

# ÁCIDO ELÁGICO Y PERFIL DE ANTOCIANINAS EN FRUTOS DE FRAMBUESA (*Rubus idaeus* L.) CON DIFERENTE GRADO DE MADURACIÓN

Y. Salinas-Moreno<sup>1</sup>; G. Almaguer-Vargas<sup>3</sup>;  
G. Peña-Varela<sup>2</sup>; R. Ríos-Sánchez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Laboratorios de Calidad. Km. 38.5 Carretera México-Texcoco. Chapingo, Estado de México, C. P. 56230. MÉXICO. Correo-e: yolysamx@yahoo.com (<sup>1</sup>Autor responsable)

<sup>2</sup>Departamento de Ingeniería Agroindustrial. Universidad Autónoma Chapingo. Km. 38.5 Carretera México-Texcoco. Chapingo, Estado de México. C. P. 56230. MÉXICO.

<sup>3</sup>Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Km. 38.5 Carretera México-Texcoco. Chapingo, Estado de México, C. P. 56230. MÉXICO.

## RESUMEN

Se determinó el contenido de ácido elágico libre (AEL) y el perfil de antocianinas en frutos de frambuesa (*Rubus idaeus* L.) variedad "Autumn Bliss" con diferente grado de maduración y provenientes de dos localidades. Los análisis de AEL y antocianinas se realizaron mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución en fase reversa (RP-HPLC). Se observó efecto de grado de maduración y localidad en el contenido de AEL. Los frutos de color rojo intenso (grado de maduración 3) de San Mateo Acatitlán, México fueron los de mayor contenido, con un valor de 5.38 mg·kg<sup>-1</sup> de muestra fresca. Por otro lado, el perfil de antocianinas fue más complejo al avanzar la maduración del fruto. En los frutos inmaduros se presentaron únicamente cuatro antocianinas, y en los completamente maduros se tuvieron ocho. De estas, las antocianinas con los mayores porcentajes relativos fueron: cianidina 3-soforósido (46.2 %) y cianidina 3-(2-glucosilrutinosido) (25.9 %). Los niveles máximos de ácido elágico libre y el mayor número de antocianinas se presentan en los frutos de frambuesa completamente maduros, observándose un color rojo intenso, cuando su consumo es recomendable.

**PALABRAS CLAVE ADICIONALES:** frutillas, elagitaninos, grado de maduración, actividad antioxidante.

## ELLAGICACID AND ANTHOCYANIN PROFILES IN FRUITS OF RASPBERRY (*Rubus idaeus* L.) IN DIFFERENT RIPENING STAGES

### ABSTRACT

The content of free ellagic acid (FEA) and the anthocyanin profile were determined in "Autumn Bliss" variety red raspberry fruits (*Rubus idaeus* L.) in different ripening stages and grown in two locations. The FEA and anthocyanins were analyzed by reverse phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC). Ripening stage and growth location affected FEA. The fruits with deep red color (degree 3 ripening) from San Mateo Acatitlán, Mexico, had the highest FEA content, with a value of 5.38 mg·kg<sup>-1</sup> of fresh fruit. The anthocyanin profile was more complex as fruits advanced in maturity. In the immature fruits only four anthocyanins were observed, while in the completely mature fruits there were eight. In the completely mature fruits the anthocyanins with the highest relative percentages were: cyanidin 3-soforoside (46.2 %) and cyanidin 3-(2-glucosyl rutinoside) (25.9 %). The maximum levels of FEA and the highest number of anthocyanins were present in the completely mature raspberry fruits, this stage is characterized by the deep red color of the fruits, and is when its consumption is recommended.

**ADDITIONAL KEY WORDS:** berries, ellagitanines, ripening stage, antioxidant activity.

## INTRODUCCIÓN

Una dieta rica en frutas y vegetales está asociada con un bajo riesgo de contraer enfermedades crónico-degenerativas tales como: cáncer, arteriosclerosis, artritis y alteraciones cardiovasculares, atribuyendo este efecto protector a la presencia de compuestos bioactivos, dentro de los cuales destacan los polifenoles (Rangkadilok *et al.*, 2005). La frambuesa (*Rubus idaeus* L.) es una fruta que posee cantidades importantes de estos compuestos, particularmente ácido elálgico, elagitaninos, antocianinas, ácidos fenólicos y algunos otros flavonoides.

El ácido elálgico es un compuesto fenólico, derivado dimérico del ácido gálico, que en los frutos que lo contienen se puede encontrar en forma libre, glicosilado o como simple o complejos elagitaninos (ésteres de ácido hexahidroxidifénico). La hidrólisis ácida de estos últimos produce ácido elálgico libre y la subsecuente liberación de unidades hexahidroxidifenol (HHDP) y de un grupo éster (Williner *et al.*, 2003; Lee y Talcott, 2004).

Se encuentra en diferentes tejidos de las frutas (piel, pulpa, semillas, aquenios en fresas) y a distintas concentraciones (Williner *et al.*, 2003; Rangkadilok *et al.*, 2005). Las frambuesas contienen elevadas concentraciones de ácido elálgico, en forma de elagitaninos, superando tres veces la cantidad encontrada en nueces de nogal pecanero y seis veces la de manzanas, peras, y ciruelas (Williner *et al.*, 2003; Anttonen y Karjalainen, 2004). La concentración de ácido elálgico en frambuesas va de 38 a 118 mg·100 g<sup>-1</sup> de fruta fresca y varía según la variedad, siendo este factor el más importante (Anttonen y Karjalainen, 2004).

La importancia de este metabolito radica en que su molécula tiene gran similitud con la de compuestos de naturaleza estrogénica presentes en mamíferos. Esto le ha valido ser intensamente estudiado por su posible efecto supresor de tumores cancerosos en glándula mamaria. Un estudio reciente realizado con ratas a las que suministraron dietas suplementadas con extractos de zarzamora, frambuesas negras y ácido elálgico mostró con claridad la capacidad de este último para suprimir el volumen y la incidencia de tumores (Aiyer, *et al.*, 2008).

El grado de madurez del fruto influye en el nivel de ácido elálgico, pero la relación entre estas dos variables cambia según el fruto del que se trate. En uva moscatel se ha encontrado un mayor contenido en los frutos completamente maduros con relación a los inmaduros, y se atribuye a que durante la maduración ocurre una acelerada hidrólisis de unidades HHDP por parte de los elagitaninos. En los frutos maduros e inmaduros, el mayor contenido de ácido elálgico se encontró en la piel (Lee y Talcott, 2004). En fresas ocurre una disminución de ácido elálgico conforme la fruta va madurando; la mayor cantidad se presenta en los aquenios (Williner *et al.*, 2003).

Por otro lado, la frambuesa también es fuente importante de antocianinas, que al igual que el ácido elálgico, poseen propiedades nutraceuticas dentro de las cuales destaca su actividad antioxidante, que tiene relevancia porque impide las reacciones de oxidación en cadena que desatan los radicales libres provenientes del metabolismo celular.

En los frutos que contienen antocianinas, su síntesis y acumulación ocurre generalmente en las etapas finales de su desarrollo y maduración.

La producción de frutillas en México está creciendo, particularmente en los estados de Michoacán y Jalisco, y aunque actualmente una proporción importante se destina a la exportación, una parte se consume en el mercado nacional, por lo que el conocimiento sobre el contenido de bioactivos como el ácido elálgico y los tipos de antocianinas es importante para el consumidor. Considerando esto, los objetivos del presente trabajo fueron determinar el contenido de ácido elálgico y el perfil de antocianinas en frutos de frambuesa de la variedad "Autumn Bliss" con diferente grado de maduración, cultivada en dos localidades diferentes.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron frutos de frambuesa variedad "Autumn Bliss" procedentes de dos localidades: Tlamimilolpa, municipio de Acaxochitlán, Hidalgo y San Mateo Acatitlán, municipio de Valle de Bravo, México. Se realizaron dos muestreos en cada localidad, con intervalo de cosecha de siete días. En cada muestreo se obtuvieron frutos con diferente grado de maduración.

