric. Food Chem.* 47: 1035-1040.
- Granados, S. D., B. A. Mercado, y R. G. López. 1999. Las Pitayas de México. Ciencia y Desarrollo 145 (2): 58-67.
- Halliwell, B. 1994. Free radicals and antioxidants. *Nutrition Rev.* 52: 253-265.
- Hertog, M. G. L., P. C. H. Hollman, and M. B. Katan. 1992. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in The Netherlands. *J. Agric. Food Chem.* 40: 2379-2383.
- Hertog, M. G. L., E. J. Feskens, and P. C. H. Hollman. 1993. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study. *Lancet* 342: 1007-1011.
- Vaccinium*. Por ello, pueden considerarse como alimentos nutraceuticos.
- Las variedades de pitaya blanca y amarilla mostraron mayor contenido fenólico que las variedades cereza y roja, mostrando una capacidad antioxidante superior. Asimismo, el contenido de ácido ascórbico de las variedades de pitaya blanca y amarilla fue mayor que en las otras dos.
- Fin de la versión en Español—
- *
- Hertog, M. G. L., D. Kromhout, and C. Aravanis. 1995. Flavonoid intake and long-term risk of coronary-heart-disease and cancer in the 7 countries study. *Arch. Internal Medicine* 155: 381-386.
- Kähkönen, M., A. I. Hopia, and M. Heinonen. 2001. Berry phenolics and their antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* 49: 4076-4082.
- Moure, A., M. Cruz, D. Franco, M. J. Domínguez, J. Siniero, H. Domínguez, J. M. Núñez, and C. J. Pájaro. 2001. Natural antioxidant from residual sources. *Food Chem.* 72: 145-171.
- Muñoz, D. C., S. J. Ledesma, V. A. Chávez, R. F. Pérez-Gil, M. E. Mendoza, L. J. Castañeda, C. Calvo, G. I. Castro, C. C. Sánchez, y C. A. Ávila. 2002. Los Alimentos y sus Nutrientes. Tablas de Valor Nutritivo de Alimentos. Mc Graw Hill Interamericana, México. 203 p.
- Pellegrini, N., M. Serafin, B. Colombi, D. Del Rio, S. Salvatore, M. Bianchi, and F. Brighenti. 2003. Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *The J. Nutr.* 133: 2812-2819.
- Prior, R. L., G. Cao, A. Martin, E. Sofic, J. McEwen, C. O'Brien, N. Lischner, M. Ehlenfeldt, W. Kalt, G. Krewer, and M. C. Mainland. 1998. Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity and variety of *Vaccinium* species. *J. Agric. Food Chem.* 46: 2686-2693.
- Ranganna, S. 1986. Handbook of Analysis and Quality Control for Fruit and Vegetable Products. 2nd ed. Tata Mc Graw Hill Publishing Company Ltd. India. pp: 105-107.
- Singleton, V. L., and J. A. Rossi. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Viticulture* 16: 144-158.
- Stintzing, F. C., A. Schieber, and R. Carle. 2002. Betacyanins in fruits from red-purple pitaya, *Hylocereus polyrhizus* (Weber) Britton & Rose. *Food Chem.* 77: 101-106.
- Velioglu, Y. S., G. Mazza, L. Gao, and B. D. Oomah. 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. *J. Agric. Food Chem.* 46: 413-417.
- Wang, H., G. Cao, and R. L. Prior. 1996. Total antioxidant capacity of fruits. *J. Agric. Food Chem.* 44: 701-705.
- Wang, S. Y., and H. S. Lim. 2000. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and development stage. *J. Agric. Food Chem.* 48: 140-146.
- Wybraniec, S., and Y. Mizrahi. 2002. Fruit flesh betacyanin pigments in *hylocereus* cacti. *J. Agric. Food Chem.* 9: 6086-6089.
- Yu, B. P. 1994. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol. Rev.* 76: 139-162.
- Zheng, W., and S. Y. Wang. 2001. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J. Agric. Food Chem.* 49: 5165-5170.