



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS

**“OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE TERMOULTRASONICACIÓN
DEL JUGO DE ZARZAMORA SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS
FISICOQUÍMICAS, MICROBIOLÓGICAS Y ANTIOXIDANTES”**

TESIS

Que para obtener el título de
Maestra en Ciencias de los Alimentos

P R E S E N T A

L.N. Cervantes Elizarrarás Alicia

Directores:

Dr. Javier Piloni Martini

Dra. Nelly del S. Cruz Cansino



Tulancingo de Bravo, Hgo., Junio 2015

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco a Dios por todas las bendiciones que me ha dado, entre ellas, la oportunidad de desarrollarme personal y profesionalmente, con la ayuda de esos seres que ha puesto en mi camino...

A mis amados padres, por todos los valores inculcados, por brindarme todo el amor y el apoyo para continuar con mis estudios, así como a mis hermanos y sobrinos, que me llenan de alegría y motivación.

A mi amado Edgar Covarrubias Cervantes, mi gran amigo y compañero, que me ha brindado su amor y apoyo incondicional. Y a toda la familia Covarrubias Cervantes y Covarrubias Guaso, por todo su apoyo y afecto, por hacerme sentir parte de la familia.

A los doctores Nelly de Socorro Cruz Cansino y Javier Piloni Martini, por todo su apoyo, sus conocimientos compartidos y su buen desempeño como directores en la realización de este trabajo de tesis.

A los doctores Ernesto Alanís García, Carlos Alberto Gómez Aldapa, Esther Ramírez Moreno y Norma Güemes Vera, que a lo largo de este trabajo me brindaron su apoyo y compartieron conmigo sus conocimientos y experiencia.

Al programa de becas de **CONACyT**, por los recursos brindados que fueron parte importante para la realización de estos estudios.

Índice

Índice de figuras	iv
Índice de tablas	vi
Índice de anexos	vii
RESUMEN.....	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1 Zarzamora	3
2.1.1 Origen de la Zarzamora.....	3
2.1.2 Adaptabilidad	5
2.1.3 Producción	5
2.1.4 Exportación	7
2.1.5 Composición química y nutricional.....	8
2.2 Compuestos bioactivos.....	9
2.2.1 Ácidos grasos y lípidos estructurales	10
2.2.2 Proteínas y aminoácidos.....	11
2.2.3 Carbohidratos y sus derivados.....	11
2.2.4 Microorganismos.....	11
2.2.5 Minerales	12
2.2.6 Isoprenoides.....	12
2.2.7 Polifenoles	12
2.3 Actividad antioxidante.....	19
2.3.1 Antioxidantes y la salud	19
2.4 Antioxidantes presentes en la zarzamora	20
2.5 Procesamiento de alimentos	22
2.5.1 Procesado de frutas	22
2.5.2 Jugos	22
2.5.3 Procesamiento de alimentos y su efecto en los compuestos bioactivos ...	23
2.6 Uso de las tecnologías emergentes en el procesamiento de alimentos	24
2.6.1 Alta presión hidrostática.....	24

2.6.2 Pulsos de alta intensidad de campo eléctrico	25
2.6.3 Pulsos de alta intensidad de campo magnético	25
2.6.4 Irradiación	25
2.6.7 Ultrasonido.....	25
2.7.1 Termoultrasonido	27
2.8 Efecto del ultrasonido en el procesamiento de jugos de frutas.....	29
2.8.1 Efecto del termoultrasonido en el procesamiento de jugos de frutas....	29
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	30
4. JUSTIFICACIÓN.....	31
5. OBJETIVOS	32
5.1 Objetivo General.....	32
5.2 Objetivos específicos.....	32
6 MATERIALES Y MÉTODOS	33
6.1 Obtención de las muestras	33
6.2 Tratamiento termoultrasonido	33
6.3 Determinación de las propiedades fisicoquímicas.....	34
<i>pH y sólidos solubles totales</i>	34
<i>Índice de turbidez</i>	34
<i>Índice de oscurecimiento</i>	34
6.4 Análisis microbiológico	34
6.5 Determinación de la actividad enzimática.....	35
6.5.1 Pectinmetilesterasa (PME).....	35
6.5.2 Polifenoloxidasa (PPO)	35
6.6 Determinación de actividad antioxidante	36
6.6.1 Determinación actividad antioxidante por el método con ABTS ^{•+}	36
6.6.2 Determinación actividad antioxidante medida por el método con DPPH●	37
6.7 Porcentaje de actividad quelante (% AQ)	37
6.8 Determinación de ácido ascórbico (AA).....	38
6.9 Determinación del contenido de compuestos fenólicos totales (CFT)	38
6.10 Determinación de antocianinas	39
6.11 Diseño experimental y análisis estadístico	40
7.1 Propiedades fisicoquímicas	43

pH y sólidos solubles.....	43
7.2 Análisis microbiológico	50
7.3 Actividad enzimática residual de la PME y PPO.....	51
7.4.1 Actividad antioxidante por el método de ABTS	56
7.4.2 Actividad antioxidante por el método de DPPH.....	59
7.5 Porcentaje de Actividad Quelante (%AQ).....	62
7.6 Contenido de ácido ascórbico (AA)	64
7.7 Contenido de compuestos fenólicos totales (CFT)	65
7.8 Contenido de antocianinas	67
7.9 Optimización del jugo de zarzamora termoultrasonificado	69
7.10 Reproducibilidad del estudio.....	71
7.11 Comparación del jugo termoultrasonificado con el jugo pasteurizado y jugo fresco	72
7.11.1 Actividad residual de la pectinmetilesterasa y la polifenoloxidasasa	72
7.11.2 Actividad antioxidante	73
7.11.3 Contenido de ácido ascórbico.....	74
7.11.4 Contenido de Fenoles Totales	75
7.11.4 Contenido de antocianinas.....	76
7 CONCLUSIONES	77
8 REFERENCIAS	78
9 ANEXOS	95

Índice de figuras

Figura 1. Planta de zarzamora.....	4
Figura 2. Valor comercial en dólares de las exportaciones de frutillas realizadas en los años 2010 – 2013.	7
Figura 3. Aumento del valor comercial de la zarzamora exportada por México en el periodo 2009-2013.	8
Figura 4. Estructura química de los principales ácidos fenólicos.....	14
Figura 8. Diseño central compuesto rotatable.	40
Figura 9. Efecto del termoultrasonido sobre el pH del jugo de zarzamora.....	45
Figura 10. Efecto del termoultrasonido sobre los sólidos solubles (°Bx) del jugo de zarzamora.....	46
Figura 11. Efecto del termoultrasonido sobre el índice de turbidez del jugo de zarzamora.....	47
Figura 12. Efecto del termoultrasonido sobre el oscurecimiento del jugo de zarzamora.....	49
Figura 13. Efecto del termoultrasonido sobre la actividad residual de la pectinmetilesterasa (% AR PME) del jugo de zarzamora	53
Figura 14. Efecto del termoultrasonido sobre la actividad residual de la polifenoloxidasasa (% AR PPO) del jugo de zarzamora	54
Figura 15. Efecto del termoultrasonido sobre la actividad antioxidante del jugo de zarzamora medida por el método de ABTS.....	59
Figura 16. Efecto del termoultrasonido sobre la actividad antioxidante del jugo de zarzamora medida por el método de DPPH	60
Figura 17. Efecto del termoultrasonido sobre la actividad quelante del jugo de zarzamora.....	63
Figura 18. Efecto del termoultrasonido sobre el contenido de ácido ascórbico en el jugo de zarzamora	64
Figura 19. Efecto del termoultrasonido sobre el contenido de compuestos fenólicos totales del jugo de zarzamora.....	66
Figura 20. Efecto del termoultrasonido sobre el contenido de antocianinas del jugo de zarzamora.....	68

Figura 21. Condiciones óptimas de termoultrasonicación del jugo de zarzamora con respecto a la inactivación de la PPO, actividad antioxidante y contenido de fenoles totales y antocianinas	70
Figura 22. Efecto del termoultrasonido y la pasteurización sobre la actividad residual (% AR) de la pectinmetilesterasa (PME) y la polifenoloxidasas (PPO)	72
Figura 23. Efecto del termoultrasonido (TUS) y la pasteurización (PAS) sobre la actividad antioxidante medida por los métodos de ABTS (a) y DPPH (b), comparados con jugo fresco (CNTR)	73
Figura 24 Efecto del termoultrasonido (TUS) y la pasteurización (PAS) sobre el contenido de ácido ascórbico comparado con jugo fresco (CNTR)	74
Figura 25 Efecto del termoultrasonido (TUS) y la pasteurización (PAS) sobre el contenido de Compuestos Fenólicos Totales comparados con jugo fresco (CNTR)	75
Figura 26. Efecto del termoultrasonido (TUS) y la pasteurización (PAS) sobre el contenido de antocianinas comparados con jugo fresco (CNTR)	76

Índice de tablas

Tabla 1. Producción agrícola de zarzamora en México, 2013.....	6
Tabla 2. Información nutrimental de la zarzamora	9
Tabla 3. Clasificación de compuestos bioactivos según su naturaleza bioquímica..	10
Tabla 4. Compuestos fenólicos identificados en especies de zarzamora.	21
Tabla 5. Aplicación del ultrasonido en la industria	28
Tabla 6. Diseño experimental de tratamiento por ultrasonido	41
Tabla 7 Efecto de la temperatura y tiempo de termoultrasonido sobre el pH, sólidos solubles (°Brix), turbidez y oscurecimiento del jugo de zarzamora	44
Tabla 8. Coeficientes de regresión del modelo y significancia para las variables de respuesta pH, °Bx, turbidez y oscurecimiento del jugo de zarzamora termoultrasonificado	45
Tabla 9. Porcentaje de actividad Residual (% AR) en el jugo de zarzamora termoultrasonificado	52
Tabla 10. Coeficientes de regresión del modelo y significancia para las variables de respuesta de la actividad enzimática residual del jugo de zarzamora termoultrasonificado	53
Tabla 11. Efecto de la temperatura y tiempo de termoultrasonido sobre actividad antioxidante del jugo de zarzamora.....	57
Tabla 12. Coeficientes de regresión del modelo y significancia para las variables de respuesta de actividad antioxidante y compuestos antioxidantes del jugo de zarzamora termoultrasonificado	58
Tabla 13. Análisis estadístico de los valores predichos por el modelo de RSM contra los valores experimentales	71

Índice de anexos

Anexo 1. Curva estándar de trólox	95
Anexo 2. Curva estándar de trólox	95
Anexo 3. Curva estándar de ácido ascórbico	96
Anexo 4. Curva estándar de ácido gálico	96

RESUMEN

La zarzamora es un fruto que presenta gran adaptabilidad climática, por lo que en México la producción de este fruto alta, así como la exportación de este producto a otros países, ocupando el tercer lugar en ambos aspectos. Sin embargo su vida de anaquel es corta, por lo que se han elaborado productos entre los que destaca el jugo. El jugo de zarzamora es una bebida que presenta compuestos bioactivos con capacidad antioxidante, siendo mayoritarios los compuestos fenólicos, tales como las antocianinas, sin embargo durante el procesamiento térmico hay pérdida de dichos compuestos, por lo que han surgido tecnologías emergentes como el termoultrasonido, que inactiva eficazmente microorganismos y enzimas, preservando o favoreciendo el contenido de estos compuestos, así como las propiedades relacionadas con la calidad. Por lo que el objetivo de este estudio fue optimizar las condiciones de termoultrasonificación del jugo de zarzamora sobre las características fisicoquímicas, microbiológicas y antioxidantes.

Se evaluó el pH, °Bx, turbidez y oscurecimiento, así como la carga microbiana (recuento total, enterobacterias, levaduras y bacterias ácido lácticas), la actividad de la polifenol oxidasa y pectin metilesterasa, la capacidad antioxidante y el contenido de ácido ascórbico, fenoles totales y antocianinas del jugo de zarzamora termoultrasonificado para su optimización por superficies de respuesta y se comparó con jugo pasteurizado (90 °C/15 s) y jugo fresco. Se utilizó el diseño de superficie de respuesta con un diseño central, compuesto rotable, siendo las variables independientes la temperatura (X_1) y el tiempo (X_2). La comparación de los jugos termoultrasonificado, pasteurizado y control, se realizó con la prueba de Tukey con un nivel de confianza del 95 %.

Con excepción del análisis microbiano, las variables estudiadas se ajustaron al modelo matemático con una $R^2_{Adj} \geq 0.87$. El termoultrasonido logró la total inactivación microbiana para las 4 técnicas estudiadas y una reducción significativa de las enzimas PME y PPO (53 y 98 % respectivamente), así como un aumento de la actividad antioxidante y de los compuestos fenólicos, con una ligera reducción del ácido ascórbico y de las antocianinas. De manera general, la temperatura fue la variable más influyente en estas variables de respuesta, tanto en términos lineales

como cuadráticos. Las condiciones óptimas, obtenidas por la superposición de superficies de respuesta, fueron de 50 ± 1 °C por 17 ± 1 min, encontrando mayor reducción enzimática, una alta capacidad antioxidante y elevado contenido de antocianinas y fenoles totales.

En cuanto a la comparación de las técnicas de procesamiento, el jugo termoultrasonificado, comparado con el pasteurizado, logró mayor reducción de la polifenoloxidasa (98.3 %) y de la pectinmetilesterasa (63.7 %) con aumento de actividad antioxidante (1,118.2 mg EAA/L y 13,964.96 μ mol ET/L), ácido ascórbico (291.16 mg EAA/L), compuestos fenólicos (3,311.3 mg EAG/L) y contenido de antocianinas (922.55 mg Cy-3-GI). La metodología de superficie de respuesta permitió definir las condiciones óptimas de termoultrasonido. Esta tecnología resulta mejor que la tecnología convencional en cuanto a la inactivación enzimática y mejoramiento de las propiedades antioxidantes del jugo de zarzamora, confiriendo un valor agregado al producto.

ABSTRACT

Blackberry is a fruit with a great climatic adaptability, being México a high production of this fruit, occupying the 3rd position in the international production and exportation. Besides, shelf-life of blackberry is short therefore has been elaborated some products, like juices. Blackberry juice is a beverage with bioactive compounds which present antioxidant capacity, among them phenolic compounds like anthocyanins, nevertheless during the thermal processing there are a loss of this compounds, therefore in this study the objective was to optimize the thermoultrasonication conditions for blackberry juice, based on physic-chemical, microbiological and antioxidants properties.

pH, °Bx, cloud and browning index were measured, also microbial load (total plate counts, enterobacteriae, molds and lactic acid bacterium), enzymatic activity (polifenoloxidase and pectinmetylesterase activity), antioxidant capacity, total phenolic compounds and the ascorbic acid and anthocyanins content of the thermoultrasonicated blackberry juice were investigate to optimize by response surface superposition and was compared with the pasteurized juice (90 °C/ 15 s) and fresh juice. The response surface methodology was employed to obtain the optimum conditions of thermoultrasonication with a central, composited rotatable design, being the independent variables temperature (X_1) and time (X_2). Significant differences between mean values of thermoultrasonicated, pasteurized and control juice were determined by Tukey pairwise comparison test at a significance level of $p < 0.05$.

Excepting the microbial analysis, the studied variables showed high correlation coefficients with mathematical model of $R^2\text{Adj} \geq 0.87$. Thermoultrasonication treatment showed total microbial inactivation (total plate counts, enterobacteriae, olds and lactic acid bacterium), enzymatic activity reduction (98 % of polifenol oxidase and 53 % of pectinmetylesterase activity), an aincrease of antioxidant capacity and total phenolic compounds, on the contrary, the ascorbic acid and anthocyanins content was reduced. Generally, temperature was the most important independent variable on the response variables, in linear terms as well as quadratic terms. The optimum conditions by response superposition figures was 50 ± 1 °C at 17 ± 1 min,

showing higher enzymatic reduction, augment of antioxidant activity and greater anthocyanins and total phenol content.

Comparing the processing techniques of blackberry juice, thermoultrasonication treatment, compared with pasteurization, showed higher reduction of polyphenol oxidase (98.3 %) and pectin metylesterase (63.7 %) activity, higher antioxidant activity (1,118.2 mg EAA/L and 13,964.96 μ mol ET/L) as well as greater phenolic compounds and anthocyanin content (3,311.3 mg EAG/L and 922.55 mg Cy-3-Gl respectively). The response surface methodology allows obtain the optimum conditions of thermoultrasonication for blackberry juice. This technology is better than conventional in terms of enzymatic inactivation and improvement of the antioxidant properties of blackberry juice.

1. INTRODUCCIÓN

El conocimiento de la zarzamora se remonta al año 370 a.c., donde ya se usaba como alimento y con fines medicinales. Desde entonces se han colectado de manera silvestre, debido a su rápida reproducción vegetativa y a la diseminación de semillas por las aves (Pérez-Barraza y Vázquez-Valdivia, 2004; Chávez, 2011). Este fruto pertenece al grupo de las “berries”, es un fruto rojo que al madurar se tornan negro con sabor dulce y aromático, es utilizado para la preparación de jugos, helados, yogurt, mermeladas, dulces y mosto de frutas (Pérez-Barraza y Vázquez-Valdivia, 2004; Cuevas-Rodríguez, 2011; SIAP, 2014a).

México ocupa el tercer lugar en producción de zarzamora, siendo el estado de Michoacán el principal productor, mientras que el estado de Hidalgo genera menos del 1 % de la producción nacional (SIAP, 2014b). De acuerdo a la SAGARPA (2014), el cultivo de las berries es el de mayor rentabilidad en la industria hortofrutícola, siendo un importante generador de divisas y empleos para el campo nacional, por lo que se está en busca de alternativas para aumentar la producción de estos frutos.

En cuanto a su composición nutricional, la zarzamora contiene alrededor del 80 % agua, es buena fuente de fibra, vitaminas del complejo B y minerales, como calcio, fósforo, potasio y magnesio, entre otros, y destacan también sus compuestos bioactivos con propiedades antioxidantes, tales como vitamina E y C, β -carotenos, polifenoles y flavonoides como las antocianinas y taninos (Deighton *et al.*, 2000; Cuevas-Rodríguez *et al.*, 2010; Chávez, 2011; Lee *et al.*, 2012), siendo estos últimos compuestos los que confieren mayor poder antioxidante (Deighton *et al.*, 2000; Tiwari *et al.*, 2009b). Estos antioxidantes tienen la capacidad de aplazar, retardar o prevenir el daño oxidativo causado por radicales libres, especies reactivas de oxígeno (ROS) o nitrógeno, además de brindar protección de las defensas endógenas de antioxidantes, promoviendo o mejorando la salud humana (Cuevas-Rodríguez *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2012).

Debido a esto y a la vida de anaquel corta, se han elaborado productos como jugos pasteurizados de zarzamora, con la finalidad de alargar la vida útil del producto, ya que en México, los jugos de frutas son ampliamente consumidos y son empleados como sustituto de los refrescos, ya que, a diferencia de estos últimos, proveen la

mayor parte de los nutrientes de su fuente natural. Sin embargo, el procesamiento térmico presenta algunas desventajas, ya que se genera la degradación de compuestos bioactivos y otras cualidades sensoriales y de calidad, tales como color, sabor, turbidez, oxidación, entre otras, por lo que han surgido tecnologías emergentes como el ultrasonido. Esta tecnología resulta económica, sencilla, respetuosa con el medio ambiente y eficaz para lograr una disminución de la carga microbiana, sin afectar de manera significativa, las características sensoriales y nutricionales de los jugos procesados (Earnshaw *et al.*, 1995; Tiwari *et al.*, 2009c; Soria y Villamiel, 2010; Herceg *et al.*, 2013). Se ha estudiado el efecto del ultrasonido con otras técnicas de procesamiento, tales como la aplicación de altas presiones y/o calor (Earnshaw *et al.*, 1995; Herceg *et al.*, 2013). Así, la aplicación de ultrasonido con un tratamiento térmico suave (< 100 °C), da lugar al procedimiento denominado termosonido o termoultrasonido (Demirdöven y Baysal, 2008; Herceg *et al.*, 2013), esta tecnología es una alternativa a los tratamientos térmicos convencionales, con resultados favorables como la inactivación microbiana y enzimática, así como la liberación y retención de compuestos con actividad antioxidante y el mantenimiento de sus propiedades relacionadas con la calidad como el color, acidez titulable, entre otros parámetros (Earnshaw *et al.*, 1995; Cheng *et al.*, 2007; Demirdöven y Baysal, 2008; Tiwari *et al.*, 2010; Adekunle *et al.*, 2010; Vidal-Fonteles *et al.*, 2012; Ercan y Soysal, 2013).

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Zarzamora

La zarzamora (*Rubus fruticosus sp.*), es un arbusto de ramas espinosas y de sección pentagonal y pueden crecer hasta 3 metros. Las flores son blancas o rosadas, brotan en racimos dando lugar a inflorescencias de forma oblonga o piramidal. Los pétalos son ovalados de 10 a 15 mm, variando su color desde el blanco al rosa (figura 1). En algunos países se considera a las zarzamoras como plantas invasivas, pertenecen a la familia de las rosáceas y es conocido por su fruto: la zarzamora (Pérez-Barraza y Vázquez-Valdivia, 2004; SIAP, 2014a).

Este fruto pertenece al grupo de las “berries” o frutillas, en el cual se incluyen también la fresa, la frambuesa, el arándano, las uvas, las aronias y las grosellas. La zarzamora es un fruto rojo, que al madurar se tornan negro, con sabor dulce y aromático, es utilizado para la preparación de jugos, helados, yogurt, mermeladas, dulces y mosto de frutas. Está compuesta de numerosos frutos (drupas) situados alrededor de un núcleo fibroso (Pérez-Barraza y Vázquez-Valdivia, 2004; Cuevas-Rodríguez, 2011; SIAP, 2014a).

La planta está lista para fructificar aproximadamente a los 7 meses de edad; a los 16 días se desarrolla la yema floral y tiene una vida de 6 días que es cuando tira los pétalos, en ese momento y hasta que el fruto comienza a colorear transcurren 24 días; finalmente se obtiene el fruto para cosecha a los 10 a 20 días después, dependiendo de la variedad y las temperaturas (Chávez, 2011).

2.1.1 Origen de la Zarzamora.

El conocimiento de la zarzamora se remonta al año 370 A. C. (Antes de Cristo), donde ya se usaba como alimento y con fines medicinales. Desde entonces se han colectado de manera silvestre, e incluso, esta planta llegó a ser plaga en Australia y Sudamérica después de ser introducida por los colonizadores, debido principalmente, a su rápida reproducción vegetativa y a la diseminación de semillas por las aves (Pérez-Barraza y Vázquez-Valdivia, 2004; Chávez, 2011).



Figura 1. Planta de zarzamora

Fue hasta el siglo XVII que se domesticó el cultivar Evergreen, y el resto de los cultivares conocidos actualmente, fueron producidos hasta el siglo XIX y XX. En América comenzaron a ser cultivadas por los años de 1850-1860, el tipo Himalaya y Evergreen de Europa fueron las primeras en introducirse. En 1867 se listaron 18 cultivares, la mayoría seleccionados de plantas nativas. En Norteamérica fue a fines del siglo XIX que comenzaron a establecerse huertos comerciales en forma notable (Chávez, 2011; Cuevas-Rodríguez, 2011).

La industria de la zarzamora en México inicia a mediados de los 80's, con los primeros huertos comerciales en Morelos con el cultivar Logan y en Michoacán con el Brazos. Posteriormente, se fueron introduciendo otras variedades como Cherokee, Comanche, Cheyenne, Shawnee y Choctaw, provenientes de la Universidad de Arkansas y la variedad Tupy o la Brasileña originada en Brasil (Parra-Quezada, 1999; Parra-Quezada, 2005; Chávez, 2011; Cuevas-Rodríguez, 2011).

En México la variedad Tupy es la que mejor se ha adaptado, y la cual ha presentado buenas cualidades en cuanto a firmeza, color y productividad, siendo mejor que la variedad Brazos (Finn y Clark, 2012).

2.1.2 Adaptabilidad

La planta de zarzamora crece a grandes altitudes, en terrenos ubicados entre dos y tres mil metros sobre el nivel del mar. En México, llega a crecer a altitudes desde 1,100 m hasta alrededor de 2,500 m; crece adecuadamente en suelos ácidos con pH de 5.5 a 6.5 y con una profundidad de al menos 50 cm (Pérez-Barraza y Vázquez-Valdivia, 2004; FAO, 2014; SIAP, 2014a).

En condiciones naturales, la zarzamora se desarrolla bien en climas frescos y fríos, sin embargo, cuando las temperaturas descienden a -17 °C o más, las zarzamoras sufren daños. Por otro lado, hay variedades que no requieren frío para su desarrollo, por lo que crecen adecuadamente en climas cálidos (Pérez-Barraza y Vázquez-Valdivia, 2004). También llega a crecer en pedregales, en donde encuentra algo de suelo rico en materia orgánica, se adapta a condiciones de luz y sombra; pero cuando recibe mucha luz crece con más vigor (SIAP, 2014a).

2.1.3 Producción

Debido a la gran adaptabilidad de la planta de zarzamora, México representa una alternativa para el mercado nacional y de exportación. La producción de este fruto se da en la mayor parte del año (de octubre a junio), por lo que la demanda mundial es alta. En México se producen 128,976.41 toneladas anuales, lo que representa un valor de producción en pesos de \$ 4,095,530.11, siendo el mayor productor el estado de Michoacán (tabla 1). El estado de Hidalgo es productor de este fruto, y en 2013 se generó una producción de 2.20 toneladas, con una ganancia de \$ 29.7 miles de pesos, siendo Atotonilco El Grande el único productor del estado (SIAP, 2014b).

De acuerdo a un reporte emitido por la SAGARPA (2014), el cultivo de las berries es el de mayor rentabilidad en la industria hortofrutícola, siendo un importante generador de divisas y empleos para el campo nacional, por lo que se está en busca de alternativas para aumentar la producción de estos frutos.

Tabla 1. Producción agrícola de zarzamora en México, 2013

Estado	Sup. Sembrada (Ha)	Sup. Cosechada (Ha)	Producción (Ton)	PMR (\$/Ton)	Valor Producción (Miles de Pesos)
Chihuahua	20.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Colima	108.00	108.00	1,182.00	31,032.99	36,681.00
Distrito Federal	5.00	5.00	16.38	10,900.00	178.54
Guanajuato	23.00	3.00	6.00	10,666.67	64.00
Hidalgo	1.00	1.00	2.20	13,500.00	29.70
Jalisco	431.00	300.00	5,138.03	12,004.02	61,677.00
Michoacán	11,456.00	11,400.00	122,203.90	32,682.51	3,993,930.17
Morelos	10.00	10.00	18.00	10,750.00	193.50
México	20.00	20.00	74.10	15,828.54	1,172.90
Nayarit	3.00	3.00	21.60	20,000.00	432.00
Puebla	34.00	34.00	273.20	1,515.41	414.01
Querétaro	3.00	3.00	27.00	9,900.00	267.30
Veracruz	2.00	2.00	14.00	35,000.00	490.00
Total	12,117.00	11,889.00	128,976.41	31,754.10	4,095,530.11

Fuente: SIAP, 2014b

2.1.4 Exportación

En el periodo 2010 - 2013 México ocupó el tercer lugar en exportación mundial de zarzamora (figura 2), generando una ganancia en dólares de \$ 562, 293, 386, siendo el mayor exportador Estados Unidos (COMTRADE, 2014a). Del total de las exportaciones de zarzamora que realiza México, el 90 % es destinada a los Estados Unidos y el resto es para el mercado nacional en fresco y para la industria de mermeladas, yogurt y helados principalmente (Chávez, 2011; SAGARPA, 2014).