### Grados de maduración de los frutos

Los frutos fueron clasificados visualmente por la intensidad de su color rojo, en tres grados de maduración: inmaduros (GM1); maduros (GM2) y muy maduros (GM3). Una muestra aproximada de 30 g se colocó en cajas petri para medir el color con un equipo Hunter Lab MiniScan XE Plus (Modelo 45/O-L) en escala CIE L\*, a\* y b\*; con los valores L\*, a\* y b\* se calculó el tono y la pureza de color para cada uno de los grados de maduración de los frutos. El tono se obtuvo mediante la  $\tan^{-1}(b^*/a^*)$ , en tanto que el croma por medio de  $(a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$ .

### Perfil de antocianinas por HPLC

Una porción de frutos de cada grado de maduración se maceró y se tomó una muestra de 3 g que se depositó en matraz de 125 ml al que se añadieron 20 ml de ácido trifluoroacético (TFA) al 1 % en metanol. Los matraces se colocaron en condiciones de refrigeración durante 24 h; posteriormente se decantó el sobrenadante y se filtró con papel Whatman # 4. El filtrado se purificó con una columna de Amberlita XAD-7, y se analizó según lo descrito por Salinas *et al.*, (2005).

Para identificar las antocianinas se preparó una solución de estándares comerciales de pelargonidina 3-glucósido, cianidina 3-glucósido, peonidina 3-glucósido y malvidina 3-glucósido (Polyphenols, NW), empleando como disolvente ácido fórmico:agua (1:9 v/v). Para el análisis de estos compuestos se usó un equipo de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC por sus siglas en inglés) marca Perkin Elmer serie 200, que consta de un inyector manual, una bomba cuaternaria, un horno para columnas y un detector de UV-Vis con arreglo de diodos. El equipo es operado por una computadora de escritorio mediante el paquete estadístico TotalChrom. Se filtró e inyectó cada estándar para determinar los tiempos de retención de estas antocianinas y utilizarlos como referencia para poder identificarlas en las muestras estudiadas.

### Contenido de ácido eláxico

Se pesaron 50 g de muestra en una balanza semianalítica (Sartorius BL610) y se colocaron en una tela "manta de cielo" para extraer el jugo mediante la presión manual de la fruta con la tela. El jugo de los frutos con los diferentes grados de maduración se filtró con papel filtro Whatman # 1, ajustando el volumen final a 40 ml. Posteriormente este volumen se dividió en dos partes iguales para realizar la extracción de ácido eláxico, y tener así dos repeticiones por muestra.

El jugo se colocó en un matraz de separación de 250 ml y se le añadió un volumen similar de acetato de etilo, agitando ligeramente la mezcla para favorecer la extracción del ácido eláxico y sus derivados (Zafrilla *et al.*, 2001). Se realizaron tres extracciones sucesivas, recuperando en cada caso la fase orgánica, y juntando los volúmenes. El extracto se concentró a sequedad en un rotavapor (Heidolph 4010-digital) a 40 °C y se redisolvió en 3 ml de metanol al 50 %.

La cuantificación se realizó por HPLC conforme a lo descrito por Lee y Talcott, (2004). Se usó una columna analítica Spherisorb ODS (250 x 4.6 mm) con tamaño de partícula de 5 µm. Como fase móvil se usó una mezcla de disolventes: A, que fue agua y B, metanol al 60 %, ambos ajustados a pH = 2.4 con ácido o-fosfórico al 85 % de pureza. Se empleó un gradiente lineal como sigue: 0-3 min, de 100 a 70 % de A; de 3 a 5 min de 70 a 50 %; de 5 a 17 min de 50 a 30 %; de 17 a 5 min de 30 a 20 %; de 5 a 5 min de 20 a 0 %; 9 min con 100 % de B. El volumen de muestra inyectada fue de 20 µl y la velocidad de flujo de 1 ml·min<sup>-1</sup>. La detección se hizo a 252 nm.

