



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

**INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD
ÁREA ACADÉMICA DE NUTRICIÓN**

**“Evaluación fisicoquímica y bioaccesibilidad
in vitro de antioxidantes de un yogurt bebible
adicionado con residuo ultrasonicado de
zarzamora (*Rubus fruticosus L.*)”**

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE
Licenciada en Nutrición

PRESENTA

P. L. N. Alejandra Meléndez González.

No. cuenta: 244934.

Bajo la Dirección de:

M. en NH. Zuli Guadalupe Calderón Ramos.

Codirectores:

Dra. Nelly del Socorro Cruz Cansino.

Dra. Esther Ramírez Moreno.

Profesoras investigadoras del Área Académica de Nutrición.



San Agustín Tlaxiaca, Hgo., Julio 2019.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD
ÁREA ACADÉMICA DE NUTRICIÓN



De acuerdo con el artículo 134 del Reglamento de Control Escolar vigente, el jurado de examen recepcional designado, autoriza para su impresión la Tesis titulada

"Evaluación fisicoquímica y bioaccesibilidad *in vitro* de antioxidantes de un yogurt bebible adicionado con residuo ultrasonicado de zarzamora (*Rubus fruticosus L.*)"

Que para obtener el Título de Licenciada de Nutrición sustenta la Pasante

C. Alejandra Meléndez González

ATENTAMENTE
Pachuca, Hidalgo, 28 de Junio de 2019
"Amor, Orden y Progreso"

PRESIDENTE:	DRA. ESTHER RAMÍREZ MORENO
SECRETARIO:	DRA. DIANA PATRICIA OLIVO RAMÍREZ
PRIMER VOCAL:	DRA. NELLY DEL SOCORRO CRUZ CANSINO
SEGUNDO VOCAL:	MTRA. ARIANNA OMAÑA COVARRUBIAS
TERCER VOCAL:	MTRA. ZULI GUADALUPE CALDERÓN RAMOS
PRIMER SUPLENTE:	DR. JOSÉ ALBERTO ARIZA ORTEGA
SEGUNDO SUPLENTE:	MTRO. TEODORO SUÁREZ DIÉGUEZ

AGRADECIMIENTOS

Querido lector:

Esta tesis quiero dedicarla a mi familia, mis amigos y colegas que convivieron conmigo durante estos años de universidad, y para aquellos que se presentaron después de ella. Pero sobre todo, este trabajo de investigación esta dedicado a ti, futuro investigador, que te tomaste el tiempo de leerme y de leer el resultado de más de un año de trabajo.

Permíteme decirte que si buscas seguir el camino de la investigación, te advierto que no será sencillo. Llorarás, te enojarás y maldecirás por la desesperación que te causen tus muestras y resultados. Dejarás de lado amigos y familia por tu proyecto, y muchas veces te preguntarás si tomaste la decisión correcta, sobre todo cuando todo el mundo te diga que estás equivocado.

Debes recordar, futuro investigador, que los grandes logros requieren grandes riesgos, y que si fuera sencillo, todo el mundo lo haría.

La investigación también te da muchas alegrías, como la satisfacción de haber hecho algo que otros no se atrevieron, te otorga conocimientos y habilidades de las cuales nunca habías sido consiente, y sobre todo te regala una nueva familia.

En el laboratorio conocí gente valiosa, compañeros que se volvieron amigos. Nunca olvidaré a mis primeros maestros: Quina, ella me ayudo con toda la paciencia demostrando la maestra que es, me guió en el camino que a ella le había costado tanto trabajo recorrer, levantandome cuando caia y animandome cuando no podía mas. Siempre tuvo una palabra de aliento y un consejo para todo aquel que lo necesitara.

Lili, mi querida amiga, mi maestra y compañera de yogurt. El camino que ella recorrió primero, me animó también a terminar con este proyecto. Una pequeña madre que siempre se preocupó por nuestro bienestar y salud.

Eli, ella me enseñó que los deseos, por mas pequeños que sean, siempre pueden volverse realidad.

Bere, su sarcasmo y alegría llenaban el laboratorio de nuestras risas.

Chava y Alicia mis compañeros, maestros y ejemplos a seguir, esforzándose siempre en sus respectivos proyectos, siempre con visión de llegar mas lejos de lo que cualquiera puede pensar.

Por otro lado, también llegó el momento en el que tuve que enseñar. Fue una experiencia aterradora, siempre con el miedo de que mi ayuda resultara en una catástrofe para mis compañeros. Lis, Luis, Gloria, espero que mis pocos conocimientos les hayan servido, que me recuerden con cariño tal y como yo los recuerdo, que nuestros viajes y convivios se los lleven en el corazón.

Agradezco a mi directora, la maestra Zuli, y a mi codirectora la doctora Esther, ambas estuvieron para mí, para ayudarme, aconsejarme y regañarme cuando fue necesario.

Pero sin duda la persona que más me apoyó durante la elaboración de mi proyecto, y a quien debo un agradecimiento especial, fue la doctora Nelly, quien siempre me alentó a continuar, creyó en mi aun cuando ya me había dado por vencida. Este proyecto y yo hubiéramos sido un desastre sin su guía y paciencia, incluso imagino que sin su apoyo no hubiera podido llegar hasta el final.

Agradezco a mi familia. A mi hermana quien siempre le he querido dar un buen ejemplo, pero no para que siga mis pasos, más bien para que genere su propio camino, y se dirija en la dirección que desee, sabiendo que siempre me tendrá a su lado para apoyarla.

Mi mamá, un ejemplo de dedicación. Ella me enseñó sobre el amor al trabajo y a la familia.

Mi abuela, quien me enseñó a no rendirme tan fácilmente, que no estoy sola y que pase lo que pase, ella siempre tendrá un café para mejorar mi ánimo.

Mamá Mari, quien siempre estuvo para mí, incluso en los días mas oscuros.

Tíos y tías, mis queridos hermanos de quienes aprendí el camino que quiero seguir y me enseñaron a vivir la vida como debe vivirse.

También quiero agradecer a Ana, Ari, Bob, Brandon y Roberto, mis amigos de toda la vida, no importa lo que pase, y los cambios que tengamos, siempre seremos una familia.

Karen, Diana Márquez, Diana Aduna, Yisel y Zenen. A ellos debo mis mejores momentos durante la universidad, y si pude terminarla, fue gracias a ellos.

Oyohualli fue mi escape para todo, me recordó que mi corazón sigue latiendo por una razón, y que la vida es mejor cuando tienes un motivo por que vivirla. Mi querida maestra Montserrat Castañeda, quien me animó a salir de mi zona de confort y aventurarme a nuevas experiencias. Mis mejores amigos del grupo: Erany, Carlos, Itzel, Leslie, Liz, Bere, Ana, Cristian, Dany, Gustavo, Omar y todos aquellos que han formado parte de esta experiencia, me permitieron aprender de ellos y mostrarles lo que sabía, me tuvieron paciencia y me trataron con el cariño de una familia.

Debo decirte lector, que la vida durante el servicio social es tu última oportunidad de hacer todo lo que quieras antes de enfrentarte al inmenso abismo del desempleo, y a la constante ansiedad de no tener dinero, ser un parásito para tus familiares y que estos mismos empiecen con las preguntas incómodas sobre tu vida personal. Quiero contarte también un poco sobre lo que hay después de la escuela. La vida laboral no es tan sencilla como la vida de un estudiante. Vivir sola, lejos de mi familia y amigos fue algo sumamente difícil, agregando mi descubrimiento de que la escuela realmente no te prepara para la vida adulta. Llegarás a cualquier trabajo y te sentirás como un tonto que ha olvidado todo lo aprendido durante la universidad. Tranquilo, estarás bien, sobre todo cuando reconozcas que lo aprendido en libros y clases no se compara con la experiencia y convivencia. Recuerda que el aprendizaje es diario, y que siempre hay cosas nuevas que conocer, que debes ser humilde y tratar como quieres ser tratado. Así y solo así, las puertas se abrirán para ti.

Quisiera darte miles de consejos que te sirvan de aquí en adelante, pero la realidad es que la vida está llena de misterios, y que no hay nada que pueda decir que te prepare para lo que viene.

Mis mejores deseos:

Tu escritora.

ÍNDICE GENERAL

ACTA DE IMPRESIÓN DE TESIS	I
AGRADECIMIENTOS	II
ÍNDICE GENERAL	V
ÍNDICE DE ECUACIONES	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
ÍNDICE DE TABLAS	IX
GLOSARIO DE ABREVIATURAS	X
RESUMEN	1
SUMMARY	2
I. MARCO TEÓRICO	3
1.1 Ultrasonido	3
1.1.1 Fundamento	3
1.2 Zarzamora	5
1.2.1 Morfología	5
1.2.2 Producción y Consumo	6
1.2.3 Contenido nutrimental	8
1.2.4 Residuo de la zarzamora	8
1.2.5 Compuestos fenólicos	10
1.3 Yogurt	12
1.3.1 Aditivos en el yogurt	13
1.3.2 Beneficios del yogurt asociados a la salud	14
1.4 Bioaccesibilidad intestinal e interacciones alimenticias	15
1.4.1. Interacciones con lípidos	16
1.4.2. Interacciones con proteínas	16
1.4.3. Interacciones con hidratos de carbono	16
II. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	17
III. JUSTIFICACIÓN	18
IV. OBJETIVOS	19
4.1 Objetivo general	19
4.2 Objetivos específicos	19
V. METODOLOGÍA	20
5.1 Obtención del residuo de zarzamora	22

5.2 Elaboración del yogurt	22
5.3 Determinación de pH y acidez titulable en el yogurt	24
5.4 Determinación de la capacidad de retención de agua	25
5.5 Determinación de viscosidad	25
5.6 Determinación de color	26
5.7 Análisis microbiológico	26
5.8 Preparación de los extractos	27
5.8.1 Bioaccesibilidad intestinal <i>in vitro</i>	27
5.9 Determinación de compuestos fenólicos totales	28
5.10 Determinación de antocianinas	29
5.11 Determinación de actividad antioxidante por ABTS•+	30
5.12 Determinación de actividad antioxidante por DPPH•	31
5.13 Determinación de actividad antioxidante por FRAP	31
5.14 Análisis estadístico	32
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
6.1 Propiedades fisicoquímicas	33
6.1.1 pH y acidez titulable	33
6.1.2 Capacidad de retención de agua y viscosidad	34
6.1.3 Color	35
6.2 Calidad microbiológica	39
6.3 Capacidad antioxidante	41
6.3.1 Contenido de fenoles totales y antocianinas	42
6.3.2 Actividad antioxidante por inhibición de los radicales ABTS•+, DPPH y FRAP	45
VII. CONCLUSIONES	49
VIII. REFERENCIAS	50

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1	24
Ecuación 2	25
Ecuación 3	26
Ecuación 4	26
Ecuación 5	29

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática del fenómeno de cavitación.....	3
Figura 2. Daño celular inducido por ultrasonido	4
Figura 3. Representación gráfica de la zarzamora	6
Figura 4. Estados de mayor producción de zarzamora en México durante el año 2017	7
Figura 5. Estructura química del grupo fenol	10
Figura 6. Estructura química de las antocianinas	11
Figura 7. Diagrama del diseño metodológico y especificaciones de la elaboración de las muestras de yogurt	21
Figura 8. Colores de las muestras de yogurt	36
Figura 9. Diagrama de las coordenadas de color de las muestras de yogurt.	37
Figura 10. Compuestos fenólicos totales y antocianinas en el yogurt y la fracción bioaccesible.....	43

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición nutrimental de la zarzamora en 100 g de peso fresco.....	8
Tabla 2. Composición nutrimental del residuo de la zarzamora en 100 g de peso fresco	9
Tabla 3. Antocianinas más comunes	11
Tabla 4. Composición nutrimental del yogurt en 100 g	14
Tabla 5. Especificaciones de las muestras de estudio.....	23
Tabla 6. Valores de pH y acidez titulable de las muestras de yogurt.....	33
Tabla 7. Capacidad de retención de agua y viscosidad de las muestras de yogurt..	34
Tabla 8. Parámetros de color de las muestras de yogurt.....	36
Tabla 9. Microbiología de las muestras de yogurt.....	39
Tabla 10. Actividad antioxidante antes y después de la Bioaccesibilidad intestinal in vitro de las muestras de yogurt	46

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

ABTS: Ácido 2,2-azino-bis-(3etil-benzotiazolin-6-sulfónico)	kHz: Kilohercios
AOAC: Association of Official Analytical Chemists	L: Litros
AT: Acidez titulable	L: Luminosidad
atm: Presión atmosférica	Log10: Logaritmo base 10
BAL: Bacterias ácido lácticas	m/m: masa sobre masa
C: Cromaticidad	M: Molaridad
CFT: Contenido de fenoles totales	MA: Mesófilos aerobios
COL: Yogurt con Colorante	mg: Miligramos
COM: Yogurt comercial	mmol: Milimol
cP: Centipoises	µL: Microlitros
CRA: Capacidad de retención de agua	µm: Microgramos
Cy – 3 – Gl: Cianidín – 3 – Glucósido	µmol: Micromol
DCPI: 2,6-diclorofenol-indofenol	NAT: Yogurt natural
DPPH: 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo	nm: Nanómetros
EAA: Equivalentes de ácido ascórbico	p/v: peso sobre volumen
EAG: Equivalentes de ácido gálico	ROS: Especies de oxígeno reactivo
EB: Enterobacterias	rpm: Revoluciones por minuto
EFe(II): Equivalentes de hierro ferroso	RZ: Yogurt con residuo de Zarzamora
ET: Equivalentes de trolox	RZU: Yogurt con residuo de Zarzamora ultrasonificado
FRAP: Poder antioxidante reductor de hierro	TPTZ: 2, 4, 6 - tri (2-piridil) -s- triazina
°h: Grados Hue	UFC: Unidades formadoras de colonia
ha: Hectáreas	US: Ultrasonido
Kcal: Kilocalorías	UI: Unidad Internacional
	W: Vatio
	Wcm⁻²: vatio por centímetro cuadrado

RESUMEN

La zarzamora es un fruto con alto contenido de compuestos fenólicos, durante su procesamiento se generan gran cantidad de residuos ricos en antioxidantes que pueden ser utilizados como ingredientes funcionales en la industria alimentaria, incluyendo el sector lácteo. Por otra parte, con la aplicación del ultrasonido, es posible mejorar la extracción de compuestos bioactivos en los residuos, manteniendo la calidad y características originales de un producto. Por otro lado, para conocer la absorción de antioxidantes, los modelos de digestión *in vitro* resultan factibles debido a que son simples, baratos y reproducibles. El objetivo de este estudio fue evaluar las propiedades fisicoquímicas, microbiológicas y bioaccesibilidad *in vitro* de antioxidantes de un yogurt para beber, adicionado con residuo de zarzamora ultrasonicado (RZU) (90% de amplitud por 15 minutos), comparándolo con un yogurt con residuo de zarzamora (RZ), un yogurt con colorante (COL) un yogurt comercial (COM) y un yogurt natural (NAT) utilizado como muestra como control. La adición del residuo de zarzamora (RZ) y el residuo de zarzamora ultrasonicado (RZU) a los yogures, no afectó el valor de pH y acidez, manteniéndose dentro de lo establecido por la normativa oficial (<4.5 y >0.5%, respectivamente), incrementó la capacidad de retención de agua y la viscosidad, proporcionando un atractivo color violeta en comparación con las muestras NAT, con COL y COM. Se encontró bajo recuento de mesófilos aerobios y las bacterias ácido lácticas cumplen con la Norma Oficial Mexicana. El yogurt con RZ fue el único con presencia de enterobacterias, mientras que el residuo ultrasonicado (RZU) demostró completa inactivación. El yogurt con RZU presentó alto contenido de fenoles totales (CFT), antocianinas y actividad antioxidante (ABTS, DPPH y FRAP) comparado con las otras muestras. Finalmente, en la fracción bioaccesible, el yogurt con RZU fue mayor en antocianinas, ABTS y FRAP, pero el yogurt con RZ fue mayor para CFT y DPPH. Estos resultados sugieren que el residuo de zarzamora ultrasonicado podría ser utilizado como aditivo en la industria láctea como una opción para la reducción de aditivos artificiales añadidos.