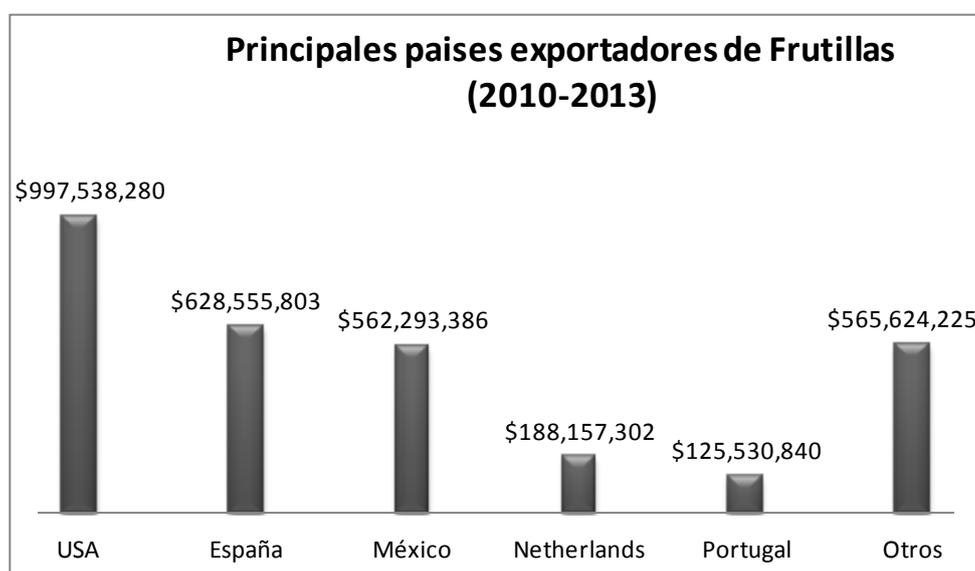


Figura 2. Valor comercial en dólares de las exportaciones de frutillas realizadas en los años 2010 – 2013. Fuente: COMTRADE, 2014a

Cabe mencionar que en los últimos años, el precio de la zarzamora ha ido en aumento a nivel mundial, por lo que el valor de las exportaciones realizadas por México aumentó un 60.7 % del año 2009 al 2013 (figura 3)

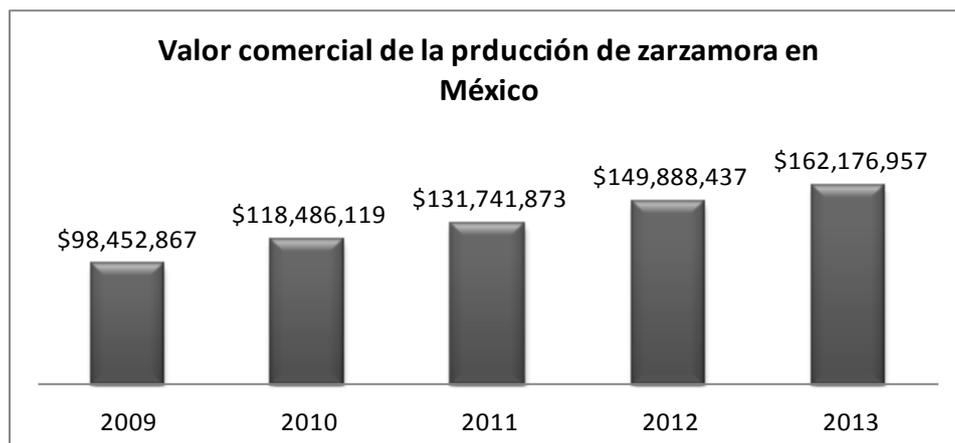


Figura 3. Aumento del valor comercial de la zarzamora exportada por México en el periodo 2009-2013. Fuente: COMTRADE, 2014b

2.1.5 Composición química y nutricional

Los frutos de zarzamora contienen un porcentaje de agua elevado (alrededor de un 80 % de su peso total), es buena fuente de fibra, vitaminas del complejo B y minerales, como calcio, fósforo, potasio y magnesio, entre otros (tabla 2).

Son también una fuente rica en compuestos bioactivos con propiedades antioxidantes, tales como vitamina E y C, β -carotenos, polifenoles y flavonoides (Deighton *et al.*, 2000; Cuevas-Rodríguez *et al.*, 2010; Chávez, 2011; Lee *et al.*, 2012), siendo estos últimos compuestos, los que confieren mayor poder antioxidante (Deighton *et al.*, 2000; Tiwari *et al.*, 2009b).

Tabla 2. Información nutrimental de la zarzamora

Nutrientes (Unidad)	Valor por 100g de porción Comestible
Agua (g)	88.15
Energía (Kcal)	43
Proteínas (g)	1.39
Grasa (g)	0.49
Carbohidratos (g)	9.61
Fibra dietética (g)	5.3
Azúcar (g)	4.88
Calcio (mg)	29
Hierro (mg)	0.62
Magnesio (mg)	20
Fósforo (mg)	22
Potasio (mg)	162
Sodio (mg)	1
Vitamina C (mg)	21
Ácido pantoténico (mg)	0.276
Vitamina A (UI)	214
Vitamina E (mg)	1.17
β -caroteno (μ g)	128
Luteína (μ g)	118

Fuente: USDA, 2011

2.2 Compuestos bioactivos

En los alimentos se han encontrado, además de macro y micronutrientes, otro tipo de compuestos que no son denominados “nutrientes” como tal, sin embargo, dichos compuestos son potencialmente bioactivos, produciendo una gran variedad de efectos biológicos. Se pueden clasificar a estos compuestos de acuerdo a su naturaleza bioquímica en ácidos grasos y lípidos estructurales, aminoácidos y proteínas, carbohidratos y derivados, microorganismos y minerales, isoprenoides y polifenoles (tabla 3) (Hall, 2001; Wildman, 2001).

Tabla 3. Clasificación de compuestos bioactivos según su naturaleza bioquímica

Grupo	Compuestos
Ácidos grasos y lípidos estructurales	Esfingolípidos, lecitinas, ácido linoléico, ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados
Aminoácidos y proteínas	Aminoácidos, compuestos alil-S, capsaicinoides, isotiocianatos, colinas y folatos
Carbohidratos derivados	Ácido ascórbico, oligosacáridos y polisacáridos no almidonosos
Microorganismos	Probióticos y prebióticos
Minerales	Ca ²⁺ , Zn ²⁺ , Cu ²⁺ , K ⁺ y Se ²⁻
Isoprenoides	Carotenoides, saponinas, tocotrienoles y terpenos simples
Polifenoles	Ácidos fenólicos, flavonoides, taninos, estilbenos y difluoroilmetanos

Modificado de Wildman, 2001.

2.2.1 Ácidos grasos y lípidos estructurales

Los ácidos grasos son ácidos carboxílicos de cadena larga, suelen tener un número par de átomos de carbono, generalmente entre 12 y 24, siendo los más abundantes los que tienen 16 y 18 carbonos. Las cadenas de los ácidos grasos pueden ser saturadas o insaturadas, este último caso se denominan poliinsaturados.

En la actualidad se ha estudiado la capacidad antioxidante que tienen algunos ácidos grasos, entre ellos se encuentra el ácido poliinsaturado ω -3 presente en plantas y animales marinos, y el ácido linoléico producido por bacterias en el rumen de animales en pastoreo. Ambos ácidos grasos son producidos ampliamente por

plantas, utilizando acetil CoA de manera similar a los humanos (Wildman y Kelley, 2006).

2.2.2 Proteínas y aminoácidos

Algunos aminoácidos han sido estudiados debido a los beneficios que brindan a la salud, y se han clasificado como compuestos bioactivos o nutraceuticos. Entre ellos destaca la arginina por su efecto cardioprotector, y la taurina, la cual, se ha demostrado que reduce los niveles de presión arterial, actuando como antioxidante (Wildman y Kelley, 2006). Así mismo, se ha reportado que algunos aminoácidos participan en la quelación de metales, como el ión ferroso, causante de estrés oxidativo (Berlett *et al.*, 2001; Heim *et al.*, 2002). Otro derivado de los aminoácidos es el ácido fólico (vitamina B₉), que reduce los niveles de homocisteína, brindando un efecto cardioprotector (Wildman y Kelley, 2006).

2.2.3 Carbohidratos y sus derivados

Las plantas producen polisacáridos que tienen funciones prebióticas, entre ellas se encuentra la lignina, compuesta por anillos fenólicos, la cual no es digerible por las enzimas del ser humano. También está la celulosa, compuesta por repetidas cadenas ramificadas de glucosa, y la hemicelulosa, que se encuentra normalmente ligada a la celulosa, formando cadenas altamente ramificadas con pentosas, hexosas, ácido urónico y la pectina, formada por repetidas unidades de ácido metilgalacturónico (Wildman y Kelley, 2006). Otro derivado de los carbohidratos es el ácido ascórbico o vitamina C, el cual se encuentra en forma de ácido L-ascórbico y ácido dehidroascórbico en plantas, frutas y verduras, y en alimentos procesados a los que se les ha añadido como antioxidante, al ejercer un efecto protector contra daño oxidativo (Jonhson, 2001).

2.2.4 Microorganismos

Los microorganismos probióticos son considerados compuestos bioactivos o nutraceuticos, debido a los beneficios que estos brindan a la salud humana (Wildman y Kelley, 2006). Se ha evaluado los extractos de especies de *Penicillium* y *Aspergillus*, los cuales han demostrado gran capacidad protectora a ácidos grasos.

Además, en la actualidad se han aislado compuestos antioxidantes producidos por microorganismos, tales como el ácido protocatecuico, la citrinina y ácido curvúlico, siendo este último el de mayor capacidad antioxidante, incluso mayor que el α -tocoferol (Hall, 2001).

2.2.5 Minerales

Algunos minerales se han reconocido por sus propiedades funcionales, tal es el caso del calcio, que además de estar relacionado con la salud de los huesos, también se le atribuyen efectos benéficos a la salud del colon y efectos cardioprotectores. El potasio se ha relacionado con la disminución de la presión arterial y salud cardiovascular. Otros minerales como el zinc, cobre, selenio y magnesio han mostrado propiedades antioxidantes (Wildman y Kelley, 2006).

2.2.6 Isoprenoides

Los isoprenoides son moléculas muy abundantes en los vegetales, constituidos por unidades de 5 carbonos y se clasifican de acuerdo al número de isoprenos que contienen, algunos de ellos se conocen como vitaminas liposolubles (vitaminas A, E y K) (Voet *et al.*, 2007).

La Vitamina A (Retinoides), encontrada en la naturaleza como β -caroteno, precursor de dicha vitamina, posee una larga cadena de dobles enlaces que le confieren su capacidad antioxidante. La vitamina E, es la principal vitamina liposoluble con capacidad antioxidante. Este término se aplica a ocho compuestos: tocoferoles y tocotrienoles α -, β -, γ - δ -, siendo el α -tocoferol el que ejerce un 90 % de la actividad antioxidante de la vitamina E endógena en humanos (Jonhson, 2001). La vitamina K, actúa como cofactor en el proceso de carboxilación del ácido glutámico para dar ácido γ -carboxiglutámico, indispensable en la síntesis de determinados factores de la coagulación, como la protrombina (Battaner-Arias, 2014).

2.2.7 Polifenoles

Los polifenoles son una amplia variedad de metabolitos secundarios, sintetizados por plantas vasculares, de los que se han identificado más de 8000 compuestos fenólicos (Singh *et al.*, 2009; Wu-Yang y Yi-Zhong, 2010).

Estos compuestos son sintetizados por la ruta de los aminoácidos aromáticos, algunos de estos continúan la vía de fenilpropanoides, produciendo derivados del ácido cinámico, los cuales podrían unirse en la ruta de los flavonoides para dar lugar a una gran diversidad de compuestos flavonoides (Wildman, 2001; Cuevas-Rodríguez, 2011).

Estructuralmente, los compuestos fenólicos son derivados del benceno con uno o más grupos hidroxilo sustituyentes, frecuentemente acompañados de sustituciones funcionales, tales como ésteres, ésteres metílicos, glicósidos y otros (Han *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008; Cuevas-Rodríguez, 2011). Los polifenoles varían desde compuestos simples a complejos, su posición y número de glicósidos, taninos y derivados fenólicos grandes (Han *et al.*, 2007; Wu-Yang y Yi-Zhong, 2010).

Los compuestos fenólicos se clasifican en cuatro grupos: ácidos fenólicos flavonoides, taninos, estilbenos y difluoroilmetanos (Han *et al.*, 2007; Cuevas-Rodríguez, 2011).

a) Ácidos fenólicos

Del total de polifenoles, los ácidos fenólicos se encuentran presentes en las plantas en un 30%. Se pueden diferenciar dos grupos principales de ácidos fenólicos, los ácidos benzoicos y los ácidos cinámicos. Los ácidos fenólicos derivados del ácido hidroxibenzoico son ácido gálico, protocatecuico, vanílico y siríngico. Los ácidos fenólicos derivados de ácido hidroxicinámico incluyen el ácido ferúlico, *p*-cumárico, cafeico y sinápico (figura 4), siendo el cafeico el que proporciona mayor actividad antioxidante (Hall, 2001; Cuevas-Rodríguez, 2011).

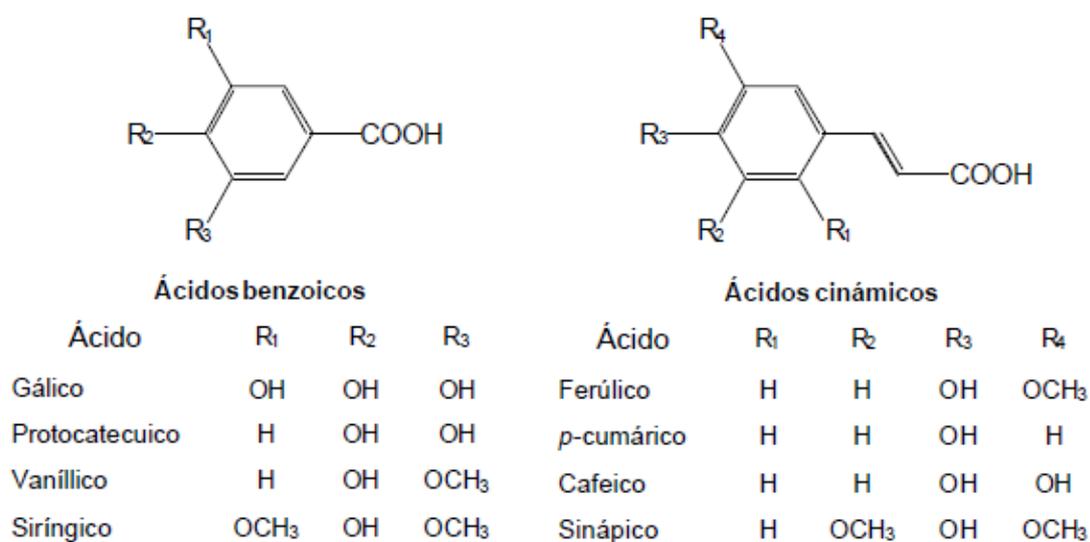


Figura 4. Estructura química de los principales ácidos fenólicos

b) Diferuloilmetanos

Los compuestos diferuloilmetanos son un grupo de compuestos fenólicos con dos anillos aromáticos, sustituidos con grupos hidroxilos y ligados por una cadena alifática conteniendo grupos carbonil. Los curcuminoides son el grupo mayormente conocido de diferuloilmetanos, siendo el más común el aislados de raíz de *Curcuma longa* (Cuevas-Rodríguez, 2011).

c) Estilbenos

Los estilbenos se caracterizan por la presencia de un núcleo de 1,2-difeniletieno con grupos hidroxilo en los anillos aromáticos, existen en la forma de monómeros y oligómeros (figura 5). Los estilbenos con mayor interés nutricional son el piceido (resveratrol-3-O-β-D-glucósido) y el resveratrol (3, 5, 4'-trihidroxiestilbeno) que es el compuesto mejor conocido, éste es generado en respuesta al estrés en algunas plantas y se ha encontrado en mayor proporción en la piel de las uvas, cacahuate y vino tinto. Éste posee efecto inhibitorio sobre radicales superóxido y peróxido de hidrógeno, se le atribuyen propiedades antiinflamatorias y anticancerígenas (Martínez y Moreno, 2000; Riles *et al.*, 2006; Cuevas-Rodríguez, 2011).

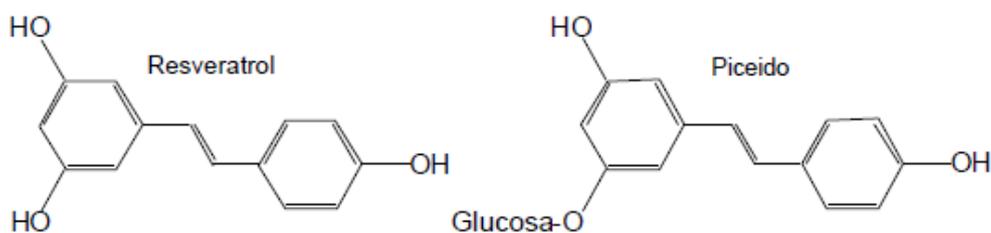


Figura 5. Estructura química de los principales estilbenos

d) Flavonoides

Los flavonoides están presentes de manera abundante en los vegetales, aproximadamente 4000 sustancias, de las cuales, 900 forman parte de la dieta humana (Yanishlieva, 2001; D'Archivio *et al.*, 2007). Se distribuyen en las plantas vasculares de manera ubicua y sus propiedades biológicas han llamado la atención de los investigadores, de modo que, hoy día, es el grupo de polifenoles más estudiado (Hassimotto *et al.*, 2008; Cuevas-Rodríguez *et al.*, 2010).

Se les atribuyen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antiagregantes, antihemorrágicas, vasodilatadoras, antineoplásicas, antivirales, antibacterianas, antialérgicas y hepatoprotectoras (Álvarez-Castro y Orallo-Cambeiro, 2003; Hassimotto *et al.*, 2008).

Su estructura básica (flaván) consta de dos grupos fenilo (A y B) unidos por un puente de tres carbonos que forma un anillo heterocíclico oxigenado (anillo C). En función de los grados de oxidación e insaturación del anillo heterocíclico, se pueden diferenciar varias clases de flavonoides y dentro de cada clase se pueden establecer diferencias en base a la naturaleza y número de los sustituyentes unidos a los anillos (Robards *et al.*, 1999).

Antocianinas

Son colorantes naturales que pertenecen a la familia de los flavonoides, se encuentran ampliamente distribuidos en frutos principalmente, y en las flores (aunque no en concentraciones altas). Estos pigmentos son responsables de las coloraciones que van de rojo intenso a colores azules o morados, en frutas y vegetales (Sellappan *et al.*, 2002; D'Archivio *et al.* 2007; Tiwari *et al.*, 2009c; Jiménez

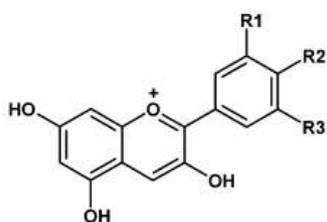
et al., 2010; Ivanovic *et al.*, 2014), y juegan un papel muy importante en el mecanismo de protección de las plantas al ataque de insectos (Hassimotto *et al.*, 2008; Tiwari *et al.*, 2009b; Tiwari *et al.*, 2009d; Cuevas-Rodríguez *et al.*, 2010).

El interés en estos pigmentos se ha intensificado gracias a sus posibles efectos terapéuticos y benéficos, así como a su potencial antioxidante, ya que ayudan en la reducción de enfermedades coronarias, brindan efectos anticancerígenos, antitumorales, antiinflamatorios y antidiabéticos; además mejoran la agudeza visual y el comportamiento cognitivo, así como protección contra la radiación solar (Sellappan *et al.*, 2002; Wu y Prior, 2005).

Su estructura está constituida principalmente por el catión flavilo y dobles enlaces conjugados responsables de la absorción de la luz alrededor de 500 nm. En la naturaleza, se encuentran en su forma de aglicona (glicosilada), llamadas antocianidinas, por lo general con sustituciones penta-(3,5,7,3, 4) o hexa- (3,5,7,3, 4, 5) (Delgado-Vargas *et al.*, 2000).

Se han identificado más de veinte antocianidinas naturales; siendo las más comunes en los alimentos la pelargonidina (Pg), peonidina (Pn), cianidina (Cy), malvidina (Mv), petunidina (Pt) y delfinidina (Dp) (figura 6) (Jurd, 1972; Wu y Prior, 2005; Tiwari *et al.*, 2009c; Dubrović *et al.*, 2011).

La estabilidad del color de las antocianinas está relacionada con factores como su estructura, concentración, pH, temperatura, luz, enzimas, oxígeno, copigmentos, iones metálicos, ácido ascórbico, azúcares y los productos de degradación (Tiwari *et al.*, 2009c; Dubrović *et al.*, 2011).



Antocianidina	R1	R2	R3
Pg	H	OH	H
Pn	OH	OH	H
Cy	OH	OH	OH
Mv	OMe	OH	H
Pt	OMe	OH	OH
Dp	OMe	OH	OMe

Figura 6. Estructura química de las principales antocianidinas

e) Taninos

Los taninos son metabolitos secundarios de las plantas, brindan características astringentes a los alimentos y son utilizados como agentes clarificantes y antioxidantes en el vino, cerveza y jugos de frutas (Rodríguez *et al.*, 2010).

Estos polifenoles son solubles en agua, con un peso molecular de entre 500 y 3000 g/mol (Santos-Buelga y Scalbert, 2000); sin embargo, algunos taninos son insolubles en agua, tienen pesos moleculares de 3,000 a 30,000 g/mol y pueden encontrarse asociados con polisacáridos de la pared celular (Wursch *et al.*, 1984; Odriozola-Serrano *et al.*, 2009).

Los taninos se dividen en dos grupos: taninos hidrolizables y taninos condensados. Los taninos condensados son los más comunes en la dieta humana y sus efectos en la salud han sido mucho más estudiados que las de los taninos hidrolizables, este tipo de taninos son hidrolizados por ácidos, bases, agua caliente y por enzimas como la tanasa (Nandakumar *et al.*, 2008; Rodríguez *et al.*, 2010; Cuevas-Rodríguez, 2011).

- Taninos condensados.

Los taninos condensados, conocidos también como proantocianidinas, son compuestos fenólicos que se encuentran muy distribuidos en frutas, vegetales, nueces, semillas, flores, té negro y corteza de plantas. Son compuestos que toman la forma de oligómeros o polímeros de unidades de flavan-3-ol, tales como catequina y epicatequina (Nandakumar *et al.*, 2008). Los tres anillos que conforman la

estructura básica de las proantocianidinas son denominados con las letras A, B y C (figura 7). Estructuralmente, están ligados por enlaces C-C y ocasionalmente por enlaces C-O-C. Las proantocianidinas más comunes en los alimentos son las procianidinas (PCs) con una sustitución en el anillo B de 3',4'-dihidroxi y las prodelfinidinas con sustitución 3',4',5'-trihidroxi. (Hashimoto *et al.*, 1989; Santos-Buelga y Scalbert, 2000; Nandakumar *et al.*, 2008).

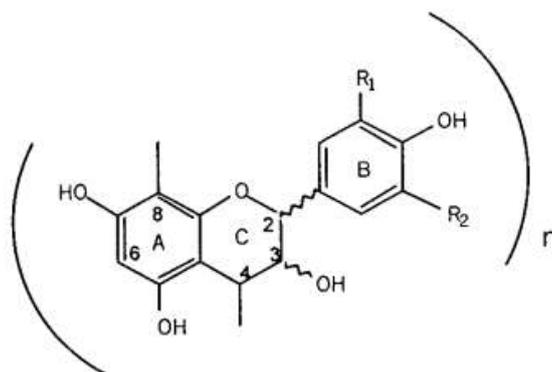


Figura 7. Estructura básica de las proantocinidinas: propelargonidinas R1, R2 =H; procianidinas R1 =H, R2 =OH; prodelfinidinas R1, R2 =OH. Fuente: Santos-Buelga y Scalbert, 2000.

Las subunidades de flavan-3-ols pueden tener grupos acilo sustituyentes como ácido gálico o grupos glicosilo, ambos pueden estar unidos en la posición del C3 o C5 de los oligómeros (Santos-Buelga y Scalbert, 2000).

- Taninos hidrolizables

Los taninos hidrolizables se forman cuando el ácido elágico se esterifica y se liga con grupos hidroxilo de un carbohidrato polirol, como la glucosa, fructosa, xilosa y sacarosa. Si el ácido es ácido elágico, los compuestos son llamados galotaninos, y elagitaninos cuando se hidroliza el tanino y se forma ácido elágico y agua (Odriozola-Serrano *et al.*, 2009).

Estos compuestos bioactivos ayudan a reducir de manera considerable las enfermedades crónico-degenerativas, tales como cáncer, diabetes y enfermedades cardiovasculares, gracias a sus propiedades antioxidantes (Nandakumar *et al.*, 2008; Odriozola-Serrano *et al.*, 2009; Rodríguez *et al.*, 2010; Cuevas-Rodríguez, 2011).

2.3 Actividad antioxidante

Un antioxidante es capaz de aplazar, retardar o prevenir el daño oxidativo causado por radicales libres, especies reactivas de oxígeno (ROS) o nitrógeno, además de brindar protección de las defensas naturales de antioxidantes. Cuando en el organismo se produce un desbalance entre la producción de radicales libres y ROS, y la eliminación de estos, ocurre lo que se conoce como estrés oxidativo, el cual se ha relacionado con el desarrollo de ciertas patologías, entre ellas la diabetes, ciertos tipos de cáncer y cardiopatías (Nandakumar *et al.*, 2008; Reuter *et al.*, 2010).

Los antioxidantes se clasifican en dos: a) primarios, que inhiben o retardan la oxidación mediante el atrapamiento de radicales libres; entre ellos se encuentran los compuestos fenólicos como la vitamina E, y b) secundarios, que actúan mediante la quelación de metales pesados, captación de oxígeno, conversión de hidroperóxidos a especies no radicales, absorción de rayos UV o inactivación de oxígeno (Gordon, 2001).

2.3.1 Antioxidantes y la salud

La actividad antioxidante en los productos alimenticios proporciona beneficios sobre la salud, principalmente a través de la combinación de efectos aditivos y/o sinérgicos. La mayor parte de la actividad antioxidante proviene principalmente del contenido de flavonoides y otros compuestos fenólicos, actuando de manera sinérgica con otros compuestos con actividad antioxidante, tales como las vitaminas C, E y A (Patras *et al.*, 2009; Cuevas-Rodríguez, 2011; Ivanovic *et al.*, 2014).

De manera general, los polifenoles tienen la capacidad de: atrapar radicales libres, modular la transducción de señales, inhibir enzimas oxidantes e inducir la actividad de las enzimas antioxidantes. Estas propiedades impactan de manera significativa en la salud humana, ya que brindan efecto cardioprotector, antiinflamatorio, antitumoral, protección endotelial, mejoran la salud gastrointestinal, brindan inmunoprotección y neuroprotección, además de prevenir la diabetes (Han *et al.*, 2007).

Las isoflavonas y ácidos fenólicos (ácido cafeico y ácido gálico) son mejor absorbidos, seguido de las catequinas, flavanonas y glucósidos de quercetina

(Manach *et al.*, 2005). Sin embargo, la mayoría de los polifenoles en la forma de ésteres, glucósidos o polímeros no pueden ser absorbidos en su forma nativa, de tal modo que deben de ser fraccionados por enzimas intestinales o por la microflora para poder llegar a la sangre y tejidos (D'Archivio *et al.* 2007; Saura-Calixto *et al.*, 2007). Por otro lado, algunos polifenoles se conjugan con glucoronidatos, sulfatos y grupos metilos de la mucosa intestinal y tejidos adyacentes para poder llegar a plasma, tal es el caso de la epicatequina y la epigallocatequina (Serrano *et al.*, 2009).

En cuanto a la bioaccesibilidad y biodisponibilidad de taninos, estos no son absorbidos como tal. En plasma se han detectado los dímeros B₁ (Sano *et al.*, 2003) y B₂, los cuales han demostrado baja absorción (100 veces menor que la de los monómeros de flavanoles) (Manach *et al.*, 2005; Cuevas-Rodríguez, 2011). Sin embargo, para que los taninos tengan un efecto positivo a la salud, no requieren que su absorción intestinal sea eficiente, ya que pueden tener efectos directos sobre la mucosa intestinal y protegerla contra el estrés oxidativo o la acción de los carcinógenos (Manach *et al.*, 2005; Williamson y Manach, 2005).

Se ha demostrado que el consumo de alimentos ricos en proantocianidinas, aumenta la capacidad antioxidante del plasma, mostrando efectos positivos sobre la función vascular, lo cual podría estar asociado a su interacción en el intestino con otros componentes, tales como lípidos o hierro (Manach *et al.*, 2005).

2.4 Antioxidantes presentes en la zarzamora

Varios estudios revelan la presencia de compuestos bioactivos con actividad antioxidante en la zarzamora (Sellapan *et al.*, 2002; Tiwari *et al.*, 2009b; Jiménez *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2012; Ivanovic *et al.*, 2014), la cual ha evidenciado mayor capacidad antioxidante con respecto a otros frutos y vegetales; por lo tanto, mayores beneficios en la prevención de enfermedades crónico degenerativas (Cuevas-Rodríguez *et al.*, 2010).

Entre los compuestos bioactivos presentes en la zarzamora se encuentra la fibra, la vitamina C, β -caroteno, α -tocoferol, ácido linoléico y linolénico, y compuestos fenólicos, siendo los flavonoides y taninos los más abundantes (Hager *et al.*, 2008; Acosta-Montoya *et al.*, 2010; Cuevas-Rodríguez, 2011; Lee *et al.*, 2012). En varios

estudios se ha encontrado que en diversos cultivares de zarzamora, el compuesto más abundante en la zarzamora es la cianidina-3-glucósido (Mertz *et al.*, 2007; Elisia *et al.*, 2007; Acosta-Montoya *et al.*, 2010; Cuevas-Rodríguez, 2011).

En la tabla 4 se reportan los compuestos fenólicos identificados en especies de zarzamora.

Tabla 4. Compuestos fenólicos identificados en especies de zarzamora.

Grupo	Compuesto	Referencia
Flavonoides	Cianidina-3-O-glucósido	1-9
	Cianidina-3-O-(6-O-malonil) glucósido*	
	Cianidina-3-O-sambubiosido	
	Cianidina-3-O-arabinósido	
	Cianidina-3-O-xilosilrutinosido	
	Cianidina-3-O-rutinosido	
	Cianidina-3-O-xilosido*	
	Cianidina-3-dioxalilglucósido*	
	Pelargonidina-3-glucósido	
	Pelargonidina-3-rutinosido	
	Kaempferol-gucósido	
	Kaempferol-3-glucuronido	
	Quercetina-3-rutinósido	
	Quercetina-3-glucurónido	
	Quercetina-3-arabinósido	
	Quercetina-3-soforósido	
Miricetina		
Ácido fenólicos	Ácido caféico	7,9
	Ácido cumárico	
Taninos	Derivados de ácido ferúlico	5, 7, 9
	Lambertanina C	
	Sanguinina H-6	
	Derivados de ácido elágico	
	Ácido gálico y derivados	
	Catequina Epicatequina	

*no identificado en todas las variedades de zarzamora. Fuente: 1. Sellappan *et al.*, 2002; 2. Wu y Prior, 2005; 3. Elisia *et al.*, 2007; 4. Mertz *et al.*, 2007; 5. Acosta-Montoya *et al.*, 2010; 6. Cuevas-Rodríguez *et al.*, 2010; 7. Sariburun *et al.*, 2010; 8. Cuevas-Rodríguez, 20011; 9. Ivanovic *et al.*, 2014

Se ha demostrado que las frutas y vegetales ocupan el primer lugar en cuanto a contenido polifenólico y al estar en forma soluble hace que estos tengan una mayor

bioaccesibilidad y por tanto mayor biodisponibilidad, sin embargo, debido a la corta vida de anaquel de estos productos, es necesaria la aplicación de métodos de conservación, mediante los cuales ocurren cambios en la composición nutricional del alimento (Tscheuschner, 2001; Lee y Coates, 2003; Manach *et al.*, 2005; Wells y Singh, 2009).

2.5 Procesamiento de alimentos

Los alimentos son susceptibles a la alteración, por lo que estos deben consumirse de manera inmediata o conservarse para poder ser almacenados. Así, el término de conservación se refiere a todas las medidas tomadas para impedir la alteración de los alimentos (Luck y Jager, 1995). En la industria alimentaria, los tratamientos térmicos, como la pasteurización, son los más usados para la inactivación de microorganismos y enzimas causantes del deterioro de alimentos (Lee y Coates, 2003; Wells y Singh, 2009).

2.5.1 Procesado de frutas

El procesado de frutas se caracteriza por dos rasgos: el período de cosecha limitado y la capacidad de conservación reducida, lo que hace necesaria la diversificación de productos derivados, tales como conservas esterilizadas, congeladas y crudas, mermeladas, alimentos infantiles y jugos, para lo cual se requiere un estado de esterilidad para evitar el crecimiento y desarrollo de microorganismos, y con ello el deterioro del producto (Tscheuschner, 2001).

2.5.2 Jugos

La obtención de la fracción líquida de las frutas y hortalizas se obtiene mediante el prensado o trituración, con el objetivo de extraer la mayor fracción posible de jugo y la menor fracción posible de turbios finos (Tscheuschner, 2001). De acuerdo a la Norma General del CODEX para zumos (jugos) y néctares de frutas (CODEX STAN 247-2005), el jugo de fruta es el líquido sin fermentar, pero fermentable, que se obtiene de la parte comestible de frutas en buen estado, debidamente maduras y frescas, lo cuales podrán elaborarse mediante procedimientos que mantengan las características físicas, químicas, organolépticas (color, aroma y sabor) y nutricionales esenciales de la fruta de que proceden.

En México, los jugos de frutas son ampliamente consumidos y son empleados como sustituto de los refrescos, ya que, a diferencia de estos últimos, proveen la mayor parte de los nutrientes de su fuente natural. Sin embargo, en la mayoría de los jugos industrializados, el aporte energético es alto y se altera el contenido de algunos de los compuestos bioactivos, como la fibra, vitaminas y otros compuestos (Rivera *et al.*, 2008), y su consumo en exceso se han vinculado con resultados adversos en la salud, incluido el aumento del riesgo de diabetes mellitus tipo 2 (Sanigorski y Bell, 2007; Tam y Garnett, 2006).

2.5.2.1 Problemas de calidad en los jugos

Uno de los principales problemas de calidad en la elaboración y comercialización de jugos es la alteración microbiana, que puede provocar deterioro en la calidad del producto, así como problemas de intoxicación alimentaria (Tiwari *et al.*, 2008a; Tiwari *et al.*, 2008b; Wong *et al.*, 2010; Abid *et al.*, 2014). El oscurecimiento enzimático es otro problema de calidad de jugos de fruta, y se da por la formación de pigmentos color café, rojo o negro, relacionado con la oxidación de compuestos fenólicos hacia o-quinonas inestables altamente electrofílicas (Mayer and Harel, 1991) y se asocia fuertemente a la actividad de la polifenoloxidasas (PPO) (Yoruk, 2003). Por otro lado, la enzima pectinmetilesterasa (PME) provoca precipitados en los jugos de frutas, debido a que genera una desesterificación de los grupos metil en el ácido galacturónico de la pectina, afectando considerablemente la aceptación del producto (Ralet *et al.*, 2001; Croak y Correding, 2006; Abid *et al.*, 2014).

2.5.3 Procesamiento de alimentos y su efecto en los compuestos bioactivos

En la actualidad, los métodos más comunes para el procesamiento de alimentos son los tratamientos térmicos, que implican la aplicación de calor, debido a su capacidad para inactivar microorganismos y algunas enzimas responsables del deterioro y descomposición de alimentos (Ashokkumar *et al.*, 2008; Soria y Villamiel, 2010; Dubrović *et al.*, 2011). Sin embargo, el tratamiento térmico en condiciones severas puede inducir cambios químicos y físicos, perjudicando de manera significativa las

propiedades organolépticas y el contenido o la biodisponibilidad de algunos compuestos bioactivos.

En la actualidad el consumidor se inclina por alimentos procesados con alto valor nutritivo y propiedades organolépticas similares a las del producto fresco. Es por esto que hay un creciente interés en los nuevos métodos de procesamiento o las llamadas “tecnologías emergentes”, que implican condiciones de procesamiento suaves, tales como el procesamiento de alta presión hidrostática (HHP), pulsos de alta intensidad de campo eléctrico (PEF), pulsos de alta intensidad de campo magnético (OMF), irradiación y ultrasonido, entre otros, con la finalidad de extender la vida de anaquel y obtener alimentos de alta calidad y que al mismo tiempo preserven sus propiedades funcionales (Ashokkumar *et al.*, 2008; Soria y Villamiel, 2010; Chemat *et al.*, 2011; Dubrović *et al.*, 2011; Rawson *et al.*, 2011).

2.6 Uso de las tecnologías emergentes en el procesamiento de alimentos

Las tecnologías emergentes, o procesos no térmicos, presentan varias ventajas sobre los métodos convencionales de procesamiento térmico, ya que se llevan a cabo a temperaturas relativamente bajas (<50°C) y permiten la inactivación de microorganismos patógenos y deteriorativos, así como a la inactivación de enzimas, sin afectar de manera significativa el color, sabor y propiedades nutricias del alimento (Calderón-Miranda *et al.*, 1999).

2.6.1 Alta presión hidrostática

En el procesamiento de alimentos por altas presiones hidrostáticas (HHP por sus siglas en inglés) se aplica presión al alimento de manera isostática, es decir, el alimento es comprimido uniformemente en todas direcciones regresando a su forma original al ser eliminada la presión. Las presiones empleadas durante el procesamiento del alimento son mayores a 400 MPa y estas provocan un incremento en la permeabilidad de la célula, inhiben reacciones energéticas y desnaturalizan enzimas esenciales para el crecimiento y reproducción de la célula microbiana (Rastogi *et al.*, 2007; Barbosa-Cánovas *et al.*, 1997).

2.6.2 Pulsos de alta intensidad de campo eléctrico

Durante el procesamiento de líquidos por pulsos de alta intensidad de campo eléctrico (PEF por sus siglas en inglés) el alimento se expone durante microsegundos ($< 1s$) a pulsos de alto voltaje (20-80 kV/cm). La exposición de la célula microbiana a PEF induce la formación de poros en la membrana celular, lo cual puede ser reversible o irreversible de acuerdo a la intensidad del campo eléctrico aplicado (Señorans *et al.*, 2003; Qin *et al.*, 1996).

2.6.3 Pulsos de alta intensidad de campo magnético

Los pulsos de alta intensidad de campo magnético (OMF por sus siglas en inglés), son generados mediante electromagnetos de corriente alterna, y su intensidad varía de manera periódica dependiendo de la frecuencia y del tipo de onda del magneto. Sin embargo, los resultados reportados hasta ahora sobre el efecto que los campos magnéticos ejercen en microorganismos y en otros sistemas biológicos son contradictorios, y se han clasificado en promotores del crecimiento, inhibidores del crecimiento y ningún efecto observable (Rawson *et al.*, 2011; Tiwari *et al.*, 2009).

2.6.4 Irradiación

La irradiación se logra sometiendo al producto a una fuente de energía ionizante, mediante rayos X, rayos gamma o electrones altamente cargados, o por radiación con rayos ultravioleta (UV), luz visible, microondas e infrarrojo. La inactivación microbiana es debida al daño que ocasiona la irradiación al ADN celular, inhibiendo el crecimiento y reproducibilidad de los microorganismos (Rawson *et al.*, 2011; Tiwari *et al.*, 2009).

2.6.7 Ultrasonido

El ultrasonido es una tecnología emergente que resulta económica, sencilla, respetuosa con el medio ambiente y eficaz para lograr una disminución de la carga microbiana, sin afectar de manera significativa, las características sensoriales y nutricionales de los jugos procesados (Earnshaw *et al.*, 1995; Tiwari *et al.*, 2009c; Soria y Villamiel, 2010; Herceg *et al.*, 2013).

El ultrasonido se refiere a las ondas de sonido por encima de la frecuencia del oído humano (>20kHz) y su aplicación puede ser acoplado a un dispositivo, sumergido en un baño o de manera directa (Chemat *et al.*, 2011). De acuerdo a la frecuencia empleada, el ultrasonido puede ser dividido en dos:

- Ultrasonido de baja frecuencia/alta energía, en el rango de los KHz (16 - 100 kHz). Utilizado en la industria alimentaria para la conservación de alimentos, ya que pueden alterar las propiedades fisicoquímicas o la estructura de un material, produciendo reacciones químicas (Chemat *et al.*, 2011; Kentish y Feng, 2014).
- Ultrasonido de alta frecuencia/baja energía. Este se utiliza normalmente para aplicaciones analíticas, como la determinación de la composición, estructura, y estado físico: ultrasonido de diagnóstico (16 - 100 MHz) y ecografía de diagnóstico (1 - 10 MHz) (Chemat *et al.*, 2011; Kentish y Feng, 2014).

Así, el ultrasonido de alta intensidad y baja frecuencia genera el fenómeno de cavitación, que involucra el crecimiento y colapso de las microburbujas pre-existentes en el medio tratado, elevando la temperatura y presión en la zona de cavitación. Su importancia radica en que cuando este pasa a través de un medio, surgen vibraciones que pueden modificar partículas sólidas presentes en el medio, sin embargo, a medida que la frecuencia aumenta, la cavitación es menor y en rango de los MHz la cavitación no ocurre (Earnshaw *et al.*, 1995; Piyasena *et al.*, 2003; Tiwari *et al.*, 2008; Soria y Villamiel, 2010; Valdramidis *et al.*, 2010).

La coalescencia de las microburbujas supone la liberación de toda la energía acumulada, ocasionando incrementos de temperatura instantáneos y focales, que se disipan sin que supongan una elevación sustancial de la temperatura del líquido tratado. Sin embargo, la energía liberada, así como el choque mecánico asociadas al fenómeno de implosión, afectan la estructura de las células situadas en el micro entorno (Earnshaw *et al.*, 1995; Tiwari *et al.*, 2008; Tiwari *et al.*, 2009b; Soria y Villamiel, 2010; Valdramidis *et al.*, 2010). Estos cambios de presión y temperatura permiten la destrucción de los microorganismos (Earnshaw *et al.*, 1995; Herceg *et al.*, 2013).

La investigación de las ondas de ultrasonido como potencial método de inactivación microbiana inició en la década de 1960, después de que fuera descubierto que las ondas de sonido, utilizados en la guerra para detectar submarinos, mataba a los peces del entorno, a partir de entonces el efecto de estas ondas ha sido estudiada (Piyasena *et al.*, 2003). Actualmente el ultrasonido tiene varias aplicaciones en la industria de procesamiento de productos químicos, así como limpieza y procesamiento de alimentos (tabla 5), en donde se utiliza el ultrasonido de alta intensidad, de 16 - 100 kHz (Patist y Bates, 2008).

Hoy en día, se ha estudiado el efecto del ultrasonido con otras técnicas de procesamiento, tales como la aplicación de altas presiones, conocido como manosonicación, y combinado con calor (termosonicación), o con ambas técnicas y se le denomina manotermosonicación (Earnshaw *et al.*, 1995; Herceg *et al.*, 2013).

2.7.1 Termoultrasonido

El término de termosonido o termoultrasonido se refiere a la aplicación de ondas de ultrasonido combinado con un tratamiento térmico suave (< 100 °C) (Demirdöven y Baysal, 2008; Herceg *et al.*, 2013), esta tecnología emergente ha demostrado ser una buena opción como alternativa a los tratamientos térmicos convencionales, ya que se han obtenido resultados favorables en el procesamiento de alimentos, tales como la inactivación microbiana y enzimática, así como la liberación y retención de compuestos con actividad antioxidante y el mantenimiento de sus propiedades relacionadas con la calidad como el color, acidez titulable, entre otros parámetros (Earnshaw *et al.*, 1995; Cheng *et al.*, 2007; Demirdöven y Baysal, 2008; Tiwari *et al.*, 2010; Adekunle *et al.*, 2010; Vidal-Fonteles *et al.*, 2012; Ercan y Soysal, 2013).

Con la finalidad de inactivar microorganismos, se ha aplicado de forma directa el ultrasonido, y se han empleado los mismos modelos que en otros métodos de conservación: *Escherichia coli* y *Saccaromyces cerevisiae*, siendo este último el más resistente al tratamiento debido probablemente al tamaño del mismo (López Malo *et al.*, 1999; Petin *et al.*, 1999), sin embargo el termoultrasonido mostró mayor efectividad, incluso en la inactivación de *Listeria innocua* y en bacterias mesófilas, observándose velocidades mayores de muerte térmica, mayores que cuando se aplicó solo calor (Earnshaw *et al.*, 1995). En el caso de inactivación enzimática, se

ha reportado una inactivación efectiva de la pectinmetilesterasa y la poligalacturonasa en jugo de tomate con frecuencias de 24 KHz, amplitud de 25, 50 y 75 μm de 60 a 65 °C (Wu *et al.*, 2008).

Tabla 5. Aplicación del ultrasonido en la industria

Aplicación	Mecanismo	Beneficio
Extracción	Aumento en la transferencia de masa del disolvente, liberación del material de la célula vegetal (desprendimiento cavitacional)	Aumento de la eficiencia de extracción, mayor rendimiento del disolvente, medio acuoso o sistemas supercríticos
Emulsificación/ Homogenización	Alto cizallamiento por micro-transmisión	Emulsión efectiva
Cristalización	Nucleación y modificación de la formación de cristales	Formación de cristales más pequeños
Filtración	Alteración de las capas superficiales	Aumento del flujo y reducción de incrustaciones
Separación	Aglomeración de los componentes en puntos nodales de presión	Complemento para procedimientos de separación no químicos
Viscosidad	Modificación estructural reversible y no reversible a través de vibración y alto cizallamiento por micro-transmisión	Modificación sono-química que implica el entrecruzamiento y reestructuración para mejorar sus características y funcionalidad, así como la reducción de aditivos
Antiespumante	Transmisión de aire por ondas de presión que causan el colapso de burbujas	Aumento en el rendimiento de la producción, reducción o eliminación de los productos químicos antiespumantes y reducción de pérdidas en líneas de embotellado
Extrusión	Vibraciones mecánicas, menor fricción	Aumento del rendimiento
Inactivación enzimática de microorganismos	El aumento de la transferencia de calor y alto cizallamiento. Daño cavitacional a membranas de células microbianas	Inactivación de enzimas a menor temperatura para mejorar la calidad
Fermentación	Mejora la transferencia de sustrato y los procesos enzimáticos	Aumento la producción de metabolitos y acelera los procesos de fermentación
Transferencia de calor	Mejora de la transferencia de calor a través de las corrientes acústicas y cavitación	Aceleración del calentamiento, enfriamiento y secado a baja temperatura

Fuente: Patist y Bates, 2008

2.8 Efecto del ultrasonido en el procesamiento de jugos de frutas

Se han realizado estudios acerca del efecto del ultrasonido sobre las características fisicoquímicas de jugos de fruta, demostrando que dicho tratamiento no induce cambios significativos en el pH ni en el contenido de sólidos solubles, mientras que las propiedades como turbidez y capacidad antioxidante se ven favorecidas después del tratamiento (Tiwari *et al.*, 2010; Abid *et al.*, 2013). Así mismo, estudios similares revelan el efecto del ultrasonido sobre los compuestos bioactivos de jugos de frutas, los cuales han demostrado aumentos significativos en el contenido de antocianinas y compuestos fenólicos (Masuzawa *et al.*, 2000; Tiwari *et al.*, 2008; Zafra-Rojas *et al.*, 2013). Por otro lado, Vidal-Fonteles *et al.* (2012) realizaron un estudio en jugo de melón sonificado a $373 \text{ W/cm}^2/10 \text{ min}$, mostrando una disminución significativa de la actividad residual de las enzimas polifenoloxidasas, peroxidasa y ascorbatoperoxidasas respectivamente. En cuanto al efecto de este tratamiento sobre la carga microbiana, se logró una reducción significativa de hongos, de hasta 5 log UFC en jugo de tomate (Adekunte *et al.*, 2010).

2.8.1 Efecto del termoultrasonido en el procesamiento de jugos de frutas

Actualmente se han realizado estudios del tratamiento de termoultrasonido sobre los alimentos, el cual ha demostrado ser más efectivo, con respecto al ultrasonido por sí solo. Dubrović *et al.* (2011), realizaron un estudio en donde se comparó el efecto del termoultrasonido con el tratamiento de pasteurización sobre el contenido de antocianinas en jugo de fresa, mostrando mayor retención de estos compuestos con el tratamiento de termoultrasonido. Además de mayor retención de compuestos bioactivos, éste tratamiento logró una inactivación total de los microorganismos nativos del jugo de manzana, así como de las enzimas pectinmetilesterasa, polifenoloxidasas y peroxidasa (Abid *et al.*, 2014). Por otro lado, en un estudio realizado por Bermúdez-Aguirre y Barbosa-Cánovas (2012), se observó una completa inactivación de *Saccharomyces cerevisiae* ($> 7 \text{ log/mL}$) en jugos de piña, uva y arándano rojo a temperaturas de 40-60 °C por 10 min. De este modo, surge la necesidad de optimizar los procesos de termoultrasonido, para lograr una mayor retención de los compuestos bioactivos y que a su vez permita la obtención de un producto libre de microorganismos que pudieran afectar la calidad e inocuidad.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Con la finalidad de aumentar la expectativa de vida promedio, los consumidores demandan productos que potencialicen, de manera significativa, la salud humana. Unos de los “potenciadores” de salud son los compuestos bioactivos con capacidad antioxidante, que brindan protección contra el daño causado por los radicales libres, reduciendo considerablemente las enfermedades crónico degenerativas, tales como la diabetes, cáncer y cardiopatías, que son unas de las primeras causas de mortalidad. Sin embargo, durante el procesamiento de alimentos, llegan a perderse, de manera parcial o total, estos compuestos bioactivos, por lo que, en la industria alimentaria, la tendencia actual es hacia la producción de alimentos mínimamente procesados, que conserven sus propiedades benéficas para la salud. En respuesta a esta problemática, se han desarrollado tecnologías emergentes, tales como campos pulsantes eléctricos, alta presión hidrostática, la irradiación ultravioleta de onda corta y el ultrasonido, las cuales se usan solas o en combinación, con la finalidad de inactivar microorganismos y la actividad enzimática, utilizando temperaturas relativamente bajas.

Sin embargo, el uso de bajas temperaturas se ha asociado a brotes de enfermedades transmitidas por el consumo de bebidas, por lo que la Food and Drug Administration (FDA) requiere una reducción mínima de 5 log 10 de microorganismos patógenos en jugos de fruta.

4. JUSTIFICACIÓN

La zarzamora es un fruto que posee un alto contenido de antioxidantes, y en México su producción es alta, ocupando el tercer lugar en producción a nivel mundial. Sin embargo, debido a la fragilidad del fruto, la vida de anaquel es de 3 a 4 días en refrigeración, por lo que se han elaborado productos como jugos pasteurizados, con la finalidad de alargar su vida útil y evitar pérdidas del fruto. Sin embargo la pasteurización genera pérdida de calidad y de los compuestos bioactivos.

Debido a la demanda de los consumidores, de productos que brinden beneficios a la salud, la industria alimentaria está en busca de procesos que disminuyan la pérdida de compuestos bioactivos, presentes en los alimentos de manera natural.

Una de las tecnologías que han demostrado menor daño a dichos compuestos es el ultrasonido, el cual, junto con un tratamiento térmico, disminuye también la carga microbiana presente en el alimento, brindando así bebidas que cumplan con los requisitos de inocuidad, preservando la calidad sensorial, nutricional y sus propiedades funcionales.

Es por esto que en el presente estudio se busca un tratamiento que genere la menor pérdida posible de compuestos bioactivos presentes en el jugo de zarzamora, combinando tiempo y temperatura, y que al mismo tiempo permita la obtención de un producto inocuo y de calidad. Aunado a esto, la optimización del proceso, permitirá a la industria alimentaria ahorrar tiempo y energía, lo que se traduce en disminución de los costos de producción y del daño al ambiente.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Optimizar el proceso de elaboración del jugo de zarzamora termoultrasonificado, con base en los parámetros fisicoquímicos, microbiológicos y antioxidantes.

5.2 Objetivos específicos

- Obtener el jugo de zarzamora tratado por termoultrasonificación y determinar sus características fisicoquímicas (pH, °Brix, índice de oscurecimiento y turbidez)
- Analizar la presencia de microorganismos (recuento total, enterobacterias, levaduras y bacterias ácido lácticas) y la actividad enzimática (pectinmetilesterasa y polifenoloxidasas) en el jugo
- Evaluar la actividad antioxidante por ABTS y DPPH y el contenido de los compuestos bioactivos (fenoles totales, ácido ascórbico y antocianinas)
- Obtener el mejor tratamiento por medio del diseño de superficie de respuesta
- Comprobar la reproducibilidad del estudio por comparación de los valores predichos por el modelo con los experimentales
- Comparar el jugo optimizado con el jugo fresco y pasteurizado realizando las determinaciones anteriores

6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Obtención de las muestras

Para la obtención del jugo, la zarzamora fue obtenida de Atotonilco el Grande, Hidalgo, la muestra se sometió a homogenización en una licuadora industrial (38BL52-LBC10, Waring Comercial®). La mezcla fue filtrada con un colador convencional, con la finalidad de separar el jugo de la pulpa, semillas y piel. Posteriormente el jugo fue clarificado mediante centrifugación (Allegra 25TM, Beckman Coulter, California, USA) a 10,000 rpm durante 30 minutos a 4 °C. Se separaron tres porciones del jugo, una porción de jugo fresco (muestra control), otra porción fue sometida a pasteurización (90 °C/15 s), y se congelaron a -32 °C para su posterior análisis, y la otra porción fue sometida a termoultrasonido, se realizó el análisis microbiológico y la muestra restante se congeló a -32 °C para los demás análisis.

6.2 Tratamiento termoultrasonido

Se aplicó el tratamiento de termoultrasonificación con un equipo de ultrasonido (VCX-1500, Sonics & Materials, Inc. Newtown, USA) con potencia de 1500 W y una frecuencia de 20 kHz. Se utilizó una celda de flujo continuo con capacidad de 400 mL para controlar la temperatura en el cual se utilizó un baño de calentamiento (12108-10, Cole Parmer, USA). Las muestras fueron tratadas según el diseño experimental (tabla 6). Una vez optimizado, se elaboró un jugo por triplicado bajo las condiciones óptimas según el diseño de superficie de respuesta. Todos los análisis fueron realizados por triplicado.

6.3 Determinación de las propiedades fisicoquímicas

pH y sólidos solubles totales

Para la medición del pH se utilizó un potenciómetro (HANNA, PH210, Rumania) previamente calibrado con soluciones buffer de pH 4 y 7. Las muestras (20 mL) fueron colocadas en vasos de precipitado de 50 mL y se insertó el electrodo. Los sólidos solubles se determinaron con la ayuda de un refractómetro (Trading Co., Brix/ATC FG-113, Chincan) a temperatura ambiente. El refractómetro fue limpiado antes de cada medición con agua destilada y algodón.

Índice de turbidez

Se centrifugaron 5 mL de muestra (Hamilton Bell, V6500, USA) a 3,400 rpm durante 10 minutos. Posteriormente se leyó la absorbancia del sobrenadante obtenido a 660 nm en un lector de microplacas (Power Wave XS UV-Biotek, software KC Junior, USA), utilizando agua destilada como blanco (Versteeg 1980).

Índice de oscurecimiento

El índice de oscurecimiento se determinó de acuerdo a la metodología descrita por Meydav *et al.* (1977), se centrifugaron 15 mL de muestra (Hamilton Bell, V6500, USA) durante 10 minutos a 3,400 rpm. En un tubo, se adicionó 5 mL del sobrenadante y 5 mL de etanol (95 %) y se volvió a centrifugar a las mismas condiciones. La absorbancia del sobrenadante fue medida a 420 nm en el lector de microplacas (Power Wave XS UV-Biotek, software KC Junior, USA).

6.4 Análisis microbiológico

Los análisis microbiológicos se realizaron mediante la técnica de vaciado en placa, para lo cual se agregó 1 mL de jugo diluído en agua peptonada 0.1 % previamente esterilizada. Las diluciones fueron seriadas de 1×10^1 a 1×10^3 . Se realizó el recuento total (RT), de enterobacterias (EB), levaduras (LV) y bacterias ácido lácticas.

Para el RT se utilizó el agar para métodos estándar (PCA), se incubó a 30°C (LSI-3016A, Labtech, Korea) y el conteo se realizó a las 48 h. El recuento de EB se realizó en agar bilis rojo violeta glucosado (VRBG), las placas fueron incubadas a 37°C (LSI-3016A, Labtech, Korea) y se realizó el conteo transcurridas las 24 y 48 h.

Para análisis de LV se utilizó como medio el agar de extracto de malta y el conteo se realizó a las 72 h de incubación a 25 °C (LSI-3016A, Labtech, Korea) (Cruz *et al.*, 2007). El recuento de bacterias ácido-lácticas (BAL) se realizó a la 24 y 48 h de incubación (LSI-3016A, Labtech, Korea) de incubación a 30 °C en medio APT según lo reportado por Evans y Niven (1951).

6.5 Determinación de la actividad enzimática

6.5.1 Pectinmetilesterasa (PME)

La determinación de la actividad residual de la enzima PME se realizó mediante titulación del grupo carboxil, de acuerdo a Askar y Treptow (1993). Se añadieron 20 mL de jugo a 40 mL de solución de pectina cítrica al 1%, en una solución NaCl 2N. La mezcla se ajustó a pH 7.0 con NaOH 1 N. Una vez alcanzado el pH de 7.0, se agregó 1 mL de NaOH 0.05 N y se midió el tiempo requerido para que la muestra regresara al pH de 7.0. Una unidad de PME (UPME) es definida como la liberación de 1 µmol del grupo carboxil por minuto a pH de 7.0 a 30 °C. Para el cálculo de la actividad enzimática se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{UPME/mL} = \frac{(\text{mL de NaOH}) * (\text{normalidad del NaOH}) * 1000}{(\text{minutos}) * (\text{mL de muestra})}$$

Los valores fueron convertidos a % de actividad residual con respecto a la muestra control, la cual representó el 100 % de actividad de PME.

6.5.2 Polifenoloxidasasa (PPO)

La actividad de la PPO fue medida por espectrofotometría a 420 nm en un espectrofotómetro con arreglo de diodos (Agilent, USA), de acuerdo a la metodología reportada por Cano *et al.* (1997). El extracto de la enzima se obtuvo mezclando 5 mL de muestra con 5 mL de buffer McIlvaine (pH 6.6). Esta mezcla fue

centrifugada (Allegra 25TM, Beckman Coulter, California, USA) a 4 °C, a 10,000 rpm por 40 min y posteriormente se filtró con papel Whatman no. 1. Una vez obtenido el extracto, se tomaron 0.25 mL y se añadió 1 mL de buffer McIlvaine (pH 6.6) y 0.5 mL of catecol (0.175 M). La absorbancia se midió cada 15 s por 3 min y la porción lineal de la curva se utilizó para calcular las unidades de actividad enzimática (UAE). Una UAE es definida como $0.001 \Delta A_{420} / \text{min/mL}$. Los valores fueron convertidos a % de actividad residual con respecto a la muestra control, la cual representó el 100 % de actividad de PPO.

6.6 Determinación de actividad antioxidante

6.6.1 Determinación actividad antioxidante por el método con ABTS^{•+}.

La determinación de la actividad antioxidante por medio del atrapamiento del radical ABTS^{•+} se realizó de acuerdo a Kuskoski *et al.* (2005). El ABTS^{•+} es un radical con un nitrógeno central que presenta un color característico azul-verde, cuando este catión es reducido por un antioxidante a la forma no radical, presenta una pérdida de color.

Se preparó una solución de ABTS al 7 mM/L con persulfato de potasio al 2.45 mM/L, se incubó durante 16 h a temperatura ambiente en la oscuridad para dar lugar a la formación del radical libre ABTS^{•+}, posteriormente se realizó una dilución 1:15 en agua desionizada para obtener una absorbancia de 0.7 ± 0.1 a 754 nm

Se tomaron 980 μL de dicha dilución y 20 μL de muestra, se mezclaron y se dejó reposar durante 7 min. Posteriormente se realizó la lectura espectrofotométrica a 754 nm en el lector de microplacas (Power Wave XS UV-Biotek, software KC Junior, USA).

Se utilizó una curva estándar, para la cual, se preparó una solución de ácido ascórbico con las siguientes concentraciones: 0, 10, 20, 30, 40 y 50 mg/L. La capacidad antioxidante se expresó como mg equivalentes de ácido ascórbico por litro de jugo (mg EAA/L).

6.6.2 Determinación actividad antioxidante medida por el método con DPPH●

La determinación antirradical por el método con DPPH se realizó según la metodología reportada por Morales y Jiménez-Pérez (2001). El reactivo DPPH● es un radical libre estable, que en solución etanólica presenta una coloración violeta. Si se adiciona a este medio una sustancia susceptible de atrapar radicales libres, el electrón no apareado del DPPH● se aparea e inmediatamente se presenta una decoloración de la solución que puede ir hasta amarillo en razón del número de electrones apareados.

Se preparó el radical DPPH● en solución etanólica. A 100 µL de muestra se le agregaron 500 µL de solución de DPPH●, se dejó reposar durante 1h a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugó a 3,000 rpm durante 10 min (C1200/DW41, Labnet, Korea). La absorbancia fue medida a 520 nm utilizando un lector de microplacas (Power Wave XS UV-Biotek, software KC Junior, USA).

Se realizó una curva de calibración, utilizando trolox como antioxidante de referencia, a concentraciones de 0, 50, 100, 200 y 300 µmol/L. La actividad antioxidante se expresó como µmol de equivalentes de trolox por litro de jugo (µmol ET/L).

6.7 Porcentaje de actividad quelante (% AQ)

La actividad quelante se determinó según Gülcin *et al.* (2003), el cual se basa en la reacción de la molécula quelante de referencia con el ion ferroso (Fe^{2+}), posteriormente el ion ferroso que no fue quelado reacciona con la ferrozina generando color. A 100 µL de muestra se le agregaron 50 µL de solución de cloruro férrico II tetrahidratado 2 mM. Se añadieron 450 µL de metanol y se mantuvo en reposo durante 5 min a temperatura ambiente. Se agregaron 400 µL de solución de ferrozina al 5 mM y se dejó reposar durante 10 min a temperatura ambiente. La absorbancia fue medida a 562 nm utilizando un lector de microplacas (Power Wave XS UV-Biotek, software KC Junior, USA). Como agente quelante de referencia se utilizó EDTA a 0.1 M y como muestras control se utilizó agua desionizada bajo las mismas condiciones.

Para el cálculo de la actividad quelante (% AQ) se aplicó la siguiente ecuación:

$$\% \text{ AQ} = [(A_0 - A_1)/A_0] * 100.$$

Dónde: A_0 = absorbancia de la muestra control. A_1 = absorbancia de la muestra.

6.8 Determinación de ácido ascórbico (AA)

Se determinó la cantidad de ácido ascórbico de acuerdo a Dürüst *et al.* (1997) el cual utiliza el reactivo 2,6-diclorofenolindofenol (DCPI) que tiene una coloración azul-violeta y al entrar en contacto con ácido ascórbico cambia de color a rosa o incoloro, según la concentración de AA.

En viales ámbar de 1.5 mL, se mezclaron 100 μ L de muestra (dilución 1:30 en ácido oxálico al 4 %) con 100 μ L de amortiguador (acetato de sodio) y 800 μ L de DCPI. La absorbancia fue medida a 520 nm utilizando un lector de microplacas (Power Wave XS UV-Biotek, software KC Junior, USA), el blanco fue ácido oxálico al 4 %.

Para realizar la curva estándar se realizaron concentraciones a partir de la solución de ácido ascórbico: 0, 10, 20, 30, 40 y 50 mg/L. Los resultados fueron expresados como mg ácido ascórbico por litro de jugo (mg AA/L).

6.9 Determinación del contenido de compuestos fenólicos totales (CFT)

Se realizó según Stintzing *et al.* (2005), el cual utiliza el reactivo Folin Ciocalteu. Este reactivo es una mezcla de ácido fosfotúngstico y fosfomolibdico, la cual es reducida a óxidos azules de tungsteno y molibdeno durante la oxidación fenólica que ocurre en condiciones alcalinas. La coloración azul refleja la cantidad total de polifenoles.

Se tomaron 100 μ L de muestra (dilución 1:10) y se mezclaron con 500 μ L de Folin-Ciocalteu diluido (1:10 en agua desionizada). Se agregaron 400 μ L de carbonato de sodio al 7.5 % y se mantuvo en reposo durante 30 min a temperatura ambiente. La absorbancia fue medida a 765 nm utilizando un lector de microplacas (Power Wave XS UV-Biotek, software KC Junior, USA).

La concentración de compuestos fenólicos totales se obtuvo a partir de una curva estándar (figura 10) preparando una solución de ácido gálico con las siguientes concentraciones: 0, 100, 200, 300 mg/L. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico por litro de jugo (mg EAG/L).

6.10 Determinación de antocianinas

Para la determinación de antocianinas totales se utilizó el método reportado por Giusti y Wrolstad (2001), el cual es un método colorimétrico que se basa en el diferencial de color emitido por las antocianinas en distintos pH.

Se colocaron 0.5 mL de muestra y se diluyeron usando 4.5 mL de buffer de cloruro de potasio al 0.025 M, ajustado a pH de 1.0. En otro vial, se diluyó la misma cantidad de muestra con 4.5 mL de solución de acetato de sodio 0.4 M y se ajustó a pH de 4.5 con HCl 0.1 M. Las muestras se dejaron reposar durante 15 min en la oscuridad, para posteriormente realizar la lectura a 510 y 700 nm, en un lector de microplacas (Power Wave XS UV-Biotek, software KC Junior, USA). El contenido de antocianinas fue calculado por la siguiente ecuación:

$$\text{Contenido de antocianinas (mg Cy3g/L)} = (A * PM * FD * 1000) / (E * Tc)$$

Dónde:

A = Resta de la absorbancia los valores con cloruro de potasio (510 nm - 700 nm) menos la resta de la absorbancia de los valores con acetato de sodio (510 nm - 700 nm).

PM = Peso molecular de cianidin-3-glucósido (449.2 g/mol)

FD = Factor de dilución

E = Absorción molar (26900 L mol⁻¹ cm⁻¹)

Tc = Tamaño de la celda

Como blanco se utilizó agua destilada.

6.11 Diseño experimental y análisis estadístico

Para la optimización del tratamiento del jugo de zarzamora se utilizó la metodología de superficie de respuesta (RSM por sus siglas en inglés) con el programa estadístico JMP 7.0.2 (SAS Institute Inc 2007).

Se consideraron dos factores (temperatura y tiempo) para el tratamiento de termoultrasonido y se empleó un diseño experimental central, compuesto, rotatable, con un $\alpha = 1.414$, teniendo como resultado 5 puntos centrales, 4 axiales y 4 factoriales (figura 8), dando un total de 13 puntos experimentales (tabla 6). El nivel de amplitud del ultrasonido fue fijado a 80%.

Las variables independientes o de proceso fueron:

X_1 = Temperatura (40 °C - 50° C)

X_2 = Tiempo (15 - 25 minutos)

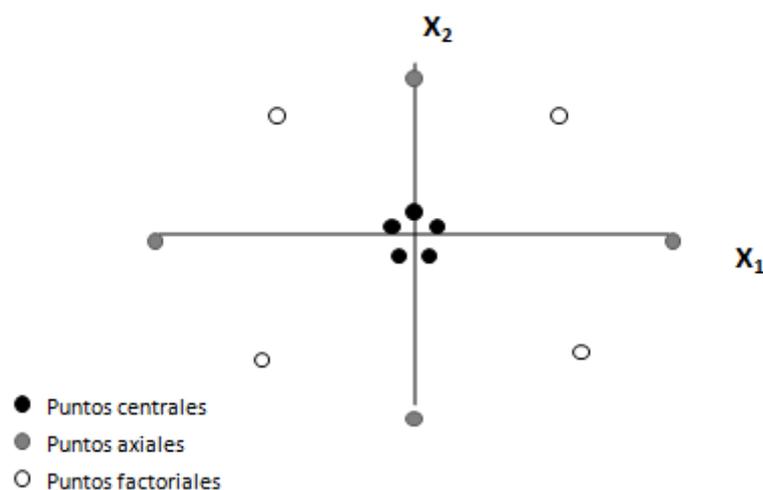


Figura 5. Diseño central compuesto rotatable.

Tabla 6. Diseño experimental de tratamiento por ultrasonido

Amplitud (%)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
80	45	20
80	40	15
80	45	20
80	45	13
80	50	25
80	38	20
80	52	20
80	45	27
80	40	25
80	50	15
80	45	20
80	45	20
80	45	20

Para predecir las variables de respuesta se empleó como modelo matemático un polinomio de segundo grado:

$$Y_i = B_0 + B_1X_1 + B_2X_2 + B_{12} X_1X_2 + B_{11}X_1^2 + B_{22}X_2^2$$

donde Y_i es la respuesta, X_1 es la temperatura, X_2 es el tiempo de termoultrasonificación y $B_0, B_1, B_2, B_{12}, B_{11}$ y B_{22} son los coeficientes de regresión.

Las variables de respuesta son:

Y_1 = pH

Y_2 = °Brix,

Y_3 =Índice de oscurecimiento

Y_4 =Índice de turbidez

Y_5 =Recuento Total

Y_6 =Enterobacterias

Y_7 =Levaduras

Y_8 =Bacterias ácido-lácticas

Y_9 = Pectinmetilestrerasa

Y_{10} =Polifenoloxidasas

Y_{11} =Capacidad antioxidante por ABTS

Y_{12} =Capacidad antioxidante por DPPH

Y_{13} =Capacidad quelante

Y_{14} =Ácido ascórbico

Y_{15} =Compuestos fenólicos totales

Y_{16} =Antocianinas

Todas las técnicas se realizaron por triplicado. Una vez obtenidos los resultados de la optimización, se elaboró por triplicado el jugo bajo las condiciones óptimas y se comparó con jugo pasteurizado y jugo fresco como control, mediante el análisis de varianza (ANOVA) con el paquete estadístico SPSS versión 12.0.1, para Windows (SPSS Inc. Chicago, Illinois) y se les aplicó el test de Tukey con un nivel de significancia del 95%. Se comparó la inactivación de la pectin metilesterasa, polifenol oxidasa, capacidad antioxidante por ABTS y DPPH, CFT, antocianinas y ácido ascórbico.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Propiedades fisicoquímicas

pH y sólidos solubles

Para determinar las propiedades fisicoquímicas de los jugos o néctares de frutas, es necesario medir su pH y los sólidos solubles (°Brix). Los °Brix de los jugos se conforman principalmente por azúcares reductores (glucosa y fructosa), seguidos por azúcares no reductores y por ácidos (Rodríguez *et al.*, 2010). Los valores obtenidos de pH y °Brix del jugo de zarzamora termoultrasonificado se muestran en la tabla 7, donde se observa que se encontraron en un rango de 3.02 - 3.21 y 9.9 - 11.1 respectivamente. Estos resultados se ajustaron al modelo matemático, con una R² de 0.98 y 0.96 respectivamente (tabla 8). De acuerdo al análisis de regresión, se puede observar que el pH fue influenciado principalmente por el tiempo en su término lineal (b₂) y la temperatura en términos cuadráticos (b₁₁) ($p < 0.0001$), así como por la interacción de estos (b₁₂) ($p < 0.01$). Por otro lado, los °Brix se vieron afectados principalmente por la temperatura en su forma cuadrática (b₁₁) ($p < 0.0001$) (tabla 8). Estas tendencias se pueden apreciar en sus gráficos (figura 9 y 10 respectivamente), en donde se puede apreciar que conforme aumenta el tiempo de ultrasonido, el pH disminuye, del mismo modo que los °Brix, encontrando los valores más altos de estos parámetros a temperaturas y tiempos de tratamiento intermedios

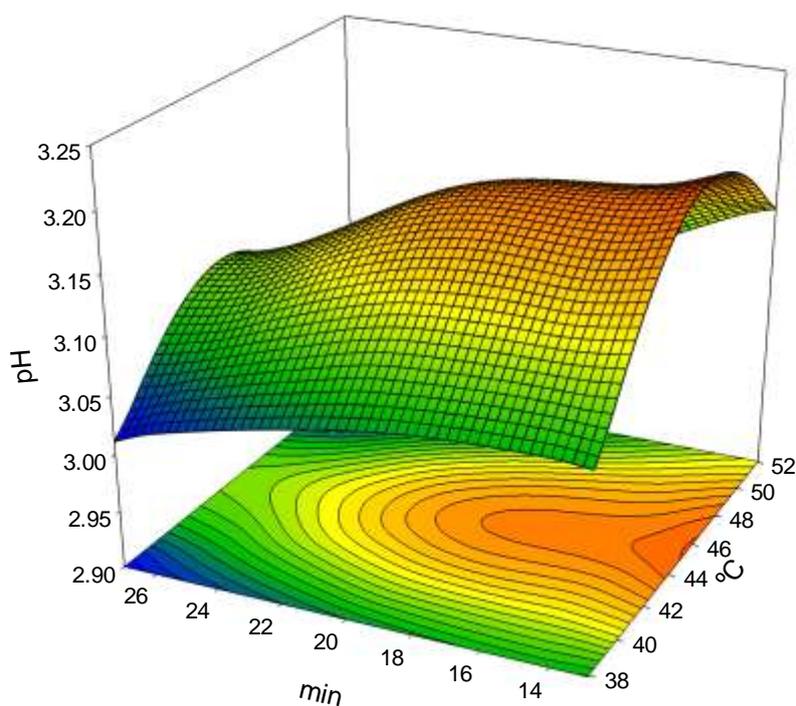
Tabla 7 Efecto de la temperatura y tiempo de termoultrasonido sobre el pH, sólidos solubles (°Brix), turbidez y oscurecimiento del jugo de zarzamora

Tratamiento	pH	°Brix	Turbidez	Oscurecimiento
Control	3.15±0.06	11.1±0.06	0.029±0.00	0.62±0.08
40°C 25 min	3.07±0.00	10.1±0.00	0.019±0.00	0.79±0.07
38°C 20 min	3.06±0.01	10.2±0.00	0.016±0.00	0.69±0.01
50°C 25 min	3.02±0.01	10.2±0.06	0.019±0.00	0.66±0.06
40°C 15 min	3.12±0.00	11.1±0.00	0.020±0.00	0.65±0.06
45°C 27 min	3.10±0.05	10.5±0.05	0.025±0.00	0.70±0.06
45°C 20 min	3.17±0.01	11.1±0.05	0.025±0.00	0.65±0.06
52°C 20 min	3.04±0.05	9.9±0.10	0.018±0.00	0.83±0.01
45°C 20 min	3.19±0.05	11.1±0.06	0.025±0.00	0.67±0.04
50°C 15 min	3.15±0.05	10.2±0.10	0.023±0.00	0.85±0.07
45°C 13 min	3.21±0.05	10.9±0.06	0.025±0.00	0.78±0.06
45 °C 20 min	3.18±0.05	11.0±0.05	0.025±0.00	0.65±0.13
45 °C 20 min	3.19±0.05	11.0±0.00	0.024±0.00	0.65±0.04
45 °C 20 min	3.19±0.10	11.0±0.00	0.024±0.00	0.64±0.06

Tabla 8. Coeficientes de regresión del modelo y significancia para las variables de respuesta pH, °Bx, turbidez y oscurecimiento del jugo de zarzamora termoultrasonicado

Coeficientes	pH	°Bx	Turbidez	Oscurecimiento
b₀	3.184 ^a	11.040 ^a	0.243 ^a	0.649 ^a
b₁	-0.006	-0.158 ^c	0.009 ^c	0.035 ^c
b₂	-0.042 ^a	-0.201 ^b	-0.004	-0.019 ^d
b₁₂	-0.021 ^c	0.240 ^c	-0.001	-0.081 ^b
b₁₁	-0.070 ^a	-0.491 ^a	-0.039 ^a	0.051 ^b
b₂₂	-0.018 ^c	-0.166 ^c	0.002	0.043 ^c
R²Adj	0.98	0.96	0.93	0.91

Niveles de significancia: *a*, $p < 0.0001$; *b*, $p < 0.001$; *c*, $p < 0.01$ y *d*, $p < 0.05$. En los coeficientes (b) el subíndice 1= temperatura; 2= tiempo

**Figura 6.** Efecto del termoultrasonido sobre el pH del jugo de zarzamora

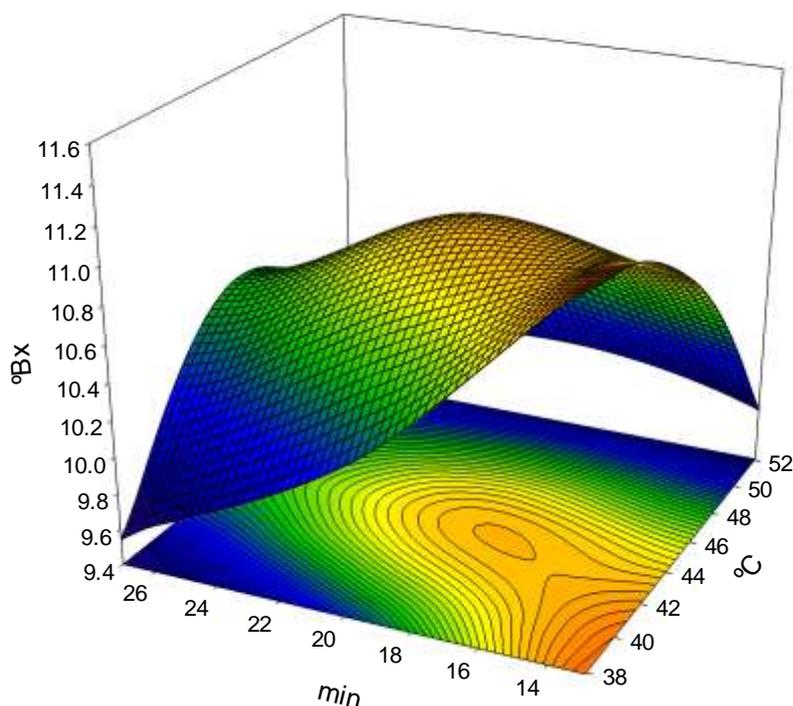


Figura 7. Efecto del termoultrasonido sobre los sólidos solubles ($^{\circ}\text{Bx}$) del jugo de zarzamora

Estos parámetros cumplen con los criterios de calidad establecidos para jugos y néctares de frutas, donde se indica que el pH no debe ser inferior a 2.5 y los $^{\circ}\text{Brix}$ deberán de estar entre 9 y 11.1 dependiendo de la variedad de zarzamora (CODEX, 2005; Rodríguez *et al.*, 2010). Al respecto, se ha reportado que los valores de pH de la zarzamora se encuentra entre 2.69 y 3.42 (Hassimotto *et al.*, 2008; Tiwari *et al.*, 2009b), mientras que los $^{\circ}\text{Brix}$ van desde 8.8 hasta 11.7 (Strik y Thompson, 2009), y esto depende tanto de la variedad del fruto, el suelo y la época de cosecha (Hassimotto *et al.*, 2008; Strik y Thompson, 2009; Tiwari *et al.*, 2009b). Con respecto al efecto del termoultrasonido sobre estas dos propiedades en jugos de frutas, se ha reportado anteriormente que esta tecnología no ejerce cambios significativos (Tiwari *et al.*, 2009b; Abid *et al.*, 2014), sin embargo, las temperaturas utilizadas han sido menores a la aplicadas en este estudio, y de acuerdo los coeficientes de regresión mostrados anteriormente (tabla 8), la temperatura es la variable que más influye.

Índice de turbidez

Otro parámetro de calidad en los jugos y néctares de frutas es el índice de turbidez, el cual está relacionado con las proteínas, lípidos, celulosa, pectina y otros polisacáridos presentes en los jugos (Croak y Corredig, 2006). Los cambios en la turbidez podrían estar asociados a la cavitación, ya que provoca dispersión de agregados o rompimiento de partículas susceptibles, como enzimas y microorganismos (Tiwari *et al.*, 2008a, Tiwari *et al.*, 2008b).

En este estudio, los jugos tratados por termoultrasonido presentaron menor turbidez en comparación con el control, con valores de 0.016 a 0.025 (tabla 7), siendo la temperatura la que mostró un efecto significativo sobre la turbidez, en su término lineal (b_1 , $p < 0.01$) y cuadrático (b_{11} , $p < 0.0001$), mientras que el tiempo no influyó sobre este parámetro (tabla 8), y esto se ve reflejado en su gráfico (figura 11), observándose que, independientemente del tiempo de tratamiento, la turbidez aumenta conforme lo hace la temperatura, encontrando mayores valores a temperaturas de 50 - 52 °C.

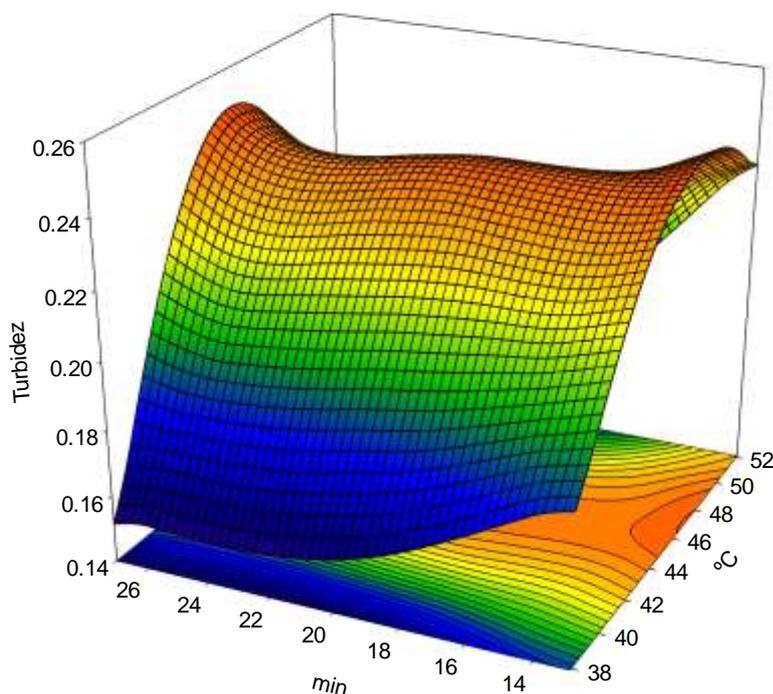


Figura 8. Efecto del termoultrasonido sobre el índice de turbidez del jugo de zarzamora

Esta tendencia encontrada en el índice de turbidez coincide con la encontrada en la inactivación enzimática, ya que a mayores temperaturas ocurrió mayor inactivación (figuras 13 y 14), y de acuerdo a Tiwari *et al.* (2008a) y Tiwari *et al.* (2008b) los cambios podrían estar asociados al rompimiento de partículas susceptibles, como las enzimas. En dichos estudios se reporta que la turbidez disminuye conforme se aumenta la amplitud y el tiempo de ultrasonido en jugo de naranja. Sin embargo, los resultados de un estudio realizado por Abid *et al.* (2014) demuestran una tendencia contraria, ya que los valores de turbidez en el jugo de manzana tratado por ultrasonido, tienden a aumentar debido a la dispersión y rompimiento de macromoléculas, causados por el gradiente de alta presión durante la sonicación. El jugo utilizado en este estudio fue filtrado y clarificado por centrifugación (10,000 rpm/30 min/4 °C) previo al tratamiento de termoultrasonicación, para separar las macromoléculas presentes, favoreciendo de esta manera la homogeneidad y calidad del jugo.

Índice de oscurecimiento

En cuanto al índice de oscurecimiento, se puede observar valores más altos en los jugos sometidos a tratamiento con respecto a la muestra control, siendo los tratados a temperaturas mayores los que presentaron mayor índice de oscurecimiento (50° C 15 min y 52 °C 20 min) (tabla 7). Como se puede apreciar, este valor fue influenciado mayormente por la temperatura en su forma cuadrática (b_{11} , $p < 0.001$), así como por su interacción con el tiempo (b_{12} , $p < 0.001$) (tabla 8). El comportamiento gráfico se puede apreciar en la figura 12, en donde se observa un incremento del oscurecimiento a las temperaturas más altas y menor tiempo, mientras que a bajas temperaturas y mayor tiempo de tratamiento, el oscurecimiento es menor.

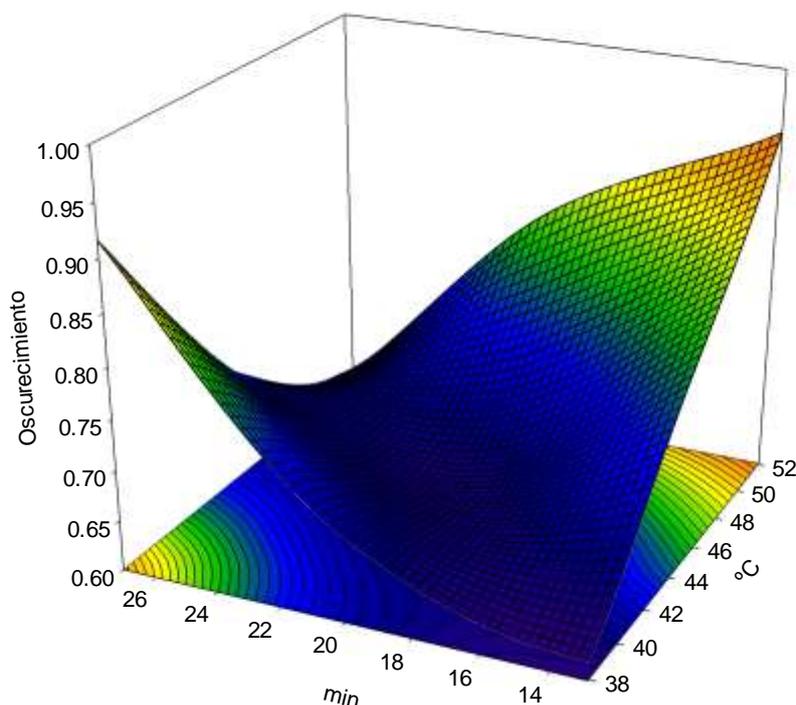


Figura 9. Efecto del termoultrasonido sobre el oscurecimiento del jugo de zarzamora

Al respecto, Vaikousi *et al.* (2008), Tiwari *et al.* (2009e) y Valdramidis *et al.* (2010) encontraron una tendencia similar en jugo de naranja y manzana respectivamente, en donde la temperatura fue el factor más importante en el índice de oscurecimiento. Este parámetro afecta la calidad de los alimentos procesados, y se da por caramelización, formación de productos de la reacción de Maillard o por degradación de los carotenoides y del ácido ascórbico (Valdramidis *et al.*, 2010; Vaikousi *et al.*, 2008; Tiwari *et al.*, 2009e). Este último factor pudo estar relacionado con el índice de oscurecimiento ocurrido en este estudio, ya que como se podrá observar más adelante (tabla 11), hubo una reducción del ácido ascórbico en las muestras que presentaron mayor oscurecimiento, concordando con los resultados reportados por Jiang (2000).

7.2 Análisis microbiológico

En cuanto al recuento total (RT) realizado en el jugo de zarzamora, en el jugo control la carga microbiana fue de 3.37 log 10 UFC/mL, mientras que en los jugos tratados por termoultrasonido no se detectó crecimiento. La misma tendencia se observó en el conteo de levaduras, en donde el control presentó 2.48 log 10 UFC/mL sin presencia de estas en los jugos termoultrasonificados. El conteo de bacterias ácido lácticas (BAL), después de las 24 h de incubación a 30 °C, fue de 0.48 log 10 UFC/mL en el jugo control, esta cifra aumentó a 2.34 log 10 UFC/mL cuando se realizó el conteo a las 48 h. Sin embargo, no se detectaron dichas bacterias en las muestras tratadas por termoultrasonido. Por otro lado, no se detectó crecimiento de enterobacterias en ninguna de las muestras, después de las 24 y 48 h de incubación (datos no mostrados). Cabe mencionar que los resultados del análisis de microorganismos no se ajustaron al modelo de regresión, por lo que no se muestran las superficies de respuesta.

Referente al tratamiento de termoultrasonido sobre la carga microbiana, se ha encontrado que la termoultrasonificación provoca la mayor inactivación en jugos de piña, uva y manzana, debido a que este tratamiento incrementa la sensibilidad de los microorganismos al calor, altas presiones y bajos pH, debido a la cavitación que se genera con las ondas de ultrasonido, provocando cambios en la permeabilidad de la membrana celular, pérdida de homeostasis y muerte celular (Earnshaw *et al.*, 1995; Piyasena *et al.*, 2003; Wong *et al.*, 2008; Wong *et al.*, 2010; Bermúdez-Aguirre, y Barbosa-Cánovas, 2012).

En un estudio realizado por Wong *et al.*, (2010), en jugo de zarzamora, se reportó que la concentración inicial de hongos, levaduras y bacterias ácido lácticas va desde 1,8 hasta 3,2 log 10 UFC/mL, por lo que establecieron como objetivo la reducción de 3 log 10 UFC/mL. En tal estudio, los hongos y levaduras fueron inactivados después de 15 minutos mediante osmosonificación, mientras que las BAL fueron más resistentes, logrando la reducción de sólo 2 log 10 UFC/mL. En el presente estudio, la carga inicial de BAL, después de 48 h, fue de 2.34 log 10 UFC/mL, las cuales fueron inactivadas incluso con las condiciones de tratamiento más bajas.

7.3 Actividad enzimática residual de la PME y PPO

La PME provoca precipitados en los jugos de frutas y es uno de los problemas de calidad que repercute en la aceptación del producto, (Abid *et al.*, 2014), esto se debe a la desesterificación de los grupos metil del ácido galacturónico de la pectina (Ralet *et al.*, 2001; Croak y Correding, 2006). Otro problema de calidad son los cambios de color debido al oscurecimiento enzimático provocado por la PPO, la cual produce la oxidación de compuestos fenólicos a O-quinonas que se polimerizan y producen colores indeseables y cambios en el sabor (Abid *et al.*, 2014).

En la tabla 9 se muestran los valores de la actividad enzimática residual, la cual disminuye cuando los jugos son sometidos a termoultrasonificación, sin embargo, el tratamiento parece ser más efectivo en la inactivación de la PPO con respecto a la PME. El máximo porcentaje de inhibición se logró en el tratamiento 50°C/25 min, con un 19.2 % y 53.5 % de actividad residual de la PPO y PME respectivamente.

Los resultados de la actividad enzimática residual se ajustaron al modelo de regresión con una R^2 0.96 y de 0.94 respectivamente (tabla 10). Los resultados estadísticos evidencian que la variable más influyente en la actividad enzimática del jugo de zarzamora termoultrasonificado fue la temperatura en su término lineal (b_1) con un nivel de significancia de $p < 0.0001$. Por otro lado, el tiempo influyó de manera significativa en la actividad de la PME en términos cuadráticos (b_{22} , $p < 0.01$) mientras que esta variable no ejerció efecto significativo en la actividad de la PPO (tabla 9), tendencia que se puede apreciar en las figuras 13 y 14 respectivamente, en donde a mayor temperatura aplicada, la actividad residual de ambas enzimas disminuye.

Tabla 9. Porcentaje de actividad Residual (% AR) en el jugo de zarzamora termoultrasonificado

Tratamiento (°C/min)	PME (%)	PPO (%)
Control	100±0.0	100±0.0
40°C 25 min	73.7±4.3	37.99±1.5
38°C 20 min	72.3±1.5	44.88±1.8
50°C 25 min	53.5±1.0	1.50±0.0
40°C 15 min	73.5±1.2	46.67±1.6
45°C 27 min	68.5±5.8	30.49±0.0
45°C 20 min	62.2±1.0	35.59±2.35
52°C 20 min	53.0±3.6	1.64±0.0
45°C 20 min	61.9±1.0	37.04±0.1
50°C 15 min	55.8±4.4	1.76±0.0
45°C 13 min	71.7±1.1	39.84±0.1
45 °C 20 min	64.1±7.1	38.10±1.2
45 °C 20 min	62.2±3.6	34.86±1.5
45 °C 20 min	63.0±1.3	38.27±2.6

PME (pectinmetilesterasa), PPO (polifenoloxidasas)

Tabla 10. Coeficientes de regresión del modelo y significancia para las variables de respuesta de la actividad enzimática residual del jugo de zarzamora termoultrasonicado

Coeficientes	PME	PPO
b_0	62.68 ^a	36.772 ^a
b_1	-8.149 ^a	-17.81 ^a
b_2	-0.828	-2.77036
b_{12}	-0.625	2.105
b_{11}	-0.5825	-8.5697 ^c
b_{22}	-3.1625 ^c	-2.60975
R^2 Adj	0.96	0.91

Niveles de significancia: a, $p < 0.0001$; b, $p < 0.001$; c, $p < 0.01$ y d, $p < 0.05$; En los coeficientes (b) el subíndice 1= temperatura; 2= tiempo. PME (pectinmetilesterasa), PPO (polifenoloxidasas)

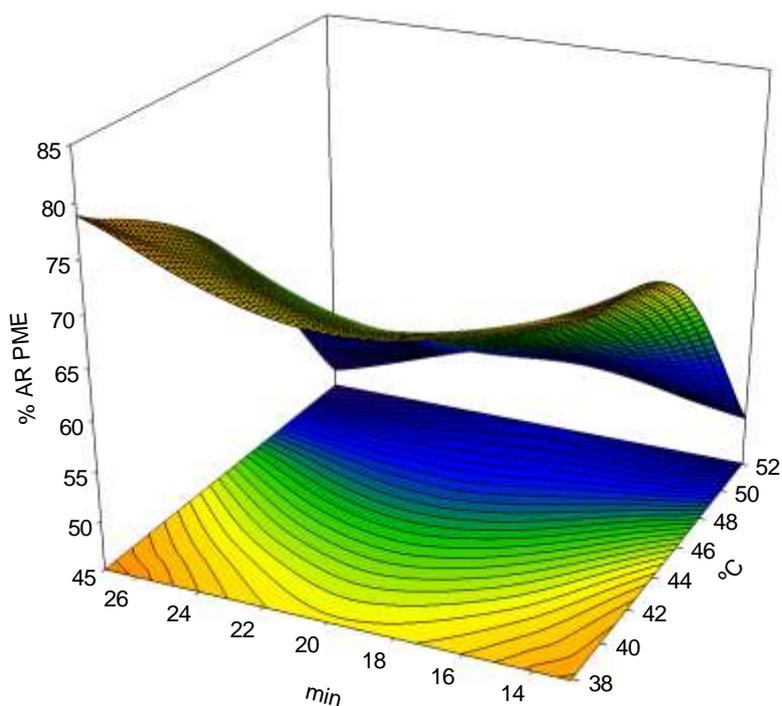


Figura 10. Efecto del termoultrasonido sobre la actividad residual de la pectinmetilesterasa (% AR PME) del jugo de zarzamora

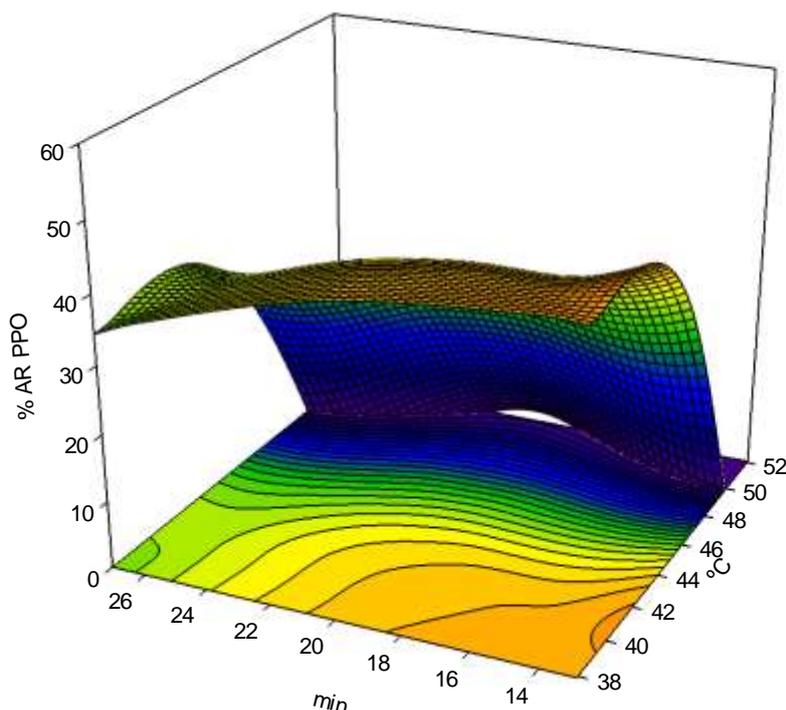


Figura 11. Efecto del termoultrasonido sobre la actividad residual de la polifenoloxidasasa (% AR PPO) del jugo de zarzamora

En el jugo de zarzamora, la actividad de la enzima PME, expresada como unidades de PME (UPM/MI), fue baja tanto para el control como los jugos tratados, partiendo de un 0.029 UPM/mL en el control (datos no mostrados), esto podría ser debido a que la pectina de la zarzamora se encuentra en un medio ácido ($\text{pH } 3.02 \pm 0.01$ y 3.21 ± 0.05), y para que ocurra la des-esterificación esta debe estar altamente cargada, de lo contrario hay una supresión de la disociación de los grupos carboxílicos débiles (Ralet *et al.*, 2001; Croak y Correding, 2006).

En un estudio realizado por Lacroix *et al.* (2005) en jugo de naranja, se evaluó la inactivación de la PME por medio de altas presiones (170 MPa) a 50 °C por 10 min, y se encontró que cuando se disminuía el pH del jugo a 3.0 la actividad enzimática disminuía hasta un 90 %. Por otro lado, en estudios realizados en jugo de naranja y tomate se ha demostrado que la temperatura aplicada en el tratamiento de termoultrasonido es la variable que más influye en la inactivación de enzimas, y que

ésta es mucho más efectiva que el tratamiento térmico por sí solo (Raviyan *et al.*, 2005; Koshani *et al.*, 2014).

El efecto que ejerce el ultrasonido en las enzimas es debido a los procesos químicos y mecánicos inducidos por la cavitación, ya que éstos provocan daños en la integridad de la estructura de las enzimas, disminuyendo su actividad. Así, el gradiente de altas presiones generadas durante la cavitación causa fragmentación de las moléculas de proteína, mientras que la temperatura generada provoca inactivación por pirolisis y desnaturalización proteica (Morel *et al.*, 2000; Tiwari *et al.*, 2009a). Aunado a esto, las ondas de ultrasonido rompen la estructura lineal de la pectina, reduciendo así su peso molecular y debilitando las redes que estas forman, haciendo que estas sean menos accesibles como sustrato para la PME (Seshadri *et al.*, 2003; Tiwari *et al.*, 2009a).

En cuanto a la resistencia de las enzimas al tratamiento, Abid *et al.* (2014) observaron que la PPO mostró mayor inactivación, con respecto a la PME, en jugo de manzana termosonicado a 60 °C, logrando una inactivación de hasta 6.15 y 7.10 % respectivamente. Una menor inactivación de las enzimas en nuestro estudio, podría ser debido a que se utilizaron temperaturas menores, ya que la efectividad del ultrasonido depende de este factor, así como de la concentración inicial de la enzima, el pH y la composición del jugo (O'Donnell *et al.*, 2010; Vidal-Fonteles *et al.*, 2012).

7.4 Actividad antioxidante

Los métodos para medir la capacidad antioxidante de ABTS y DPPH son métodos que se basan en la transferencia de electrones, e involucran una reacción de oxidación. Ambos métodos son útiles para saber si el proceso de elaboración de un alimento influye sobre la actividad antioxidante, además puede ser un indicador del potencial que posee el alimento como antioxidante (Villaño *et al.*, 2007).

7.4.1 Actividad antioxidante por el método de ABTS

En la tabla 11 se muestran los valores obtenidos, expresados como mg equivalentes de ácido ascórbico por litro (mg EAA/L), donde se puede observar un aumento de la actividad antioxidante en las muestras 45 °C/20 min con respecto al control, sin embargo, en la muestra 50 °C/25 min ocurre disminución del 39.9 %. Como se puede observar en la tabla 12, los resultados de la actividad antioxidante medida por la capacidad de atrapamiento del radical libre ABTS•+ se ajustaron al modelo matemático con una R^2 de 0.96. Esta capacidad antioxidante se vio afectada principalmente por la temperatura y el tiempo en términos cuadráticos (b_{11} y b_{22} ; $p < 0.0001$), mientras que la interacción de dichas variables ejerció un efecto positivo (b_{12} ; $p < 0.01$). Este efecto se puede apreciar en la figura 15, en donde se observa que la mayor capacidad antioxidante se encuentra a temperaturas y tiempos de tratamiento intermedios.

Tabla 11. Efecto de la temperatura y tiempo de termoultrasonido sobre actividad antioxidante del jugo de zarzamora

Tratamiento (°C/min)	ABTS ($\mu\text{mol ET/L}$)	DPPH ($\mu\text{mol ET/L}$)	% AQ	AA (mg EAAL)	CFT (mg EAG/L)	Cy3GI (mg/L)
Control	2695.24 \pm 5.2	16284.21 \pm 23.1	93.7 \pm 0.034	324.0 \pm 1.06	3137.85 \pm 0.02	1008.9 \pm 4.3
40°C 25 min	1266.67 \pm 6.3	15863.2 \pm 4.7	91.9 \pm 0.03	278.1 \pm 0.01	2564.58 \pm 0.00	985.4 \pm 10.9
38°C 20 min	1933.33 \pm 9.7	14810.5 \pm 19.7	92.1 \pm 0.07	298.1 \pm 2.00	2984.38 \pm 0.00	999.2 \pm 15.7
50°C 25 min	1234.92 \pm 6.2	16178.9 \pm 1.1	92.6 \pm 0.07	290.1 \pm 1.06	3805.21 \pm 0.04	900.1 \pm 18.6
40°C 15 min	2314.29 \pm 11.6	14915.8 \pm 11.1	92.2 \pm 0.13	323.5 \pm 1.01	4211.18 \pm 0.01	996.1 \pm 12.1
45°C 27 min	1488.89 \pm 7.4	16178.9 \pm 7.9	92.2 \pm 0.02	280.8 \pm 22.52	3255.21 \pm 0.01	961.3 \pm 25.3
45°C 20 min	2663.49 \pm 13.3	16284.2 \pm 1.6	92.8 \pm 0.07	302.1 \pm 1.29	4032.99 \pm 0.01	989.8 \pm 15.1
52°C 20 min	1266.67 \pm 6.3	17130.8 \pm 1.1	92.9 \pm 0.01	286.1 \pm 22.63	3609.72 \pm 0.01	913.9 \pm 25.2
45°C 20 min	2758.73 \pm 13.8	16444.7 \pm 4.7	92.7 \pm 0.08	299.5 \pm 22.86	4086.46 \pm 0.01	901.0 \pm 27.1
50°C 15 min	1076.19 \pm 5.4	17126.3 \pm 0.5	92.8 \pm 0.05	293.6 \pm 22.06	3318.40 \pm 0.01	982.0 \pm 28.6
45°C 13 min	2028.57 \pm 10.1	16214.0 \pm 9.2	92.5 \pm 0.06	315.5 \pm 22.52	3669.79 \pm 0.01	949.2 \pm 36.8
45 °C 20 min	2631.75 \pm 13.2	16333.3 \pm 15.0	92.8 \pm 0.13	299.5 \pm 22.63	4059.03 \pm 0.01	975.9 \pm 16.0
45 °C 20 min	2726.98 \pm 13.6	16285.7 \pm 10.4	92.8 \pm 0.07	296.8 \pm 22.63	4043.40 \pm 0.02	990.2 \pm 12.0
45 °C 20 min	2790.48 \pm 14.0	16428.6 \pm 9.2	92.7 \pm 0.053	296.8 \pm 21.59	4089.24 \pm 0.03	983.7 \pm 10.1

ET (Equivalentes de Trolox), AQ (Actividad Quelante), AA (Ácido Ascórbico), CFT (Compuestos Fenólicos Totales), EAG (Equivalentes de Ácido Gálico), Cy3GI (Cianidin-3-Glucósido)

Tabla 12. Coeficientes de regresión del modelo y significancia para las variables de respuesta de actividad antioxidante y compuestos antioxidantes del jugo de zarzamora termoultrasonificado

Coeficientes	ABTS (μmol ET/L)	DPPH (μmol ET/L)	AQ (%)	AA (mg EAA/L)	CFT (mg EAG/L)	Cy3GI (mg/L)
b₀	2714.28 ^a	16355.31 ^a	92.77 ^a	298.93 ^a	4062.22 ^a	995.45 ^a
b₁	-275.58 ^b	725.97 ^a	0.31 ^a	-4.35 ^b	154.03 ^c	-33.76 ^a
b₂	-206.51 ^c	-6.20	-0.12 ^b	-12.23 ^a	-218.26 ^c	-6.91 ^d
b₁₂	301.59 ^c	-473.68 ^a	0.03	10.47 ^a	533.35 ^a	-8.12 ^d
b₁₁	-608.73 ^a	-207.95 ^c	-0.14 ^b	-3.10 ^c	-358.81 ^a	-18.12 ^b
b₂₂	-529.36 ^a	-95.04	-0.24 ^a	-0.10	-276.09 ^b	-14.33 ^c
R² Adj	0.96	0.97	0.97	0.98	0.95	0.96

Niveles de significancia: *a*, $p < 0.0001$; *b*, $p < 0.001$; *c*, $p < 0.01$ y *d*, $p < 0.05$. En los coeficientes (b) el subíndice 1= temperatura; 2= tiempo. AQ (Actividad Quelante), EAA (Equivalentes de Ácido Ascórbico), CFT (Compuestos Fenólicos Totales), Cy3GI (Cianidin-3-Glucósido).

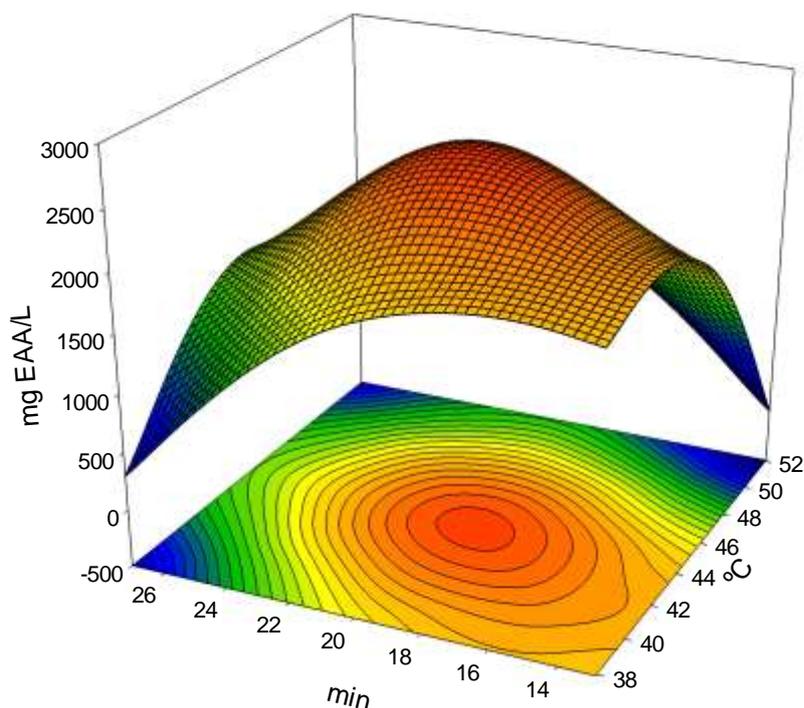


Figura 12. Efecto del termoultrasonido sobre la actividad antioxidante del jugo de zarzamora medida por el método de ABTS

7.4.2 Actividad antioxidante por el método de DPPH.

Los resultados expresados como equivalentes de trolox ($\mu\text{mol ET/L}$) muestran que el jugo tratado a 52 °C/20 min presenta la mayor actividad antioxidante comparado con las demás muestras sometidas a termoultrasonicación y con el control, seguida por la muestra 50 °C/15 min (tabla 11).

Los resultados de la actividad antioxidante medida por el método del atrapamiento del radical DPPH presentaron una R^2 de ajuste de 0.97. Los coeficientes de regresión del modelo (tabla 12) muestran que la temperatura en su forma lineal (b_1), así como su interacción con el tiempo (b_{12}), presentaron un efecto altamente significativo ($p < 0.0001$). Tal tendencia se muestra en la figura 16, en donde se observa mayor capacidad antioxidante a temperaturas altas (48 - 52 °C) y menor

tiempo de termoultrasonido (14 - 18 min), mientras que a bajas temperaturas y tiempo dicha capacidad se ve disminuida.

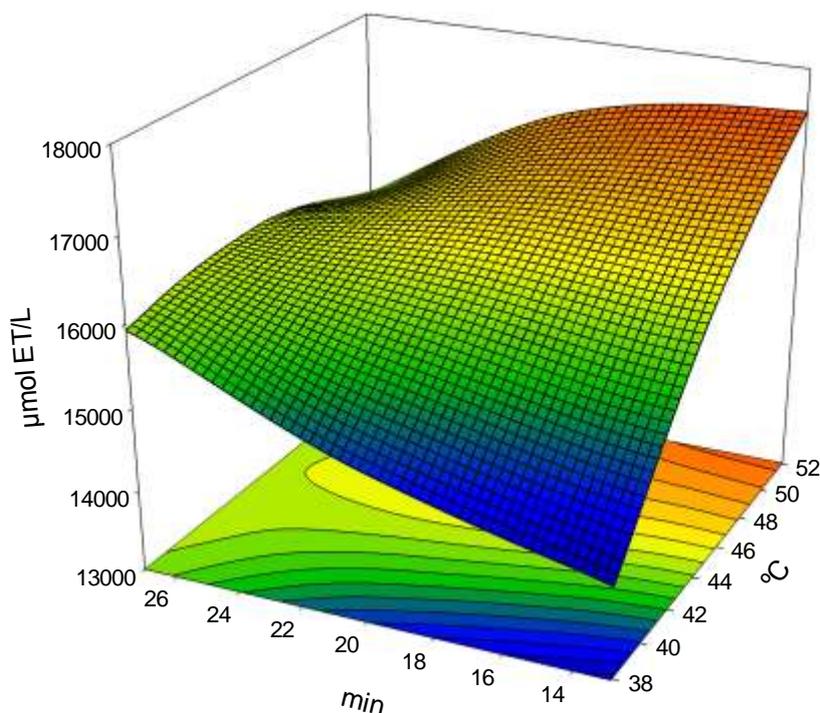


Figura 13. Efecto del termoultrasonido sobre la actividad antioxidante del jugo de zarzamora medida por el método de DPPH

Las diferencias en los valores de actividad antioxidante están dadas por las concentraciones del antioxidante sintético de la curva patrón, así como los diluyentes, las diferentes longitudes de onda y el tiempo en que se realizan las lecturas espectrofotométricas (Sellapan *et al.*, 2002; Villaño *et al.*, 2004). Se ha reportado que la técnica con DPPH es mejor que la de ABTS para medir la actividad antioxidante, a pesar de que la técnica de DPPH no reacciona con los flavonoides que no tengan en su anillo B al menos un grupo -OH, como es el caso de las flavonas e isoflavonas. Sin embargo, la cianidina 3-glucósido y otras antocianinas tienen en su anillo B de 2 a más grupos -OH (Roginsky y Lissi, 2005; Sariburun *et al.*, 2010), lo que podría explicar valores más altos de actividad antioxidante con la técnica de DPPH con respecto a la de ABTS, ya que, de acuerdo a lo reportado por Hager *et al.*, 2008; Acosta-Montoya *et al.*, 2010; Cuevas-Rodríguez, 2011 y Lee *et*

al., 2012, las antocianinas, junto con los taninos y otros flavonoides, son los principales responsables de la actividad antioxidante de la zarzamora, actuando en sinergismo con las vitaminas C y E.

El incremento de la capacidad antioxidante, medida por el método con ABTS, en las muestras 45 °C/20 min podría estar asociado al aumento que registran estas muestras en el contenido de CFT (datos mostrados más adelante), ya que existe una relación entre la actividad antioxidante medida por esta técnica y los compuestos fenólicos totales determinados con el reactivo Folin-Cioacaltea (Singleton *et al.*, 1999; Roginsky y Lissi, 2005), así como también se asocia a la cantidad de ácido ascórbico (Kuti, 2004; Kasetstart, 2010).

Con respecto al efecto del ultrasonido sobre la capacidad antioxidante, se ha demostrado que durante la sonicación se generan radicales libres y la cantidad de estos aumenta conforme aumenta el tiempo de tratamiento y esto ocurre por la hidroxilación de los compuestos fenólicos, sin embargo, la presencia de ácido ascórbico en el medio tratado disminuye esta hidroxilación (Ashokkumar *et al.*, 2008).

Por otro lado, la hidroxilación generada durante el ultrasonido también se ha utilizado en la industria para favorecer la capacidad antioxidante de los flavonoides ya que la introducción de un grupo $\bullet\text{OH}$ en la posición *orto* o *para* incrementa su actividad antioxidante, así, la *O*-dihidroxilación en el anillo B de los flavonoides brinda mayor potencial antioxidante a las moléculas (Wanasundara *et al.*, 1997; Ashokkumar *et al.*, 2008).

En un estudio realizado por Aybastier *et al.* (2013) se obtuvo mayor capacidad antioxidante por el método de ABTS de un extracto de hojas de zarzamora por termoultrasonido a las temperaturas y tiempos de tratamiento más altos (66 y 68 °C/105 y 117 min), mientras que Ivanovic *et al.* (2014) encontraron la misma tendencia en un extracto de zarzamora obtenido por termoultrasonido, con el método de DPPH, y correlacionan esta actividad antioxidante con la cantidad de antocianinas presentes. Se ha demostrado que el tratamiento de ultrasonido y termoultrasonido y el gradiente de altas presiones (>400 MPa) mejoran la capacidad antioxidante de los alimentos líquidos al aumentar y/o preservar sus compuestos

bioactivos (Knorr *et al.*, 2004; Sánchez-Moreno *et al.*, 2005; Patras *et al.*, 2009; Rawson *et al.*, 2011).

7.5 Porcentaje de Actividad Quelante (%AQ)

Los compuestos fenólicos pueden actuar como antioxidantes al captar radicales libres y/o al quelar metales. En este último caso, se requiere, ya sea de la presencia de dos grupos hidroxilos cercanos en el anillo aromático, la presencia del grupo 4-ceto y grupos hidroxilo en posición 5 y/o 3 (como la quercetina) o bien, la presencia de un gran número de grupos hidroxilo (como ácido tánico) (García-Alonso, 2005).

En el organismo, los polifenoles y el ácido ascórbico solubilizan el hierro y crean un complejo con éste para facilitar su excreción por medio de las heces y orina (Morel *et al.*, 1993; Heim *et al.*, 2002; Ebrahimzadeh *et al.*, 2008).

Los resultados muestran una disminución de la actividad quelante en los jugos termoultrasonificados con respecto al control, siendo la muestra 45 °C/20 min la que presentó una máxima reducción del 1.8 % y la muestra 52 °C/20 min la mínima, de 0.8 % (tabla 11). En este estudio, el porcentaje de actividad quelante (%AQ) de las muestras de jugo de zarzamora se vieron mayormente afectados por la temperatura de tratamiento en su forma lineal (b_1 , $p < 0.0001$) y el tiempo en términos cuadráticos (b_{22} , $p < 0.0001$) (tabla 12), mientras que la interacción de estos no ejerció efecto significativo. Este efecto se representa gráficamente en la figura 17, en donde se aprecia un ligero aumento de la capacidad quelante del jugo cuando se somete a termoultrasonido durante 18 y 22 min, y este aumento es mayor a temperaturas más altas.

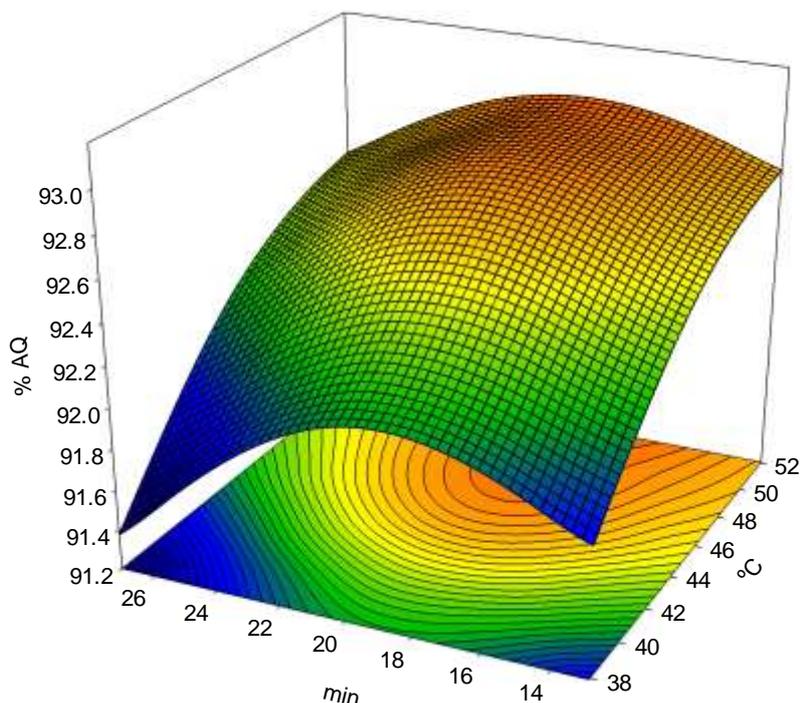


Figura 14. Efecto del termoultrasonido sobre la actividad quelante del jugo de zarzamora

La poca variabilidad del %AQ de las muestras termoultrasonificadas, con respecto al jugo fresco, podría estar relacionada, por un lado, con la estabilidad que presenta su pH, ya que este factor afecta negativamente la capacidad quelante (Pokorny *et al.*, 2001), y por otro lado con su alto contenido en compuestos bioactivos, como ácido ascórbico y polifenoles, entre otros, los cuales presentan la capacidad de quelar metales como el hierro (Morel *et al.*, 1993; García-Alonso, 2005; Ebrahimzadeh *et al.*, 2008). Con respecto al efecto del ultrasonido sobre esta característica, Zafra-Rojas *et al.* (2013) reportó una disminución en jugo de tuna tratado por ultrasonido, sin embargo, a mayor amplitud (80 %) y mayor tiempo (25 min) no se observaron diferencias significativas con respecto al jugo fresco.

7.6 Contenido de ácido ascórbico (AA)

La retención de ácido ascórbico en jugos de frutas ha sido empleado como un indicador de calidad y vida de anaquel, la cual disminuye cuando éste es degradado a un 50 % (Morales-de la Peña *et al.*, 2011). Los resultados expresados como mg de ácido ascórbico (mg AA/L) presentan una disminución en las muestras que fueron sometidas a tratamiento de termoultrasonicación con respecto al control. Sin embargo, la máxima disminución fue en la muestra 40 °C/25 min, con una reducción del 14.17 % (tabla 11). Estos resultados se ajustaron al modelo de regresión con una R^2 de 0.98 y se puede observar que el tiempo, en su término lineal (b_2), y su interacción con la temperatura (b_{12}) ejercieron un fuerte efecto sobre el contenido de este compuesto ($p < 0.0001$) (tabla 12); tal tendencia se muestra en la figura 18, en donde se aprecia que cuando la muestra es tratada a altas temperaturas (>40 °C) y tiempos cortos (<16 min) el contenido de ácido ascórbico es mayor que cuando la muestra se somete a tratamiento por mayor tiempo, incluso a temperaturas menores.

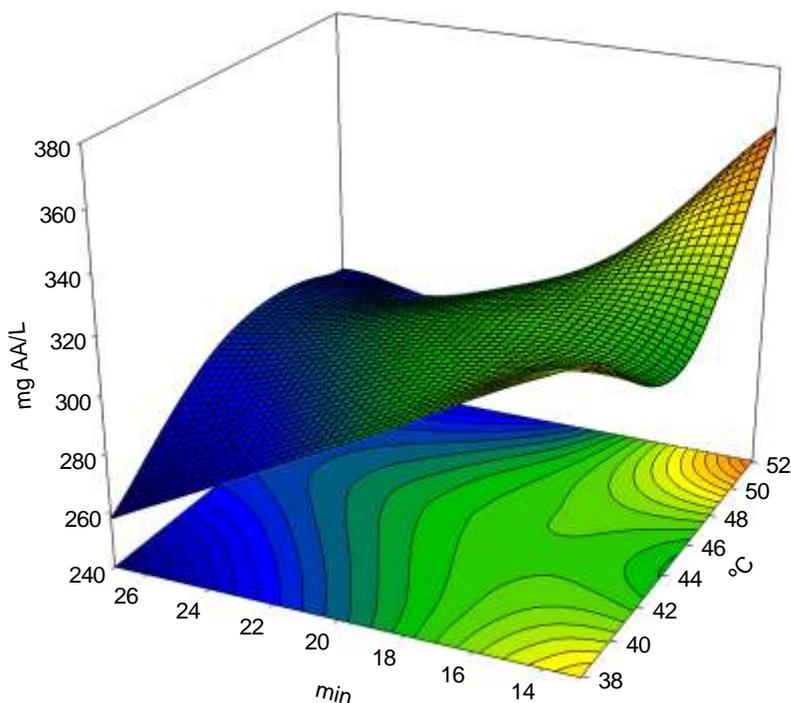


Figura 15. Efecto del termoultrasonido sobre el contenido de ácido ascórbico en el jugo de zarzamora

Los resultados de este estudio concuerdan con lo reportado por Rawson *et al.* (2011), quienes encontraron que la degradación de ácido ascórbico en jugo de sandía aumentó cuando la temperatura de tratamiento se incrementaba a 45 °C (hasta 50 %), observando también mayor reducción de este antioxidante conforme aumentaba el tiempo y amplitud de tratamiento. Tiwari *et al.* (2009f) observó una reducción del 15 % del ácido ascórbico en jugo de fresa después de sonificarlo por 10 min, mientras que en jugo de naranja solo disminuyó un 5 % (Tiwari *et al.*, 2009d).

La degradación del ácido ascórbico se debe, en parte, a la inestabilidad que presenta este compuesto (Odrizola-Serrano *et al.*, 2009; Tiwari *et al.*, 2009d; Abid *et al.*, 2014) y, probablemente, al fenómeno de cavitación, en donde se generan radicales libres, produciendo reacciones de oxidación, las cuales podrían estar afectando al ácido ascórbico (Tiwari *et al.*, 2009f; Dubrovic *et al.*, 2011; Rawson *et al.*, 2011; Abid *et al.*, 2014). El ácido ascórbico evita la hidroxilación de los fenoles, al reaccionar con los radicales $\bullet\text{OH}$ generados durante la cavitación acústica, reaccionando hasta con el 95 % de estos (Ashokkumar y Grieser, 1999; Ashokkumar *et al.*, 2008).

Por otro lado, se ha informado en estudios anteriores que el tratamiento de ultrasonido elimina el oxígeno presente en el jugo, favoreciendo la estabilidad de los compuestos antioxidantes durante su almacenamiento (Solomon *et al.*, 1995; Knorr *et al.*, 2004; Ashokkumar *et al.*, 2008; Abid *et al.*, 2014), e incluso, gracias a esto se ha observado un aumento en la concentración de ácido ascórbico del jugo de lima comparado con el jugo fresco (Bhat *et al.*, 2011).

7.7 Contenido de compuestos fenólicos totales (CFT)

Los compuestos fenólicos han demostrado gran potencial antioxidante y beneficios a la salud humana (Lee *et al.*, 2012; Bhat *et al.*, 2011). En el fruto de la zarzamora se han identificado compuestos como los ácidos fenólicos, antocianinas y taninos, siendo estos últimos los más abundantes (Lee *et al.*, 2012; Cuevas-Rodríguez *et al.*, 2011).

Los valores de la determinación de los compuestos fenólicos totales del jugo de zarzamora termoultrasonificado aumenta con respecto al control, con excepción de

las muestras tratadas a 38 °C/20 min y 40 °C/25 min, en donde se registra una disminución del 4.9 y 18.27 % respectivamente. Por otro lado, la mayor cantidad de CFT se encontró en el jugo tratado a 40 °C/15 min, con un incremento del 34.2 % de su concentración inicial (tabla 11). Los resultados obtenidos se ajustaron al modelo matemático con una R^2 de 0.95. Los coeficientes de regresión del modelo (tabla 12) muestran que el mayor efecto lo ejerció la temperatura en términos cuadráticos (b_{11}), así como su interacción con el tiempo (b_{12}) ($p < 0.0001$), lo cual se representa gráficamente en la figura 19, observándose que a mayor tiempo y menor temperatura de tratamiento el contenido de compuestos fenólicos es menor, mientras que a temperaturas entre 38 y 48 °C durante más de 20 min la concentración de estos compuestos es mayor.

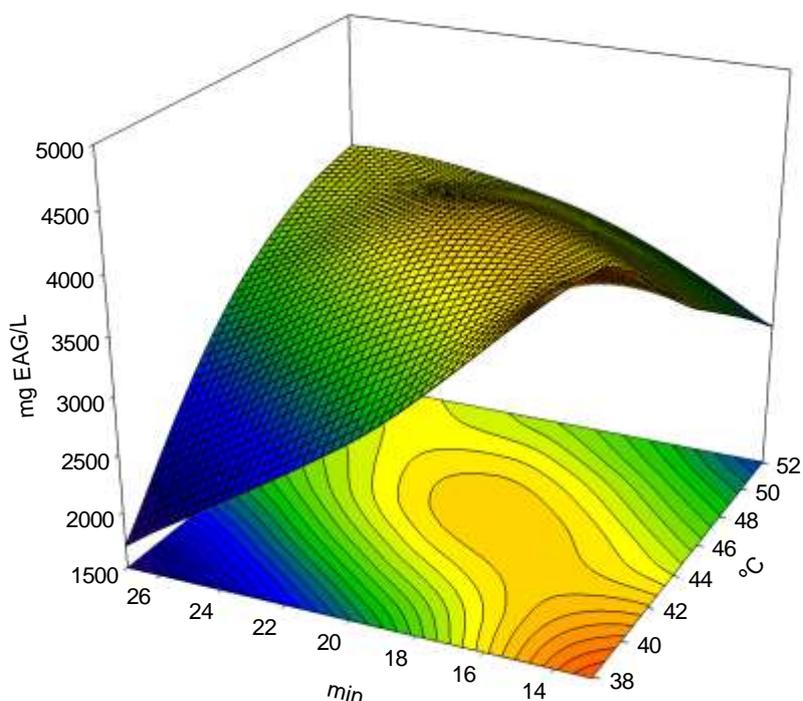


Figura 16. Efecto del termoultrasonido sobre el contenido de compuestos fenólicos totales del jugo de zarzamora

En estudios anteriores, realizados en muestras tratadas por sonicación, se ha reportado un aumento en la concentración de CFT (hasta 93 %) con respecto a la muestra fresca. Este fenómeno está asociado a la alta liberación de los compuestos fenólicos durante el tratamiento de ultrasonido, ya que durante la cavitación hay una

ruptura en los enlaces que forman los ácidos fenólicos con otros compuestos como polisacáridos (Lieu y Le *et al.*, 2010; Soria y Villamiel, 2010). Al respecto, se ha demostrado que el procesado de jugos incrementa el contenido en ácido elágico libre, llegando en torno al doble del contenido presente en la fruta fresca (Amakura *et al.*, 2000; De Ancos *et al.*, 2000). Otros estudios revelan un aumento de estos compuestos en jugo de tuna y de lima ultrasonificados con respecto al jugo fresco (Bhat *et al.*, 2011; Cruz *et al.*, 2013).

Por otro lado, la degradación de algunos compuestos fenólicos durante el tratamiento de ultrasonido ocurre debido a la producción de radicales libres. A pesar de que el ácido ascórbico atrapa gran cantidad de estos, los fenoles son más hidrofóbicos en comparación con el ácido ascórbico, por lo que su concentración en la interfaz podría ser más alta, por lo que algunos $\bullet\text{OH}$ pueden reaccionar con estos antes de ser atrapados por el ácido ascórbico (Ashokkumar y Grieser, 1999; Ashokkumar *et al.*, 2008).

7.8 Contenido de antocianinas

Las antocianinas son las principales responsables de la capacidad antioxidante del jugo de la zarzamora (Ivanovic *et al.*, 2014). Su estabilidad está influenciada por su estructura y los factores de la matriz en que se encuentran (pH, temperatura, enzimas, luz, oxígeno y otros compuestos). El contenido de antocianinas, expresadas como cianidin-3-glucósido (Cy-3-Gl), disminuye en los jugos termoultrasonificados con respecto al control, mostraron una disminución del 9.9 – 10.78 % en los tratamientos 38 °C/20 min y 50 °C/20 min respectivamente (tabla 11). De acuerdo al coeficiente de regresión (tabla 12), la temperatura, tanto en su forma lineal (b_1), como en términos cuadráticos (b_{11}), es el factor que mayor efecto ejerce sobre el contenido de estos compuestos ($p < 0.0001$ y $p < 0.001$ respectivamente). En la figura 20 se observa una menor concentración de antocianinas a las temperaturas y tiempos más altos de tratamiento (50 – 52 °C/18 – 27 min), mientras que a temperaturas de 38 a 46 °C la concentración es mayor, independientemente del tiempo.

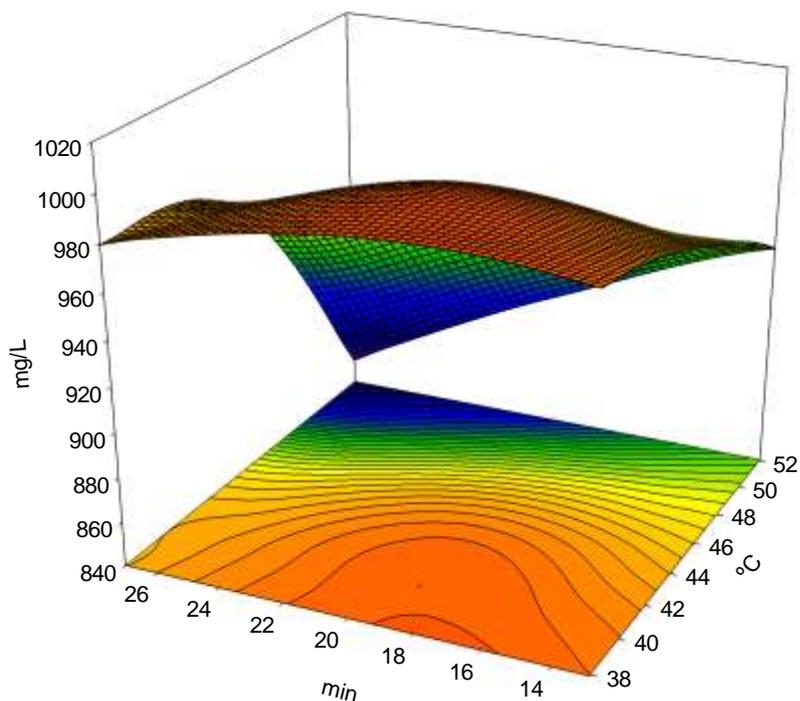


Figura 17. Efecto del termoutrasonido sobre el contenido de antocianinas del jugo de zarzamora

Estudios similares reportaron una variación del 5 % en el contenido de antocianinas durante la sonicación del jugo de zarzamora y fresa, a 25 y 40 °C respectivamente, influenciado tanto por el tiempo de sonicación como la energía aplicada (Tiwari *et al.* 2009b; Tiwari *et al.* 2009f). Sin embargo, las temperaturas utilizadas en este estudio fueron superiores, y, como ya se mencionó, la temperatura es el factor que mayor efecto ejerce sobre el contenido de estos compuestos, concordando con lo reportado en estudios anteriormente, en donde relaciona mayor temperatura de tratamiento con una mayor degradación de antocianinas (Sadilova *et al.*, 2007; Dubrovic *et al.*, 2011).

Aunado a esto, la disminución en los jugos sometidos a tratamiento de ultrasonido podría estar asociada al fenómeno de cavitación, generado por la sonicación, en el cual se producen radicales libres, induciendo así la oxidación de compuestos antioxidantes (Tiwari *et al.*, 2009d; Dubrovic *et al.*, 2011; Rawson *et al.*, 2011). Se ha reportado que los radicales libres provocan la degradación de las antocianinas al modificar los anillos de la estructura convirtiéndolas en chalconas (Sadilova *et al.*,

2007) además de una posible hidrólisis en la fracción glucosídica (Adams y Ongley, 1973).

7.9 Optimización del jugo de zarzamora termoultrasonificado

La optimización fue realizada mediante superposición de las superficies de respuesta. Las variables de respuesta elegidas para este procedimiento fueron: % de AR de la PPO, la actividad antioxidante medida por el método de DPPH, compuestos fenólicos totales y antocianinas.

Los principales criterios para establecer el área óptima fue la reducción de la actividad enzimática para evitar deterioros en la calidad del jugo, así como una alta capacidad antioxidante, alto contenido de ácido ascórbico, compuestos fenólicos y antocianinas.

Como se puede observar en la figura 21, las condiciones óptimas de tratamiento para el jugo de zarzamora se encuentran a 50 ± 1 °C y 17 ± 1 min, obteniendo una inactivación mayor al 90 % de la PPO, mayor capacidad antioxidante medida por el método de DPPH (16,425 $\mu\text{mol ET/L}$) y una alta concentración de compuestos fenólicos totales y antocianinas (alrededor de 3,755 mg EAG/L y 940 mg/L respectivamente).

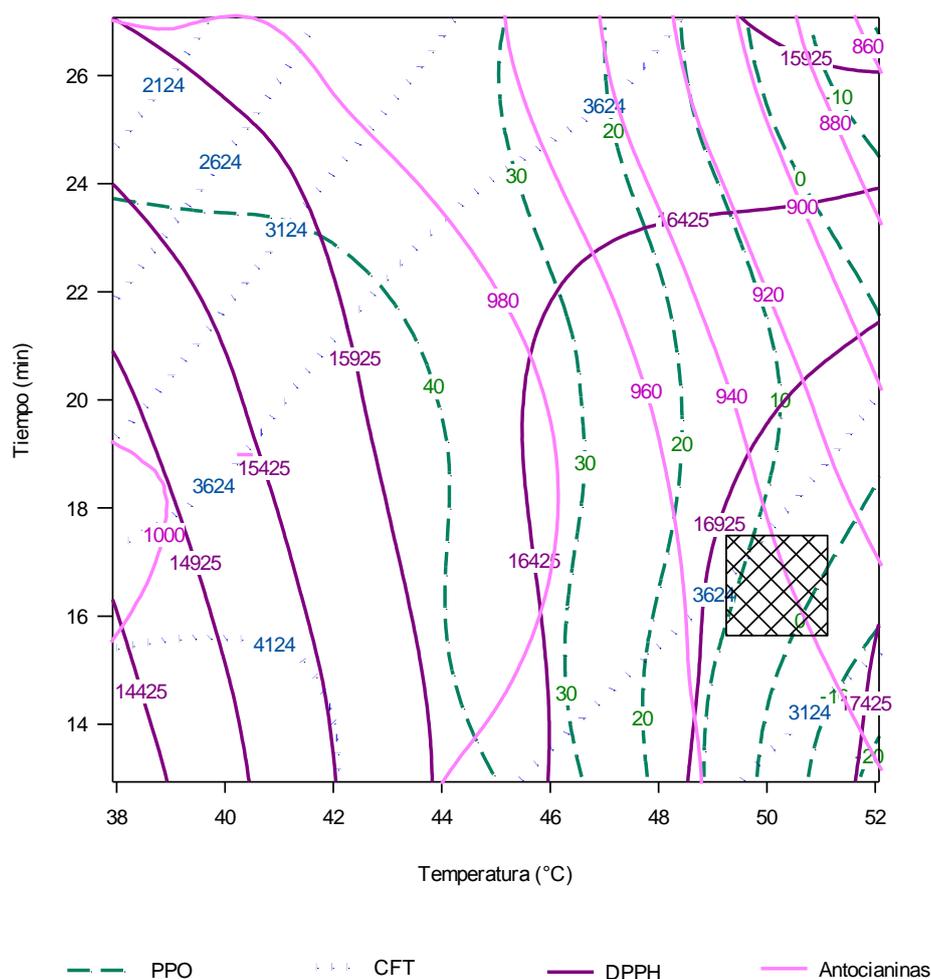


Figura 18. Condiciones óptimas de termoultrasonicación del jugo de zarzamora con respecto a la inactivación de la PPO, actividad antioxidante y contenido de fenoles totales y antocianinas

Basado en estos datos, se elaboró un jugo bajo las condiciones mencionadas anteriormente (50 ± 1 °C/ 17 ± 1 min) para comprobar la reproducibilidad de este trabajo y se comparó con dos muestras, de las cuales, una corresponde a jugo de zarzamora pasteurizado (90 °C/ 15 s) y la otra a jugo de zarzamora fresco (control). A las tres muestras se les realizaron los análisis de actividad enzimática (PME y PPO), capacidad antioxidante por los métodos de ABTS y DPPH, contenido de ácido ascórbico, compuestos fenólicos totales y antocianinas.

7.10 Reproducibilidad del estudio

En la tabla 13 se muestran los valores predichos por el modelo de Superficie de Respuesta (RSM) y los obtenidos mediante el análisis experimental, y se puede observar que los valores de la actividad enzimática residual de la PME y la actividad antioxidante medida por el método con DPPH mostraron diferencias significativas con respecto a los valores predichos por el modelo de superficie de respuesta ($p < 0.05$). En cuanto a la actividad de la PME, está mostró mayor inactivación al realizar los análisis de manera experimental, sin embargo, la actividad antioxidante medida por DPPH fue menor que en lo señalado por el modelo matemático, mientras que los resultados de PPO, ABTS, AA, CFT y AT fueron estadísticamente iguales en ambos casos ($p < 0.05$) (tabla 13).

Tabla 13. Análisis estadístico de los valores predichos por el modelo de RSM contra los valores experimentales

Análisis	Valor predicho	Valor experimental
PME	55.8 ^a	35.35 ^b
PPO	1.76 ^a	1.72 ^a
ABTS*	1076.2 ^a	1118.2 ^a
DPPH*	17,126.3 ^a	13,965.0 ^b
AA	293.6 ^a	291.1 ^a
CFT	3318.4 ^a	3311.3 ^a
AT	949.2 ^a	922.55 ^a

PME (pectinmetilesterasa), PPO (polifenoloxidasas), AA (ácido ascórbico), CFT (compuestos fenólicos totales), AT (antocianinas totales). * Capacidad antioxidante por los métodos con ABTS y DPPH. ^{a,b}Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos de acuerdo a la prueba T para una muestra

7.11 Comparación del jugo termoultrasonificado con el jugo pasteurizado y jugo fresco

7.11.1 Actividad residual de la pectinmetilesterasa y la polifenoloxidasas

En la figura 22 se muestra el porcentaje de actividad residual de las enzimas pectinmetilesterasa y polifenoloxidasas en el jugo termoultrasonificado y pasteurizado. Se puede apreciar que ambas enzimas fueron inactivadas en mayor porcentaje por el termoultrasonido (TUS) (63.71 y 98.28 % respectivamente) con respecto a la pasteurización (PAS) (14.67 y 89.75 % respectivamente) ($p < 0.05$). Así mismo se puede observar que la polifenoloxidasas fue más sensible tanto al TUS como a la PAS, con respecto a la pectinmetilesterasa.

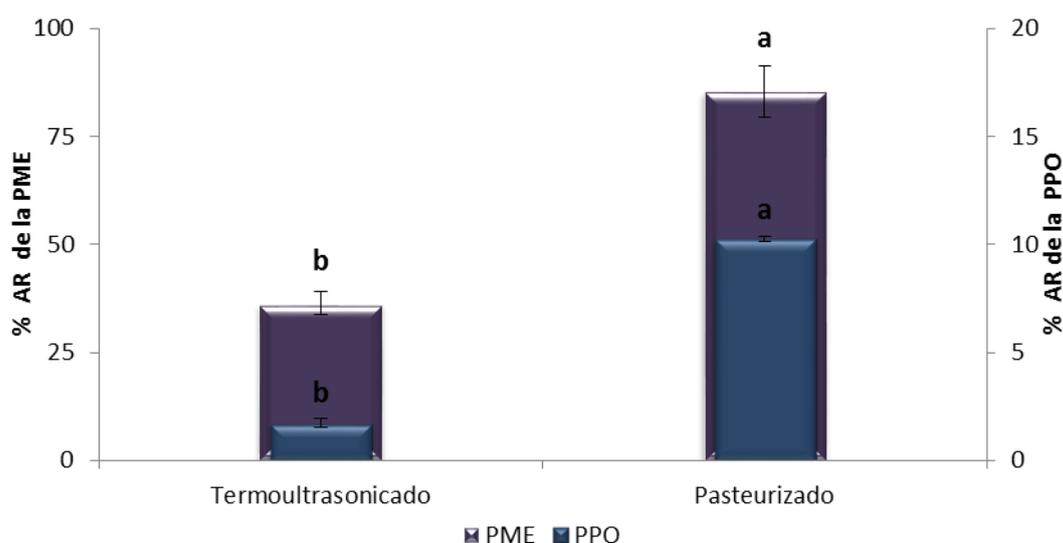


Figura 19. Efecto del termoultrasonido y la pasteurización sobre la actividad residual (% AR) de la pectinmetilesterasa (PME) y la polifenoloxidasas (PPO)

Referente a esto, Abid *et al.* (2014) observaron un comportamiento similar en jugo de manzana termoultrasonificado, logrando mayor inactivación de la PPO que de la PME. Por otro lado, se ha reportado que la temperatura aplicada en el tratamiento de termoultrasonido es la variable más influyente en la inactivación enzimática y que esta es más efectiva que el efecto térmico de la pasteurización (Raviyan *et al.*, 2005; Koshani *et al.*, 2014). Por otro lado, Cruz-Cansino *et al.*, (2015), lograron una inactivación máxima del 33.43 % de la PPE

en jugo de tuna púrpura termoultrasonicado a 80 % amplitud, por 15 min, con una temperatura de salida de 47.48 ± 0.64 °C, mientras que el jugo pasteurizado (70 °C/30 min) tuvo una inactivación del 10.2 %. El daño inducido por el termoultrasonido está asociado al daño en la estructura de la enzima generado por la cavitación, incrementando con esto la sensibilidad de la proteína al calor de termoultrasonido (Morel *et al.*, 2000; Tiwari *et al.*, 2009a Cruz-Cansino *et al.*, 2015).

7.11.2 Actividad antioxidante

En la figura 23 se muestra la actividad antioxidante del jugo termoultrasonicado (TUS), pasteurizado (PAS) y jugo fresco (CNTR). En esta se puede observar que, con respecto al jugo fresco, el jugo tratado por TUS no mostró diferencias significativas ($p < 0.05$), por los métodos de ABTS y DPPH.

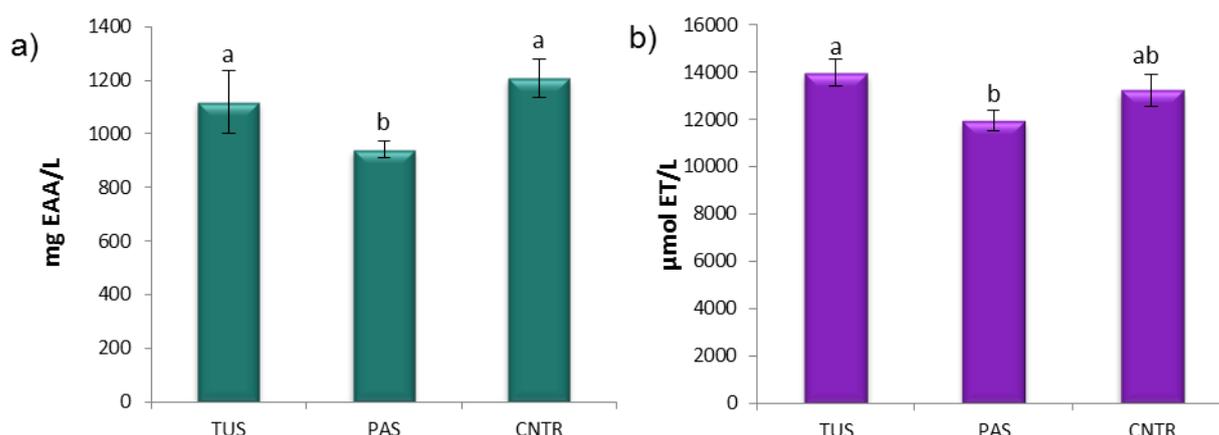


Figura 20. Efecto del termoultrasonido (TUS) y la pasteurización (PAS) sobre la actividad antioxidante medida por los métodos de ABTS (a) y DPPH (b), comparados con jugo fresco (CNTR)

Aybastier *et al.* (2013) evaluó la actividad antioxidante de un extracto de hojas de zarzamora y se observó que a mayor tiempo y temperatura de termoultrasonido, la actividad antioxidante aumentaba. Por otro lado se ha demostrado que el tratamiento de pasteurización afecta significativamente la capacidad antioxidante del jugo de naranja y tuna, con respecto al termoultrasonido, incrementando dicha capacidad (> 200 %) en el jugo de tuna

termoultrasonificado (medido por ABTS y DPPH), asociado a la alta liberación de los compuestos con capacidad antioxidante (Patras *et al.*, 2009; Cruz Cansino *et al.*, 2015).

7.11.3 Contenido de ácido ascórbico

En cuanto al contenido de ácido ascórbico, se puede observar en la figura 24 que las muestras sometidas a tratamiento de TUS y PAS mostraron una degradación de dicho compuesto ($p < 0.05$), mostrando valores de 291.16, 248.10 y 360.14 mg EAA/L para el jugo TUS, PAS y CNTR respectivamente. Sin embargo la disminución fue mayor en el jugo pasteurizado ($p < 0.05$).

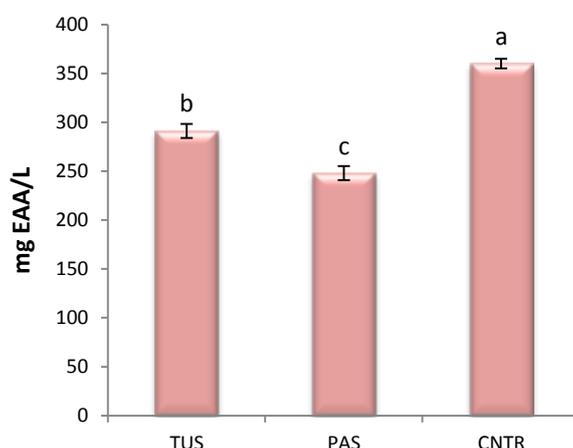


Figura 21 Efecto del termoultrasonido (TUS) y la pasteurización (PAS) sobre el contenido de ácido ascórbico comparado con jugo fresco (CNTR)

Polyedra *et al.* (2003) evaluaron las constantes de velocidad de degradación del ácido ascórbico en jugo de naranja pasteurizado y sonificado, demostrando que dicho compuesto es más estable en este último. Al respecto, Cruz-Cansino *et al.* (2015), reportaron un incremento de este compuesto en jugo de tuna termoultrasonificado (>200 %), con respecto al jugo fresco y pasteurizado. Se ha reportado que durante el tratamiento de ultrasonido elimina el oxígeno de la muestra tratada, confiriendo estabilidad al ácido ascórbico al evitar su oxidación incluso durante el almacenamiento (Ashokkumar *et al.*, 2008; Tiwari *et al.*,

2009f; Rawson *et al.*, 2011; Abid *et al.*, 2014). Por otro lado, el jugo de naranja pasteurizado ha mostrado pérdidas de hasta 67 % debido al tratamiento y hasta un 13 % una vez almacenado en refrigeración (Tiwari *et al.*, 2009d).

7.11.4 Contenido de Fenoles Totales

Con respecto a los compuestos fenólicos totales se puede apreciar en la figura 25 que la concentración de estos no varió en ninguno de los tres jugos ($p < 0.05$), mostrando concentraciones de $3,311.3 \pm 269.4$, $2,736.64 \pm 235.9$ y $2,930 \pm 260.1$ para jugo termoultrasonificado, pasteurizado y control respectivamente.

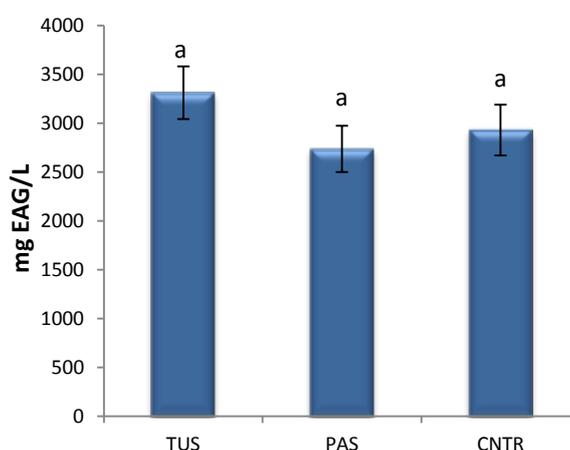


Figura 22 Efecto del termoultrasonido (TUS) y la pasteurización (PAS) sobre el contenido de Compuestos Fenólicos Totales comparados con jugo fresco (CNTR)

Anteriormente se ha reportado que el tratamiento de ultrasonido favorece el contenido de compuestos fenólicos al romper los enlaces que estos forman con algunos polisacáridos (Lieu y Le *et al.*, 2010; Soria y Villamiel, 2010; Bhat *et al.*, 2011; Cruz *et al.*, 2013; Cruz-Cansino *et al.*, 2015). Aunado a esto, la producción de radicales libres como los grupos hidroxilo pueden favorecer el contenido de estos compuestos al incluir este grupo en el anillo C de las flavonas, y su conservación puede estar asociada al contenido de ácido ascórbico que actúa como protector de estos compuestos (Ashokkumar *et al.*, 2008).

7.11.4 Contenido de antocianinas

En la figura 26 se muestran los resultados obtenidos del análisis de antocianinas presentes en los jugos de zarzamora. En esta se observa que el jugo termoultrasonificado presenta la mayor concentración de antocianinas expresadas como cianidin-3-glucósido con respecto al jugo pasteurizado y el control ($p < 0.05$) con concentraciones de 922.55 ± 29.5 , 604.56 ± 47.2 y 823.34 ± 30.3 mg/L respectivamente.

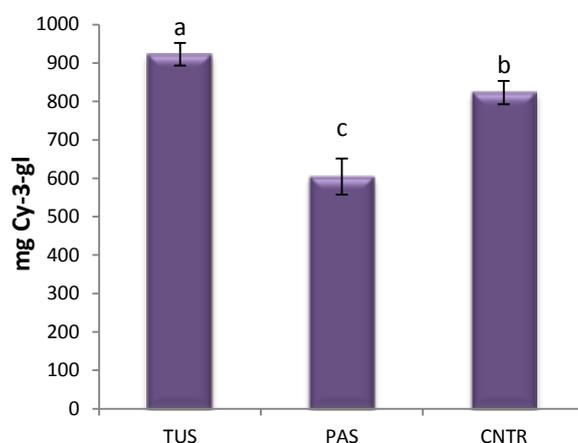


Figura 23. Efecto del termoultrasonido (TUS) y la pasteurización (PAS) sobre el contenido de antocianinas comparados con jugo fresco (CNTR)

Estudios anteriores han revelado que el tratamiento de ultrasonido genera degradación de estos compuestos (Tiwari *et al.*, 2009d; Tiwari *et al.*, 2009f), sin embargo, como ya se mencionó anteriormente, el ácido ascórbico juega un papel importante al actuar como protectores de los demás compuestos antioxidantes. Dubrovic *et al.* (2011) mostró que las antocianinas presentes en el jugo de fresa termoultrasonificado fue 85 % mayor que en el jugo pasteurizado, demostrando que el óptimo tratamiento de ultrasonido tiene menor influencia sobre estos compuestos comparado con un tratamiento térmico, y esto se debe a que altas temperaturas de tratamiento oxidan dichos compuestos.

7 CONCLUSIONES

El tratamiento de ultrasonido, junto con la aplicación de temperaturas bajas (<60 °C), ha demostrado ser una tecnología adecuada para el procesamiento del jugo de zarzamora, ya que se logró una completa inactivación de los microorganismos, lo que permite la obtención de un producto inocuo al consumidor. Por otro lado, el uso de esta tecnología reduce considerablemente la actividad de la pectinmetilesterasa y la polifenoloxidasa, enzimas que se han asociado al deterioro de la calidad de jugos de frutas, lo cual supone la conservación o mejoramiento de la calidad del mismo en términos de sabor, color y aspecto, parámetros que influyen en la aceptación del producto por parte del consumidor. Sin embargo, es necesario realizar las pruebas pertinentes para evaluar la aceptación del producto, así como la vida de anaquel del mismo.

En cuanto a la capacidad antioxidante del jugo de zarzamora, esta se vio favorecida por el tratamiento de termoultrasonido, ya que el contenido de los compuestos fenólicos aumentaron con el tratamiento hasta en un 34.2 %, lo que pudo haber compensado la reducción del 10.8 % de las antocianinas y el 14.2 % del ácido ascórbico.

Con respecto a la pasteurización, se puede inferir que el tratamiento de termoultrasonido demostró ser mejor, al permitir mayor inactivación de las enzimas estudiadas, así como mayor concentración de compuestos bioactivos, permitiendo la obtención de un jugo con mayor capacidad antioxidante, lo que podría aportar un valor agregado al producto.

Por otro lado, se puede concluir que la metodología de superficie de respuesta es un método adecuado para la mayoría de las variables de respuesta evaluadas en el presente estudio, ya que la mayoría de estas se ajustaron al modelo matemático. Esta metodología permite definir las condiciones óptimas de termoultrasonido para procesar el jugo de zarzamora, brindando un producto de calidad, inocuo y con elevadas propiedades antioxidantes.

8 REFERENCIAS

Abid, M., Jabbar, S., Hua, B., Hashim, M.M., Wua, T., Lei, S., Khan, M.A. y Zeng, X. (2014) Thermosonication as a potential quality enhancement technique of apple juice. *Ultrasonics Sonochemistry* 21: 984–990

Acosta-Montoya, O., Vaillant, F., Cozzano, S., Mertz, C., Perez, A. M., y Castro, M. V. (2010). Phenolic content and antioxidant capacity of tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichus* Schltld.) during three edible maturity stages. *Food Chemistry*, 119: 1497–1501.

Adekunte, A., Tiwari, B. K, Scannell A., Cullen, P. J, O'Donnel, C. (2010). Modelling of yeast inactivation in sonicated tomato juice. *Int J Food Mic*, 137: 116–120.

Álvarez Castro, E. y Orallo, F. 2003. Actividad biológica de los flavonoides (II). Acción cardiovascular y sanguínea. *OFFARM*, 22(11): 102-110.

Amakura, Y., Umino, T., Tsuji, S. y Tonogai, Y. (2000). Influence of jam processing on the radical scavenging activity and phenolic content in berries. *J Agric Food Chem.*, 48: 6292-6297.

Ashokkumar, M., y Grieser, F. (1999). Ultrasound assisted chemical processes. *Reviews in Chemical Engineering*, 15, 41–83.

Ashokkumar, M., Sunartio, D., Kentish, S., Mawson, R., Simons, L. Vilku, K. y Versteeg, C. (2008). Modification of food ingredients by ultrasound to improve functionality: A preliminary study on a model system. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9: 155–160

Askar, A. y Treptow, H. (1993). Determination of pectinesterase activity. En *Quality assurance in tropical fruit processing* (pp. 41–45). Berlin, Germany: Springer-Verlag.

Battaner-Arias, E. (2014). Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. 3: Lípidos. Recuperado el 11 de agosto de 2014 de <http://campus.usal.es/~dbbm/modmol/modmol03/mm03t01.htm#ind>

- Berlett, B. S., Levine, R. L., Chock, P. B., Chevion, M. y Stadtman, E. R. (2001). Antioxidant activity of Ferrozine–iron–amino acid complexes. *PNAS*, 98 (2): 451–456
- Bermúdez-Aguirre, D. y Barbosa-Cánovas, G.V. (2012). Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* in pineapple, grape and cranberry juices under pulsed and continuous thermo-sonication treatments, *J. Food Eng.*, 108: 383–392.
- Bhat, R., Kamaruddin, N.S.B.C., Min-Tze L. y Karim, A.A, (2011). Sonication improves kasturi lime (*Citrus microcarpa*) juice quality, *Ultrason.Sonochem.*18(6): 1295–1300.
- Calderón-Miranda, M. L., González, M. F., Barbosa-Cánovas, G. V. y Swanson, B. G. (1999). Métodos no térmicos para procesamiento de alimentos: Variables e inactivación microbiana. *Braz. J. Food Technol.*, 1(1,2): 3-11
- Cano, M. P., Hernández, A. y De Ancos, B. (1997). High pressure and temperature effects on enzyme inactivation in strawberry and orange products. *Journal of Food Science*, 62 (1): 85-88.
- Barbosa-Cánovas, G.Y., Pothakamury, U.R, Palou, E., Swanson, B.G. (1997). *Non-thermal Preservation of Foods*, Marcel Dekker, EUA.
- Chávez, M. O. (2011). Cultivo y manejo de la zarzamora. Tesis de Licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás De Hidalgo.
- Chemat, F., Zill-e-Huma y Kamran, K. M. (2011). Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18: 813–835.
- Cheng, L. H, Soh CY, Liew, S. C, The, F. F. (2007). Effects of sonication and carbonation on guava juice quality. *Food Chem*, 104: 1396-1401.
- CODEX (2005). Norma general del CODEX para zumos (jugos) y néctares de frutas CODEX-STAN 247-2005
- COMTRADE (2014a). United Nations Commodity Trade Statistics Database. Statistics Database. Raspberry, blackberry, mulberry and loganberry.

Recuperado el 22 de agosto de 2014 de:
<http://comtrade.un.org/db/ce/ceSnapshot.aspx?px=HS&cc=081020>

COMTRADE (2014b). United Nations Commodity Trade Statistics Database. Statistics Database. Raspberry, blackberry, mulberry and loganberry. Recuperado el 22 de agosto de 2014 de:
<http://comtrade.un.org/db/dqBasicQueryResultsd.aspx?action=print&px=HS&cc=081020&r=484&p=0&rg=2&y=2013,2012,2011,2010,2009&so=8>

Croak, S. y Corredig, M. (2006). The role of pectin in orange juice stabilization: Effect of pectin methylesterase and pectinase activity on the size of cloud particles. *Food Hydrocolloids*, 20: 961-965

Cruz-Benítez, M. M. y Trejo-González, L. (2014). Bioaccesibilidad intestinal de encapsulados mediante secado por aspersion de extractos lipídicos de xoconostle y zarzamora. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. México.

Cruz, N., Capellas, M., Hernández, M., Trujillo, A., Guamis, B. y Ferragut, V. (2007). Ultra high pressure homogenization of soymilk: Microbiological, physicochemical and microstructural characteristics. *Food Res Int.* 40:725-732.

Cruz-Cansino, N. S., Ramírez-Moreno, E., León-Rivera, J. E., Delgado-Olivares, L., Alanís-García E., Ariza-Ortega J. A., Manríquez-Torres J. J. y Jaramillo-Bustos, D. P. (2015). Shelf life, physicochemical, microbiological and antioxidant properties of purple cactus pear (*Opuntia ficus indica*) juice after thermoultrasound treatment. *Ultrasonics Sonochemistry* 27: 277–286

Cuevas-Rodríguez, E. (2011). Evaluación del potencial nutraceutico de zarzamoras Silvestres y mejoradas. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Querétaro, México.

Cuevas-Rodríguez, E.O.; Gad, G. Y.; García-Saucedo, P.A.; López-Medina, J.; Paredes-López, O. y Lila, M.A. (2010). Characterization of anthocyanins and proanthocyanidins in wild and domesticated Mexican blackberries (*Rubus spp.*). *J. Agric. Food Chem.*, 58: 7458–7464

- D'Arhivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C. y Masella, R. (2007). Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanità* 4 (43): 348-361
- De Ancos, B., González, E. M. y Cano, M. P. (2000). Ellagic acid, vitamin C, and total phenolic contents and radical scavenging capacity affected by freezing and frozen storage in raspberry fruit. *J Agric Food Chem.*, 48: 4565-4570
- Deighton, N., Brennan, R. y Davies, H. (2000). Antioxidant properties of domesticated and wild *Rubus* species. *J Sci Food Agric.*, 80: 1307-1313
- Delgado-Vargas, F., Jiménez, A. R. y Paredes-López, O. (2000). Natural Pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains - Characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(3):173–289
- Demirdöven, A. y Baysal, T. (2008). The Use of Ultrasound and Combined Technologies in Food Preservation. *Food Reviews International*, 25 (1): 1-11
- Dubrović, I., Herceg, Z., Jambrak, A.R., Badanjak, M. y Dragović-Uzelac (2011). Effect of high intensity ultrasound and pasteurization on anthocyanin content in strawberry juice. *Food Technol. Biotechnol.*, 49 (2): 196-204
- Dürüst, N., Dogan, S. y Dürüst, Y. (1997). Ascorbic acid and element contents of foods of Trabzon (Turkey). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45: 2085-2087
- Earnshaw, R.G., Appleyard, J. y Hurst, R.M. (1995). Understanding physical inactivation processes: combined preservation opportunities using heat, ultrasound and pressure. *International Journal of Food Microbiology*, 28: 197-219
- Ebrahimzadeh, M. A., Pourmorad, F. y Bekhradnia, A. R. (2008). Iron chelating activity, phenol and flavonoid content of some medicinal plants from Iran. *African Journal of Biotechnology*, 7 (18): 3188-3192
- Elisia, I., Hu, C., Popovich, D. G. y Kitts, D. D. (2007). Antioxidant assessment of an anthocyanin enriched blackberry extract. *Food Chem.*, 101: 1052-1058

- Ercan, S. S. y Soysal, C. (2013) Use of ultrasound in food preservation. *Natural Science*, 5 (8A2): 5-13
- Evans, J. B. y Niven, C. F. (1951). Nutrition of the heterofermentative lactobacilli that cause greening of cured meat products. *J Bacteriology*, 62: 599–603.
- FAO (2014). Organización de las Naciones unidas. Suelos ácidos. Recuperado el 21 de febrero de 2014 en: <http://www.fao.org/soils-portal/manejo-del-suelo/manejo-de-suelos-problematicos/suelos-acidos/es/>
- FDA (2001). Food and Drug Administration (FDA) Final Rule: HACCP Procedures for the safe and sanitary processing of juice. *Federal register* 66(13):6138–202
- Finn, C. E. y Clark, J. R. (2012). Blackberry. En Badenes, M.L. y Byrne, D.H., *Fruit Breeding, Handbook of Plant Breeding*, vol 8 (pp 152-190). EE.UU: Springer.
- García-Alonso, F. J. (2005). Evaluación *in vitro* e *in vivo* de la funcionalidad de un producto rico en antioxidantes. Tesis doctoral. Universidad de Murcia. España.
- Giusti, M. M. y Wrolstad, R. E. (2001). Characterization and measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. En Ronald E. Wrolstad, *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* (pp)NY: John Wiley & Sons.
- Gordon, M.H. (2001). El desarrollo del enranciamiento oxidativo en los alimentos. En Pokorny, J., Yanishlieva, N. y Gordon, M. (1ª. ed.), *Antioxidantes de los alimentos. Aplicaciones prácticas* (pp.7-21). España: Acribia.
- Gülcin, I., Buyukokuroglu, M. E. y Kufrevioglu, O. I. (2003). Metal chelating and hydrogen peroxide scavenging effects of melatonin. *Journal of Pineal Research*, 34: 278-281
- Hager, T. J., Howard, L. R. y Prior, L. R. (2008). Processing and storage effects on monomeric anthocyanins, percent polymeric color, and antioxidant capacity of processed blackberry products. *J. Agric. Food Chem.*, 56: 689–695

- Hall, C. (2001). Origen de los antioxidantes naturales: aceites de semillas, frutos secos, cereales, legumbres, alimentos de origen animal y de origen microbiano. En Pokorny, J., Yanishlieva, N. y Gordon, M. (1ª. ed.), *Antioxidantes de los alimentos. Aplicaciones prácticas* (pp.141-149). España: Acribia.
- Han, X.; Shen, T.; Lou, H. (2007). Dietary polyphenols and their biological significance. *Int. J. Mol. Sci.*, 8: 950-988
- Hashimoto, F., NonakaG-I. y Nishioka, I. (1989). Tannins and related compounds. XC.8-C-Ascorbyl (-)-epigallocatechin 3-O-gallate and novel dimeric flavan-3-ol, oolonghomobis flavans A and B, from oolong tea. *Chem Pharmaceut Bull*, 37: 3255-3263
- Hassimotto, N.M.A., Da Mota, R.V., Cordenunsi, B.R., Lajolo, F.M. (2008). Physicochemical characterization and bioactive compounds of blackberry fruits (*Rubus sp.*) grown in Brazil. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 28(3): 702-708
- Heim K.E., Tagliaferro A.R, Bobilya D.J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry* 13: 572–584
- Herceg, Z., Lelas, V., Jambrak, A.R., Vukušić, T. y Levaj, B. (2013) Influence of thermo-sonication on microbiological safety, color and anthocyanins content of strawberry juice. *Journal of Hygienic Engineering and Design*, 4: 26-37
- Hollman, P. C.; van Trijp, J. M.; Buysman, M. N.; van der Gaag, M. S.; Mengelers, M. J.; de Vries, J. H.; Katan, M. B. (1997). Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. *FEBS Lett.*, 418: 152-156
- Howard, L. R., Talcott, S. T., Brenes, C. H. y Villalon, B. (2000). Changes in phytochemical and antioxidant activity of selected pepper cultivars (*Capsicum species*) as influenced by maturity. *J. Agric. Food Chem.* 48:1713-1720
- Ibarra, M. L., Romero, V. N., Jaime, M. R. y Hurtado, B. B. (2013). Estudio de factibilidad para la comercialización de zarzamora en mercados internacionales. *Revista internacional administración & finanzas*, 6 (2): 57-72

- Ivanovic, J., Tadic, V., Dimitrijevic, S., Stamenic, M., Petrovic, S. y Zizovic, I. (2014). Antioxidant properties of the anthocyanin-containing ultrasonic extract from blackberry cultivar “ ˇCaˇcanska Bestrna”. *Industrial Crops and Products*. 53: 274-281
- Jiang, Y. (2000). Role of anthocyanins, polyphenol oxidase and polyphenols in lychee pericarp browning. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80: 305-310
- Jiménez, N., Bohuon, P., Lima, J., Dornier, M., Vaillant, F. y Pérez, A.M. (2010). Kinetics of anthocyanin degradation and browning in reconstituted blackberry juice treated at high temperatures (100-180 °C). *J. Agric. Food Chem.*, 58 (4): 2314-2322
- Jonhson, I.T. (2001). Propiedades antitumorales de los antioxidantes. En Pokorny, J., Yanishlieva, N. y Gordon, M. (1ª. ed.), *Antioxidantes de los alimentos. Aplicaciones prácticas* (p.97-117). España: Acribia
- Jurd, L. (1972). Some advances in the chemistry of anthocyanin-type plant pigments. *Advances Food Res. Suppl.*, 3: 123-142
- Kentish, S. y Feng, H. (2014). Applications of power ultrasound in food processing. *Annual review of food science and technology*. 5:263-84
- Knorr, D., Zenker, M., Heinz, V. y Lee, D.U. (2004). Applications and potential of ultrasonics in food processing. *Trends Food Sci. Technol.*, 15: 261–266
- Koshani, R., Ziaee, E., Niakousari, M. y Golmakani, M.-T. (2014). Optimization of thermal and thermosonication treatments on pectin methyl esterase inactivation of sour orange juice (*Citrus aurantium*). *Journal of Food Processing and Preservation*, 1-7
- Kuskoski, E., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., Mancini-Filho, J. y Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 25: 726-732

- Lee, J., Dossett, M. y Finn, E. (2012). Rubus fruit phenolic research: The good, the bad, and the confusing. *Food Chemistry*, 130: 785–796.
- Lee, S. H. y Coates, G. A. (2003). Effect of thermal pasteurization on Valencia orange juice color and pigments. *Food Science and Technology*. 36(1):153-6.
- Lieu, L. N. y Le, V. V. M. (2010). Application of ultrasound in grape mash treatment in juice processing. *Ultrasonics Sonochemistry*, 17: 273–279
- Luck, E. y Jager, M. (1995). Objetivos y evolución de la conservación de alimentos. En: Luck, E. y Jager, M. (2ª ed.), Conservación química de los alimentos. Características, usos, efectos (pp. 3-10). España: Acribia
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A. y Rémésy, C. (2005) Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am. J. Clin. Nutr.*, 81: 230S-242S
- Martínez, J. y Moreno, J. (2000). Effect of resveratrol, a natural polyphenolic compound on reactive oxygen species and prostaglandin production. *Biochem. Pharmacol.*, 59 (7): 865-870
- Masuzawa, N., Ohdaira, E., e Ide, M. (2000). Effects of ultrasonic irradiation on phenolic compounds in wine. *Japanese Journal of Applied Physics*, 39: 2978-2979.
- Mertz, C., Cheynier, V.; Gánata, Z. y Brat, P. (2007). Analysis of phenolic compounds in two blackberry species (*Rubus glaucus* and *Rubus adenotrichus*) by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ion trap mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, 55: 8616-8624.
- Meydav, S., Saguy, I. y Kopelman, IJ. (1977). Browning determination in citrus products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 25: 602–604
- Miller, D. D., Schricker R. B., Rasmussen R. R. y Van-Campen, D. (1981). An in vitro method for estimation of iron availability from meals. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 34: 2248-2256
- Morales-de la Peña, M., Salvia-Trujillo, L.,. Rojas-Graü, M.A y Martín-Belloso, O. (2011). Changes on phenolic and carotenoid composition of high intensity

pulsed electric field and thermally treated fruit juice-soymilk beverages during refrigerated storage, *Food Chem.* 129: 982–990

Morales, F. J. y Jiménez-Pérez, S. (2001). Free radical scavenging capacity of Maillard reaction products as related to colour and fluorescence. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 72: 119-125

Morel, M. H., Dehlon, P., Autran, J. C., Leygue, J. P. y Bar-L'Helgouac'h, C. (2000). Effects of temperature, sonication time, and power settings on size distribution and extractability of total wheat flour proteins as determined by size-exclusion highperformance liquid chromatography. *Cereal Chemistry,* 77: 685–691.

Morel, I., Lescoat, G., Cogrela, P., Sergenta, O., Padeloup, N., Brissot, P., Cillard, P. y Cillard, J. (1993). Antioxidant and iron-chelating activities of the flavonoids catechin, quercetin and diosmetin on iron-loaded rat hepatocyte cultures. *Biochemical Pharmacology,* 45 (1): 13–19.

Nandakumar, V.; Sing, T.; Katiyar, K. S. (2008). Multi-targeted prevention and therapy of cancer by proanthocyanidins. Mini-review. *Cancer Lett.* 269 (2): 378-387

O'Donnell, C. P., Tiwari, B. K., Bourke, P. y Cullen, P. J. (2010). Effect of ultrasonic processing on food enzymes of industrial importance. *Trends in Food Science & Technology,* 21: 358-367

Odriozola-Serrano, I., Soliva-Fortuny, R. y Martín-Belloso, O. (2009). Impact of highintensity pulsed electric fields variables on vitamin C, anthocyanins and antioxidant capacity of strawberry juice. *LWT-Food Science and Technology,* 42: 93–100.

OMS. (2014). Organización Mundial de la Salud. Recuperado el 02 de febrero de 2014 en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>

Parra-Quezada, R. A., Acosta-Rodríguez, G. F. y Arreola-Ávila, J. G. (2005). Crecimiento y producción de zarzamora cv. Cheyenne con cubiertas orgánicas.

- Parra-Quezada, R. A., Rodríguez-Ontiveros, J. L. y González-Hernández, V. A. (1999). Transpiración, potencial hídrico y prolina en zarzamora bajo déficit hídrico. *TERRA Latinoamericana*, 17: 125-130.
- Patist, A. y Bates, D. (2008). Ultrasonic innovations in the food industry: From the laboratory to commercial production. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 9: 147–154
- Patras, A., Brunton, N., Da Pieve, S. y Butler, F. (2009). Impact of high pressure processing on total antioxidant activity, phenolic, ascorbic acid, anthocyanin content and colour of strawberry and blackberry purées. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 10: 308-313
- Pérez-Barraza, H. y Vázquez-Valdivia, V. (2004). Zarzamora (*Rubus spp.*) su cultivo y producción en el trópico de México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Folleto técnico no. 2. México.
- Piyasena, P. Mohareb, E. y McKellar, R.C. (2003). Inactivation of microbes using ultrasound: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 87; 207 - 216.
- Qin, B.L., Pothakamury, U.R, Barbosa-Cánovas, G.Y. y Swanson, B.G. (1996). Nonthermal pasteurization of liquid foods using high-intensity pulsed electric fields. *C.R. Food Sei.*, 36(6): 603-627.
- Ralet, M. C., Bonnin, E., y Thibault, J. F. (2001). Chromatographic study of highly methoxylated lime pectins deesterified by different pectinmethyl-esterases. *Journal of Chromatography B*, 753: 157–166.
- Rastogi, N. K., Raghavarao, K. S., Balasubramaniam, V. M., Niranjana, K. y Knorr, D. (2007). Opportunities and challenges in high pressure processing of foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47(1): 69-112.
- Raviyan, P., Zhang, Z. y Feng, H. (2005). Ultrasonication for tomato pectinmethylesterase inactivation: effect of cavitation intensity and temperature on inactivation. *Journal of Food Engineering*, 70: 189–196.

- Rawson, A., Patras, Tiwari, B.K, Noci, F., Koutchma, T. y Brunton, N.(2011). Effect of thermal and non thermal processing technologies on the bioactive content of exotic fruits and their products: Review of recent advances. *Food Research International.*, 44: 1875–1887.
- Reuter, S., Gupta, Carwal, S., Chaturvedi, M. M. y Aggarwal, B. B. (2010) Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked?. *Free Radic. Biol. Med.*, 49 (11): 1603-1616.
- Riles, L. W., Sanjay, N. J. E., Atten, M. J., Attar, B. M. y Holian, O. (2006). Resveratrol engages selective apoptotic signal in gastric adenocarcinoma cell. *World J. Gastroent.*, 12(35): 5628-5634.
- Rivera, J.A., Muñoz-Hernández, O., Rosas-Peralta, M., Aguilar-Salinas, C.A., Popkin, B.M. y Willett, W. C. (2008). Consumo de bebidas para una vida saludable: recomendaciones para la población mexicana. *Salud pública de México.*50(2): 173-195.
- Robards, K., Prentzler, P. D., Tucker, G., Swatsitang, P. y Glover W. (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem.* 66: 401-436.
- Roblez-Osuna, L. E. y Ochoa-Martínez L.A. (2008). Ultrasonido y sus aplicaciones en el procesamiento de alimentos. *Rev. Iber. Tecnología Postcosecha.* 13(2): 109-122
- Rodríguez, G. M., Guzmán, M. S., Andrade, E. E. y Hernández, L. D. (2010). Evaluación de las propiedades fisicoquímicas y funcionales de jugo obtenido mediante tratamiento enzimático en zarzamora comercial (*Rubus spp*) del estado de Michoacán. *XII Congreso Nacional De Ciencia y Tecnología De Alimentos:* FH851- FH8520
- Roginsky, V. y Lissi, E. A. (2005). Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chem.* 92: 235–254
- Sadilova, E., Carle, R. y Stintzing, F.C. (2007). Thermal degradation of anthocyanins and its impact on color and in vitro antioxidant capacity. *Mol. Nutr. Food Res.* 51: 1461–1471

SAGARPA (2014) Diversificarán producción de berries con la integración de pequeños productores. Recuperado el 08 de agosto de 2014 en: <http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/2012/Paginas/2013B477.aspx>

Sánchez-Moreno, C., Plaza, L., DeAncos, B., Martín, B. O. y Cano, M. P. (2005). Impact of high pressure and pulsed electric fields on bioactive compounds and antioxidant activity of orange juice in comparison with traditional thermal processing. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53: 4403–4409.

Sanigorski, A. M. y Bell, A. C. (2007). Association of key foods and beverages with obesity in Australian schoolchildren. *Public Health Nutr.* 10(2):152-157.

Sano, A., Yamakoshi, J., Tokutake, S., Tobe, K., Kubota, Y. y Kikuchi, M. (2003) Procyanidin B1 is detected in human serum after intake of proanthocyanidin-rich grape seed extract. *Biosci Biotechnol Biochem.*, 67: 1140–3

Santos-Buelga, C. y Scalbert, A. (2000). Proanthocyanidins and tannin-like compounds- nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *Journal of The Science of Food and Agriculture*. 80 (7): 1094–1117

Sariburun, E., Şahin, S., Demir, C., Türkben, C. y Uylaşer, V. (2010). Phenolic content and antioxidant activity of raspberry and blackberry cultivars. *Journal of Food Science*, 75 (4): C328-C334

Saura-Calixto, F., Serrano, J., Goñi, I. (2007). Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chem.* 101: 492–501.

Sellapan, S., Akoh, C. C. y Krewer, G. (2002). Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-grown blueberries and blackberries. *J. Agric. Food Chem.*, 50 (8): 2432–2438.

Señorans, F. J., Ibañez, E., y Cifuentes, A. (2003). New trends in food processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43(5): 507-526.

- Seshadri, R., Weiss, J., Hulbert, G. J., y Mount, J. (2003). Ultrasonic processing influences rheological and optical properties of high-methoxyl pectin dispersions. *Food Hydrocolloid*, 17: 191–197.
- SIAP. (2014a). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Recuperado el 21 de febrero de 2014 en: <http://www.siap.gob.mx/zarzamora/>
- SIAP. (2014b). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Recuperado el 22 de agosto de 2014 en: www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-estado/
- Singh, N. B.; Singh R. B.; Singh L. R.; Prakash, D.; Sarma, P. D.; Upadhyay, G.; Singh, B.H. (2009). Polyphenols from various extracts/fractions of red onion (*Allium cepa*) peel 149 with potent antioxidant and antimutagenic activities. *Food Chem. Toxicol.* , 47: 1161-1167
- Singleton, V. L., Orthofer, R., y Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299: 152–178
- Solomon, O., Svanberg, U. y Sahlström, A. (1995). Effect of oxygen and fluorescent light on the quality of orange juice during storage at 8 °C. *Food Chem.* 53:n363–368
- Soria, A.C. y Villamiel, M. (2010) efecto of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 21: 323-331
- Stintzing, F., Herbach, K., Moßhammer, M. R, Carle, R., Yi, W., Sellappa, S., Akoh, C. C., Brunch, R. y Felker P. (2005). Color, betalains pattern, and antioxidant properties of cactus pear (*Opuntia* spp) clones. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 442-451
- Strik, B. C. y Thompson, E. (2009). Primocane-fruiting Blackberries: Potential for Extending Harvest Season and Production Regions. *HortScience* 44 (1): 23-24.

- Tam, C. S. y Garnett, S. P. (2006). Soft drink consumption and excess weight gain in Australian school students: Results from the Nepean study. *Int J Obes.* 30(7):1091-1093.
- Tiwari, B. K., Muthukumarappan, K., O'Donnell, C. P. y Cullen, P. J. (2008a) Colour degradation and quality parameters of sonicated orange juice using response surface methodology, *LWT – Food Sci. Technol.*, 41: 1876-1883.
- Tiwari, B. K., Muthukumarappan, K., O'Donnell, C. P. y Cullen, P. J. (2008b). Effects of sonication on the kinetics of orange juice quality parameters, *J. Agric. Food Chem.*, 56: 2423-2428.
- Tiwari, B. K., Muthukumarappan, K., O'Donnell, C. P. y Cullen, P. J. (2009a) Inactivation kinetics of pectin methylesterase and cloud retention in sonicated orange juice. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 10: 166–171.
- Tiwari, B. K., O'Donnell, C. P. y Cullen, P. J. (2009b). Effect of sonication on retention of anthocyanins in blackberry juice. *Journal of Food Engineering.* 93: 166–171
- Tiwari, B. K., O'Donnell, C. P. y Cullen, P. J. (2009c). Effect of non thermal processing technologies on the anthocyanin content of fruit juices. *Trends in Food Science & Technology*, 20: 137-145
- Tiwari, B. K., O'Donnell, C. P., Muthukumarappan, K. y Cullen, P. J. (2009d). Ascorbic acid degradation kinetics of sonicated orange juice during storage and comparison with thermally pasteurised juice. *Food Science and Technology*, 42: 700–704
- Tiwari, B. K., O'Donnell, C. P., Muthukumarappan, K. y Cullen, P. J. (2009e). Effect of low temperature sonication on orange juice quality parameters using response surface methodology. *Food Bioprocess Technol*, 2: 109-114
- Tiwari, B. K., O'Donnell, C. P., Patras, A., Brunton, N. y Cullen, P. J. (2009f). Stability of anthocyanins and ascorbic acid in sonicated strawberry juice during storage. *Eur Food Res Technol*, 228:717–724

- Tiwari, B. K., O'Donnell, C. P., Patras, A., y Cullen, P. J. (2008). Anthocyanin and ascorbic acid degradation in sonicated strawberry juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(21): 10071-10077.
- Tiwari, B. K., Patras, A., Brunton, N., Cullen, P. J. y O'Donnell, C. P. (2010). Effect of ultrasound processing on anthocyanins and color of red grape juice. *Ultrasonics Sonochemistry*, 17: 598–604.
- Trinidad, P., Wolever, T. y Thompson, L. (1996). Availability of calcium for absorption in the small intestine and colon from diets containing available and unavailable carbohydrates: an in vitro assessment. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 47: 83-88
- Tscheuschner, H.-D. (2001). Procesado de frutas y hortalizas. En: Tscheuschner, H.-D. (2ª ed.), *Fundamentos de tecnología de los alimentos*. (pp. 436-452). España: Acribia
- USDA (2011) United State Department of Agriculture. Nutrient Database.
- Vaikousi, H., Koutsoumanis, K., Biliaderis, C.G. (2008) Kinetic modelling of nonenzymatic browning of apple juice concentrates differing in water activity under isothermal and dynamic heating conditions. *Food Chemistry*, 107 (2): 785–796
- Valdramidis, V.P., Cullen, P.J., Tiwari, B.K. y O'Donnell, C.P. (2010) Quantitative modelling approaches for ascorbic acid degradation and non-enzymatic browning of orange juice during ultrasound processing. *Journal of Food Engineering*, 96: 449–454
- Versteeg, C., Rombouts, F.M., Spaansen, C.H. y Pilnik, W. (1980). Thermostability and orange juice cloud destabilizing properties of multiple pectinesterases from orange. *Journal of Food Science*, 45: 969–972
- Vidal –Fonteles, T., Maia-Costa, M.G., Tibério- de Jesus, A.L., Alcântara-de Miranda, M.R., Narciso- Fernandes, F.A. y Rodrigues, S. (2012) Power ultrasound processing of cantaloupe melon juice: Effects on quality parameters. *Food Research International*, 48: 41–48

- Villaño, D., Fernández-Pachón, A.M., Troncoso, A.M. y Garcia-Parrilla, M.C. (2004). The antioxidant activity of wines determined by the ABTS method: influence of sample dilution and time. *Talanta*, 64: 501-509
- Voet, D., Voet, J.G. y Pratt, C.W. (2007). Lípidos y membranas biológicas. En Voet, D., Voet, J.G. y Pratt, C.W (2ª. ed.) Fundamentos De Bioquímica (pp.233-248). España: Médica Panamericana.
- Wanasundara, P. K. J. P. D., Shahidi, F., & Shukla, V. K. S. (1997). Endogenous antioxidants from oilseeds and edible oils. *Food Reviews International*, 13: 225–292.
- Wang, L. S. y Stoner, D. G. (2008). Anthocyanins and their role in cancer prevention. Mini-review. *Cancer Letter*. 6: 119-128.
- Wells, J. H. y Singh, R. P. (1988). Application of time-temperature indicators in monitoring changes in quality attributes of perishable and semiperishable foods. *Journal of food science*. 53(1):148-52.
- Wildman, E. C. (2001). Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods. CRC Press. Boca Ratón. pp 8-25.
- Wildman, R.E.C. y Kelley, M. (2006). Nutraceuticals and functional foods. En Wildman, R.E.C., Wildman, R. y Wallace, T.C. (2ª. ed.) Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods (pp.1-20). EE.UU.: CRC Press.
- Williamson, G. y Manach, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. *Am J Clin Nutr*, 81: 243S–55S
- Wong, E., Pérez, A.M. y Vaillant, F. (2008). Combined effect of osmotic pressure and sonication on the reduction of *Salmonella spp.* in concentrated orange juice. *J. Food Saf.*, 28: 499–513.
- Wong, E., Vaillant, F. y Pérez, A. (2012). Osmosonication of Blackberry Juice: Impact on selected pathogens, spoilage microorganisms, and main quality parameters. *Journal of Food Science*, 75 (7): 468-474

Wordon, B.A., Mortimer, B. y McMaster, L.D. (2012). Comparative real-time analysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell viability, injury and death induced by ultrasound (20 kHz) and heat for the application of hurdle technology. *Food Res. Int.*, 47: 34–139.

Wu, X. y Prior, R. L. (2005). Systematic identification and characterization of anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in common foods in the United States: fruits and berries. *J Agric Food Chem*, 53: 2589–99.

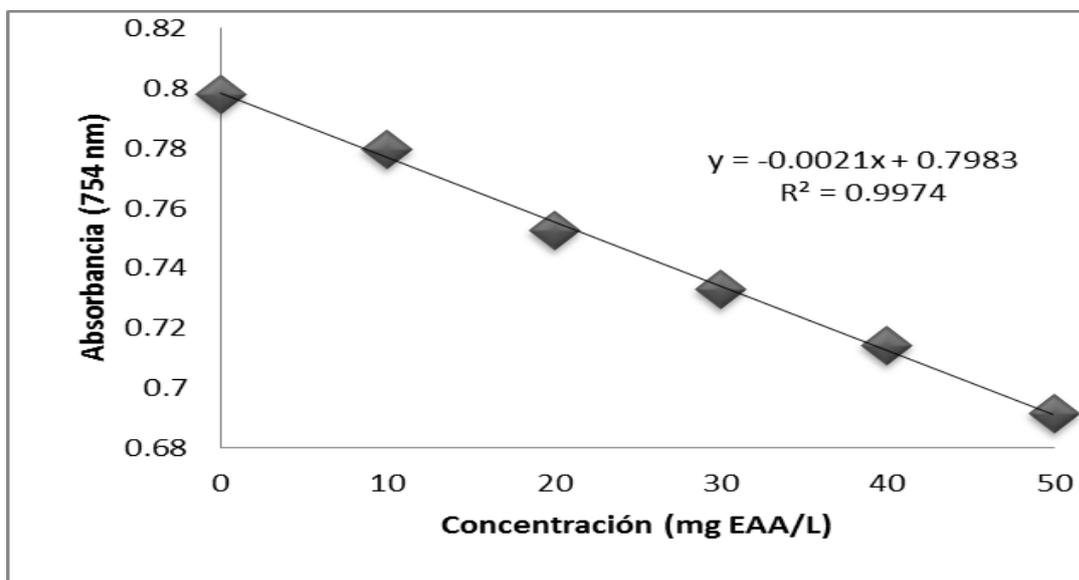
Wursch, P.; del Vedovos, S.; Rosset, J.; Smiley, M. (1984). The tannin granules from ripe carbo pod. *Lebensm. Wiss. Technol.*, 17: 351–354

Wu-Yang, H.; Yi-Zhong, C. (2010). Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention. *Nutr. Cancer*, 62: 1-10

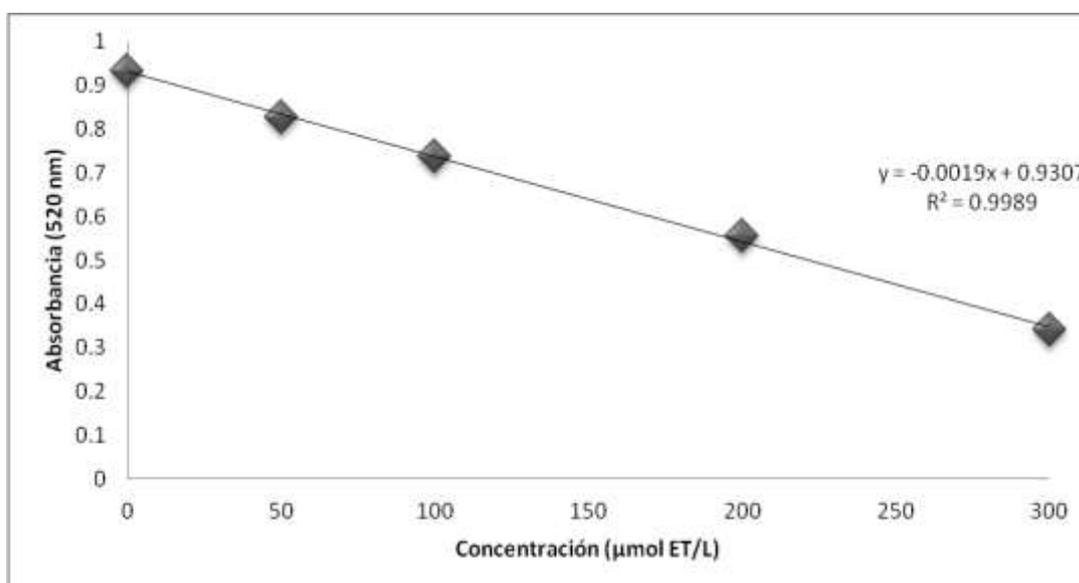
Yanishlieva, N. (2001). Inhibición de la oxidación. En Pokorni, J., Yanishlieva, N. y Gordon, M. (1ª. ed.), *Antioxidantes de los alimentos. Aplicaciones prácticas* (pp. 43-50). España: Acribia

Zafra-Rojas, Q. Y., Cruz-Cansino, N., Ramírez-Moreno, E., Delgado-Olivares, L., Villanueva-Sánchez, J. y Alanís-García, E. 2013. Effects of ultrasound treatment in purple cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) juice. *Ultrason Sonochem.* 20:1283-1288.

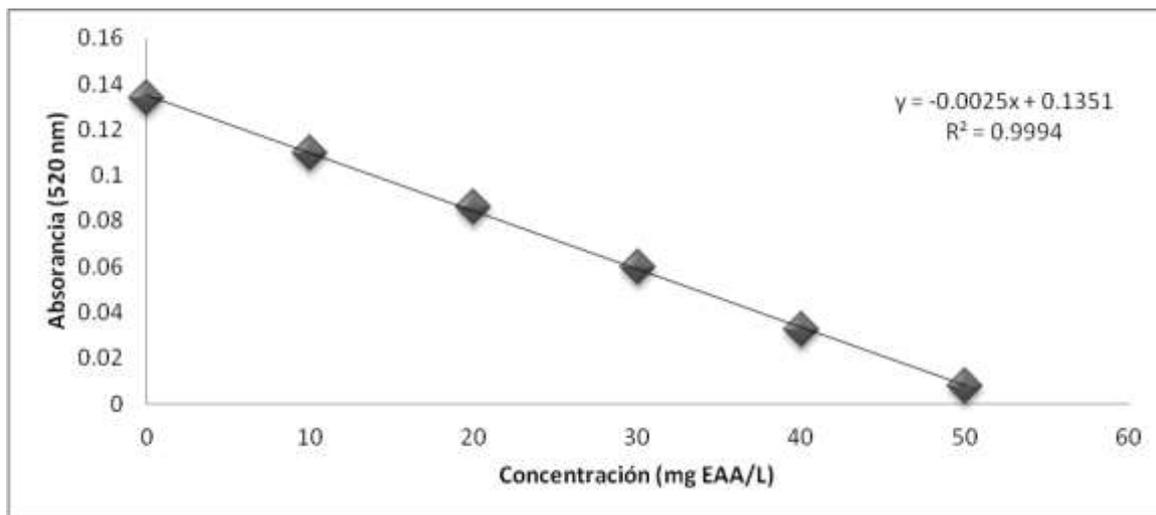
9 ANEXOS



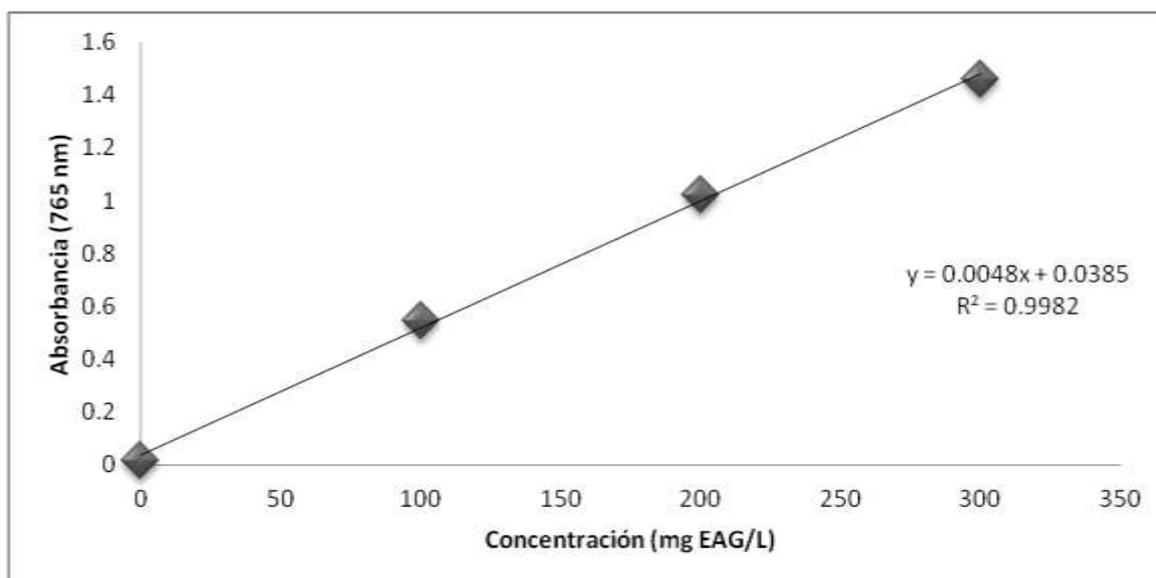
Anexo 1. Curva estándar de Ácido ascórbico



Anexo 2. Curva estándar de trólox



Anexo 3. Curva estándar de ácido ascórbico



Anexo 4. Curva estándar de ácido gálico