Para la cuantificación se preparó una solución de 100 mg de ácido eláxico·100 ml<sup>-1</sup> de solución, usando como disolvente metanol al 70 %. El volumen de muestra inyectado fue de 20 µl (2 mg de ácido eláxico en su forma libre). El tiempo de retención del estándar de ácido eláxico fue de 32.7 min. Las muestras antes de inyectarse al equipo se filtraron con acrodiscos 0.45 µm de Millipore. Todos los

disolventes usados fueron grado HPLC y se filtraron con una membrana 0.25 µm (Millipore) antes de usarse.

### Análisis estadístico

Se estableció un experimento factorial asimétrico 2 x 3, (localidad y grado de maduración) bajo un diseño completamente al azar. Se realizó el análisis de varianza y la prueba de comparación de medias (Tukey,  $P \leq 0.05$ ) para todas las variables registradas. El análisis estadístico se hizo con la ayuda del programa SAS System para Windows V8 (SAS, 1998).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El color de los frutos de frambuesa, expresado en términos de L\*, Hue y Croma fue estadísticamente diferente entre los tres grados de maduración. En ambas localidades los valores de luminosidad (L\*), tono (Hue) y pureza de color (Croma) decrecieron en la medida que avanzó la maduración del fruto, lo que significa que el color rojo se intensificó (Cuadro 1). El color rojo de la frambuesa se debe a las antocianinas, que son principalmente derivados glicosilados de cianidina y pelargonidina. La intensidad del color depende de la concentración de estos compuestos. En los frutos inmaduros, de coloraciones rojas tenues, se tiene un menor contenido de antocianinas que en los frutos maduros (Peña-Varela *et al.*, 2006). El número de antocianinas del fruto aumentó al avanzar su maduración, siendo más complejo el perfil en los frutos bien maduros (GM3) que en los inmaduros (GM1). Los frutos con grado de maduración GM1 únicamente presentaron cuatro antocianinas: cianidina 3-soforósido (1); cianidina 3-(2-glucosilrutinosido) (2); cianidina 3-glucósido (4); y cianidina 3-rutinosido (6). En los frutos con grado de maduración GM2 se tuvieron prácticamente las mismas antocianinas, pero en los de GM3 el número aumentó a ocho.

**CUADRO 1. Color en frutos de frambuesa variedad "Autumn Bliss", cosechados en dos localidades, en tres grados de maduración.**

Localidad	Variables de color		
	L*	Hue	Croma
Tlamiimilolpa, Hgo.			
GM1 <sup>+</sup>	30.38 ± 0.78 a <sup>z</sup>	28.42 ± 0.30a	40.36 ± 0.46a
GM2	24.67 ± 0.28b	24.02 ± 0.61b	34.74 ± 1.00b
GM3	17.75 ± 0.51c	20.33 ± 0.44c	22.64 ± 0.69c
San Mateo Acatitlán, Méx.			
GM1	34.44 ± 0.88a	32.50 ± 0.46a	41.21 ± 0.76a
GM2	30.10 ± 0.48b	26.66 ± 0.61b	39.95 ± 0.63b
GM3	21.05 ± 0.30c	21.05 ± 0.30c	30.06 ± 0.42c

<sup>z</sup>Valores con la misma letra dentro del factor en cada columna son iguales de acuerdo con la prueba de Tukey a una  $P \leq 0.05$ .

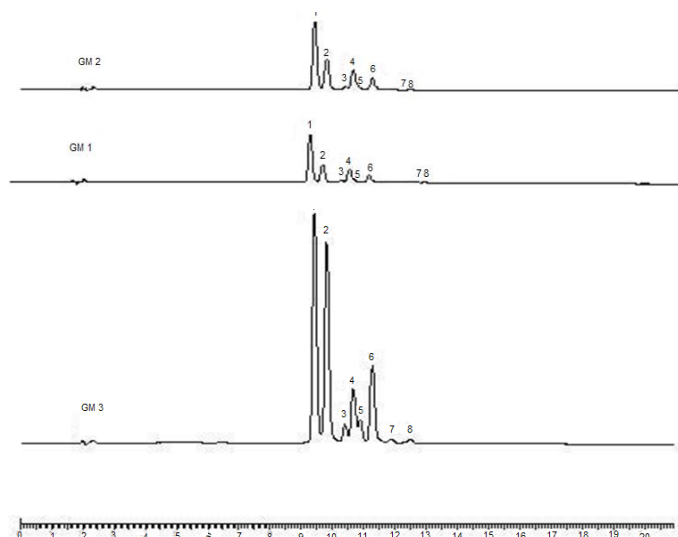
<sup>+</sup>Desviación Estándar.

GM1: fruto inmaduro; GM2: fruto maduro; GM3: fruto muy maduro.

La identificación de las antocianinas cianidina 3-glucósido y pelargonidina 3-glucósido se realizó mediante comparación de sus tiempos de retención con los de estándares comerciales (Polyphenols, NW), el resto se hizo comparando los cromatogramas y tiempos de retención de cada pico con los de otros autores que aplicaron un procedimiento cromatográfico similar al usado en el presente trabajo (Määttä-Riihinen, *et al.*, 2004).

Durante el proceso de maduración del fruto se observaron cambios en el porcentaje relativo de las antocianinas dominantes, tal fue el caso de cianidina 3-rutinósido, que en las fases GM1 y GM2 apareció con un porcentaje inferior al de cianidina 3-glucósido, y que en la etapa GM3 ya presentó un porcentaje superior al de ésta. Las antocianinas más importantes en el fruto maduro, de acuerdo al porcentaje relativo de cada una, fueron 1, 2, 4 y 6, que representaron 46.2, 25.9, 9.3 y 8. %, respectivamente. Las que aparecieron al final de la maduración del fruto fueron: cianidina 3-soforósido-5-ramnósido (3); pelargonidina 3-soforósido (5); pelargonidina 3-glucósido (7); y pelargonidina 3-rutinósido (8). Estas antocianinas se encuentran en porcentajes relativos muy bajos (Cuadro 2).

El patrón de síntesis y acumulación de antocianinas en flores y frutos va de lo más simple a lo más complejo, tanto en relación al tipo de antocianina como al patrón de glicosilación (Harborne, 1967) e incorporación de radicales acilo (Justesen *et al.*, 1977). En el grano de maíz azul las primeras antocianinas que se acumulan son las no aciladas, que serían las simples, y en las últimas etapas del desarrollo del grano se presentan las tipo aciladas, que son más complejas que las simples (Salinas, 2000). En el caso de la



**FIGURA 1.** Perfil cromatográfico de las antocianinas presentes en frutos de frambuesa variedad "Autum Bliss" con diferente grado de maduración. 1 = cianidina 3-soforósido; 2 = cianidina 3-(2-glucosilrutinosido); 3 = cianidina 3-soforósido-5-ramnósido; 4 = cianidina 3-glucósido; 5 = pelargonidina 3-soforósido; 6 = cianidina 3-rutinósido; 7 = pelargonidina 3-glucósido; 8 = pelargonidina 3-rutinósido.

Ácido elágico y...

**CUADRO 2.** Porcentajes relativos de las antocianinas presentes en el fruto maduro de frambuesa, variedad "Autum Bliss"

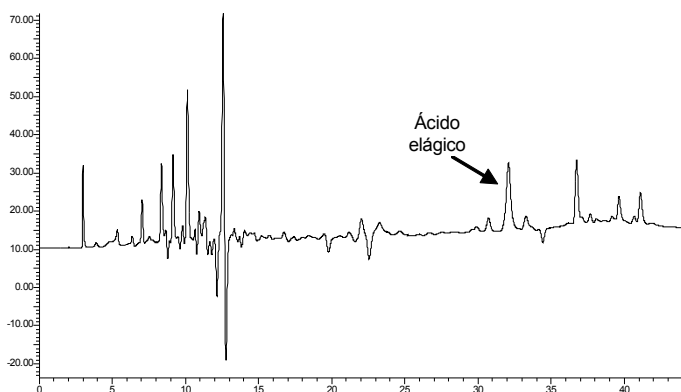
Antocianina	Núm. de pico	Porcentaje relativo	Tiempo de retención (min)
Cianidina 3-soforósido	1	46.2	9.44
Cianidina 3-(2-glucosilrutinosido)	2	25.9	9.85
Cianidina 3-soforósido-5-ramnósido	3	1.1	10.4
Cianidina 3-glucósido	4	9.31	10.66
Pelargonidina 3-soforósido	5	0.5	10.9
Cianidina 3-rutinósido	6	8.05	11.28
Pelargonidina 3-glucósido	7	0.23	11.83
Pelargonidina 3-rutinósido	8	0.16	12.45

frambuesa sus antocianinas son del tipo no aciladas (Määttä-Riihinen, *et al.*, 2004); en los frutos inmaduros analizados en el presente estudio, los derivados de cianidina se observaron antes que los de pelargonidina.

### Contenido de ácido elágico

En frambuesa el ácido elágico libre comprende una pequeña parte del ácido elágico total; los elagitaninos, como el sanguinin H-6 y lambertina, son la principal fuente de ácido elágico (Anttonen y Karjalainen, 2004; Lee y Talcott, 2004), sin embargo, su biodisponibilidad es considerablemente menor. En el presente trabajo se cuantificó únicamente el ácido elágico libre. El cromatograma del extracto de acetato de etilo del jugo de los frutos se muestra en la Figura 2. El ácido elágico presentó un tiempo de retención de 32.7 minutos en promedio.

El contenido de ácido elágico fue diferente entre cada uno de los grados de maduración de los frutos, para la localidad de San Mateo Acatitlán, Méx., mientras que para



**FIGURA 2.** Cromatograma del extracto en acetato de etilo del jugo de frutos de frambuesa variedad "Autum Bliss".

la localidad de Tlamimilolpa no hubo diferencias entre los grados de madurez 1 y grado de madurez 2 (GM1 y GM2), pero si entre estos dos y los frutos completamente maduros (GM3). A medida que el fruto fue madurando el contenido de ácido elálgico aumentó, este comportamiento se observó en los frutos de las dos localidades (Cuadro 3). Fue considerable la diferencia en el contenido de ácido elálgico en los frutos completamente maduros de ambas localidades. Los producidos en San Mateo Acatitlán, Méx., presentaron 39.6 % más que los cultivados en Tlamimilolpa, Hgo.

Los valores de ácido elálgico obtenidos en los frutos de frambuesa son parecidos a los informados por Anttonen y Karjalinen, (2004) de 3.8 a 8.8 mg·kg<sup>-1</sup>. Según Zafrilla *et al.* (2001) el contenido total de este fenólico se favorece cuando los frutos son procesados para obtener mermeladas, aunque el contenido de antocianinas se reduce considerablemente.

**CUADRO 3. Contenido de ácido elálgico en frutos de frambuesa "Autumn Bliss" con diferentes grados de maduración, cultivados en dos localidades.**

	San Mateo Acatitlán, Méx.	Tlamimilolpa, Hgo.
GM1	0.51(± 0.04) a <sup>z</sup>	0.74 (±) a
GM2	1.95 (± 0.07) b	0.74 (±) a
GM3	5.38 (± 0.55) c	3.25 (±) c
DMS	1.36	0.16

<sup>z</sup>Desviación Estándar.

<sup>z</sup>Los valores están expresados en mg·kg<sup>-1</sup> de muestra fresca. Valores con la misma letra dentro del factor en cada columna son iguales de acuerdo con la prueba de Tukey a una ( $P \leq 0.05$ ).  
GM1: fruto inmaduro; GM2: fruto maduro; GM3: fruto muy maduro.

## CONCLUSIONES

Los frutos maduros de frambuesa presentaron ocho antocianinas diferentes, de las cuales cuatro son las antocianinas dominantes. Estas antocianinas se van incrementando durante el proceso de maduración. Las que primero aparecen son las antocianinas dominantes, que son derivados glicosilados de cianidina.

La localidad no tuvo efecto sobre el perfil de antocianinas, pero si en los porcentajes relativos de las antocianinas más importantes.

El grado de maduración del fruto influye en el contenido de ácido elálgico, los frutos completamente maduros tienen un contenido mayor. La localidad también afectó de manera notable, pues las diferencias fueron de 39.6 % entre los dos sitios considerados, reflejando un mayor contenido en San Mateo Acatitlán, México.

De acuerdo con los resultados, es conveniente consumir los frutos de frambuesa completamente maduros, esto es cuando su color es rojo intenso, pues en este momento se tiene los mayores contenidos de ácido elálgico libre.

## LITERATURA CITADA

- ANTTONEN J., M.; KARJALAINEN O., R. 2005. Environmental and genetic variation of phenolic compounds in red raspberry. *Journal of Food Composition and Analysis* 18(8): 759-769.
- AIYER, H. S.; SRINIVASAN, C.; GUPTA, R. C. 2008. Dietary berries and ellagic acid diminish estrogen-mediated mammary tumorigenesis in ACI rats. *Nutritional Cancer* 60(2): 227-234.
- HARBORNE, J. B. 1967. The Anthocyanin pigments. *In: Comparative Biochemistry of the Flavonoids*. Academic Press. New York, London.
- JUSTESEN, H., ANDERSEN, A. S.; BRANDT, K. 1997. Accumulation of anthocyanins and flavones during bud and flower development in *Campanula isophylla* Moretti. *Annals of Botany* 79: 355-360.
- LEE, J. E.; TALCOTT T., S. 2004. Fruit maturity and juice extraction influences ellagic acid derivatives and other antioxidant polyphenolics in muscadine grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(2): 361-366.
- MÄÄTTÄ-RIIHINEN, K. R.; KAMAL-ELDIN, A.; TORRONEN, A. R. 2004. Identification and quantification of phenolic compounds in berries of *Fragaria* and *Rubus* species (family Rosaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(20): 6178-6187.
- PEÑA-VARELA, G.; SALINAS-MORENO, Y.; RÍOS-SÁNCHEZ, R. 2006. Contenido de antocianinas totales y actividad antioxidante en frutos de frambuesa (*Rubus idaeus* L.) con diferente grado de maduración. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, Vol. XII(1):159-163.
- RANGKADILOK, N.; WORASUTTAYANGKURN, L.; BENNETT, R. N.; SATAYAVIVAD, J. 2005. Identification and quantification of polyphenolic compounds in Logan (*Euphoria longana* Lam.) fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(5): 1387-1392.
- SALINAS, M. Y. 2000. Antocianinas en el grano de maíces criollos mexicanos. Tesis doctoral. Programa de Fisiología Vegetal. Colegio de Posgraduados. México. 102 p.
- SALINAS, M. Y.; SALAS-SÁNCHEZ, G.; RUBIO-HERNÁNDEZ, D.; RAMOS-LOBATO, N. 2005. Characterization of anthocyanins extracts from maize kernels. *Journal of Chromatography Science* 43(9): 483-487.
- SAS Institute Inc. 1998. SAS/STAT guide for personal computers. Version 8.0. Cary, NC. USA. 595 p.
- WILLINER R., M.; PIROVANI E., M.; GUEMES R., D. 2003. Ellagic acid content in strawberries of different cultivars and ripening stages. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 83: 842-845.
- ZAFRILLA, P.; FERRERES, F.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. 2001. Effect of processing and storage on the antioxidant ellagic acid derivatives and flavonoids of red raspberry (*Rubus idaeus*) jams. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49(8): 3651-3655.