Palabras clave: *Ultrasonido, Zarzamora, Yogurt, Bioaccesibilidad, Propiedad Antioxidante.*

SUMMARY

The blackberry is a fruit with a high content of phenolic compounds, during its processing is generated a large amount of residues rich in antioxidants, which can be used as functional ingredients in the food industry, including the dairy sector. On the other hand, with applying of an emerging technology, such as ultrasound, is possible to improve the extraction of bioactive compounds in foods, maintaining the quality and original characteristics of the product. On the other hand, to know the absorption of antioxidants, models of *in vitro* digestion are feasible because they are simple, cheap and reproducible. The objective of this study was to evaluate the physicochemical, microbiological and *in vitro* bioaccessibility of antioxidants properties from yogurt to drink, added with ultrasonicated blackberry residues (RZU) (90% amplitude for 15 minutes) in comparison with a yogurt with blackberry residues (RZ), yogurt with food coloring (COL), commercial yogurt (COM) and natural yogurt (NAT) used as control sample. The addition of the blackberry residue (RZ) and the ultrasonicated blackberry residue (RZU) to the yoghurts, did not affect the pH value and the acidity, complying within the established by the official regulations (<4.5 and >0.5%, respectively). In addition, it contributed to the increase in the water retention capacity and the viscosity of the yogurt, providing an attractive violet color in comparison with the NAT, COL and COM samples. A low load of counts of aerobic mesophiles was found and lactic acid bacteria comply with the established of the Official Mexican Norm. The yogurt with RZ was the only one with presence of enterobacteria, while the ultrasonicated residue (RZU) was effective in the total elimination of this microorganism. The yogurt with RZU presented high values in content of total phenols (CFT), anthocyanins and antioxidant activity (ABTS, DPPH and FRAP) in comparison with other samples. Finally, in the bioaccessible fraction, the yogurt with RZU was significantly higher in anthocyanins, ABTS and FRAP, but the yogurt with RZ was higher for CFT and DPPH. These results suggest that the ultrasonicated blackberry residue could be used as an additive in the dairy industry as an option for the reduction of added artificial additives.

Keywords: *Ultrasound, Blackberry, Yogurt, Bioaccessibility, Antioxidant property.*

I. MARCO TEÓRICO

1.1 Ultrasonido

La industria alimentaria ha optado por el desarrollo y uso de nuevas tecnologías para mejorar la calidad en los procesos de elaboración de productos alimenticios (Chemat *et al.* 2017). Un ejemplo de estas tecnologías emergentes es el ultrasonido, cuyo uso resulta barato, sencillo, confiable y respetuoso con el medio ambiente (Tiwari *et al.* 2009), ya que consume menos energía como la obtenida del carbón, petróleo, o gas natural y permite la reducción de disolventes, generando productos puros y de mayor rendimiento (Chemat *et al.* 2017).

1.1.1 Fundamento

El ultrasonido es una forma de energía generada por ondas sonoras demasiado altas para ser detectadas por el oído humano (>16 kHz) (Tiwari, 2015). Durante el proceso de ultrasonido en productos líquidos o semilíquidos se generan ondas longitudinales que provocan regiones de compresión y expansión, lo que forman cavidades llenas de vapor; fenómeno conocido como cavitación, haciendo las partículas más pequeñas, como se observa en la Figura 1 (Dolatowski *et al.* 2007; Abdullah y Ling, 2014; Tiwari, 2015; Chemat *et al.* 2017).

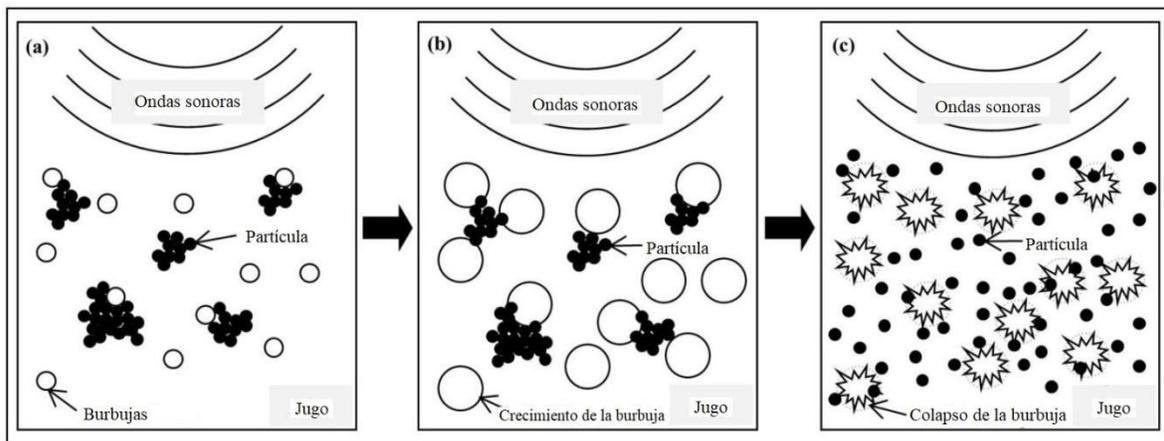


Figura 1. Representación esquemática del fenómeno de cavitación. (a) Formación de ondas de sonido que genera microburbujas en el líquido; (b) burbujas de cavitación en su tamaño máximo; (c) microburbujas colapsando y dispersión de las partículas. Modificada de Abdullah y Ling, 2014.

En los microorganismos, cuando estas burbujas alcanzan un tamaño crítico colapsan generando condiciones locales de presión y temperaturas extremas (1,000 atm y 5,000 K respectivamente), provocando la muerte del microorganismo (Figura 2) (Soria y Villamiel, 2010; Chemat *et al.* 2011).

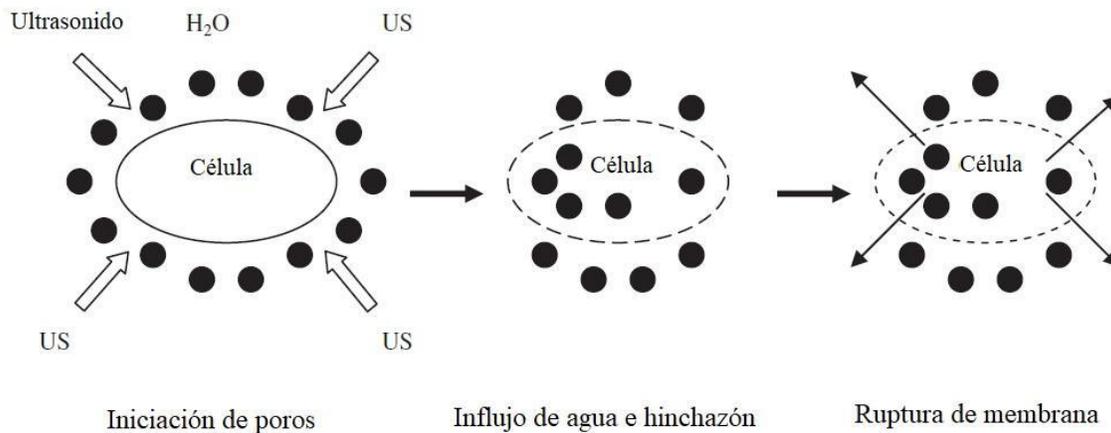


Figura 2. Daño celular inducido por ultrasonido. Modificada de Chemat *et al.* 2011.

De acuerdo con la intensidad, el ultrasonido es clasificado en ultrasonido de baja y alta energía (Soria y Villamiel, 2010). El ultrasonido de baja energía (baja potencia, baja intensidad), maneja niveles menores a 1 Wcm^{-2} y frecuencias de más de 100 kHz, y es utilizado en mediciones analíticas no destructivas, con fines de control de calidad y monitoreo de la composición de los alimentos durante su procesamiento y almacenamiento (Dolatowski *et al.* 2007; Abdullah y Ling, 2014).

Por otro lado, el ultrasonido de alta energía (alta potencia y alta intensidad), tiene niveles superiores a 1 Wcm^{-2} y un rango de frecuencia de 16 a 100 kHz (Soria y Villamiel, 2010). Este tipo de ultrasonido es útil en aplicaciones invasivas, que generan cambios en las propiedades físicas, químicas y biológicas de los alimentos procesados (Dolatowski *et al.* 2007; Majid *et al.* 2015).

En el alimento, dependiendo de la frecuencia y la amplitud de ondas sonoras utilizadas, se pueden observar diferentes efectos físicos, químicos y bioquímicos (Dolatowski *et al.* 2007; Tiwari, 2015). Los efectos físicos incluyen la reducción del tamaño de partícula, estrés local por cizallamiento y destrucción de la molécula en el alimento (Chemat *et al.* 2017); mientras que los efectos químicos incluyen la generación de radicales libres, debido a la hidrólisis de agua dentro de las burbujas,

lo que conduce a la formación de radicales libres H^+ y $\cdot OH$ (Majid *et al.* 2015). Estos son los efectos por los cuales el ultrasonido es utilizado para minimizar la carga bacteriana y facilitar la liberación de compuestos bioactivos de un producto, mientras que mantiene la calidad y las características originales del producto (Chemat *et al.* 2017).

Los productos alimenticios poseen nutrientes, aromas, pigmentos y antioxidantes altamente sensibles a cambios químicos, físicos y microbiológicos, por lo que métodos comunes de procesamiento pueden generar la pérdida de algunos compuestos (Chemat *et al.* 2011; Citta *et al.* 2017).

El ultrasonido ha sido utilizado para la extracción de compuestos antioxidantes (Soria y Villamiel, 2010), que genera fenómenos físicos y químicos que permiten maximizar el rendimiento de la extracción y la actividad antioxidante mejorando la migración de estos compuestos al medio líquido (Romero y Yépez, 2015), al mismo tiempo que reduce el consumo de energía y el tiempo de extracción, generando extractos libres de solventes o contaminantes residuales, en comparación con los métodos convencionales, los cuales utilizan disolventes (Chemat *et al.* 2017). Frutas como la zarzamora, son una fuente rica de compuestos antioxidantes (Romero y Yépez, 2015), distribuidos en el jugo, pulpa, cáscara y semillas (Abdullah y Ling, 2014), los cuales pueden ser mejor aprovechados al aplicarse un método de extracción como el del ultrasonido, el cual mejora la disponibilidad de los compuestos antioxidantes.

1.2 Zarzamora

1.2.1 Morfología

Rubus fruticosus L., mejor conocida como zarzamora (Figura 3), proviene de un arbusto espinoso semi erecto, de una altura aproximada de 150 a 200 cm y una anchura de 100 a 150 cm; al madurar la hoja, su follaje es de un tono verde oscuro (Pérez y Vázquez, 2004; Hummer y Janick, 2007). El diámetro de su flor es aproximadamente de 2 a 3 cm; tiene 5 pétalos rosados o blancos pálidos y múltiples estambres en su flor (Zia-UI-Haq *et al.* 2014). Después de la caída de los pétalos, la fruta se desarrolla en agregados llamados polidrupas, cuyo peso es de aproximadamente 3 a 12 g, dependiendo de la variedad (Kaume *et al.* 2012). Al

principio, las frutas son verdes y con la maduración se tornan de un color de rojo a negro (Hummer y Janick, 2007; Zia-Ul-Haq *et al.* 2014).

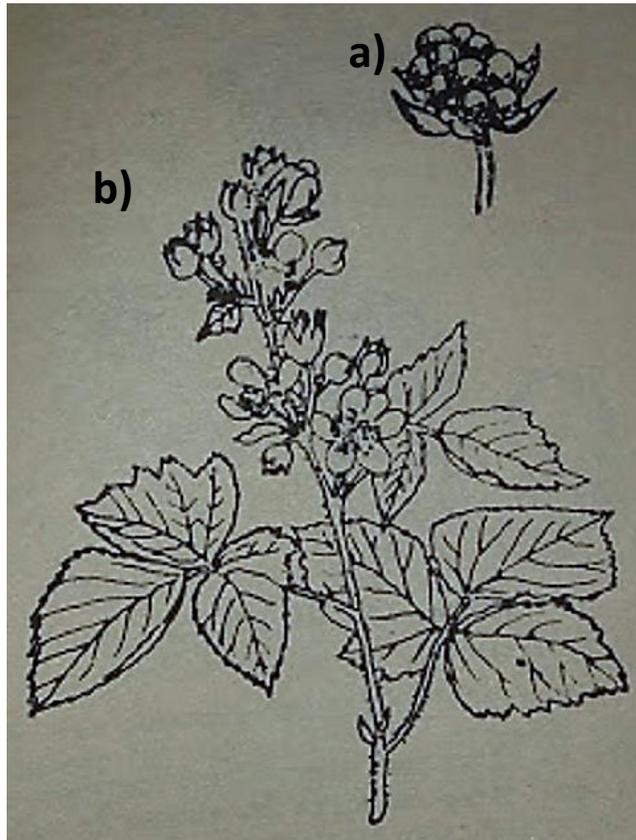


Figura 3. Representación gráfica de la zarzamora. a) Fruto; b) Flores, Hojas y Ramas. Modificada de Samano, 1986.

Esta fruta se produce durante dos estaciones del año: la primera entre marzo y julio; y la segunda en los dos últimos meses del año (Hummer y Janick, 2007; FIRA, 2016). La planta se desarrolla en lugares frescos y fríos, su recolección se puede realizar de forma manual o mecánica justo cuando el fruto se encuentre casi maduro, cuando tiene un color rojo o empieza a tornarse oscuro (Pérez y Vázquez, 2004).

1.2.2 Producción y Consumo

Debido a la alta demanda de frutos del bosque en diferentes países y a las características climáticas óptimas, calidad de suelo y oportunidad de periodos estacionales, México se ha convertido en el quinto productor de zarzamoras del mundo, antecedido por China, Estados Unidos, Rusia y Polonia (FIRA, 2016).

En México, para el 2017 se reportó una producción de 12,561.05 toneladas de zarzamora (SIAP, 2017), destacándose cuatro estados en la producción y cosecha de zarzamora (Figura 4): Michoacán (11,782.75 toneladas), donde se concentró la mayor producción del país; Jalisco (536.5 toneladas), Colima (136 toneladas) y Baja California (56 toneladas) (FIRA, 2016; SIAP, 2017).

Durante el 2017, en Hidalgo se reportó una producción de 1 tonelada de esta fruta, siendo Atotonilco El Grande el lugar con mayor superficie cosechada (SIAP, 2017).



Figura 4. Estados de mayor producción de zarzamora en México durante el año 2017. Fuente: SIAP, 2017.

La composición química de la zarzamora depende de muchos factores, como el cultivar analizado, las prácticas agronómicas del cultivo, la etapa de maduración, y las condiciones geológicas y climáticas del área donde es recolectada, además de las condiciones de almacenamiento, la actividad enzimática y la contaminación microbiana (Yilmaz *et al.* 2009).

Normalmente estas frutas se consumen frescas, sin embargo, este tipo de producto contiene enzimas (como la polifenol oxidasa y la peroxidasa) que contribuyen a su deterioro, generando pérdida de textura, formación de pigmento marrón y destrucción de fitoquímicos que, en conjunto, afectan su aceptabilidad (Kaume *et al.* 2012). Por

por el consumidor y terminan siendo desechados, sin embargo, contienen altas cantidades de fibra dietética y compuestos fenólicos, (Tseng y Zhao, 2013) como ácidos fenólicos, taninos, flavonoides y antocianinas, que contribuyen a su alta capacidad antioxidante (Kaume *et al.* 2012). Estos usualmente son pigmentos que han sido utilizados como colorantes naturales en productos horneados, jaleas, chicles, vinos de frutas y bebidas (Türemis *et al.* 2003).

Un estudio realizado por Zafra, *et al.* 2018 demostró que el residuo de zarzamora es una buena fuente de minerales, ácidos orgánicos y fibra, además de presentar cantidades elevadas de compuestos fenólicos y antocianinas (Tabla 2).

Tabla 2. Composición nutrimental del residuo de la zarzamora en 100 g de peso fresco

Composición	Cantidad	Composición	Cantidad
Humedad	74.83 ± 0.76	Ácidos orgánicos (mg/100 g bs)	
Proteína	2.60 ± 0.11	Ácido Oxálico	59.51 ± 8.18
Lípidos	1.84 ± 0.03	Ácido Málico	5706.37 ± 123.38
Hidratos de carbono totales	9.07 ± 0.80	Ácido Cítrico	125.54 ± 0.61
Fibra dietética total	11.12 ± 0.22	Ácido Fumárico	230.25 ± 2.47
Cenizas	0.54 ± 0.02	Ácido Ascórbico	6.00 ± 1.00
Minerales (%)		Ácido Palmítico (C16:0)	1.68 ± 0.40
Carbón (C)	48.02 ± 4.69	Ácido Linolenico (C18:3n-3)	0.43 ± 0.07
Nitrógeno (N)	7.54 ± 0.43	Ácido Araquidónico (C20:0)	7.68 ± 1.88
Oxígeno (O)	43.04 ± 4.16	Ácido Eicosanóico (C20:1)	0.20 ± 0.00
Fosforo (P)	0.19 ± 0.08	Antioxidantes	
Sodio (Na)	0.01 ± 0.01	Compuestos fenólicos	4016.43 ± 13.44
Magnesio (Mg)	0.11 ± 0.05	totales (mg EAG/100 g db)	
Potasio (K)	0.81 ± 0.17	Antocianinas (mg/100 g db)	364.53 ± 7.36
Calcio (Ca)	0.08 ± 0.04	Capacidad antioxidante	
Hierro (Fe)	0.03 ± 0.05	ABTS (mg EAA/100 g bs)	5422.38 ± 71.50
Azufre (S)	0.05 ± 0.01	DPPH (µmol ET/100 g bs)	13656.27 ± 532.66
Silicio (Si)	0.02 ± 0.04	FRAP (µmol Fe(II)/100 g bs)	12511.44 ± 147.39
Cloro (Cl)	0.06 ± 0.05	Fibra dietética	
		Fibra dietética total (%)	44.26 ± 0.09
		Fibra soluble (%)	5.90 ± 0.52
		Fibra insoluble (%)	38.35 ± 0.39

Modificada de Zafra *et al.*, 2018.

1.2.5 Compuestos fenólicos

Los fenoles o compuestos fenólicos (Figura 5), son un grupo de antioxidantes considerados como metabolitos secundarios de las plantas, cuya estructura química tiene de uno o más grupos fenólicos (Tsao, 2010; Carbonell *et al.* 2014).

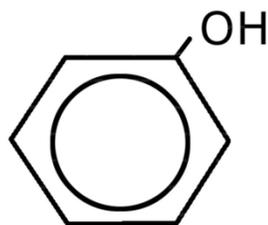


Figura 5. Estructura química del grupo fenol

Las frutas, verduras, cereales integrales y bebidas como el té, el chocolate y el vino son fuentes ricas de polifenoles (Tsao, 2010). La cantidad de los compuestos fenólicos totales en las zarzamoras varían de 114 a 1056 mg /100 g, dependiendo de la genética y la madurez de la fruta (Kaume *et al.* 2012).

Los polifenoles, además de poseer efectos analgésicos, antiinflamatorios y citotóxicos (León *et al.* 2015), son antioxidantes capaces de neutralizar los radicales libres donando un electrón o un átomo de hidrógeno, inhibiendo así la formación de las especies reactivas y los precursores de radicales libres (Muniandy *et al.* 2016). Además, los polifenoles también son conocidos por su actividad quelante de metales (Tsao, 2010). Dependiendo de su estructura química, los compuestos fenólicos pueden ser divididos en compuestos no flavonoides, como ácidos fenólicos, diarilheptanoides, estilbenos, arilcananonas, antraquinonas, cumarinas y fenoles simples; y en flavonoides, que incluyen flavonoles, flavonoles, flavonoides, flavanonas, isoflavonas, chalconas y antocianinas (Tsao, 2010; León *et al.* 2015), considerándose estos últimos constituyentes principales de las zarzamoras (Zia-Ul-Haq *et al.* 2014). Las antocianinas son glucidos flavonoides solubles en agua, con un anillo - A beinzoil y un anillo - B hidroxicinamoil, conocidos como los pigmentos rojos, azules y morados de la mayoría de los pétalos de flores, frutas y verduras, y ciertas variedades especiales de granos. Su color y tipo de antocianina depende del tipo de radical (R1 y R2) (Tabla 3) unido al anillo fenol, como se puede ver en la Figura 6 (Giusti y Wrolstad, 2003; Wu *et al.* 2006; Tsao, 2010).

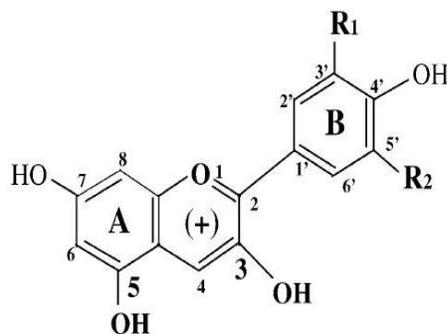


Figura 6. Estructura química de las antocianinas

Tabla 3. Antocianinas más comunes

Antocianina	R ₁	R ₂	λ_{\max} (nm) visible/color
Pelargonidina	H	H	494 nm / naranja
Cianidina	OH	H	506 nm / naranja-rojo
Peonidina	OMe	H	506 nm / naranja-rojo
Delfinidina	OH	OH	508 nm / rojo
Petunidina	OMe	OH	508 nm / rojo
Malvidina	OMe	OMe	510 nm / azul-rojo

A) Anillo benzoil; B) Anillo hidroxicinamoil; R₁: Radical 1; R₂: Radical 2. OMe: Metoxil. Modificada de Giusti y Wrolstad, 2003.

Las antocianinas se sintetizan durante la maduración de la zarzamora, aumentando a medida que la fruta va madurando, desde las etapas rosa/rojo claro a púrpura-azulado oscuro (Kaume *et al.* 2012); el color de las frutas también depende del pH del alimento, siendo más estables en soluciones ácidas (pH>3), cuyo color es rojo; en condiciones básicas el color es azul (Fang y Bhandari, 2011). Otros factores como el grado de hidroxilación, o el patrón de metilación de los anillos aromáticos, y el patrón de glicosilación, también pueden afectar el color de las antocianinas (Tsao, 2010), así como la humedad y el oxígeno (Fang y Bhandari, 2011).

Las antocianinas encontradas en la zarzamora son derivados de cianidina unidos a restos de glucosa, rutinosa, xilosa y arabinosa, algunos ejemplos son cianidina 3-glucósido, que es el principal tipo de antocianina encontrado en esta fruta; cianidina 3-galactósido, cianidina 3-xilósido, cianidina 3-dioxalil-glucósido, cianidina 3-rutinósido, perlargonidina 3-glucósido, cianidina 3- (3-malonil) glucósido y cianidina 3- (6-malonil) glucósido, entre otros (Kaume *et al.* 2012).

La actividad antioxidante de las antocianinas está asociada con el número de hidroxilos libres alrededor del anillo de pirona: cuanto mayor es el número de hidroxilos, mayor es la actividad antioxidante (Genskowsky *et al.* 2016).

1.3 Yogurt

Se le conoce como yogurt, yogur, yoghurt, yoghurth o yogurth al producto obtenido de la fermentación de leche (NOM-181-SCFI-2010), estandarizada o no, entera, parcial o totalmente descremada, enriquecida en extractos secos, tratada térmicamente y coagulada biológicamente por medio de la acción de microorganismos *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus* (NOM-181-SCFI-2010; NMX-F-444-1983).

Durante la fermentación de la leche por los microorganismos, se realiza la conversión de lactosa en ácido láctico, la hidrólisis de caseínas en péptidos y aminoácidos libres y de la grasa láctea en ácidos grasos libres (Lee y Lucey, 2010). Estas reacciones conducen a la producción de diversos metabolitos que dan como resultado una disminución del pH, la formación de una textura semisólida y un sabor distintivo del yogurt (Settachaimongkon *et al.* 2014). Este producto puede clasificarse por sus componentes en simple (o natural) y en saborizado (o con fruta), para ello puede contener hasta 50% (m/m) de ingredientes no lácteos, como por ejemplo edulcorantes, frutas, verduras, jugos, purés, pastas, preparados y conservadores derivados de otros alimentos aromatizantes naturales e inocuos y/o sabores (NOM-181-SCFI-2010). El yogurt natural es normalmente de color blanco, de aroma y sabor ligeramente ácidos, característicos del producto, y de consistencia firme (NMX-F-444-1983). La leche usada para yogurt se tiene que estandarizar a un nivel menor de grasa y mayores contenidos de lactosa, proteínas, minerales y vitaminas; para eso se pueden añadir sólidos lácteos no grasos (leche deshidratada descremada, suero de leche, etcétera); y a partir de la obtención del yogurt se pueden añadir algunos aditivos como colorantes, gelificantes, estabilizantes, saborizantes y edulcorantes (Badui, 2006).

1.3.1 Aditivos en el yogurt

En la industria alimentaria, los aditivos son utilizados para mejorar las características y propiedades de los productos procesados, los cuales incluyen conservantes, colorantes, aromatizantes, texturizantes y diversos agentes con propiedades nutricionales (Caleja *et al.* 2016), algunas de sus funciones se enuncian a continuación:

- ❖ Colorantes y pigmentos: sustancia que tiene la propiedad de impartir color al medio que lo contiene, obtenido de una fuente animal, vegetal o mineral.
- ❖ Edulcorantes: sustancia natural o sintética que puede sustituir parcial o totalmente el dulzor del azúcar.
- ❖ Emulsificantes, emulsivos, estabilizadores, espesantes y gelificantes: sustancia o mezcla de sustancias que mantiene homogéneos a los productos constituidos por dos o más fases inmiscibles, impidiendo su separación.
- ❖ Saborizantes: todos los agentes, naturales y sintéticos, que se emplean para proporcionar un determinado sabor a los alimentos (Badui, 2006).

El abuso de los aditivos sintéticos resulta peligroso para la salud humana, debido a los efectos adversos relacionados a su consumo excesivo (Muniandy *et al.* 2016), los cuales incluyen problemas gastrointestinales (intolerancias), dermatológicos (urticaria), respiratorios (asma) y neurológicos (Caleja *et al.* 2016). Diversos estudios mencionan la combinación de un derivado lácteo, yogurt, con un alimento de origen vegetal (Giusti y Wrolstad, 2003; Gonzalez *et al.* 2011; Tseng y Zhao 2013; Gad *et al.* 2015; Sung *et al.* 2015; Oliveira *et al.* 2015; Muniandy *et al.* 2016; Bakirci *et al.* 2017; Cassani *et al.* 2017). Esta combinación demostró mejorar las características fisicoquímicas del yogurt, aumentando la capacidad de retención de agua, viscosidad, entre otros (Gad *et al.* 2015; Bakirci *et al.* 2017); y mejorando la capacidad antioxidante de las muestras (Oliveira *et al.* 2015; Muniandy *et al.* 2016). Al ser estos aditivos de origen natural, disminuyen las reacciones adversas que los aditivos de origen sintético pudieran generar en quien los consume (Caleja *et al.* 2016)

1.3.2 Beneficios del yogurt asociados a la salud

El yogurt es rico en nutrientes (Tabla 4), como lípidos, proteínas, potasio, calcio y vitaminas del complejo B (Harish y Varghese, 2006; USDA, 2018). El principal carbohidrato en el yogurt es la lactosa, sin embargo, resulta bien tolerada por individuos sensibles a este disacárido debido a la presencia de bacterias ácido lácticas (*Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*) (Fernandez y Marette, 2017), que a su vez mejoran la función intestinal y previenen episodios de diarrea, gracias a su acción sobre la lactosa (Harish y Varghese, 2006; Parra, 2012; Muniandy *et al.* 2016).

Tabla 4. Composición nutrimental del yogurt en 100 g

Composición	Cantidad	Composición	Cantidad
Energía	61 kcal	Vitaminas	
Agua	87.90 g	Vitamina A	99 UI
Proteína	3.47 g	Tiamina (B1)	0.029 mg
Lípidos Totales	3.25 g	Riboflavina (B2)	0.142 mg
Carbohidratos	4.66 g	Niacina (B3)	0.075 mg
Fibra Total	0.0 g	Piridoxina (B6)	0.032 mg
Azúcares Totales	4.66 g	Ácido Fólico (B9)	7 µg
Minerales		Cobalamina (B12)	0.37 µg
Calcio (Ca)	121 mg	Vitamina C (Total Ácido Ascórbico)	0.5 mg
Hierro (Fe)	0.05 mg	Vitamina D	2UI
Magnesio (Mg)	12 mg	Vitamina E (α-tocoferol)	0.06 mg
Fosforo (P)	95 mg	Vitamina K (Filoquinona)	0.2 µg
Potasio (K)	155 mg	Lípidos	
Sodio (Na)	46 mg	Saturados	2.096 g
Zinc (Zn)	0.59 mg	Monoinsaturados	0.893 g
		Poliinsaturados	0.092 g
		Colesterol	13 mg

Modificada de USDA, 2018.

Durante el proceso de fermentación del yogurt aumenta la biodisponibilidad de ciertos nutrientes de la leche, como la vitamina B12, calcio, magnesio, entre otros, así como de proteínas y péptidos, lo que lo hace ideal para las poblaciones con,

como niños y ancianos que son vulnerable a presentar déficit de nutrientes, que necesitan desarrollar o mantener su masa muscular (Fernandez y Murette, 2017). El yogurt también actúa en la prevención de enfermedades urogenitales, control de enfermedades inflamatorias del intestino y actúa en el control, prevención, y tratamiento de úlcera gástrica causada por *Helicobacter pylori* (Harish y Varghese, 2006; Parra, 2012). Otros beneficios a la salud incluyen la producción de enzimas, estabilización de la microbiota intestinal, así como su posible acción en la prevención de cáncer de estómago y colon (Parra, 2012), en el control de la presión arterial y sobre el daño hepático producido por una alta ingesta de alcohol (Nardone y Rocco, 2004). El yogurt a pesar de ser un alimento rico en hidratos de carbono, lípidos y proteínas, posee limitado contenido de compuestos bioactivos, por lo que el adicionarlos con frutas o residuos de estos pueden mejorar su formulación, sustituyendo el uso de aditivos sintéticos que pudieran generar reacciones adversas en quien los consume (Caleja *et al.* 2016 Bakirci *et al.* 2017). Sin embargo, las propiedades biológicas de los antioxidantes de la dieta dependen de su absorción en el intestino (Saura, *et al.* 2007).

1.4 Bioaccesibilidad intestinal e interacciones alimenticias

La bioaccesibilidad se define como la cantidad de un componente alimenticio que está presente en el intestino, como consecuencia de su liberación desde matriz alimenticia sólida, y que puede pasar a través de la barrera intestinal (Saura, *et al.* 2007). Los métodos de simulación intestinal *in vitro* resultan rápidos, reproducibles, seguros y no tienen las mismas restricciones bioéticas como los métodos *in vivo* (Sengul *et al.* 2014). Un ejemplo de simulación *in vitro*, es el modelo de diálisis, que corresponde la fracción dializable (parte de la muestra que atraviesa la membrana semipermeable y está disponible para la absorción), y la fracción no absorbible (la fracción de la muestra que queda fuera de la membrana de diálisis) (Van de Velde *et al.* 2018). La absorción intestinal y metabolismo de los polifenoles, entre ellos las antocianinas, depende principalmente de sus características fisicoquímicas y de su interacción con otros macronutrientes en los productos

alimenticios que los rodean (lípidos, proteínas e hidratos de carbono) (Carbonell *et al.* 2014; Jakobek, 2015).

1.4.1. Interacciones con lípidos

Los complejos generados entre los lípidos y los polifenoles son debido a los grupos hidroxilo presentes de los fenoles. Dichas interacciones tienen solo una pequeña influencia en la accesibilidad de absorción del polifenol, pero los lípidos pueden proteger a los compuestos fenólicos en su paso a través de la digestión, pudiendo estos llegar a las partes más bajas del tracto gastrointestinal (Jakobek, 2015).

1.4.2. Interacciones con proteínas

Estas interacciones son principalmente hidrofóbicas no covalentes, que son uniones reversibles, dependiendo del pH, temperatura y la concentración de la proteína o flavonoide (Trigueros *et al.* 2014; Jakobek, 2015). La asociación entre los polifenoles y las proteínas puede disminuir la actividad antioxidante de los polifenoles (Arts *et al.* 2002), sin embargo, esto puede resultar beneficioso, ya que esta unión protege a los polifenoles contra la degradación oxidativa a través de su paso por el tracto gastrointestinal, sin verse afectada la bioeficacia del antioxidante (Trigueros *et al.* 2014).

1.4.3. Interacciones con hidratos de carbono

Los grupos hidroxilo de los polifenoles forman enlaces con los átomos de oxígeno de los polisacáridos (Jakobek, 2015). La fibra dietética, constituida principalmente de polisacáridos, puede actuar como una matriz que retiene polifenoles, lo que puede permitir que hasta el 50% de los antioxidantes del alimento lleguen a colon (Saura, *et al.* 2011), ahí pueden estimular el crecimiento de bacterias beneficiosas e inhibir el crecimiento de bacterias patógenas (Palafox *et al.* 2011).

II. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Comúnmente la parte más utilizada de la zarzamora es el jugo, obteniéndose una gran cantidad de residuo, el cual está compuesto por cáscara, pulpa y semillas que son usualmente desechados, pero esta parte posee un alto contenido en nutrientes, fibra y antioxidantes. Por otro lado, el yogurt es un producto lácteo altamente consumido y con alto valor nutrimental con beneficios a la salud, sin embargo, posee bajo contenido en antioxidantes, y durante su procesamiento se agregan aditivos como endulzantes, aromatizantes, colorantes y estabilizantes, cuyo consumo excesivo puede resultar dañino para la salud. La industria alimentaria ha buscado formas de extraer los compuestos antioxidantes en las frutas como aditivo natural, pero los métodos convencionales más utilizadas para extraerlos necesitan el empleo de disolventes, los cuales resultan perjudiciales en la salud o el medio ambiente. Por lo anterior el elaborar un yogurt adicionado con residuo de zarzamora podría sustituir al uso de aditivos dañinos e incrementa su actividad antioxidante.

III. JUSTIFICACIÓN

Actualmente resulta casi imposible consumir alimentos en fresco, la mayoría son procesados y contienen alto contenido de aditivos los cuales pueden ser perjudiciales para la salud. Como se mencionó anteriormente, existe un 20% de residuos a partir de frutos procesados que no son utilizados, un ejemplo de ellos es la zarzamora, el cual tiene alto contenido en antioxidantes. Por otro lado, es conocido que el ultrasonido es una tecnología no toxica durante la extracción de compuestos, por lo que adicionar un residuo de zarzamora ultrasonificado a un yogurt como un aditivo natural, puede ser una alternativa de uso del residuo, evitando así su deshecho, y a la vez mejorar las propiedades fisicoquímicas del yogurt, incrementando así la ingesta de antioxidantes en el consumidor. Además, el consumo de este producto podría prevenir o disminuir la posibilidad de padecer enfermedades crónicas no transmisibles como cáncer, diabetes o trastornos cardiovasculares, entre otros.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar las propiedades fisicoquímicas, microbiológicas y bioaccesibilidad *in vitro* de antioxidantes de un yogurt bebible adicionado con residuo ultrasonicado de zarzamora (*Rubus fruticosus L.*), para establecer su posible uso como aditivo en un producto lácteo.

4.2 Objetivos específicos

- ❖ Analizar las propiedades fisicoquímicas de las muestras de yogurt mediante técnicas de pH, acidez, capacidad de retención de agua, viscosidad y color para conocer el comportamiento del residuo de zarzamora en el yogurt.
- ❖ Evaluar la calidad microbiológica de las muestras a través de recuento de mesófilos aerobios enterobacterias y bacterias ácido lácticas para evaluar si el producto elaborado cumple con lo establecido dentro de las normas oficiales para el yogurt.
- ❖ Calcular el contenido de compuestos fenólicos totales, antocianinas y capacidad antioxidante mediante los métodos de ABTS, DPPH y FRAP de las muestras de yogurt para determinar la cantidad de antioxidantes del residuo de zarzamora presentes en el yogurt.
- ❖ Medir en la fracción bioaccesible, el contenido de compuestos fenólicos totales, antocianinas y capacidad antioxidante mediante los métodos de ABTS, DPPH y FRAP para conocer la cantidad de antioxidantes liberados de los yogures durante las bioaccesibilidad *in vitro*.

V. METODOLOGÍA

Se analizaron cinco tipos diferentes de yogurt y fueron evaluadas las siguientes variables (Figura 7): propiedades fisicoquímicas (pH, acidez titulable, capacidad de retención de agua, viscosidad y color), recuento microbiológico (mesófilos aerobios, enterobacterias y bacterias ácido lácticas) y actividad antioxidante (compuestos fenólicos totales, antocianinas, ABTS, DPPH y FRAP) de las muestras y su fracción bioaccesible.

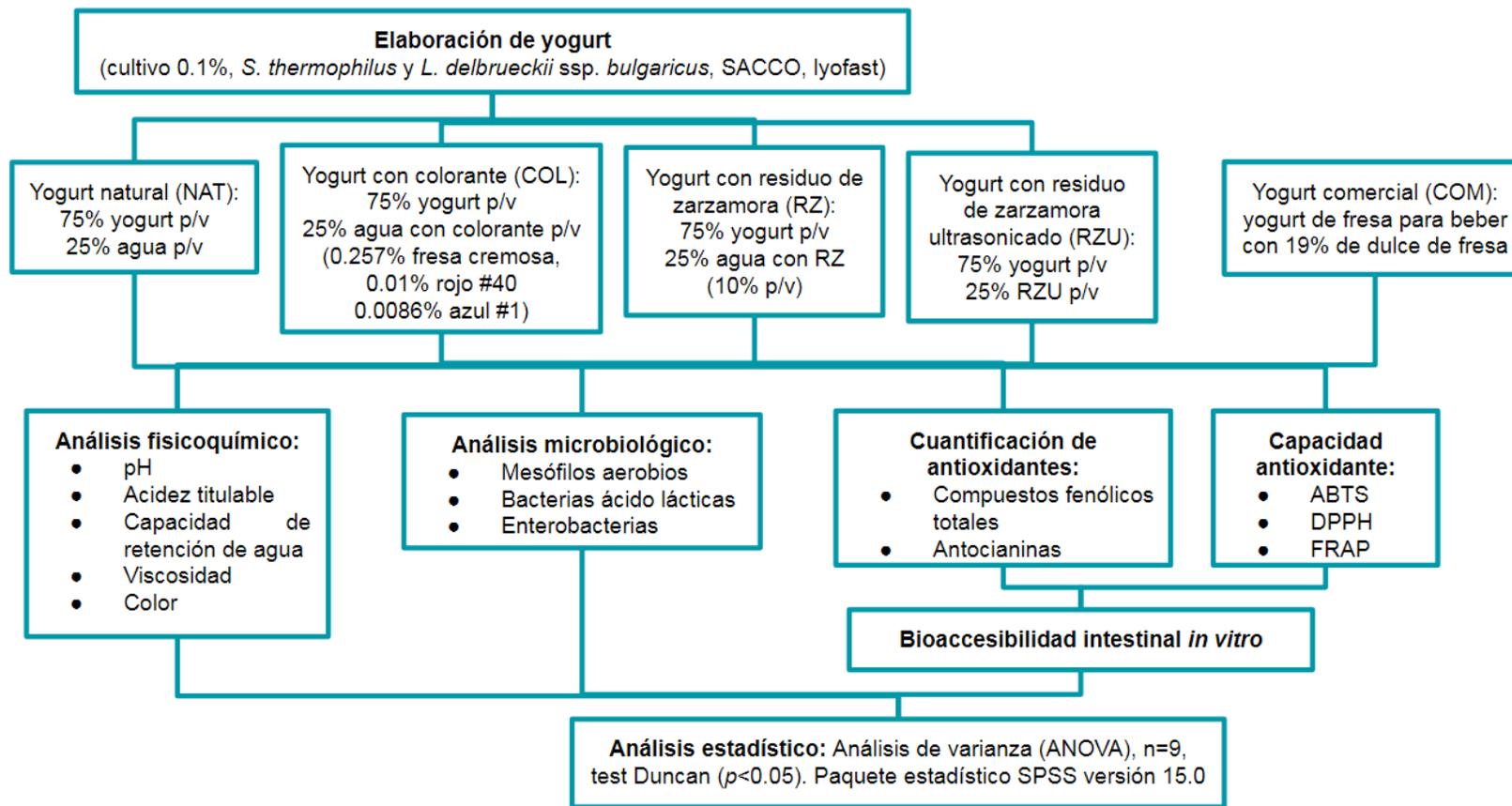


Figura 7. Diagrama del diseño metodológico y especificaciones de la elaboración de las muestras de yogurt

5.1 Obtención del residuo de zarzamora

El residuo fue obtenido a partir de la metodología descrita por Zafra *et al.* (2018), con algunas modificaciones. La zarzamora (*Rubus fruticosus*) fue adquirida de forma local en el mercado de Atotonilco el Grande, Hidalgo, en mayo de 2017. El fruto fue seleccionado, lavado y posteriormente desinfectado, utilizando agua adicionada con un producto desinfectante a base de plata ionizada estable, durante 10 minutos; posteriormente la fruta fue congelada hasta su utilización. La zarzamora fue molida en una licuadora industrial (38BL52 LBC10, Waring Comercial, Torrington, CT, USA) y filtrada con ayuda de un colador, para separarla del bagazo y las semillas. Posteriormente, el jugo fue centrifugado (Allegra 25™, Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA) a 10,000 rpm durante 30 minutos a 4°C, obteniendo de esta forma un precipitado y un sobrenadante. El residuo de zarzamora (RZ), conformado por bagazo, semillas y precipitado fue liofilizado (7753020, Labconco, Kansas City, MO, USA), molido y tamizado a un tamaño de partícula de 500 µm. El RZ se mantuvo en congelación en bolsas plásticas a -30°C, hasta su utilización. Para la elaboración del residuo de zarzamora ultrasonicado (RZU), se siguió la metodología utilizada por Zafra (2015), con algunas modificaciones. Se mezcló 4% (p/v) del residuo de zarzamora liofilizado con agua potable (400 mL). Posteriormente el líquido fue ultrasonicado usando un procesador de ultrasonido (VCX - 1500 HV, Sonics y Materials Inc. Newtown, EE. UU) a 1500 W en una frecuencia constante de 20 kHz a 90% de amplitud durante 15 minutos. El pulso tuvo una duración de 4 segundos encendido y 2 segundos apagado.

5.2 Elaboración del yogurt

Para la elaboración del yogurt natural (NAT), utilizado como muestra control y para la elaboración de los otros yogures: con colorante (COL), residuo de zarzamora (RZ) y residuo de zarzamora ultrasonicado (RZU), se utilizó leche descremada pasteurizada, la cual fue calentada a una temperatura de 45°C. Posteriormente se adicionó 1.8% de un endulzante bajo en calorías (a base de esteviol al 2.5% y sacarosa), y 30% de leche entera en polvo, evitando la formación de grumos en la

mezcla. Después se adicionó el 0.01% de cultivo láctico (Raff, S.A. de C.V. SACCO LYOFAS Y 4.50 B Jalisco, México), mezcla de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, previamente revivificado en 30 mL de leche a 45°C durante 20 minutos; finalmente el producto fue dividido en cuatro recipientes previamente esterilizados. El yogurt fue incubado durante 4 horas, a una temperatura de 45°C. Una vez alcanzado el pH deseado (<4.5), se dejó reposar el yogurt durante 16 horas a una temperatura de 8°C. Para las muestras NAT, con COL y con RZ fue adicionado además 25% de agua simple potable (Tabla 5).

Tabla 5. Especificaciones de las muestras de estudio

Clave	Tipo de muestra	Composición
NAT	Yogurt Natural	Yogurt + 25% p/v agua
COL	Yogurt con Colorante	Yogurt + 0.257% concentrado “fresa cremosa”, 0.01% rojo #40 y 0.0086% azul #1 en 25% p/v agua
COM	Yogurt Comercial	Yogurt bebible adicionado con 19% de dulce de fresa
RZ	Yogurt con Residuo de Zarzamora	Yogurt + 10% p/v de residuo de zarzamora liofilizado en 25% de agua
RZU	Yogurt con Residuo de Zarzamora Ultrasonicado	Yogurt + 25% residuo de zarzamora ultrasonicado

- ❖ Para el yogurt con colorante (COL), la muestra fue elaborada a partir de yogurt natural más una mezcla de concentrado artificial líquido para alimentos “fresa cremosa” marca DEIMAN (0.257% p/v) y colorantes Bodia Spices Inc. P. O. Box 226497, Doral, FL 33222-6497 rojo FDyC RED #40 (0.01% p/v) y azul FDyC Blue #1 (0.0086% p/v).
- ❖ El yogurt con residuo de zarzamora fue elaborado a partir de yogurt natural más RZ liofilizado (10% p/v).
- ❖ El yogurt con RZU fue preparado a partir de yogurt natural adicionado con 25% (p/v) de residuo de zarzamora ultrasonicado.
- ❖ El yogurt comercial (COM), fue un yogurt para beber de fresa obtenido en el mercado local, seleccionado como control por sus características similares a

las del producto elaborado. Dentro de su formulación incluye leche parcialmente descremada pasteurizada, 19% de dulce de fresa (azúcar, fresa, lactato de calcio, pectina, almidón modificado, saborizante artificial y colorante natural) y cultivos lácticos.

5.3 Determinación de pH y acidez titulable en el yogurt

El pH se define como el logaritmo negativo (base 10) de la concentración de iones de hidrógeno, el cual puede ser medido con un potenciómetro, que es un dispositivo compuesto de dos electrodos que miden el voltaje relacionado con la concentración iónica de la solución medida (Tyl y Sadler, 2017). La medición de pH de las muestras de yogurt se realizó con un potenciómetro (Hanna Instruments, 210, EUA) en 30 mL de yogurt (AOAC, 2005). La acidez titulable mide la concentración total de ácido en un alimento, que es neutralizada mediante la titulación exhaustiva con una base estándar (Briones, 2005). La acidez titulable fue determinada de acuerdo con lo señalado por AOAC (2005). La prueba se llevó a cabo en 1 mL de muestra disuelto en 9 mL de agua, más 5 gotas de fenolftaleína en un matraz Erlenmeyer, posteriormente se tituló con solución de hidróxido de sodio (NaOH) 0.1 N hasta que la muestra adquirió un ligero color rosa. La acidez se calculó mediante la siguiente ecuación.

Ecuación 1

$$\% \text{ de ácido láctico} = \frac{V * N * Peq}{M} * 100$$

Donde:

V = Volumen de solución de hidróxido de sodio 0.1 N gastado en la titulación de la muestra, en cm³

N = Normalidad de la solución de NaOH (0.1)

Peq = Peso equivalente del ácido láctico (0.09)

M= Volumen de la muestra, en cm³

Los resultados fueron reportados como porcentaje (%) de ácido láctico.

5.4 Determinación de la capacidad de retención de agua

La capacidad de retención de agua (CRA), es la habilidad de los alimentos de conservar agua en condiciones específicas de temperatura, duración y velocidad de centrifugación (Mudgil y Barak, 2013). La CRA de las muestras de yogurt se midió por el método de centrifugación, descrito por Parnell *et al.* (1986), con algunas modificaciones. En un tubo de centrífuga se pesaron 10 gr de muestra y se dejó reposar durante 16 horas, posteriormente fue centrifugado (Hamilton Bell HealthSmart, V6500, EUA) a 3500 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante fue decantado y se pesó el precipitado, posteriormente se realizó la diferencia de pesos para obtener el peso del sobrenadante y fue calculado mediante la siguiente ecuación:

Ecuación 2

$$\% CRA = \frac{PS}{PM} * 100$$

Donde:

PS = peso del sobrenadante después de la centrifugación

PM = peso de la muestra de yogurt

Los resultados se reportaron en % de capacidad de retención de agua.

5.5 Determinación de viscosidad

La viscosidad es definida como la resistencia al flujo, derivada de la falta de deslizamiento en un líquido (Joyner y Daubert 2017). Esta fue medida siguiendo el método descrito por Gad *et al.* (2015) con algunas modificaciones. En tubos de centrífuga de 50 mL se añadieron 35 mL de cada muestra y se dejó en reposo durante 6 horas. La viscosidad fue medida a 60 rpm a temperatura ambiente usando un viscosímetro (Brookfield, DV III, Stoughton Mass, USA) con una aguja cilíndrica de precisión (LV3). Los resultados fueron expresados en centipoises (cP).

5.6 Determinación de color

El color es el primer atributo que los consumidores evalúan en los alimentos (Giusti y Wrolstad, 2003). Los parámetros de color fueron medidos mediante la metodología empleada por Sah *et al.* (2016). La prueba se realizó en 10 mL de muestra usando un colorímetro portátil (Minolta CM-80, 500SM - 508D, Japón), en el cual se obtuvieron valores según la escala CIE *Lab*, donde L^* indica luminosidad de un alimento, es decir, el grado de oscuridad o brillo del producto, y varía de 0 (negro) a 100 (blanco); a^* indica el eje de cromaticidad entre el verde (-) y el rojo (+), y b^* el eje entre el azul (-) y el amarillo (+). Los valores numéricos de a^* y b^* fueron utilizados para obtener la cromaticidad (C) (Ecuación 3), que es la saturación de color. El ángulo de color, o grados Hue (h°), (Ecuación 4) que mide la tonalidad del producto (Mathias y Ah, 2014).

Ecuación 3

$$C = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$$

Ecuación 4

$$h^\circ = \text{tg}^{-1}(b^*/a^*)$$

5.7 Análisis microbiológico

Los microorganismos son entidades vivas de tamaño microscópico; entre ellos, algunos mohos, levaduras, bacterias y virus las cuales tienen funciones deseables e indeseables en la comida (Ray y Bhunia, 2008). El análisis microbiológico se realizó mediante la técnica de microgota (Polanco *et al.* 1996), usando agua peptonada esterilizada para las diluciones del yogurt. El recuento de mesófilos aerobios (MA) se realizó en agar para métodos estándar (PCA); para la determinación de bacterias ácido lácticas se realizó en Agar MRS, ambas fueron incubadas a 30°C (LSI-3016A, LabTech®, Korea) durante 48 horas. El recuento de enterobacterias fue determinado en Agar Bilis Rojo-Violeta Glucosado (VRBG), incubado a 37°C (LSI-3016A, LabTech®, Korea) durante 24 horas. Los resultados fueron expresados como

logaritmo en base 10 de unidades formadoras de colonias por gramo de muestra (Log^{10} UFC/g).

5.8 Preparación de los extractos

Previo a las determinaciones de contenido y actividad antioxidante se realizaron extracciones en las muestras de yogurt. Los compuestos antioxidantes fueron extraídos del yogurt utilizando el método descrito por Muniandy *et al.* (2016), con algunas modificaciones. En tubos de centrífuga de 50 mL fueron pesados 10 g de muestra, estos fueron mezclados con 25 mL de agua desionizada y homogenizados con ayuda de un vortex. El pH de la muestra se acidificó a 4.0 con ayuda de Ácido Clorhídrico (HCl) al 0.1 M. Los tubos fueron incubados a baño de agua (45°C) durante 10 minutos y posteriormente centrifugados (Allegra 25™, Beckman Coulter, USA) a 10,000 rpm por 30 minutos a 4°C. El sobrenadante fue decantado y llevado a un pH de 7 con hidróxido de sodio (NaOH) al 0.1 M. La muestra fue nuevamente centrifugada a 10,000 rpm por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante fue mantenido en congelación hasta su utilización en las determinaciones de contenido de fenoles totales, antocianinas y actividad antioxidante.

5.8.1 Bioaccesibilidad intestinal *in vitro*

La bioaccesibilidad se define como la cantidad de un componente alimenticio que está presente en el intestino, como consecuencia de su liberación de la matriz alimenticia y que puede pasar a través de la barrera intestinal (Tagliazucchi *et al.* 2010; Palafox *et al.* 2011) y se evalúa mediante una simulación de digestión gástrica y del intestino delgado (Carbonell *et al.* 2014). Esta determinación se basa en un modelo gastrointestinal *in vitro*, que incluye un tratamiento enzimático digestivo para aislar los compuestos no digeribles de los alimentos (Saura *et al.* 2007).

La obtención de la fracción bioaccesible de los antioxidantes presentes en el yogurt se realizó por el método de digestión *in vitro* seguido por diálisis tomado de Miller *et al.* (1981). En tubos de centrífuga se añadieron 20 mL de cada yogurt y se ajustó a pH 2, utilizando HCl 6 M. Posteriormente se adicionaron 120 μL de solución de pepsina (40 mg en 1mL de HCl 0.1 M), los tubos fueron incubados a 37°C durante 2

horas con agitación constante de 40 rpm/min, después se adicionó 1.5 mL de solución pancreatina/bilis (0.5 mg de pancreatina y 25 mg de extracto de bilis en 1 mL de 0.1 mol/L de bicarbonato de sodio [NaCOH3]), se colocó la mezcla en una bolsa de diálisis de 15 cm (previamente se lavó en agua destilada). Se procedió a una diálisis por 14 horas en 200 mL de NaHCO₃ pH 7.5 a temperatura ambiente con agitación de 40 rpm/min (LSI-3016A, LabTech®, Korea). A la fracción bioaccesible obtenida se le realizó las determinaciones de CFT y antocianinas, así como actividad antioxidante.

5.9 Determinación de compuestos fenólicos totales

El contenido de fenoles totales fue determinado mediante el procedimiento de Folin – Ciocalteu, que es un método colorimétrico basado en las reacciones de transferencia de electrones entre el reactivo de Folin-Ciocalteu y los compuestos fenólicos (Cassani *et al.* 2018). El reactivo de Folin - Ciocalteu contiene molibdato y tungstato sódico, que reaccionan con cualquier tipo de fenol, formando complejos fosfomolibdico - fosfotúngstico (Peterson, 1979). La transferencia de electrones a pH básico reduce los complejos fosfomolibdico - fosfotúngstico en óxidos, cromógenos de color azul intenso, de tungsteno (W₈O₂₃) y molibdeno (Mo₈O₂₃), siendo proporcional este color al número de grupos hidroxilo de la molécula (Julkunen, 1985). Para este estudio, fue empleado el método descrito por Rimpapa, *et al.* (2007), con algunas modificaciones. Se prepararon las soluciones: Folin (1:10), Carbonato de Sodio (7.5 g en 100 mL de agua desionizada) y Ácido Gálico (15 mg en 50 mL de agua). Para la elaboración de la curva de calibración de ácido gálico se prepararon las siguientes concentraciones: 0, 100, 200 y 300 mg/L (ácido gálico/agua desionizada) y se tomaron 100 µL de cada concentración; posteriormente fueron agregados 400 µL de la solución de carbonato de sodio y 500 µL de Folin, la mezcla se reposó a temperatura ambiente durante 30 minutos. En una microplaca se vertieron 200 µL de cada concentración, y fueron leídos a 765 nm usando un lector de microplacas (Power Wave XS UV-Biotek, software KC Junior, USA) utilizando agua como blanco. Con los resultados obtenidos de esta lectura se realizó una curva estándar con una R² cercana a 1. Para la lectura de las muestras se tomaron 100 µL

de muestra de extracto de yogurt o de la fracción bioaccesible, se agregaron 400 μL de la solución de carbonato de sodio y 500 μL de Folin, la mezcla reposó durante 30 minutos y fue leída usando agua como blanco.

El contenido de fenoles totales fue expresado como miligramos equivalentes de ácido gálico por 100 gramos (mg EAG/100 g).

5.10 Determinación de antocianinas

El Cyanidin-3-glucósido es un tipo de antocianina que se encuentra predominantemente en la naturaleza y generalmente se utiliza como un estándar en el cálculo del contenido de antocianinas. Esta medición fue realizada por el método descrito por Wallace y Giusti (2008). Se tomaron 500 μL de extracto de yogurt o la fracción bioaccesible, y se diluyó usando 4.5 mL de solución buffer de cloruro de potasio al 0.025 M (0.466g de cloruro de potasio en 250 mL de agua desionizada), ajustando a pH de 1.0 y otra muestra de yogur (500 μL de extracto de yogurt o la fracción bioaccesible) fue diluida con 4.5 mL de solución buffer de acetato de sodio al 0.4 M (8.203 g de acetato de sodio en 250 mL de agua desionizada), ajustando a pH 4.5 con HCl. Posteriormente, este preparado de buffer con los extractos de la muestra fue dejado en oscuridad durante 15 minutos a temperatura ambiente (25°C). En una microplaca se vertieron 200 μL de cada buffer adicionado con la muestra, y fueron leídos a 510 nm y 700 nm usando un lector de microplacas (Power Wave XS UV-Biotek, software KC Junior, USA), utilizando agua destilada como blanco. Más tarde, el contenido de antocianinas fue calculado mediante la siguiente ecuación.

Ecuación 5

$$\text{Contenido de antocianinas } \left(\frac{\text{mg}}{100\text{g}} \right) = \frac{A * PM * FD * 100}{E * Tp}$$

Donde:

A = Absorbancia de la resta entre los valores de cloruro de potasio (510 nm – 700 nm) menos la absorbancia de la resta de los valores de acetato de sodio (510 nm – 700 nm).

PM = Peso molecular de Cyanidin – 3 – Glucósido (449.3 g/mol).

FD= Factor de dilución (1:10).

E = Absorción molar ($26900 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Tp = Tamaño de diámetro del pocito de la microplaca (0.52 cm).

El contenido de antocianinas fue expresado como miligramos de Cianidín – 3 – Glucósido por 100 g (mg Cy-3-Gl/100 g).

5.11 Determinación de actividad antioxidante por ABTS•+

Se fundamenta en la cuantificación de la decoloración del radical ABTS•⁺ (2,2'-azinobis [ácido 3-etilbenzotiazolina-6- ácido sulfónico]), debido a la interacción con especies donantes de hidrógeno o de electrones (Re *et al.* 1999). El radical catiónico ABTS•⁺ es un cromóforo azul-verde, generado por una reacción de oxidación del radical ABTS con persulfato de potasio. Cuando este catión radical es reducido por un antioxidante, ya sea de tipo lipofílico o hidrofílico, presenta una decoloración detectado a una longitud de onda de 734 nm (Kuskoski *et al.* 2005). El catión radical (ABTS•⁺) fue formado por la reacción de ABTS•⁺ al 7 mmol/L con 2.45 mmol/L de persulfato de potasio bajo condiciones de oscuridad y temperatura ambiente durante 16 horas antes de su uso. Para la determinación, se diluyó la solución de ABTS con agua desionizada (relación 1:15) hasta obtener una absorbancia de 0.70 ± 0.10 a 734 nm. Para la curva patrón, se prepararon soluciones de 0, 60, 120, 180, 240 y 300 $\mu\text{mol/L}$ de ácido ascórbico (3 mg en 10 mL de agua), tomándose 20 μL de cada concentración y agregando 980 μL de ABTS•⁺, se dejó reposar por 7 minutos. Después de transcurrido este tiempo, se vertieron en una microplaca 200 μL de cada concentración por triplicado, y fueron leídos a 734 nm, utilizando un lector de microplacas (Power Wave XS UV-Biotek, software KC Junior, USA) realizándose una curva estándar con una R^2 cercana a 1. La lectura de las muestras se realizó tomando 20 μL de muestra de extracto de yogurt o de la fracción bioaccesible; se agregaron 980 μL de ABTS•⁺, se dejó reposar por 7 minutos. y fueron leídos usando agua como blanco. La actividad antioxidante fue expresada como μmol de equivalentes de ácido ascórbico por 100 g ($\mu\text{mol EAA/100 g}$).

5.12 Determinación de actividad antioxidante por DPPH•

DPPH• (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo) es un radical con un electrón desapareado. En condiciones normales, este radical presenta color azul-violeta, y se torna amarillo pálido en presencia de una sustancia antioxidante (Chávez, 2004).

Para esta determinación se pesaron 7.4 mg del reactivo de DPPH y se diluyeron en 100 mL de etanol grado analítico. Como antioxidante de referencia se utilizó Trolox (relación 1:30). Con la solución de Trolox se prepararon concentraciones de 0, 50, 100, 200 y 300 $\mu\text{mol ET/L}$ para la elaboración de una curva control cuya R^2 fue cercana a 1. De estas diluciones se tomaron 100 μL y se agregaron 500 μL de DPPH•, se dejó reposar durante 1 hora. En una microplaca se vertieron 200 μL de cada concentración por triplicado, y fueron leídos a 520 nm, usando un lector de microplacas (Power Wave XS UV-Biotek, software KC Junior, USA. Una vez obtenida la curva. Para la lectura de las muestras se tomaron 100 μL de muestra de extracto de yogurt o de la fracción bioaccesible y se agregaron 500 μL de DPPH•, se dejó reposar durante 1 hora y fue leída usando etanol como blanco. La actividad antioxidante fue expresada como μmol de equivalentes de trolox por 100 g ($\mu\text{mol ET/100 g}$).

5.13 Determinación de actividad antioxidante por FRAP

Este método de poder antioxidante reductor de hierro, conocido por sus siglas en inglés como FRAP, evalúa la capacidad antioxidante de una muestra de acuerdo con su capacidad para reducir el hierro férrico (Fe^{+3}) presente en un complejo con la 2, 4, 6 - tri (2-piridil) -s- triazina (TPTZ) hasta la forma ferrosa (Fe^{+2}) (Benzie y Strain, 1996).

El reactivo de FRAP fue preparado con acetato de sodio, TPTZ y FeCl^3 en una relación de 10:1:1 del acetato, el TPTZ y el FeCl^3 respectivamente. Fue utilizado Sulfato Ferroso (FeSO_4) como sustancia reductora de referencia (13.9 mg de FeSO_4 en 10 mL del preparado de HCl). Para la curva control, cuya linealidad fue cercana a 1 se prepararon las siguientes concentraciones de FeSO_4 : 0, 10, 20, 30, 40 y 50 $\mu\text{mol Fe(II)/L}$, tomando 30 μL de cada concentración, y adicionando 900 μL de FRAP y 90 μL de agua destilada, la mezcla reposó 10 minutos en un baño de agua de

37°C. En una microplaca se vertieron 200 µL de cada concentración, utilizando cuatro pozos de la microplaca por triplicado, y fueron leídos a 593 nm usando un lector de microplacas (Power Wave XS UV-Biotek, software KC Junior, USA) utilizando agua como blanco. La lectura de las muestras se realizó mezclando 30 µL de muestra de extracto de yogurt o de la fracción bioaccesible; se adicionaron 900 µL de FRAP y 90 µL de agua destilada. La mezcla reposó 10 minutos en un baño de agua de 37°C. fueron leídos usando agua como blanco. La actividad antioxidante fue expresada en micromoles de hierro (II) por 100 gramos (µmol Fe (II)/100 g).

5.14 Análisis estadístico

Todas las muestras se realizaron en tres lotes independientes, y las determinaciones fueron evaluadas por triplicado (n=9). Los resultados se expresaron como media ± desviación estándar (DE), y se analizaron mediante el modelo unidireccional de varianza (ANOVA por sus siglas en inglés). Las diferencias entre las medias se compararon utilizando una prueba Duncan, con un nivel de significancia de $p < 0.05$, usando el paquete estadístico SPSS versión 15.0 (SPSS® para Windows™, Chicago, Illinois).

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Propiedades fisicoquímicas

6.1.1 pH y acidez titulable

Los ácidos alimentarios más comunes son los ácidos orgánicos, como el ácido málico, ácido láctico, entre otros, los cuales conforman la acidez en un alimento (Tyl y Sadler, 2017) y juega un papel importante en la acidez en productos fermentados como el yogurt (Lee y Lucey, 2010), ya que propiedades físicas como sabor, color, estabilidad microbiana y calidad de conservación del alimento dependen enteramente de la fermentación láctica durante la elaboración del yogurt (Tyl y Sadler, 2017). Los resultados de la prueba de pH y acidez titulable se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Valores de pH y acidez titulable de las muestras de yogurt

Muestras	pH	AT (%)
NAT	4.16 ± 0.01 ^c	0.87 ± 0.05 ^a
COL	4.41 ± 0.04 ^a	0.63 ± 0.00 ^b
RZ	4.32 ± 0.09 ^b	0.54 ± 0.00 ^d
RZU	4.36 ± 0.11 ^{ab}	0.60 ± 0.05 ^c
COM	4.19 ± 0.05 ^c	0.63 ± 0.00 ^b

^{a-d} Letras superíndices diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las muestras. AT: Acidez Titulable. NAT: Yogurt Natural. COL: Yogurt con Colorante. RZ: Yogurt con Residuo de Zarzamora. RZU: Yogurt con Residuo de Zarzamora Ultrasonificado. COM: Yogurt Comercial.

Todas las muestras se mantuvieron dentro de los parámetros establecidos por las normas oficiales para pH (<4.5) (NMX-F-444-1983) y acidez (>0.5%) (NOM-181-SCFI-2010), presentando en pH un promedio de 4.28, siendo la muestra con COL (4.41) la que mostró el mayor valor significativamente con respecto al yogurt NAT, COM y con RZ. En la acidez titulable se obtuvieron porcentajes de 0.54 a 0.87%; en este parámetro el yogurt NAT tuvo el valor más alto ($p < 0.05$) comparado con las otras muestras. Gonzalez *et al.* (2011) reportó altos valores para pH y acidez titulable en muestras de yogurt natural elaboradas con leche descremada, estos

disminuyeron al combinar el yogurt con un fruto, similar a lo obtenido en el yogurt NAT al adicionar el RZ. Dicho resultado podría estar relacionado a cantidades ligeramente más altas de proteína láctea en el yogurt natural, en comparación con las muestras adicionadas con fruta.

6.1.2 Capacidad de retención de agua y viscosidad

La industria alimentaria ha optado por el empleo de gomas (polisacáridos) como aditivo, debido a sus propiedades funcionales como estabilizante, espesante, por su habilidad de retención de agua y como emulsificador. En la Tabla 7 se pueden observar los resultados obtenidos de la capacidad de retención de agua y la viscosidad de las muestras de yogurt.

Tabla 7. Capacidad de retención de agua y viscosidad de las muestras de yogurt

Muestras	CRA (%)	Viscosidad (cP)
NAT	22.87 ± 0.57 ^c	120.00 ± 0.00 ^d
COL	17.52 ± 0.83 ^d	77.78 ± 6.67 ^e
RZ	23.71 ± 0.52 ^c	143.33 ± 15.81 ^c
RZU	27.97 ± 0.44 ^b	200.00 ± 8.66 ^b
COM	45.88 ± 3.80 ^a	305.56 ± 18.10 ^a

^{a-d} Letras superíndices diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las muestras. CRA: Capacidad de Retención de Agua. NAT: Yogurt Natural. COL: Yogurt con Colorante. RZ: Yogurt con Residuo de Zarzamora. RZU: Yogurt con Residuo de Zarzamora Ultrasonificado. COM: Yogurt Comercial.

La muestra COM fue significativamente mayor en CRA y viscosidad comparado con las otras muestras, seguido por el yogurt con RZU. Se observa que al adicionar el residuo de zarzamora en los yogures también incrementa la CRA y la viscosidad, ya que las muestras con RZU y con RZ presentaron valores altos con respecto a las muestras con COL y NAT. Un comportamiento similar fue observado en un yogurt adicionado a diferentes concentraciones con fibra de calabaza, presentando mayor viscosidad y retención de agua al aumentar la cantidad de fibra de calabaza añadida (Bakirci *et al.* 2017). Se vio aumento en la CRA y viscosidad del yogurt con RZU en

comparación con la muestra con RZ. Esto pudo deberse al tratamiento de ultrasonido, que pudo generar la ruptura y la liberación de material celular, como fibra soluble, debido a la acción de las burbujas de cavitación (Li *et al.* 2014), los cuales pudieron aumentar la capacidad de hidratación del alimento (Toma *et al.* 2001). Los altos valores de CRA y viscosidad en el yogurt COM pudieron deberse a la adición directa de pectina a la formulación de este yogurt, ya que La pectina es un tipo de fibra soluble presente en frutas y es utilizada en la industria alimentaria como gelificante, espesante, emulsificante y por su capacidad de retención de agua, para evitar la formación de sinéresis en ciertos alimentos, como en el yogurt (Elleuch *et al.* 2011), aumentado también la viscosidad en el alimento al que sea añadido (Gad *et al.* 2015; Bakirci *et al.* 2017). En un estudio de residuo de zarzamora mencionan que el residuo de zarzamora ultrasonificado presenta un 44.26% de fibra total, de los cuales 38.35% es fibra insoluble y 5.90% fibra soluble (Zafra, *et al.* 2018), por lo que la adición del RZ puede mejorar las propiedades tecnológicas y nutricionales del yogurt, sin necesidad de utilizar aditivos estabilizantes, como la pectina.

La combinación del residuo de zarzamora con el yogurt, puede aumentar el consumo de fibra, que a su vez podría contribuir en la prevención de trastornos del intestino grueso como estreñimiento, diverticulitis y cáncer de colon (Mudgil y Barak, 2013). Venancio *et al.* (2018) menciona que pacientes con estreñimiento crónico mejoraron su estado en frecuencia de evacuaciones, consistencia y forma de las heces tras consumir 5 g de fibra, mostrando que un mayor consumo de fibra está asociado a una menor incidencia en enfermedades crónicas como enfermedad cardiovascular, diabetes tipo 2, e incluso tiene efecto sobre el peso corporal (Dahl, y Stewart, 2015).

6.1.3 Color

El color es el primer atributo que los consumidores evalúan en los alimentos, ya que se encuentra estrechamente relacionado con factores de calidad como frescura, madurez, variedad y seguridad alimentaria, así como con la parte visual (Giusti y Wrolstad, 2003; Wu *et al.* 2013).

En la Figura 8 se puede observar el color de las muestras de yogurt. El color del yogurt natural fue blanco; las muestras con COL, con RZ y con RZU fueron de color morado, mientras que la muestra COM se observó rosa pálido.

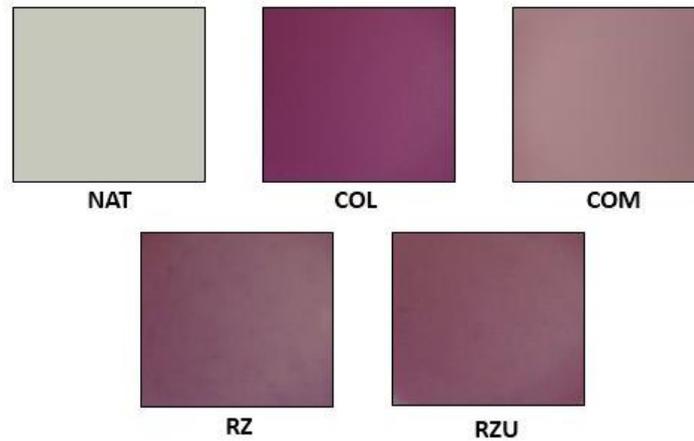


Figura 8. Colores de las muestras de yogurt. NAT: Yogurt Natural. COL: Yogurt con Colorante. COM: Yogurt Comercial. RZ: Yogurt con Residuo de Ziziphora. RZU: Yogurt con Residuo de Ziziphora Ultrasonicado.

Los valores obtenidos de coordenadas de Luminosidad (L), verde (-), rojo (+) (a^*), azul (-), amarillo (+) (b^*), cromaticidad (C) y grados hue (h°), que indican las características colorimétricas de los alimentos analizados, se pueden observar en la Tabla 8.

Tabla 8. Parámetros de color de las muestras de yogurt

Muestras	L^*	a^*	b^*	C	h°
NAT	67.93 ± 0.69^a	-1.65 ± 0.05^c	5.54 ± 0.03^a	5.76 ± 0.07^c	-73.42 ± 0.50^e
COL	38.01 ± 2.33^e	15.85 ± 1.36^a	-5.77 ± 0.55^e	16.81 ± 1.52^a	-20.01 ± 0.52^d
RZ	45.67 ± 1.64^d	9.42 ± 0.41^b	0.14 ± 0.02^b	9.43 ± 0.41^b	0.86 ± 0.13^a
RZU	49.26 ± 1.08^c	8.59 ± 0.74^b	-1.48 ± 0.14^d	8.87 ± 0.65^b	-9.76 ± 1.30^c
COM	61.57 ± 0.28^b	8.67 ± 0.96^b	-0.61 ± 0.09^c	8.66 ± 0.92^b	-1.37 ± 0.17^b

^{a-e} Letras superíndices diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las muestras. NAT: Yogurt Natural. COL: Yogurt con Colorante. RZ: Yogurt con Residuo de Ziziphora. RZU: Yogurt con Residuo de Ziziphora Ultrasonicado. COM: Yogurt Comercial.

El yogurt NAT presentó un valor para luminosidad (negro-blanco) de 67.93 (Tabla 8), que comparando con las otras muestras de yogurt fue alto significativamente y se puede apreciar en la Figura 9, donde se observa que esta muestra es la más cercana a 100, comparada con las otras muestras; esto es debido a que no contiene ningún fruto o colorante añadido. Tseng y Zhao (2013) mencionan que los valores de luminosidad del yogurt natural disminuyen al adicionar mayor porcentaje de pulpa de uva al yogurt debido al color de la pulpa, lo que concuerda con lo obtenido en este estudio. El color de la muestra NAT puede ser atribuido al color de la leche, que es generado por los glóbulos de grasa, las micelas de caseína y el fosfato de calcio coloidal, responsables de la dispersión de la luz y de la blancura de la leche y sus subproductos (Mathias y Ah, 2014).

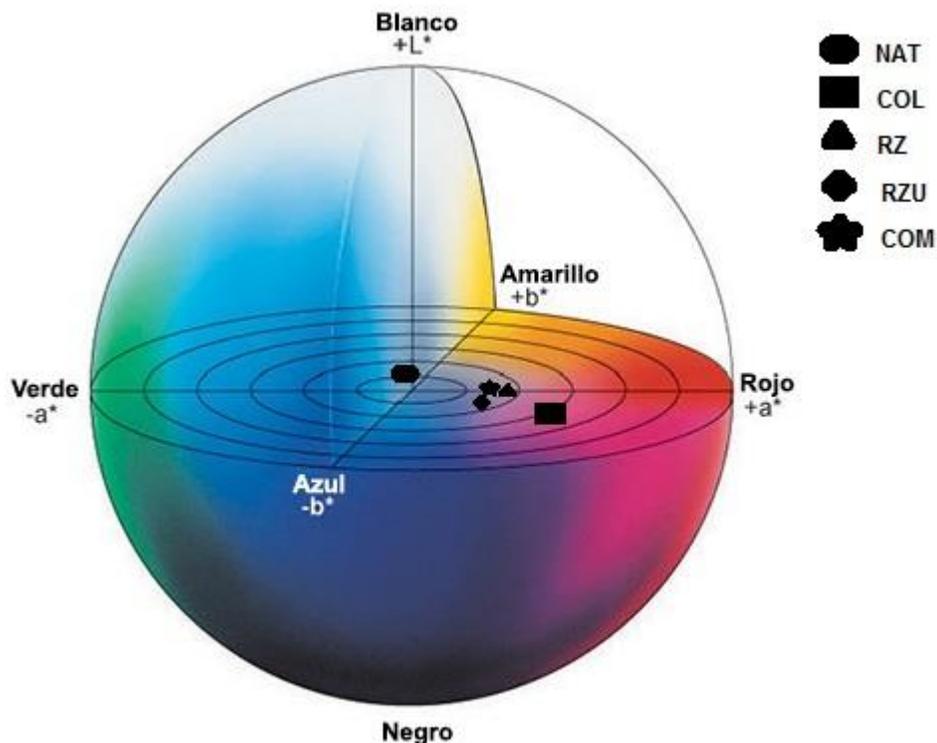


Figura 9. Diagrama de las coordenadas de color de las muestras de yogurt. NAT: Yogurt Natural. COL: Yogurt con Colorante. RZ: Yogurt con Residuo de Zarzamora. RZU: Yogurt con Residuo de Zarzamora Ultrasonificado. COM: Yogurt Comercial.

En la coordenada a^* (Figura 9), el yogurt con COL fue mayor significativamente con respecto a las otras muestras, mientras que en la coordenada b^* fue el yogurt NAT

(Tabla 8). El color de las muestras con COL y COM pudo ser debido a los colorantes artificiales añadidos; mientras que los yogures adicionados con residuo de zarzamora obtuvieron este color a la presencia de los pigmentos naturales de la fruta (antocianinas). El tratamiento de ultrasonido aplicado al residuo de zarzamora, pudo generar mayor liberación de compuestos de antocianina (Tiwari *et al.* 2009), lo cual podría relacionarse a la tendencia del color azul que presenta la muestra (Figura 9), ya que las antocianinas son azul - violeta cuando los valores de pH en el alimento son mayores a 3 (Fang y Bhandari, 2011) y, como se observa en la Tabla 6 las muestras adicionadas con residuo de zarzamora presentaron valores de pH de 4. Para el nivel de cromaticidad (*C*), las muestras presentaron valores entre 5.76 y 16.81, siendo el más alto ($p < 0.05$) el yogurt con COL entre las muestras (Tabla 8). En un estudio realizado por Cevallos y Cisneros (2004), mencionan que la adición de los colorantes rojo (FDyC Red No. 40 [allura red]) y azul (FDyC Blue No. 1 [brillant blue]) aumentan la saturación de color en los alimentos, comportamiento similar a la muestra con COL.

En cuanto a la tonalidad o grados *hue* (h°) todas las muestras presentaron valores negativos (-73.42 a -1.37), con excepción del yogurt con RZ (0.86), que tuvo valores altos significativamente (Tabla 8). El residuo de zarzamora es rico en antocianinas y puede ser una opción natural de color para algunos alimentos ya que son pigmentos naturales encontrados en plantas y frutas que han sido consumidos durante siglos como colorantes en alimentos o como medicina alternativa por su actividad antiinflamatoria, antidiabética, antimicrobiana y anticancerígena, sin mostrar efectos adversos de su consumo sobre la salud (Genskowsky *et al.* 2016). Mientras que los colorantes sintéticos adicionados a los alimentos son compuestos orgánicos de estructura química compleja, cuya digestión puede derivar en la liberación de aminas aromáticas al organismo, que pueden causar efectos secundarios como dolores de cabeza e hiperactividad (Siqueira *et al.* 2015).

6.2 Calidad microbiológica

Durante la elaboración del yogurt, se produce un pH bajo, la liberación de ácidos orgánicos, dióxido de carbono, peróxido de hidrógeno, bacteriocinas, etanol y diacetilo; el agotamiento de los nutrientes; y la competencia por espacio habitable disponible, que limitan el crecimiento de microorganismos patógenos (Adolfsson *et al.* 2004), por ende, hacen de este un alimento con bajo riesgo de contaminación (Marco *et al.* 2017). Los resultados de las pruebas de microbiología (mesófilos aerobios, enterobacterias y bacterias ácido lácticas) de las muestras de yogurt se aprecian en la Tabla 9.

Tabla 9. Microbiología de las muestras de yogurt

Muestras	MA (Log ¹⁰ UFC/mL)	BAL (Log ¹⁰ UFC/mL)	EB (Log ¹⁰ UFC/mL)
NAT	6.88 ± 0.05 ^a	6.59 ± 0.06 ^b	ND
COL	6.60 ± 0.09 ^{bc}	6.53 ± 0.11 ^b	ND
RZ	6.57 ± 0.14 ^c	6.57 ± 0.32 ^b	1.83 ± 0.16
RZU	6.68 ± 0.07 ^b	6.86 ± 0.07 ^a	ND
COM	6.40 ± 0.17 ^d	6.26 ± 0.20 ^c	ND

^{a-c} Letras superíndices diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las muestras. MA: Mesófilos Aerobios. BAL: Bacterias Ácido Lácticas. EB: Enterobacterias. NAT: Yogurt Natural. COL: Yogurt con Colorante. RZ: Yogurt con Residuo de Zarzamora. RZU: Yogurt con Residuo de Zarzamora Ultrasonificado. COM: Yogurt Comercial. ND: No Detectado.

Las mediciones de mesófilos aerobios y bacterias ácido lácticas de todas las muestras dieron como resultado valores de 6.40 a 6.88 y 6.26 a 6.86 Log¹⁰ UFC/g respectivamente, mostrando altos valores significativamente el yogurt NAT para mesófilos aerobios y el yogurt con RZU para bacterias ácido lácticas.

El recuento de mesófilos aerobios puede usarse como referente a las condiciones higiénico sanitarias de algunos alimentos (Ray y Bhunia, 2008), sin embargo, los

resultados obtenidos de mesófilos aerobios, pueden ser atribuidos a la presencia de los cultivos lácticos utilizados para la elaboración de las muestras de yogurt, porque en el análisis de mesófilos aerobios también cuantifica microorganismos como el *S. thermophilus* (Sfakianakis y Tzia, 2014). Por lo que los valores obtenidos de mesófilos aerobios podrían representar totalmente bacterias ácido lácticas, ya que estas presentaron valores similares con respecto a recuento de mesófilos aerobios.

De acuerdo con la Norma Oficial Mexicana (NOM-181-SCFI-2010), el yogurt debe contener como mínimo $2.03 \text{ Log}^{10} \text{ UFC/g}$ de cultivos lácticos viables, por lo que todas las muestras cumplen con lo establecido por esta legislación.

En un estudio realizado de un yogurt con melaza de uva, éste presentó un contenido de bacterias mesófilas aerobias de $5.87 \text{ log}^{10} \text{ UFC/g}$ (Tarakçı y Küçüköner, 2003), mientras que otro adicionado con fruta de espino, tuvo $5.7 \text{ log}^{10} \text{ UFC/g}$ de *S. thermophilus* (Selvamuthukumaran y Farhath *et al.* 2014), valores menores a lo obtenido en el presente trabajo en las muestras adicionadas con residuo de zarzamora. Estos resultados podrían estar relacionados a la cantidad de azúcares disponibles en el yogurt (Fernandez y Murette, 2017). Por otro lado, Bakirci *et al.* (2017) obtuvo un aumento de bacterias ácido lácticas al incrementar la cantidad de fibra de calabaza (de 8.25 a $8.39 \text{ Log}^{10} \text{ UFC/g}$), y fue atribuido a los componentes prebióticos presentes en la fibra dietética no digerible del alimento (Ozcan y Kurtuldu, 2014).

Como se mencionó anteriormente, el yogurt con RZU fue la muestra que tuvo los más altos valores de BAL, este resultado pudo estar relacionado a la disponibilidad de algunos nutrientes en el residuo de zarzamora ultrasonificado, como hidratos de carbono, ya que un estudio realizado por Sindhu *et al.* (2013), menciona que el ultrasonido aumenta el área de superficie accesible rompiendo partículas, y los hidratos de carbono complejos pueden ser hidrolizado más fácilmente por acción enzimática o microbiana. El yogurt con RZ fue la única muestra que tuvo presencia de enterobacterias, con un valor de $1.83 \text{ Log}^{10} \text{ UFC/g}$. Esto pudo deberse a la contaminación del residuo de zarzamora, por la manipulación durante su proceso de elaboración (Ray y Bhunia, 2008). La NMX-F-444-1983 menciona que el yogurt debe

contener menos de 1.0 Log^{10} UFC/g de organismos coliformes para su consumo, por lo que la muestra con RZ no cumple con lo establecido por la norma.

Se observó que el tratamiento de ultrasonido aplicado al residuo de zarzamora antes de su adición al yogurt, resultó efectivo en la eliminación de enterobacterias, ya que en la muestra con RZU no se encontró la presencia de dichos microorganismos. Esto es consecuencia del tratamiento de ultrasonido, que es un método que inactiva microorganismos en los alimentos (Juraga *et al.* 2011), debido al adelgazamiento de las membranas celulares microbianas por el efecto de cavitación (Tiwari, 2015; Cassani *et al.* 2017). Como se mencionó al principio, los alimentos fermentados poseen bajo riesgo de contaminación (Adolfsson *et al.* 2004) debido a ello no existió presencia de microorganismos patógenos en el resto de las muestras. Tongtawee *et al.* (2015) en la terapia para la erradicación de *Helicobacter pylori*, encontró un valor significativamente mayor de erradicación en el grupo suplementado con yogurt (90.8%) que en el grupo con placebo (84.3%). Por lo que se puede decir que el consumo de yogurt, puede disminuir o evitar padecimientos intestinales, como úlcera péptica, gastritis crónica, adenocarcinoma gástrico y linfoma de tejido linfoide asociado a la mucosa (Adolfsson *et al.* 2004), provocados por infección microbiana, como la causada por *Helicobacter pylori* (Nair *et al.* 2016).

6.3 Capacidad antioxidante

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) son moléculas más reactivas que el oxígeno en su estado basal de triplete, que pueden ser las que se producen por la ruptura del oxígeno (oxígeno atómico, ozono, etc.) y las parcialmente reducidas (anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo) (Cárdenas y Pedraza, 2005). Los antioxidantes previenen que agente oxidante reaccione con las células o con otras moléculas del cuerpo (Chemat *et al.* 2017).

6.3.1 Contenido de fenoles totales y antocianinas

Los compuestos fenólicos (CFT) y las antocianinas pueden actuar como antioxidantes debido a su habilidad para donar electrones (Oliveira *et al.* 2015; Muniandy *et al.* 2016). Como se observa en la Figura 10a, el yogurt con RZU fue la única muestra con contenido fenólico (0.36 mg EAG/100g), lo cual pudo deberse al tratamiento de ultrasonido que recibió el residuo de zarzamora antes de su adición al yogurt. Sin embargo, no se observaron diferencias en antocianinas, mostrando valores de 0.10 y 0.11 mg Cy-3-GI/100g para la muestra con RZ y con RZU, respectivamente (Figura 10b).

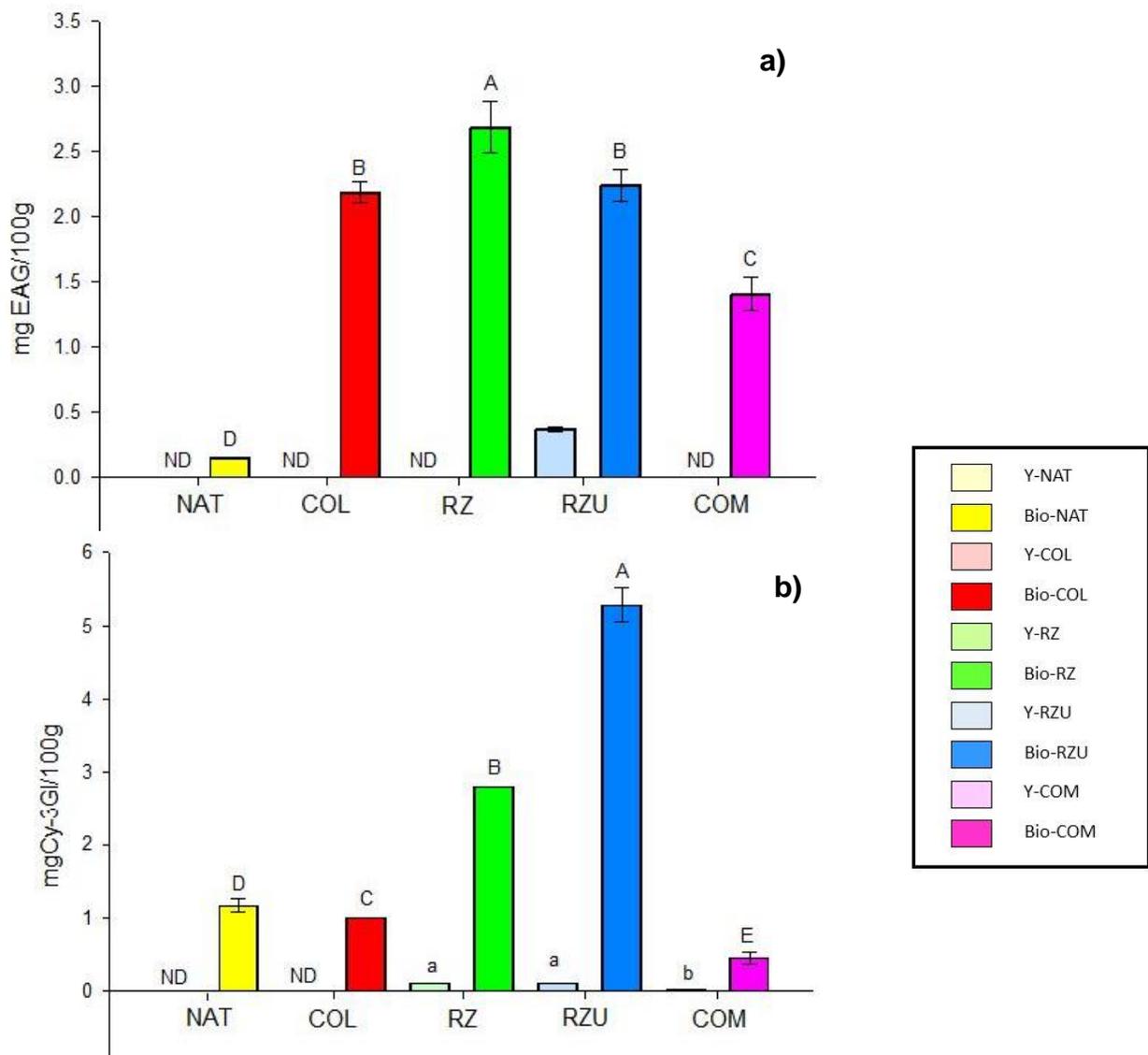


Figura 10. Compuestos fenólicos totales y antocianinas en el yogurt y la fracción bioaccesible. **a)** Contenido de fenoles totales y **b)** contenido de antocianinas presentes en las muestras de yogurt. ^{a-b} Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) en muestras de yogurt. ^{A-C} Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) en las muestras después de la digestión in vitro. mg EAG: miligramos equivalentes de ácido gálico. mg Cy – 3 – Gl: miligramos de Cianidín – 3 – Glucósido. NAT: Yogurt Natural. COL: Yogurt con Colorante. RZ: Yogurt con Residuo de Zarzamora. RZU: Yogurt con Residuo de Zarzamora Ultrasonificado. COM: Yogurt Comercial. ND: No Detectado. BIO: Fracción bioaccesible.

Cassani *et al.* (2018) menciona que aquellos compuestos fenólicos (entre ellos las antocianinas) que no pueden ser detectados en la matriz del alimento, pueden liberarse durante la digestión en el intestino delgado, lo cual pudo ser comprobado después de la prueba de bioaccesibilidad *in vitro*, ya que existió contenido de fenoles y antocianinas en todas las muestras.

Para CFT se presentaron valores de 0.15 a 2.68 mg EAG/100g, el yogurt con RZU incrementó 6 veces su contenido (de 0.36 a 2.23 mg EAG/100g), sin embargo, el yogurt con RZ (2.68 mg EAG/100g) fue el que tuvo el valor mayor significativamente con respecto a las demás muestras. Este incremento de CFT en la muestra con RZ pudo deberse a la liberación de los compuestos fenólicos unidos a complejos de alto peso molecular presentes en el residuo, mediante la hidrólisis enzimática generada por la acción de lipasa y pancreatina (Jenner *et al.* 2005; Bouayed *et al.* 2011; Oliveira *et al.* 2015; Cassani *et al.* 2018).

En cuanto al yogurt con RZU, este pudo sufrir la oxidación durante la digestión de algunos compuestos fenólicos libres en el alimento (Scalbert *et al.* 2002), debido a que los antioxidantes mantienen el equilibrio de óxido reducción de compuestos en el tracto gastrointestinal, previniendo el estrés oxidativo causado por la generación de radicales libres durante los procesos de digestión (Bouayed *et al.* 2011).

No se observaron diferencias significativas en la prueba de compuestos fenólicos después de la digestión *in vitro* entre la muestra con COL y con RZU, sin embargo, como se mencionó anteriormente, los colorantes artificiales pueden generar daño a la salud, por lo que el consumo de un yogurt adicionado con RZU, rico en compuestos fenólicos y antocianinas, puede ser una mejor opción que el yogurt adicionado con colorantes artificiales.

Sólo las muestras RZ, RZU y COM presentaron valores para antocianinas antes de la digestión *in vitro*, contenido que aumentó significativamente durante la digestión, presentándose valores entre 0.44 y 5.29 mg CY-3GI/100g. Un comportamiento similar se observó en un yogurt adicionado con jugo de fresa, donde el contenido de antocianinas aumentó después de la digestión, debido a la acción de las enzimas presentes en el intestino (Oliveira *et al.* 2015).

El yogurt con RZU tuvo altos valores ($p < 0.05$) con respecto a las otras muestras, aumentando casi 50 veces respecto a su contenido original. El proceso de ultrasonicado al que fue sometido el residuo de zarzamora resultó efectivo en la liberación de antocianinas, los cuales posiblemente se encontraba unidos a la fibra dietética o proteínas del alimento (Bouayed *et al.* 2011).

Cabe mencionar que la fracción no absorbida en intestino delgado puede llegar a colon unida a otros metabolitos, como fibra dietética, ser metabolizados por la microbiota intestinal y ser posteriormente absorbidos (Saura *et al.* 2011).

El consumo de compuestos fenólicos, como los presentes en el yogurt adicionado con residuo de zarzamora y residuo de zarzamora ultrasonicado, al ser absorbidos pueden contribuir en la reducción del peso y el índice de masa corporal, la circunferencia de cintura, la presión arterial, y los niveles de lipoproteínas de baja densidad, colesterol y sustancias reactivas (Georgakouli *et al.* 2016), debido a que todos los polifenoles son capaces de eliminar los radicales libres y proteger los constituyentes celulares contra el daño oxidativo, previniendo enfermedades degenerativas, como cáncer, enfermedades cardiovasculares (Scalbert *et al.* 2002). Por ello, se recomienda un consumo de 1 g/día para CFT (Scalbert *et al.* 2000) y 180 mg/día de antocianinas (Cöisson *et al.* 2005).

6.3.2 Actividad antioxidante por inhibición de los radicales ABTS•+, DPPH y FRAP

Fueron utilizadas tres metodologías (ABTS•+, DPPH y FRAP) para determinar la actividad antioxidante de las muestras de yogurt. Los datos obtenidos de la actividad antioxidante por estos métodos antes y después de la bioaccesibilidad intestinal *in vitro* de las muestras de yogurt se expresan en la Tabla 10.

Tabla 10. Actividad antioxidante antes y después de la Bioaccesibilidad intestinal *in vitro* de las muestras de yogurt

Muestras	ABTS ($\mu\text{mol EAA}/100\text{g}$)		DPPH ($\mu\text{mol ET}/100\text{g}$)		FRAP ($\mu\text{mol FE[II]}/100\text{g}$)	
	Antes	Después	Antes	Después	Antes	Después
NAT	$0.59 \pm 0.05^{\text{d}}$	$13.03 \pm 0.38^{\text{C}}$	$5.66 \pm 0.30^{\text{d}}$	$165.33 \pm 84.85^{\text{C}}$	$0.06 \pm 0.01^{\text{d}}$	$0.13 \pm 0.00^{\text{E}}$
COL	$0.65 \pm 0.02^{\text{c}}$	$11.28 \pm 0.55^{\text{D}}$	$6.68 \pm 0.68^{\text{c}}$	$44.36 \pm 39.60^{\text{E}}$	$0.06 \pm 0.00^{\text{d}}$	$0.43 \pm 0.05^{\text{C}}$
RZ	$0.92 \pm 0.06^{\text{b}}$	$13.60 \pm 0.62^{\text{B}}$	$11.77 \pm 0.51^{\text{b}}$	$213.54 \pm 66.06^{\text{A}}$	$0.24 \pm 0.00^{\text{b}}$	$1.24 \pm 0.02^{\text{B}}$
RZU	$1.43 \pm 0.08^{\text{a}}$	$19.45 \pm 0.06^{\text{A}}$	$15.79 \pm 0.53^{\text{a}}$	$196.18 \pm 83.45^{\text{B}}$	$0.26 \pm 0.02^{\text{a}}$	$1.37 \pm 0.06^{\text{A}}$
COM	$0.60 \pm 0.06^{\text{cd}}$	$13.41 \pm 0.29^{\text{BC}}$	ND	$150.69 \pm 90.56^{\text{D}}$	$0.09 \pm 0.00^{\text{c}}$	$0.35 \pm 0.02^{\text{D}}$

^{a-d} Letras superíndices diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.5$) en las muestras antes de la digestión *in vitro*. ^{A-E} Letras superíndices diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.5$) en las muestras después de la digestión *in vitro*. NAT: Yogurt Natural. COL: Yogurt con Colorante. RZ: Yogurt con Residuo de Zarzamora. RZU: Yogurt con Residuo de Zarzamora. COM: Yogurt Comercial. ND: No Detectado.

Las muestras de yogurt presentaron valores de 0.59 a 1.43 $\mu\text{mol EAA}/100\text{g}$ para ABTS, 5.66 a 15.79 $\mu\text{mol ET}/100\text{g}$ para DPPH, y para FRAP 0.06 a 0.26 $\mu\text{mol Fe [II]}/100\text{g}$, siendo la muestra con RZU significativamente mayor en las pruebas de ABTS, DPPH y FRAP, comparado con las otras muestras. Este resultado pudo estar relacionado al tratamiento de ultrasonido del residuo de zarzamora, ya que en un estudio realizado por Romero y Yépez (2015) mostró una liberación cuatro veces más de antioxidantes debido al tratamiento de ultrasonido, en comparación a las muestras no tratadas. Además, estudios mencionan que existe un aumento significativo de la actividad antioxidante del yogurt al añadir productos con alto contenido en fenoles (Gad *et al.* 2015; Muniandy *et al.* 2016; Citta *et al.* 2017).

Las propiedades antioxidantes de los compuestos fenólicos están vinculadas a su estructura (Dudonné *et al.* 2009), ya que los fenoles están compuestos por uno o más anillos aromáticos que llevan uno o más grupos hidroxilo (Genskowsky *et al.* 2016), estos son capaces de estabilizar radicales libres, al atrapar especies de oxígeno reactivo, reaccionan con radicales libres como los de ABTS, DPPH y FRAP, con lo cual se forman radicales estables (Gad *et al.* 2015; Eghbaliferiz *et al.* 2016).

Además, los péptidos derivados de la caseína y las proteínas de suero presentes en el yogurt, poseen propiedades antioxidantes, a través de eliminación de radicales libres, quelación de metales preoxidantes y / o inactivación de especies reactivas a oxígenos (Yuan *et al.* 2018), que posiblemente también contribuyeron en la actividad antioxidante de las muestras de yogurt.

Después de la digestión intestinal *in vitro*, todos los valores se vieron incrementados, con valores de 11.28 a 19.45 $\mu\text{mol EAA}/100\text{g}$ para ABTS, 44.36 a 213.54 $\mu\text{mol ET}/100\text{g}$ para DPPH y 0.13 a 1.37 para FRAP. El yogurt RZU fue el mayor significativamente para ABTS y FRAP, mientras que para DPPH, el mayor fue la muestra con RZ. El aumento de la capacidad de eliminación de radicales después de la fase intestinal, es atribuido a los compuestos fenólicos presentes en el alimento, ya que la actividad secuestrante de radicales de los polifenoles aumenta debido al pH alcalino del intestino, por la desprotonación de los restos hidroxilo presentes en los anillos aromáticos de estos compuestos (Tagliazucchi *et al.* 2010; Bouayed *et al.* 2011; Lamothe *et al.* 2014). Ramírez *et al.* (2017), midió la actividad antioxidante

después de la digestión *in vitro* de un jugo de zarzamora tratado a diferentes condiciones de amplitud y tiempo de ultrasonido, encontrando mayor actividad antioxidante en las muestras ultrasonicadas que en la muestra control; pudiendo deberse a la liberación los átomos de hidrógeno presentes en los compuestos fenólicos, los cuales pudieron contribuir con el aumento de su actividad antioxidante (Roginsky y Lissi, 2005), sin embargo, para DPPH, se encontró que la muestra con RZ fue mayor con respecto a las demás, como se presentó en la prueba de contenido de fenoles (Scalbert *et al.* 2002), por lo que se podría decir que los resultados pudieron estar relacionados con la oxidación de los fenoles libres del alimento durante la digestión; esto es debido a que los antioxidantes mantienen el equilibrio de óxido reducción de compuestos en el tracto gastrointestinal, previniendo el estrés oxidativo causado por la generación de radicales libres durante los procesos de digestión (Bouayed *et al.* 2011).

En el cuerpo humano, el equilibrio oxido-reducción puede prevenir enfermedades del tracto gastrointestinal relacionadas con la generación de especies de oxígeno reactivo (ROS) durante los procesos de digestión (Bouayed *et al.* 2011), evitando situaciones de estrés metabólico (Prior *et al.* 2015) como accidentes cerebrovasculares, diabetes y cáncer (Kaume *et al.* 2012). Alimentos con alto contenido en polifenoles, como la zarzamora, tienen impacto directo en la mucosa intestinal, protegiéndola contra especies reactivas y contra la acción de algunos carcinógenos (Scalbert *et al.* 2002). Por ejemplo, en un modelo de rata suplementada con resveratrol redujo significativamente la incidencia de tumores de colon en las ratas alimentadas con resveratrol en comparación con las ratas control (Sengottuvelan y Nalini, 2006). Por lo anterior, el consumo de un yogurt adicionado con compuestos antioxidantes, como el yogurt con RZ o con RZU, podrían ser una opción para el consumo de compuestos antioxidantes, pudiendo así evitarse situaciones de estrés metabólico que pudieran derivar en enfermedades.

VII. CONCLUSIONES

El residuo de zarzamora ultrasonicado podría ser utilizado como aditivo en la industria láctea, pudiendo ser una opción para la reducción de aditivos artificiales añadidos a los productos.

- ❖ La adición del residuo de zarzamora (RZ y RZU) al yogurt no afectó el valor de pH (4.36) y acidez titulable (0.6%), manteniéndose dentro de lo establecido por la normativa oficial. Además, contribuyó al incremento la capacidad de retención de agua y la viscosidad del yogurt, a la vez que les confiere un agradable color violeta.
- ❖ Las muestras de yogurt evaluadas presentaron buena calidad microbiológica, reportada en los recuentos de mesófilos aerobios y de bacterias ácido lácticas, con excepción del yogurt RZ, que fue el único con presencia de enterobacterias. Sin embargo, el residuo ultrasonicado (RZU) demostró ser efectivo en la eliminación de estos microorganismos indeseables.
- ❖ El yogurt con RZU presentó valores mayores en contenido de fenoles totales (CFT), antocianinas y actividad antioxidante (ABTS, DPPH y FRAP) comparado con las otras muestras evaluadas.
- ❖ En la fracción bioaccesible, el yogurt con RZU fue significativamente mayor en antocianinas, ABTS y FRAP, pero el yogurt con RZ fue mayor para CFT y DPPH.

Con lo anterior, el residuo de zarzamora podría ser una alternativa para disminuir el uso de aditivos perjudiciales, y a la vez, proporcionar antioxidantes al yogurt como valor agregado.

VIII. REFERENCIAS

1. Abdullah, N. y Ling, C. N. 2014. Application of thermosonication treatment in processing and production of high quality and safe-to-drink fruit juices. *Agric Agric Sci Procedia*. 2: 320 – 327.
2. Adolfsson, O., Meydani, S. y Russell, R. 2004. Yogurt and gut function. *Am J Clin Nutr*. 80:245–256.
3. AOAC International. 2005. En: *Official Methods of Analysis*. 18th edition (ed) Horwitz, W. y Latimer, G.W. Rockville, USA.
4. Arts, M., Haenen, G., Wilms, L., Beetstra, S., Heijnen, C., Voss, H. y Bast, A. 2002. Interactions between flavonoids and proteins: effect on the total antioxidant capacity. *J Agric Food Chem*. 50: 1184-1187.
5. Badui, S. 2006. Aditivos. En: *Química de los Alimentos*. 4ta Edición. (ed) Quintanar, E. Grupo Herdez, S.A. de C.V. Pearson Educación, México. Pp: 507-546.
6. Bakirci, S., Dagdemir, E., Seracettin, B. O. y Adnan, A. H. 2017. The effect of pumpkin fibre on quality and storage stability of reduced-fat set-type yogurt. *Int J Food Sci Technol*. 52: 180–187.
7. Benzie I. y Strain J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *Anal Biochem*. 239(1): 70-76.
8. Bouayed, J., Hoffmann, L. y Bohn, T. 2011. Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake. *Food Chem*. 128: 14–21.
9. Briones, R. E. 2005. Proceso de elaboración de yogur y su presentación en página web. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. En: *Tesis en Ingeniería Agroindustrial*. pp: 8 – 10.
10. Caleja, C., Barros, L., Antonio, A., Carocho, M., Oliveira, B. y Ferreira, I. 2016. Fortification of yogurts with different antioxidant preservatives: A comparative study between natural and synthetic additives. *Food Chem*. 210: 262–268.
11. Carbonell, C. J., