



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO-BIOLÓGICAS
DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

**Potencial fitoquímico del bagazo de noni (*Morinda
citrifolia* L.) y evaluación de su capacidad
antioxidante**

TESIS

Que presenta:

CLAUDIA BARRAZA ELENES

Para obtener el Grado de
DOCTORA EN CIENCIA

Y
TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Directores

DR. ARMANDO CARRILLO LÓPEZ

DRA. IRMA LETICIA CAMACHO HERNÁNDEZ

Culiacán, Sinaloa, México, Julio de 2019



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Culiacán, Rosales Sinaloa, el día 02 del mes de Julio del año 2019, la que suscribe MC. Claudia Barraza Elenes alumna del Programa de Doctorado en Ciencia y Tecnología de Alimentos con número de cuenta 9117203-9, de la Unidad Académica Facultad de Ciencias Químico Biológicas, manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de los Dres. Armando Carrillo López e Irma Leticia Camacho Hernández y cede los derechos del trabajo titulado “Potencial fitoquímico del bagazo de noni (*Morinda citrifolia* L.) y evaluación de su capacidad antioxidante”, a la Universidad Autónoma de Sinaloa para su difusión, con fines académicos y de investigación por medios impresos y digitales.

La Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México) protege el contenido de la presente tesis. Los usuarios de la información contenida en ella deberán citar obligatoriamente la tesis como fuente, dónde la obtuvo y mencionar al autor intelectual. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "CB Barraza Elenes", is written over a horizontal line.

Claudia Barraza Elenes

Este trabajo fue realizado en los Laboratorios del Posgrado en Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa, en el Centro de Investigación y Desarrollo, A.C., Unidad Culiacán (CIAD) y en el Laboratorio de Fitoquímicos y Nutrición de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ) bajo la dirección del Dr. Armando Carrillo López y la Dra. Irma Leticia Camacho Hernández así como la asesoría del Dr. José de Jesús Zazueta Morales, el Dr. Ernesto Aguilar Palazuelos, el Dr. José Basilio Heredia (CIAD) y el Dr. Elhadi M. Yahia (UAQ). Contó con financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), y del Programa de Fortalecimiento y Apoyo a Proyectos de Investigación de la Universidad Autónoma de Sinaloa (PROFAPI-UAS, Proyecto PROFAPI-2014/061). Claudia Barraza Elenes recibió beca del CONACYT.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres **Guadalupe y Hermila** gracias por todo su amor, paciencia y dedicación, por cada día confiar y creer en mi y por todo el apoyo brindado para poder culminar esta meta profesional de mi vida. A mis hermanos **Edgardo y Adriana** por estar presentes no solo en esta etapa tan importante sino siempre.

A mi esposo **Jesús Abel** y a mi hija **Claudia Ivette** por ser mi más grande motivación, y por su apoyo incondicional durante la realización de este trabajo. Y a una personita que está por llegar, te espero con todo mi amor.

A mi director de tesis **Armando Carrillo López** primeramente por haberme aceptado como su tesista y agradezco además todas sus enseñanzas, paciencia, dedicación y estar siempre dispuesto a aclarar mis dudas.

A mi directora de tesis **Dra. Irma Leticia Camacho Hernández** por haberme aceptado en su grupo de trabajo, ya que sin ella no hubiera sido posible concluir esta etapa tan importante de mi vida, gracias por su apoyo incondicional y por siempre estar dispuesta a aportar sus conocimientos para la realización de este proyecto.

A mis asesores **Dr. Ernesto Aguilar Palazuelos, Dr. José de Jesús Zazueta Morales, Dr. José Basilio Heredia** por su apoyo y orientación en el desarrollo de este proyecto.

Al **Dr. Elhadi Yahia** por su asesoría y todas las facilidades que me otorgó para utilizar los materiales y equipos del Laboratorio de Fitoquímicos y Nutrición de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro.

A la **MC Bianca Irina Bojórquez Márquez** y a la **MC Guadalupe Cervantes Rubio** por su amistad brindada a mi llegada al Laboratorio de Bioquímica Poscosecha de Frutas y Hortalizas, muchas gracias por todo su apoyo.

A la **MC Carolina Isabel Vázquez Herrera** y a la **IBQ María Lourdes Pérez López** por su amistad y por su valioso apoyo en la realización del trabajo experimental.

Al **Dr José Angel López Valenzuela, Dra Nancy Yareli Salazar Salas y MC María Fernanda Quintero Soto** cuyo apoyo y disposición fue invaluable en el trabajo experimental de espectrometría de masas.

A la **Dra. Noelia Jacobo Valenzuela, Dr Carlos Iván Delgado Nieblas, Dr Francisco Delgado Vargas, Dra. Gabriela López Angulo, QFB Israel López Partida MC Josefina Sicaños Félix, Dra Xiomara Perales Sánchez, Dra Muy Rangel, IQ Werner Rubio Carrasco**, por el apoyo técnico brindado.

A mis compañeros de generación **Abraham, Rosalina y César**.

A todos los compañeros y amigos del posgrado que forman parte del equipo de trabajo **Xóchitl, Cristian, Victor, Perla, Marco, Milton, Ana Patricia, Jesús, Luis, Silveria, Karen, Sarahi, Paola, Amado, Enrique**, por hacer más ameno este trayecto.

A mis compañeros del Laboratorio de Fitoquímicos de la FCN de Querétaro: **Fabiola, Luis Felipe, Dr Braulio Cervantes, Erik, Marisol y Valeria**.

A mi suegra **Esperanza Cota** por todo su amor y haber cuidado a mi hija durante mi estancia en Querétaro, y a **Ricardo** por sus asesorías en computación.

A la **Universidad Autónoma de Sinaloa** y a **Conacyt** por el apoyo económico brindado.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	v
ÍNDICE DE CUADROS	vi
I RESUMEN	1
ABSTRACT	3
II INTRODUCCIÓN	5
III REVISIÓN DE LITERATURA	8
A. FITOQUÍMICOS	8
1. Compuestos fenólicos	8
a. Flavonoides	11
b. Compuestos fenólicos no flavonoides	12
2. Carotenoides	14
3. Actividad antioxidante	17
a. Método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo)	20
b. Método ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)	21
c. Método FRAP (Poder antioxidante reductor del hierro)	21
d. Método ORAC (Capacidad de absorción de radicales oxígeno)	22
e. Ensayo de la inhibición de hemólisis eritrocitaria inducida por dihidrocloruro de 2,2'-azobis (2-metil-amidinopropano)	24
4. Técnicas de análisis de compuestos fenólicos y carotenoides	25
a. Cromatografía líquida de alta resolución	26
b. Espectrometría de masas	33
B. EI NONI	36
1. Generalidades y aspectos botánicos	36
2. Composición nutrimental	37
3. Fitoquímicos asociados a noni	37
4. Actividad biológica del noni	39
5. Importancia económica y usos tradicionales	40
6. Jugo de noni	41
C. SUBPRODUCTOS DE LA ELABORACIÓN DE JUGO	43
IV JUSTIFICACIÓN	48
V OBJETIVOS	49

A. OBJETIVO GENERAL	49
B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	49
VI MATERIALES Y MÉTODOS	50
A. MATERIALES	50
B. MÉTODOS	50
1. Elaboración del jugo y obtención del bagazo	50
2. Análisis fisicoquímicos	51
a. Acidez titulable	51
b. pH	51
c. Sólidos solubles totales (SST)	52
3. Análisis nutrimental	52
a. Análisis proximal	52
b. Ácido ascórbico	56
c. Fibra dietaria	58
d. Minerales	62
4. Análisis fitoquímicos	63
a. Fenólicos libres (FL), fenólicos ligados (FU) y fenólicos totales (FT)	63
b. Flavonoides totales	65
c. Taninos condensados	66
1) Extracción de la muestra	66
2) Determinación del contenido de taninos condensados	66
d. Carotenoides totales	66
1) Extracción de la muestra	66
2) Curva de calibración de β -caroteno	67
3) Determinación de carotenoides totales	68
5. Carotenoides individuales identificados y cuantificados por HPLC	68
6. Identificación y cuantificación de fenólicos e iridoides por UPLC-DAD-ESI-MS	69
7. Determinación de la capacidad antioxidante (CAO).	70
a. Preparación de los extractos hidrofílicos (EHF) y lipofílicos (ELF)	70
1) Obtención del ELF	70
2) Obtención del EHF	71
b. Método DPPH	71
1) Curva de calibración	71

2) Medición de la capacidad antioxidante	71
c. Método ABTS	72
1) Curva de calibración	72
2) Medición de la capacidad antioxidante	73
d. Método FRAP	73
1) Curva de calibración	74
2) Medición de la capacidad antioxidante	74
e. Método ORAC	74
1) Extracción de la muestra	75
2) Preparación de reactivos	75
3) Ensayo	76
4) Valoración de resultados	77
f. Capacidad de inhibición de hemólisis eritrocitaria inducida por dihidrocloruro de 2,2-azobis (2-metil-amidinopropano) (AAPH)	77
1) Obtención de los eritrocitos	77
2) Medición de la capacidad de inhibición de la hemólisis	78
C. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	79
VII RESULTADOS Y DISCUSIÓN	80
A. ANÁLISIS FISICOQUÍMICOS	80
1. Acidez titulable (AT), pH y sólidos solubles totales (SST)	80
B. ANÁLISIS NUTRIMENTAL	80
1. Análisis proximal	80
2. Ácido ascórbico	83
3. Fibra dietaria	85
4. Minerales	87
C. ANÁLISIS FITOQUÍMICOS	90
1. Fenólicos libres (FL)	90
2. Fenólicos ligados (FU)	92
3. Fenólicos totales (FT)	92
4. Flavonoides totales	93
5. Taninos condensados (TC)	95
6. Carotenoides totales (CT)	97
D. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE FITOQUÍMICOS INDIVIDUALES	99

1. Identificación y cuantificación de carotenoides individuales por HPLC-DAD	99
2. Fenólicos individuales	102
a. Identificación de compuestos fenólicos individuales por UPLC-ESI-MS	102
b. Cuantificación de compuestos fenólicos individuales	112
E. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	118
1. Método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo).	119
2. Método ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazoliana-6-sulfónico)	121
3. Método FRAP (poder antioxidante reductor del hierro)	124
4. Método ORAC (capacidad de absorción de radicales de oxígeno)	126
5. Capacidad de inhibición de la hemólisis eritrocitaria inducida por AAPH	128
VIII CONCLUSIONES	132
IX BIBLIOGRAFÍA	133
ABREVIATURAS	156
ANEXOS	158

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Descripción	Página
1	Clasificación de los fitoquímicos de la dieta.	9
2	Estructura básica de los flavonoides y algunos ejemplos representativos de las principales clases.	13
3	Ejemplos representativos de compuestos no flavonoides.	15
4	Estructuras típicas de carotenoides acíclicos (licopeno), monocíclicos (γ -caroteno), bicíclicos (α -caroteno y β -caroteno) (A), estructuras de las principales xantofilas (a) violaxantina, (b) luteoxantina, (c) luteína y (d) zeaxantina (B).	18
5	Características de la planta de <i>M. citrifolia</i> L., fruto y hoja.	38
6	Residuo de jugo de noni (<i>Morinda citrifolia</i> L.) molido.	46
7	Cromatograma HPLC-DAD representativo para carotenoides de bagazo con semilla a 452 nm.	101
8	Cromatograma UPLC representativo para compuestos fenólicos e iridoides de bagazo con semilla. La identidad de los picos numerados se indica en el Cuadro 14.	103

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Descripción	Página
1	Comparación entre HPLC y UHPLC.	31
2	Composición fisicoquímica de jugos de noni.	42
3	Composición química del bagazo de jugo de noni.	47
4	Análisis fisicoquímico del bagazo con semilla (BCS), bagazo sin semilla (BSS) y jugo (JN) de noni (<i>Morinda citrifolia</i> L.).	81
5	Análisis proximal de bagazo con semilla (BCS), bagazo sin semilla (BSS) y jugo (JN) de noni (<i>Morinda citrifolia</i> L.).	82
6	Contenido de ácido ascórbico presente en bagazo con semilla (BCS), bagazo sin semilla (BSS) y jugo (JN) de noni (<i>Morinda citrifolia</i> L.).	84
7	Porcentaje de fibra dietaria total (FDT), insoluble (FDI) y soluble (FDS) en base seca y razón FDI/FDS presentes en bagazo con semilla (BCS), bagazo sin semilla (BSS) y jugo (JN) de noni (<i>Morinda citrifolia</i> L.).	86
8	Contenido de minerales en mg/100g bs presentes en bagazo con semilla (BCS), bagazo sin semilla (BSS) y jugo (JN) de noni (<i>Morinda citrifolia</i> L.).	89
9	Fenólicos libres (FL), fenólicos ligados (FU) y fenólicos totales (FT) presentes en bagazo con semilla (BCS), bagazo sin semilla (BSS) y jugo (JN) de noni (<i>Morinda citrifolia</i> L.)	91
10	Flavonoides totales presentes en bagazo con semilla (BCS), bagazo sin semilla (BSS) y jugo (JN) de noni (<i>Morinda citrifolia</i> L.).	94
11	Taninos condensados presentes en bagazo con semilla (BCS), bagazo sin semilla (BSS) y jugo (JN) de noni (<i>Morinda citrifolia</i> L.).	96
12	Carotenoides totales presentes en bagazo con semilla (BCS), bagazo sin semilla (BSS) y jugo (JN) de noni (<i>Morinda citrifolia</i> L.).	98

13	Carotenoides individuales presentes en bagazo con semilla (BCS), bagazo sin semilla (BSS) y jugo (JN) de noni (<i>Morinda citrifolia</i> L.).	100
14	Compuestos fenólicos e iridoides identificados en extractos de metanol de bagazo y jugo de noni por UPLC-DAD-ESI-MS	
15	Contenido de compuestos fenólicos e iridoides de bagazos con semilla (BCS), sin semilla (BSS) y jugo de noni (JN), analizados por UPLC-DAD-ESI-MS.	114
16	Orden de abundancia de los compuestos fenólicos e iridoides identificados en bagazos de noni con semilla (BCS), sin semilla (BSS) y jugo (JN) de noni (<i>Morinda citrifolia</i> L.), expresados en µg/g bs.	115
17	Capacidad antioxidante por el método DPPH en EHF y ELF de bagazo con semilla (BCS), bagazo sin semilla (BSS) y jugo (JN) de noni (<i>Morinda citrifolia</i> L.)	120
18	Capacidad antioxidante por el método ABTS en EHF y ELF de bagazo con semilla (BCS), bagazo sin semilla (BSS) y jugo (JN) de noni (<i>Morinda citrifolia</i> L.).	122
19	Capacidad antioxidante por el método de FRAP en EHF de bagazo con semilla (BCS), bagazo sin semilla (BSS) y jugo (JN) de noni (<i>Morinda citrifolia</i> L.).	125
20	Capacidad antioxidante por el método de ORAC en EHF de bagazo con semilla (BCS), bagazo sin semilla (BSS) y jugo (JN) de noni (<i>Morinda citrifolia</i> L.).	127
21	Capacidad de inhibición de la hemólisis eritrocitaria inducida por dihidrocloruro de 2,2-azobis (2-metil- amidinopropano) (AAPH, 200 mM) de bagazo con semilla (BCS), bagazo sin semilla (BSS) y jugo (JN) de noni (<i>Morinda citrifolia</i> L.).	129

I RESUMEN

El bagazo de noni generalmente se desperdicia después del proceso de extracción de jugo de noni. El propósito de este estudio fue investigar la composición fitoquímica y la actividad antioxidante del bagazo de noni (con y sin semillas) obtenido después de un período de una semana de extracción por goteo de jugo a corto plazo de fruto de noni sobremaduro. Se evaluaron la composición proximal, la fibra dietaria, los minerales, el pH, la acidez titulable (AT), los sólidos solubles totales (SST) y el ácido ascórbico. Las características fitoquímicas, incluidos los fenólicos libres (FL), ligados (FU) y fenólicos totales (FT), flavonoides totales, taninos condensados (TC) y carotenoides totales (CT) se determinaron mediante técnicas espectrofotométricas. Además, los carotenoides individuales se identificaron y cuantificaron utilizando cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC), mientras que los compuestos fenólicos e iridoides individuales se realizaron mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (UPLC) y espectrometría de masas. Se evaluó la capacidad antioxidante por diferentes ensayos que incluyeron las técnicas de inhibición de los radicales DPPH (ácido 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), ABTS 2,2'-azino-bis (3-etilbenciozolona-6) -sulfónico (ABTS), poder antioxidante reductor de hierro (FRAP), capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) y el modelo biológico (basado en eritrocitos) del daño inducido por los radicales libres generados por AAPH por espectrofotometría. En el presente estudio, se destacaron los resultados de ambos tipos de bagazo (BCS y BSS), mientras que el jugo de noni se tuvo en cuenta principalmente como un punto de referencia. Los totales de fenólicos libres, flavonoides, taninos condensados, carotenoides y la mayoría de los minerales fueron más altos en el bagazo sin semilla (BCS) que en el bagazo con semilla (BSS), mientras que los fenólicos ligados, y la fibra

dietaria total e insoluble fueron mayores en BCS que en BSS. El β -caroteno y la luteína, cuantificados por HPLC-DAD, fueron más altos en el bagazo que en el jugo. Se determinaron dieciséis compuestos fenólicos y dos iridoïdes mediante UPLC-DAD-ESI-MS. Entre ellos, el dímero de procianidina tipo B, el ácido cafeoilquínico-hexósido y la quercetina-hexosa-desoxihexosa no se han reportado previamente en bagazo de noni o jugo o fruto de noni. Isorhamnetina-3-O-rutinósido fue el compuesto más abundante en ambos bagazos. Además, ambos bagazos mostraron actividad antioxidante. La actividad antioxidante en BSS fue mayor que en BCS por todos los métodos evaluados (DPPH, ABTS, FRAP, ORAC e inhibición de la hemólisis eritrocitaria). BSS exhibió consistentemente los valores más altos de fenólicos libres, flavonoides totales, β -caroteno y luteína. En conclusión, ambos bagazos son fuentes potenciales de compuestos fitoquímicos con actividad antioxidante para las industrias alimentaria y farmacéutica.

ABSTRACT

Noni bagasse is usually wasted after noni juice extraction process. The purpose of this study was to investigate the phytochemical composition and the antioxidant activity of noni bagasse (with and without seeds) obtained after a one-week period of short-term juice drip-extraction process from over-ripe noni fruit. The proximate composition, dietary fiber, minerals, pH, titratable acidity (TA), total soluble solids (TSS) and ascorbic acid were evaluated. Phytochemical characteristics including free (FP), bound (BP) total phenolics (TP), total flavonoids, condensed tannins (CT) and total carotenoids (TC) were determined by spectrophotometric techniques. Additionally, individual carotenoids were identified and quantified by using high-performance liquid chromatography (HPLC), while individual phenolic and iridoids compounds by ultra-performance liquid chromatography (UPLC) and mass spectrometry. The antioxidant potential was measured with different assays including the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiozoline-6)-sulphonic acid (ABTS), ferric-reducing antioxidant power (FRAP), oxygen radical absorption capacity (ORAC), and the biological model (erythrocyte-based) of damage induced by AAPH-generated free radicals. In the present study, the results of both types of bagasse (WSB and NSB) were emphasized whereas noni juice was taken into account mostly as a benchmark.

Totals of, free phenolics, flavonoids, condensed tannins, carotenoids and most of the minerals were higher in bagasse without seeds (NSB) than bagasse with seeds (WSB), whereas bound phenolics, and total and insoluble dietary fiber were higher in WSB than NSB. β -carotene and lutein, quantified by HPLC-DAD, were higher in both bagasse than in juice. Sixteen phenolic compounds and two iridoids were determined by UPLC-DAD-ESI-MS. Among them, procyanidin B-type dimer, caffeoylquinic-acid-

hexoside and quercetin-hexose-deoxyhexose have not been previously reported in noni-bagasse, juice or noni fruit. Isorhamnetin-3-O-rutinoside was the most abundant compound in both bagasse. Also, both bagasse showed antioxidant activity. The antioxidant activity in NSB was higher than those in WSB by all the methods evaluated (DPPH, ABTS, FRAP, ORAC and inhibition of hemolysis). NSB consistently exhibited the highest values of free phenolics, total flavonoids, β -carotene and lutein. In conclusion, both bagasse are potential sources of phytochemical compounds with antioxidant capacity for the food and pharmaceutical industries.

II INTRODUCCIÓN

Los desechos derivados de la industria de los jugos de frutas y hortalizas comprenden aproximadamente 5.5 millones de toneladas métricas (Sagar y col 2018), los cuales pueden representar un problema ambiental; sin embargo, estos pueden ser convertidos en productos útiles y comercializables. Cada vez más, estos desechos se están considerando como fuentes importantes de fitoquímicos tales como compuestos fenólicos y carotenoides, entre otros, los cuales permanecen en el bagazo después del proceso de extracción del jugo (Domínguez-Perles y col 2018). Dicho interés se debe a los efectos benéficos a la salud que se le ha atribuido al consumo de fitoquímicos como son el disminuir el riesgo de enfermedades crónicas tales como enfermedades cardiovasculares y cáncer, entre otras. Asimismo, diversos autores señalan que los fitoquímicos pueden tener una alta actividad antioxidante, anti-inflamatoria y antimicrobiana (O'shea y col 2012; Domínguez-Perles y col 2018; Ben-Aziz y col 2019).

Algunos ejemplos de desechos que han sido ampliamente estudiados y que han demostrado contener cantidades importantes remanentes de fitoquímicos son los bagazos de uva y manzana (González-Centeno y col 2013; Sudha y col 2007). Se ha reportado que estos bagazos son fuentes potenciales de ingredientes alimentarios de valor agregado, tales como fitoquímicos y fibra (O'shea y col 2012).

El cultivo de noni (*Morinda citrifolia* L.) está muy extendido en las regiones tropicales y subtropicales, y durante los últimos años, su fruto se ha comercializado en todo el mundo principalmente como jugo fermentado. Esta comercialización ha aumentado especialmente desde la aprobación del jugo de fruto de noni como nuevo ingrediente alimentario por la Comisión de la Unión Europea (European Commission 2003; West y col 2011).

Actualmente, el jugo de noni se considera un alimento funcional popular (Motshakeri y Ghazali 2015), y se ha establecido que posee actividades antioxidantes (Wang y col 2013), anti-inflamatorias (Dussossoy y col 2016), anticancerígenas (Gupta y Singh 2013), y de mejora de la inmunidad (Palu y col 2008). Algunas de estas propiedades se han asociado con el contenido fitoquímico del jugo (Wang y col 2013). La investigación sobre fitoquímicos de jugo de noni ha identificado y cuantificado a la escopoletina, la rutina, la quercetina y algunos iridoides, entre otros (West y col 2011; Potterat y col 2007; Dussossoy y col 2011).

Durante el proceso de extracción de jugo de noni, se genera una gran cantidad de desechos, compuestos principalmente de pulpa remanente, semillas y cáscara. (Aregheore, 2005). Sin embargo, el desecho de noni (bagazo) ha sido escasamente caracterizado. Algunas publicaciones han proporcionado información limitada sobre la composición proximal y digestibilidad del bagazo de noni utilizado para forraje.

Aregheore (2005) estudió los desechos de jugo de noni obtenidos a partir de un proceso de extracción de jugo de fruto de noni fermentado durante 2 meses, lo que permitió conocer su potencial como forraje al determinar solamente las características de la fibra y su composición proximal. Adicionalmente, Evvyernie y col (2018) estudiaron mezclas de desechos derivados de la industria del jugo de noni y la piña como un suplemento energético para cabras lecheras. Este estudio se centró en las características de fermentación *in vitro*, la digestibilidad y la población de microbios del rumen. Sin embargo, estos estudios previos no evaluaron el contenido de fitoquímicos, ácido ascórbico ni minerales del bagazo de noni.

En México, el estado de Nayarit es el principal productor de noni (Sagarpa 2016) cuya producción se destina principalmente a la extracción de jugo utilizando el método

de extracción por goteo a corto plazo. Sin embargo, surge un problema de manejo de desechos para los productores de jugo de noni ya que se desechan en una gran cantidad.

Aunque se ha realizado mucha investigación para determinar cualitativa y cuantitativamente la naturaleza fitoquímica del jugo de noni (Potterat y col 2007; Deng y col 2010; Dussossoy y col 2011; Yan y col 2018), hay una falta de información sobre los compuestos que permanecen en el bagazo de noni. La generación de este conocimiento podría llevar a una mayor utilización del bagazo de noni como fuente de ingredientes que proporcionen un valor agregado en la industria farmacéutica y/o alimentaria. El objetivo de este estudio fue investigar la composición fitoquímica y la capacidad antioxidante del bagazo de noni obtenido como un subproducto del proceso de extracción de jugo de noni mediante el método de extracción por goteo a corto plazo. Según nuestro conocimiento, este es el primer estudio que investiga la composición fitoquímica y la capacidad antioxidante del bagazo de noni.

III REVISIÓN DE LITERATURA

A. FITOQUÍMICOS

Diversidad de estudios mencionan que la actividad nutracéutica de las plantas es debida a los fitoquímicos. Los fitoquímicos son compuestos bioactivos de origen vegetal que cuando se ingieren proveen ciertos beneficios funcionales más allá de la nutrición básica. Estos beneficios funcionales podrían incluir la prevención y/o disminución de la iniciación y/o propagación de enfermedades crónicas en humanos (Okarter y Liu 2010). Los fitoquímicos son metabolitos secundarios de las plantas que también proveen color, sabor y que comúnmente son referidos como fitoprotectores o nutraceúticos (Kalt 2001).

Existen miles (>10 000) de fitoquímicos conocidos los cuales se han identificados principalmente como derivados de la fenilalanina y tirosina, y que realizan una variedad de funciones en las plantas tales como pigmentación, antioxidación, protección contra luz UV, etc. Basados en sus características estructurales pueden ser clasificados como carotenoides, fenólicos, alcaloides, compuestos nitrogenados y organosulfurados. Siendo las dos primeros los más estudiados (**Figura 1**) (Liu, 2004; Manach y col 2009).

1. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son los compuestos más relevantes de la familia de los fitoquímicos. Son metabolitos secundarios que presentan al menos un anillo aromático que poseen uno o más grupos hidroxilos y son sintetizados en las plantas bajo respuesta a condiciones de estrés como infecciones, daños por radiación ultravioleta, ataques de depredadores, entre otros (Beckman 2000).

Fitoquímicos

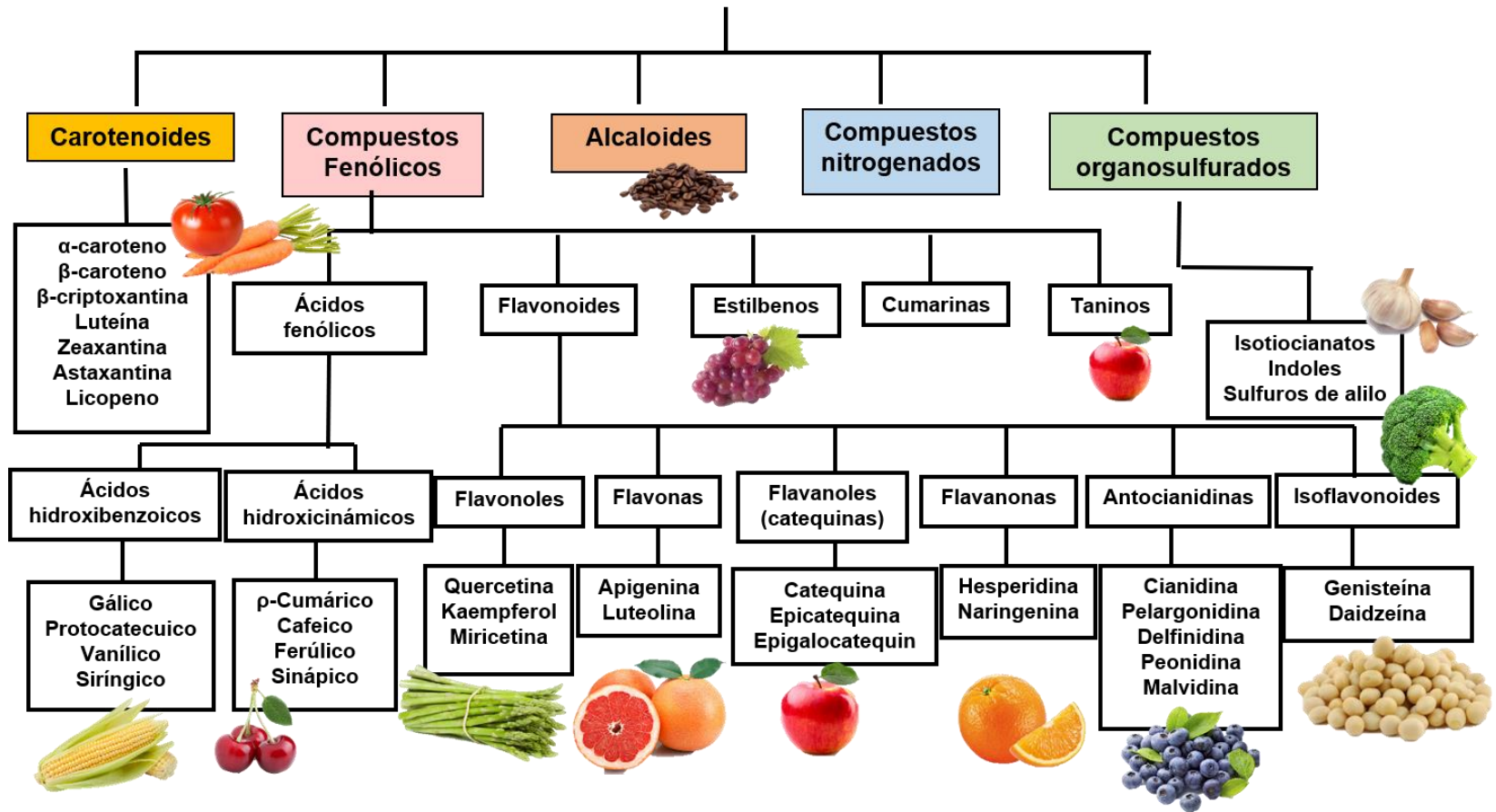


Figura 1. Clasificación de los fitoquímicos de la dieta.

Fuente: Liu 2004; Manach y col 2009.

En adición a sus funciones en plantas, los compuestos fenólicos en nuestra dieta pueden proveer beneficios a la salud asociados con la reducción al riesgo de enfermedades crónicas (Liu, 2007, Craft y col 2012; Shahidi y Ambigaipalan 2015; de la Rosa y col 2019) derivados de su actividad biológica como anti-inflamatorios, antivirales, antimicrobianos y antioxidantes (Carocho y Ferreira 2013; Shahidi y Ambigaipalan 2015; de la Rosa y col 2019).

La actividad antioxidante de estos fenólicos es principalmente debido a sus propiedades redox, que les permiten actuar como agentes reductores o donantes de átomos de hidrógeno. Así, los antioxidantes naturales funcionan como eliminadores de radicales libres. y rompedores de cadenas, complejos de prooxidante.iones metálicos y apagadores de la formación de oxígeno singlete (Liyana-Pathirana 2006; Shahidi y Ambigaipalan 2015).

Aunque, el consumo de compuestos fenólicos es altamente recomendado, actualmente no hay recomendaciones específicas para las cantidades de ingesta diaria de los mismos. Por lo tanto, no es posible calcular los porcentajes de ingesta diaria para estos fitoquímicos (Jiménez-Aguilar y col 2017).

Los compuestos fenólicos están ampliamente distribuidos entre las diferentes especies vegetales. Se clasifican en dos grupos: los flavonoides que son el subgrupo más común y los no flavonoides. La estructura química de estos compuestos es lo que les confiere la capacidad para actuar como antioxidantes. Dicha propiedad está directamente relacionada con la posición del grupo hidroxilo y el grado de hidroxilación de los anillos aromáticos (Shahidi y Ambigaipalan 2015; de la Rosa y col 2019).

Los ácidos fenólicos simples y los flavonoides son los compuestos fenólicos más comunes y generalmente se presentan como solubles conjugados (glucósidos) y

formas insolubles. Las frutas y hortalizas tienen la mayoría de sus compuestos fenólicos en formas libres o solubles conjugadas. Los fenólicos ligados solamente comprenden un promedio del 24% del total de fenólicos presentes en estas matrices alimentarias. Por otra parte, la mayoría de los fenólicos asociados a granos de cereales enteros están en las formas ligadas (62-85%) (Acosta-Estrada y col 2014).

a. Flavonoides

Los flavonoides son los compuestos fenólicos más abundantes en frutas y hortalizas, representan casi dos tercios de los fenólicos en la dieta. Están presentes principalmente en la epidermis de algunas hojas, la cáscara de algunas frutas y en muchas flores; tienen importantes funciones como metabolitos secundarios. Los flavonoides en las plantas están involucrados en los procesos de protección contra la luz UV y de pigmentación, la estimulación de nódulos fijadores de nitrógeno y la resistencia a algunas enfermedades. (Crozier y col 2006).

Los flavonoides están formados por un esqueleto común de difenilpiranos (C6-C3-C6) compuesto por dos anillos fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico). Se pueden dividir en seis grupos o familias, según diferencias en el anillo pirano. En cada familia, los compuestos individuales difieren en su patrón de hidroxilación y metilación de los anillos A y B (de la Rosa y col 2019).

El esqueleto básico de flavonoides puede tener numerosos sustituyentes. Es común encontrar sustituyentes hidroxilo en las posiciones 4', 5 y 7. Las principales subclases son los flavonoles, flavanonas, flavonas, isoflavonas, flavan-3-oles y antocianidinas. Ejemplos representativos de estas clases de compuestos son flavonoles: quercetina-3-O-rutinósido (rutina) (1) y kaempferol (2); flavanonas: naringenina (3), y hesperetina (4); flavonas: apigenina (5), y luteolina (6); isoflavonas;

daidzeína (7), y genisteína (8); antocianidinas: cianidina (9), malvidina (10); flavan-3-ols: epicatequina (11), catequina (12) (**Figura 2**). Los flavan-3 ols oligoméricos son llamados proantocianidinas (debido a que la degradación ácida en presencia de alcoholes produce antocianidinas libres), mientras que las formas poliméricas se denominan taninos condensados, aunque los términos suelen ser intercambiables (de la Rosa y col 2019).

Los azúcares y los grupos hidroxilo existentes en las moléculas de flavonoides aumentan su solubilidad en agua, mientras que sustituyentes como grupos metilo e isopentilo, los hacen lipofílicos (Crozier y col 2006). Los flavonoides unidos a azúcares se conocen como flavonoides glicosilados y es más común encontrarlos en vacuolas, mientras que las agliconas, los flavonoides que no están unidos a azúcares, están presentes en regiones lipofílicas como glándulas de aceite o capas cerosas (Puppo 1992).

b. Compuestos fenólicos no flavonoides

Los compuestos no flavonoides más representativos en la dieta son los ácidos fenólicos que contienen un solo grupo fenilo sustituido por un grupo carboxílico y uno o más grupos OH. Los ácidos fenólicos se pueden dividir en ácidos hidroxibenzoicos (esqueleto básico C6-C1), y ácidos hidroxicinámicos (esqueleto básico fenilpropanoide C6-C3) que difieren entre ellos en la longitud de la cadena que contiene el grupo carboxílico (Crozier y col 2006; de la Rosa y col 2019). Los ácidos hidroxibenzoicos rara vez se encuentran en su forma libre, comúnmente aparecen glicosilados, vinculados a ácidos orgánicos pequeños (quínico, málico o tartárico) o unidos a componentes estructurales de las células vegetales (celulosa, proteínas o lignina).

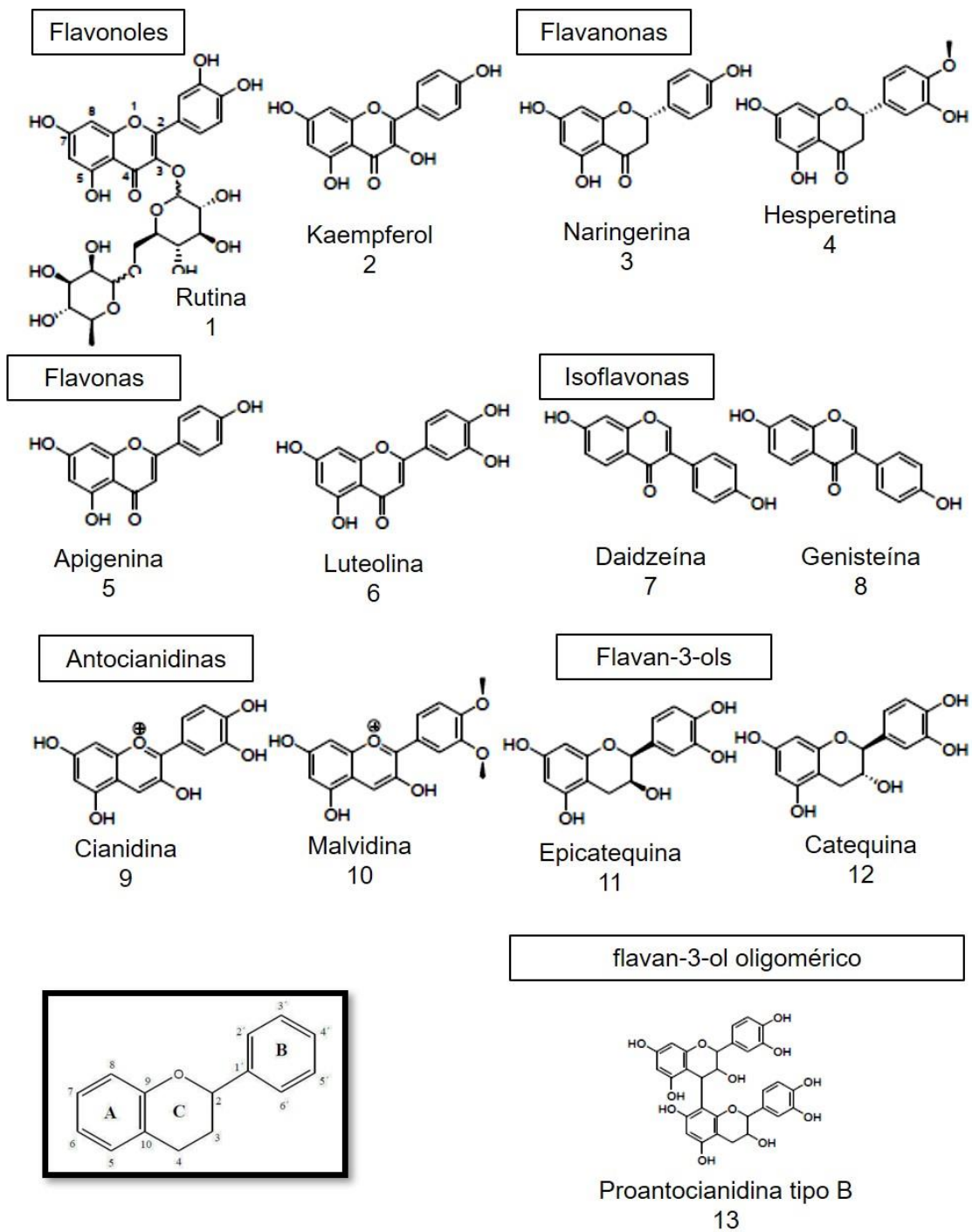


Figura 2. Estructura básica de los flavonoides y algunos ejemplos representativos de las principales clases. Adaptado de: de la Rosa y col 2019.

Los derivados del ácido hidroxibenzoico incluyen el ácido gálico, *p*-hydroxibenzoico, protocatecuico, vanílico y siringíco. El ácido gálico a veces forma estructuras complejas con carbohidratos, llamadas taninos hidrolizables, que se pueden dividir en galotaninos y elagitaninos. Los principales ácidos hidroxicinámicos son el ácido *p*-cumárico, el ácido cafeico, y las formas metiladas de los ácidos ferúlico y sinápico. El derivado de ácido hidroxicinámico más abundante en alimentos vegetales es un éster de los ácidos cafeico y quínico, llamado ácido clorogénico (ácido 5-cafeoilquinico) (Ignat y col 2011; de la Rosa y col 2019).

Otros compuestos no flavonoides son los estilbenos (C6-C2-C6), los cuales son típicos de las uvas y el vino, siendo el *trans*-resveratrol el estilbeno más común. Los lignanos están formados por dos unidades fenilpropanoides (C6-C3-C6-C3) y están presentes en bajas concentraciones en cereales, frutas, hortalizas y nueces (**Figura 3**) (Ignat y col 2011; de la Rosa y col 2019). Otro tipo de compuestos no flavonoides son las cumarinas tales como la escopoletina la cual es típica del fruto de noni (Deng y col 2010).

2. Carotenoides

Los carotenoides son pigmentos lipofílicos que juegan un papel muy importante en la nutrición y en la salud humana. Son reconocidos como antioxidantes debido a su capacidad para desactivar el oxígeno singulete y secuestrar radicales peroxilo (Gayosso-García Sancho y col 2011). Algunos carotenoides son precursores de la vitamina A (todo-*trans*- β -caroteno, α -caroteno y β -criptoxantina) y han sido asociados con efectos protectores contra algunos tipos de cáncer, y enfermedades del corazón (Ornelas-Paz y col 2012; Solovchenko y col 2019), mientras que la mayoría no son precursores (licopeno, luteína, zeaxantina, etc).

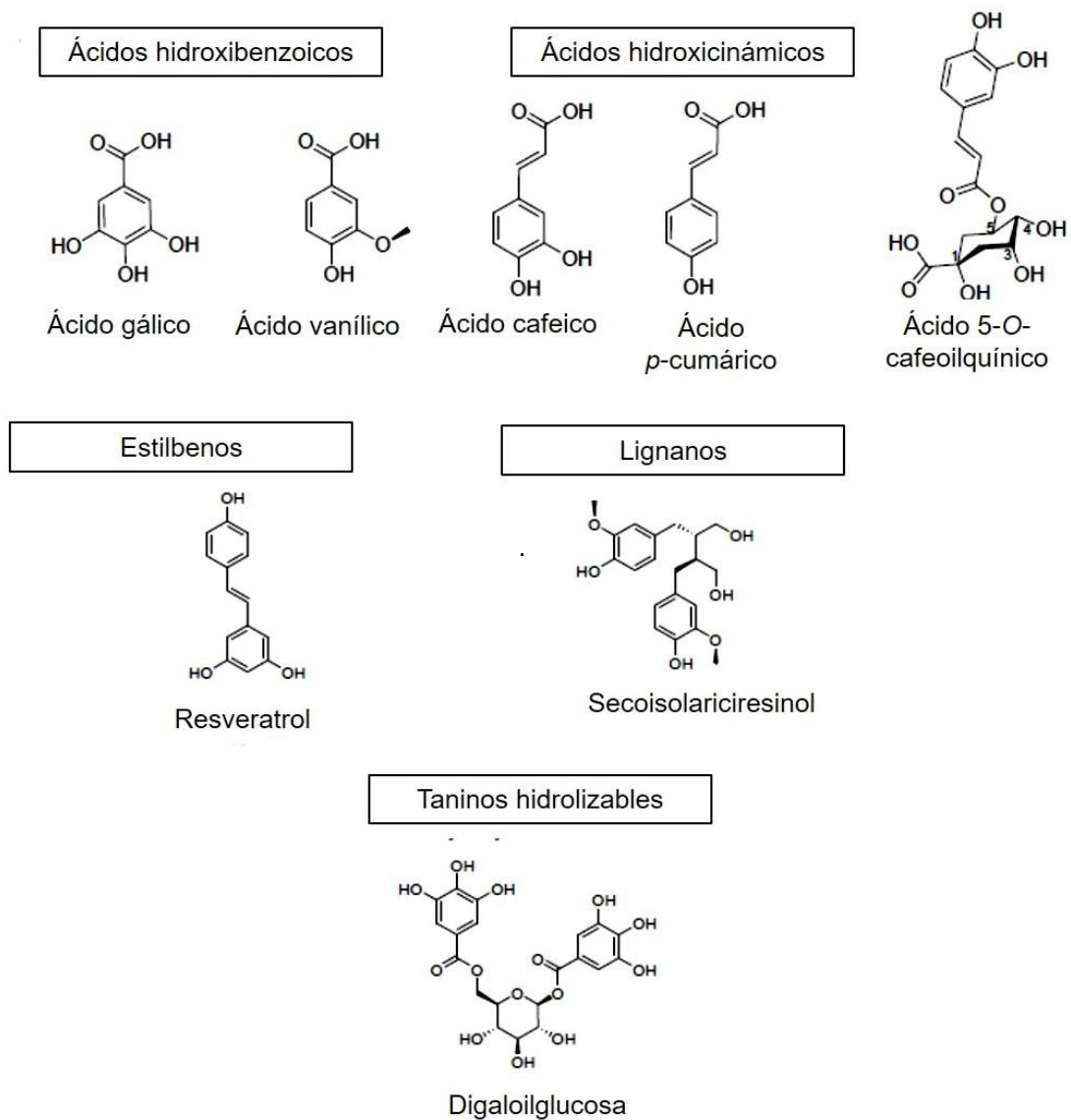


Figura 3. Ejemplos representativos de compuestos no flavonoides.

Adaptado de: de la Rosa y col 2019.

La vitamina A es esencial para la visión normal y el sistema inmune de humanos, mientras que la luteína se considera nutraceutica debido a sus efectos potenciales en la salud humana tales como prevenir la degeneración macular y sus propiedades antioxidantes (Kopec y col 2012; Steiner y col 2018).

Debido a su solubilidad en medios lipofílicos y su propiedad específica de secuestrar radicales peroxilo, se piensa que los carotenoides juegan un papel muy importante en la protección de las membranas celulares y lipoproteínas contra el daño oxidativo (Milde y col 2007; Solovchenko y col 2019).

Químicamente los carotenoides son terpenoides (C₄₀), formados básicamente por ocho unidades de isopreno (C₅), de tal forma que la unión de cada unidad se invierte en el centro de la molécula. En los carotenoides naturales sólo se encuentran tres elementos: C, H y O. El oxígeno puede estar presente como grupo hidroxilo, metoxilo, epoxi, carboxilo o carbonilo. Dentro de los carotenoides se pueden distinguir dos grupos: carotenos, caracterizados por estar compuestos únicamente de carbono e hidrógeno, y xantofilas, caracterizadas por la presencia de diferentes grupos funcionales oxigenados además de carbono e hidrógeno (Crupi y col 2012). Los carotenoides, ya sea carotenos o xantofilas, pueden ser acíclicos (ej. licopeno), monocíclicos o bicíclicos (α , β -caroteno o γ -caroteno) (**Figura 4A**).

Los dobles enlaces conjugados presentes en los carotenoides son los responsables de la intensa coloración de los alimentos que contienen estos pigmentos (Meléndez-Martínez y col 2004). Los carotenoides de las frutas generalmente están más concentrados en la cáscara que en la pulpa, generalmente tienen estructuras

bicíclicas y, según el tipo y el grado de maduración de la fruta, pueden estar presentes como ésteres de ácidos grasos.

Entre los carotenos, el β -caroteno es el más extendido (por ejemplo, en albaricoques, mangos, cerezas, zanahorias y uvas), mientras que el α -caroteno y el γ -caroteno están presentes en concentraciones más bajas. En cuanto a las xantofilas, la luteína (todo trans) es la más extendida, mientras que menores cantidades de zeaxantina, luteína y epoxixantofilas como neoxantina, violaxantina, luteoxantina también pueden estar presentes (**Figura 4B**) (Crupi y col 2012).

3. Actividad antioxidante

El interés por los antioxidantes naturales de las plantas ha aumentado debido al crecimiento a nivel mundial del uso de extractos de plantas para usarse como aditivos en alimentos y cosméticos (Loranty y col 2010; Domínguez-Perles y col 2018). Un antioxidante se define como “cualquier sustancia que, cuando está presente a baja concentración en comparación con la de un sustrato oxidable, retrasa o evita significativamente la oxidación de ese sustrato” (Frankel y Meyer 2000). Los antioxidantes pueden actuar neutralizando la acción nociva de especies reactivas por tres mecanismos principales: donación de átomos de hidrógeno, transferencia de electrones individuales y quelación de metales de transición (Granato y col 2018). Las especies reactivas de oxígeno (ERO) son especies potencialmente reactivas derivadas de las reacciones de oxígeno que ocurren en el organismo. Aunque son necesarios para las funciones celulares, por ejemplo, la señalización y regulación celular (Foyer 2018).

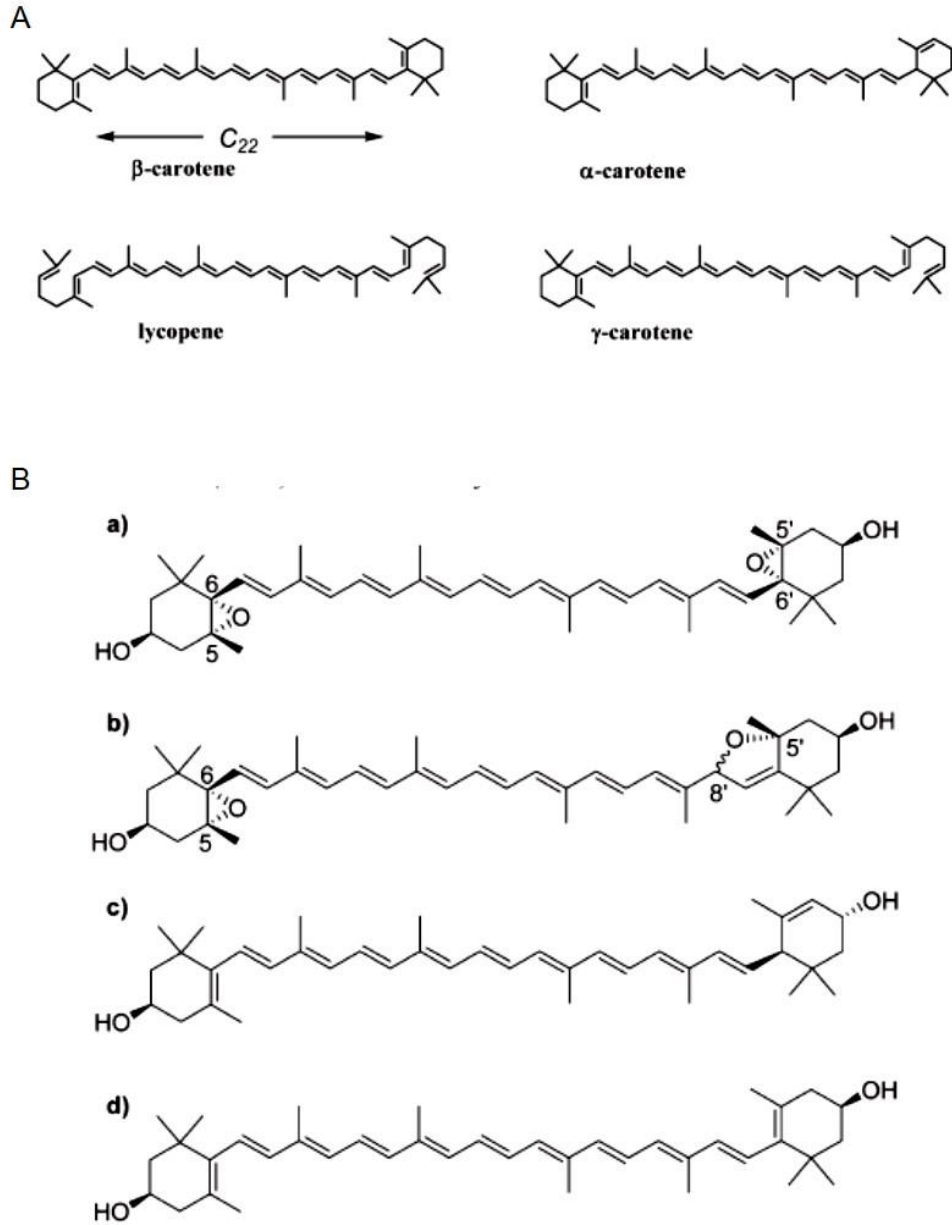


Figura 4. Estructuras típicas de carotenoides acíclicos (licopeno), monocíclicos (γ -caroteno), bicíclicos (α -caroteno y β -caroteno) (A), estructuras de las principales xantofilas (a) violaxantina, (b) luteoxantina, (c) luteína y (d) zeaxantina (B).

Fuente: Crupi y col 2012.

La acumulación de radicales libres excesivos que superan a la capacidad antioxidante celular puede generar estrés oxidativo (Pan y col 2018). Estos radicales se producen por procesos endógenos (enzimas oxidativas, cadena respiratoria) o exógenos (fumar, toxinas, contaminación del aire, entre otros) y pueden dañar a las macromoléculas (ADN, lípidos y proteínas), organelos (membranas y mitocondrias), y tejidos enteros en el cuerpo humano, siendo uno de los factores que contribuyen a la aterosclerosis, cataratas, cáncer, isquemia (vasoconstricción, trombosis), gota, envejecimiento, demencia, diabetes, fibrosis pulmonar y enfermedades de Alzheimer y Parkinson (Loranty y col 2010; Pan y col 2018).

La mayor parte de la capacidad antioxidante de frutas y vegetales se la proporciona su contenido en vitamina E, C, carotenos y compuestos fenólicos. Además, existen otros compuestos como los flavonoides (incluyendo flavonas, isoflavonas, flavononas, antocianinas y catequinas) que son fuertes antioxidantes y que contribuyen significativamente a la capacidad antioxidante total. La medición de los antioxidantes individuales por separado no permite conocer con certeza la capacidad antioxidante total de una preparación, compuesto o de un fluido biológico, por los efectos sinérgicos que puedan establecerse entre los antioxidantes presentes en él (Zavala y col 2012).

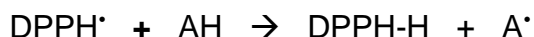
Hay muchos métodos para evaluar la actividad antioxidante, ya sea *in vitro* o *in vivo*. La estrategia más utilizada es probar la actividad antioxidante total de determinada sustancia frente a sustancias cromógenas de naturaleza radical en sistemas *in vitro*. La pérdida de color ocurre proporcionalmente con la concentración. Sin embargo, las determinaciones *in vitro* nos dan tan sólo una idea aproximada de lo que ocurre en situaciones complejas *in vivo* (Kuskoski y col 2005; Alam y col 2013). A pesar de que existen muchos métodos para la medición de actividad antioxidante, uno

sólo no es capaz de identificar todos los posibles mecanismos que están implicados en la oxidación (Frankel y Meyer 2000).

A continuación, se describen algunos ensayos que se utilizan para la medición de la capacidad antioxidante de plantas y alimentos reportados en la literatura.

a. Método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo)

El método del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) evalúa la capacidad antioxidante de sustancias o extractos que pueden reaccionar con un radical estable, DPPH, en solución metanólica. El método está basado en la medición de la absorbancia de los cambios en la concentración de DPPH después de la reacción con un antioxidante. En la reacción, el electrón desapareado del radical DPPH es reducido por la donación de un átomo de hidrógeno de la sustancia antioxidante (AH) o una especie radical (R•), como se indica en la siguiente reacción:



La reducción del radical DPPH se monitorea midiendo la absorbancia a 515 nm durante la reacción, ya que, en su forma radical, el DPPH• de color violeta absorbe a esta longitud de onda, pero al ser reducido, la absorción disminuye cambiando a un color amarillo (Brand-Williams y col 1995; Dawidowicz y col 2012). Se trata de una reacción de acuerdo a un mecanismo principalmente HAT, pero también hay evidencias que puede ocurrir un mecanismo mixto (Schaich y col 2015; Apak y col 2016). El método de DPPH es fácil, rápido y más económico que otros métodos para medir la capacidad antioxidante *in vitro*, y puede ser adaptado a extractos con diferentes solventes como etanol, metanol, benceno, acetona acuosa y etanol acuoso, entre otros (Cheng y col 2006).

b. Método ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)

Otro de los ensayos más comunes para determinar la capacidad antioxidante es el ABTS, el cual mide la capacidad antioxidante de una sustancia o extracto para disminuir la concentración del radical catión del ácido 2,2'-azinobis-3- etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS•+) mediante dos mecanismos: bien por la interrupción de la oxidación inicial y prevención de la producción de ABTS•+, o bien mediante una reacción directa con el radical catión ABTS•+ (Schaich y col 2015). La concentración remanente del radical catión ABTS•+ (cromóforo azul-verdoso) se determina espectrofotométricamente a 734 nm que es cuando presenta su máximo de absorción (Rodríguez-Roque y col 2012). La medida en la que disminuye esta coloración, depende directamente de la capacidad antioxidante de la sustancia que se encuentre presente en el medio.

A diferencia del radical estable DPPH•, no se dispone en el mercado del radical ABTS•+, por lo que es necesario generarlo por oxidación del reactivo ABTS usando persulfato de potasio como agente oxidante (Rodríguez-Roque y col 2012). También es conocido en la literatura científica como el método TEAC (Capacidad Antioxidante en Equivalentes de Trolox, por sus siglas en inglés). Su mecanismo de neutralización es principalmente por transferencia de electrones, y se puede medir la actividad de compuestos hidrofílicos y lipofílicos (Mercado-Mercado y col 2013).

c. Método FRAP (Poder antioxidante reductor del hierro)

Este ensayo fue descrito por primera vez por Benzie y Strain (1996). El método FRAP se desarrolla bajo condiciones ácidas (pH 3.6) y en presencia de antioxidantes (reductores), donde la forma férrica del complejo hierro-tripiridiltriazina (Fe+3~TPTZ,

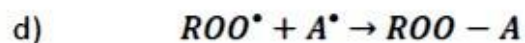
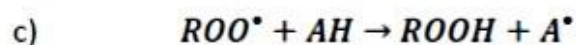
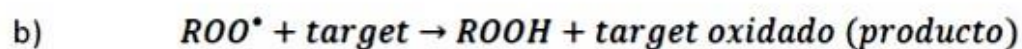
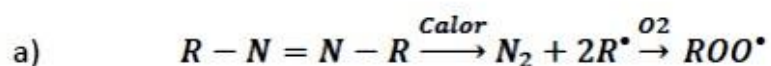
incolore) se reduce a su forma ferrosa (Fe^{+2} -TPTZ). El complejo de Fe^{+2} -TPTZ produce una coloración azul intensa que presenta su máxima absorción a 593 nm. La intensidad del color producido es proporcional a la concentración de antioxidantes. A diferencia de muchos otros sistemas, éste no utiliza ningún radical (Rodríguez-Roque y col 2012).

d. Método ORAC (Capacidad de absorción de radicales oxígeno)

Este método es un ensayo que mide la capacidad de un compuesto para atrapar el radical peróxilo ($\text{ROO}\cdot$), relevante en la oxidación de lípidos en los alimentos; mediante un mecanismo de transferencia de un átomo de hidrógeno (Zapata y col 2014). Es uno de los métodos más usados para determinar la capacidad antioxidante no sólo de frutas y vegetales, sino también en muestras biológicas (plasma, tejidos). Se basa en la habilidad que tienen los antioxidantes para inhibir la pérdida de fluorescencia de la fluoresceína, causada por el generador de radicales AAPH [dihidrocloruro de 2,2-azobis (2-metil-amidinopropano)], en un tiempo determinado.

La cuantificación se realiza midiendo el área bajo la curva de intensidad de fluorescencia a lo largo del tiempo (Rodríguez-Roque y col 2012). Algunas ventajas del ensayo ORAC sobre los ensayos ABTS y DPPH son que incluye el uso de radicales peróxilos como oxidantes los cuales son fisiológicamente relevantes y de vida relativamente larga ($\text{ROO}\cdot$) y que utiliza pH fisiológico de tal manera que los compuestos antioxidantes reaccionan con una carga general y un estado de protonación similar al del cuerpo humano. Además, este ensayo considera la cinética de la reacción, es decir combina tanto el grado como el tiempo de inhibición en una sola determinación (Apak y col 2016).

Los radicales se generan calentando AAPH, que por efecto del calor se descompone desprendiendo nitrógeno en estado gaseoso y generando dos radicales de carbono R• (Reacción a). En presencia de oxígeno, R• son convertidos casi instantáneamente en radicales peroxilo ROO• (Reacción a). Estos pueden atacar moléculas target que presentan fluorescencia como la fluoresceína (Reacción b) o bien reaccionar con un compuesto antioxidante presente en el medio (Reacción c y d) (Schaich y col 2015).



El fundamento del método se basa en la competencia entre el target y los antioxidantes presentes por el radical ROO•. La fluoresceína, compuesto que presenta una fluorescencia intensa en su forma nativa, cuando es atacada por radicales ROO• pierde su fluorescencia, de tal forma que si existe un antioxidante en el medio que reaccione con los radicales ROO• mediante la transferencia de un átomo de hidrógeno (Reacción c) o la adición de radicales (Reacción d) se retrasa la pérdida de fluorescencia de la fluoresceína (Prior y col 2005; Schaich y col 2015).

Esta metodología se adaptó para determinar la capacidad antioxidante hidrofílica y lipofílica, para la cual se emplea una solución de acetona/agua (1/1 v/v), conteniendo 7% de β-ciclodextrina metilada aleatoriamente para solubilizar los antioxidantes

lipofílicos en agua. Una de las ventajas del ORAC es que, al realizar la medición de la capacidad antioxidante por fluorescencia, hay menos interferencia de los compuestos coloreados presentes en algunos alimentos (carotenos, antocianinas), comparados con otros métodos (Rodríguez-Roque y col 2012).

e. Ensayo de la inhibición de hemólisis eritrocitaria inducida por dihidrocloruro de 2,2-azobis (2-metil-amidinopropano)

El estrés oxidativo también puede afectar gravemente a nivel celular, especialmente en la membrana, ya que es el primer sitio de contacto al ataque de radicales libres (Bonarska-Kujawa y col 2011). El daño del estrés oxidativo en los eritrocitos puede derivar en enfermedades tales como β -talasemia, anemia falciforme, deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y otras hemoglobinopatías (Zhao y col 2017).

La membrana de los eritrocitos está compuesta por 39.5% de proteínas y 35.1% de lípidos (principalmente ácidos grasos poliinsaturados), lo que la hace altamente susceptible a la peroxidación. Además, las células rojas de la sangre contienen grandes cantidades de oxígeno y de hierro proveniente de la hemoglobina, por lo que pueden ser iniciadores del proceso oxidativo (Meshkini 2015). Por esto, los eritrocitos han sido considerados un excelente modelo experimental sobre el daño ocasionado por el estrés oxidativo en las membranas celulares (Zhao y col 2017). Se sabe que el H_2O_2 puede penetrar la membrana de los eritrocitos dañando a la célula desde ambos sitios de la membrana (Meng y col 2015). Es por ello por lo que la incorporación de compuestos antioxidantes tiene un papel fundamental para la preservación de la integridad estructural y funcional de la membrana celular, ayudando al equilibrio iónico y la actividad de receptores y enzimas unidas a ella (Meshkini 2015).

Cuando se libera el hierro de la hemoglobina debido al estrés oxidativo, puede unirse a metabolitos intracelulares y componentes de la membrana que pueden generar radicales hidroxilos a partir de la reacción con O₂ en reacciones tipo Fenton, provocando la peroxidación lipídica de la membrana (Durán y col 2013). El [dihidrocloruro de 2,2-azobis (2-metil-amidinopropano)], abreviado como AAPH, es un iniciador de radicales libres por descomposición térmica sin la adición de cofactores, que ha sido usado comúnmente para evaluación de antioxidantes naturales (Wang y col 2017). En este método *ex vivo* se evalúa el porcentaje de inhibición de la hemólisis de eritrocitos de un extracto o compuesto antioxidante cuando se incuba con la presencia del inductor de radicales AAPH a partir de H₂O₂. (García-Becerra y col 2016; Wang y col 2017).

4. Técnicas de análisis de compuestos fenólicos y carotenoides

La amplia variedad de compuestos fenólicos existentes en la naturaleza con polaridad y tamaños tan variado abarcando desde compuestos fenólicos simples (ácidos fenólicos) hasta oligómeros (procianidinas y taninos condensados) sumado a los bajos niveles de concentración en los que pueden encontrarse en las matrices (Motilva y col 2013), ha propiciado el desarrollo de poderosas plataformas analíticas capaces de separar, detectar y dilucidar estructuras fenólicas. De todas estas plataformas destaca la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés) acoplada a espectrometría de masas (MS por sus siglas en inglés) con ionización por electrospray (ESI por sus siglas en inglés) (Ignat y col 2011; Ostrowski y col 2014).

En el caso de los carotenoides, la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) ha sido la técnica de análisis preferida para separar, identificar y cuantificar

carotenoides en muestras biológicas y de alimentos en las últimas décadas. Siendo el arreglo de detector de diodos (DAD por sus siglas en inglés) el detector más comúnmente usado para el análisis de carotenoides mediante HPLC (Kopec y col 2012).

a. Cromatografía líquida de alta resolución

La cromatografía líquida de alta resolución es una técnica analítica basada en la separación de compuestos individuales de una mezcla compleja gracias a la interacción de los analitos con la fase estacionaria y fase móvil. El fenómeno de separación se basa en las distintas afinidades que presentan los constituyentes de la muestra hacia cada una de estas fases. La fase estacionaria puede ser un sólido poroso, generalmente particulado, o bien una sustancia líquida ligada a un soporte sólido formando una capa fina en su superficie. Estas fases estacionarias suelen estar soportadas en placas de vidrio u otro material o contenidas en el interior de un tubo habitualmente metálico, que es lo que se conoce con el nombre de columna cromatográfica (Weston y Brown 1997a).

Por otro lado, la fase móvil es un disolvente o mezcla de ellos a los que en algunas ocasiones se les modifica el pH mediante adición de ácidos, bases o disoluciones reguladoras. La variedad de fases estacionarias y móviles que se pueden seleccionar para HPLC permite la separación de una amplia variedad de compuestos que abarcan desde moléculas pequeñas y se extienden a polímeros tales como proteínas (Moldoveanu y David 2017b). El tipo de cromatografía líquida más usada es la de reparto, donde dependiendo de la polaridad de la fase móvil y estacionaria se clasifica en fase normal (fase estacionaria polar y fase móvil apolar) y en fase reversa (fase estacionaria apolar y fase móvil polar) (Weston y Brown 1997b).

Esta última es la más usada para la separación tanto de compuestos fenólicos (Ignat y col 2011) como de carotenoides (Kopec y col 2012), ya que se usa para separar moléculas neutras en solución en función de su hidrofobicidad (Weston y Brown 1997a).

Generalmente para los compuestos fenólicos las fases estacionarias más empleadas son las que tienen rellenos de sílice modificada químicamente con cadenas de hidrocarburos, generalmente de n-octilo (C-8) o n-octadecilo (C-18), lo que le confiere un alto carácter hidrófobo. También se pueden usar como fase estacionaria materiales poliméricos. Respecto a dimensiones de columnas y tamaños de partícula, comercialmente hay disponibles una gran variedad de ellas.

En el caso del análisis de polifenoles las columnas de HPLC convencionales son las más usadas, con tamaños de partícula que oscilan entre 3 y 5 μm (Hossain y col 2010; He y col 2011; Abu-Reidah y col 2017), aunque recientemente el uso de UHPLC con tamaños de partícula de 1.7 μm se ha extendido ampliamente para el análisis de polifenoles en matrices vegetales (Mizgier y col 2016; Viacava y col 2018). Por otro lado las columnas C18 son a menudo suficientes para separar diferentes carotenoides, aunque las columnas C30 tienden a producir mejores separaciones, especialmente de compuestos similares (por ejemplo, luteína y zeaxantina) (Kopec y col 2012).

La fase móvil para el caso de los fenólicos es típicamente una mezcla de un disolvente orgánico (acetonitrilo, metanol, isopropanol, etc.) y agua, a las que se le pueden agregar pequeñas cantidades de tampones, ácidos o bases (Moldoveanu y David 2017b). Aunque se han optimizado métodos para separar compuestos fenólicos

de una misma familia utilizando gradientes isocráticos (Amakura y col 2000), la mayoría de las aplicaciones emplean elución en gradiente. Los gradientes utilizados para los compuestos fenólicos comienzan con un bajo porcentaje de fase orgánica, entre un 0–10% (v/v) si se utiliza acetonitrilo ó 5–10% en el caso del metanol, y terminan con porcentajes elevados, entre 40–100% de metanol y entre 30–90% de acetonitrilo.

Para carotenoides, la mayoría de los métodos de C30 usan alguna combinación de metil *ter*-butil-éter (MTBE), metanol y una pequeña cantidad de agua y emplean un gradiente para la separación óptima de diferentes especies de carotenoides y sus isómeros. Algunos métodos C30 pueden también separar los isómeros de carotenoides mientras separan simultáneamente tocoferoles y clorofilas (Kopeck y col 2012).

La HPLC emplea una presión elevada para forzar el paso del disolvente por la fase estacionaria, cuyo tamaño de partícula suele ser muy pequeño, consiguiendo la separación de los analitos mediante la retención selectiva en la fase estacionaria y su liberación secuencial a la fase móvil (Moldoveanu y David 2017a). Con base en este fundamento, la instrumentación de HPLC está conformada por un sistema de suministro de disolvente (contenedores de disolvente y desgasificador), un sistema de bombeo de alta presión, un inyector (frecuentemente incluido en un automuestreador), un soporte de columna termostaticado, una columna cromatográfica, un sistema de detección con uno o más detectores acoplados y una unidad controladora para adquisición y procesamiento de datos (Merken y Beecher 2000).

La eficiencia de la separación de los analitos mediante HPLC está determinada por la ecuación de van Deemter, una fórmula empírica que describe la relación entre la velocidad de fase móvil y eficiencia de la columna. En este sentido, el tamaño de partícula de la fase estacionaria es una de las variables que afectan esta relación, es de esperar que a menor tamaño de partícula la eficiencia aumente. Cuando este tamaño de partícula disminuye a valores inferiores a 2.5 μm , se pueden obtener incrementos drásticos en resolución, sensibilidad y velocidad de análisis. Este descubrimiento dio inicio a la cromatografía de líquidos de ultra alta resolución (Swartz 2005).

Por otra parte, a menores tamaños de partícula de la fase estacionaria se requiere el uso de altas presiones, lo que puede producir que el calentamiento por fricción de la fase móvil pueda ser bastante significativo y debe considerarse. Por ejemplo, en HPLC utilizando diámetros de columna de 3.0 a 4.6 mm existe una pérdida de rendimiento debido al flujo no uniforme inducido por la temperatura de la fase móvil.

En este sentido, para minimizar los efectos del calentamiento por fricción en UHPLC se usan columnas de diámetro más pequeño (1–2.1 mm) (Swartz 2005). Sin embargo, la principal desventaja de este sistema es la elevada presión de trabajo, que hace que en ocasiones la tecnología usada en HPLC estándar (bombas, inyector y detectores) no tenga la capacidad necesaria para aprovechar al máximo el uso de fases estacionarias con un tamaño de partícula menor a 2 μm . Por ejemplo, se necesita una presión de 1,035 bar para obtener la máxima eficiencia en una columna de 15 cm de longitud empaquetada con partículas de 1.7 μm . Por lo tanto, se requiere

una bomba capaz de suministrar disolvente a esta presión de forma suave y reproducible (Swartz 2005).

También, el sistema de inyección de la muestra debe operar a esas altas presiones. De igual forma, las válvulas de inyección convencionales, ya sean automáticas o manuales, no están diseñadas para trabajar a esa presión extrema (Swartz 2005). Además, la velocidad de muestreo del detector debe ser lo suficientemente alta como para registrar suficientes puntos de datos a través del pico cromatográfico. La implementación de instrumentación para lograr trabajar con estos niveles de exigencia se consiguió a principios de 2004, cuando se desarrolló el primer sistema de UHPLC (ACQUITY UPLCTM System de Waters), para la separación de pequeñas moléculas orgánicas, proteínas y péptidos relacionados con fármacos (Swartz 2005). En el **Cuadro 1** se presenta la comparación entre las principales características de HPLC y UHPLC.

Una vez llevada a cabo la separación de los analitos de interés, es necesario la detección e identificación de los mismos. En un sistema HPLC, el detector es el componente responsable de convertir algún atributo físico o químico del analito y convertirlo en una señal medible que corresponda a la concentración o identidad de este (Swartz 2010).

Cuadro 1. Comparación entre HPLC y UHPLC

Característica	HPLC	UHPLC
Tamaño de partícula	3 a 5 μm	Menor de 2 μm
Presión máxima de operación	350–400 bar	1,035 bar
Dimensiones de la columna	150 X 3.2 mm	150 X 2.1 mm
Temperatura de la columna	25–30 °C	25–65 °C
Volumen de inyección	5–20 μL	5–10 μL

Fuente: Swartz 2005; Taleuzzaman y col 2015.

Los detectores pueden clasificarse según sean destructivos (electroquímico, espectrometría de masas, etc.) o no destructivos (absorción UV-Vis, fluorescencia, etc). Los detectores de absorción UV-Vis conocidos como detectores de arreglo de diodos (DAD por sus siglas en inglés), son muy usados en el análisis de compuestos fenólicos, ya que debido a la existencia intrínseca de enlaces dobles y aromáticos conjugados en su estructura estos compuestos son cromóforos, lo que le confiere capacidad de absorción de radiación en la región UV-Vis.

Cada familia de compuestos fenólicos posee una máxima de absorción características, los ácidos fenólicos del tipo hidroxibenzoicos tienen su máxima absorción en el rango de 200-290 nm, mientras que los hidroxicinámicos en 270-360 nm (Stalikas y col 2007). Por otra parte las flavonas y flavonoles presentan un espectro con dos bandas principales de absorción denominadas banda I (300–380 nm) y banda II (240–280 nm) (Merken y Beecher 2000).

Una de las limitaciones del detector DAD es la imposibilidad de reconocer la presencia de azúcares o grupos acilo enlazados a compuestos fenólicos, debido a que estos grupos de compuestos no son cromóforos fuertes. Además, dado que no proporciona información estructural, es necesario el uso de patrones comerciales para identificar de manera inequívoca un compuesto. Sin embargo, su sencillez, rapidez y relativo bajo costo hacen que su uso esté ampliamente extendido, acoplado en ocasiones a otros detectores como espectrometría de masas (MS) y resonancia magnética nuclear (RMN) para una identificación inequívoca de compuestos fenólicos en matrices vegetales (Stalikas 2007). En el caso del análisis de carotenoides, son

frecuentes los reportes de métodos que usan este tipo de detector (DAD) (Gayosso-García Sancho y col 2011).

b. Espectrometría de masas

Los detectores de espectrometría de masas (MS) son sistemas de detección utilizados para identificar y cuantificar compuestos de interés en diferentes productos vegetales, debido a su gran potencial y alta sensibilidad (Dorta y col 2014). Este sistema se basa en la separación a vacío de iones en fase gaseosa de acuerdo con su relación masa/carga (m/z). En los últimos años este sistema de detección ha experimentado un auge espectacular, lo cual se debe a las ventajas que posee, principalmente a su selectividad y al hecho de que es uno de los pocos sistemas de detección que proporciona información estructural (Aaby y col 2007).

A esto se le suma el hecho de que cuando se acopla a una técnica separativa, como puede ser la HPLC, el uso de este detector proporciona una segunda dimensión de separación, ya que tras la separación de los analitos en la técnica separativa se produce una segunda separación de estos en el espectrómetro de masas en función de su relación m/z .

El espectrómetro de masas está compuesto básicamente por un sistema de introducción de muestra, un sistema de ionización, un acelerador de iones a través de un campo eléctrico, un analizador que dispersa los iones en función de su relación masa/carga (m/z), un detector de iones y finalmente un sistema de adquisición de datos que procesa la señal generada por el detector. La fuente de ionización es el compartimento donde se producen las especies cargadas, la ionización por electrospray (ESI) es la más empleada en el análisis de compuestos fenólicos.

Para llevar a cabo el acoplamiento de una técnica que trabaja en fase líquida, como es la HPLC, con un espectrómetro de masas en el que las sustancias para ser analizadas deben encontrarse en fase gaseosa, es necesaria una interfase adecuada.

En el proceso de formación del electrospray, el cual se lleva a cabo a presión atmosférica, intervienen diversos mecanismos al mismo tiempo. La muestra en estado líquido es conducida a través de un capilar de acero inoxidable de pequeño diámetro. A medida que la muestra se pulveriza constantemente con la ayuda de un gas nebulizador (generalmente nitrógeno), se aplica un alto potencial eléctrico en la aguja (3–4 kV), dando como resultado la formación de gotitas altamente cargadas (proceso conocido como nebulización) (El-Aneed y col 2009).

Una vez que en la interfase se ha llevado a cabo la transformación de los iones procedentes de la técnica separativa desde la fase líquida a la fase gaseosa, los iones son dirigidos hacia el interior del analizador de masas. Estos analizadores de masas permiten la separación, detección y cuantificación de los analitos en estudio con un grado de sensibilidad y selectividad muy elevado, proporcionando información sobre su masa molecular.

Un analizador de masas es la parte del instrumento en el que los iones se separan en función en sus valores m/z (El-Aneed y col 2009). Existen diversos tipos: analizador de cuadrupolo (transmiten los iones de un pequeño rango de m/z a través de un campo electrodinámico), trampa de iones (los iones pueden ser formados y confinados durante cierto tiempo por la acción de campos eléctricos y/o magnéticos), analizadores de tiempo de vuelo (se fundamentan en la separación en el tiempo en base a la velocidad del ión en un tubo de vuelo), y analizadores de sector magnético (utilizan un imán permanente o un electroimán) (Glish y Burinsky 2008; El-Aneed y col 2009).

Los analizadores de trampa de iones permiten el confinamiento de iones dentro de una cámara de pequeño tamaño utilizando campos eléctricos (Paul trap o ión trap, Orbitrap) o magnéticos (analizador de resonancia ciclotrónica de iones mediante transformada de Fourier, FT-ICR). Este tipo de analizadores permiten almacenar, seleccionar y analizar los iones formados en la misma trampa o en fuentes de ionización externas.

En un analizador de trampa de iones lineal, los iones están confinados radialmente por una radiofrecuencia que existe solo en dos dimensiones (2D), y axialmente por electrodos terminales a los cuales se les aplica un potencial que actúa como barrera para los iones atrapados en su interior (Douglas y col 2004).

Este tipo de analizadores, denominados trampas iónicas lineales (LIT, por sus siglas en inglés) o cuadrupolos de confinamiento lineal (LTQ, por sus siglas en inglés), mejoró muchas de las características de los trampa de iones cuadrupolar (QIT por sus siglas en inglés) aumentando su capacidad de almacenamiento de iones, velocidad de barrido y sensibilidad (Schwartz y col 2002).

El uso combinado de HPLC con espectrometría de masas de trampa iónica lineal ha sido empleando en la identificación de compuestos fenólicos en matrices vegetales. Por ejemplo, se ha utilizado en muestras de achicoria roja (Bergantin y col 2017) cáscaras y semillas de aguacate (Melgar y col 2018) y bagazo de uva (Peixoto y col 2018).

B. EI NONI

1. Generalidades y aspectos botánicos

Noni es el nombre hawaiano para el fruto de *Morinda citrifolia* L., también conocido como mora de la India. Esta fruta pertenece a la familia Rubiaceae y es originaria del Sudeste Asiático, Oceanía y Australia tropical, extendiéndose desde la Polinesia a la India. Actualmente crece en todo el trópico y se cultiva a escala comercial en América Latina, desde México a Colombia y Venezuela, entre ellos Costa Rica, Panamá, Cayos de Florida y las Antillas (Chan-Blanco y col 2007).

Los polinesios han estado utilizando la planta de noni con fines alimenticios y medicinales por más de 2000 años, ya que se utiliza sobre todo para estimular el sistema inmunológico y por lo tanto para luchar contra las infecciones bacterianas, virales, parasitarias y micóticas, también se utiliza para evitar la formación y la proliferación de tumores, incluyendo los malignos (Chan-Blanco 2006). Actualmente los productos de noni, tales como jugos y polvos encapsulados son alimentos funcionales muy populares en Asia, Europa y Norteamérica. (Motshakeri y Ghazali 2015).

Morinda citrifolia var *citrifolia* es la única variedad, de las tres reconocidas actualmente, usada como un suplemento alimenticio y la más importante en cuanto a su valor cultural, medicinal y económico (Assi y col 2015). Es llamada “mengkudu” en Malasia, “nhau” en las Islas del Pacífico Sur y árbol que quita el dolor en el Caribe.

La planta de noni es un arbusto perenne de 3 a 10 m de altura con abundantes hojas anchas elípticas (5-17 cm de largo, 10 a 40 cm de ancho). Presenta floración todo el año y produce flores pequeñas, blancas y tubulares (Carrillo-López 2011). El fruto de noni es oval, alcanzando de 4-10 cm de largo y 3-4 cm de ancho, su color

varía de verde a amarillo hasta casi blanco al momento de su recolección (**Figura 5**). El fruto maduro despide un fuerte olor a rancio semejante al del ácido butírico por lo que es conocido como el fruto del queso; la pulpa es jugosa y amarga, de color amarillo opaco o blanco y aspecto gelatinoso (Chan-Blanco y col 2006, Motshakeri 2015).

2. Composición nutrimental

Los análisis de la composición nutrimental del fruto de noni han mostrado que el fruto contiene 90% de agua y 10% de materia seca. La materia seca consiste principalmente de sólidos solubles (8-10°Brix) de los cuales el 5% son azúcares reductores (glucosa y fructosa) y 1.3% es sacarosa y el resto consiste de fibra dietaria y proteína. (Carrillo-López 2011).

El contenido de proteína es alto y representa un 11.3% de la materia seca y los principales aminoácidos son el ácido aspártico, ácido glutámico e isoleucina. El fruto de noni es una buena fuente de vitaminas y minerales. Aproximadamente 10-12% de la materia seca son minerales principalmente potasio (30-150 ppm), calcio, azufre, magnesio, sodio, fósforo y trazas de selenio (Motshakeri y Ghazali 2015). Las vitaminas que se han reportado en el fruto de noni incluyen el ácido ascórbico (24-158 mg 100g⁻¹ de materia seca) y provitamina A (Carrillo-López 2011).

3. Fitoquímicos asociados a noni

Son casi 200 los fitoquímicos que han sido identificados y aislados de diferentes partes de la planta de *M. citrifolia*, Sin embargo, hasta la fecha su composición a fitoquímica completa no ha sido reportada (Assi y col 2015). La composición química y sus concentraciones dependen no únicamente de la parte de la planta sino de su país de origen, época de cosecha entre otros (Motshakeri y Ghazali 2015).

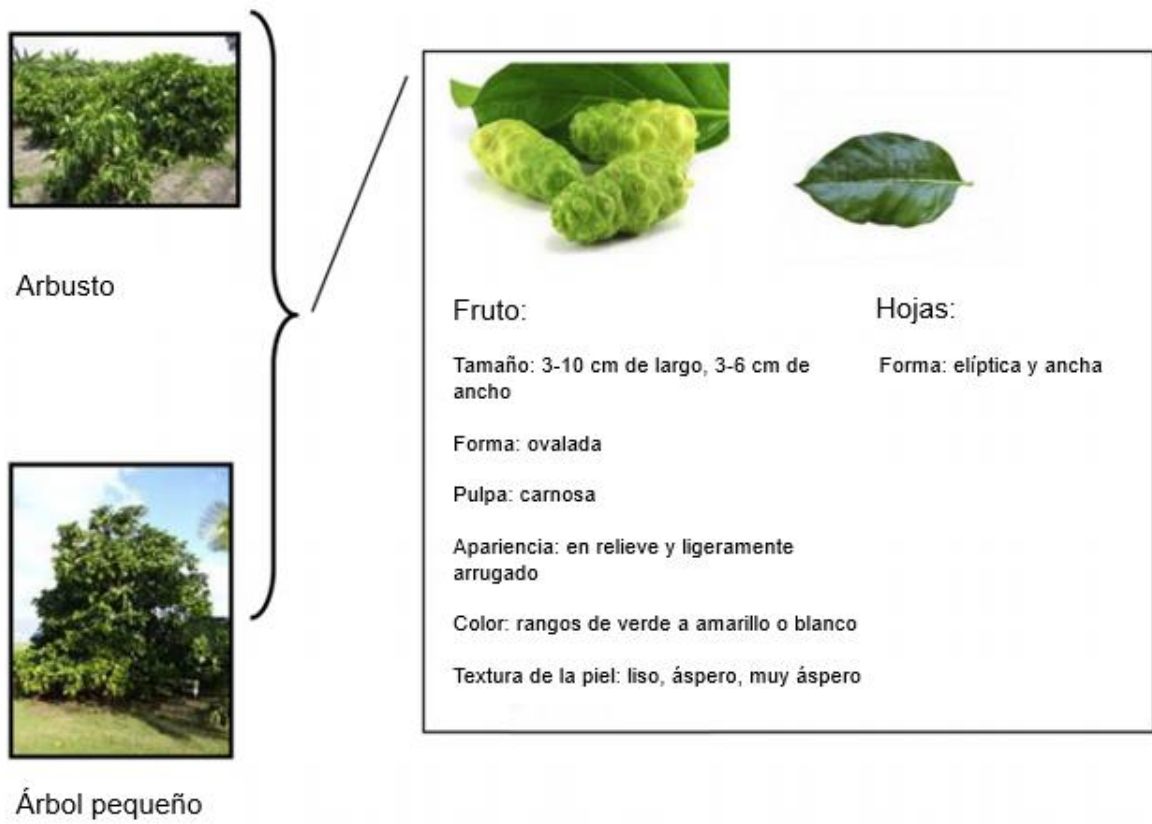


Figura 5. Características de la planta de *M. citrifolia* L., fruto y hoja.

Adaptado de Motshakeri y col 2015.

Entre los principales fitoquímicos registrados están los compuestos fenólicos, ácidos orgánicos y alcaloides que tienen un efecto positivo en la salud con la protección contra el cáncer, problemas cardiovasculares, el envejecimiento y enfermedades asociadas. Los compuestos fenólicos comúnmente reportados incluyen antraquinonas (damnacantal, morindona y morindin), aucubina, escopoletina (Carrillo-López 2011) e iridoides tales como asperulósido y ácido asperulosídico (Potterat y Hamburger 2007). Entre los flavonoides se han identificado a la catequina, epicatequina, kaempferol, quercetina y rutina (Lewis-Luján y col 2014; Motshakeri y Ghazali 2015). Los ácidos orgánicos más importantes son el caproico, caprílico y el málico (Motshakeri y Ghazali 2015).

Además, se ha reportado la existencia de proxeronina en el Noni, la cual es el precursor de la xeronina, un alcaloide que se encuentra combinado con proteínas humanas, mejorando su funcionalidad. Este autor atribuye muchos de los efectos beneficiosos del noni a la xeronina. Sin embargo, aún no se ha podido determinar una caracterización química ni tampoco se ha publicado un método para evaluar su contenido (Chan-Blanco y col 2006).

4. Actividad biológica del noni

Varios estudios *in vitro* e *in vivo* han mostrado que los compuestos fitoquímicos del noni le confieren propiedades antioxidantes tales como la capacidad de secuestrar radicales libres; propiedades anticarcinogénicas, antimutagénicas, analgésicas, antimicrobianas y antiinflamatorias, así como la habilidad de inhibir la oxidación de lipoproteínas de baja densidad, estimular el sistema inmune, regular el colesterol y regular la función celular entre otras (Yang y col 2007; Palu y col 2008; Singh 2012, Wang y col 2013; Dussosoy y col 2016).

En cuanto a la capacidad antioxidante se han realizado un gran número de trabajos en diferentes partes de la planta, en extractos o en productos derivados del noni tales como jugo o puré en los cuales sus propiedades antioxidantes han quedado demostradas, atribuidas a compuestos fenólicos, β -caroteno y flavonoides tales como catequina y epicatequina, entre otros (West y col 2011; Wang y col 2013; Motshakeri y Ghazali 2015).

5. Importancia económica y usos tradicionales

Los productos de noni se han comercializado en Estados Unidos desde 1990s, derivados de hojas y frutos son vendidos como cápsulas, tés y jugos. Sin embargo, el jugo de noni fermentado mezclado con el jugo de otras frutas constituye el producto más importante en el mercado internacional, especialmente desde su aprobación como un alimento nuevo por la Comisión de la Unión Europea en el año 2003 (European Commision 2003; West y col 2011). Según Potterat y Hamburger (2007), las ventas anuales de productos de noni ascienden a 1.3 billones de dólares.

Existe poca información estadística de los volúmenes de producción del noni, pero se sabe que en la región del Pacífico se produce y comercializa un volumen importante de productos a base de noni, aproximadamente 23,000 toneladas. La Polinesia Francesa suministra y exporta alrededor del 84%; Samoa, el 9%; las Islas Cook, el 4%; Tonga, Fiji y Vanuatu suministran y exportan el volumen restante (Codex Alimentarius 2013). A nivel nacional el principal estado productor de noni es Nayarit, con una superficie sembrada de 28 hectáreas y una producción de 229 toneladas seguido de Guerrero y Michoacán con 123 toneladas y 25 toneladas respectivamente (SAGARPA 2016).

El noni posee un amplio rango de propiedades medicinales. El fruto y las hojas ejercen actividades antibacteriales, la raíz elimina las infecciones de los pulmones y las hemorroides, también muestra propiedades sedativas. Los extractos de las hojas son útiles para tratar dolores e inflamaciones de la piel. Muchas personas toman extractos de la fruta para tratar la hipertensión, dolores menstruales, artritis, úlceras gástricas y diabetes, entre otras afecciones (González-Lavaut y González-Lavaut 2003).

6. Jugo de noni

El jugo de noni es especialmente conocido por sus propiedades medicinales: antibacterianas, analgésicas, anticongestivas, antiinflamatorias, astringentes, laxantes, sedantes e hipotensivas, las cuales han sido citadas por muchos autores (Chunhieng y col 2005; Gupta y Singh 2013; Dussossoy y col 2016). Actualmente, el jugo de noni se considera un alimento funcional popular (Motshakeri y Ghazali 2015), y se ha establecido que posee actividades antioxidantes (Wang y col 2013), antiinflamatorias (Dussossoy y col 2016), anticancerígenas (Gupta y Singh 2013), y de mejora de la inmunidad (Palu y col 2008).

Algunas de estas propiedades se han asociado con el contenido fitoquímico del jugo (Wang y col 2013). La investigación sobre fitoquímicos de jugo de noni ha identificado y cuantificado a la escopoletina, la rutina, la quercetina y algunos iridoides, entre otros (West y col 2011; Potterat y col 2007; Dussossoy y col 2011). Hoy en día también se cuenta con información parcial de su composición fisicoquímica (**Cuadro 2**) (Chan-Blanco 2006).

El jugo de noni puede obtenerse mediante diversas técnicas, siendo las principales la fermentación, el prensado y la extracción por goteo (Newton 2003), de las cuales la

Cuadro 2. Composición fisicoquímica de jugos de noni.

Características	Chunhieng (2003) ^a	Shovic y Whister (2001) ^a	European Commision (2002) ^b
pH	3.72	-	3.4-3.6
Materia seca	9.8 ± 0.4%	-	10-11%
Solidos solubles totales (°Brix)	8	-	-
Proteína	2.5%	0.4 g/100g	0.2-0.5%
Lípidos	0.15%	0.30 g/100g	0.1-0.2%
Glucosa	11.9 ± 0.2 g/L	-	3.0-4.0 g/100g
Fructosa	8.2 ± 0.2 g/L	-	3.0-4.0 g/100g
Potasio	3900 mg/L	188 mg/100g	30-150 mg/100g
Sodio	214 mg/L	21 mg/100g	15-40 mg/100g
Magnesio	14 mg/L	14.5 mg/100g	3-12 mg/100g
Calcio	28 mg/L	41.7 mg/100g	20-25 mg/100g
Vitamina C	-	155 mg/100g	3-25 mg/100g

^a Fruto de noni

^b Jugo Tahitian Noni™ (Jugo comercial de noni que contiene 89% jugo de noni y 11% de concentrado de jugos de uva y arándano).

Fuente: Chan-Blanco y col 2006.

más común es por fermentación de los frutos en contenedores cerrados por aproximadamente 2 meses (Motshakeri y Ghazali 2015). En México, el estado de Nayarit es el principal productor de noni (Sagarpa 2016) cuya producción se destina principalmente a la extracción de jugo utilizando el método de extracción por goteo a corto plazo. Sin embargo, surge un problema de manejo de desechos para los productores de jugo de noni ya que se desechan en una gran cantidad.

C. SUBPRODUCTOS DE LA ELABORACIÓN DE JUGO

En muchos procesos agroindustriales, como la elaboración de jugos y vinos se generan subproductos y residuos ricos en fitoquímicos (Kammerer y col 2014). Estos desechos derivados de la industria de los jugos de frutas y hortalizas comprenden aproximadamente 5.5 millones de toneladas métricas (Sagar y col 2018), los cuales pueden representar un problema ambiental; sin embargo, estos pueden ser convertidos en productos útiles y comercializables Tumbas-Saponjac y col 2015; Sagar y col 2018).

Cada vez más, estos desechos se están considerando como fuentes importantes de fitoquímicos tales como compuestos fenólicos y carotenoides, entre otros, los cuales permanecen en el bagazo después del proceso de extracción del jugo (Dominguez-Perles y col 2018). Estas sustancias, han despertado el interés tanto de científicos como de la industria por el reconocimiento de sus propiedades antioxidantes y su probable papel en la prevención de varias enfermedades asociadas al estrés oxidativo como el cáncer y enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas (Sagar y col 2018; Ben-Aziz y col 2019).

Cada vez más, estos desechos se están considerando como fuentes importantes de fitoquímicos tales como compuestos fenólicos y carotenoides, entre otros, los cuales permanecen en el bagazo después del proceso de extracción del jugo (Dominguez-Perles y col 2018). Estas sustancias, han despertado el interés tanto de científicos como de la industria por el reconocimiento de sus propiedades antioxidantes y su probable papel en la prevención de varias enfermedades asociadas al estrés oxidativo como el cáncer y enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas (Sagar y col 2018; Ben-Aziz y col 2019).

La identificación y cuantificación de dichos compuestos, así como la evaluación de su capacidad antioxidante es un primer paso para promover la posible aplicación de estos residuos. Algunos ejemplos de desechos (bagazos) que han sido ampliamente estudiados y que han demostrado contener cantidades importantes remanentes de fitoquímicos son los bagazos de uva y manzana (Sudha y col 2007; González-Centeno y col 2013). Se ha reportado que estos bagazos son fuentes potenciales de ingredientes alimentarios de valor agregado, tales como fitoquímicos y fibra (O'shea y col 2012). Zhou y col (2009) y Tumbas-Saponjac y col (2015) identificaron y cuantificaron por primera vez los compuestos fenólicos y evaluaron la capacidad antioxidante en bagazos de arrayán chino y fresa, respectivamente.

Tumbas-Saponjac y col (2015) encontraron que el cultivar marmolada fue el que presentó el mayor contenido de fenólicos siendo el ácido protocatéquico, catequina y pelargonidina-3-glucósido los más abundantes y el que presentó la mayor capacidad antioxidante, y concluyeron que el bagazo de fresa es una buena fuente de fitoquímicos que puede ser utilizado como ingrediente funcional.

Como subproducto agroindustrial resultante de la industria de fabricación de jugo de noni queda el bagazo, el cual generalmente es desechado provocando contaminación ambiental (Aregheore 2005). El bagazo de noni está formado por el pericarpio y las semillas. Después de la extracción, este se oscurece (**Figura 6**) y cuando se seca y se muele tiene un olor y sabor a café (Aregheore 2005). En algunas regiones de México, el bagazo de noni es usado como abono (SAGARPA 2009), también se ha sugerido su empleo como alimento para rumiantes (Chuenging y col 2005), con aplicaciones limitadas debido al sabor inusual y a la baja digestibilidad que presenta (Aregheore 2005).

Existe poca información en la literatura acerca de la composición del bagazo de noni. Aregheore (2005) estudió los desechos de jugo de noni obtenidos a partir de un proceso de extracción de jugo de fruto de noni fermentado durante 2 meses, lo que permitió conocer su potencial como forraje al determinar solamente las características de la fibra y su composición proximal (**Cuadro 3**). Adicionalmente, Evvyernie y col (2018) estudiaron mezclas de desechos derivados de la industria del jugo de noni y la piña como un suplemento energético para cabras lecheras. Este estudio se centró en las características de fermentación *in vitro*, la digestibilidad y la población de microbios del rumen. Sin embargo, estos estudios previos no evaluaron el contenido de fitoquímicos, ácido ascórbico ni minerales del bagazo de noni.



Figura 6. Residuo de jugo de noni (*Morinda citrifolia* L.) molido.

Fuente: Aregheore 2005.

Cuadro 3. Composición química de bagazo de noni

Características	Contenido (%)
Materia seca	90.4
Análisis con base en materia seca	
Proteína cruda	12.6
Extracto etéreo	1.1
Cenizas	8.8
Fibra neutro-detergente	60.9
Fibra ácido-detergente	43.1
Lignina detergente ácida	19.0
Hemicelulosa	17.8
Celulosa	24.1
Carbohidratos no estructurales	16.7
Materia orgánica	91.2

Fuente: Aregheore 2005

IV JUSTIFICACIÓN

La industria del jugo de noni (*Morinda citrifolia* L.) ha crecido sustancialmente en los últimos años debido a que promueve efectos benéficos a la salud. Dichos efectos son atribuidos principalmente a su contenido de fitoquímicos. En el fruto de *Morinda citrifolia* se han identificado casi 200 fitoquímicos, principalmente compuestos fenólicos los cuales han mostrado poseer propiedades antioxidantes.

Durante el proceso de elaboración del jugo de noni se producen desechos que generalmente provocan contaminación ambiental. En algunas regiones de México, el bagazo de noni se utiliza como abono, por otra parte, se ha probado su uso como alimento para rumiantes con aplicaciones limitadas.

Actualmente, la evaluación de subproductos de la industria de alimentos como fuente de fitoquímicos es una tendencia que va en aumento, así se ha reportado que en el bagazo de muchas frutas y hortalizas permanecen una gran cantidad de compuestos bioactivos.

Sin embargo, la información científica sobre los compuestos fitoquímicos que permanecen en bagazo de noni es escasa. Por lo que la identificación y cuantificación de dichos compuestos, así como la determinación de su capacidad antioxidante es importante para determinar su potencial como fuente de fitoquímicos (ácidos fenólicos, flavonoides y carotenoides) para ser utilizado como ingrediente funcional en alimentos.

V OBJETIVOS

A. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el potencial fitoquímico del bagazo (con semilla y sin semilla) y jugo de noni (*Morinda citrifolia* L.) y su capacidad antioxidante.

B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Realizar una caracterización físicoquímica (pH, acidez titulable, sólidos solubles totales) del bagazo (con semilla y sin semilla) y jugo de noni.
2. Realizar un análisis nutrimental (análisis proximal, ácido ascórbico, fibra dietaria y minerales) en bagazo (con semilla y sin semilla) y jugo de noni.
3. Evaluar la composición fitoquímica del bagazo (con semilla y sin semilla) y jugo de noni (fenólicos libres, fenólicos ligados, fenólicos totales, flavonoides totales, taninos condensados y carotenoides totales).
4. Identificar y cuantificar el contenido individual de carotenoides, ácidos fenólicos, y flavonoides en bagazo (con semilla y sin semilla) y jugo de noni.
5. Evaluar la capacidad antioxidante de bagazo (con semilla y sin semilla) y jugo de noni mediante 4 ensayos *in vitro* DPPH, ABTS, FRAP, ORAC.
6. Evaluar la capacidad de inhibición de la hemólisis eritrocitaria de bagazo (con y sin semilla) y jugo de noni, utilizando el modelo biológico (*ex vivo*) del daño inducido por los radicales libres generados por AAPH.

VI MATERIALES Y MÉTODOS

A. MATERIALES

Para el desarrollo de este proyecto se utilizó como materia prima fruto de noni (*Morinda citrifolia* L.) proveniente de una huerta comercial ubicada en Nayarit, México. Los frutos fueron cosechados en un estado de madurez amarillo-pálido muy firme (Cárdenas-Coronel y col 2016) y con ausencia de daños físicos. Los frutos se trasladaron al Laboratorio de Bioquímica y Fisiología Poscosecha de Frutas y Hortalizas del Posgrado en Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa, donde se lavaron, se sanitizaron con una solución de hipoclorito de sodio 0.01% (v/v), se dejaron secar y se mantuvieron por 4-5 días a 23°C hasta alcanzar un grado de madurez translúcido-gris muy suave (Cárdenas-Coronel y col 2016), en el que la fruta es suficientemente suave para liberar fácilmente la mayor parte de su jugo. Posteriormente se elaboró el jugo para obtener el bagazo.

B. MÉTODOS

1. Elaboración del jugo y obtención del bagazo

Para obtener el jugo, los frutos enteros se colocaron en 4 contenedores térmicos con capacidad de 7.8 L (~3.0 kg frutos por contenedor térmico) a temperatura ambiente. Después de un periodo de 8 días el jugo drenado naturalmente fue colectado (método de extracción por goteo de corto plazo). Se obtuvo jugo adicional presionando a mano el residuo envuelto en una manta. Se recolectó todo el jugo extraído y el residuo sólido que contenía humedad residual se denominó bagazo de noni. Este bagazo se dividió en bagazo con semilla (BCS) y bagazo sin semilla (BSS). El jugo de

noni (JN), BCS y BSS se liofilizaron, se molieron y se almacenaron en contenedores herméticamente cerrados a -20 °C hasta su análisis.

2. Análisis fisicoquímicos

a. Acidez titulable

La acidez titulable se llevó a cabo por triplicado en BCS, BSS y JN de acuerdo con el método oficial de la AOAC (2012) 942.15, que consiste en triturar 10 g de cada muestra en 50 mL de agua destilada neutra (pH=7), posteriormente filtrar y aforar a 100 mL para posteriormente tomar una alícuota de 20 mL para proceder a titular con hidróxido de sodio 0.1 N hasta alcanzar un pH de 8.1 ± 0.2 (punto de vire de la fenolftaleína). Los cambios de pH fueron observados con un potenciómetro Orion 420-A, USA. El porcentaje de acidez titulable se expresó como porcentaje de ácido cítrico que fue calculado con la siguiente ecuación:

$$AT(\%) = \frac{[(VG)(MEqA)(N)(V)]}{[(PM)(A)]} (100)$$

Dónde:

VG= mL de NaOH gastados en la titulación

V = Volumen total de la disolución

N = Normalidad del NaOH (0.1N)

A = Alícuota de la muestra

MEqA = Peso miliequivalente del ácido cítrico (0.064 g)

PM = Peso de la muestra

b. pH

Para la medición del pH, se siguió la metodología 943.02 propuesta por la AOAC (2012), para la cual se utilizó un potenciómetro digital (Orion 420-A, USA) previamente

calibrado a pH 4 y 7; en las mismas alícuotas obtenidas para el análisis de acidez. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

c. Sólidos solubles totales (SST)

Los sólidos solubles totales se evaluaron mediante refractometría de acuerdo con el método 932.12 de la AOAC (2012), donde se colocaron unas gotas del jugo (JN) en un refractómetro (marca ATAGO 1-877-USA), con ajuste automático de temperatura. Para el caso de BCS y BSS se realizaron las mediciones en las soluciones obtenidas para el análisis de acidez titulable, se pusieron unas gotas en el refractómetro para tomar la lectura, reportándose los resultados como °Brix. Las cuantificaciones se realizaron a temperatura ambiente, por triplicado.

3. Análisis nutrimental

a. Análisis proximal

1) Humedad

Se determinó el contenido de humedad mediante el método termogravimétrico 925.09 descrito por la AOAC (2012) en las muestras de BCS, BSS y JN. El método se basa en someter la muestra a desecación en una estufa de aire forzado hasta obtener peso constante. Mediante la cuantificación de la pérdida de peso, se determina el porcentaje de humedad contenido en la muestra.

Se llevó a cabo por triplicado. Se colocaron una serie de cápsulas de porcelana en una estufa (marca Felisa, Modelo FE-292D, Serie 0511109) por 24 horas a 100 °C para conseguir el peso constante (PCc). Se pesaron 1.5 g de muestra fresca (PMf) junto con la cápsula de porcelana utilizando una balanza digital (Marca Sartorius ED2245) y posteriormente se secaron en la estufa durante 24 horas a 100 °C. Una vez

pasado el tiempo de secado por convección se dejaron enfriar a temperatura ambiente por 30 min en un desecador. Después se determinó el peso de la muestra seca (PMs) calculando el contenido de humedad con la siguiente ecuación:

$$Humedad(\%) = \frac{PMf - (PMs - PCc)}{PMf} (100)$$

PMf = Peso de la muestra fresca (g)

PCc = Peso constante de la cápsula (g)

PMs = Peso del recipiente con la muestra seca (g)

2) Cenizas

Se siguió la metodología 940.26 de la AOAC (2012) por triplicado. Esta determinación se llevó a cabo colocando varios crisoles de porcelana en una estufa con aire forzado para obtener peso constante (Thermolyne, Modelo FB1415M, Serie 1257050461027, México) por espacio de 24 h a una temperatura de 100 °C. Enseguida fueron ambientados durante 30 min en un desecador y se registró el peso (W2). Inmediatamente después a cada crisol se le adicionaron 2 g de muestra fresca (PMf), los cuales fueron sometidos a carbonización en una placa de calentamiento (Thermolyne, Modelo SP131015, Serie 130040705026). Los crisoles con la muestra carbonizada fueron colocados en una mufla por espacio de 5 h a una temperatura de 550 °C. Pasado este tiempo, la temperatura de la mufla se bajó hasta los 100 °C, para posteriormente colocar los crisoles con la muestra en el desecador en el cual se mantuvieron por 30 min, finalizado esto, se registró su peso (W1). Los cálculos fueron realizados de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$Cenizas(\%) = \frac{W1 - W2}{PMf} (100)$$

Dónde:

W1 = Peso del crisol con cenizas (g)

W2 = Peso del crisol (g)

PMf = Peso de la muestra fresca (g)

3) Extracto etéreo

Se utilizó el método de extracción por solvente por medio del cual los lípidos se extraen de la muestra seca y molida, en un equipo Soxhlet con éter de petróleo 35-60 °C. Se llevó a cabo por triplicado en BCS, BSS y JN de acuerdo con la metodología 920.39 propuesta por la AOAC (2012). El análisis se determinó en un equipo Soxtec System de Tecator, Extraction Unit, Suecia; constituido por una unidad de extracción HT 1043, serie 2833 y una unidad de servicio HT 1046. También se acopló un recirculador-enfriador de agua (Refrigerated Constant Temperature Circulator marca Polyscience, Modelo 1146, Serie 415058, USA) para mantener la temperatura de condensación constante durante la extracción etérea.

Se pesó 1 g de muestra liofilizada (PM) en un papel filtro Whatman No. 4, el cual fue enrollado de tal manera que se pudiera introducir a un dedal de celulosa. Toda esta operación se llevó a cabo con guantes de látex para no influir en la medición del análisis. En recipientes de aluminio previamente tarados (PR) se adicionaron 50 mL de éter de petróleo 35-60 °C. Los dedales ya colocados en el equipo de extracción fueron sumergidos en los vasos de aluminio con el solvente, extrayéndose así la grasa de las muestras, durante 30 min, después se procedió a evaporar el solvente. El residuo en el recipiente de aluminio se colocó en una estufa (Felisa, Modelo FE-292D, Serie 0511109) por espacio de 1 h a 121 °C. Enseguida se ambientó en un desecador

por 30 min y se registró su peso (PRR). Los cálculos fueron determinados de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Extracto etéreo (\%)} = \frac{PRR - PR}{PM} (100)$$

Dónde:

PRR = Peso del recipiente y el residuo de la grasa (g)

PR = Peso del recipiente de aluminio (g)

PM = Peso de la muestra (g).

4) Proteína cruda

Se determinó por triplicado en BCS, BSS y JN, mediante la metodología 960.52 propuesta por la AOAC (2012) con algunas modificaciones. Se pesaron 0.2 g de muestra liofilizada y 1.625 g de catalizador (mezcla de K_2SO_4 con $CuSO_4 \cdot 5H_2O$), los cuales se colocaron en el fondo de un matraz Kjeldahl, cuidando que no se pegaran a las paredes. A dicho matraz se le adicionaron 5 mL de H_2SO_4 y fue depositado en un equipo digestor (Kjeldahl, marca Labconco, Modelo 2123200, USA). El amoniaco resultante fue recibido en una solución de ácido bórico al 4%, utilizando rojo de metilo como indicador. Posteriormente se llevó a cabo una titulación con HCl 0.1 N hasta obtener el cambio de color. Los valores obtenidos se reportaron como porcentaje de proteína, utilizando 6.25 como factor de corrección. Los cálculos se determinaron por medio de la siguiente ecuación:

$$\text{Proteína(\%)} = \frac{(N \text{ HCl}) - (mL \text{ HCl})(0.014)(FC)}{PM} (100)$$

Dónde:

N HCl = Normalidad del ácido clorhídrico

mL HCl = mL de ácido clorhídrico gastado

PM = Peso de la muestra (g)

FC = Factor de corrección

5) Carbohidratos

Se calcularon por simple diferencia sobre una base de cálculo de 100 de los demás componentes del análisis proximal (humedad, cenizas, extracto etéreo y proteína), esto se llevó a cabo considerando en base húmeda todos los resultados obtenidos para posteriormente poder realizar la diferencia. Los resultados fueron reportados como porcentaje en base seca, excepto para humedad.

b. Ácido ascórbico

1) Curva de calibración

El contenido de ácido ascórbico se determinó mediante análisis espectrofotométrico propuesto por Dürüst y col (1997) con algunas modificaciones. Esta técnica se basa en una reacción de óxido-reducción donde el ácido ascórbico presente en la muestra reacciona con un compuesto conocido como 2,6-diclorofenolindofenol (DCPI); en donde el ácido ascórbico es oxidado a ácido dehidroascórbico y el DCPI es reducido ganando los dos átomos de hidrógeno que pierde cada molécula de ácido ascórbico. Cuando el DCPI se reduce cambia de color azul fuerte a rosa y este cambio de color es monitoreado espectrofotométricamente. Para llevar a cabo este análisis se prepararon las siguientes soluciones: ácido oxálico 0.4% en agua (p/v); solución madre de ácido ascórbico 1000 ppm (0.01 g en 10 mL de

ácido oxálico 0.4%); buffer de acetatos (300 g de acetato de sodio anhídrido, 700 mL agua desionizada, 1000 mL de ácido acético glacial); 12 mg de 2,6-diclorofenol indofenol (DCPI) en 1L de agua desionizada.

Mediante la solución madre de 1000 ppm, se prepararon diluciones de ácido ascórbico de 10, 20, 30, 40 y 50 ppm, diluyendo con ácido oxálico al 0.4%. Se ajustó el espectrofotómetro a cero con agua desionizada a 520 nm. Se mezcló 1 mL de ácido oxálico 0.4%, 1 mL de buffer de acetatos y 8 mL de DCPI. Se agitaron en vortex y se leyó la absorbancia (espectrofotómetro, marca ThermoSpectronic, GENESYS 10 UV, 2H7G22900A, USA) a 520 nm a los 15 s después de adicionar el DCPI. Esa lectura se reconoce como L1, la cual corresponde a la absorbancia del DCPI. Todo el ensayo se llevó cabo en la oscuridad.

Se ajustó nuevamente el espectrofotómetro a cero (520 nm), pero ahora con 1 mL de la solución de 10 ppm de ácido ascórbico, 1 mL de buffer de acetatos y 8 mL de agua desionizada (blanco de la solución de 10 ppm). Posteriormente se mezclaron 1 mL de la solución de 10 ppm de ácido ascórbico, 1 mL de buffer de acetatos y 8 mL de DCPI. Se agitó en vortex rápidamente y se leyó la absorbancia (520 nm) a los 15 s después de haber adicionado el DCPI. Esta lectura se reconoce como L2, la cual corresponde a la absorbancia del DCPI remanente después de la reacción con el ácido ascórbico. Este paso se repitió para todas las soluciones de ácido ascórbico restantes (20, 30, 40 y 50 ppm). Es importante tener en cuenta que se ajustó el blanco con cada solución de ácido ascórbico para la determinación de la lectura L2. Se construyó la curva de calibración graficando la diferencia de L1-L2 (absorbancia de la muestra) en el eje "Y" y la concentración de las soluciones de ácido ascórbico en el eje "X".

2) Extracción de la muestra

Se tomaron 0.5 g de la muestra de bagazo con y sin semilla de noni y para el caso de jugo 0.5 mL de jugo de noni en tubos falcon de 15 mL. Se adicionaron 15 mL de ácido oxálico 0.4% para llevar a cabo la extracción. Una vez adicionado el ácido oxálico a la muestra se mezclaron en un agitador (ultra-turrax T 25 Basic, USA) por espacio de 30 s a 1 min hasta observar una mezcla uniforme. Posteriormente se filtró con papel Whatman No. 4 y el filtrado se utilizó para el análisis.

3) Determinación del ácido ascórbico

Se realizó por cuadruplicado en bagazo con y sin semilla y jugo de noni. Se mezclaron 1 mL del extracto, 1 mL de buffer de acetatos y 8 mL de agua desionizada; se dejaron pasar 15 s y se ajustó nuevamente el espectrofotómetro a cero (520 nm). Posteriormente, se mezclaron 1 mL del extracto de bagazo con semilla, 1 mL de buffer de acetatos y 8 mL de DCPI. De igual manera se dejaron pasar 15 s y se realizó la medición de la absorbancia, obteniendo el valor L2. Se realizó esta operación por triplicado y cada valor obtenido se restó del valor L1 obtenido para la curva de calibración, para de esta manera llevar a cabo los cálculos correspondientes. Los resultados fueron expresados en miligramos de ácido ascórbico por g en base seca (mg AA/g bs) y en miligramos por 100 g en base húmeda (mg AA/100g bh).

c. Fibra dietaria

1) Preparación de material y muestra

Los crisoles se pusieron en una mufla una hora a 525 °C, se ambientaron en un desecador, posteriormente se añadió agua destilada y se pusieron a secar al aire. Después se añadió 0.5 g de celite (con precisión de 0.1 mg) a cada crisol y se agregó

agua destilada con el fin de redistribuir la celite en el fondo del crisol, se esperó a que se escurrieran y se pusieron en una estufa a 130 °C durante una hora para conseguir peso constante, una vez transcurrido el tiempo se ambientaron en un desecador, se pesaron y se registró su peso como W1.

En el caso de la preparación de muestras, si el contenido de materia grasa de éstas es superior al 10%, es necesario desengrasar con éter de petróleo.

2) Fibra dietaria total (FDT)

Este análisis se basó en la metodología propuesta por el kit de ensayo de fibra dietaria de Sigma Aldrich, código de producto DF-100A y TDF-C10, de acuerdo con la metodología oficial de la AOAC 985.29 (2012). Este ensayo determina el contenido total de fibra dietaria de los alimentos mediante una combinación de métodos enzimáticos y gravimétricos. Las muestras secas, y libres de grasa son gelatinizadas con α -amilasa y luego digeridas enzimáticamente con la proteasa y amiloglucosidasa para eliminar la proteína y el almidón presente en la muestra. Se añade etanol para precipitar la fibra dietaria soluble. El residuo se filtra y se lava con etanol y acetona. Después del secado, se pesa el residuo. La mitad de las muestras son analizadas para las proteínas y las otras muestras son incineradas. La fibra dietaria total es el peso de los residuos, menos el peso de la proteína, cenizas y un blanco.

La cuantificación de la FDT se llevó a cabo por cuadruplicado en BCS, BSS y JN. Se pesó 1 g de muestra liofilizada (precisión de 0.1 mg y ponderaciones entre muestras de 20 mg) en vasos de digestión de 600 mL. A cada muestra se le adicionaron 50 mL de buffer de fosfatos (pH 6, 0.08 M), agitando levemente y teniendo cuidado de que la muestra no se pegara en las paredes. Enseguida se añadieron 100 μ L de α -amilasa

estable al calor, para después tapar el vaso con aluminio y colocarlo en un baño de agua (SHELLAB, Modelo WS27, Serie 04020109, USA) durante 15 min a 95 °C.

Los vasos fueron agitados manualmente cada 5 min para una mejor homogenización en la digestión. Terminada la primera digestión enzimática, se ajustó el pH a 7.5 ± 0.2 con 10 mL de NaOH 0.275 N (si el pH no era el valor indicado, se ajustaba con NaOH o HCl, ambos 1 N) y se adicionaron 100 μ L de solución de proteasas (pesando 50 mg/mL de proteasa en buffer de fosfato) para llevar a cabo la segunda digestión. Los vasos se cubrieron con aluminio y se colocaron en el baño de agua con agitación a 60 °C, durante 30 min. Después se llevó a cabo la tercera digestión añadiendo amiloglucosidasa bajo las condiciones antes mencionadas, ajustando el pH previamente a un rango de 4.0-4.6 con 10 mL de HCl 0.325 M (si el pH no era el valor indicado, se ajustaba con NaOH o HCl, ambos 1 N).

Una vez terminadas las tres digestiones se procedió a precipitar la FDS adicionando cuatro volúmenes de etanol al 95%. Dicha precipitación se dejó reposar toda la noche para permitir una completa decantación. El residuo total se filtró sobre los filtros de vidrio de porosidad No. 2 de 50 mL de capacidad (previamente calcinados, adicionados de una capa de celite, pesados y tarados, conociendo este valor como W1), mediante una bomba de vacío y sometidos a tres lavados con 60 mL de etanol al 78% (tres porciones de 20 mL), 20 mL de etanol al 95% (dos porciones de 10 mL) y 20 mL de acetona (dos porciones de 10 mL). El residuo en los filtros se dejó secar en una estufa durante 12 h a 105 °C. Posteriormente los filtros fueron ambientados en un desecador por 30 min y se determinó su peso (W2). Posteriormente fueron sometidas a incineración a 525 °C por 5 h en la mufla. Los filtros con la ceniza fueron ambientados y se registró su peso (W3). Al mismo tiempo con las muestras se corrieron cuatro

blancos para cuantificar la contribución de los reactivos en el residuo final (WB). Los cálculos fueron determinados por las siguientes ecuaciones:

$$\text{Residuo} = W2 - W1; \text{Cenizas} = W3 - W1; B = R_{\text{blanco}} - P_{\text{blanco}} - A_{\text{blanco}}$$

$$FDT(\%) = \frac{R_{\text{muestra}} - P_{\text{muestra}} - A_{\text{muestra}} - B}{PM} (100)$$

Dónde:

W1 = Peso del crisol + celite, en peso constante

W2 = Muestra seca después de filtrar

W3 = Muestra calcinada

FDT = Fibra dietaria total (%)

R = Peso promedio del residuo (g)

P = Peso promedio de la proteína (g)

A = Peso promedio de las cenizas (g)

PM = Peso de la muestra (g)

3) Fibra dietaria insoluble y soluble

La determinación de la fibra dietaria insoluble se llevó a cabo de la misma manera que la determinación de la fibra dietaria total y utilizando las mismas fórmulas, únicamente omitiendo el paso de la precipitación con etanol. La fibra dietaria soluble se calculó por diferencia entre la fibra dietaria total y la fibra dietaria insoluble.

d. Minerales

La determinación de minerales se llevó a cabo por triplicado en BCS, BSS y JN utilizando espectrofotometría de absorción atómica, conforme al método 955.06 reportado en la AOAC (2012). El cual se basa en el principio de que los átomos libres en estado fundamental pueden absorber la luz a cierta longitud de onda, específica para cada elemento.

Primeramente, se realizó la digestión seca tomando un gramo de muestra liofilizada y se calcinó en una mufla (Thermo scientific modelo F30430CM-33) a 550 °C por 8 h. Se continuó con la digestión húmeda de las cenizas adicionando 5 mL de ácido clorhídrico concentrado, esto se filtró utilizando papel filtro Whatman No. 1 en un matraz aforado de 100 mL y se aforó con agua destilada. Este extracto se utilizó para la determinación de los minerales.

Se utilizó un espectrofotómetro de absorción atómica marca Agilent Technologies, modelo 240FS AA, modalidad flama. Se determinaron los minerales calcio, magnesio, potasio, sodio, hierro, manganeso, cobre y zinc realizando la determinación a una longitud de onda de 422.7, 285.2, 769.9, 589.9, 248.3, 279.5, 324.8 y 213.9 nm, respectivamente. Se utilizaron lámparas de cátodo hueco con excepción del sodio y potasio que se determinaron por emisión y no por absorbancia. Las determinaciones se llevaron a cabo utilizando flama aire-acetileno con excepción del calcio y magnesio en las que se utilizó flama de óxido nitroso-acetileno. El tipo de detección empleado fue por absorbancia, excepto para el caso de potasio y sodio que se determinaron por emisión.

La elaboración de la curva de calibración para cada elemento se llevó a cabo de manera automática utilizando un sistema automatizado de introducción y dilución de

muestras [SIPS (Sample Introduction Pump System)] mediante la ayuda de un sistema de bombeo de agua y muestra (SIPS) acoplado al equipo. Para su elaboración se prepararon soluciones concentradas conocidas para cada elemento (calcio 10 ppm, magnesio 10 ppm, potasio 100 ppm, sodio 100 ppm, hierro 10 ppm, manganeso 10 ppm, zinc 5 ppm y cobre 5 ppm). Los resultados se expresaron en miligramos del mineral por 100 g de base seca (mg/100g bs).

4. Análisis fitoquímicos

a. Fenólicos libres (FL), fenólicos ligados (FU) y fenólicos totales (FT)

1) Extracción de la muestra

La extracción de compuestos fenólicos libres se realizó de acuerdo con la metodología propuesta por Gómez-Romero y col (2010) con algunas modificaciones. Se pesaron 0.5 ± 0.05 g de muestra liofilizada, se agregaron 5 mL de metanol, se homogenizó durante 1 minuto, en un homogeneizador de tejidos ultra-turrax T 25 Basic (IKA Works, Wilmington, E.U.A.) y se sonicó durante 20 minutos en un sonicador Bransonic 3510 (Bransonic Ultrasonic Co., Danbury, CT). Posteriormente, se centrifugó a $3200 \times g$ durante 15 minutos a 2°C , se recuperó el sobrenadante en un matraz bola y se repitió el mismo procedimiento. con el pellet adicionando otros 5 mL de metanol y el proceso de extracción se repitió 3 veces. Los tres sobrenadantes recuperados se combinaron en el matraz bola y se evaporaron bajo presión reducida a 40°C en un rotavapor (Heidolph, modelo LABOROTA4011, serie 100500495, Alemania).

El extracto seco resultante se resuspendió en 2 mL de metanol, se sonicó durante 5 min y se filtró a través de un filtro de PVDF de $0.45 \mu\text{m}$ (Thermo Scientific, Valley

Road Rockwood, TN) y se almacenó en viales ámbar a -20 °C hasta el análisis. Este extracto se denominó extracto de fenólicos libres, mientras que el sedimento obtenido después de la centrifugación se usó para obtener el extracto de los fenólicos ligados, de acuerdo con la metodología propuesta por Tao y col (2014) descrita a continuación.

El sedimento se lavó con 10 mL de hexano para eliminar los lípidos. Después de que se eliminó el hexano, el residuo se hidrolizó con 10 mL de NaOH 2 M durante 30 min a 60 °C usando un baño de hidrotérmico. La muestra se mantuvo hasta alcanzar la temperatura ambiente. Se añadió HCl para neutralizar la solución y se extrajo cuatro veces con 20 mL de acetato de etilo. Las fracciones de acetato de etilo se combinaron y evaporaron hasta sequedad y finalmente se resuspendieron en 2 mL de metanol.

2) Determinación del contenido de compuestos fenólicos totales

El contenido fenólico, se cuantificó tanto en los extractos fenólicos libres como ligados según el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu descrito por Corral-Aguayo y col (2008). Se mezclaron 500 µL de agua desionizada, 125 µL del extracto y 125 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu durante 6 min a temperatura ambiente. Luego, se agregaron 1.25 mL de Na₂CO₃ al 7% y 1 mL de agua desionizada. La mezcla se mantuvo durante 1.5 h en la oscuridad y la absorbancia se midió a 750 nm utilizando un espectrofotómetro (GENESYS 10 UV, Madison, MI). Se utilizó una curva de calibración de ácido gálico en metanol como estándar (0 a 0.3 mg / mL). Los resultados se expresaron en miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de materia seca (mg EAG/g bs). Los fenólicos totales (FT) se calcularon como la suma de los contenidos fenólicos libres y ligados.

b. Flavonoides totales

1) Extracción de la muestra

La extracción se llevó a cabo por triplicado siguiendo la metodología propuesta por Ghasemi y col (2009) con algunas modificaciones en BCS, BSS y JN. Se pesaron 1 ± 0.05 g de muestra liofilizada, y fueron homogenizados en 20 mL de acetona al 80% en un homogeneizador de tejidos ultra-turrax T 25 Basic (IKA Works, Wilmington, USA). Después, el homogeneizado fue sometido a ultrasonido por espacio de 20 min en un sonicador Branson (modelo 3510R-DTH, serie CPN-925-318R, México) y posteriormente fue centrifugado a 4000 rpm a 2 °C por 15 min (Eppendorf AG 22331 Hamburg, Modelo 5810 R, Serie 5811F-0030768, Alemania). El sobrenadante, producto de la centrifugación fue recolectado y el sedimento fue sometido nuevamente al proceso de extracción bajo las mismas condiciones descritas con anterioridad. Los sobrenadantes fueron reunidos y evaporados a 40 °C y presión reducida en un rotavapor (Heidolph, modelo LABOROTA4011, serie 100500495, Alemania), el concentrado resultante fue diluido con 25 mL de metanol y finalmente aforado a 50 mL con agua HPLC. Dicha dilución se filtró con acrodiscos de nylon HPLC de 0.45 μm .

2) Determinación de compuestos flavonoides totales

Se utilizó el método del cloruro de aluminio reportado por Ghasemi y col (2009) con ligeras modificaciones. Se colocaron 20 μL del extracto en cada una de las placas de 96 orificios y luego 100 μL de agua destilada, 60 μL de metanol, 10 μL de solución de cloruro de aluminio al 4% ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) y 10 μL de acetato de potasio 0.4 M fueron añadidos. La placa se mantuvo a temperatura ambiente durante 30 min en la oscuridad y se leyó la absorbancia a 415 nm utilizando un lector de microplacas Spectra Max 250

(Molecular Devices, USA). La concentración de flavonoides se calculó utilizando una curva estándar de quercetina (0 a 0.3 mg/mL) y se expresó en miligramos equivalentes de quercetina por gramo de muestra en base seca (mg EQ/ g bs).

c. Taninos condensados

1) Extracción de la muestra

Se utilizó la metodología propuesta por Price y col (1978), además que se seguirán los procedimientos y sugerencias de Ortíz-Robles (1998). La extracción se llevó a cabo por triplicado en BCS, BSS y JN. Se pesaron 0.5 ± 0.05 g de muestra liofilizada y se mezclaron con 10 mL de metanol acidificado (4% de HCl concentrado en metanol). La mezcla se agitó continuamente en un balancín de tubo de ensayo (Vari-mix aliquot mixer, Modelo M48725, Serie 1108050353638, USA) a temperatura ambiente durante 20 min. Posteriormente, los extractos se centrifugaron a $3220 \times g$ durante 45 minutos a 25 °C, siendo de interés para el análisis la fase superior.

2) Determinación del contenido de taninos condensados

A la fase superior obtenida del extracto se le adicionaron 5 mL de reactivo vainillina (50:50 v/v vainillina al 1% en metanol y HCl al 8% en metanol) a razón de 1mL/min. La mezcla de reacción se colocó en un baño hidrotérmico a 30 °C durante 20 min, en la oscuridad y luego se leyó la absorbancia a 500 nm (GENESYS 10 UV, Madison, MI. Simultáneamente con la muestra se corrió un blanco (metanol), para medir algún tipo de injerencia de los reactivos. Se elaboró una curva estándar de catequina reportando los resultados como miligramos equivalentes de catequina por gramo de muestra en base seca (mg EC/g bs)

d. Carotenoides totales

1) Extracción de la muestra

La extracción de carotenoides se llevó a cabo mediante la metodología de Ornelas-Paz y col (2013), con algunas modificaciones. Los extractos se realizaron por triplicado. Se pesaron 0.5 g de muestra liofilizada y se le adicionaron 0.2 g de carbonato de calcio (Ca_2CO_3) para neutralizar los ácidos presentes y 20 mL de metanol. Esta mezcla se homogenizó durante 1 min usando un homogeneizador básico Ultra-Turrax modelo T25 (IKA Works, Wilmington, NC) y el homogenizado se filtró por vacío en papel filtro Whatman No. 3. Se realizaron 2 lavados adicionales con metanol (20 mL c/u) y luego 2 lavados (20 mL c/u) con una mezcla de hexano:acetona (1:1 v/v) conteniendo 0.1% de butilhidroxitolueno (BHT) como antioxidante, hasta que el residuo sólido quedó decolorado. El filtrado se vació a un embudo de separación de 500 mL, se agregaron 40 mL de Na_2SO_4 al 10% y se agitó vigorosamente durante 1 min; seguido de esto se hicieron 3 lavados con agua destilada (50 mL c/u) y se agitó durante 30 seg en cada lavado. Se dejó reposar durante 15 min hasta la separación de fases para después decantar y separar la fase orgánica, la cual se colocó en matraces bola cuidando que no quedaran gotas de la fase acuosa (en cuyo caso se retiraron cuidadosamente con pipeta Pasteur de vidrio). El solvente orgánico del extracto se evaporó en rotavapor por 15 min a 40 °C. Una vez obtenido el extracto concentrado, el residuo se resuspendió en 3 mL de acetona y se filtró con membrana de nylon de 0.45 μm (Whatman International Ltd, Maidstone, England) y se pusieron en viales para las mediciones.

2) Curva de calibración de β -caroteno

Se pesaron 0.001 g de estándar de β -caroteno y se aforaron a 10 mL con acetona generando una solución stock de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (se realizó por triplicado). De ella se tomaron 100, 200, 300, 400 y 500 μL y se completaron a 2 mL con acetona para cada

dilución. La curva de calibración fue generada con concentraciones de 5, 10, 15, 20 y 25 µg/mL, utilizando acetona como blanco.

3) Determinación de carotenoides totales

La cuantificación TC se realizó en un espectrofotómetro Beckman DU-65 a 450 nm. Se elaboró una curva de calibración utilizando como estándar β-caroteno en acetona. Los resultados se expresaron como microgramos equivalentes de β-caroteno por gramo de muestra en base seca (µg βCE /g bs). Además, se inyectaron directamente alícuotas de extractos filtrados de carotenoides (20 µL) en el sistema de HPLC.

5. Carotenoides individuales identificados y cuantificados por HPLC

1) Extracción de la muestra

El análisis de carotenoides individuales se realizó con los mismos extractos obtenidos para carotenoides totales. Las mediciones se realizaron el mismo día de obtención de los extractos.

2) Identificación y cuantificación de carotenoides por HPLC

Los carotenoides individuales se identificaron utilizando el método de HPLC descrito anteriormente por Cervantes-Paz y col 2012. Los extractos fueron inyectados en volúmenes de 20 µL en un sistema HPLC (HP 1100, Agilent Technologies Co, Palo Alto, USA) equipado con un detector de arreglo de diodos (DAD).

Se utilizó una columna YMC C30 de 3 µm, 4.6 x 150 mm en fase reversa a 15 °C. La fase móvil consistió en agua (A), metanol (B) y metil *ter*-butil-éter (C) con una velocidad de flujo de 0.75 mL/min y el siguiente gradiente: 4% A / 94.5% B / 1.5% C al minuto 0; 4% A / 68% B / 28% C al minuto 31; y 4% A / 53% B / 43% C al minuto 52.

Los espectros de absorción fueron registrados a 441, 447 y 452 nm. La identificación de los carotenoides se llevó a cabo comparando los tiempos de retención y los espectros de absorción de estándares de β -caroteno y luteína. La cuantificación de β -caroteno y luteína se llevó a cabo con curvas de calibración construidas con cinco niveles de concentración de estándares de alta pureza.

6. Identificación y cuantificación de fenólicos e iridoides por UPLC-DAD-ESI-MS

1) Preparación del extracto

El análisis de fenólicos e iridoides individuales se realizó con los mismos extractos obtenidos para fenólicos libres.

2) Identificación y cuantificación de fenólicos e iridoides por UPLC

Se inyectaron alícuotas (5 μ L) de los extractos fenólicos libres previamente filtrados a través de un cartucho Chromafix SPE (Macherey-Nagel, Düren Alemania) en un sistema Accela UPLC-DAD (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA) acoplado a un espectrómetro de masas LTQ XL (Thermo Scientific, Waltham, MA).

Los compuestos fenólicos e iridoides se separaron utilizando una columna C18 (3 μ m, 50 X 2.1 mm) (Fortis Technologies Ltd., Neston, Cheshire, Reino Unido). La fase móvil consistió en agua acidificada con ácido fórmico al 1% (solvente A) y acetonitrilo (solvente B), siguiendo un gradiente lineal de 99.5% A y 0.5% B a 40% A y 60% B en 40 min usando una velocidad de flujo de 0.2 ml/min (Quintero-Soto y col 2018).

La detección se registró a 280, 320 y 350 nm. El sistema de espectrómetro de masas estaba equipado con una interfaz de electrospray que operaba en modo de ionización negativa y positiva, con un voltaje capilar y una temperatura de 35 V y 300 °C, respectivamente. Se utilizó un software Xcalibur 2.2 (Thermo Fisher Scientific Inc.,

Waltham, MA) en full scan mode en el rango de m/z 110-2000. Los compuestos fenólicos e iridoides se identificaron comparando sus tiempos de retención y espectros de masas con los obtenidos a partir de soluciones estándar, cuando estaban disponibles. De lo contrario, los picos se identificaron tentativamente al comparar la información obtenida con los datos disponibles reportados en la literatura. La cuantificación se llevó a cabo utilizando curvas de calibración de estándares comerciales (Sigma Aldrich., St. Louis, MO) y los resultados se expresaron como microgramos por gramo de muestra en una base de peso seco ($\mu\text{g} / \text{g}$ bs). Para los compuestos fenólicos para los cuales no estaba disponible un estándar comercial, la cuantificación se realizó a través de la curva de calibración de otro compuesto del mismo grupo fenólico.

7. Determinación de la capacidad antioxidante (CAO).

a. Preparación de los extractos hidrofílicos (EHF) y lipofílicos (ELF)

La obtención de los EHF y EHL se llevó a cabo mediante la metodología propuesta por Wu y col (2004) con algunas modificaciones.

1) Obtención del ELF

Se pesó por triplicado 0.5 g de muestra liofilizada (BCS, BSS y JN), el cual se homogenizó por espacio de 1 min con 25 mL de una mezcla de hexano:diclorometano (1:1 v/v). Después, las muestras fueron sometidas a ultrasonido por 20 min y a centrifugación a una velocidad de 4000 rpm por 15 min a 4 °C.

Los sobrenadantes fueron recuperados y los sedimentos fueron sometidos al mismo proceso de extracción descrito con anterioridad. Terminada la segunda extracción, los sobrenadantes fueron reunidos y concentrados por medio de un

rotavapor a 40 °C y presión reducida. El extracto seco y concentrado fue resuspendido en 10 mL de acetona, y después se filtró con membrana de 0.45 µm, éste se designó como extracto lipofílico (ELF).

2) Obtención del EHF

Los sedimentos residuales producto de las centrifugaciones de los ELF se sometieron a una nueva extracción con 20 mL de una mezcla de acetona:agua:ácido acético (70:29.5:0.5 v/v/v) mediante homogenización, sonicación y centrifugación bajo las mismas condiciones mencionadas en el apartado anterior, se juntaron los sobrenadantes sin concentrar en rotavapor, y se obtuvo el extracto hidrofílico (EHF) (Wu y col 2004).

b. Método DPPH

Se siguió la metodología de Kim y col. (2002), con modificaciones para microplaca de 96 pozos por Corral-Aguayo y col (2008). Se preparó una solución 100 µM de DPPH en metanol, la cual se utilizó inmediatamente para el ensayo.

1) Curva de calibración

Para la curva de calibración se pesaron por triplicado 0.01 g de trolox y se aforó a 10 mL con metanol, obteniendo una solución madre con una concentración de 1000 ppm, con la cual se formaron distintas diluciones de 20, 40, 60, 80, 100 y 120 ppm.

2) Medición de la capacidad antioxidante

Se mezclaron 20 µL de cada extracto (EHF o ELF) o de cada dilución de Trolox, con 280 µL del radical DPPH en microplacas con formato de 96 pozos. De igual manera se determinó la absorbancia de un control (A_0) de 20 µL de metanol y 280 µL de radical DPPH. La mezcla en las placas se dejó reposar por 30 min en la oscuridad. Después

de este tiempo fueron leídas en un lector de microplacas Molecular Devices (Spectra MAX 250, USA) a una longitud de onda de 515 nm (A). El porcentaje de inhibición por el efecto del radical se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\%Inhibición\ del\ radical\ DPPH = \frac{A_0 - A}{A_0} (100)$$

Donde:

A_0 = Absorbancia del control (metanol)

A = Absorbancia de la muestra

Calculado el porcentaje de inhibición, se realizó una gráfica en función de la concentración de las soluciones de trolox. El valor de la capacidad de inhibición del radical DPPH se expresó como micromoles equivalentes de Trolox por gramo de base seca ($\mu\text{moles ET/g bs}$).

c. Método ABTS

Para la realización del ensayo se utilizó la metodología propuesta por Re y col (1999) con algunas modificaciones. Para la preparación del radical catión $\text{ABTS}^{\bullet+}$ se mezclaron 5 mL de ABTS 7 mM (preparado con agua destilada) y 88 μL de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 140 mM (persulfato de potasio, preparado con agua destilada). Dicha mezcla se dejó reposar por espacio de 16 horas aproximadamente a temperatura ambiente en completa oscuridad para la generación óptima del radical.

Ya formado el radical fue ajustado con etanol a una absorbancia de 0.70 ± 0.02 a una longitud de onda de 734 nm, el cual fue utilizado para llevar a cabo el ensayo.

1) Curva de calibración

Se pesaron por triplicado 0.01 g de trolox aforándose a 10 mL con metanol, obteniendo una solución madre de 1000 ppm. con la cual se formaron distintas diluciones de 20, 40, 60, 80, 100 y 120 ppm.

2) Medición de la capacidad antioxidante

Se tomaron 60 μ L de cada extracto (EHF o ELF) o dilución de trolox y se le adicionaron 1940 μ L del radical ABTS^{•+} con la absorbancia ajustada (0.7 ± 0.02). De igual manera se determinó la absorbancia de un control (A_0) que contenía 60 μ L de metanol y 1940 μ L de radical ABTS^{•+}. Posteriormente, cada tubo se mezcló en vortex 10 s y se sometió a una agitación orbital por espacio de 15 min. Pasado el tiempo se procedió a la lectura de la absorbancia (A) a 734 nm. El porcentaje de inhibición por el efecto del radical se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\%Inhibición = \frac{A_0 - A}{A_0} (100)$$

Dónde:

A_0 =Absorbancia del control

A=Absorbancia del efecto del antioxidante sobre el radical ABTS

Calculado el porcentaje de inhibición, se realizó una gráfica en función de la concentración de las soluciones de trolox. El valor de la capacidad de inhibición del radical ABTS se expresó como micromoles equivalentes de Trolox por gramo de base seca (μ moles ET/g bs).

d. Método FRAP

En este método se determina la capacidad antioxidante de forma indirecta. Se basa en el poder que tiene una sustancia antioxidante para reducir el Fe^{3+} a Fe^{2+} que

es menos antioxidante. El complejo férrico-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) incoloro es reducido al complejo ferroso coloreado.

Para la determinación de la CAO por el método de FRAP se siguió la metodología descrita por Benzie y Strain (1996), con modificaciones llevadas a cabo por Szöllösi y Varga (2002). Para lo cual se prepararon los siguientes reactivos: 1) buffer de acetatos 300 mM, pH 3.6; 2) 2,4,6-tripiridil-2-triazina (TPTZ) 10 mM en HCl 40 mM; 3) $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 20 mM, en agua HPLC. El reactivo FRAP se preparó mezclando 50 mL de buffer de acetatos con 5 mL de solución TPTZ y 5 mL de solución de FeCl_3 . El reactivo fue preparado para su uso diariamente

1) Curva de calibración

Se pesaron por triplicado 0.01 g de trolox aforándose a 10 mL con metanol, obteniendo una solución madre de 1000 ppm. con la cual se formaron distintas diluciones de 20, 40, 60, 80, 100 y 120 ppm.

2) Medición de la capacidad antioxidante

Se mezclaron 20 μL de cada extracto (EHF o ELF) o de cada dilución de Trolox, con 280 μL del reactivo FRAP en microplacas con formato de 96 pozos. Se incubaron por 30 min en la oscuridad a temperatura ambiente. Al finalizar el tiempo de incubación, las placas fueron leídas en un lector de microplacas Molecular Devices (Spectra MAX 250, USA) a una longitud de onda de 593 nm. La CAO se expresó como micromoles equivalentes de Trolox por gramo de base seca ($\mu\text{moles ET/g bs}$).

e. Método ORAC

El proceso se dividió en 4 etapas, extracción, preparación de reactivos, ensayo y valoración, y se llevó a cabo por triplicado en BCS, BSS y JN, con la metodología de Huang y col (2002).

1) Extracción de la muestra

Se pesó 1 g de cada muestra en tubos falcon de 50 mL y se homogenizó con 10 mL de etanol al 80% en un homogeneizador ultraturrax durante 1 min aproximadamente. Posteriormente las muestras se incubaron en un rotator horizontal (modelo HAG 14020393, marca DAIGGER, Korea) a 200 rpm durante 2 h a temperatura ambiente. Después las muestras se centrifugaron a 10 000 x g por 15 min a 4 °C (Thermo SCIENTIFIC, modelo 41797633, Alemania). Finalmente se recolecta el sobrenadante para utilizarlo en el ensayo.

2) Preparación de reactivos

Buffer de fosfatos 75 mM (pH 7.4), se pesó 10.4065 g de fosfato dipotásico (K_2HPO_4) y 2.130 g de fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) en 1 L de agua destilada, se ajustó el pH con gotas de H_3PO_4 (ácido fosfórico) y se transfirió a un matraz volumétrico de 2 L para aforar con agua destilada. Esta solución se puede almacenar en refrigeración hasta su uso.

Solución de fluoresceína, se pesó 0.1125 g de fluoresceína (FSL) y se aforó a 50 mL con buffer de fosfato para generar la solución madre (esta puede mantenerse en refrigeración protegida de la luz durante 3-6 meses). Se tomaron 100 μ L de la solución de FSL y se aforaron a 10 mL con buffer de fosfato, la cual se denominó como fluoresceína 2 (FSL2) (esta también puede mantenerse en refrigeración protegida de la luz durante 3-6 meses).

Solución de fluoresceína para el equipo, de la solución FLS2 se tomaron 400 μ L y se aforaron a 25 mL con el buffer de fosfatos (lo cual genera una concentración de 0.96 μ M).

Estándares de trolox, se pesó 0.01032 g de trolox y se disolvió en 100 mL de buffer de fosfato para una concentración final de 400 μM . A partir de este estándar se prepararon diluciones de 6.25, 25, 50, 75, 100 y 125 μM diluidas en buffer de fosfatos.

Preparación de AAPH (2,2'-Azobis (2-amidinopropano) dihidrocloruro), se pesó 0.26 g de AAPH y se aforó a 10 mL (95.8 μM) con buffer de fosfatos, su preparación se realiza para cada uso.

3) Ensayo

Primeramente, se encendió y se programó el equipo lector de microplacas modelo Synergy HT (Bio Tek, Inc, EEUU) a una temperatura de 37 °C y el buffer de fosfatos se puso a calentar a baño maría para que alcanzara la misma temperatura del equipo. Posteriormente, en una microplaca se colocaron 200 μL de agua destilada de los pozos A al H, A1 al A6 y H1 al H6.

Luego de los pozos B6 al G6 se adicionaron 200 μL del buffer de fosfatos y de los B5 a G5 se colocaron las soluciones de las diluciones de trolox en orden descendente, respectivamente. Y en los pozos restantes (B2, B3, B4, C2, C3, C4, D2, D3 y D4) se colocaron 10 μL de los extractos de las muestras de BCS, BSS y JN y se adicionaron 990 μL del buffer de fosfatos.

Una vez llena, la microplaca se colocó en el lector de microplacas, el cual dispensa en cada pozo de la placa 200 μL de FSL2 0.96 μM y 75 μL de AAPH 95.8 μM , iniciando la reacción una vez adicionado este último reactivo, midiendo la fluorescencia por 70 min con intervalos de 70 s a una longitud de onda para excitación de 485 nm y para emisión de 580 nm.

4) Valoración de resultados

La valoración (cálculos estadísticos) se realizaron usando la ecuación de regresión lineal de la curva estándar de trolox y el área bajo la curva de la pérdida de fluoresceína, esto es realizado por el equipo lector de microplacas. Los resultados se expresaron como micromoles equivalentes de trolox por gramo en base seca ($\mu\text{moles ET/g bs}$).

f. Capacidad de inhibición de hemólisis eritrocitaria inducida por dihidrocloruro de 2,2-azobis (2-metil-amidinopropano) (AAPH)

La determinación de la actividad anti-hemolítica de los extractos se realizó según la metodología de Aman y col (2013) con algunas modificaciones. Los extractos fueron los mismos que se utilizaron para flavonoides totales solo que una vez eliminada la acetona no se resuspendió en metanol ni se aforó con agua HPLC, quedando un extracto acuoso, por lo que para evitar daño a los eritrocitos debido al contenido de agua, se tuvo que compensar utilizando PBS 2X.

1) Obtención de los eritrocitos

El ensayo de la inhibición de hemólisis eritrocitaria se llevó a cabo usando muestras de sangre de voluntarios sanos. Las muestras de sangre se recolectaron mediante punción venosa en tubos con EDTA. Se centrifugaron a $2500 \times g$ durante 15 min y se descartó el plasma cuidadosamente con pipeta pasteur de vidrio eliminando además la porción leucocitaria. Una vez que se obtuvo la porción eritrocitaria se llevaron a cabo de 3 a 4 lavados de los eritrocitos con 5 volúmenes de buffer de fosfatos salino, PBS 1X, (Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , KCl, NaCl, ajustado a pH de 7.4), descartando cada vez el sobrenadante y la capa leucocitaria sobrante. Finalmente, se preparó una suspensión de eritrocitos al 5% con PBS para el ensayo.

2) Medición de la capacidad de inhibición de la hemólisis

En tubos Eppendorf de 1.5 mL, se agregaron 0.25 mL de suspensión de eritrocitos al 5%, 0.125 mL de extracto a diferentes concentraciones, 0.125 mL de PBS 2X y 0.25 mL de AAPH [dihidrocloruro de 2,2-azobis (2-metil-amidinopropano)] 200 mM. La mezcla se incubó durante 3 horas a 37 °C con agitación constante. Después de la incubación, la mezcla se transfirió a tubos tipo Falcon de 15 mL y se diluyó con 8 volúmenes de PBS. Se centrifugó a 2500 x g durante 5 min y se midió la absorbancia del sobrenadante en un espectrofotómetro a 540 nm.

Se realizaron los siguientes controles:

- Control de estabilidad de eritrocitos: 0.25 mL de suspensión de eritrocitos con 0.5 mL de PBS 1X.
- Control de estabilidad de los eritrocitos frente a la muestra (negativo): 0.25 mL de suspensión de eritrocitos, 0.125 mL de muestra, 0.125 de PBS 2X y 0.25 mL de PBS 1X.
- Control de hemólisis con AAPH: 0.25 mL de suspensión de eritrocitos, 0.25 mL de AAPH y 0.25 mL de PBS 1X.
- Control de hemólisis total (positivo): 0.25 mL de suspensión de eritrocitos y 0.5 mL de agua destilada.
- Antioxidantes de referencia: 0.25 mL de suspensión de eritrocitos, 0.25 mL de antioxidante de referencia (ácido ascórbico o Trolox) y 0.25 mL de AAPH.

El porcentaje de inhibición se calculó con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición de hemólisis} = \frac{A_0 - A}{A_0} (100)$$

A_0 = Absorbancia del control de hemólisis con AAPH

A = Absorbancia de la muestra

El resultado se reportó como % de inhibición de hemólisis.

C. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se empleó estadística inferencial con un diseño completamente al azar a través del análisis de varianza (ANOVA), con un diseño unifactorial (derivado del fruto de noni) con tres niveles (bagazo con semilla, bagazo sin semilla y jugo de noni). Los resultados se expresaron como promedios de 3 repeticiones \pm desviación estándar. La comparación de medias se determinó mediante la prueba de Fisher (LSD), con un nivel de significancia de 0.05, utilizando el paquete estadístico STATGRAPHIC plus versión 5.1.

VII RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS

1. Acidez titulable (AT), pH y sólidos solubles totales (SST)

Los resultados para acidez titulable, pH y sólidos solubles totales se pueden apreciar en el **Cuadro 4**. Ambos tipos de bagazos mostraron niveles de pH más altos y valores de AT más bajos que en el jugo de noni. BSS presentó el nivel más alto de SST seguido de BCS. En cuanto al pH y la AT, no hubo diferencias entre ambos tipos de bagazo y debido a que ambos poseen niveles de pH inferiores a 4.6 pueden considerarse alimentos ácidos. Por otro lado, ambos tipos de bagazo, después del proceso de extracción del jugo, permanecieron con niveles de SST relativamente altos (8.07-9.18 °Brix), en comparación con la fruta entera (12 °Brix) de acuerdo a lo reportado por Cárdenas-Coronel (2016).

B. ANÁLISIS NUTRIMENTAL

1. Análisis proximal

Los resultados de la composición proximal se muestran en el **Cuadro 5**. Se presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre todas las muestras (BCS, BSS y JN) para todos los parámetros de la composición proximal, excepto en los carbohidratos. BCS mostró el menor contenido de humedad (82.27%) seguido de BSS (88.09%) y del jugo (94.08%). Este nivel relativamente alto de humedad en el bagazo refleja una importante capacidad de retención de agua. Se ha reportado un alto contenido de humedad (92.3%) en el bagazo de fresa (Tumbas-Šaponjac y col 2015).

Cuadro 4. Análisis fisicoquímico del bagazo con semilla (BCS), bagazo sin semilla (BSS) y jugo (JN) de noni (*Morinda citrifolia* L.).

	pH	AT	SST
Derivado del fruto de noni		(%)	(°Brix)
BCS	3.88 ± 0.10 ^a	0.68 ± 0.02 ^b	8.07 ± 0.21 ^b
BSS	3.84 ± 0.04 ^a	0.69 ± 0.01 ^b	9.18 ± 0.32 ^a
JN	3.7 ± 0.08 ^b	0.80 ± 0.02 ^a	7.44 ± 0.32 ^c

Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa ($\alpha=0.05$). LSD= 0.12, 0.47 °Brix y 0.03% para pH, sólidos solubles totales y acidez titulable, respectivamente. Media de 3 repeticiones ± DE.

Cuadro 5. Análisis proximal de bagazo con semilla (BCS), bagazo sin semilla (BSS) y jugo (JN) de noni (*Morinda citrifolia* L).

	Humedad	Proteína cruda	Extracto etéreo	Cenizas	Carbohidratos*
Derivado del fruto de noni		(%bs)	(%bs)	(%bs)	(%bs)
BCS	82.27±0.81 ^c	5.90±0.25 ^a	3.75±0.01 ^a	4.70±0.41 ^c	85.64±0.47 ^a
BSS	88.09±0.12 ^b	5.35±0.42 ^b	0.67±0.03 ^b	7.77±0.30 ^b	86.20±0.54 ^a
JN	94.08±0.05 ^a	3.29±0.28 ^c	0.02±0.00 ^c	10.62±1.08 ^a	86.06±1.11 ^a

Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa ($\alpha = 0.05$). LSD = 0.73%, 0.50%, 0.02%, 1.10% y 1.22% para humedad, proteína, extracto etéreo, cenizas y carbohidratos respectivamente. bs=base seca. *Por diferencia. Media de 3 repeticiones \pm DE.

Entre todas las muestras estudiadas, BCS mostró el mayor contenido de proteínas y lípidos con 5.90 ($p < 0.05$) y 3.75% ($p < 0.05$), en peso seco respectivamente, mientras que BSS exhibió niveles de proteína y lípidos de 5.35 y 0.67%, respectivamente. JN mostró los menores contenidos de proteínas y lípidos. Al comparar ambos tipos de bagazo, se observa que las semillas de noni contribuyen a aumentar el contenido de proteínas y lípidos en el BCS.

En el caso de los lípidos, el alto contenido de grasa del BCS puede atribuirse al alto contenido de lípidos de la semilla de noni, que se ha reportado como 12.5% (West y col 2008). En cuanto al contenido de cenizas, se pudo observar que las cenizas se lixiviaron fácilmente durante la extracción del jugo, el jugo mostró el valor más alto (10.62% bs), seguido por NSB (7.77% bs) y BCS (4.70% bs). BSS y BCS exhibieron el 73 y 44% del contenido de cenizas en relación con JN, respectivamente. Por lo tanto, en ambos tipos de bagazo quedan cantidades importantes de cenizas. BSS mostró un contenido de cenizas similar al reportado previamente para bagazo de noni (8.8%) (Aregheore, 2005).

2. Ácido ascórbico

En el **Cuadro 6** se muestran los resultados para ácido ascórbico. JN mostró un contenido de ácido ascórbico de 16.06 mg AA / g bs, seguido de BSS y BCS, con 5.12 y 2.53 mg AA / g bs, respectivamente. La mayor parte del ácido ascórbico se lixivió en el jugo de noni, sin embargo, aún quedó contenido importante de ácido ascórbico en ambos tipos de bagazo. Una porción de 10 g de muestra de bagazo en polvo contribuye con el 28 y el 57% de la ingesta diaria recomendada de vitamina C para hombres adultos (FAO/WHO 2001) para BCS y BSS, respectivamente.

Cuadro 6. Contenido de ácido ascórbico presente en bagazo con semilla (BCS), bagazo sin semilla (BSS) y jugo (JN) de noni (*Morinda citrifolia* L.).

Ácido ascórbico		
Derivado del		
fruto de noni	mg/g bs	mg/100g bh
BCS	2.53 ± 0.42 ^c	44.18 ± 7.50
BSS	5.12 ± 0.61 ^b	61.03 ± 7.29
JN	16.06 ± 0.81 ^a	95.11 ± 4.85

Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa ($\alpha=0.05$). LSD= 1.02 mg/g bs para ácido ascórbico en base seca. bs= base seca, bh= base húmeda. Media de 3 repeticiones ± DE.

El contenido de ácido ascórbico en ambos tipos de bagazo, en una base de peso fresco (44 y 61 mg AA /100 g bh para BCS y BSS, respectivamente), son más altos que los niveles de vitamina C reportados en el fruto fresco de noni por Chan-Blanco y col (2007), Barbosa-Costa y col (2013) y Palioto y col (2015).

3. Fibra dietaria

En el **Cuadro 7** se presentan los contenidos de fibra dietaria total (FDT), fibra dietaria insoluble (FDI) y fibra dietaria soluble (FDS). La fibra dietaria es la parte comestible de las plantas compuesta por lignina y polisacáridos no digestibles y oligosacáridos no digestibles, que son resistentes a ser digeridos y absorbidos por el intestino delgado humano y con una fermentación parcial o completa en el intestino grueso (AACC, 2001).

La FDT mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) entre todas las muestras (BCS, BSS y Jugo). El BCS presentó el mayor contenido de FDT (60.31% bs), seguido por BSS (48.16% bs). BCS y BSS mostraron un contenido de FDT aproximadamente 4 y 3 veces mayor que JN, respectivamente. La FDI también presentó diferencias significativas entre todas las muestras. BCS presentó el contenido más alto (48.22% bs), seguido por BSS (29.01% bs). BCS y BSS presentaron un nivel de FDI aproximadamente 63 y 38 veces superior a los de JN, respectivamente.

En el caso de la FDS, solo BCS y JN no fueron significativamente diferentes. BSS exhibió el mayor contenido de FDS, mostrando una cantidad aproximadamente 1.5 veces mayor que BCS ó JN. Se cree que el alto contenido de FDT y FDI en BCS se debe a la presencia de las semillas. Se ha reportado que las semillas de noni contienen 79% bs de FDT (West y col 2008).

Cuadro 7. Porcentaje de fibra dietaria total (FDT), insoluble (FDI) y soluble (FDS) en base seca y razón FDI/FDS presentes en bagazo con semilla (BCS), bagazo sin semilla (BSS) y jugo (JN) de noni (*Morinda citrifolia* L.).

Derivado del	FDT	FDI	FDS	FDI/FDS
fruto de noni				
BCS	60.31±2.67 ^a	48.22±1.43 ^a	12.08±0.76 ^b	4:1
BSS	48.16±1.32 ^b	29.01±0.68 ^b	19.14±0.99 ^a	1.5:1
JN	14.18±1.48 ^c	0.76±0.14 ^c	13.41±1.75 ^b	0.05:1

Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa ($\alpha=0.05$).

LSD= 3.08, 1.47 y 2.91 para FDT, FDI y FDS, en base seca, respectivamente.

Media de 3 repeticiones ± DE.

Además, se ha reportado que las semillas de noni contienen 38 veces más fibra insoluble que soluble (Nascimento y col 2018). Del contenido de FDT en JN, el 94.6% correspondió a FDS. Esta alta proporción de SDF en el jugo se debe a la alta lixiviación de los polímeros solubles en agua durante la extracción del jugo. En bagazo, como se esperaba, la FDI es más alta que el contenido de la FDS, presentando una relación FDI/FDS de 4:1 y 1.5:1 para BCS y BSS, respectivamente (**Cuadro 7**).

Resultados similares a BSS fueron reportados previamente por Amaya-Cruz y col (2015) con proporciones de FDI/FDS de 1.81:1 y 1.35:1 en subproductos de jugo de melocotón y mango, respectivamente. Además, concluyeron que una proporción de 17.46:1 en guayaba se debió a su alto contenido de IDF en semilla.

La ingesta diaria recomendada (DRI por sus siglas en inglés) de fibra dietaria es de 25 y 38 g por día, para mujeres y hombres adultos, respectivamente (Institute of Medicine 2005). Porciones de 41 g para mujeres y 63 g para hombres de BCS y 52 g para mujeres y 79 g para hombres de BSS proporcionan esta DRI. Por lo tanto, ambos tipos de bagazo pueden usarse como fuente de fibra dietética para el desarrollo de alimentos funcionales.

La fibra dietaria es generalmente reconocida por sus propiedades para promover un aumento en el volumen de las heces y una reducción en el tiempo de tránsito intestinal, los niveles totales de colesterol en la sangre, la glucemia posprandial y los niveles de insulina (Codex Alimentarius 2006).

4. Minerales

La composición mineral de las muestras de noni se presentan en el **Cuadro 8**. En todas las muestras, el potasio fue el elemento predominante de los ocho minerales analizados. El potasio ha sido el principal mineral observado en diferentes productos

de noni, tales como jugo (Chunhieng y col 2005) y puré de noni (West y col 2011). El jugo de noni (JN) mostró el mayor contenido de potasio (3148.57 mg/100 g bs). Entre ambos tipos de bagazo, BSS exhibió el mayor contenido de potasio (1886.82 mg / 100 g bs). Este nivel representa más del 50% del contenido de potasio en comparación con el jugo y el 4% de la ingesta diaria recomendada para adultos considerando una porción de 10 g de materia seca (Institute of Medicine, 1997).

El segundo mineral más abundante fue el calcio. Ambos tipos de bagazo exhibieron mayor contenido de calcio que el jugo de noni, mostrando 478.78 y 316.09 mg/100 g bs de calcio para BSS y BCS, respectivamente, mientras que el jugo de noni presentó 182.04 mg/100 g bs. En el presente estudio, el manganeso fue el único mineral presente en cantidades nutricionalmente significativas. Resultados similares fueron reportados previamente para puré de noni (West y col 2011). En este contexto, ambos tipos de bagazo contribuyen con más del 10% del DRI de manganeso en una porción de 10 g de materia seca, mientras que el jugo de noni contribuye con el 6.5 y el 5.1% de la ingesta diaria recomendada para mujeres adultas (DRI 1.8 mg/día) y hombres (DRI 2.3 mg/día), respectivamente (Institute of Medicine 2001).

El contenido de manganeso de ambos tipos de bagazo es aproximadamente el 75% de un reporte previo para puré de noni (0.47 mg/100 g bh) (West y col 2011). Se puede observar que, en la mayoría de los minerales analizados, el BCS mostró un contenido mineral significativamente menor ($p < 0.05$) en comparación con BSS, esto se debe a que las semillas de noni poseen menos contenido mineral que el pericarpio de noni en base seca (Nascimento y col 2018). De acuerdo con nuestra estimación, las semillas representan aproximadamente el 31% de la masa total del BCS.

Cuadro 8. Contenido de minerales en mg/100g bs presentes en bagazo con semilla (BCS), bagazo sin semilla (BSS) y jugo (JN) de noni (*Morinda citrifolia* L.).

Minerales			
mg/100g bs	Derivado del fruto de noni		
Mayores	BCS	BSS	JN
K	1124.24 ± 19.08 ^c	1886.82 ± 92.98 ^b	3148.57 ± 122.39 ^a
Ca	316.09 ± 26.06 ^b	478.78 ± 48.41 ^a	182.04 ± 7.14 ^c
Na	72.72 ± 5.3 ^c	98.91 ± 4.4 ^b	133.41 ± 4.6 ^a
Mg	148.89 ± 1.5 ^b	204.35 ± 11.7 ^a	199.33 ± 14.5 ^a
Menores			
Fe	6.2 ± 1.2 ^{ab}	7.6 ± 2.2 ^a	4.0 ± 0.6 ^b
Mn	2.06 ± 0.2 ^b	2.8 ± 0.32 ^a	1.18 ± 0.12 ^c
Zn	2.8 ± 0.4 ^b	3.5 ± 0.2 ^a	3.5 ± 0.1 ^a
Cu	1.2 ± 0.13 ^a	1.1 ± 0.08 ^a	1.2 ± 0.11 ^a

Letras diferentes en la misma fila indican diferencia significativa ($\alpha=0.05$).

LSD= 178.6, 63.9, 9.5, 21.6, 3.1, 0.52, 0.58 y 0.23 en mg/100g bs, para K, Ca, Na, Mg, Fe, Mn, Zn y Cu, respectivamente. bs=base seca. Media de 3 repeticiones ± DE.

C. ANÁLISIS FITOQUÍMICOS

1. Fenólicos libres (FL)

En el presente estudio, el contenido de fenólicos libres representa la contribución de los fenólicos solubles no conjugados y conjugados extraídos por metanol. El jugo de noni (JN) exhibió el mayor contenido de FL (12.05 mg EAG/g bs) seguido de BSS y BCS, con 5.61 y 4.14 mg EAG/g bs, respectivamente (**Cuadro 9**). Debido a sus propiedades hidrofílicas, la mayoría de los FL se lixiviaron en el jugo de noni. En relación con el contenido de FL en el jugo, el bagazo mostró 34 y 47% para BCS y BSS, respectivamente.

Estos niveles siguen siendo importantes y similares a los contenidos reportados como compuestos fenólicos totales (los cuales son fenólicos libres de acuerdo con la metodología) para el bagazo de manzana (5.51 mg EAG/g bs) obtenido por extracción con metanol (Sudha y col 2007). Resultados aproximados fueron reportados para el bagazo de naranjita (9.6 mg EAG/g bs) extraído con una solución acuosa de acetona (Delgado-Nieblas y col 2017). Además, nuestros FL fueron más bajos que los del bagazo de frambuesa (25 mg EAG/g bs), pero más altos que los del bagazo de arándano (2 mg EAG/g bs) (Gouw y col 2017).

Por otra parte, nuestro contenido de FL en bagazo resultó mayor que algunas frutas frescas de acuerdo con lo reportado por Pérez-Jiménez y col (2010) para durazno (59 mg/100 g), albaricoque (34 mg/100 g) nectarina (25 mg/100 g) y pera (17 mg / 100 g), cuando el contenido se expresa en la misma manera. La ingesta dietética de fenólicos solubles puede promover beneficios para la salud humana al inhibir el colesterol LDL y la oxidación de los liposomas (Acosta-Estrada y col 2014).

Cuadro 9. Fenólicos libres (FL), fenólicos ligados (FU) y fenólicos totales (FT) presentes en bagazo con semilla (BCS), bagazo sin semilla (BSS) y jugo (JN) de noni (*Morinda citrifolia* L.).

Derivado del fruto de noni	mg EAG/g bs			mg EAG/100g bh		
	FL	FU	FT	FL	FU	FT
BCS	4.14±0.27 ^c	2.79±0.19 ^a	6.93±0.35 ^b	73.5±4.9	49.4±3.3	122.9±6.2
BSS	5.61±0.23 ^b	1.35±0.06 ^b	6.96±0.17 ^b	66.9±2.8	16.1±0.7	83.0±2.0
JN	12.05±0.39 ^a	1.31±0.15 ^b	13.36±0.37 ^a	71.4±2.4	7.8±0.9	79.2±2.2

Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa ($\alpha=0.05$). LSD = 0.62 mgEAG/g bs, para FL en bs; LSD= 0.22 mgEAG/g bs, para FU en bs; LSD= 0.5 mgEAG/g bs, para fenólicos totales en bs. bs= base seca, bh= base húmeda. Media de 3 repeticiones \pm DE.

2. Fenólicos ligados (FU)

En este estudio, los fenólicos ligados representan a los fenólicos liberados por hidrólisis alcalina a partir del sedimento obtenido después de la extracción con metanol de los fenólicos solubles (fenólicos libres). BCS presentó el doble del contenido de FU (2.79 mg EAG/g bs) con respecto a BSS o a JN (1.35 y 1.31 mg EAG/g bs, respectivamente) (**Cuadro 9**). Estos últimos no mostraron diferencia significativa. Nuestros resultados sugirieron que las semillas de noni contribuyeron al aumento del contenido de FU en el BCS.

Las semillas de frutos carnosos han demostrado ser fuentes importantes de fenólicos ligados, por ejemplo, las semillas de frutos de maracuyá de cáscara roja, longan, rambután, pitahaya de pulpa blanca y pulpa roja mostraron una alta contribución de los FU al contenido fenólico total (62-77%), mientras que la semilla de mango exhibió una baja contribución (9.5%) (Nguyen y col 2019). Ciertamente, los niveles de los FU en nuestros bagazos son bastante bajos en comparación con la cantidad de fenólicos ligados de los subproductos del jugo de uva (cáscara, semillas y tallos) que fueron 75 veces más altos que los de nuestros bagazos (de Camargo y col 2014). Se ha sugerido que la ingesta dietética de fenólicos ligados posee actividad preventiva contra el cáncer de colon (Yi y col 2005).

3. Fenólicos totales (FT)

FT es la suma de fenólicos libres y ligados. JN presentó el contenido más alto (13.36 mg EAG/g bs), mientras que no hubo diferencias significativas entre BCS (6.93 mg EAG/g bs) y BSS (6.96 mg EAG/g bs) (**Cuadro 9**). Nuestros niveles de FT son mucho más bajos que los encontrados en los subproductos de la uva (381 mg EAG/g

bs) (de Camargo y col 2014). Sin embargo, nuestros resultados en bagazos (82.9 y 79.1 mg EAG/g bh para BCS y BSS, respectivamente) resultaron más altos que los reportados para algunos frutos carnosos como la pera (70.6 mg / 100 g bh) y la uva (49.6 mg /100 g bh) (Sun y col 2002). La mayoría de las investigaciones anteriores sobre los fenólicos en el bagazo de la fruta incluyeron solo fenólicos solubles libres en el análisis (excluyendo los fenólicos ligados).

En este estudio, los fenólicos libres resultaron dominantes sobre los fenólicos ligados. Los fenólicos libres representaron el 60, 80 y 90% del total de compuestos fenólicos en BCS, BSS y JN, respectivamente. Otros estudios en frutas también encontraron que la mayoría de sus compuestos fenólicos se encuentran en forma libre (aproximadamente 76.5%) (Sun y col 2002, Arruda y col 2018). Por otro lado, BCS tuvo la mayor proporción (40%) de FU, entre nuestras tres muestras.

Como se mencionó anteriormente, estos resultados sugirieron que las semillas de noni poseen un mayor contenido de fenólicos ligados que el pericarpio de noni. Estos resultados están de acuerdo con de Camargo y col (2014) quienes reportaron una alta contribución de las formas ligadas (55%) al contenido fenólico total de los subproductos de uva, en donde las semillas de uva son una parte importante. Por otra parte, el bagazo de cítricos presentó una baja contribución de los compuestos fenólicos ligados (32%) al contenido fenólico total, lo que puede deberse a la ausencia de semillas en este bagazo (Tao y col 2014).

4. Flavonoides totales

JN exhibió el mayor contenido de flavonoides (5.06 mg EQ/g bs) seguido de BSS y BCS, con 2.9 y 2.17 mg EQ/ g bs, respectivamente (**Cuadro 10**).

Cuadro 10. Flavonoides totales presentes en bagazo con semilla (BCS), bagazo sin semilla (BSS) y jugo (JN) de noni (*Morinda citrifolia* L.).

Flavonoides totales		
Derivado del		
fruto de noni	mg EQ/g bs	mg EQ/100 g bh
BCS	2.17 ± 0.33 ^c	38.48 ± 5.87
BSS	2.90 ± 0.25 ^b	34.45 ± 3.05
JN	5.06 ± 0.52 ^a	30.06 ± 3.08

Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa ($\alpha=0.05$).

LSD = 0.61 mg EQ/g bs para flavonoides totales en base seca. bs= base seca, bh= base húmeda. Media de 3 repeticiones ± DE.

En relación con el jugo, el contenido de flavonoides del bagazo varió de 43 a 57%. Además, el contenido de flavonoides totales en los bagazos fue aproximadamente de 2 a 3 veces más alto que el reportado previamente para el bagazo de manzana (Cerdá-Tapia y col 2015) cuando se expresan de la misma manera. Los flavonoides han mostrado propiedades benéficas para la salud humana porque poseen actividades antibacterianas, antihipertensivas, antidiabéticas, antiinflamatorias y anticancerígenas, entre otras. Tienen capacidad efectiva como eliminadores de la mayoría de las moléculas oxidantes, como el oxígeno singulete y otros radicales libres (Rana y Gulliva 2019).

5. Taninos condensados (TC)

En el **Cuadro 11** se presentan los resultados para taninos condensados. El jugo de noni (JN) mostró un contenido de TC de 14.37 mg EC/g bs, significativamente mayor que en ambos tipos de bagazo ($p < 0.05$) (9.05 y 6.81 mg EC/g bs para BSS y BCS, respectivamente), pero no se encontraron diferencias significativas entre ambos tipos de bagazo. Aunque los TC se lixiviaron en su mayor parte en el jugo de noni, una gran proporción de ellos permaneció en bagazo, el 63% en BSS, mientras que el 47% en BCS.

En comparación con los TC encontrados en bagazos de cuatro variedades de uva blanca (50-92 mg/g bs) (González-Centeno y col 2013), nuestros niveles de TC en noni fueron de 7 a 9 veces más bajos. Sin embargo, nuestros resultados en base húmeda corresponden a niveles intermedios (120.76 y 107.89 mg EC/100 g bh para BCS y BSS, respectivamente), de acuerdo con los reportados para frutas frescas (uva y manzana) cuyos valores de TC oscilaron entre 40 y 213 mg/100 g bh de acuerdo con

Cuadro 11. Taninos condensados presentes en bagazo con semilla (BCS), bagazo sin semilla (BSS) y jugo (JN) de noni (*Morinda citrifolia* L.).

Taninos condensados		
Derivado del		
fruto de noni	mg EC/g bs	mg EC/100 g bh
BCS	6.81 ± 0.76 ^b	120.76 ± 13.47
BSS	9.05 ± 1.70 ^b	107.89 ± 20.27
JN	14.37 ± 2.71 ^a	85.15 ± 16.08

Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa ($\alpha=0.05$).

LSD = 3.31 mg EC/g bs para taninos condensados en base seca. bs=base seca, bh= base húmeda. Media de 3 repeticiones ± DE.

lo reportado por Andrés-La-Cueva y col (2010). Se ha prestado mucha atención a las proantocianidinas debido a sus propiedades benéficas para la salud humana, las cuales abarcan actividades anticancerígenas, inmunomoduladoras, anti-inflamatorias, antioxidantes, cardioprotectoras y antitrombóticas (Smeriglio y col 2017).

6. Carotenoides totales (CT)

El contenido de carotenoides totales se muestra en el **Cuadro 12**. Se presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en el contenido de CT entre todas las muestras. BSS mostró el contenido más alto ($48.37 \mu\text{g E}\beta\text{-C/g bs}$), mientras que JN mostró la cantidad más baja ($10.59 \mu\text{g de E}\beta\text{-C/g bs}$). Entre los tipos de bagazo, el BSS fue 1.6 veces más alto en contenido de carotenoides que el BCS, en base seca. Palioto y col (2015) reportaron 0.45 mg/100 g bh para carotenoides totales en pulpa de noni, lo cual es ligeramente inferior a nuestros resultados para bagazo cuando se expresan de la misma manera, 0.52 y 0.57 mg/100 g bh para BCS y BSS, respectivamente.

Como era de esperar, el contenido de carotenoides en ambos tipos de bagazo fue notablemente más alto que en el jugo, debido al carácter lipofílico de los carotenoides, que se mantienen preferentemente en la matriz de bagazo en lugar de lixiviarse hacia el jugo. Los carotenoides son compuestos bioactivos de la dieta que brindan protección contra afecciones degenerativas que incluyen enfermedades cardiovasculares, enfermedades crónicas del hígado, diabetes, cáncer y degeneración macular (Solovchenko y col 2019). Además, los carotenoides también son antioxidantes por su capacidad para eliminar el oxígeno singulete y eliminar radicales peroxilo (Solovchenko y col 2019).

Cuadro 12. Carotenoides totales presentes en bagazo con semilla (BCS), bagazo sin semilla (BSS) y jugo (JN) de noni (*Morinda citrifolia* L.).

Carotenoides totales		
Derivado del		
fruto de noni	µg Eβ-C/g bs	µg Eβ-C/100 g bh
BCS	29.47 ± 3.99 ^b	522.40 ± 70.81
BSS	48.37 ± 4.44 ^a	576.16 ± 52.90
JN	10.59 ± 2.48 ^c	62.37 ± 14.71

Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa ($\alpha=0.05$). LSD = 5.97 µg EβC/g bs para carotenoides totales en base seca; bs=base seca, bh=base húmeda. Media de 3 repeticiones ± DE.

D. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE FITOQUÍMICOS INDIVIDUALES

1. Identificación y cuantificación de carotenoides individuales por HPLC-DAD

Básicamente, el β -caroteno y la luteína fueron los únicos picos evidentes, identificados y cuantificados utilizando HPLC-DAD en todas las muestras (BCS, BSS y JN). El β -caroteno mostró diferencias ($p < 0.05$) en el contenido entre todas las muestras. BSS presentó el contenido más alto (29.53 $\mu\text{g/g}$ bs), mientras que JN presentó la cantidad más baja (8.60 $\mu\text{g/g}$ bs) (**Cuadro 13**). Se observó un comportamiento similar entre las muestras para la luteína, cuyo contenido fue relativamente bajo del orden de 5.78, 3.64 y 1.76 $\mu\text{g/g}$ bs, para BSS, BCS y JN, respectivamente.

El β -caroteno mostró un contenido de 5 a 6 veces mayor que la luteína para cualquiera de las muestras (BSS, BCS y JN). La luteína y el β -caroteno aparecen como picos bien definidos a los 21.8 y 44.3 minutos de tiempo de retención, respectivamente. Otros picos que aparecen en el cromatograma a los 25.1 y 47.4 minutos son muy pequeños, y sus espectros de absorción no están claramente definidos (**Figura 7**). Porciones de 10 g de muestra en polvo de BSS, BCS y JN respectivamente proporcionan el 16.4, 12.3 y 4.8% del valor diario recomendado para la vitamina A para hombres adultos (300 ER según FAO/OMS) respectivamente, calculado a partir del contenido de β -caroteno (FAO/OMS 1988).

La vitamina A es esencial para la visión normal y la inmunidad de humanos y animales (Solovchenko y col 2019). Por otro lado, las porciones de 10 g en base seca

Cuadro 13. Carotenoides individuales presentes en bagazo con semilla (BCS), bagazo sin semilla (BSS) y jugo (JN) de noni (*Morinda citrifolia* L.).

Derivado del	β -Caroteno		Luteína	
	$\mu\text{g/g bs}$	$\mu\text{g/100 g bh}$	$\mu\text{g/g bs}$	$\mu\text{g/100 g bh}$
BCS	22.18 \pm 3.33 ^b	393.20 \pm 59.11	3.64 \pm 0.03 ^b	64.62 \pm 0.60
BSS	29.53 \pm 2.77 ^a	351.68 \pm 33.09	5.78 \pm 0.96 ^a	68.89 \pm 11.54
JUGO	8.60 \pm 1.58 ^c	50.95 \pm 9.38	1.76 \pm 0.37 ^c	10.41 \pm 2.24

Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa ($\alpha=0.05$). LSD = 5.33 $\mu\text{g/g bs}$ para β -caroteno y 1.20 $\mu\text{g/g bs}$ para luteína; bs=base seca, bh=base húmeda. Media de 3 repeticiones \pm DE.

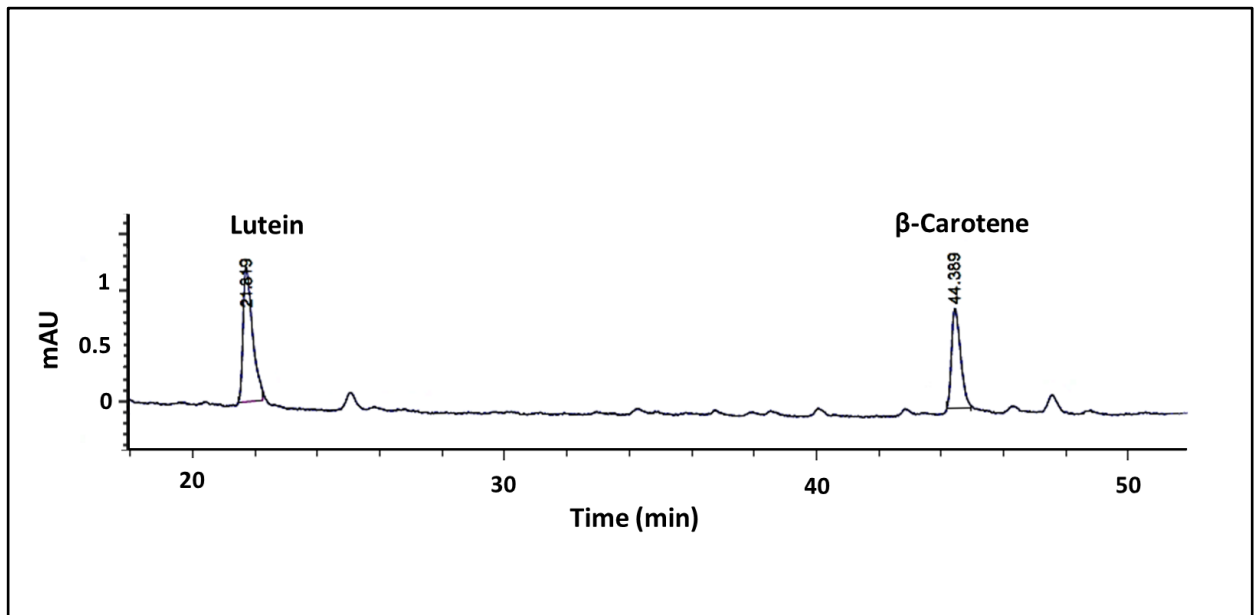


Figura 7. Cromatograma HPLC-DAD representativo para carotenoides de bagazo con semilla a 452 nm.

de BSS, BCS y JN proporcionan el 0.6, 0.4 y 0.2% de los niveles recomendados de luteína para la salud en los ojos (10 mg/día) establecida por la Asociación Americana de Optometría respectivamente (Asociación Americana de Optometría 2019). La luteína es nutracéutica debido a sus efectos potenciales en la salud humana, como la prevención de la degeneración macular y sus propiedades antioxidantes (Steiner y col 2018). Hay muy pocos reportes de carotenoides individuales en el fruto de noni. La luteína y el β -caroteno se han identificado, pero no se han cuantificado en extractos de diferentes etapas de desarrollo del fruto de noni (Singh y col 2016).

2. Fenólicos individuales

a. Identificación de compuestos fenólicos individuales por UPLC-ESI-MS

Un total de 16 compuestos fenólicos y dos iridoides se identificaron (inequívoca o tentativamente) en todas las muestras estudiadas (BCS, BSS y JN) mediante UPLC acoplado a ESI-MS (**Figura 8 y Cuadro 14**). El análisis de espectros de masas se realizó utilizando el modo de ión negativo, sin embargo, el modo de ión positivo se utilizó en algunos casos con fines de verificación. La identificación de un compuesto dado se consideró de forma inequívoca cuando se comparó con los datos de su respectivo estándar auténtico, como su tiempo de retención y su patrón de fragmentación de masas.

El **Cuadro 14** muestra el tiempo de retención, los patrones de fragmentación, una descripción tentativa del fragmento, el compuesto identificado y su tipo para todos los compuestos identificados de forma inequívoca o tentativamente. Los siete compuestos identificados inequívocamente fueron: ácido *p*-hidroxibenzoico, escopoletina, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, ácido sinápico, rutina y quercetina. Los 11 compuestos

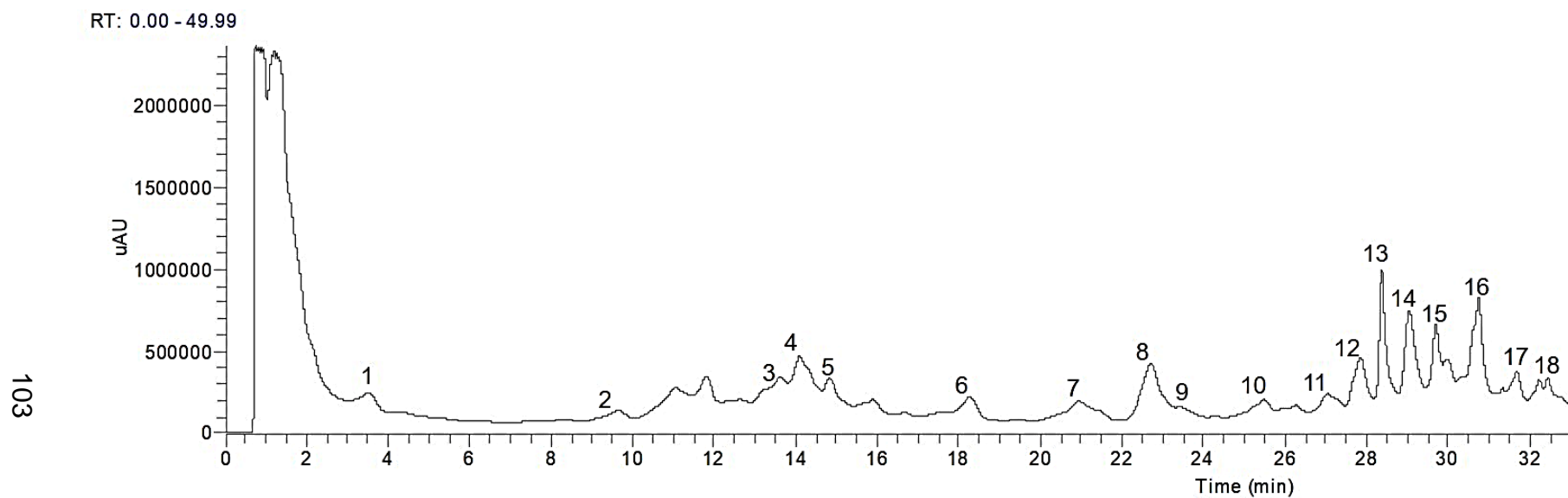


Figura 8. Cromatograma del HPLC representativo para compuestos fenólicos e iridoides de bagazo con semilla. La identidad de los picos numerados se indica en el Cuadro 14.

Cuadro 14. Compuestos fenólicos e iridoides identificados en extractos de metanol de bagazo y jugo de noni por UPLC-DAD-ESI-MS.

No.	TR ^a (min)	Fragmentos	Descripción tentativa del fragmento	Compuesto identificado	Tipo de compuesto
1	3.51	389 [390-H]- 227 [390-H-162]- 209 [390-H-162-18]- 183 [390-H-162-44]-	Ion molecular desprotonado DAA menos grupo glucosilo deshidratado DAA menos grupo glucosilo deshidratado, menos una molécula de agua DAA menos grupos glucosilo deshidratado y carboxilo	Ácido deacetilasperulosídico ^b	Iridoide
2	9.63	137 ([138-H]-	Ion molecular desprotonado	Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico ^c	Ácido hidroxibenzoico
3	13.19	577 [578-H]- 451 [578-H-126]- 425 [578-H-152]- 407 [578-H-152-18]- 289 [578-H-288]- 245 [578-H-288-44]-	Ion molecular desprotonado Pérdida del anillo-A (floroglucinol) Pérdida de 152 amu Pérdida de una molécula de agua del fragmento <i>m/z</i> 425 Pérdida de una molécula de (epi)catequina Pérdida de CH ₂ , CH y OH del anillo C de (epi)catequina	Dímero de procianidina tipo-B ^b	Flavan-3-ol
4	14.3	431 [432-H]- 269 [432-H-162]- 251 [432-H-180]-	Ion molecular desprotonado AA menos grupo glucosilo deshidratado AA menos grupo glucosilo deshidratado y menos una molécula de agua	Ácido asperulosídico ^b	Iridoide
5	14.81	515 [516-H]- 353 [516-H-162]- 341 [516-H-174]- 323 [516-H-174-18]- 191 [516-H-162-162]- 179 [516-H-174-162]-	Ion molecular desprotonado Pérdida de un hexósido Pérdida del ácido quínico Pérdida del ácido quínico y agua Pérdida de los grupos hexósido y cafeoil Pérdida de los grupos hexósido y ácido quínico	Ácido cafeoilquínico-hexósido ^b	Ácido hidroxicinámico
6	18.55	191 [192-H]- 176 [192-H-15]- 148 [192-H-28-15]- 133	Ion molecular desprotonado Pérdida de un grupo metilo Pérdida de los grupos carbonilo y metilo Indefinido	Derivado de cumarina I ^b	Cumarina
7	21.15	191 [192-H]- 176 [192-H-15]- 148 [192-H-28-15]-	Ion molecular desprotonado Pérdida de un grupo metilo Pérdida de los grupos carbonilo y metilo	Derivado de cumarina II ^b	Cumarina
8	22.7	191 [192-H]- 176 [192-H-15]- 163 [192-H-28]-	Ion molecular desprotonado Pérdida de un grupo metilo Pérdida de un grupo carbonilo	Escopoletina ^c	Cumarina

Cuadro 14. Continuación

No.	TR ^a (min)	Fragmentos	Descripción tentativa del fragmento	Compuesto identificado	Tipo de compuesto
		148 [192-H-28-15]-	Pérdida de un grupo metilo del fragmento <i>m/z</i> 163		
9	23.44	163 [164-H]-	Ion molecular desprotonado	Ácido <i>p</i> -cumárico ^c	Ácido hidroxicinámico
		119 [164-H-44]-	Pérdida de dióxido de carbono		
10	25.68	193 [194-H]-	Ion molecular desprotonado	Ácido ferúlico ^c	Ácido hidroxicinámico
		149 [194-H-44]-	Pérdida de dióxido de carbono		
		117	Indefinido		
11	27.18	223 [224-H]-	Ion molecular desprotonado	Ácido sinápico ^c	Ácido hidroxicinámico
		208 [224-H-15]-	Pérdida de un grupo metilo		
		193 [224-H-15-15]-	Pérdida de dos grupos metilo		
		179 [224-H-44]-	Pérdida de dióxido de carbono		
12	27.72	741 [742-H]-	Ion molecular desprotonado	Quercetina-3- <i>O</i> -rutinósido-7- <i>O</i> -pentósido ^b	flavonol
		609 [742-H-132]-	Pérdida de una pentosa		
		301 [742-H-132-308]-	Pérdida de los grupos pentosilo y rutosilo		
13	28.45	609 [610-H]-	Ion molecular desprotonado	Quercetina-3- <i>O</i> -rutinósido (rutina) ^c	flavonol
		301 [610-H-308]-	Pérdida de un grupo rutosilo		
		300	Derivado de quercetina		
		179 [610-H-308-122]-	Derivado del mecanismo Retro Diels-Adler		
14	29.14	151 [610-H-308-122-28]-	Derivado del mecanismo Retro Diels-Adler	Quercetina-hexosa-desoxihexosa ^b	flavonol
		609 [610-H]-	Ion molecular desprotonado		
		301 [610-H-308]-	Pérdida de una hexosa-desoxihexosa		
		300	Derivado de quercetina		
		179 [610-H-308-122]-	Derivado del mecanismo Retro Diels-Adler		
15	29.75	151 [610-H-308-122-28]-	Derivado del mecanismo Retro Diels-Adler	Kaempferol-3- <i>O</i> -rutinósido ^b	flavonol
		593 [594-H]-	Ion molecular desprotonado		
		447 [594-H-146]-	Pérdida de una desoxihexosa		
		285 [594-H-146-162]-	Pérdida de un grupo rutosilo		
		255	Indefinido		
16	30.13	623 [624-H]-	Ion molecular desprotonado	Isoramnetina-3- <i>O</i> -rutinósido ^b	flavonol
		477 [624-H-146]-	Pérdida de una desoxihexosa (ramnosa)		
		459 [624-H-146-18]-	Pérdida de ramnosa y agua		
		315 [624-H-146-162]-	Pérdida de un grupo rutosilo		
17	30.82	359 [360-H]-	Ion molecular desprotonado	Ácido rosmarínico ^b	Ácido hidroxicinámico
		197 [360-H-162]-	Pérdida del ácido cafeico deshidratado		

Cuadro 14. Continuación

No.	TR ^a (min)	Fragmentos	Descripción tentativa del fragmento	Compuesto identificado	Tipo de compuesto
18	32.49	179 [360-H-180]-	Pérdida del ácido salviánico A deshidratado	Quercetina ^c	flavonol
		161 [360-H-180-18]- y/o	Pérdida de una molécula de agua y/o		
		161 [360-H-162-18-18]-	Pérdida simultánea de dos moléculas de agua		
		135 [360-H-180-44]-	Pérdida de dióxido de carbono		
		301 [302-H]-	Ion molecular desprotonado		
		179 [610-H-308-122]-	Derivado del mecanismo Retro Diels-Adler		
151 [610-H-308-122-28]-	Derivado del mecanismo Retro Diels-Adler				

^aTR = tiempo de retención. ^bIdentificado tentativamente. ^cIdentificado usando estándar. DAA: ácido deacetilasperulosídico, AA: ácido asperulosídico.

restantes fueron tentativamente identificados basándose en patrones de fragmentación de masas y en la literatura. Del total de los compuestos identificados, seis se clasificaron como ácidos fenólicos, dos como iridoides, tres como cumarinas y siete como flavonoides. Entre los ácidos fenólicos que se encontraron, uno era de tipo hidroxibenzoico (ácido *p*-hidroxibenzoico), y cinco eran de tipo hidroxicinámico (ácido cafeoilquínico-hexósido, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, ácido sinápico y ácido rosmarínico). El único compuesto de tipo hidroxibenzoico identificado fue el ácido *p*-hidroxibenzoico basado en su valor de masa/carga $m/z = 137$ ($[138-H]^-$) y el tiempo de retención de su estándar. El ácido *p*-hidroxibenzoico ha sido descrito previamente por Lin y col (2103) en el jugo de noni.

Entre los ácidos hidroxicinámicos, se identificó tentativamente un ácido cafeoilquínico-hexósido (M 516) de acuerdo con el siguiente patrón de fragmentación: m/z 515, 353, 341, 323, 191 y 179. El fragmento m/z 515 ($[516-H]^-$) corresponde a la molécula desprotonada de ácido cafeoilquínico-hexósido; 353 ($[516-H-162]^-$) corresponde al ácido cafeoilquínico desprotonado debido a la pérdida de una hexosa; 341 ($[516-H-174]^-$) corresponde al ión cafeoil-hexósido derivado de la pérdida del ácido quínico; 323 ($[516-H-174-18]^-$) corresponde al ion cafeoil-hexósido deshidratado debido a la pérdida del ácido quínico y agua; 191 ($[516-H-162-162]^-$) corresponde a la parte del ácido quínico desprotonado debido a la pérdida de los grupos hexósido y cafeína; 179 ($[516-H-174-162]^-$) corresponde al ión cafeoil debido a la pérdida de los grupos hexósido y ácido quínico.

La presencia de los fragmentos a m/z 341 y 323 sugiere que m/z de 515 corresponde al ácido cafeoilquínico-hexósido en lugar de al ácido dicafeoilquínico que posee el mismo valor de m/z de acuerdo con lo reportado por Ncube y col (2014). De

acuerdo con nuestra revisión bibliográfica, los hexósidos del ácido cafeoilquínico no se han reportado previamente ni en la fruta ni en el jugo de noni.

En el caso de los ácidos *p*-cumárico y ferúlico, mostraron los iones moleculares desprotonados a m/z 163 ($[164-H]^-$) y 193 ($[194-H]^-$), y sus correspondientes fragmentos de iones con valor m/z 119 ($[164-H-44]^-$) y 149($[194-H-44]^-$), respectivamente. Estos últimos fragmentos se derivaron de la descarboxilación de los iones *p*-cumaroil y feruloil, respectivamente. Patrones de fragmentación similares se han reportado previamente (Hossain y col 2010). Ambos ácidos se han reportado en el jugo de noni (Yan y col 2018).

El ácido sinápico exhibió el ion molecular desprotonado a m/z 223 ($[224-H]^-$) y los fragmentos de iones a m/z 208, 193 y 179. Los iones m/z 208 ($[224-H-15]^-$) y 193 ($[224-H-15-15]^-$) corresponden a los fragmentos desmetilados, mientras que el ion m/z 179 ($[224-H-44]^-$) corresponde a la pérdida de dióxido de carbono. Estos fragmentos fueron similares a los reportados previamente por Mizgier y col (2016). El ácido sinápico ha sido reportado previamente en jugo de noni (Yan y col 2018). Finalmente, el último compuesto de tipo hidroxicinámico identificado exhibió un ion $[MH]^-$ a m/z 359 ($[360-H]^-$) con el siguiente patrón de fragmentación m/z 197, 179, 161 y 135. Esta fragmentación de masas nos permitió identificar tentativamente este compuesto como ácido rosmarínico (Hossain y col 2010).

El fragmento de ion m/z 197 ($[360-H-162]^-$), del cual creemos que es el ion salviánico, se formó por la pérdida del ácido cafeico deshidratado, mientras que el fragmento de ion m/z 179 ($[360-H-180]^-$), del cual creemos que es el ión cafeoil, se formó por la pérdida del ácido salviánico A deshidratado. En el caso del fragmento m/z 161, creemos que esto puede derivarse de dos rutas posibles, una podría ser la

pérdida de una molécula de agua del ión cafeoil ($179-18=161$) y la otra de la pérdida simultánea de dos moléculas de agua del ion salviánico ($197-18-18=161$). Finalmente, el fragmento de ion m/z 135 se deriva de la descarboxilación del ion cafeoil ($179-44=135$). El ácido rosmarínico se ha reportado previamente en un extracto acuoso de fruto de noni (de Moraes y col 2016). Por otro lado, también se identificaron dos iridoideas en todas las muestras estudiadas: el ácido deacetilasperulosídico y el ácido asperulosídico. El ácido deacetilasperulosídico exhibió un ion $[M-H]^-$ a m/z 389 ($[390-H]^-$) con el siguiente patrón de fragmentación m/z , 227, 209 y 183. El fragmento en m/z 227 ($[390-H-162]^-$) corresponde a la pérdida del grupo glucosilo deshidratado; 209 ($[390-H-162-18]^-$) corresponde a la pérdida tanto del grupo glucosilo deshidratado como a una molécula de agua, mientras que 183 ($[390-H-162-44]^-$) corresponde a la pérdida del grupo glucosilo deshidratado y el grupo carboxílico.

El otro iridoide fue el ácido asperulosídico que mostró un patrón de fragmentación m/z 431 ($[432-H]^-$), 269 ($[432-H-162]^-$) y 251 ($[432-H-180]^-$) que corresponden a la molécula desprotonada de ácido asperulosídico, la pérdida del grupo glucosilo deshidratado y la pérdida del grupo glucosilo deshidratado menos una molécula de agua, respectivamente. Patrones de fragmentación similares se han reportado previamente para el ácido deacetilasperulosídico y para el ácido asperulosídico (Dussossoy y col 2011). Estos iridoideas se han reportado comúnmente en el jugo de noni (Dussossoy y col 2011) y en el fruto de noni (Deng y col 2011).

También se identificaron tres moléculas de tipo cumarina, entre ellas el derivado de cumarina I, el derivado de cumarina II y la escopoletina, cuyos tiempos de retención fueron 18.55, 21.15 y 22.70 min, respectivamente. La escopoletina mostró el siguiente patrón de fragmentación: m/z 191, 176, 163 y 148. El fragmento en m/z 191 ($[192-H]^-$)

) corresponde a la molécula desprotonada de escopoletina; 176 ([192-H-15]⁻) corresponde a la pérdida de un grupo metilo; 163 ([192-H-28]⁻) corresponde a la pérdida de un grupo carbonilo y 148 ([192-H-28-15]⁻) corresponde a la pérdida de un grupo metilo del fragmento *m/z* 163. La escopoletina es un compuesto característico del fruto de noni según lo reportado por Deng y col (2010), quienes propusieron que dicho compuesto se puede usar como una referencia para la autenticación de productos de noni comerciales. Además, se ha reportado que la escopoletina presenta propiedades antioxidantes, antimicrobianas, antihipertensivas, analgésicas y antiinflamatorias y una capacidad significativa para controlar los niveles de serotonina en el cuerpo (Chan-Blanco y col 2007; Pandey y col 2014).

Las dos cumarinas tentativas restantes mostraron un patrón de fragmentación similar a la escopoletina, y debido a eso creemos que son isómeros de la escopoletina. El derivado de cumarina I mostró los fragmentos *m/z* 191, 176, 163 y 148 mientras que el derivado de cumarina II exhibió los fragmentos *m/z* 191, 176 y 148. Entre los flavonoides que se encontraron, uno fue flavan-3-ol (dímero de procianidina tipo B) y seis flavonoles (quercetina-3-*O*-rutinosido-7-*O*-pentósido, rutina, quercetina-hexosa-desoxihexosa, kaempferol-3-*O*-rutinosido, isoramnetina-3-*O*-rutinosido y quercetina). El dímero de procianidina tipo B se identificó tentativamente de acuerdo con el siguiente patrón de fragmentación: *m/z* 577, 451, 425, 407, 289, 245 (Engida y col 2015).

El fragmento *m/z* 577 ([578-H]⁻) corresponde a la molécula desprotonada del dímero de procianidina tipo B; 451 ([578-H-126]⁻) corresponde a la pérdida del anillo A (floroglucinol); 425 ([578-H-152]⁻) resulta de la pérdida de 152 unidades (u) y 407 ([578-H-152-18]⁻) resulta de perder una molécula de agua a partir de *m/z* 425, los dos

últimos fragmentos son derivados del mecanismo Retro Diels-Adler (RDA); 289 ([578-H-288]⁻) corresponde a la pérdida de una molécula de (epi) catequina; 245 ([578-H-288-44]⁻) corresponde a la pérdida de 44 u del fragmento *m/z* 288, aparentemente 44 u corresponden a la pérdida de CH₂, CH y OH del anillo C de (epi) catequina (No a la descarboxilación). De acuerdo con nuestra revisión bibliográfica, esta es la primera vez que se encuentra el dímero de procianidina tipo B en noni.

Entre los flavonoles, se encontró quercetina-3-O-rutinósido-7-O-pentósido (rutina pentósido) según el siguiente patrón de fragmentación *m/z* 741, 609 y 301. El fragmento *m/z* 741 ([742-H]⁻) corresponde a la molécula desprotonada de rutina pentósido; 609 ([742-H-132]⁻) corresponde a la pérdida de una pentosa y 301 ([742-H-132-308]⁻) corresponde a la pérdida de los grupos pentosilo y rutinosilo. Este último compuesto fue reportado recientemente en noni por Gironés-Vilaplana y col (2015). La rutina apareció en el tiempo de retención de 28.45 min y exhibió el ion molecular desprotonado *m/z* 609 ([610-H]⁻) y los fragmentos de iones *m/z* 301, 300, 179 y 151. El ion *m/z* 301 ([610-H-308]⁻) corresponde a la pérdida de un grupo rutinosilo mientras que los iones *m/z* 179 ([610-H-308-122]⁻) y 151 ([610-H-308-122-28]⁻) se derivan del mecanismo de fragmentación RDA (Sun y col 2007; Taamalli y col 2012).

La rutina se ha encontrado previamente en jugo y fruto de noni (Dussossoy y col 2011; Gironés-Vilaplana y col 2015). y se ha reportado que ejerce varias propiedades biológicas, como actividad antioxidante, anticancerígena, neuroprotectora y anticonvulsiva (Pandy y col 2014). Cerca de la rutina, en el tiempo de retención de 29.14 min apareció una quercetina-hexosa-desoxihexosa (isómero de la rutina) que coincidía con el patrón de fragmentación de la rutina (fragmentos *m/z* 609, 301, 300, 179 y 151). Ningún isómero de la rutina ha sido reportado previamente en noni.

Kaempferol 3-O-rutinósido exhibió el ion molecular desprotonado m/z 593 ($[594-H]^-$) y los fragmentos de iones de m/z 447, 285. Los fragmentos m/z 447 ($[594-H-146]^-$) y 285 ($[594-H-146-162]^-$) se derivan de la pérdida de una desoxihexosa y un grupo rutinosilo, respectivamente. Kaempferol-3-O-rutinósido ha sido reportado en jugo de noni (Dussossoy y col 2011) y en fruto de noni (Gironés-Vilaplana y col 2015). Isoramnetina-3-O-rutinósido mostró el ion molecular desprotonado m/z 623 ($[624-H]^-$) y los fragmentos de iones m/z 477, 459 y 315. El fragmento m/z 477 ($[624-H-146]^-$) corresponde al ion de isoramnetina hexósido derivado de la pérdida de una desoxihexosa (ramnosa). El fragmento 459 ($[624-H-146-18]^-$) corresponde al hexósido de isoramnetina deshidratado. El fragmento m/z 315 ($[624-H-146-162]^-$) corresponde a la aglicona de isoramnetina cargada negativamente, derivada de la pérdida de un grupo rutinosilo. Isoramnetina-3-O-rutinósido ha sido reportada en noni por Su y col (2005).

Finalmente, el último flavonol identificado fue la quercetina. Este compuesto exhibió el ion molecular desprotonado m/z 301 ($[302-H]^-$) con el siguiente patrón de fragmentación m/z 179 y 151. Estos fragmentos, como se mencionó anteriormente, se derivan del mecanismo de fragmentación de RDA. La quercetina se ha reportado previamente en jugo de noni (Dussossoy y col 2010; Yan y col 2018).

b. Cuantificación de compuestos fenólicos individuales

Ambos tipos de bagazo mostraron el mismo orden de abundancia con respecto a los diferentes tipos de compuestos fenólicos, que fueron los siguientes: flavonoles> ácidos fenólicos> cumarinas> iridoides> flavan-3-ol (**Cuadro 15**). La mayoría de los compuestos fenólicos detectados en el jugo de noni mostraron concentraciones de 1.3 a 3.1 veces más altas que las de BSS y concentraciones de 2 a 5 veces más altas que

las de BCS (**Cuadro 15**). La razón por la cual el jugo de noni resultó con la mayor concentración de compuestos fenólicos, se cree que se debe, como se mencionó anteriormente, al alto carácter hidrofílico de estos componentes. Sin embargo, se mantuvieron cantidades importantes en ambos tipos de bagazo, en el que el mayor contenido observado en BSS en comparación con BCS (BSS mostró concentraciones de 1.2 a 3.3 veces más altas que BCS) sugirió que el contenido fenólico extraído con metanol en semillas de noni es bastante más bajo que en el pericarpio, en la mayoría de los casos.

Los ácidos fenólicos fueron el principal tipo de compuestos fenólicos en el jugo seguidos de los flavonoles. Debido a que los ácidos fenólicos poseen pesos moleculares más bajos que los flavonoles, los ácidos fenólicos podrían haber sido lixiviados del pericarpio de noni más fácilmente que los flavonoles durante el proceso de extracción del jugo. De acuerdo con el grado de abundancia, se pueden identificar tres grupos para todas las muestras. Estos pueden ser nombrados el grupo más abundante, el intermedio y el menos abundante (**Cuadro 16**).

El grupo más abundante incluyó isoramnetina-3-O-rutinósido, escopoletina, rutina, ácido asperulosídico, ácido rosmarínico y ácido deacetylasperulosídico, que fueron los primeros seis compuestos más abundantes en todas las muestras, solo que, en diferente orden de abundancia, como puede ser visto en el **Cuadro 16**. El grupo intermedio incluye ácido cafeoilquínico hexósido, quercetina-hexosa-desoxihexosa, dímero de procianidina tipo B, ácido sinápico, derivado de cumarina-II, ácido *p*-hidroxibenzoico y derivado de cumarina-I. Mientras que el grupo menos abundante incluye ácido ferúlico, quercetina-3-O-rutinósido-7-O-pentósido, quercetina, kaempferol-3-O-rutinósido y ácido *p*-cumárico.

Cuadro 15. Contenido de compuestos fenólicos e iridoides de bagazos con semilla (BCS), sin semilla (BSS) y jugo de noni (JN), analizados por UPLC-DAD-ESI-MS.^a

	Compuesto	BCS (µg/g bs)	BSS (µg/g bs)	JN (µg/g bs)
1	Ácido deacetilasperulosídico	58.04 ± 2.83 c	140.31 ± 4.9 b	294.79 ± 9.79 a
2	Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	17.69 ± 1.21 c	46.37 ± 1.10 b	86.57 ± 8.26 a
3	Dímero de procianidina tipo B	37.93 ± 1.53 c	54.09 ± 0.26 b	113.33 ± 1.61 a
4	Ácido asperulosídico	93.28 ± 0.23 c	193.31 ± 2.6 b	499.89 ± 27.61 a
5	Ácido cafeoilquínico hexósido	50.64 ± 3.78 c	83.27 ± 6.11 b	131.93 ± 4.37 a
6	Derivado de cumarina I	13.47 ± 0.49 c	44.83 ± 2.45 b	61.15 ± 0.58 a
7	Derivado de cumarina II	18.46 ± 0.01 c	44.24 ± 0.28 b	137.68 ± 8.66 a
8	Escopoletina	114.39 ± 7.12 c	186.31 ± 6.06 b	317.77 ± 7.95 a
9	Ácido <i>p</i> -cumárico	0.96 ± 0.08 c	5.91 ± 0.00 b	12.84 ± 0.63 a
10	Ácido ferúlico	13.12 ± 0.85 c	15.22 ± 0.13 b	25.08 ± 0.17 a
11	Ácido sinápico	23.39 ± 0.05 c	44.78 ± 0.04 b	71.82 ± 3.74 a
12	Quercetina-3- <i>O</i> -rutinósido-7- <i>O</i> -pentósido	9.77 ± 0.05 c	17.07 ± 0.14 b	40.03 ± 1.88 a
13	Quercetina-3- <i>O</i> -rutinósido (Rutina)	81.47 ± 3.51 c	126.58 ± 0.94 b	206.58 ± 3.66 a
14	Quercetina-hexosa-desoxihexosa	48.44 ± 1.41 c	72.67 ± 0.78 b	87.43 ± 0.69 a
15	Kaempferol-3- <i>O</i> -rutinósido	4.48 ± 0.37 c	18.05 ± 0.08 b	27.09 ± 0.17 a
16	Isoramnetina-3- <i>O</i> -rutinósido	149.61 ± 5.78 c	270.49 ± 3.11 b	342.85 ± 16.20 a
17	Ácido rosmarínico	62.02 ± 3.43 c	199.31 ± 5.01 b	530.75 ± 30.44 a
18	Quercetina	5.79 ± 0.23 b	11.68 ± 0.26 a	5.39 ± 0.11b

^a Los valores son presentados como media ± error estándar. Letras diferentes en cada renglón indican diferencias significativas entre muestras usando la prueba de LSD ($p < 0.05$). Compuestos 1, 4, 5 y 17 fueron cuantificados con ácido cafeico; 2 con *p*-hidroxibenzoico; 3 con catequina; 6,7 y 8 con escopoletina; 9 con ácido *p*-cumárico; 10 con ácido ferúlico; 11 con ácido sinápico; 12, 13 y 14 con rutina; 15 con kaempferol; 16 con isoramnetina y 18 con quercetina.

Cuadro 16. Orden de abundancia de los compuestos fenólicos e iridoides identificados en bagazos de noni con semilla (BCS), sin semilla (BSS) y jugo (JN) de noni (*Morinda citrifolia* L.), expresados en µg/g bs.

	BCS	Compuesto	BSS	Compuesto	JN	Compuesto
Orden abundancia						
1	149.61	Isoramnetina-3-O-rutinósido	270.49	Isoramnetina-3-O-rutinósido	530.75	Ácido rosmarínico
2	114.39	Escopoletina	199.31	Ácido rosmarínico	499.89	Ácido asperulosídico
3	93.28	Ácido asperulosídico	193.31	Ácido asperulosídico	342.85	Isoramnetina-3-O-rutinósido
4	81.47	Quercetina-3-O-rutinósido (Rutina)	186.31	Escopoletina	317.77	Escopoletina
5	62.02	Ácido rosmarínico	140.31	Ácido deacetilasperulosídico	294.79	Ácido deacetilasperulosídico
6	58.04	Ácido deacetilasperulosídico	126.58	Quercetina-3-O-rutinósido (Rutina)	206.58	Quercetina-3-O-rutinósido (Rutina)
7	50.64	Ácido cafeoilquínico hexósido	83.27	Ácido cafeoilquínico hexósido	137.68	Derivado de cumarina II
8	48.44	Quercetina-hexosa-dexosihexosa	72.67	Quercetina-hexosa-dexosihexosa	131.93	Ácido cafeoilquínico hexósido
9	37.93	Dímero de procianidina tipo B	54.09	Dímero de procianidina tipo B	113.33	Dímero de procianidina tipo B
10	23.39	Ácido sinápico	46.37	Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	87.43	Quercetina-hexosa-dexosihexosa
11	18.46	Derivado de cumarina II	44.83	Derivado de cumarina I	86.57	Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico
12	17.69	Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	44.78	Ácido sinápico	71.82	Ácido sinápico
13	13.47	Derivado de cumarina I	44.24	Derivado de cumarina II	61.15	Derivado de cumarina I
14	13.12	Ácido ferúlico	18.05	Kaempferol-3-O-rutinósido	40.03	Quercetina-3-O-rutinósido-7-O-pentosido
15	9.77	Quercetina-3-O-rutinósido-7-O-pentosido	17.07	Quercetina-3-O-rutinósido-7-O-pentosido	27.09	Kaempferol-3-O-rutinósido
16	5.79	Quercetina	15.22	Ácido ferúlico	25.08	Ácido ferúlico
17	4.48	Kaempferol-3-O-rutinósido	11.68	Quercetina	12.84	Ácido <i>p</i> -cumárico
18	0.96	Ácido <i>p</i> -cumárico	5.91	Ácido <i>p</i> -cumárico	5.39	Quercetina

Con respecto al grupo de los compuestos más abundantes, isoramnetina-3-O-rutinósido (Su y col 2005) y ácido rosmarínico (De Moraes y col 2016) se han identificado, pero no se han cuantificado en la fruta de noni. Este es el primer reporte de la cuantificación de estos compuestos en productos de noni. En el caso de isoramnetina-3-O-rutinósido, nuestros resultados en bagazo fueron aproximadamente 8 veces más altos que los reportados previamente por Sójka y col (2015) en bagazo de ciruela (0.36 mg/100 g bh), cuando se expresan de la misma manera.

El ácido rosmarínico mostró niveles similares en BSS y niveles 3 veces más bajos en BCS que los reportados para el bagazo de olivo (0.181 mg/g bs), cuando se expresaron de la misma manera (Morsi y col 2016). Por otro lado, se han identificado y cuantificado a la escopoletina, la rutina y los ácidos asperulosídico y deacetilasperulosídico, tanto en fruto como en jugo de noni. (Potterat y col 2007; Deng y col 2010; Dussosoy 2011; Yan y col 2018). Estos últimos cuatro compuestos son característicos de noni y cantidades importantes para todos ellos permanecieron en nuestro bagazo sin semilla (38-61%) (**Cuadro 16**).

La escopoletina es un compuesto fenólico poco común y se encuentra escasamente en las frutas, sin embargo, generalmente se encuentra en el fruto de noni (Deng y col 2010). No se han encontrado reportes de contenido de escopoletina en el bagazo de ninguna fruta. La concentración de escopoletina en el fruto de noni fresco según la literatura varía de 0.064 a 6.87 mg/g bs (Deng y col 2010), mientras que en nuestro bagazo fue de 0.11 y 0.19 mg/g bs para BCS y BSS, respectivamente. En el caso de la rutina, nuestro contenido en bagazo (81.5-126.6 µg/g bs) fue mayor que el reportado previamente para bagazo de manzana (50.7 µg/g bs) (Cerdeira-Tapia y col 2015). Tumbas-Šaponjac y col (2015) encontraron 4.89 mg/100 g bh de rutina en

bagazo de fresa que es 3 veces mayor que nuestros resultados cuando se expresan de la misma manera (1.44 y 1.51 mg/100 g bh para BCS y BSS, respectivamente). Por último, para este grupo, los iridoides: ácido asperulosídico y ácido deacetilasperulosídico que también se encuentran escasamente en las frutas, no se han reportado ni para el bagazo de noni ni para el bagazo de otras frutas. Nuestro bagazo mostró niveles entre 58.04 y 140.31 $\mu\text{g/g}$ bs para el ácido deacetilasperulosídico y 93.28-193.31 $\mu\text{g/g}$ bs para el ácido asperulosídico.

Con respecto al grupo intermedio, los contenidos de dímero de procianidina tipo B en nuestro bagazo fueron 37.9 y 54.09 $\mu\text{g/g}$ bs para BCS y BSS, respectivamente. Estos niveles se encuentran en el rango reportado para los bagazos de diferentes variedades de uva (González-Centeno y col 2013) cuyos datos oscilaron entre 35 y 170 $\mu\text{g/g}$ bs. El dímero de procianidina tipo B se ha descrito comúnmente como un compuesto fenólico importante en los bagazos de uva (González-Centeno y col 2013). En nuestro estudio, el ácido cafeolquínico-hexósido presentó 50.64 y 83.27 $\mu\text{g/g}$ bs para BCS y BSS, respectivamente.

Esta es la primera vez que se reporta la identificación y cuantificación del dímero de procianidina tipo B y del ácido cafeolquínico-hexósido tanto para el jugo de noni como para el bagazo de noni. Sobre el grupo menos abundante y como se mencionó anteriormente, en la mayoría de los casos, el contenido de compuestos fenólicos en ambos tipos de bagazo fue menor que el del jugo de noni, excepto para la quercetina. BSS mostró el contenido más alto de quercetina (11.7 $\mu\text{g/g}$ bs) mientras que no se encontraron diferencias significativas entre BCS (5.79 $\mu\text{g/g}$ bs) y jugo de noni (5.39 $\mu\text{g/g}$ bs) ($p < 0.05$). La mala lixiviación de la quercetina desde el pericarpio de noni hacia el jugo puede deberse a la baja solubilidad acuosa de la quercetina (Darband y col

2018). Nuestro contenido de quercetina en BSS fue similar al encontrado anteriormente en un bagazo de un cultivar de fresa (12.2 $\mu\text{g/g}$ bs) (Tumbas-Šaponjac y col 2015). Sin embargo, fue mayor que lo reportado para el bagazo de manzana (10.31 $\mu\text{g/g}$ bs) (Cerde-Tapia y col 2015). En el caso del kaempferol-3-O-rutinósido, nuestros resultados en bagazo variaron de 1.5 a 4.5 veces más bajos que los reportados anteriormente para bagazo de ciruela (0.32 mg /100 g bh), cuando se expresa de la misma manera (Sójka y col 2015). Por otro lado, nuestro bagazo mostró niveles entre 9.77 y 17.07 $\mu\text{g/g}$ bs para la quercetina-3-O-rutinósido-7-O-pentósido. Girones y col (2014) encontraron en frutos de noni, 0.86 mg/100 g bs de quercetina-3-O-rutinósido-7-O-pentósido, cuyos valores fueron similares a nuestros resultados cuando se expresaron de la misma manera.

E. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

La elección del método de ensayo de capacidad antioxidante, se basa a menudo en la velocidad, la simplicidad, la facilidad de uso y la disponibilidad de instrumentación (Ky y col 2015). En general, las mediciones de antioxidantes pueden relacionarse con la capacidad de los extractos para transferir electrones a un radical (DPPH, ABTS o FRAP), o involucra la transferencia de átomos de hidrógeno (ORAC) (Fu y col 2011). Por lo tanto, la capacidad antioxidante de cada extracto no se puede determinar por un solo método. Es necesario realizar más de un tipo de medición para tener en cuenta los distintos modos de acción de los antioxidantes (Ky y col 2015). En ese contexto, en este trabajo el potencial de captación de radicales libres fue evaluado por tres pruebas espectrofotométricas: DPPH, ABTS y FRAP. Una prueba espectrofluorimétrica: ORAC y una prueba de la capacidad inhibitoria de la hemólisis inducida por el generador de radicales peroxilo AAPH en los eritrocitos humanos.

1. Método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo).

En el **Cuadro 17** se presentan los resultados obtenidos para el ensayo de inhibición del radical DPPH para extractos hidrofílicos (EHF) y extractos lipofílicos (ELF) expresados en $\mu\text{moles ET/g bs}$. En los EHF, JN tuvo la mayor inhibición del radical ($p < 0.05$), mientras que no se presentaron diferencias significativas entre los bagazos. En cuanto a los ELF no se presentaron diferencias significativas entre muestras. Los EHF presentaron una CAO superior a los ELF en todas las metodologías de CAO evaluadas. De manera particular, por el método de DPPH, los EHF aportaron del 88 al 97% de la CAO total, lo cual concuerda con lo observado por Corral-Aguayo y col (2008). La CAO de los EHF por el método DPPH representó el 58 y 68% para BCS y BSS, respectivamente, con respecto a la CAO en el jugo.

La capacidad de inhibición del radical DPPH de los EHF se relacionó con el contenido de FT. JN que tuvo el mayor contenido de FT también fue el mayor inhibidor del radical DPPH, mientras que los dos tipos de bagazos no presentaron diferencia significativa en ambos ensayos. Diversos autores han establecido esta relación, tales como Ky y col (2014) quienes observaron que los extractos de bagazo de uva con mayor capacidad antioxidante fueron aquellos que presentaron los valores más altos de compuestos fenólicos totales, proantocianidinas y antocianinas. Dussosoy y col (2011) atribuyeron la capacidad antioxidante del jugo de noni a los compuestos fenólicos y ácido ascórbico presentes en el.

Los niveles de CAO por el método DPPH fueron más altos para BSS y similares a BCS que los reportados para fruto de noni ($37.1 \mu\text{moles ET/g bs}$) por Gironés-Vilaplana y col (2014). Esparza-Martínez y col (2016) reportaron un valor de DPPH de $161.04 \mu\text{moles ET/g bs}$ en extractos hidrofílicos de bagazo de mandarina (albedo, flavedo,

Cuadro 17. Capacidad antioxidante por el método DPPH en EHF y ELF de bagazo con semilla (BCS), bagazo sin semilla (BSS) y jugo (JN) de noni (*Morinda citrifolia* L.)

	DPPH EHF	DPPH ELF
Derivado del		
fruto de noni	µmoles ET/g bs	µmoles ET/g bs
BCS	36.53 ± 3.00 ^b	2.54±0.42 ^a
BSS	42.90 ± 8.02 ^b	2.22±0.41 ^a
JN	63.54 ± 18.65 ^a	1.97±0.46 ^a

EHF: Extracto hidrofílico, ELF: Extracto lipofílico.

Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa ($\alpha=0.05$). LSD = 18.9 µmoles ET/g bs para EHF y LSD = 0.69 µmoles ET/g bs para ELF en base seca. bs=base seca. Media de 3 repeticiones ± DE.

residuos de pulpa y membranas carpelares) lo cual es 3.7 y 4 veces mayor que nuestros resultados en BSS y BCS, respectivamente. Ben-Aziz y col (2019) reportaron un valor de 120 μ moles ET/g bs para CAO por el método DPPH en extracto de cáscara de bagazo de uva Cabernet Sauvignon, generado a partir del proceso de elaboración del vino rojo, lo cual es 2.7 a 3.2 veces mayor que nuestros valores en BSS y BCS, respectivamente.

2. Método ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazoliana-6-sulfónico)

En el **Cuadro 18** se presentan los resultados obtenidos para el ensayo ABTS para extractos hidrofílicos (EHF) y extractos lipofílicos (ELF) expresados en μ moles ET/g bs. En los EHF, se presentaron diferencias significativas entre todas las muestras ($p < 0.05$). JN exhibió la mayor capacidad antioxidante (146.74 μ moles ET/g bs) seguido de BSS y BCS, con 86.13 y 56.37 μ moles ET/g bs, respectivamente.

En cuanto a los ELF los dos tipos de bagazos presentaron la mayor capacidad antioxidante, sin diferencia significativa entre ellos (3.03 y 2.76 μ moles ET/g bs para BCS y BSS, respectivamente). La CAO de los EHF por el método ABTS representó el 38 y 59% para BCS y BSS, respectivamente, con respecto a la CAO en el jugo. Los EHF presentaron una CAO superior a los ELF, aportando del 95 al 99% de la CAO total por el método ABTS, lo cual concuerda con lo reportado por Corral-Aguayo y col (2008).

Por lo tanto, nuestros resultados indican que la mayor parte de los antioxidantes en los bagazos y jugo de noni responsables de la reducción de oxidantes por el método de ABTS se distribuyeron en los extractos hidrofílicos, en vez de los lipofílicos, similar a lo reportado por Corral-Aguayo y col (2008) para pulpa de diversos frutos (como

Cuadro 18. Capacidad antioxidante por el método ABTS en EHF y ELF de bagazo con semilla (BCS), bagazo sin semilla (BSS) y jugo (JN) de noni (*Morinda citrifolia* L.).

	ABTS EHF	ABTS ELF
Derivado del		
fruto de noni	µmoles ET/g bs	µmoles ET/g bs
BCS	56.37 ± 16.31 ^c	3.03 ± 0.65 ^a
BSS	86.13 ± 6.35 ^b	2.76 ± 0.55 ^a
JN	146.74 ± 17.17 ^a	1.18 ± 0.43 ^b

EHF: Extracto hidrofílico, ELF: Extracto lipofílico.

Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa ($\alpha=0.05$). LSD = 22.65 µmoles ET/g bs para EHF y LSD = 0.88 µmoles ET/g bs para ELF en base seca. bs=base seca. Media de 3 repeticiones ± DE.

guayaba cv. Media China, fresa cv. Sweet Charlie, mango cv. Ataulfo y papaya cv. Maradol. Esto último difiere con lo que sucedió con la pulpa de diferentes variedades de uva donde la mayor parte de los antioxidantes (compuestos fenólicos) se distribuyó en las fracciones lipofílicas (Liu y col 2018). Esta diferencia puede deberse a la polaridad de los solventes utilizados para extraer los fitoquímicos, ya que para obtener las fracciones lipofílicas estos autores utilizaron tetrahidrofurano, cuya débil polaridad hizo a las membranas celulares de la uva más permeables y más fáciles de disolver haciendo posible una mayor liberación de compuestos fenólicos.

La capacidad de inhibición del radical ABTS de los EHF se relacionó con el contenido de FL. JN que tuvo el mayor contenido de FT también fue el mayor inhibidor del radical ABTS, seguido por BSS y BCS en ambos ensayos. Como se mencionó anteriormente, esta relación ha sido establecida por diversos autores entre ellos Ky y col (2014) en bagazo de uva. Pero a diferencia del presente estudio, donde el bagazo que contenía semilla (BCS) fue el que presentó la menor CAO, Ky y col (2014) observaron que la actividad antioxidante en los extractos de bagazo de semilla de uva fue mayor que aquella de los extractos de bagazo de cáscara de uva.

Por otra parte, la capacidad antioxidante obtenida por el método ABTS fue más alta que los resultados obtenidos por el método DPPH, lo cual concuerda con lo reportado por Hua y col (2018) para residuos de pulpa, semillas y jugo de mandarina. Este fenómeno es causado por los diferentes mecanismos de reacción en que se basan estos dos métodos. En general, el método DPPH proporciona valores más bajos relacionados con trolox que el método ABTS debido a una mayor estabilidad (y por lo tanto una menor reactividad) del radical DPPH (Marecek y col 2017). La ventaja del radical ABTS es su alta reactividad, y por lo tanto es más probable que reaccione con

una gama más amplia de antioxidantes. Por otro lado, la preparación del reactivo ABTS es más difícil y su estabilidad es más baja en comparación con el DPPH (Marecek y col 2017).

Los niveles de CAO por el método ABTS reportados para fruto de noni (90.4 μ moles ET/g bs) por Girones y col (2014) fueron similares a los valores de CAO de los EHF para BSS, pero superiores a los de BCS. Por otra parte, Ben-Aziz y col (2019) reportaron un valor de 310 μ moles ET/g bs para CAO por el método ABTS en extracto de cáscara de bagazo de uva Cabernet Sauvignon, generado a partir del proceso de elaboración del vino rojo, lo cual es 5.5 a 3.5 veces más que nuestros valores en BSS y BCS, respectivamente.

En cuanto a los ELF, cuya CAO fue de orden relativamente bajo, puede notarse que ambos tipos de bagazos tuvieron valores de CAO significativamente mayores que JN. Esto coincide con sus contenidos de β -caroteno y luteína que resultaron más elevados en BCS y BSS que en JN.

3. Método FRAP (poder antioxidante reductor del hierro)

En el **Cuadro 19** se presentan los resultados obtenidos para el ensayo FRAP para extractos hidrofílicos (EHF) y extractos lipofílicos (ELF) expresados en μ moles ET/g bs. Se observó la misma tendencia que en el método DPPH. En los EHF, JN presentó la mayor capacidad antioxidante ($p < 0.05$), mientras que no se presentaron diferencias significativas entre los bagazos. La CAO de los EHF por el método FRAP representó aproximadamente el 58% en los bagazos con respecto a la CAO en el jugo. En cuanto a los ELF no se presentaron diferencias significativas entre muestras. Los EHF presentaron una CAO superior a los ELF, aportando del 86 al 96% de la CAO total por el método FRAP.

Cuadro 19. Capacidad antioxidante por el método de FRAP en EHF y ELF de bagazo con semilla (BCS), bagazo sin semilla (BSS) y jugo (JN) de noni (*Morinda citrifolia* L.).

	FRAP EHF	FRAP ELF
Derivado del		
fruto de noni	µmoles ET/g bs	µmoles ET/g bs
BCS	34.64 ± 4.60 ^b	3.30 ± 0.48 ^a
BSS	38.72 ± 5.89 ^b	2.80 ± 0.36 ^a
JUGO	65.53 ± 13.24 ^a	2.51 ± 0.75 ^a

EHF: Extracto hidrofílico, ELF: Extracto lipofílico.

Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa ($\alpha=0.05$). LSD = 14.04 µmoles ET/g bs para EHF y LSD = 0.89 µmoles ET/g bs para ELF en base seca. bs=base seca. Media de 3 repeticiones ± DE.

Los resultados indicaron que la mayor parte de los antioxidantes en los bagazos y jugo de noni responsables de la reducción de oxidantes por el método de FRAP, se distribuyeron en los extractos hidrofílicos en vez de los lipofílicos, a diferencia de lo que sucedió con la pulpa de uva donde la mayor parte de los antioxidantes se distribuyó en las fracciones lipofílicas (Liu y col 2018).

Corral-Aguayo y col (2008) evaluaron la capacidad antioxidante por el método FRAP en pulpa de diversos frutos (como guayaba cv. Media China, fresa cv. Sweet Charlie, mango cv. Ataulfo y papaya cv. Maradol), encontrando resultados aceptables en los extractos hidrofílicos, sin embargo, este método no mostró CAO en los extractos lipofílicos en ninguno de los frutos evaluados.

Los niveles de CAO por el método FRAP reportados para fruto de noni (69.2 μ moles ET/g bs) por Gironés-Vilaplana y col (2014) fueron aproximadamente 2 veces más altos que en nuestros bagazos. En un estudio realizado por Esparza-Martínez y col (2016) reportaron un valor de FRAP de 81.91 μ moles ET/g bs en extractos hidrofílicos de bagazo de mandarina (albedo, flavedo, residuos de pulpa y membranas carpelares) lo cual es aproximadamente 2 veces mayor que nuestros resultados en bagazo.

4. Método ORAC (capacidad de absorción de radicales de oxígeno)

En el **Cuadro 20** se presentan los resultados obtenidos para el ensayo ORAC para extractos hidrofílicos (EHF) expresados en μ moles ET/g bs. Se presentaron diferencias significativas entre todas las muestras estudiadas ($p < 0.05$). JN exhibió la mayor CAO (246.80 μ moles ET/g bs) seguido de BSS y BCS, con 176.34 y 107.8 μ moles ET/g bs,

Cuadro 20. Capacidad antioxidante por el método de ORAC en EHF de bagazo con semilla (BCS), bagazo sin semilla (BSS) y jugo (JN) de noni (*Morinda citrifolia* L.).

ORAC EHF	
Derivado del fruto de noni	µmoles ET/g bs
BCS	107.80 ± 1.36 ^c
BSS	176.34 ± 5.89 ^b
JN	246.80 ± 17.87 ^a

EHF: Extracto hidrofílico, ELF: Extracto lipofílico.

Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa ($\alpha=0.05$). LSD = 21.76 µmoles ET/g bs para EHF en base seca. bs=base seca. Media de 3 repeticiones ± DE.

respectivamente. La CAO por el método ORAC representó el 44 y 71% para BCS y BSS, respectivamente, con respecto a la CAO en el jugo.

Los niveles de CAO por el método ORAC en los bagazos fueron aproximadamente de 2 a 3 veces más altos que los reportados previamente para fruto de noni maduro (8 μ moles ET/g bh) por Chan-Blanco y col (2007), cuando se expresan en la misma manera (19.10 y 21.0 μ moles ET/g bh para BCS y BSS, respectivamente). Por otro lado, los niveles de CAO por el método ORAC reportados para fruto de noni (150.8 μ moles ET/g bs) por Girones y col (2014) fueron más bajos que los de BSS, pero más altos que los de BCS. En un estudio realizado por Esparza-Martínez y col (2016) en bagazo de mandarina reportaron un valor de 216.83 μ moles ET/g bs para CAO por el método ORAC lo cual es 1.5 a 2.4 veces más que nuestros valores en BSS y BCS, respectivamente.

Cabe señalar, que los EHF de BCS tuvieron la más baja CAO en estas 4 metodologías evaluadas (DPPH, ABTS, FRAP Y ORAC) probablemente como resultado de su más bajo contenido en FL en comparación con las otras muestras.

5. Capacidad de inhibición de la hemólisis eritrocitaria inducida por AAPH

En el **Cuadro 21** se presentan los resultados de la capacidad de inhibición de la hemólisis eritrocitaria. Los eritrocitos humanos son muy susceptibles al daño oxidativo debido a que contienen ácidos grasos poliinsaturados en su membrana y altas concentraciones de hemoglobina y oxígeno (Pannangpetch y col 2007; Wang y col 2017) Aunado a esto, el exceso de radicales libres puede aumentar esta susceptibilidad. En el presente estudio, usamos el dihidrocloruro de 2,2-azobis (2-metil- amidinopropano), AAPH como un generador de radicales peroxilo para inducir

Cuadro 21. Capacidad de inhibición de la hemólisis eritrocitaria inducida por dihidrocloruro de 2,2-azobis (2-metil- amidinopropano) (AAPH, 200 mM) de bagazo con semilla (BCS), bagazo sin semilla (BSS) y jugo (JN) de noni (*Morinda citrifolia* L.).

	Concentración de extracto (mg/mL)	% inhibición de hemólisis eritrocitaria
Trolox	0.5	96.33 ± 0.25 ^a
Ácido ascórbico	0.5	92.20 ± 2.38 ^{ab}
BCS	18	47.70 ± 8.71 ^e
	32	90.10 ± 1.71 ^b
	62	92.34 ± 2.02 ^a
BSS	18	76.83 ± 3.09 ^d
	32	94.36 ± 1.40 ^a
	62	94.57 ± 1.64 ^a
JN	18	85.66 ± 3.27 ^c
	32	93.94 ± 1.80 ^a
	62	94.04 ± 1.09 ^a

Letras diferentes indican diferencia estadística significativa entre las medias.

Media de 3 repeticiones ± desviación estándar (LSD, $\alpha=0.05$).

la hemólisis en eritrocitos humanos. Este modelo biológico es actualmente utilizado para evaluar los efectos de antioxidantes de origen natural (García- Becerra y col 2016; Wang y col 2017).

Se utilizaron trolox y ácido ascórbico como antioxidantes control, los cuales produjeron un alto porcentaje de inhibición de la hemólisis a concentraciones bajas (0.5 mg/mL). Cuando los eritrocitos fueron tratados con las muestras y sin AAPH (Control negativo), los eritrocitos permanecieron estables mostrando que las muestras por sí mismas no inducen hemólisis sobre ellos (Datos no mostrados).

Todas las muestras presentaron inhibición a las concentraciones usadas (18, 32 y 62 mg/mL). A la concentración de 62 mg/mL, todas las muestras presentaron un elevado porcentaje de inhibición de la hemólisis comparable con la presentada por los antioxidantes control ($p < 0.05$). Sin embargo, a la concentración de 32 mg/mL, BCS presentó una inhibición significativamente más baja que BSS y JN. Entre bagazos, BSS resultó significativamente más eficaz en inhibir la hemólisis ya que a la concentración más baja utilizada (18 mg/mL) tuvo un 76.83% de inhibición frente a un 47.70% de BCS. Cabe señalar, BSS exhibió consistentemente los más altos valores de FP y flavonoides entre bagazos, así como también presentó los niveles más altos de β -caroteno and luteína entre todas las muestras.

García-Becerra y col (2016) realizaron estudios de inhibición de hemólisis en dos tipos de extractos metanólicos de bagazo de uva mexicana. Los efectos antioxidantes fueron dosis-dependiente y obtuvieron mejores resultados en la inhibición de hemólisis eritrocitaria con los extractos obtenidos por maceración que alcanzaron valores desde 85 a 95%, mientras que los obtenidos mediante soxhlet se incrementaron de 30 a 85%

para las dosis de 0.1 y 100 µg/mL, respectivamente, atribuyendo estos resultados al mayor contenido de compuestos fenólicos presentes en los extractos por maceración.

Se ha demostrado que los compuestos fenólicos se pueden incorporar en la parte externa (hidrofílica) de la membrana de los eritrocitos, por lo que podrían ejercer su acción antioxidante en esta región, pero no ejercerían influencia en la región de cadenas de hidrocarburo (parte hidrofóbica) (Bonarska-Kujawa y col 2011). Por su parte, Meshkini (2015) sugiere que los compuestos fenólicos preservan la membrana celular a través de su inserción en ella, protegiéndola de condiciones de estrés químico y fisiológico. Por otra parte, Chisté y col (2014) señalan que cuando compuestos antioxidantes como los carotenoides están presentes para eliminar los ROO• y los convierten en especies no reactivas, la hemólisis puede ser inhibida.

Gupta y Singh (2013) atribuyeron el efecto antioxidante en jugo de noni en parte a la presencia de compuestos de diferente polaridad tales como polifenoles solubles en lípidos, antraquinonas, α-tocoferol y β-caroteno, entre otros. Por otra parte, Dussossoy y col (2011) atribuyeron la actividad antioxidante en jugo de noni a los compuestos fenólicos y el ácido ascórbico presentes en el.

VIII CONCLUSIONES

Ambos tipos de bagazo de noni (BCS y BSS) son fuentes ricas en fibra dietaria, equivalentes de retinol (como β -caroteno), ácido ascórbico y manganeso, y una porción de 10 g de materia seca proporciona niveles adecuados (más del 10%) de estos componentes, de acuerdo con la respectiva ingesta dietética de referencia.

El bagazo con semillas es una fuente rica de fibra dietaria insoluble, y ambos tipos de bagazo permanecieron con contenidos importantes de fenólicos libres cuyos niveles fueron más altos que en algunas frutas frescas.

Dieciséis compuestos fenólicos individuales y dos iridoides se reportan por primera vez en el bagazo de noni, tres de ellos (dímero de procianidina tipo B, ácido cafeoilquínico-hexósido y quercetina-hexosa-desoxihexosa) no han sido reportados previamente ni en bagazo de noni ni en jugo ni en fruto de noni.

Ambos tipos de bagazo presentaron actividad antioxidante en todas las metodologías evaluadas, siendo la CAO del bagazo sin semilla superior a la CAO de bagazo con semilla en todos los métodos evaluados (DPPH, ABTS, FRAP, ORAC e inhibición de la hemólisis). El bagazo sin semilla exhibió consistentemente los valores más altos de fenólicos libres, flavonoides totales, β -caroteno y de luteína.

Ambos bagazos son fuentes potenciales de compuestos fitoquímicos con capacidad antioxidante para las industrias alimentaria y farmacéutica.

IX BIBLIOGRAFÍA

AACC. 2001. The definition of dietary fiber. Report of the dietary fiber definition committee to the board of directors of the American Association of Cereal Chemist. Cereal Foods World. 46, (3):112-126. Disponible de:

<https://www.aaccnet.org/initiatives/definitions/Documents/DietaryFiber/DFDef.pdf>. Consultado el 20 de enero de 2018.

Abián J, Carrascal M, Gay M. 2008. Introducción a la espectrometría de masas para la caracterización de péptidos y proteínas en proteómica. Proteómica 2:16-64.

Abu-Reidah IM, Gil-Izquierdo A, Medina S, Ferrere F. 2017. Phenolic composition profiling of different edible parts and by-products of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) by using HPLC-DAD-ESI/MSⁿ. Food Research International 100:494-500.

Aaby K, Ekeberg D, Skrede G. 2007. Characterization of phenolic compounds in strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruits by different HPLC detectors and contribution of individual compounds to total antioxidant capacity. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55(11): 4395-4406

Acosta-Estrada BA, Gutiérrez-Urbe JA, Serna-Saldívar SO. 2014. Bound phenolics in foods, a review. Food Chemistry 152:46-55.

Alam MN, Bristi NJ, Rafiquzzaman M. 2013. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. Saudi Pharmaceutical Journal 21:143-152.

Amakura Y, Okada M, Tsuji S, Tonogai Y. 2000. Determination of phenolic acids in fruit juices by isocratic column liquid chromatography. Journal of Chromatography A 891(1):183-188.

- Aman A, Moin S, Owais M, Sissiqui MU. 2013. Antioxidant activity of thymol: protective role in AAPH-induced hemolysis in diabetic erythrocytes. *International Journal of Pharmaceutical Science Invention* 2:55-60.
- Amaya-Cruz DM, Rodríguez-González S, Pérez-Ramírez IF, Loarca-Piña G, Amaya-Llano S, Gallegos-Corona MA, Reynoso-Camacho R. 2015. Juice by-products as a source of dietary fibre and antioxidants and their effect on hepatic steatosis. *Journal of Functional Foods* 17:93-102.
- Andrés-La-Cueva C, Medina-Remon A, Llorach R, Urpi-Sarda M, Khan N, Chiva-Blanch G, Zamora-Ros R, Rotches-Ribalta M, Lamuela-Raventós RM. 2010. Phenolic compounds: Chemistry and occurrence in fruits and vegetables. En de la Rosa LA, Alvarez-Parrilla E, González-Aguilar GA. Editors. *Fruit and vegetable phytochemicals: Chemistry, nutritional value and stability*. 1ª ed. Ames, Iowa: Blackwell-Publishing. p 66-80.
- Apak R, Özyürek M, Güçlü K, Çapanoğlu, E. 2016. Antioxidant activity/capacity measurement. 2. Hydrogen atom transfer (HAT)-based, mixed-mode (electron transfer (ET)/HAT), and lipid peroxidation assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 64:1028-1045.
- Aregheore EM. 2005. Evaluation and utilization of Noni (*Morinda citrifolia*) juice extract waste in complete diets for goats. *Livestock Research for Rural Development*, Vol. 17, No. 4. Disponible de : <http://www.utaoundation.org/lrrd1704/areg17039.htm>. Consultado el 15 de noviembre de 2015.
- Arruda HS, Pereira GA, de Moraes DR, Eberlin MN, Pastore GM. 2018. Determination of free, esterified, glycosylated and insoluble-bound phenolics composition in

the edible part or araticum fruit (*Annona crassiflora* Mart.) and its by-products by HPLC-ESI-MS/MS. Food Chemistry 245:738-749.

AOAC. 2012. Official Methods of Analysis, Association of Official Analytical Chemists (pp. 934.06), Washington, D.C. Official Method.

American Optometric Association. Lutein and zeaxanthin. Disponible de: <https://www.aoa.org/patients-and-public/caring-for-your-vision/diet-and-nutrition/lutein>. Consultado el 1 de abril de 2019.

Assi RA, Darwis Y, Abdulbaqi IM, Khan AA, Vuanghao L, Laghari MH. 2017. *Morinda citrifolia* (Noni): A comprehensive review on its industrial uses, pharmacological activities, and clinical trials. Arabian Journal of Chemistry 10:691-707.

Barbosa-Costa A, Marcito-Campos de Oliveira A, De Oliveira e Silva AM, Mancini-Filho J, De Lima A. 2013. Atividade antioxidante da polpa, casca e sementes do não (*Morinda citrifolia* Linn). Revista Brasileira de Fruticultura 35(2):345-354.

Ben-Aziz M, Garcia F, Mouls L, Fulcrand H, Hajjaj H. 2019. Proanthocyanidins and anthocyanins contents, chromatic and antioxidant properties of red grape pomaces from morocco. Journal of Food Measurement and Characterization 1-11, <https://doi.org/10.1007/s11694-019-00126-3>.

Beckman CH. 2000. Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt diseases resistance and in general defence responses in plants. Physiology Molecular Plant Pathology. 57(3):101–110.

Benzie FF, Strain JJ. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. Analytical Biochemistry 239:70-76.

Bergantin C, Maietti A, Cavazzini A, Pasti L, Tedeschi P, Brandolini V, Marchetti N. 2017. Bioaccessibility and HPLC-MS/MS chemical characterization of phenolic

- antioxidants in red chicory (*Cichorium intybus*). Journal of Functional Foods 33:94-102.
- Bonarska-Kujawa D, Pruchnik H, Oszmianski J, Sarapuk J, Kleszczynska H. 2011. Changes caused by fruit extracts in the lipid phase of biological and model membranes. Food Biophysics 6:58-67.
- Brand-Williams W, Cuvellier ME, Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT Science and Technology 28(1):25-30.
- Cárdenas-Coronel, WG, Carrillo-López A, Vélez de la Rocha R, Labavitch JM, Báez-Sañudo MA, Heredia JB, Zazueta-Morales JJ, Vega-García MO, Sañudo-Barajas JA. 2016. Biochemistry and cell wall changes associated with noni (*Morinda citrifolia* L.) fruit ripening. Journal of Agricultural and Food Chemistry 64:302-309.
- Carrillo-López A. 2011. Noni (*Morinda citrifolia* L.). En: Yahia EM. Postharvest biology and technology of tropical and subtropical fruits. Vol. 4. Cambridge, UK: Woodhea Publishing. p 51-62.
- Carocho M, Ferreira ICFR. 2013. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. Food and Chemical Toxicology 51:15-25.
- Cerda-Tapia A, Pérez-Chabela ML, Pérez-Alvarez JA, Fernández-López J, Viuda-Martos M. 2015. Valorization of pomace poder obtained from native mexican apple (*Malus domestica* var. *rayada*): Chemical, techno-functional and antioxidant properties. Plant Foods for Human Nutrition 70:310-316.

- Chan-Blanco Y, Vaillant F, Pérez AM, Reynes M, Brillouet JM, Brat P. 2006. The noni fruit (*Morinda citrifolia* L.): A review of agricultural research, nutritional and therapeutic properties. *Journal of Food Composition and Analysis* 19:645-654.
- Chan-Blanco Y, Vaillant F, Pérez AM, Belleville MP, Zuñiga C, Brat P. 2007. The ripening and aging of noni fruits (*Morinda citrifolia* L): microbiological flora and antioxidant compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87:1710-1716.
- Cheng Z, Moore J, Yu L. 2006. High-throughput relative DPPH radical scavenging capacity assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54:7429-7436.
- Chunhieng T, Hay L y Montet D. 2005. Detailed study of the juice composition of noni (*Morinda citrifolia*) fruits from Cambodia. *Fruits* 60:13-24.
- [Codex Alimentarius Commission (CAC)]. 2006. Report of the 27th Session of the Committee on Nutrition and Foods for Special Dietary Uses, Bonn, Germany, 21-25 November 2005. ALINORM 06/29/26.
- [Codex Alimentarius] Comisión del Codex Alimentarius. 2013. Propuestas de elaboración de nuevas normas y textos afines y de interrupción de trabajos. Roma, Italia: FAO/OMS. Disponible de: ftp://ftp.fao.org/codex/Meetings/cac/cac36/cac36_09s.pdf. Consultado el 05 de Septiembre de 2016.
- Craft BD, Kerrihard AL, Amarowicz R, Pegg RB. 2012. Phenol-based antioxidants and the in vitro methods used for their assessment. *Comprehensive reviews in food science and food safety* 11:148-173.
- Crozier A, Jaganath IB, Clifford MN. 2006. Phenols, Polyphenols and Tanins: An Overview. En: Crozier A, Clifford MN y Ashihara H. *Plant Secondary Metabolites:*

- Occurrence, Structure and Role in the Human Diet. Blackwell Publishing Ltd. p 1-24.
- Crupi P, Preedy VR, Antonacci D. 2012. HPLC-DAD-MS (ESI+) Determination of carotenoids in fruit: En Preedy VR editor. Vitamin A: chemistry, analysis, function and effects. Cambridge, United Kingdom: RSC Publishing. p 282-300.
- Darband SG, Kavianiz M, Yousefi B, Sadighparvars S, Pakdels FG, Attari JA, Mohebbi I, Naderi S, Majidinia M. 2018. Quercetin: A functional dietary flavonoid with potential chemo-preventive properties in colorectal cancer. *Journal of Cellular Physiology* 233:6544-6560.
- Dawidowicz AL, Wianowska D, Olszowy M. 2012. On practical problems in estimation of antioxidant activity of compounds by method (Problems in estimation of antioxidant activity. *Food Chemistry* 131:1037-1043.
- de Camargo AC, Regitano-d'Arce MAB, Biasoto ACT, Shahidi F. 2014. Low molecular weight phenolics of grape juice and winemaking byproducts: antioxidant activities and inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein cholesterol and DNA strand breakage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62: 12159-12171.
- de la Rosa LA, Moreno-Escamilla JO, Rodrigo-García J. Alvarez-Parrilla. 2019. Phenolic compounds. En Yahia EM, Carrillo-López A, editores. *Postharvest physiology and biochemistry of fruit and vegetables* 1^a ed. Cambridge, Massachusetts: Woodhead Publishing. p 253-272.
- de Moraes GP, Oliveira-Barros de Alencar MV, Islam MT, da Silva-Araujo L, Vieira-Gomes DC, Mendes de Carvalho R, Corrêa D, Jardim-Paz MFC, Pinheiro-Ferreira PM, de Carvalho-Melo-Cavalcante AA, Ferraz A, Grivicich I,

- Nascimento-Picada J. 2016. Toxicogenetic profile of rats treated with aqueous extract from *Morinda citrifolia* fruits. *Journal of Medicinal Plant Research* 10(2):18-28.
- Deng S, West BJ, Jensen CJ. 2010. A quantitative comparison of phytochemical components in global noni fruits and their commercial products. *Food Chemistry* 122:267-270.
- Deng S, West BJ, Palu AK, Jensen CJ. 2011. Determination and comparative analysis of major iridoids in different parts and cultivation sources of *Morinda citrifolia*. *Phytochemical Analysis* 22:26-30.
- Delgado-Nieblas CI, Zazueta-Morales JJ, Ahumada-Aguilar JA, Aguilar-Palazuelos E, Carrillo-López A, Jacobo-Valenzuela N, Telis-Romero J. 2017. Optimization of fan air-drying process to obtain a dehydrated naranjita (*Citrus mitis* B.) pomace product with high bioactive compounds and antioxidant capacity. *Journal of Food Process Engineering* 40:e12338.
- Domínguez-Perles R, Moreno DA, García-Viguera C. 2018. Waking up from four decades' long dream of valorizing agro-food byproducts: toward practical applications of the gained knowledge. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66:3069-3073.
- Douglas DJ, Frank AJ, Mao D. 2005. Linear ion traps in mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*. 24:1-29.
- Dorta E, González M, Lobo MG, Sánchez-Moreno C, de Ancos B. 2014. Screening of phenolic compounds in by-product extracts from mangoes (*Mangifera indica* L.) by HPLC-ESI-QTOF-MS and multivariate analysis for use as a food ingredient. *Food research international*, 57:51-60.

- Dürüst N, Sumengen D, Dürüst Y. 1997. Ascorbic acid and element contents of foods of Trabzon (Turkey). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45:2085-2087.
- Durán M, Montero P, Marrugo Y. 2013. Extractos metanólicos de corteza de guayaba (*Psidium guajava* L.) y mango (*Mangifera indica* L.): efecto citotóxico, antihemolítico y en la morfología de membrana de eritrocitos. *Revista U.D.C.A. Actualidad & Divulgación Científica* 16(2):327-334.
- Dussossoy E, Brat P, Bony E, Boudard F, Poucheret P, Mertz C, Giaimis J, Michel A. 2011. Characterization, anti-oxidative and anti-inflammatory effects of Costa Rican noni juice (*Morinda citrifolia* L.). *Journal of Ethnopharmacology* 133:108-115.
- Dussossoy E, Bichon F, Bony E, Portet K, Brat P, Vaillant F, Michel A, Poucheret P. 2016. Pulmonary anti-inflammatory effects and spasmolytic properties of Costa Rica noni juice (*Morinda citrifolia* L.). *Journal of Ethnopharmacology*. 192:264-272.
- Engida AM, Faika S, Nguyen-Thi BT, Ju YH. 2015. Analysis of major antioxidants from extracts of *Myrmecodia pendans* by UV/visible spectrophotometer, liquid chromatography/tandem mass spectrometry, and high-performance liquid chromatography/UV techniques. *Journal of Food and Drug Analysis* 23:303-309.
- El-Aneed A, Cohen A, Banoub J. 2009. Mass spectrometry, review of the basics: electrospray, MALDI, and commonly used mass analyzers. *Applied Spectroscopy Reviews* 44(3):210-230.
- European Commission 2003. Commission decision of 5 June 2003 authorising the placing in the market of noni juice (juice of the fruit of *Morinda citrifolia* L.) as a novel food ingredient under regulation (EC) No 258/97 of the European

Parliament and of the council. En: Official Journal of the European Union L 144, .p 12-12.

Evyernie D, Tjakradidjaja AS, Permana IG, Toharmat T, Insani A. 2018. In vitro study of noni juice extract waste (*Morinda citrifolia* L.) and pineapple industrial wastes (*Ananas comosus* L. Merr) as energy supplement in dairy goat ration. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science 119, 1, 012017.

[FAO/WHO] Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación/ Organización Mundial de la Salud. 1988. Requirements of vitamin A, iron, folate and vitamin B12. Report of a joint FAO/WHO expert consultation. Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations.

[FAO/WHO] Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación/ Organización Mundial de la Salud . 2001. Human vitamin and mineral requirements. Report of a joint FAO/WHO expert consultation. Bangkok, Thailand, Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Floegel A, Kim DO, Chung SJ, Song WO, Fernandez ML, Bruno RS, Koo SI, Chun OK., 2010. Development and validation of an algorithm to establish a total antioxidant capacity database of the US diet. International Journal of Food Sciences and Nutrition 61(6):600-623.

Foyer CH. 2018. Reactive oxygen species, oxidative signaling and regulation of photosynthesis. Environmental and Experimental Botany 154:134-142.

Frankel EN, Meyer AS. 2000. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifactorial food and biological antioxidants. Journal of the Science of Food and Agriculture 80:1925-1941

- García-Becerra L, Mitjans M, Rivas-Morales C, Verde-Star J, Oranday-Cárdenas A, María PV. 2016. Antioxidant comparative effects of two grape pomace Mexican extracts from vineyards on erythrocytes. *Food Chemistry* 194:1081-1088.
- Gayosso-García Sancho LE, Yahia EM, González-Aguilar GA 2011. Identification and quantification of phenols, carotenoids, and vitamin C from papaya (*Carica papaya* L., cv Maradol) fruit determined by HPLC-DAD-MS/MS-ESI. *Food Research International* 44(5):1284-1291.
- Ghasemi K, Ghasemi Y, Ebrahimzadeh MA. 2009. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of 13 citrus species peels and tissues. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* 22:277-281.
- Gironés-Vilaplana A, Baenas N, Villaño D, Speisky H, García-Viguera C, Moreno DA. 2014. Evaluation of Latin-American fruits rich in phytochemicals with biological effects. *Journal of Functional Foods* 7:599-608.
- Gironés-Vilaplana A, Valentão P, Andrade PB, Ferreres F, Moreno DA, García-Viguera C. 2015. Beverages of lemon juice and exotic noni and papaya with potential for anticholinergic effects. *Food Chemistry* 170:16-21.
- Glish GL, Burinsky DJ. 2008. Hybrid mass spectrometers for tandem mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 19(2): 161-172.
- Gómez-Romero M, Seguera-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A. 2010. Metabolite profiling and quantification of phenolic compounds in methanol extracts of tomato fruit. *Phytochemistry* 71:1848-1864.
- González-Centeno MR, Jourdes M, Femenia A, Simal S, Roselló C, Teissedre PL. 2013. Characterization of polyphenols and antioxidant potential of white grape

- pomace byproducts (*Vitis vinifera* L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry 61:11579-11587.
- González-Lavaut NE, González-Lavaut JA. 2003. *Morinda citrifolia* Linn. potencialidades para su utilización en la salud humana. Revista Cubana de Farmacia 37(3):1561-2988.
- Gouw VP, Jung J, Zhao Y. 2017. Functional properties, bioactive compounds, and in vitro gastrointestinal digestion study of dried fruit pomace powders as functional food ingredients. LWT-Food Science and Technology 80:136-144.
- Granato D, Shahidi F, Wrolstad R, Kilmartin P, Melton LD, Hidalgo FJ, Miyashita K, van Camp J, Alasalvar C, Ismail AB, Elmore S, Birch GG, Charalampopoulos D, Astley SB, Pegg R, Zhou P, Finglas P. 2018. Antioxidant activity, total phenolics and flavonoids contents: Should we ban in vitro screening methods?. Food Chemistry 264:471-475.
- Gupta RK, Singh N. 2013. *Morinda citrifolia* (Noni) alters oxidative stress marker and antioxidant activity in cervical cancer cell lines. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention 14: 4603-4606.
- He D, Shan Y, Wu Y, Liu G, Chen B, Yao S. 2011. Simultaneous determination of flavanones, hydroxycinnamic acids and alkaloids in citrus fruits by HPLC-DAD-ESI/MS. Food Chemistry 127:880-885.
- Hossain MB, Rai DK, Brunton NP, Martin-Diana AB, Barry-Ryan C. 2010. Characterization of phenolic composition in *Lamiaceae* spices by LC-ESI-MS/MS. Journal of Agricultural of Food Chemistry 58:10576-10581.
- Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Prior RL. 2002. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid

- handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96 well format. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 50:4437-4444.
- Ignat I, Volf I, Popa VI. 2011. A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry* 126(4):1821-1835.
- Institute of Medicine. 2005. Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty Acids, cholesterol, protein and amino acids., Food and Nutrition Board. Washington, DC: National Academy Press.
- Institute of Medicine. 1997. Food and Nutrition Board. Dietary reference intakes for calcium, phosphorus, magnesium, vitamin D and fluoride. Washintong, D.C. National Academy Press.
- Institute of Medicine. 2001. Food and Nutrition Board. Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium and zinc. Washintong, D.C. National Academy Press.
- Jiménez-Aguilar D.M, Grusak MA. 2017. Minerals, vitamin C, phenolics, flavonoids and antioxidant activity of *Amaranthus* leafy vegetables. *Journal of Food Composition and Analysis* 58:33-39.
- Kammerer DR, Kammerer J, Valet R, Carle R. 2014. Recovery of polyphenols from the by-products of plant food processing and application as valuable food ingredients. *Food Research International* 65:2-12.
- Kalt W. 2001. Health functional phytochemicals of fruit. *Horticultural Reviews* 27: 269e-315e.

- Kim DO, Lee KW, Lee JH y Lee CY. 2002. Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity (VCEAC) of Phenolic Phytochemicals. *Journal Agricultural and Food Chemistry* 50(13): 3713-3717.
- Kopec RE, Cooperstone JL, Cichon MJ, Schwartz SJ. 2012. Analysis methods of carotenoids. En Zhimin X, Howard LR, editors. *Analysis of antioxidant rich phytochemicals*. John Wiley & Sons. p 105-148.
- Kuskoski EM, Asuero AG, Troncoso AM, Mancini-Filho J, Fett R. 2005. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Food Science and Technology* 25:726-732.
- Lewis-Luján LM, Iloki-Assanga SB, Rivera-Castañeda EG, Gil-Salido AA, Acosta-Silva AL, Meza-Cueto CY, Rubio-Pino JL. 2014. Nutritional and phenolic composition of *Morinda citrifolia* L. (Noni) fruit at different ripeness stages and seasonal patterns harvested in Nayarit, México. *International Journal of Nutrition and Food Sciences* 3(5):421-429.
- Lin YL, Chang YY, Yang DJ, Tzang BS, Chen YC. 2013. Beneficial effects of noni (*Morinda citrifolia* L.) juice on livers of high-fat dietary hamsters. *Food Chemistry* 140:31-38.
- Liu Q, Tang GY, Zhao CN, Feng XL, Xu XY, Cao SY, Meng X, Li S, Gan RY, Li HB. 2018. Comparison of antioxidant activities of different grape varieties. *Molecules* 23(2432):1-17.
- Liu RH. 2004. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *International Research Conference on Food, Nutrition, and Cancer* 3479S-3485S.

- Liyana-Pathirana CM, Shahidi F, Alasalvar C. 2006. Antioxidant activity of cherry laurel fruit (*Laurocerasus officinalis* Roem.) and its concentrated juice. *Food Chemistry* 99:121-128.
- Loranty A, Rembalkowska E, Rosa EAS, Bennett RN. 2010. Identification, quantification and availability of carotenoids and chlorophylls in fruit, herb and medicinal teas. *Journal of Food Composition and Analysis* 23:432-441.
- Marecek V, Mikiska A, Hampel D, Cejka P, Neuwirthova J, Malachova A, Cerkal R. 2017. ABTS and DPPH methods as a tool for studying antioxidant capacity of spring barley and malt. *Journal of Cereal Science* 73:40-45.
- Manach C, Hubert J, Llorach R, Scalbert A. 2009. The complex links between dietary phytochemicals and human health deciphered by metabolomics. *Molecular Nutrition and Food Research* 53:1303-1315.
- Meng HC, Gao J, Zheng HC, Damirin A, Ma CM. 2015. Diacetylated and acetone-conjugated flavan-3-ols as potent antioxidants with cell penetration ability. *Journal of Functional Foods* 12:256-261.
- Mercado-Mercado G, De la Rosa L, Wall-Medrano, López JA, Álvarez-Parrilla E. 2013. Compuestos polifenólicos y capacidad antioxidante de especias típicas consumidas en México. *Nutrición Hospitalaria* 28:36-46.
- Merken HM, Beecher GR. 2000. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48(3):577-599.
- Meshkini A. 2015. Acetone extract of almond hulls provides protection against oxidative damage and membrane protein degradation. *Journal of Acupuncture and Meridian Studies* 9(3):134-142.

- Milde J, Elstner EF, Graßmann. 2007. Synergistic effects of phenolics and carotenoids on human low-density lipoprotein oxidation. *Molecular Nutrition Food Research* 51:956-961.
- Mizgier P, Kucharska AZ, Sokół-Łętowska A, Kolniak-Ostek J, Kidon M, Fecka I. 2016. Characterization of phenolic compounds and antioxidant and anti-inflammatory properties of red cabbage and purple carrot extracts. *Journal of Functional Foods* 7:133-146.
- Moldoveanu SC, David V. 2017a. Start of the Implementation of a new HPLC method. En: Moldoveanu SC, David V. *Selection of the HPLC Method in Chemical Analysis*. Boston: Elsevier. p. 1-29.
- Moldoveanu SC, David V. 2017b. Short Overviews of the main analytical techniques containing a separation step. En: Moldoveanu SC, David V. *Selection of the HPLC Method in Chemical Analysis*. Boston: Elsevier. p. 55-85.
- Morsi, MKS, Galal S, M, Alabdulla O. 2016. Antioxidative activity of olive pomace polyphenols obtained by ultrasound assisted extraction. *Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology* 10:95-100.
- Motilva MJ, Serra A, Macià A. 2013. Analysis of food polyphenols by ultra high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry: an overview. *Journal of Chromatography A*, 1292:66-82.
- Motshakeri M, Ghazali HM. 2015. Nutritional, phytochemical and commercial quality of Noni fruit: A multi-beneficial gift from nature. *Trends in Food Science & Technology* 45:118-129.
- Nascimento LCS, Rodrigues N da R, Alves MPC, Sabaa AUO, Barbosa JJJ, Barbosa MIMJ. 2018. Chemical characterization, nutritional aspects and antioxidant

- capacity of noni (*Morinda citrifolia* L) produced in northeastern Brazil. International Food Research Journal 25:870-875.
- Ncube EN, Mhlongo MI, Piater LA, Steenkamp PA, Dubery IA, Madala NE. 2014. Analyses of chlorogenic acids and related cinnamic acid derivatives from *Nicotiana tabacum* tissues with the aid of UPLC-QTOF-MS/MS bases on the in-source collision-induced dissociation method. Chemistry Central Journal 8:66.
- Newton K. 2003. Production of noni juice and powder in Samoa. En: Proceedings of the 2002 Hawai'i Noni Conference. (ed. S.C. Nelson). College of Tropical Agriculture and Human Resources 29-32.
- Nguyen NMP, Le TT, Vissenaekens H, Gonzalez GB, Camp JV, Smagghe G, Raes K. 2019. In vitro antioxidant activity and phenolic profiles of tropical fruit by-products. International Journal of Food Science and Technology 54(4):1-10.
- O'shea N, Arendt EK, Gallagher E. 2012. Dietary fibre and phytochemical characteristics of fruit and vegetable by-products and their recent applications as novel ingredients in food products. Innovative Food Science and Emerging Technologies 16:1-10.
- Okarter N, Liu RH 2010. Health benefits of whole grain phytochemicals. Critical reviews in Food Science and Nutrition 50:193-208.
- Ornelas-Paz JJ, Cira-Chávez LA, Gardea-Béjar AA, Guevara-Arauza JC, Sepúlveda DR, Reyes-Hernandez J, Ruiz-Cruz S. 2013. Effect of heat treatment on the content of some bioactive compounds and free radical-scavenging activity in pungent and non-pungent peppers. Food Research International 50:519-525.
- Ornelas-Paz JJ, Yahia EM, Gardea-Béjar AA Pérez-Martínez JD, Ibarra-Junquera V, Escalante-Minakata MP, Ruiz-Cruz S y Ochoa-Reyes E. 2012. Actividad

- antioxidante y protectora de selectos compuestos bioactivos de frutas y hortalizas. Álvarez-Parrilla E. González-Aguilar GA, de la Rosa LA, Ayala-Zavala JF, editores. Antioxidantes en alimentos y salud. Editorial CLAVE. México p 59-82.
- Ostrowski W, Woiakowska A, Grajzer M, Stobiecki M. 2014. Mass spectrometric behavior of phenolic acids standards and their analysis in the plant samples with LC/ESI/MS system. *Journal of Chromatography B* 967:21-27.
- Palioto GF, Silva CFG, Mendes MP, Almeida VV, Rocha CLMSC, Tonin LTD. 2015. Composição centesimal, compostos bioativos e atividade antioxidante de frutos de *Morinda citrifolia* Linn (noni) cultivados no Paraná. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 17:59-66.
- Palu AK, Kim AH, West BJ, Deng S, Jensen J, White L. 2008. The effects of *Morinda citrifolia* L. (noni) on the immune system: its molecular mechanisms of action. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56:1115-1120.
- Pan Y, Deng ZY, Zheng SL, Chen X, Zhang B, Li H. 2018. Daily dietary antioxidant interactions are due to not only the quantity but also the ratios of hydrophilic and lipophilic phytochemicals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66:9107-9120.
- Pandy V, Narasingam M, Kunasegaran T, Murugan DD, Mohamed Z. 2014. Effect of noni (*Morinda citrifolia* Linn.) fruit and its bioactive principles scopoletin and rutin on rat vas deferens contractility: An *ex vivo* study. *The Scientific World Journal* Article ID 909586.

- Pérez-Jiménez J, Neveu V, Vos F, Scalbert A. 2010. Identification of the 100 richest dietary sources of polyphenols: an application of the Phenol-Explorer database. *European Journal of Clinical Nutrition* 64:S112-S120.
- Price ML, Scoyoc SV, Buttler LG. 1978. A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 26:1214-1218.
- Prior RL, Wu X, Chaich K. 2005. Standardize methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 53: 4290-4302.
- Potterat O, Hamburger M. 2007. *Morinda citrifolia* (noni) fruit -phytochemistry pharmacology, safety. *Planta Med.* 73(3):191-199.
- Potterat O, Felten RV, Dalsgaard PW, Hamburger M. 2007. Identification of TLC markers and quantification by HPLC-MS of various constituents in noni fruit powder and commercial noni-derived products. *Journal of Agricultural of Food Chemistry* 55:7489-7494.
- Puppo A. 1992. Effect of flavonoids on hydroxyl radical formation by fenton-type reactions; influence of the iron chelator. *Phytochemistry* 31(1):85-88.
- Rana AC, Gulliya B. 2019. Chemistry and pharmacology of flavonoids- A review. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research* 53(1): 8-20.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine* 26:1231-1237.
- Rodríguez-Roque JM, Grigelmo-Miguel N, Rojas-Graü MA, Martín-Belloso O. 2012. Métodos para medir la capacidad antioxidante en alimentos y sistemas

- biológicos. En: Álvarez-Parrilla E, Gonzáles-Aguilar GA, de la Rosa LA, Ayala-Zavala JF, editores. Antioxidantes en alimentos y salud. 1ª ed. México, D.F.: Clave Editorial. p 407-456.
- [SAGARPA] Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2016. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesca. Avance de siembras y cosechas. Disponible de: <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola> (Consultado el 18 de septiembre del 2017).
- Sagar NA, Pareek S, Sharma S, Yahia EM, Lobo MG. 2018. Fruit and vegetable waste: Bioactive compounds, their extraction, and possible utilization. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 17:512-531.
- Schaich K, Tian X, Xie J. 2015. Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: a critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. *Journal of Functional Foods* 14:111-125.
- Schwartz J C, Senko M W, Syka J E P. 2002. A two-dimensional quadrupole ion trap mass spectrometer. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 13:659–669.
- Shahidi F, Ambigaipalan P. 2015 Phenolic and polyphenolics in foods, beverages and spices: antioxidant activity and health effects- A review. *Journal of Functional Foods* 18:820-897.

- Singh DR, Singh S, Banu VS. 2016. Changes in antioxidants and minerals in noni (*Morinda citrifolia* L.) fruits during development process. *British Journal of Pharmaceutical Research* 10 (5):1-11.
- Smeriglio A, Barreca D, Bellico E, Trombetta D. 2017. Proanthocyanidins and hydrolysable tannins: occurrence, dietary intake and pharmacological effects. *British Journal of Pharmacology* 174:1244-1262.
- Sójka M, Kołodziejczyk K, Milala J, Abadias M, Viñas I, Guyot S, Baron A. 2015. Composition and properties of the polyphenolic extracts obtained from industrial plum pomaces. *Journal of Functional Foods* 12:168-178.
- Solovchenko A, Yahia EM, Chen C. 2019. Pigments. En Yahia EM, Carrillo-López A, editores. *Postharvest physiology and biochemistry of fruit and vegetables* 1^a ed. Cambridge, Massachusetts: Woodhead Publishing. p 225-252.
- Stalikas CD. 2007. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of separation science*, 30(18):3268-3295.
- Steiner BM, McClements DJ, Davidov-Pardo G. 2018. Encapsulation systems for lutein: a review. *Trends in Food Science and Technology* 82:71-81.
- Su BN, Pawlus AD, Jung HA, Keller WJ, McLaughlin JL, Kinghorn, AD. 2005. Chemical constituents of the fruits of *Morinda citrifolia* (noni) and their antioxidant activity. *Journal of Natural Products* 68:592-595.
- Sudha, ML, Baskaran V, Leelavathi K. 2007. Apple pomace as a source of dietary fiber and polyphenols and its effect on the rheological characteristics and cake making. *Food Chemistry* 104:686-692.
- Sun J, Chu YF, Wu X, Liu RH. 2002. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50:7449-7454.

- Sun J, Liang F, Bin Y, Li P, Duan C. 2007. Screening non-colored phenolics in red wines using liquid chromatography/ultraviolet and mass spectrometry/mass spectrometry libraries. *Molecules* 12:679-693.
- Swartz M. 2010. HPLC detectors: a brief review. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 33(9-12):1130-1150.
- Swartz, ME. 2005. UPLC™: an introduction and review. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 28(7-8):1253-1263.
- Taamalli A, Arráez-Roman D, Ibañez E, Zarrouk M, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A. 2012. Optimization of microwave-assisted extraction for the characterization of olive leaf phenolic compounds by using HPLC-ESI-TOF-MS/IT-MS². *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60:791-798.
- Taleuzzaman M, Ali S, Gilani S, Imam S, Hafeez A. 2015. Ultra performance liquid chromatography (UPLC) – a review. *Austin Journal of Analytical and Pharmaceutical Chemistry* 2(6):1056.
- Tao B, Ye F, Li H, Hu Q, Xue S, Zhao G. 2014. Phenolic profile and in vitro antioxidant capacity of insoluble dietary fiber powders from citrus (*Citrus junos* Sieb. Ex Tanaka) pomace as affected by ultrafine grinding. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62:7166-7173.
- Tumbas-Šaponjac V, Gironés-Vilaplana A, Djilas S, Mena P, Četković G, Moreno DA, Čanadanović-Brunet J, Vulić J, Stajčić S, Vinčić M. 2015. Chemical composition and potential bioactivity of strawberry pomace. *RSC Advances*. 5:5397-5405.
- Viacava GE, Roura SI, López-Márquez DM, Berrueta LA, Gallo B, Alonso-Salces RM. 2018. Polyphenolic profile of butterhead lettuce cultivar by ultrahigh performance

- liquid chromatography coupled online to UV-visible spectrophotometry and quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Food Chemistry* 260:239-273.
- Wang MY, Peng L, Jensen CJ, Deng S, West B. 2013. Noni juice reduces lipid peroxidation-derived DNA adducts in heavy smokers. *Food Science & Nutrition* 1(2):141-149.
- Wang G, Lei Z, Zhong Q, Wu W, Zhang H, Min T, Wu H, Lai F. 2017. Enrichment of caffeic acid in peanut sprouts and evaluation of its in vitro effectiveness against oxidative stress-induced erythrocyte hemolysis. *Food Chemistry* 217:332-341.
- West BJ, Jensen CJ, Westendorf JA. 2008. A new vegetable oil from noni (*Morinda citrifolia*) seeds. *International Journal of Food Science and Technology* 43:1988-1992.
- West BJ, Deng S, Jensen CJ. 2011. Nutrient and phytochemical analyses of processed noni pure. *Food Research International* 44:2295-2301.
- West BJ, Deng S, Jensen CJ. 2011. Nutrient and phytochemical analyses of processed noni puree. *Food Research International* 44:2295-2301.
- Weston A, Brown PR. 1997a. High-Performance Liquid Chromatography. En Weston A, Brown RP editores. *HPLC and CE principles and practice*. San Diego: Academic Press. p 1-23.
- Weston, A., Brown PR. 1997b. Separations in High-Performance Liquid Chromatography. En Weston A, Brown RP editores. *HPLC and CE principles and practice*. San Diego: Academic Press. p 24-70.
- Wu X, Gu L, Holden J, Haytowitz DB, Gebhardt SE, Beecher G, Prior RL. 2004. Development of a database for total antioxidant capacity in foods: a preliminary study. *Food Composition and Analysis* 17:407-422.

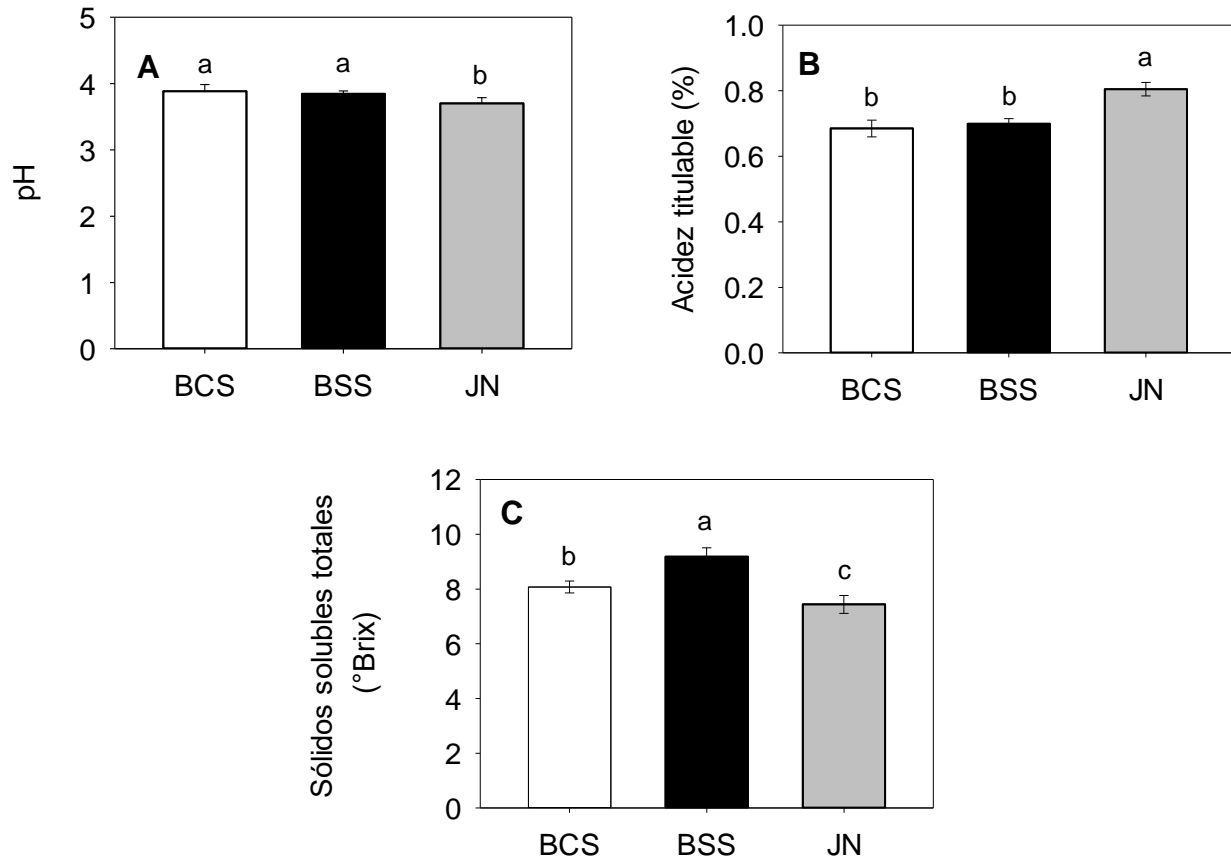
- Yan Y, Lu Y, Jiang S, Jiang Y, Tong Y, Zuo L, Yang J, Gong F, Zhang L, Wang P. 2018. Quantitative determination of bioactive constituents in noni juice by High-performance liquid chromatography with electrospray ionization triple quadrupole mass spectrometry. *Pharmacognosy Magazine* 14:70-75.
- Yang J, Paulino R, Janke-Stedronsky S y Abawi F. 2007. Free-radical-scavenging activity and total phenols of noni (*Morinda citrifolia* L.) juice and powder in processing and storage. *Food Chemistry* 102:302-308.
- Yi W, Fischer J, Krewer G, Akoh CC. 2005. Phenolic compounds from blueberries can inhibit colon cancer cell proliferation and induce apoptosis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53:7320-7329.
- Zapata S, Piedrahita AM, Rojano B. 2014. Capacidad atrapadora de radicales oxígeno (ORAC) y fenoles totales de frutas y hortalizas de Colombia. *Perspectivas en Nutrición Humana* 16:25-36.
- Zhao M, Yang Q, Lin L, Sun B, Wang Y. 2017. Intracellular antioxidant activities of selected cereal phenolic extracts and mechanisms underlying the protective effects of adlay phenolic extracts on H₂O₂-induced oxidative stress in human erythrocytes. *Journal of Functional Foods* 31:160-171.
- Zhou SH, Fang ZX, Lü Y, Chen JC, Liu DH y Ye XQ. 2009. Phenolics and antioxidant properties of bayberry (*Myrica rubra* Sieb. Et Zucc) pomace. *Food Chemistry* 112:394-399.

ABREVIATURAS

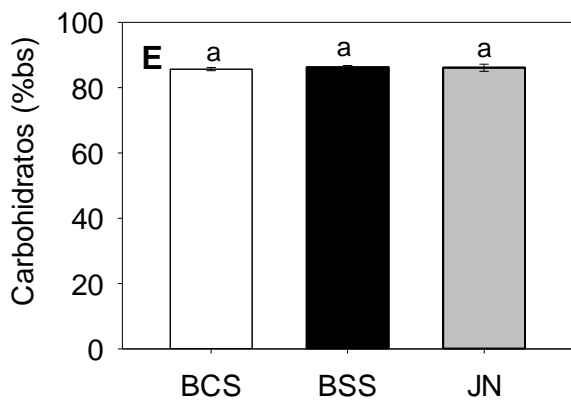
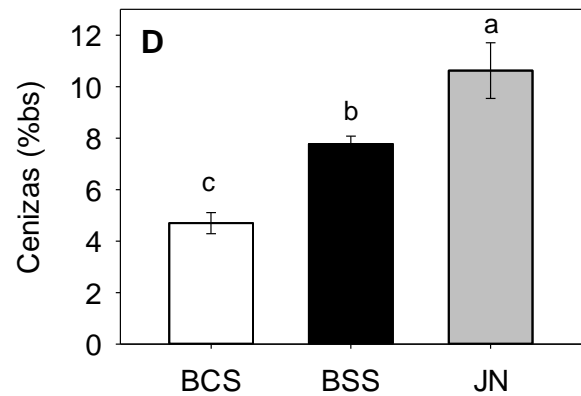
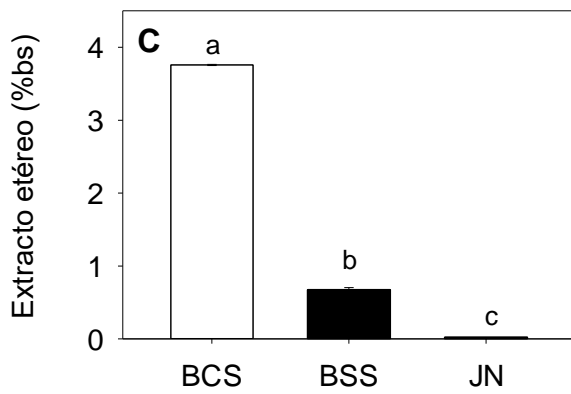
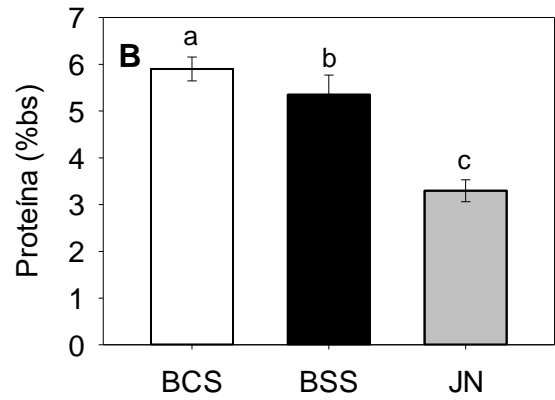
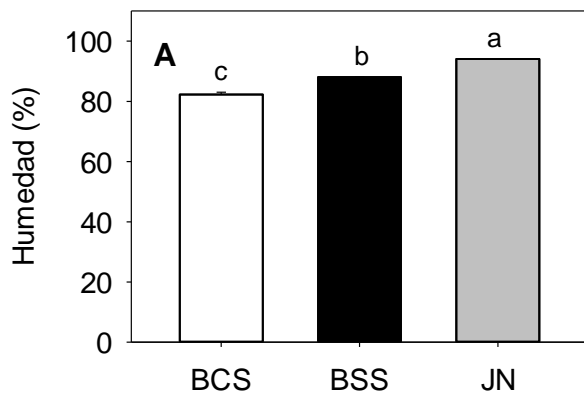
AAPH	dihidrocloruro de 2,2-azobis (2-metil-amidinopropano)
ABTS	ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico
bh	Base húmeda
bs	Base seca
CAO	Capacidad antioxidante
Col	Colaboradores
DAD	Detector de arreglo de diodos
DCPI	2,6-diclorofenolindofenol
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidracilo
EAG	Equivalentes de ácido gálico
E β -C	Equivalentes de beta caroteno
EC	Equivalentes de catequina
EQ	Equivalentes de quercetina
EHF	Extracto hidrofílico
ELF	Extracto lipofílico
ESI	Ionización por electrospray
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (del inglés, Food and Agriculture Organization of United Nations)
FRAP	Poder antioxidante reductor del hierro
FDI	Fibra dietaria insoluble
FDS	Fibra dietaria soluble

FDT	Fibra dietaria total
HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (del inglés High-Performance Liquid Chromatography)
LDL	Lipoproteínas de baja densidad (del inglés Low-Density Lipoprotein)
MS	Espectrometría de masas
m/z	Relación masa/carga
ORAC	Capacidad de absorción de radicales de oxígeno
UHPLC	Cromatografía de Líquidos de Ultra-Alta Resolución (del inglés Ultra High Performance Liquid Chromatography)
Uv-vis	Ultravioleta visible

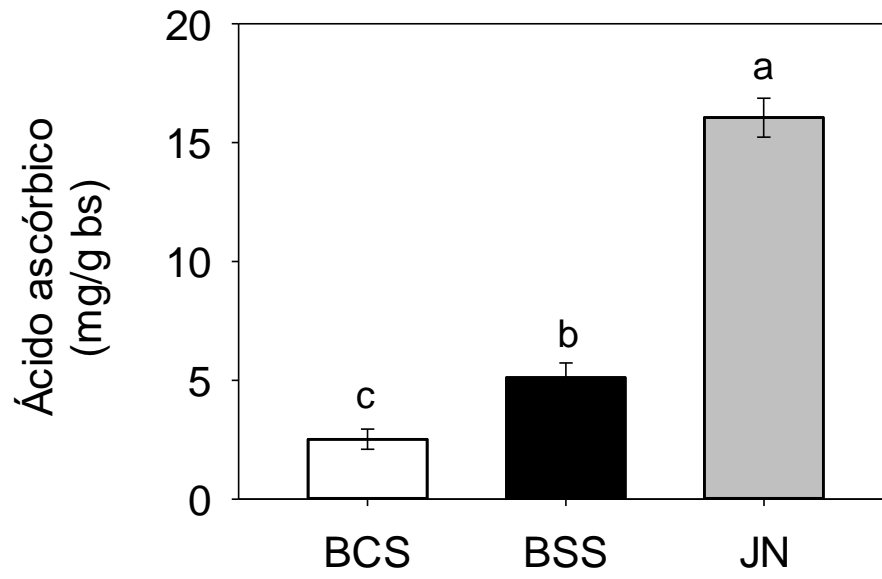
ANEXOS



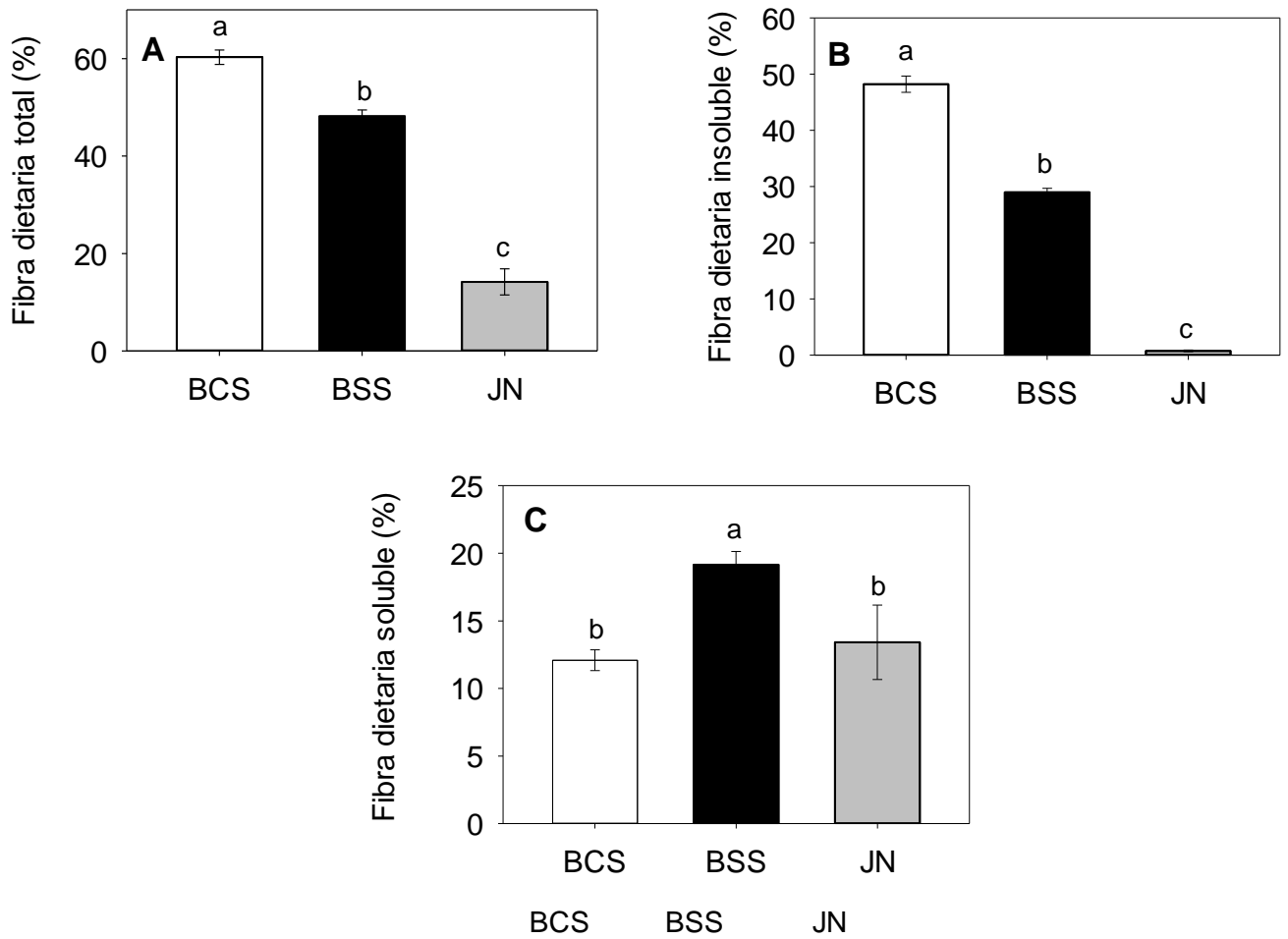
Anexo 1. Análisis fisicoquímico del bagazo con semilla (BCS), bagazo sin semilla (BSS) y jugo (JN) de noni (*Morinda citrifolia* L.). pH (A), acidez titulable (B) y sólidos solubles totales (C).



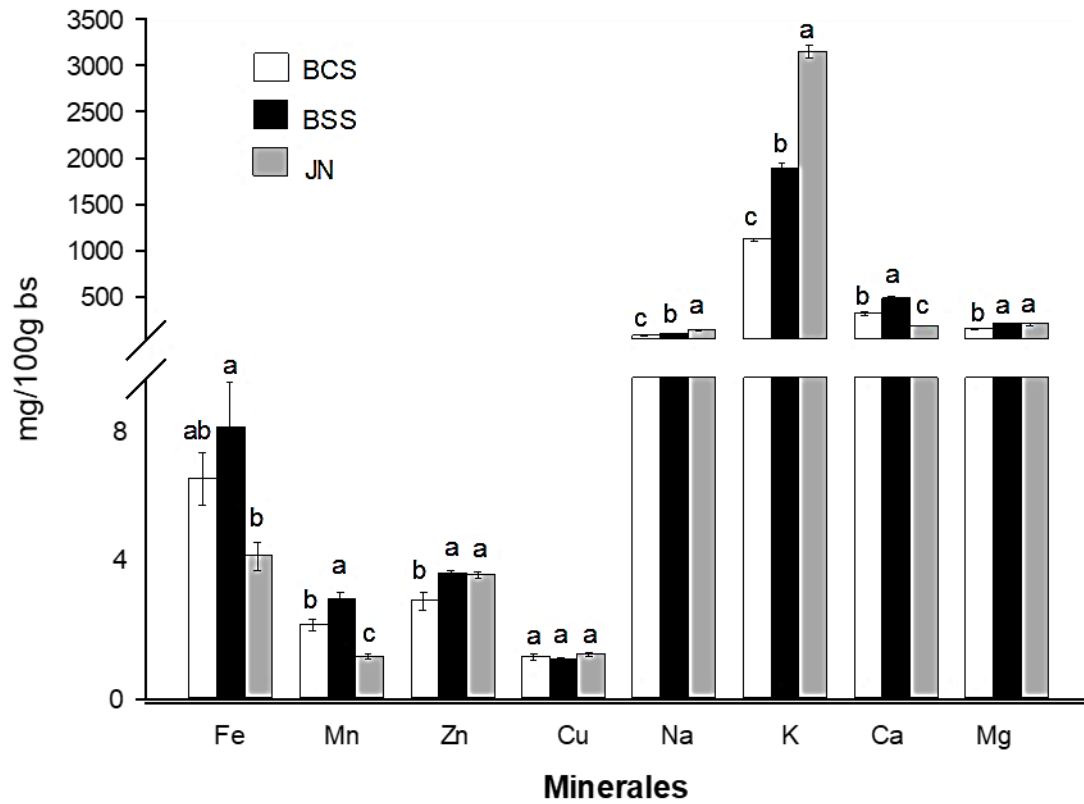
Anexo 2. Análisis proximal del bagazo con semilla (BCS), bagazo sin semilla (BSS) y jugo (JN) de noni (*Morinda citrifolia* L.). humedad (A), proteína (B) extracto etéreo (C), cenizas (D) y carbohidratos (E).



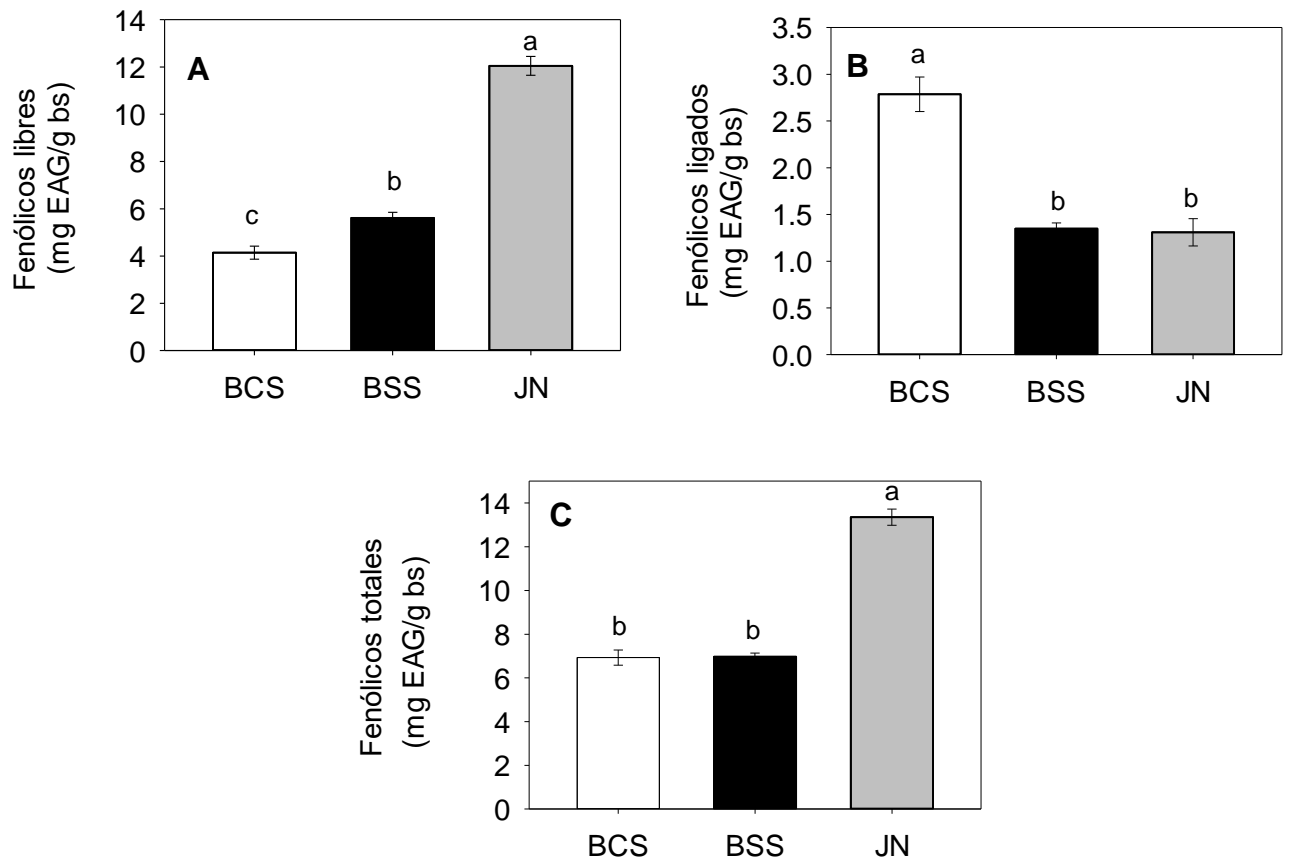
Anexo 3. Contenido de ácido ascórbico presente en bagazo con semilla (BCS), bagazo sin semilla (BSS) y jugo (JN) de noni (*Morinda citrifolia* L.).



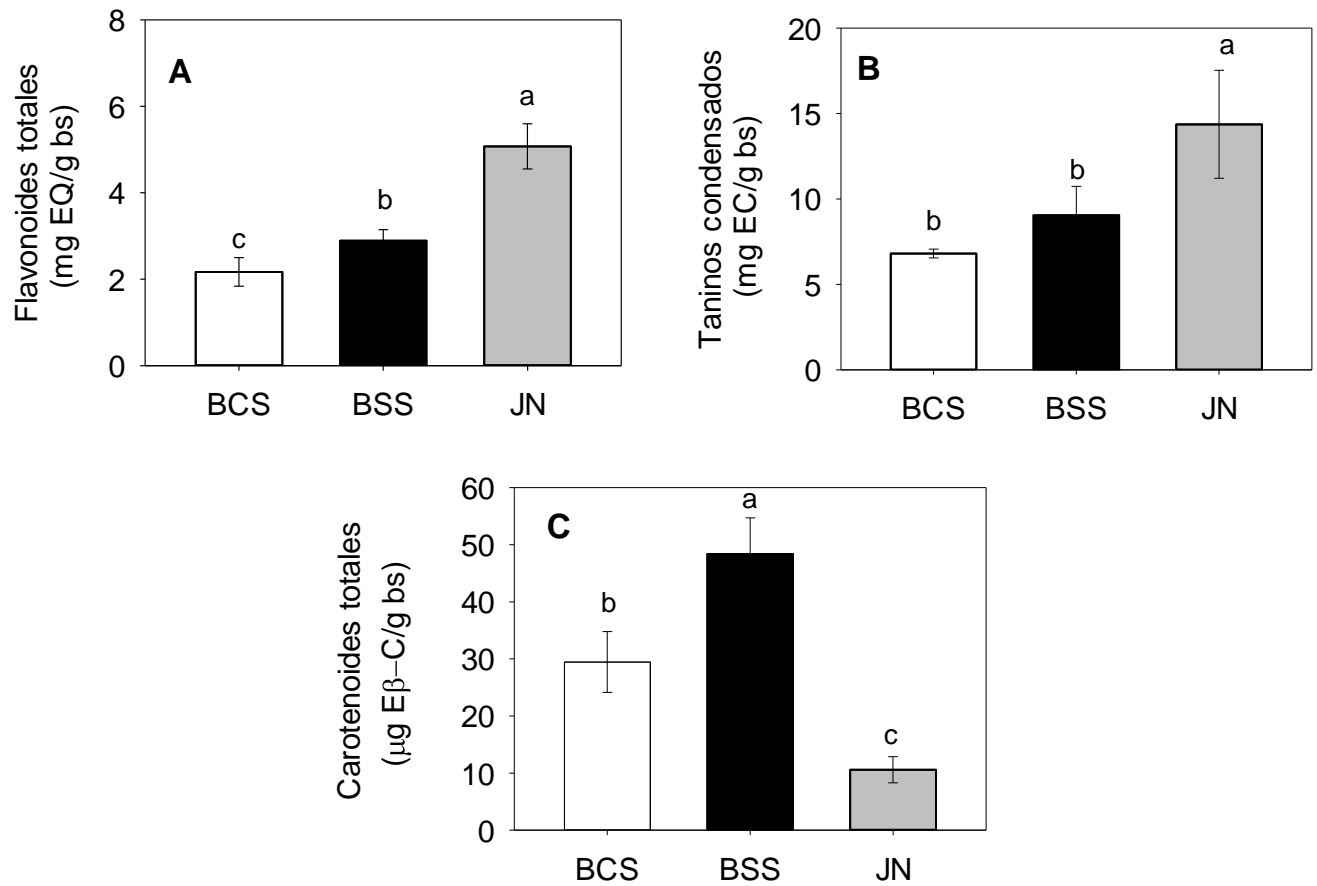
Anexo 4. Porcentaje de fibra dietaria. Fibra dietaria total (A), fibra dietaria insoluble (B) y fibra dietaria soluble (C) base seca presentes en bagazo con semilla (BCS), bagazo sin semilla (BSS) y jugo (JN) de noni (*Morinda citrifolia* L.).



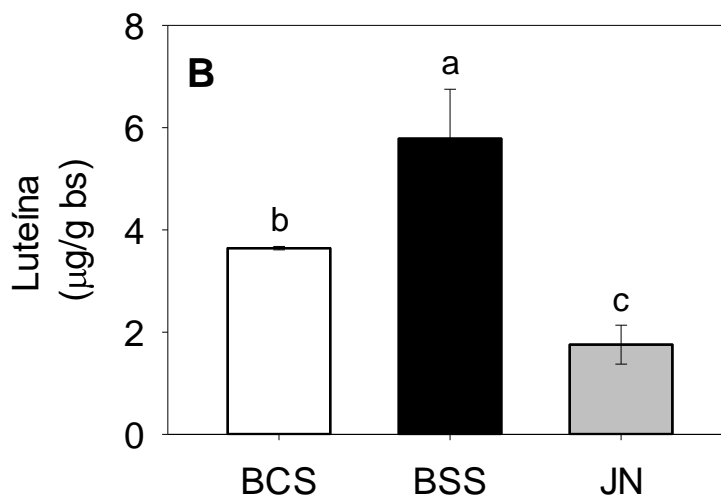
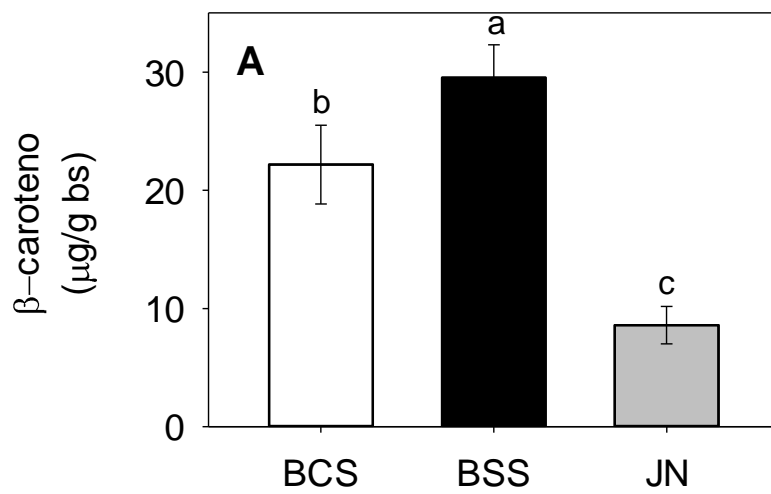
Anexo 5. Contenido de minerales en mg/100g bs presentes en bagazo con semilla (BCS), bagazo sin semilla (BSS) y jugo (JN) de noni (*Morinda citrifolia* L.).



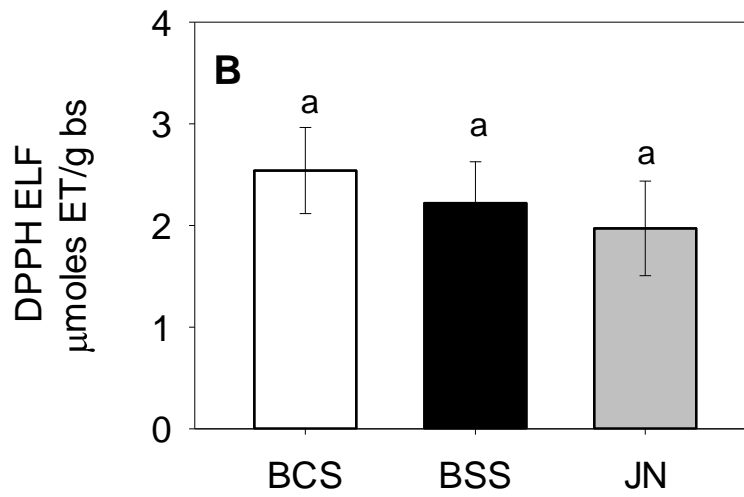
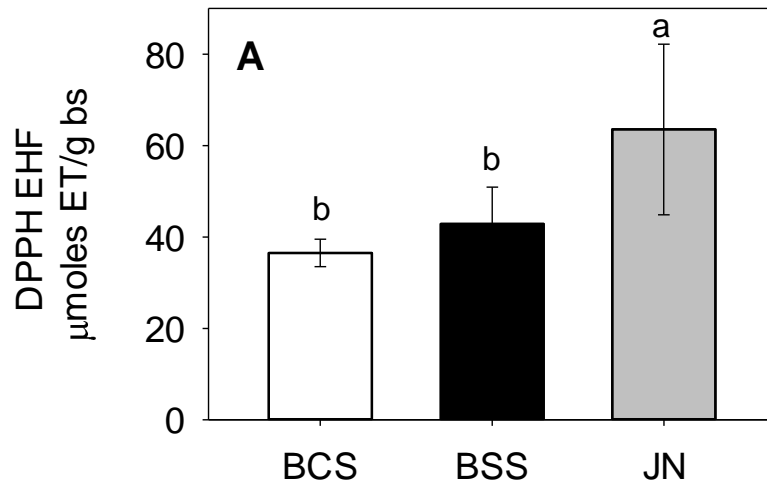
Anexo 6. Fenólicos libres (A), fenólicos ligados (B) y fenólicos totales (C) presentes en bagazo con semilla (BCS), bagazo sin semilla (BSS) y jugo (JN) de noni (*Morinda citrifolia* L.).



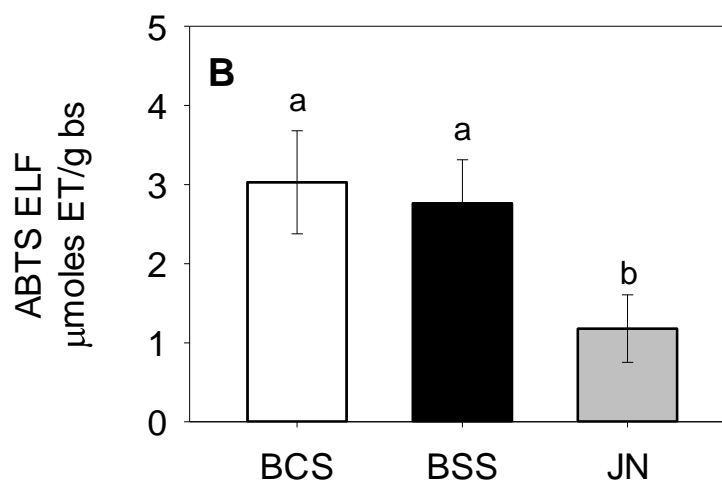
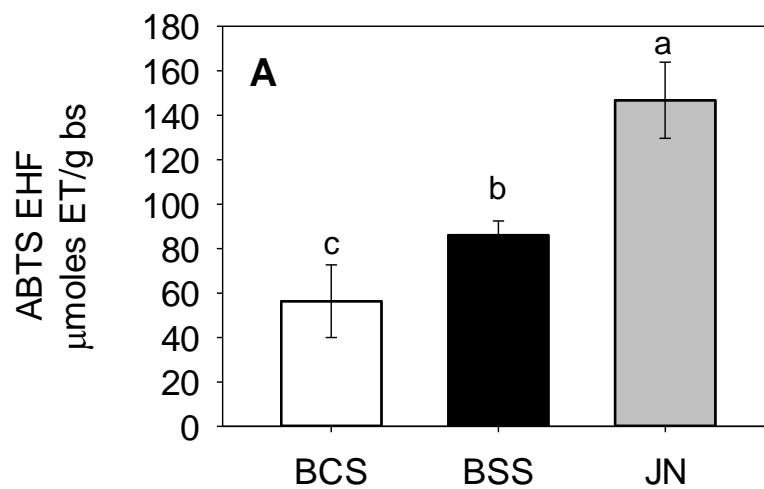
Anexo 7. Flavonoides totales (A), taninos condensados (B) y carotenoides totales (C) presentes en bagazo con semilla (BCS), bagazo sin semilla (BSS) y jugo (JN) de noni (*Morinda citrifolia* L.).



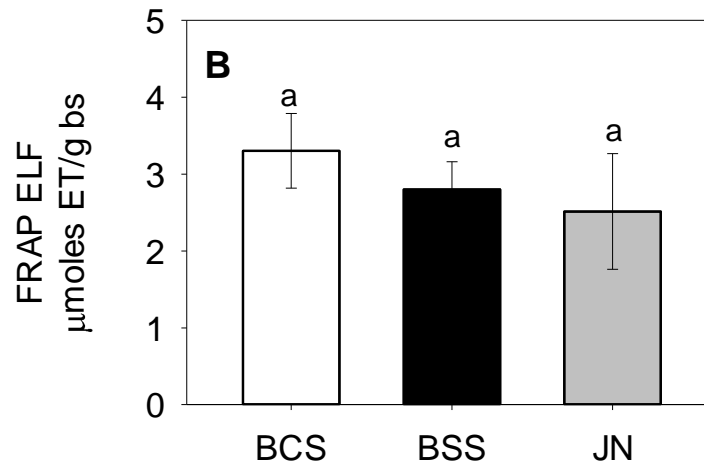
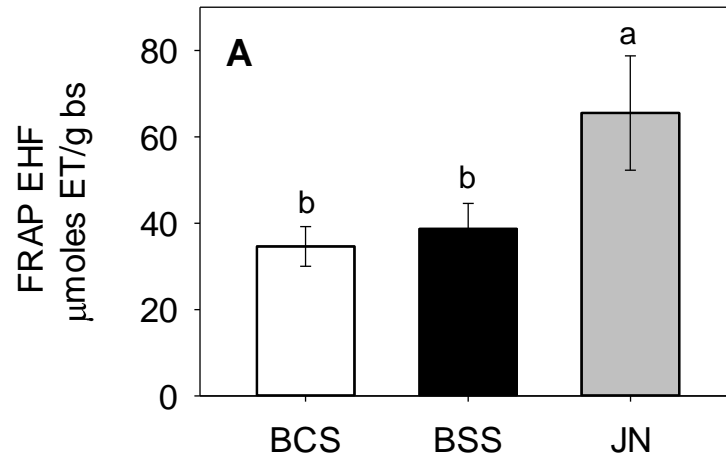
Anexo 10. Carotenoides individuales presentes en bagazo con semilla (BCS), bagazo sin semilla (BSS) y jugo (JN) de noni (*Morinda citrifolia* L.). β-caroteno (A), luteína (B).



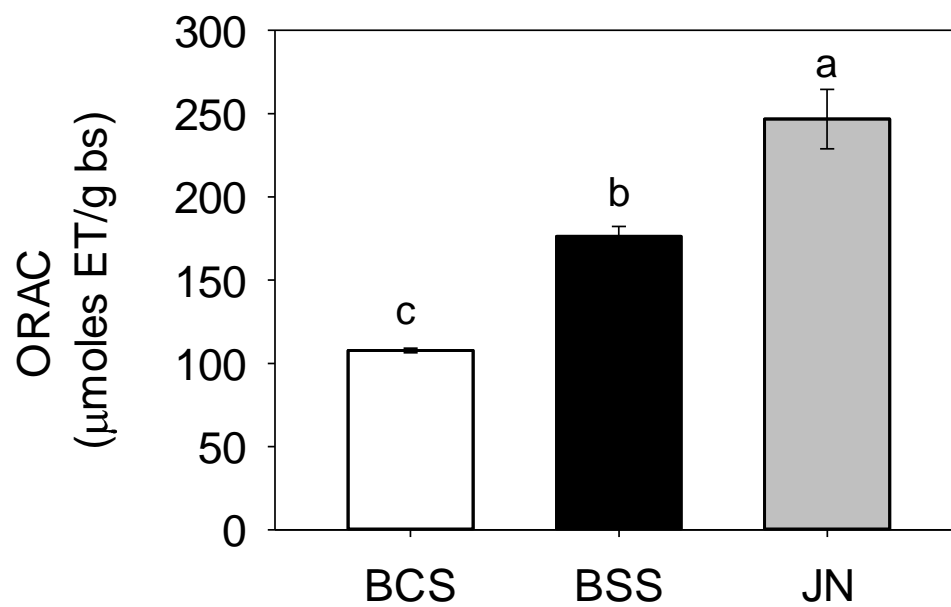
Anexo 11. Capacidad antioxidante por el método DPPH en EHF y ELF de bagazo con semilla (BCS), bagazo sin semilla (BSS) y jugo (JN) de noni (*Morinda citrifolia* L.). Extracto hidrofílico EHF (A), extracto lipofílico ELF (B).



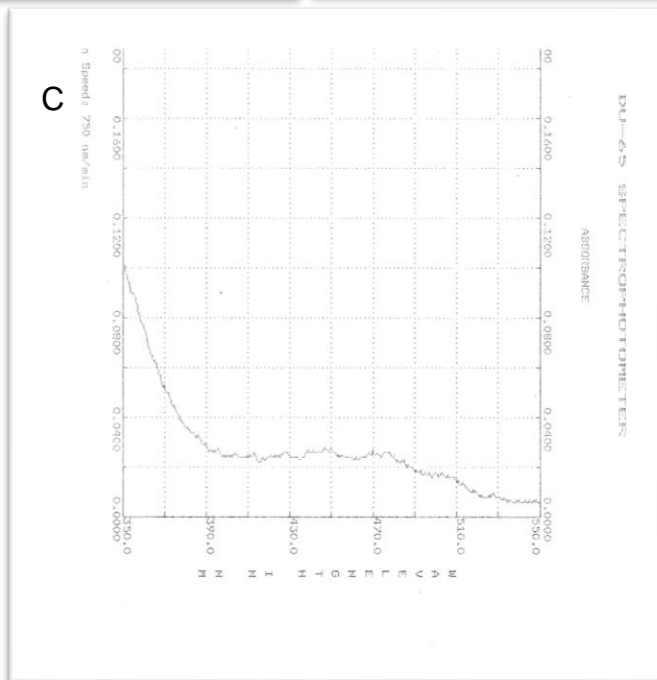
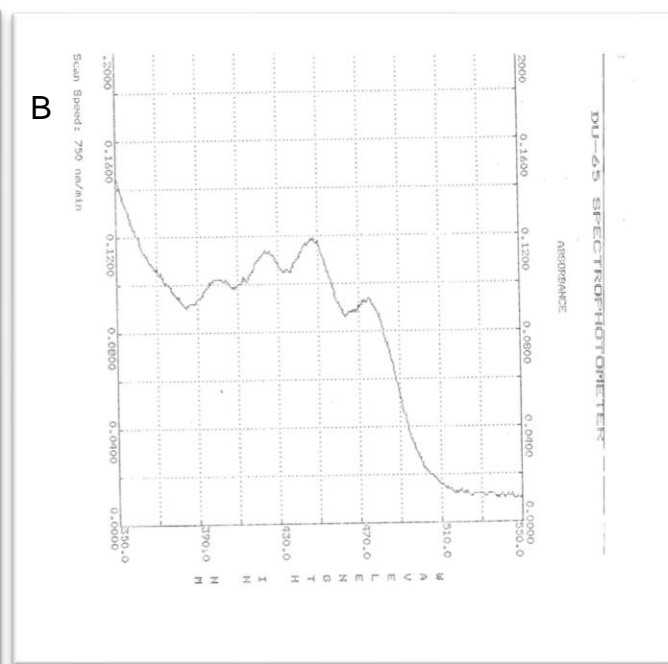
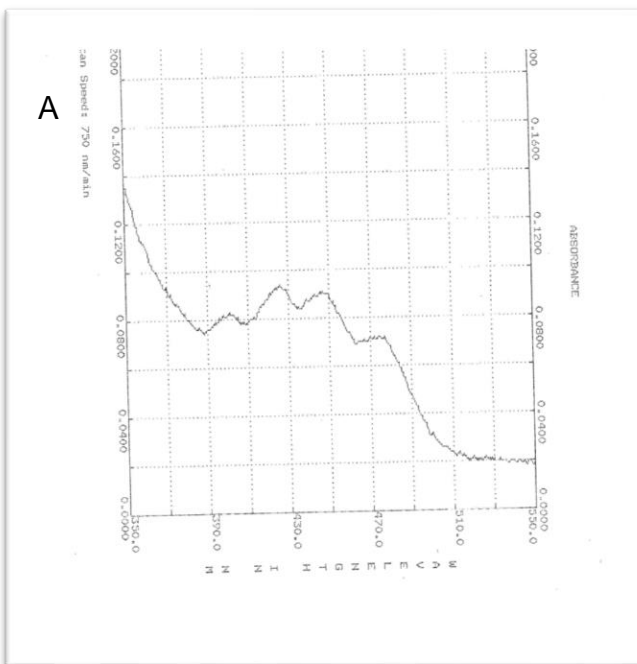
Anexo 12. Capacidad antioxidante por el método ABTS en EHF y ELF de bagazo con semilla (BCS), bagazo sin semilla (BSS) y jugo (JN) de noni (*Morinda citrifolia* L.). Extracto hidrofílico EHF (A), extracto lipofílico (B).



Anexo 13. Capacidad antioxidante por el método de FRAP en EHF y ELF de bagazo con semilla (BCS), bagazo sin semilla (BSS) y jugo (JN) de noni (*Morinda citrifolia* L.). Extracto hidrofílico EHF (A), extracto lipofílico ELF (B).



Anexo 14. Capacidad antioxidante por el método de ORAC en EHF de bagazo con semilla (BCS), bagazo sin semilla (BSS) y jugo (JN) de noni (*Morinda citrifolia* L.). Extracto EHF (A), extracto lipofílico (B).



Anexo 15. Espectros de absorción para carotenoides totales (de 350 a 550 nm) representativo de bagazo con semilla (BCS) (A), bagazo sin semilla (BSS) y jugo (JN) de noni (*Morinda citrifolia* L.).

Anexo 16. Analysis by UPLC–DAD–ESI-MS of Phenolic Compounds and HPLC–DAD Based Determination of Carotenoids in Noni (*Morinda citrifolia* L.) Bagasse

Analysis by UPLC–DAD–ESI-MS of Phenolic Compounds and HPLC–DAD-Based Determination of Carotenoids in Noni (*Morinda citrifolia* L.) Bagasse

Claudia Barraza-Elenes,[†] Irma L. Camacho-Hernández,[†] Elhadi M. Yahia,[‡] José J. Zazueta-Morales,[†] Ernesto Aguilar-Palazuelos,[†] J. Basilio Heredia,[§] Dolores Muy-Rangel,[§] Carlos I. Delgado-Nieblas,[†] and Armando Carrillo-López^{*,†}

[†]Posgrado en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa, CP 80013 Culiacán, Sinaloa, México

[‡]Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro, CP 76230 Juriquilla, Querétaro, México

[§]Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., Unidad Culiacán, CP 80110 Culiacán, Sinaloa, México

Supporting Information

ABSTRACT: Noni bagasse is usually wasted after the noni juice extraction process. The purpose of this study was to investigate the phytochemical composition of noni bagasse (with and without seeds) obtained after a 1 week period of a short-term juice drip-extraction process from over-ripe noni fruit. Totals of free phenolics, flavonoids, condensed tannins, carotenoids, and most of the minerals were higher in bagasse without seeds (NSB) than in bagasse with seeds (WSB), whereas bound phenolics and total and insoluble dietary fiber were higher in WSB than in NSB. β -Carotene and lutein, quantified by HPLC–DAD, were higher in both bagasse than in juice. A total of 16 phenolic compounds and 2 iridoids were determined by UPLC–DAD–ESI-MS. Among them, procyanidin B-type dimer, caffeoylquinic-acid-hexoside, and quercetin-hexose-deoxyhexose have not been previously reported in noni bagasse, noni juice, or noni fruit. Isorhamnetin-3-O-rutinoside was the most abundant compound in both bagasses. In conclusion, both bagasses are potential sources of phytochemical compounds for the food and pharmaceutical industries.

KEYWORDS: *Morinda citrifolia*, noni, phytochemicals, carotenoids, phenolics, flavonoids, UPLC–DAD–MS

INTRODUCTION

The wastes derived from the fruit and vegetable juice industry comprise about 5.5 million metric tons.¹ Wastes may represent an environmental problem; however, these can be converted into useful and marketable products. Wastes are being increasingly considered as important sources of phytochemicals such as phenolic compounds, pigments such as carotenoids, among others, which remain in the bagasse after the juice extraction process. These compounds may possess high antioxidant, anti-inflammatory, and antimicrobial activity.^{2,3} Some examples of wastes that have been extensively studied and shown to contain important amounts of remaining phytochemicals are grape and apple pomaces.^{4,5} These were found to be potential sources of value-added food ingredients such as phytochemicals and fiber.³

Noni (*Morinda citrifolia* L.) cultivation is widespread in tropical and subtropical regions, and during the past few years, the fruit has been marketed worldwide mostly as a fermented juice. This commercialization has been increased especially since the approval of noni fruit juice as a novel food ingredient by the Commission of the European Union.^{6,7} Currently, noni juice is considered as a popular functional food,⁸ and it has been established that it possesses antioxidant,⁹ anti-inflammatory,¹⁰ anticancer,¹¹ and immunity enhancement activities.¹² Some of these properties have been associated with the phytochemical content of the juice.⁹ Research on phytochem-

icals of noni juice has identified and quantified scopoletin, rutin, quercetin, and some iridoids, among others.^{7,13,14} During the noni juice extraction process, a large amount of wastes is generated, mostly composed of remnant pulp, seeds, and peel.¹⁵ However, the noni waste (bagasse) has been scarcely characterized. A few publications have provided some limited information on the proximate composition and digestibility of noni bagasse used for forage. Aregheore¹⁵ studied the noni juice wastes obtained from a 2 month fermented fruit juice extraction process, aiming to know its potential as forage by determining only its fiber characteristics and proximate composition. In addition, Evyernie et al.¹⁶ studied blends of wastes derived from the noni juice and pineapple industry as an energy supplement for dairy goats, focusing on in vitro fermentation characteristics, digestibility, and population of rumen microbes. However, these previous studies did not evaluate the contents of phytochemicals, ascorbic acid, and minerals from noni bagasse. In Mexico, Nayarit State is the main noni producer,¹⁷ whose production is mainly intended for juice extraction using the short-term drip-extraction method. However, a waste management problem arises for

Received: April 30, 2019

Revised: June 10, 2019

Accepted: June 11, 2019

Published: June 11, 2019

the noni juice producers, because a large amount of waste is discarded. Although much research has been done to qualitatively and quantitatively determine the phytochemical nature in noni juice,^{13,14} there is a lack of information about the compounds that remain in the noni bagasse. The generation of this knowledge could lead to further utilization of the noni bagasse as a source of ingredients that provides added value in the pharmaceutical and/or food industry. The aim of this study was to investigate, using mainly the UPLC–DAD–ESI-MS methodology, the phytochemical composition of noni bagasse obtained as a byproduct of the noni juice extraction process by means of the short-term drip-extraction method. To the best of our knowledge, this is the first study to investigate the phytochemical composition of noni bagasse.

MATERIALS AND METHODS

Plant Material. Noni fruit (*Morinda citrifolia* L.) were harvested at the pale-yellow very-hard maturity stage,¹⁸ from a commercial orchard in Nayarit, Mexico and transported to the laboratory of the Autonomous University of Sinaloa in Culiacan.

Reagents. All chemicals and solvents were HPLC or analytical grade. The following reagents were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA): HPLC standards, total dietary fiber kit, Folin–Ciocalteu's phenol reagent, aluminum chloride hexahydrate ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (we discourage the use of aluminum chloride anhydrous, because it reacts violently with water).

Sample Preparation. Fruit were washed with a 0.01% (v/v) sodium hypochlorite solution and kept at 23 °C for 4–5 days to reach the translucent-grayish, very-soft maturity stage,¹⁸ in which the fruit is sufficiently soft to freely release most of its juice. Subsequently, fruit were placed to drain their juice (~3.0 kg fruit per thermal container) into 7.8 L thermal containers at room temperature, and after a period of 8 days, the naturally drained juice was collected (short-term drip-extraction method). An additional easy-to-release juice was obtained by hand pressing the residue wrapped in cheesecloth. All the extracted juice was collected, and the solid residue containing residual moisture was referred to as noni bagasse. This bagasse was divided into bagasse with the seeds (WSB) and bagasse without the seeds (NSB). The noni juice (NJ), WSB, and NSB were freeze-dried, thoroughly milled, and stored at –20 °C until analysis.

Proximate Composition. The proximate composition was carried out by standard methods¹⁹ to analyze moisture (925.09), protein (960.52), ash (940.26), and fat (920.39). The carbohydrate content was calculated by difference.

Dietary Fiber. Total dietary fiber (TDF) and insoluble dietary fiber (IDF) were determined using the kit provided by Sigma (St Louis, MO, USA), according to AOAC method 985.29.¹⁹ This assay determines the total dietary fiber content using a combination of enzymatic and gravimetric methods. Soluble dietary fiber (SDF) was calculated by subtracting the IDF fraction from the TDF.

Mineral Analysis. The content of minerals was quantified according to the official AOAC method 955.06.¹⁹ Samples (1 g) were taken to ashes in a muffle furnace at 550 °C for 12 min, acid extracted, filtered, and taken to 100 mL with deionized water. The absorbance for each mineral was measured at specific wavelengths: Ca (422.7), Mg (285.2), K (769.9), Na (589.9), Fe (248.3), Mn (279.5), Cu (324.8), Zn (213.9), using an atomic absorption spectrophotometer (Agilent 240FS AA, Agilent Technologies, Malaysia). A calibration curve of reference standards was used for each mineral. Results were expressed in mg per 100 g of dry weight (mg/100 g dw).

pH, Titratable Acidity (TA), and Total Soluble Solids (TSS). AOAC methods¹⁹ were used to measure pH, TA, and TSS. The pH determination was done using a digital pH meter (model 520A, Beverly, MA), whereas TSS were quantified using a portable refractometer (ATAGO, Co. Ltd., Tokyo, Japan) and expressed in °Bx.

Ascorbic Acid (AA). Ascorbic acid was analyzed spectrophotometrically at 520 nm as previously reported.²⁰ This method

determines the amount of DCPI (2,6-dichlorophenol-indophenol) that is reduced by the ascorbic acid contained in the sample, and this is compared to that reduced by the ascorbic acid of a standard solution. The sample preparation was as follows: 0.5 g of fresh sample and 15 mL of oxalic acid (0.4% w/v) were homogenized using an Ultra-Turrax (IKA T18 basic Ultra-Turrax, Germany) and then filtered. A mixture of 1 mL of sample extract, 1 mL of acetate buffer, and 8 mL of DCPI solution was prepared, and its absorbance at 520 nm was recorded 15 s after the addition of DCPI. The whole procedure was carried out in the dark. A calibration curve was done with concentrations ranging from 10 to 50 mg AA/L. The curve was constructed by plotting L1–L2 values versus a range of AA concentrations, where L1 is the initial absorbance of the total DCPI, and L2 is the absorbance of the remaining DCPI after having reacted with AA. The results were expressed as mg of ascorbic acid per g of dry matter (mg AA/g dw) and in mg of ascorbic acid per 100 g of fresh weight (mg AA/100 g fw). An extended version of the methodology for the determination of ascorbic acid is shown in the Supporting Information.

Free, Bound, and Total Phenolic Content. Extraction of free-phenolic compounds was done according to a previously reported method, with some modifications.²¹ Freeze-dried powder sample (0.5 g) was homogenized in 5 mL of methanol. The mixture was exposed for 20 min in a Bransonic 3510 sonicator (Bransonic Ultrasonic Co., Danbury, CT) and then centrifuged at 3200g for 15 min at 2 °C. After centrifugation, the supernatant was recovered, and the extraction process was repeated 3-fold on the pellet. The three recovered supernatants were combined and evaporated at 40 °C in a rotary evaporator. The concentrate was resuspended in 2 mL of methanol, sonicated for 5 min, and filtered through a 0.45 μm PVDF filter (Thermo Scientific, Valley Road Rockwood, TN). This latter extract was named the free-phenolics extract, whereas the pellet obtained after centrifugation was used to obtain the bound-phenolics extract, as follows: the pellet was washed with 10 mL of hexane to remove lipids. After removal of hexane, the residue was hydrolyzed with 10 mL of 2 M NaOH for 30 min at 60 °C using a water bath. The sample was kept until reaching room temperature. HCl was added to neutralize the solution, and the solution was extracted four times with 20 mL of ethyl acetate. The ethyl acetate fractions were combined and evaporated until dryness and finally resuspended in 2 mL of methanol.²² The phenolic content was quantified in both free-phenolics and bound-phenolics extracts according to the Folin–Ciocalteu spectrophotometric method described previously.²³ A 0.5 mL aliquot of deionized water, 125 μL of the extract, and 125 μL of Folin–Ciocalteu reagent were mixed and kept for 6 min at room temperature. Then, 1.25 mL of 7% Na_2CO_3 and 1 mL of deionized water were added. The mix was kept for 1.5 h in the dark, and the absorbance was measured at 750 nm using a spectrophotometer (GENESYS 10 UV, Madison, MI). A calibration curve of gallic acid in methanol was used as a standard (0 to 0.3 mg/mL). Results were expressed as mg of gallic acid equivalents per g of dry matter (mg GAE/g dw). The total phenolics (TP) were calculated as the sum of the free- and bound-phenolic contents.

Total Flavonoid Content. The method of aluminum chloride was used to determine the total flavonoid content of the extracts, as previously reported,²⁴ with some modifications. Briefly, 1 g of freeze-dried powder samples were homogenized in 20 mL of 80% acetone. After homogenization, centrifugation, and evaporation, the concentrate was resuspended in 25 mL of methanol. This was further increased to 50 mL with HPLC grade water and filtered through a 0.45 μm nylon membrane. A 20 μL aliquot of the extract was placed in each well of a 96-well plate, and then, 100 μL of distilled water, 60 μL of methanol, 10 μL of 4% aluminum chloride ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) solution, and 10 μL of 0.4 M potassium acetate were added. The plate was then kept at room temperature for 30 min in the dark, and the absorbance was read at 415 nm using a Spectra Max 250 microplate reader (Molecular Devices, USA). The concentration of flavonoids was calculated using a standard curve of quercetin (0 to 0.3 mg/mL) and expressed as mg of quercetin equivalents per g of dry matter (mg QE/g dw).

Table 1. Chemical Composition of Noni Bagasse with Seed (WSB) and without Seed (NSB) as Well as Noni Juice (NJ)^a

	WSB	NSB	NJ
moisture (%)	82.27 ± 0.81 c	88.09 ± 0.12 b	94.08 ± 0.05 a
protein (%)	5.90 ± 0.25 a	5.35 ± 0.42 b	3.29 ± 0.28 c
fat (%)	3.75 ± 0.01 a	0.67 ± 0.03 b	0.02 ± 0.00 c
ash (%)	4.70 ± 0.41 c	7.77 ± 0.30 b	10.62 ± 1.08 a
carbohydrates (%)	85.64 ± 0.47 a	86.20 ± 0.54 a	86.06 ± 1.11 a
TDF (%)	60.31 ± 2.67 a	48.16 ± 1.32 b	14.18 ± 1.48 c
IDF (%)	48.22 ± 1.43 a	29.01 ± 0.68 b	0.76 ± 0.14 c
SDF (%)	12.08 ± 0.76 b	19.14 ± 0.99 a	13.41 ± 1.75 b
IDF/SDF	4:1	1.5:1	0.05:1
pH	3.88 ± 0.10 a	3.84 ± 0.04 a	3.7 ± 0.08 b
titratable acidity (%)	0.68 ± 0.02 b	0.69 ± 0.01 b	0.80 ± 0.02 a
total soluble solids (°Bx)	8.07 ± 0.21 b	9.18 ± 0.32 a	7.44 ± 0.32 c
K (mg/100 g dw)	1124.24 ± 19.08 c	1886.82 ± 92.98 b	3148.57 ± 122.39 a
Ca (mg/100 g dw)	316.09 ± 26.06 b	478.78 ± 48.41 a	182.04 ± 7.14 c
Na (mg/100 g dw)	72.72 ± 5.3 c	98.91 ± 4.4 b	133.41 ± 4.6 a
Mg (mg/100 g dw)	148.89 ± 1.5 b	204.35 ± 11.7 a	199.33 ± 14.5 a
Fe (mg/100 g dw)	6.2 ± 1.2 ab	7.6 ± 2.2 a	4.0 ± 0.6 b
Mn (mg/100 g dw)	2.06 ± 0.2 b	2.79 ± 0.32 a	1.18 ± 0.12 c
Zn (mg/100 g dw)	2.8 ± 0.4 b	3.5 ± 0.2 a	3.5 ± 0.1 a
Cu (mg/100 g dw)	1.2 ± 0.13 a	1.1 ± 0.08 a	1.2 ± 0.11 a
ascorbic acid (mg/g dw)	2.53 ± 0.42 c	5.12 ± 0.61 b	16.06 ± 0.81 a

^aValues are presented as means ± standard deviation ($n = 3$). Different letters in each row mean significant difference between samples using LSD test ($p < 0.05$).

Condensed Tannins (CT). Condensed tannins were evaluated as reported by Price et al.²⁵ Samples of 0.5 g of freeze-dried powder were mixed with 10 mL of acidified methanol (4% concentrated HCl in methanol). The mixture was continuously shaken in a test tube rocker at room temperature for 20 min. The extracts were then centrifuged at 3220g for 45 min at 25 °C. After centrifugation, 5 mL of vanillin reagent, added one by one at 1 min intervals, were mixed with 1 mL aliquots of supernatant (vanillin reagent: equal volumes of 1% vanillin in methanol and 8% concentrated HCl in methanol). The reaction mixture was placed in a water bath at 30 °C for 20 min, and then, the absorbance was read at 500 nm (GENESYS 10 UV, Madison, MI). Catechin was used as the standard, and condensed tannin content was expressed as mg of catechin equivalents per g of dry matter (mg CE/g dw).

Total Carotenoids (TC). TC were extracted according to Ornelas-Paz et al.²⁶ with some modifications. A total of 0.5 g of freeze-dried sample and 0.2 g of calcium carbonate were homogenized with 20 mL of methanol for 1 min using an Ultra-Turrax model T25 basic homogenizer (IKA Works, Wilmington, NC). The homogenate was vacuum-filtered through a Whatman paper No. 3, and the solid residue was washed until colorless (two washes with 20 mL of methanol, followed by two washes with 20 mL of a mixture of hexane: acetone 1:1, v/v, containing 0.1% of BHT). The filtrate was transferred to a separation funnel containing 40 mL of 10% sodium sulfate and shaken vigorously for 1 min and then washed three times with 50 mL of distilled water. The mix was then kept for 15 min to phase separation, and the upper phase was collected and evaporated at 40 °C in a rotary evaporator. The residue was dissolved in 3 mL of acetone and filtered through a 0.45 μm nylon membrane. TC quantification was measured in a Beckman DU-65 spectrophotometer at 450 nm. A calibration curve was done using β-carotene in acetone as the standard. Results were expressed as μg of β-carotene equivalents per g of dry matter (μg βCE/g dw). Furthermore, aliquots of filtered extracts of carotenoids (20 μL) were directly injected into the HPLC system.

Identification and Quantification of Carotenoids by HPLC–DAD. Carotenoids were identified using the HPLC method described previously.²⁷ Samples (20 μL) containing carotenoids were automatically injected into an HP 1100 series HPLC system (HP 1100, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), equipped with a diode array

detector (DAD). A reversed-phase C₃₀ column (4.6 × 150 mm, 3 μm) (YMC Inc., Milford, MA) at 15 °C was used. The mobile phase was composed of water (A), methanol (B), and methyl *tert*-butyl ether (MTBE) (C) at a flow rate of 0.75 mL/min. The elution gradient was as follows: at 0 min (4% A, 94.5% B, 1.5% C), at 31 min (4% A, 68% B, 28% C), at 52 min (4% A, 53% B, 43% C). Carotenoids were monitored at 441, 447, and 452 nm. Identification of carotenoids was carried out by comparing the peak chromatographic data versus respective standard data (retention times and visible spectral characteristics). Quantification of β-carotene and lutein was carried out with calibration curves constructed with five concentration levels of high purity standards.

Identification and Quantification of Phenolic and Iridoid Compounds by UPLC–DAD–ESI-MS. Aliquots (5 μL) of the free-phenolics extracts previously filtered through a cartridge Chromafix SPE (Macherey-Nagel, Düren Germany) were injected into an Accela UPLC–DAD system (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA) coupled to an LTQ XL mass spectrometer (Thermo Scientific, Waltham, MA). The phenolic and iridoids compounds were separated using a C₁₈ column (3 μm, 50 × 2.1 mm) (Fortis Technologies Ltd., Neston, Cheshire, United Kingdom). The mobile phase consisted of water acidified with 1% formic acid (solvent A) and acetonitrile (solvent B), following a linear gradient from 99.5% A and 0.5% B to 40% A and 60% B in 40 min using a flow rate of 0.2 mL/min. The detection was recorded at 280, 320, and 350 nm. The mass spectrometer system was equipped with an electrospray interface operating in both negative and positive ionization modes, with a capillary voltage and temperature of 35 V and 300 °C, respectively. A software Xcalibur 2.2 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA) in full-scan mode was used within the range of m/z 110–2000. The phenolic and iridoid compounds were identified by comparing their retention times, and mass spectra with those obtained from standard solutions, when available. Otherwise, the peaks were tentatively identified by comparing the obtained information with available data reported in the literature. Quantification was carried out using calibration curves of commercial standards (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), and the results were expressed as μg per g of sample on a dry weight basis (μg/g dw). For the phenolic compounds for which a commercial standard was not available, the quantification was

performed through the calibration curve of another compound of the same phenolic group.

Statistical Analysis. Statistical analysis was performed using StatGraphics 5.1. Fisher's least significant difference (LSD) test was performed to identify significant differences among samples.

RESULTS AND DISCUSSION

In the present study, the results of both types of bagasse (WSB and NSB) are emphasized, whereas noni juice was taken into account mostly as a benchmark.

Proximate Composition. The results of the proximate composition are shown in Table 1. There were significant differences ($p < 0.05$) among all the samples (WSB, NSB, and NJ) for all the parameters of proximate composition, except for carbohydrates. WSB had the least moisture content (82.27%) followed by NSB (88.09%) and by NJ (94.08%). This relatively high level of moisture in bagasse reflects a significant water retention capacity. A high moisture content (92.3%) has been reported in strawberry pomace.²⁸ Among all the studied samples, WSB showed the highest protein and lipid contents with 5.90 ($p < 0.05$) and 3.75% ($p < 0.05$) in dry weight, respectively, whereas NSB had 5.35% proteins and 0.67% lipids. NJ had the least amounts of proteins and lipids. Comparing both types of bagasse, it is noticed that the noni seeds contributed to the high protein and lipid content of the WSB. In the case of lipids, the high fat content of WSB may be attributed to the high lipid content of noni seeds, which has been reported to be 12.5%.²⁹ Ashes were easily leached during the juice extraction, and NJ had the highest value (10.62% dw), followed by NSB (7.77% dw) and WSB (4.70% dw). NSB and WSB had 73 and 44% of the ash content of noni juice, respectively. Hence, important amounts of ashes remained in both types of bagasse. NSB had an ash content similar to what was previously reported for noni bagasse (8.8%).¹⁵

Dietary Fiber. Dietary fiber is composed of lignin, nondigestible polysaccharides, and nondigestible oligosaccharides, which are resistant to being digested and absorbed by the human small bowel, with partial or complete fermentation in the large intestine.³⁰ The contents of TDF, IDF, and SDF are shown in Table 1. TDF showed significant differences ($p < 0.05$) among all the samples (WSB, NSB, and NJ). WSB had the greatest content of TDF (60.31% dw), followed by NSB (48.16% dw). WSB and NSB had about 4- and 3-fold higher TDF contents than NJ, respectively. IDF also exhibited significant differences among all the samples. WSB presented the highest content (48.22% dw), followed by NSB (29.01% dw). WSB and NSB had about 63- and 38-fold higher IDF levels than NJ, respectively. In the case of SDF, only WSB and NJ were not significantly different. NSB had the greatest content of SDF, approximately 1.5-fold higher than that of WSB or NJ. The high TDF and IDF contents in WSB are believed to be due to the presence of the seeds. It has been reported previously²⁹ that noni seeds contain 79% dw of TDF. In addition, noni seeds have been reported to contain 38 times more insoluble fiber than soluble fiber.³¹ Out of the TDF content in noni juice, 94.6% corresponded to SDF. This high proportion of SDF in the juice is due to the high leaching of water-soluble polymers during juice extraction. As expected, the IDF content in bagasse is higher than the SDF content, presenting an IDF/SDF ratio of 4:1 and 1.5:1 for WSB and NSB, respectively (Table 1). Similar results for NSB were reported previously with IDF/SDF ratios of 1.81:1 and 1.35:1 in peach and mango juice byproducts, respectively. Further-

more, a ratio of 17.46:1 in guava was due to its high IDF content in seed.³² The dietary reference intake (DRI) of dietary fiber is 25 and 38 g per day for adult women and men, respectively.³³ Servings of 41 g for women and 63 g for men of WSB and 52 g for women and 79 g for men of NSB provide this DRI. Therefore, both types of bagasse can be used as a source of dietary fiber for the development of functional foods. Dietary fiber is generally recognized for its properties in promoting an increase in stool bulk, a reduction in intestinal transit time, and a decrease in blood levels of total cholesterol, postprandial glucose, and insulin.³⁴

Minerals. The mineral composition of the noni samples is presented in Table 1. In all the samples, potassium was the predominant element among the eight minerals analyzed. Potassium was the major mineral observed in different noni products such as juice³⁵ and puree.⁷ Noni juice had the highest potassium content (3148.57 mg/100 g dw). Between both types of bagasse, NSB had the highest potassium content (1886.82 mg/100 g dw). This level represents more than 50% of the potassium content of the juice and 4% of the dietary reference intake for adults, considering a portion of 10 g of dry matter.³⁶ The second most abundant mineral was calcium. Both types of bagasse had greater calcium content than noni juice, showing 478.78 and 316.09 mg/100 g dw of calcium for NSB and WSB, respectively, whereas noni juice had 182.04 mg/100 g dw. In our study, manganese was the only mineral present in nutritionally significant amounts. Similar results were previously reported for noni puree.⁷ In this context, both types of bagasse contribute more than 10% of the DRI of manganese in a portion of 10 g of dry matter, whereas noni juice contributes 6.5 and 5.1% of the dietary reference intake for adult women (DRI 1.8 mg/day) and men (DRI 2.3 mg/day), respectively.³⁷ The manganese content of both types of bagasse is about 75% of a previous report for noni puree (0.47 mg/100 g fw).⁷ It can be noticed that in most analyzed minerals, WSB had significantly less mineral content ($p < 0.05$) than NSB. This is because noni seeds possess less mineral content than noni pericarp.³¹ According to our estimation, seeds represent about 31% of the total mass of the WSB.

pH, Titratable Acidity (TA), and Total Soluble Solids (TSS). Both types of bagasse had higher pH levels and lower TA values than noni juice. NSB had the highest level of TSS, followed by WSB (Table 1). Concerning pH and TA, there were no differences between both types of bagasse, and because both have pH levels lower than 4.6, they can be considered acidic products. On the other hand, both types of bagasse, after the juice extraction process, remained with relatively high TSS levels (8.07–9.18 °Bx), when compared to the whole noni fruit (12 °Bx) as previously reported.¹⁸

Ascorbic Acid (AA). Noni juice had an ascorbic acid content of 16.06 mg AA/g dw, followed by NSB and WSB, with 5.12 and 2.53 mg AA/g dw, respectively (Table 1). Most of the ascorbic acid was separated from the pericarp during the juice extraction; however, important contents of ascorbic acid still remained in both types of bagasse. Powdered 10 g servings of WSB and NSB contribute 28 and 57% of the DRI of vitamin C for adult men,³⁸ respectively. The content of ascorbic acid in both types of bagasse (44 and 61 mg AA/100 g fw for WSB and NSB, respectively) is higher than the levels previously reported for fresh noni fruit,^{39,40} on a wet basis.

Free Phenolics (FP). In the present study, the free-phenolic content represents the contribution from both nonconjugated and conjugated soluble phenolics extracted by

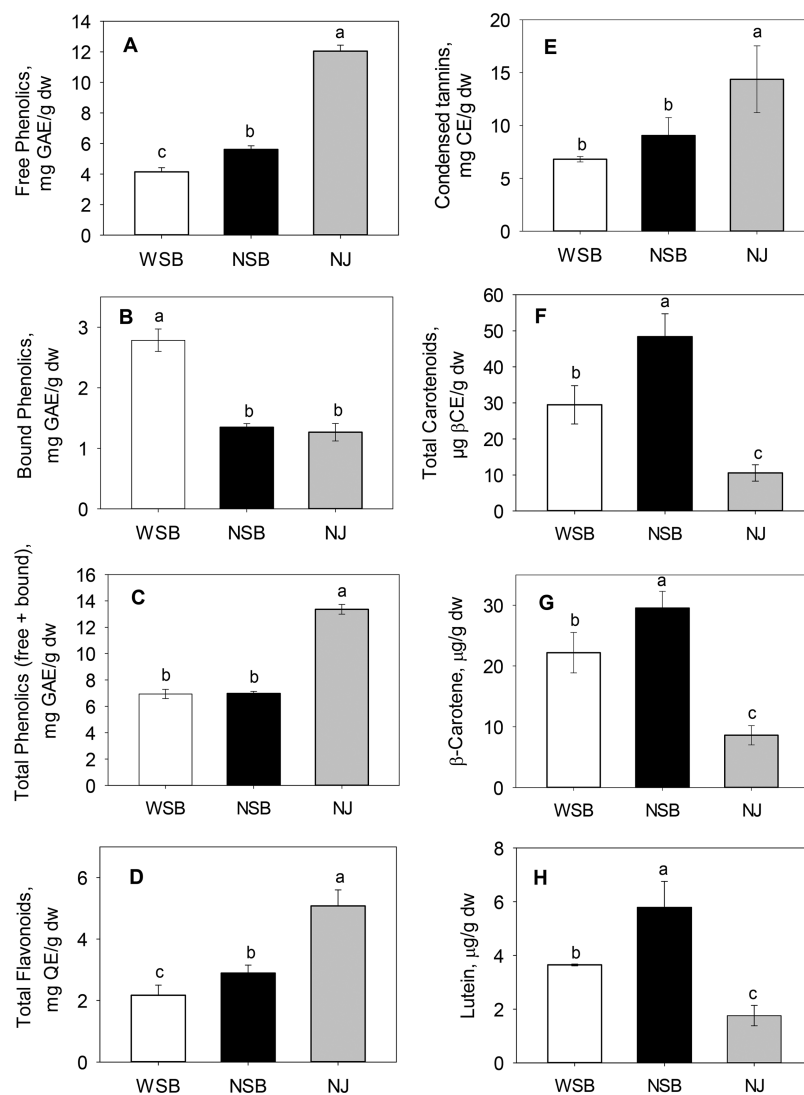


Figure 1. Phytochemical content in bagasse with seeds (WSB), bagasse without seeds (NSB), and noni juice (NJ). Free phenolics (A), bound phenolics (B), total phenolics (free + bound) (C), total flavonoids (D), condensed tannins (E), total carotenoids (F), β -carotene content (G), and lutein content (H).

methanol. Noni juice had the highest FP content (12.05 mg GAE/g dw) followed by NSB and WSB, with 5.61 and 4.14 mg GAE/g dw, respectively (Figure 1A). During the extraction process, most of the FP were leached from the pericarp as part of the noni juice, which could have been due to their hydrophilic properties. In relation to juice FP content, bagasse had 34 and 47% for WSB and NSB, respectively. These levels are still important and similar to the contents reported as total phenol (these are free phenolics according to the methodology) for apple pomace (5.51 mg GAE/g dw) obtained by methanol extraction.⁴ Approximate results were reported for naranjita pomace (9.6 mg GAE/g dw) extracted by an acetone-aqueous solution.⁴¹ In addition, our FP were lower than those of raspberry pomace but higher than those of cranberry pomace.⁴² Furthermore, our FP results in bagasse in fresh weight (73.5 and 66.9 mg GAE/100 g fw for WSB and NSB, respectively) were higher than those for some flesh fruits such as lemon, peach, orange, banana, pear, and pineapple, whose values oscillated from 40.4 to 66.3 mg/100 g fw.⁴³ Dietary intake of soluble phenolics may promote a human health

benefit by inhibiting the oxidation of both liposome and LDL cholesterol.⁴⁴

Bound Phenolics (BP). In this study, the bound phenolics represent the phenolics released by alkaline hydrolysis from the remaining pellet obtained after the methanol extraction of soluble phenolics (free phenolics). WSB had twice the BP content (2.79 mg GAE/g dw) with respect to NSB (1.35 mg GAE/g dw) and also with respect to NJ (1.31 mg GAE/g dw) (Figure 1B). These latter did not show a significant difference between them. Our results suggested that noni seeds contributed to the increased content of bound phenolics in the WSB. Seeds from fleshy fruits have shown to be important sources of bound phenolics; for instance, seeds from red-skinned passion fruit, longan, rambutan, white-flesh dragon fruit, and red-flesh dragon fruit showed a high contribution of BP to the total phenolic content (62–77%), whereas mango seed exhibited a low contribution (9.5%).⁴⁵ Certainly, the levels of the bound phenolics in our bagasse are quite low in comparison to the content of bound phenolics from grape juice byproducts (skin, seeds, and stems), which were 75-fold higher than those in our bagasse.⁴⁶ It has been suggested that the

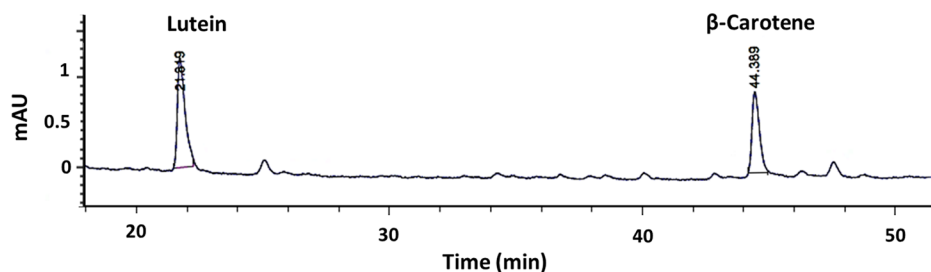


Figure 2. HPLC–DAD chromatogram for carotenoids from bagasse with seeds at 452 nm.

dietary intake of bound phenolics possesses preventive activity against colon cancer.⁴⁷

Total Phenolics (TP). TP is the sum of free and bound phenolics. NJ had the highest content (13.36 mg GAE/g dw), whereas there was no significant difference between WSB (6.93 mg GAE/g dw) and NSB (6.96 mg GAE/g dw) (Figure 1C). Our TP levels are much lower than those found in grape byproducts (381 mg GAE/g dw).⁴⁶ However, our results in both bagasse (82.9 and 79.1 mg GAE/g fw for WSB and NSB, respectively) were higher than those reported for some fleshy fruits such as pear (70.6 mg/100 g fw) and grape (49.6 mg/100 g fw).⁴³ Most of the previous research on phenolics in fruit bagasse included only free soluble phenolics in the analysis (excluding bound phenolics). In our results, free phenolics were dominant over bound phenolics. They accounted for 60, 80, and 90% of the total phenolics in WSB, NSB, and NJ, respectively. Other studies in fruits have also found that most of their phenolic compounds are in free form (about 76.5%).⁴³ On the other hand, WSB had the highest proportion (40%) of bound phenolics, among our three samples. As mentioned above, these results suggested that the noni seeds possess a higher bound-phenolic content than the noni pericarp. These results are in agreement with those of de Camargo et al.,⁴⁶ who reported a high contribution of the bound forms (55%) to the total phenolic content of grape byproducts, wherein grape seeds are a copious part. Furthermore, citrus pomace presented a low contribution of bound phenolics (32%) to the total phenolic content, which could be due to the absence of seeds in this pomace.²²

Total Flavonoid Content. Noni juice had the highest flavonoid content (5.06 mg QE/g dw) followed by NSB and WSB, with 2.9 and 2.17 mg QE/g dw, respectively (Figure 1D). In relation to the content found in juice, the flavonoid content in the bagasse ranged from 43 to 57%. Moreover, the content of total flavonoids in the bagasse was about 2- to 3-fold higher than that reported previously for apple pomace⁴⁸ when expressed in the same manner. Flavonoids have shown beneficial properties on human health, because they possess antibacterial, antihypertensive, antidiabetic, anti-inflammatory, and anticancer activities, among others.⁴⁹ They have an effective capacity as scavengers of most oxidizing molecules, such as singlet oxygen, and other free radicals.⁴⁹

Condensed Tannins (CT). The CT content in noni juice was 14.37 mg CE/g dw, a content significantly higher than that found in both types of bagasse (9.05 and 6.81 mg CE/g dw for NSB and WSB, respectively), which showed no significant difference between them (Figure 1E). Although CT were mostly leached from pericarp as part of the noni juice, a great proportion of them remained in the bagasse, 63% in NSB and 47% in WSB. In comparison to the CT found in pomaces of four white grape varieties (50–92 mg/g dw),⁵ CT levels in

noni were 7- to 9-fold lower. However, our results on a wet basis correspond to intermediate levels (120.76 and 107.89 mg CE/100 g fw for WSB and NSB, respectively), according to those reported for fresh fruits (grape and apple) whose CT values ranged from 40 to 213 mg/100 g fw.⁵⁰ A great deal of attention has been paid to proanthocyanidins because of their potential beneficial properties for human health, encompassing anticancer, immunomodulatory, anti-inflammatory, antioxidant, cardioprotective, and antithrombotic activities.⁵¹

Total Carotenoids (TC). There were significant differences ($p < 0.05$) in the TC content among all the samples (Figure 1F). NSB had the highest content (48.37 $\mu\text{g } \beta\text{CE/g dw}$), whereas NJ exhibited the lowest amount (10.59 $\mu\text{g } \beta\text{CE/g dw}$). Between the types of bagasse, NSB was 1.6-fold higher in carotenoid content than WSB, on a dry basis. Palioto et al.⁴⁰ reported 0.45 mg/100 g fw for TC in noni pulp, which is slightly lower than our results for bagasse when expressed in the same manner, 0.52 and 0.57 mg/100 g fw for WSB and NSB, respectively. As expected, the carotenoid content in both types of bagasse was remarkably higher than in the juice because of the lipophilic character of the carotenoids, which are preferably kept in the bagasse matrix instead of being leached during the juice extraction. Carotenoids are bioactive compounds of the diet that provide protection against degenerative conditions that include cardiovascular diseases, chronic liver diseases, diabetes, cancer, and macular degeneration.⁵² Carotenoids are antioxidants with great ability to quench singlet oxygen and scavenge the peroxy radical.⁵²

β -Carotene and Lutein Content. Two peaks were identified and quantified by HPLC–DAD and corresponded to β -carotene and lutein. (Figures 2 and 1G,H). β -Carotene content was significantly different ($p < 0.05$) among all the samples. NSB had the highest content (29.53 $\mu\text{g/g dw}$), whereas NJ had the lowest amount (8.60 $\mu\text{g/g dw}$). A similar pattern was observed for lutein, but the content was relatively low in all samples, showing 5.78, 3.64, and 1.76 $\mu\text{g/g dw}$, for NSB, WSB, and NJ, respectively. β -Carotene content was 5- to 6-fold higher than lutein content for any of the samples (NSB, WSB, and NJ). Lutein and β -carotene appeared as well-defined peaks at 21.8 and 44.3 min of retention time, respectively. Other peaks appearing in the chromatogram at 25.1 and 47.4 min are very small, and their absorption spectra are not clearly defined (Figure 2). Servings of 10 g dw of NSB, WSB, and NJ provide the 16.4, 12.3, and 4.8% of the daily recommended intake for vitamin A for an adult male (300 RE according to FAO/WHO), respectively, as calculated from the content of β -carotene.⁵³ Vitamin A is essential for normal vision and immunity of humans and animals.⁵² On the other hand, servings of 10 g dw of NSB, WSB, and NJ provide, respectively, 0.6, 0.4, and 0.2% of the recommended levels of lutein for eye health (10 mg/day) set by the American Optometric

Table 2. Phenolic and Iridoid Compounds Identified in Methanol Extracts of Noni Bagasse and Juice by UPLC–DAD–ESI-MS

no.	RT ^a (min)	fragment ions	tentative fragment description	identified compound	type of compound
1	3.51	389 [390 – H] [–]	deprotonated molecular ion	deacetylasperulosidic acid ^b	iridoid
		227 [390 – H – 162] [–]	DAA minus dehydrated glucosyl moiety		
		209 [390 – H – 162 – 18] [–]	DAA minus dehydrated glucosyl moiety, minus water		
		183 [390 – H – 162 – 44] [–]	DAA minus dehydrated glucosyl and carboxylic moieties		
2	9.63	137 [(138 – H) [–]	deprotonated molecular ion	<i>p</i> -hydroxybenzoic acid ^c	hydroxybenzoic acid
3	13.19	577 [578 – H] [–]	deprotonated molecular ion	procyanidin B-type dimer ^b	flavan-3-ol
		451 [578 – H – 126] [–]	loss of the A-ring (phloroglucinol)		
		425 [578 – H – 152] [–]	loss of 152 amu		
		407 [578 – H – 152 – 18] [–]	loss of a water molecule from the fragment <i>m/z</i> 425		
		289 [578 – H – 288] [–]	loss of an (epi)catechin molecule		
		245 [578 – H – 288 – 44] [–]	loss of CH ₂ , CH, and OH from the C ring of (epi) catechin		
4	14.3	431 [432 – H] [–]	deprotonated molecular ion	asperulosidic acid ^b	iridoid
		269 [432 – H – 162] [–]	AA minus dehydrated glucosyl moiety		
		251 [432 – H – 180] [–]	AA minus dehydrated glucosyl moiety and minus one water molecule		
5	14.81	515 [516 – H] [–]	deprotonated molecular ion	caffeoylquinic-acid-hexoside ^b	hydroxycinnamic acid
		353 [516 – H – 162] [–]	loss of the hexoside moiety		
		341 [516 – H – 174] [–]	loss of the quinic acid moiety		
		323 [516 – H – 174 – 18] [–]	loss of quinic acid moiety and water		
		191 [516 – H – 162 – 162] [–]	loss of the hexoside and caffeoyl moieties		
		179 [516 – H – 174 – 162] [–]	loss of the hexoside and quinic acid moieties		
6	18.55	191 [192 – H] [–]	deprotonated molecular ion	coumarin derivative I ^b	coumarin
		176 [192 – H – 15] [–]	loss of one methyl group		
		148 [192 – H – 28 – 15] [–]	loss of the carbonyl and methyl moieties		
		133	undefined		
7	21.15	191 [192 – H] [–]	deprotonated molecular ion	coumarin derivative II ^b	coumarin
		176 [192 – H – 15] [–]	loss of one methyl group		
		148 [192 – H – 28 – 15] [–]	loss of the carbonyl and methyl moieties		
8	22.7	191 [192 – H] [–]	deprotonated molecular ion	scopoletin ^c	coumarin
		176 [192 – H – 15] [–]	loss of one methyl group		
		163 [192 – H – 28] [–]	loss of one carbonyl group		
		148 [192 – H – 28 – 15] [–]	loss of one methyl group from the fragment at <i>m/z</i> 163		
9	23.44	163 [164 – H] [–]	deprotonated molecular ion	<i>p</i> -coumaric acid ^c	hydroxycinnamic acid
		119 [164 – H – 44] [–]	loss of carbon dioxide		
10	25.68	193 [194 – H] [–]	deprotonated molecular ion	ferulic acid ^c	hydroxycinnamic acid
		149 [194 – H – 44] [–]	loss of carbon dioxide		
		117	undefined		
11	27.18	223 [224 – H] [–]	deprotonated molecular ion	sinapic acid ^c	hydroxycinnamic acid
		208 [224 – H – 15] [–]	loss of one methyl group		
		193 [224 – H – 15 – 15] [–]	loss of two methyl groups		
		179 [224 – H – 44] [–]	loss of carbon dioxide		
12	27.72	741 [742 – H] [–]	deprotonated molecular ion	quercetin-3- <i>O</i> -rutinoside-7- <i>O</i> -pentoside ^b	flavonol
		609 [742 – H – 132] [–]	loss of a pentose		
		301 [742 – H – 132 – 308] [–]	loss of both pentosyl and rutinosyl moieties		
13	28.45	609 [610 – H] [–]	deprotonated molecular ion	quercetin-3- <i>O</i> -rutinoside (rutin) ^c	flavonol
		301 [610 – H – 308] [–]	loss of a rutinosyl moiety		
		300	quercetin derivative		
		179 [610 – H – 308 – 122] [–]	derived from the retro Diels–Alder mechanism		
		151 [610 – H – 308 – 122 – 28] [–]	derived from the retro Diels–Alder mechanism		
		609 [610 – H] [–]	deprotonated molecular ion		
14	29.14	609 [610 – H] [–]	deprotonated molecular ion	quercetin-hexose-deoxyhexose ^b	flavonol
		301 [610 – H – 308] [–]	loss of the hexose-deoxyhexose moiety		
		300	quercetin derivative		

Table 2. continued

no.	RT ^a (min)	fragment ions	tentative fragment description	identified compound	type of compound		
15	29.75	179 [610 – H – 308 – 122] [–]	derived from the retro Diels–Alder mechanism	kaempferol-3- <i>O</i> -rutinoside ^b	flavonol		
		151 [610 – H – 308 – 122 – 28] [–]	derived from the retro Diels–Alder mechanism				
		593 [594 – H] [–]	deprotonated molecular ion				
		447 [594 – H – 146] [–]	loss of the deoxyhexose moiety				
		285 [594 – H – 146 – 162] [–]	loss of the rutinosyl moiety				
16	30.13	255	undefined	isorhamnetin-3- <i>O</i> -rutinoside ^b	flavonol		
		623 [624 – H] [–]	deprotonated molecular ion				
		477 [624 – H – 146] [–]	loss of a deoxyhexose (rhamnose)				
		459 [624 – H – 146 – 18] [–]	loss of rhamnose and water				
17	30.82	315 [624 – H – 146 – 162] [–]	loss of the rutinosyl moiety	rosmarinic acid ^b	hydroxycinnamic acid		
		359 [360 – H] [–]	deprotonated molecular ion				
		197 [360 – H – 162] [–]	loss of the dehydrated caffeic acid moiety				
		179 [360 – H – 180] [–]	loss of the dehydrated salvianic acid A moiety				
		161 [360 – H – 180 – 18] [–]	loss of one water molecule and/or and/or				
		161 [360 – H – 162 – 18 – 18] [–]	simultaneous loss of two water molecules				
		135 [360 – H – 180 – 44] [–]	loss of carbon dioxide				
		301 [302 – H] [–]	deprotonated molecular ion			quercetin ^c	flavonol
		179 [610 – H – 308 – 122] [–]	derived from the retro Diels–Alder mechanism				
		151 [610 – H – 308 – 122 – 28] [–]	derived from the retro Diels–Alder mechanism				

^aRT = retention time. ^bIdentified tentatively. ^cIdentified using standard. DAA: deacetylasperulosidic acid, AA: asperulosidic acid.

Association.⁵⁴ Lutein is a nutraceutical due to its potential effects on human health, for instance, the prevention of macular degeneration and all the effects derived from its antioxidant properties.⁵⁵ There are very few reports of individual carotenoids in noni fruit. Lutein and β -carotene had been identified but not quantified in different developmental stages of noni fruit.⁵⁶

Phenolic and Iridoid Compounds Profile. A total of 16 phenolic compounds and 2 iridoids were identified, unambiguously or tentatively, in all the samples studied (WSB, NSB, and NJ) by means of UPLC coupled to ESI-MS (Table 2). The mass spectra analysis was performed using the negative ion mode; however, positive ion mode was used in some cases for verification purposes. The identification of a given compound was considered unambiguous when it was supported with data of its respective authentic standard, such as its retention time and its mass fragmentation pattern. Table 2 shows the retention time, fragmentation patterns, a tentative fragment description, the identified compound, and its classification for all the compounds identified either unambiguously or tentatively. From the total of the identified compounds, six were classified as phenolic acids, two as iridoids, three as coumarins, and seven as flavonoids. Among the phenolic acids, one was subclassified as hydroxybenzoic acid (*p*-hydroxybenzoic acid), and five were subclassified as hydroxycinnamic acids (caffeoylquinic-acid-hexoside, *p*-coumaric, ferulic, sinapic, and rosmarinic acids). Seven compounds were unambiguously identified: scopoletin, rutin, quercetin, *p*-hydroxybenzoic, *p*-coumaric, ferulic, and sinapic acids, whereas 11 compounds were tentatively identified based on their mass fragmentation patterns and the literature (Table 2). Among these 11 compounds, caffeoylquinic-acid-hexoside presented the following fragmentation pattern: *m/z* 515, 353, 341, 323, 191, and 179. The fragment at *m/z* 515 ([516 – H][–]) corresponds to the deprotonated molecular ion of caffeoyl-

quinic-acid-hexoside. The presence of the fragments *m/z* 341 and 323 suggests that the *m/z* of 515 corresponds to caffeoylquinic-acid-hexoside instead of dicaffeoylquinic acid, which possesses the same value of *m/z* 515 as reported previously.⁵⁷ The other compound tentatively identified was rosmarinic acid, which exhibited a deprotonated molecular ion at *m/z* 359 ([360 – H][–]) and the following fragmentation pattern: *m/z* 197, 179, 161, and 135. A similar fragmentation pattern was reported previously.⁵⁸ The fragment ion at *m/z* 197 ([360 – H – 162][–]), of which it is believed to be the salvianic ion, was formed by the loss of the dehydrated caffeic acid moiety, whereas the fragment ion at *m/z* 179 ([360 – H – 180][–]), which may be the caffeoyl ion, is the product of the loss of the dehydrated salvianic acid A moiety. In the case of the fragment *m/z* 161, we believe that this can be derived from two possible routes; one might be from the loss of one water molecule from the caffeoyl ion (179 – 18 = 161), and the other route might be from the simultaneous loss of two water molecules from the salvianic ion (197 – 18 – 18 = 161). Lastly, the fragment ion at *m/z* 135 is derived from the decarboxylation of the caffeoyl ion (179 – 44 = 135). On the other hand, two iridoids were tentatively identified: deacetylasperulosidic and asperulosidic acids. The deacetylasperulosidic acid exhibited an [M – H][–] ion at *m/z* 389 ([390 – H][–]) with the following fragmentation pattern: *m/z* 227, 209, and 183. Meanwhile, the asperulosidic acid showed a deprotonated molecular ion at 431 ([432 – H][–]) and fragments at *m/z* 269 and *m/z* 251. Similar fragmentation patterns for both iridoids have been reported previously.¹⁴ The two tentatively identified coumarins (coumarin derivative I and II) showed a similar fragmentation pattern to scopoletin, and because of that, we believe they are isomers of scopoletin (Table 2). The flavonol, quercetin-3-*O*-rutinoside-7-*O*-pentoside (rutin pentoside), was tentatively identified, because it presented the following fragmentation pattern: *m/z* 741, 609 and 301.⁵⁹ The fragment

Table 3. Content of Phenolic and Iridoid Compounds in Noni Bagasse with Seed (WSB) and without Seed (NSB) as Well as Noni Juice (NJ), Analyzed by UPLC–DAD–ESI-MS^a

	compound	WSB ($\mu\text{g/g dw}$)	NSB ($\mu\text{g/g dw}$)	NJ ($\mu\text{g/g dw}$)
1	deacetylasperulosidic acid	58.04 \pm 2.83 c	140.31 \pm 4.9 b	294.79 \pm 9.79 a
2	<i>p</i> -hydroxybenzoic acid	17.69 \pm 1.21 c	46.37 \pm 1.10 b	86.57 \pm 8.26 a
3	procyanidin B-type dimer	37.93 \pm 1.53 c	54.09 \pm 0.26 b	113.33 \pm 1.61 a
4	asperulosidic acid	93.28 \pm 0.23 c	193.31 \pm 2.6 b	499.89 \pm 27.61 a
5	caffeoylquinic-acid-hexoside	50.64 \pm 3.78 c	83.27 \pm 6.11 b	131.93 \pm 4.37 a
6	coumarine derivative I	13.47 \pm 0.49 c	44.83 \pm 2.45 b	61.15 \pm 0.58 a
7	coumarine derivative II	18.46 \pm 0.01 c	44.24 \pm 0.28 b	137.68 \pm 8.66 a
8	scopoletin	114.39 \pm 7.12 c	186.31 \pm 6.06 b	317.77 \pm 7.95 a
9	<i>p</i> -coumaric acid	0.96 \pm 0.08 c	5.91 \pm 0.00 b	12.84 \pm 0.63 a
10	ferulic acid	13.12 \pm 0.85 c	15.22 \pm 0.13 b	25.08 \pm 0.17 a
11	sinapic acid	23.39 \pm 0.05 c	44.78 \pm 0.04 b	71.82 \pm 3.74 a
12	quercetin-3- <i>O</i> -rutinoside-7- <i>O</i> -pentoside	9.77 \pm 0.05 c	17.07 \pm 0.14 b	40.03 \pm 1.88 a
13	quercetin-3- <i>O</i> -rutinoside (rutin)	81.47 \pm 3.51 c	126.58 \pm 0.94 b	206.58 \pm 3.66 a
14	quercetin-hexose-deoxyhexose	48.44 \pm 1.41 c	72.67 \pm 0.78 b	87.43 \pm 0.69 a
15	kaempferol-3- <i>O</i> -rutinoside	4.48 \pm 0.37 c	18.05 \pm 0.08 b	27.09 \pm 0.17 a
16	isorhamnetin-3- <i>O</i> -rutinoside	149.61 \pm 5.78 c	270.49 \pm 3.11 b	342.85 \pm 16.20 a
17	rosmarinic acid	62.02 \pm 3.43 c	199.31 \pm 5.01 b	530.75 \pm 30.44 a
18	quercetin	5.79 \pm 0.23 b	11.68 \pm 0.26 a	5.39 \pm 0.11b

^aValues are presented as means \pm error standard. Different letters in each row mean significant difference between samples using LSD test ($p < 0.05$). Compounds 1, 4, 5, and 17 were quantified with caffeic acid; 2 with *p*-hydroxybenzoic; 3 with catechin; 6, 7, and 8 with scopoletin; 9 with *p*-coumaric acid; 10 with ferulic acid; 11 with sinapic acid; 12, 13, and 14 with rutin; 15 with kaempferol; 16 with isorhamnetin, and 18 with quercetin.

Table 4. Abundance Order of the Phenolic and Iridoid Compounds Identified in Noni Bagasse with Seed (WSB) and without Seed (NSB) as Well as Noni Juice (NJ), Expressed in $\mu\text{g/g dw}$

abundance order	WSB	compound	NSB	compound	NJ	compound
1	149.61	isorhamnetin-3- <i>O</i> -rutinoside	270.49	isorhamnetin-3- <i>O</i> -rutinoside	530.75	rosmarinic acid
2	114.39	scopoletin	199.31	rosmarinic acid	499.89	asperulosidic acid
3	93.28	asperulosidic acid	193.31	asperulosidic acid	342.85	isorhamnetin-3- <i>O</i> -rutinoside
4	81.47	quercetin-3- <i>O</i> -rutinoside (rutin)	186.31	scopoletin	317.77	scopoletin
5	62.02	rosmarinic acid	140.31	deacetylasperulosidic acid	294.79	deacetylasperulosidic acid
6	58.04	deacetylasperulosidic acid	126.58	quercetin-3- <i>O</i> -rutinoside (rutin)	206.58	quercetin-3- <i>O</i> -rutinoside (rutin)
7	50.64	caffeoylquinic-acid-hexoside	83.27	caffeoylquinic-acid-hexoside	137.68	coumarin derivative II
8	48.44	quercetin-hexose-deoxyhexose	72.67	quercetin-hexose-deoxyhexose	131.93	caffeoylquinic-acid-hexoside
9	37.93	procyanidin B-type dimer	54.09	procyanidin B-type dimer	113.33	procyanidin B-type dimer
10	23.39	sinapic acid	46.37	<i>p</i> -hydroxybenzoic acid	87.43	quercetin-hexose-deoxyhexose
11	18.46	coumarin derivative II	44.83	coumarin derivative I	86.57	<i>p</i> -hydroxybenzoic acid
12	17.69	<i>p</i> -hydroxybenzoic acid	44.78	sinapic acid	71.82	sinapic acid
13	13.47	coumarin derivative I	44.24	coumarin derivative II	61.15	coumarin derivative I
14	13.12	ferulic acid	18.05	kaempferol-3- <i>O</i> -rutinoside	40.03	quercetin-3- <i>O</i> -rutinoside-7- <i>O</i> -pentoside
15	9.77	quercetin-3- <i>O</i> -rutinoside-7- <i>O</i> -pentoside	17.07	quercetin-3- <i>O</i> -rutinoside-7- <i>O</i> -pentoside	27.09	kaempferol-3- <i>O</i> -rutinoside
16	5.79	quercetin	15.22	ferulic acid	25.08	ferulic acid
17	4.48	kaempferol-3- <i>O</i> -rutinoside	11.68	quercetin	12.84	<i>p</i> -coumaric acid
18	0.96	<i>p</i> -coumaric acid	5.91	<i>p</i> -coumaric acid	5.39	quercetin

m/z 741 ($[742 - \text{H}]^-$) corresponds to the deprotonated molecule of rutin pentoside; 609 ($[742 - \text{H} - 132]^-$) is derived from the loss of a pentose, whereas the fragment 301 ($[742 - \text{H} - 132 - 308]^-$) proceeds from the loss of both pentosyl and rutinosyl moieties. Close to rutin, at the retention time of 29.14 min appeared a rutin isomer (quercetin-hexose-deoxyhexose) that matched the fragmentation pattern of rutin (Table 2). Kaempferol-3-*O*-rutinoside exhibited the deprotonated molecular ion m/z 593 ($[594 - \text{H}]^-$) and the fragments m/z 447 ($[594 - \text{H} - 146]^-$) and 285 ($[594 - \text{H} - 146 - 162]^-$), which are derived from the loss of a deoxyhexose and a

rutinosyl moiety, respectively. Isorhamnetin-3-*O*-rutinoside showed the deprotonated molecular ion m/z 623 ($[624 - \text{H}]^-$) and the fragment ions m/z 477, 459, and 315. The fragment m/z 477 ($[624 - \text{H} - 146]^-$) corresponds to isorhamnetin hexoside ion, whereas the fragments m/z 459 ($[624 - \text{H} - 146 - 18]^-$) and 315 ($[624 - \text{H} - 146 - 162]^-$) belong to the dehydrated isorhamnetin hexoside and the negatively charged isorhamnetin aglycone, respectively. The procyanidin B-type dimer was identified according to the fragmentation pattern m/z 577, 451, 425, 407, 289, 245, which has been previously reported as characteristic for this

compound.⁶⁰ The fragment at m/z 425 ($[578 - H - 152]^-$) results from the loss of 152 amu, and the 407 ($[578 - H - 152 - 18]^-$) results from the loss of a water molecule of the m/z 425; these two latter fragments are derived from the retro Diels–Alder mechanism; 245 ($[578 - H - 288 - 44]^-$) corresponds to the loss of 44 amu from the m/z 289 fragment. Apparently, the 44 amu proceeds from the loss of CH_2 , CH , and OH from the C ring of (epi)catechin (not decarboxylation). Among all the phenolic compounds and iridoids that were identified in the present study, 13 compounds (*p*-hydroxybenzoic, *p*-coumaric, ferulic, sinapic, rosmarinic, deacetylasperulosidic acid, asperulosidic acid, scopoletin, rutin pentoside, rutin, kaempferol-3-*O*-rutinoside, isorhamnetin-3-*O*-rutinoside, and quercetin) have been identified previously either in noni juice or noni fruit or both.^{14,59,61–64} To the best of our knowledge, procyanidin B-type dimer, caffeoylquinic-acid-hexoside, and quercetin-hexose-deoxyhexose have been previously reported neither in noni bagasse nor noni juice nor noni fruit.

Quantification of Phenolic Compounds and Iridoids.

Both types of bagasse exhibited the same abundance order concerning the different types of phenolic compounds, which was as follows: flavonols > phenolic acids > coumarins > iridoids > flavan-3-ol (Table 3). The majority of the concentrations of the phenolic compounds detected in NJ were 1.3- to 3.1-fold higher than NSB and 2- to 5-fold higher than WSB (Table 3). The reason why noni juice had the highest concentration of phenolic compounds is due to the usually high hydrophilic character of these components. However, important quantities of phenolic compounds remained in both types of bagasse, in which the higher content was observed in NSB compared to WSB (NSB showed 1.2- to 3.3-fold higher concentrations than WSB) suggesting that the phenolic content in noni seeds are lower than that in pericarp. Phenolic acids in the juice were the main type of phenolic compounds followed by flavonols. Phenolic acids possess lower molecular weights than flavonols, and therefore, they could have been leached from the noni pericarp more easily than flavonols during the juice extraction process. Depending on the level of abundance, three groups can be considered for all samples: the most, the intermediate, and the least abundant. The most abundant group included isorhamnetin-3-*O*-rutinoside, scopoletin, rutin, asperulosidic acid, rosmarinic acid, and deacetylasperulosidic acid, which were the first six most abundant compounds in all the samples, only that in different order of abundance, as can be seen in Table 4. The intermediate group includes caffeoylquinic-acid-hexoside, quercetin-hexose-deoxyhexose, procyanidin B-type dimer, sinapic acid, coumarin derivative II, *p*-hydroxybenzoic acid, and coumarin derivative I. The least abundant group includes ferulic acid, quercetin-3-*O*-rutinoside-7-*O*-pentoside, quercetin, kaempferol-3-*O*-rutinoside, and *p*-coumaric acid. From the most abundant group, isorhamnetin-3-*O*-rutinoside⁶⁴ and rosmarinic acid⁶¹ had been previously identified but not quantified in noni fruit. In the case of isorhamnetin-3-*O*-rutinoside, our results in bagasse were about 8-fold higher than those reported previously in plum pomace (0.36 mg/100 g fw),⁶⁵ when expressed in the same manner. Rosmarinic acid had similar levels in NSB, but 3-fold lower levels in WSB compared to those reported for olive pomace (0.181 mg/g dw),⁶⁶ expressed in the same manner. On the other hand, scopoletin, rutin, asperulosidic, and deacetylasperulosidic acids have previously been identified and quantified in both noni

fruit and noni juice.^{13,14,62,67} These last four compounds are characteristics for noni, and important quantities of all of them remained in our bagasse without seed (38–61%) (Table 4). Scopoletin is an uncommon phenolic compound and scarcely found in fruits; however, it is a characteristic compound in noni fruit as reported by Deng et al.⁶⁷ who proposed that it can be used as a reference for authentication of commercial noni products. No reports of scopoletin content in the bagasse of any fruit have been found in the literature. The concentration of scopoletin in fresh noni fruit⁶⁷ ranges from 0.064 to 6.87 mg/g dw, whereas in our bagasse, they were 0.11 and 0.19 mg/g dw for WSB and NSB, respectively. Scopoletin has been reported to exhibit antioxidant, antimicrobial, antihypertensive, analgesic, and anti-inflammatory properties, in addition to a significant ability to control serotonin levels in the body.^{39,68} In the case of rutin, our results in the bagasse (81.47–126.6 $\mu\text{g/g}$ dw) were higher than those reported previously for apple pomace (50.7 $\mu\text{g/g}$ dw).⁴⁸ Tumbas-Saponjac et al.²⁸ found 4.89 mg/100 g fw of rutin in strawberry pomace, which is 3-fold higher than our results when expressed in the same manner (1.44 and 1.51 mg/100 g fw for WSB and NSB, respectively). Rutin has been reported to exert several biological properties such as antioxidant, anticarcinogenic, neuroprotective, and anticonvulsant activities.⁶⁸ Lastly for this group, the iridoids asperulosidic and deacetylasperulosidic acids, which are also scarcely found in fruits, have been reported neither in noni bagasse nor bagasse from any other fruit. Our bagasse exhibited levels between 58.04 and 140.31 $\mu\text{g/g}$ dw for deacetylasperulosidic acid and 93.28–193.31 $\mu\text{g/g}$ dw for asperulosidic acid. Regarding the intermediate abundant group, the contents of procyanidin B-type dimer in our bagasse were 37.9 and 54.09 $\mu\text{g/g}$ dw for WSB and NSB, respectively. These levels are in the range reported for pomaces of different grape varieties,⁵ whose data oscillated between 35 and 170 $\mu\text{g/g}$ dw. Procyanidin B-type dimer has been commonly reported as a major phenolic compound in grape pomaces.⁵ In our study, caffeoylquinic-acid-hexoside presented 50.64 and 83.27 $\mu\text{g/g}$ dw for WSB and NSB, respectively. This is the first report regarding the identification and quantification of procyanidin B-type dimer caffeoylquinic-acid-hexoside and quercetin-hexose-deoxyhexose for both noni juice and noni bagasse. About the least abundant group and as mentioned above, in most cases, the content of phenolic compounds in both types of bagasse was lower than that of noni juice, except for quercetin. NSB had the highest content of quercetin (11.7 $\mu\text{g/g}$ dw), whereas no significant differences were found between WSB (5.79 $\mu\text{g/g}$ dw) and noni juice (5.39 $\mu\text{g/g}$ dw) ($p < 0.05$). The poor leaching of quercetin from noni pericarp toward the juice may be due the low aqueous solubility of quercetin.⁶⁹ The quercetin content in NSB was similar to that reported previously in a strawberry pomace (12.2 $\mu\text{g/g}$ dw)²⁸ but higher than what was reported for apple pomace (10.31 $\mu\text{g/g}$ dw).⁴⁸ In the case of kaempferol-3-*O*-rutinoside, our results for bagasse ranged from 1.5- to 4.5-fold lower than those previously reported for plum pomace (0.32 mg/100 g fw),⁶⁵ when expressed in the same manner. On the other hand, our bagasse exhibited levels between 9.77 and 17.07 $\mu\text{g/g}$ dw for quercetin-3-*O*-rutinoside-7-*O*-pentoside. Girones et al.⁵⁹ found 0.86 mg/100 g dw of quercetin-3-*O*-rutinoside-7-*O*-pentoside in noni fruit, whose values were similar to our results, expressed in the same manner.

In conclusion, both types of noni bagasse are rich sources of dietary fiber, retinol equivalents (as β -carotene), ascorbic acid,

and manganese, and a serving of 10 g dry weight provides adequate levels (higher than 10%) of these components according to the respective DRI. Furthermore, bagasse with seeds is a rich source of insoluble dietary fiber, and both types of bagasse remained with important contents of FP whose levels were higher than in some fresh fruits. A total of 16 individual phenolic compounds and 2 iridoids are reported for the first time in noni bagasse; three of them (procyanidin B-type dimer, caffeoylquinic-acid-hexoside, and quercetin-hexose-deoxyhexose) have not been previously reported either in noni bagasse, noni juice, or noni fruit. Noni bagasse (with or without seeds) showed to be an excellent potential source of phytochemicals/bioactive compounds, such as scopoletin and rutin, which promote health benefits due to their functional properties. This endorses their exploitation as ingredients for the pharmaceutical or food industry.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.jafc.9b02716.

Supplement to materials and methods: a detailed procedure for the determination of ascorbic acid (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Tel: 52 667 7136615 ext. 108; Fax: 52 667 7136615 ext. 102; E-mail: acarrill@uas.edu.mx.

ORCID

Claudia Barraza-Elenes: 0000-0003-2602-4839

J. Basilio Heredia: 0000-0003-1017-957X

Armando Carrillo-López: 0000-0003-3541-8493

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

We thank Jesús Israel Partida López and María Fernanda Quintero Soto (Facultad de Ciencias Químico Biológicas-UAS) for technical assistance.

■ REFERENCES

- (1) Sagar, N. A.; Pareek, S.; Sharma, S.; Yahia, E. M.; Lobo, M. G. Fruit and vegetable waste: Bioactive compounds, their extraction, and possible utilization. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2018**, *17*, 512–531.
- (2) Dominguez-Perles, R.; Moreno, D. A.; Garcia-Viguera, C. Waking up from four decades' long dream of valorizing agro-food byproducts: toward practical applications of the gained knowledge. *J. Agric. Food Chem.* **2018**, *66*, 3069–3073.
- (3) O'shea, N.; Arendt, E. K.; Gallagher, E. Dietary fibre and phytochemical characteristics of fruit and vegetable by-products and their recent applications as novel ingredients in food products. *Innovative Food Sci. Emerging Technol.* **2012**, *16*, 1–10.
- (4) Sudha, M. L.; Baskaran, V.; Leelavathi, K. Apple pomace as a source of dietary fiber and polyphenols and its effect on the rheological characteristics and cake making. *Food Chem.* **2007**, *104*, 686–692.
- (5) González-Centeno, M. R.; Jourdes, M.; Femenia, A.; Simal, S.; Rosselló, C.; Teissedre, P. L. Characterization of polyphenols and antioxidant potential of white grape pomace byproducts (*Vitis vinifera* L.). *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 11579–11587.
- (6) European Commission. 2003/426/EC: commission decision of 5 June 2003 authorizing the placing on the market of "noni juice" (juice of the fruit of *Morinda citrifolia* L.) as a novel food ingredient under regulation (EC) No 258/97 of the European parliament and of the council. *Off. J. Eur. Union* **2003**, *L 144*, 46 (June 12), 0012 <http://data.europa.eu/eli/dec/2003/426/oj> (accessed Dec 2018).
- (7) West, B. J.; Deng, S.; Jensen, C. J. Nutrient and phytochemical analyses of processed noni pure. *Food Res. Int.* **2011**, *44*, 2295–2301.
- (8) Motshakeri, M.; Ghazali, H. M. Nutritional phytochemical and commercial quality of noni fruit: a multi-beneficial gift from nature. *Trends Food Sci. Technol.* **2015**, *45*, 118–119.
- (9) Wang, M. Y.; Peng, L.; Jensen, C. J.; Deng, S.; West, B. Noni juice reduces lipid peroxidation-derived DNA adducts in heavy smokers. *Food Sci. Nutr.* **2013**, *1* (2), 141–149.
- (10) Dussossoy, E.; Bichon, F.; Bony, E.; Portet, K.; Brat, P.; Vaillant, F.; Michel, A.; Poucheret, P. Pulmonary anti-inflammatory effects and spasmolytic properties of Costa Rica noni juice (*Morinda citrifolia* L.). *J. Ethnopharmacol.* **2016**, *192*, 264–272.
- (11) Gupta, R. K.; Singh, N. *Morinda citrifolia* (Noni) alters oxidative stress marker and antioxidant activity in cervical cancer cell lines. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **2013**, *14*, 4603–4606.
- (12) Palu, A. K.; Seifulla, R. D.; West, B. *Morinda citrifolia* L. (noni) improves athlete endurance: its mechanisms of action. *J. Med. Plants Res.* **2008**, *2* (7), 154–158.
- (13) Potterat, O.; Von Felten, R.; Dalsgaard, P. W.; Hamburger, M. Identification of TLC markers and quantification by HPLC-MS of various constituents in noni fruit powder and commercial noni-derived products. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 7489–7494.
- (14) Dussossoy, E.; Brat, P.; Bony, E.; Boudard, F.; Poucheret, P.; Mertz, C.; Giannis, J.; Michel, A. Characterization, anti-oxidative and anti-inflammatory effects of Costa Rican noni juice (*Morinda citrifolia* L.). *J. Ethnopharmacol.* **2011**, *133*, 108–115.
- (15) Aregheore, E. M. Evaluation and utilization of noni (*Morinda citrifolia*) juice extract waste in complete diets of goats. *Livestock Research for Rural Development.* **2005**, *17* (4), 39.
- (16) Evvyernie, D.; Tjakradidjaja, A. S.; Permana, I. G.; Toharmat, T.; Insani, A. In vitro study of noni juice extract waste (*Morinda citrifolia* L.) and pineapple industrial wastes (*Ananas comosus* L. Merr) as energy supplement in dairy goat ration. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* **2018**, *119* (1), 012017.
- (17) Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) (Food and Fisheries Statistics Service). <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/> (accessed June 2018).
- (18) Cárdenas-Coronel, W. G.; Carrillo-López, A.; Vélez de la Rocha, R.; Labavitch, J. M.; Báez-Sañudo, M. A.; Heredia, J. B.; Zazueta-Morales, J. J.; Vega-García, M. O.; Sañudo-Barajas, J. A. Biochemistry and cell wall changes associated with noni (*Morinda citrifolia* L.) fruit ripening. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64*, 302–309.
- (19) *Official methods of analysis of AOAC international*, 19th ed.; Association of Official Analytical Chemists International: Arlington, VA, 2012.
- (20) Dürüst, N.; Sümengen, D.; Dürüst, Y. Ascorbic acid and element contents of foods of Trabzon (Turkey). *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 2085–2087.
- (21) Gómez-Romero, M.; Seguera-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A. Metabolite profiling and quantification of phenolic compounds in methanol extracts of tomato fruit. *Phytochemistry* **2010**, *71*, 1848–1864.
- (22) Tao, B.; Ye, F.; Li, H.; Hu, Q.; Xue, S.; Zhao, G. Phenolic profile and in vitro antioxidant capacity of insoluble dietary fiber powders from citrus (*Citrus junos* Sieb. Ex Tanaka) pomace as affected by ultrafine grinding. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 7166–7173.
- (23) Corral-Aguayo, R. D.; Yahia, E. M.; Carrillo-López, A.; González-Aguilar, G. Correlation between some nutritional components and the total antioxidant capacity measured with six different assays in eight horticultural crops. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 10498–10504.

- (24) Ghasemi, K.; Ghasemi, Y.; Ebrahimzadeh, M. A. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of 13 citrus species peels and tissues. *Pak. J. Pharm. Sci.* **2009**, *22*, 277–281.
- (25) Price, M. L.; Van Scoyoc, S.; Butler, L. G. A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *J. Agric. Food Chem.* **1978**, *26*, 1214–1218.
- (26) Ornelas-Paz, J. J.; Cira-Chávez, L. A.; Gardea-Béjar, A. A.; Guevara-Arauz, J. C.; Sepúlveda, D. R.; Reyes-Hernandez, J.; Ruiz-Cruz, S. Effect of heat treatment on the content of some bioactive compounds and free radical-scavenging activity in pungent and non-pungent peppers. *Food Res. Int.* **2013**, *50*, 519–525.
- (27) Cervantes-Paz, B.; Yahia, E. M.; Ornelas-Paz, J. J.; Gardea-Béjar, A. A.; Ibarra-Junquera, V.; Pérez-Martínez, J. D. Effect of heat processing on the profile of pigments and antioxidant capacity of green and red jalapeño peppers. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 10822–10833.
- (28) Tumbas-Šaponjac, V.; Gironés-Vilaplana, A.; Djilas, S.; Mena, P.; Cetković, G.; Moreno, D. A.; Čanadanović-Brunet, J.; Vulić, J.; Stajčić, S.; Vinčić, M. Chemical composition and potential bioactivity of strawberry pomace. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 5397–5405.
- (29) West, B. J.; Jarakae Jensen, C. J.; Westendorf, J. A new vegetable oil from noni (*Morinda citrifolia*) seeds. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2008**, *43*, 1988–1992.
- (30) AACC. The definition of dietary fiber. Report of the Dietary Fiber Definition Committee to the Board of Directors of the American Association of Cereal Chemist. *Cereal Foods World* **2001**, *46* (3), 112–126. <https://www.aaccnet.org/initiatives/definitions/Documents/DietaryFiber/DFDef.pdf> (accessed Jan 2018)
- (31) Nascimento, L. C. S.; Rodrigues, N. da R.; Alves, M. P. C.; Sabaa Srur, A. U. O.; Barbosa, J. L., Jr.; Barbosa, M. I. M. J. Chemical characterization, nutritional aspects and antioxidant capacity of noni (*Morinda citrifolia* L) produced in northeastern Brazil. *Int. Food Res. J.* **2018**, *25*, 870–875.
- (32) Amaya-Cruz, D. M.; Rodríguez-González, S.; Pérez-Ramírez, I. F.; Loarca-Piña, G.; Amaya-Llano, S.; Gallegos-Corona, M. A.; Reynoso-Camacho, R. Juice by-products as a source of dietary fibre and antioxidants and their effect on hepatic steatosis. *J. Funct. Foods* **2015**, *17*, 93–102.
- (33) Institute of Medicine, Food and Nutrition Board. *Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein and amino acids*; National Academies Press: Washington, D.C., 2005.
- (34) Codex Alimentarius Commission (CAC). *Report of the 27th Session of the Committee on Nutrition and Foods for Special Dietary Uses, Bonn, Germany, 21–25 November 2005*; ALINORM 06/29/26; 2006. http://www.fao.org/tempref/codex/Reports/Alinorm06/al29_26e.pdf (accessed March 2018).
- (35) Chunhieng, T.; Hay, L.; Montet, D. Detailed study of the juice composition of noni (*Morinda citrifolia*) fruits from Cambodia. *Fruits* **2005**, *60*, 13–24.
- (36) Institute of Medicine, Food and Nutrition Board. *Dietary reference intakes for calcium, phosphorus, magnesium, vitamin D and fluoride*; National Academies Press: Washington, D.C., 1997.
- (37) Institute of Medicine, Food and Nutrition Board. *Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium and zinc*; National Academies Press: Washington, D.C., 2001.
- (38) FAO/WHO. *Human vitamin and mineral requirements. Report of a joint FAO/WHO expert consultation*; Food and Agriculture Organization of the United Nations: Bangkok, Thailand, 2001.
- (39) Chan-Blanco, Y.; Vaillant, F.; Pérez, A. M.; Belleville, M. P.; Zuñiga, C.; Brat, P. The ripening and aging of noni fruits (*Morinda citrifolia* L.): microbiological flora and antioxidant compounds. *J. Sci. Food Agric.* **2007**, *87*, 1710–1716.
- (40) Palioto, G. F.; Silva, C. F. G.; Mendes, M. P.; Almeida, V. V.; Rocha, C. L. M. S. C.; Tonin, L. T. D. Composição centesimal, compostos bioativos e atividade antioxidante de frutos de *Morinda citrifolia* Linn (noni) cultivados no Paraná. *Rev. Bras. Pl. Med., Campinas.* **2015**, *17*, 59–66.
- (41) Delgado-Nieblas, C. I.; Zazueta-Morales, J. J.; Ahumada-Aguilar, J. A.; Aguilar-Palazuelos, E.; Carrillo-López, A.; Jacobo-Valenzuela, N.; Telis-Romero, J. Optimization of fan air-drying process to obtain a dehydrated naranjita (*Citrus mitis* B.) pomace product with high bioactive compounds and antioxidant capacity. *J. Food Process Eng.* **2017**, *40*, No. e12338.
- (42) Gouw, V. P.; Jung, J.; Zhao, Y. Functional properties, bioactive compounds, and in vitro gastrointestinal digestion study of dried fruit pomace powders as functional food ingredients. *LWT-Food Sci. Technol.* **2017**, *80*, 136–144.
- (43) Sun, J.; Chu, Y. F.; Wu, X.; Liu, R. H. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 7449–7454.
- (44) Acosta-Estrada, B. A.; Gutiérrez-Urbe, J. A.; Serna-Saldívar, S. O. Bound phenolics in foods, a review. *Food Chem.* **2014**, *152*, 46–55.
- (45) Nguyen, N. M. P.; Le, T. T.; Vissenaekens, H.; Gonzales, G. B.; Van Camp, J.; Smagghe, G.; Raes, K. In vitro antioxidant activity and phenolic profiles of tropical fruit by-products. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2019**, *54* (4), 1169–1178.
- (46) de Camargo, A. C.; Regitano-D'Arce, M. A. B.; Biasoto, A. C. T.; Shahidi, F. Low molecular weight phenolics of grape juice and winemaking byproducts: antioxidant activities and inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein cholesterol and DNA strand breakage. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 12159–12171.
- (47) Yi, W.; Fischer, J.; Krewer, G.; Akoh, C. C. Phenolic compounds from blueberries can inhibit colon cancer cell proliferation and induce apoptosis. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 7320–7329.
- (48) Cerda-Tapia, A.; Pérez-Chabela, M. L.; Pérez-Alvarez, J. A.; Fernández-López, J.; Viuda-Martos, M. Valorization of pomace powder obtained from native Mexican apple (*Malus domestica* var. rayada): Chemical, techno-functional and antioxidant properties. *Plant Foods Hum. Nutr.* **2015**, *70*, 310–316.
- (49) Rana, R. A. C.; Gulliya, B. Chemistry and pharmacology of flavonoids- A review. *Indian J. Pharm. Educ.* **2019**, *53* (1), 8–20.
- (50) Andres Lacueva, C.; Medina-Remon, A.; Llorach, R.; Urpi-Sarda, M.; Khan, N.; Chiva-Blanch, G.; Zamora-Ros, R.; Rotches-Ribalta, M.; Lamuela-Raventós, R. M. Phenolic compounds: Chemistry and occurrence in fruits and vegetables. In *Fruit and vegetable phytochemicals: Chemistry, nutritional value and stability*, 1st ed.; de la Rosa, L. A., Alvarez-Parrilla, E., González-Aguilar, G. A., Eds.; Blackwell-Publishing: Ames, IA, 2010; pp 66–80.
- (51) Smeriglio, A.; Barreca, D.; Bellocco, E.; Trombetta, D. Proanthocyanidins and hydrolysable tannins: occurrence, dietary intake and pharmacological effects. *Br. J. Pharmacol.* **2017**, *174*, 1244–1262.
- (52) Solovchenko, A.; Yahia, E. M.; Chen, C. Pigments. In *Postharvest physiology and biochemistry of fruit and vegetables*, 1st ed.; Yahia, E. M., Carrillo-López, A., Eds.; Woodhead Publishing: Cambridge, MA, 2019; pp 254–256.
- (53) FAO/WHO *Requirements of vitamin A, iron, folate and vitamin B12. Report of a joint FAO/WHO expert consultation*; Food and Agriculture Organization of the United Nations, Series No. 23, 1988.
- (54) American Optometric Association. Lutein and zeaxanthin. <https://www.aoa.org/patients-and-public/caring-for-your-vision/diet-and-nutrition/lutein> (accessed March 2019).
- (55) Steiner, B. M.; McClements, D. J.; Davidov-Pardo, G. Encapsulation systems for lutein: a review. *Trends Food Sci. Technol.* **2018**, *82*, 71–81.
- (56) Singh, D. R.; Singh, S.; Banu, V. S. Changes in antioxidants and minerals in noni (*Morinda citrifolia* L.) fruits during development process. *Br. J. Pharm. Res.* **2016**, *10* (5), 1–11.
- (57) Ncube, E. N.; Mhlongo, M. I.; Pieter, L. A.; Steenkamp, P. A.; Dubery, I. A.; Madala, N. E. Analyses of chlorogenic acids and related cinnamic acid derivatives from *Nicotiana tabacum* tissues with the aid of UPLC-QTOF-MS/MS bases on the in-source collision-induced dissociation method. *Chem. Cent. J.* **2014**, *8*, 66.
- (58) Hossain, M. B.; Rai, D. K.; Brunton, N. P.; Martin-Diana, A. B.; Barry-Ryan, C. Characterization of phenolic composition in

Lamiaceae spices by LC-ESI-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 10576–10581.

(59) Gironés-Vilaplana, A.; Baenas, N.; Villaño, D.; Speisky, H.; García-Viguera, C.; Moreno, D. A. Evaluation of Latin-American fruits rich in phytochemicals with biological effects. *J. Funct. Foods* **2014**, *7*, 599–608.

(60) Engida, A. M.; Faika, S.; Nguyen-Thi, B. T.; Ju, Y. H. Analysis of major antioxidants from extracts of *Myrmecodia pendans* by UV/visible spectrophotometer, liquid chromatography/tandem mass spectrometry, and high-performance liquid chromatography/UV techniques. *J. Food Drug Anal.* **2015**, *23*, 303–309.

(61) de Moraes, G. P.; Oliveira-Barros de Alencar, M. V.; Islam, M. T.; da Silva-Araujo, L.; Vieira-Gomes, D. C.; Mendes de Carvalho, R.; Corrêa, D.; Jardim-Paz, M. F. C.; Pinheiro-Ferreira, P. M.; de Carvalho-Melo-Cavalcante, A. A.; Ferraz, A.; Grivicich, I.; Nascimento-Picada, J. Toxicogenetic profile of rats treated with aqueous extract from *Morinda citrifolia* fruits. *J. Med. Plants Res.* **2016**, *10* (2), 18–28.

(62) Yan, Y.; Lu, Y.; Jiang, S.; Jiang, Y.; Tong, Y.; Zuo, L.; Yang, J.; Gong, F.; Zhang, L.; Wang, P. Quantitative determination of bioactive constituents in noni juice by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization triple quadrupole mass spectrometry. *Pharmacogn. Mag.* **2018**, *14*, 70–75.

(63) Lin, Y. L.; Chang, Y. Y.; Yang, D. J.; Tzang, B. S.; Chen, Y. C. Beneficial effects of noni (*Morinda citrifolia* L.) juice on livers of high-fat dietary hamsters. *Food Chem.* **2013**, *140*, 31–38.

(64) Su, B. N.; Pawlus, A. D.; Jung, H. A.; Keller, W. J.; McLaughlin, J. L.; Kinghorn, A. D. Chemical constituents of the fruits of *Morinda citrifolia* (noni) and their antioxidant activity. *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 592–595.

(65) Sójka, M.; Kołodziejczyk, K.; Milala, J.; Abadias, M.; Viñas, I.; Guyot, S.; Baron, A. Composition and properties of the polyphenolic extracts obtained from industrial plum pomaces. *J. Funct. Foods* **2015**, *12*, 168–178.

(66) Morsi, M. K. S.; Galal, S. M.; Alabdulla, O. Antioxidative activity of olive pomace polyphenols obtained by ultrasound assisted extraction. *J. Environ. Sci. Toxicol. Food Technol.* **2016**, *10*, 95–100.

(67) Deng, S.; West, B. J.; Jensen, J. A quantitative comparison of phytochemical components in global noni fruits and their commercial products. *Food Chem.* **2010**, *122*, 267–270.

(68) Pandey, V.; Narasingam, M.; Kunasegaran, T.; Murugan, D. D.; Mohamed, Z. Effect of noni (*Morinda citrifolia* Linn.) fruit and its bioactive principles scopoletin and rutin on rat vas deferens contractility: an ex vivo study. *Sci. World J.* **2014**, *2014*, 1–11 Article ID 909586.

(69) Darband, S. G.; Kaviani, M.; Yousefi, B.; Sadighparvar, S.; Pakdel, F. G.; Attari, J. A.; Mohebbi, I.; Naderi, S.; Majidinia, M. Quercetin: A functional dietary flavonoid with potential chemopreventive properties in colorectal cancer. *J. Cell. Physiol.* **2018**, *233*, 6544–6560.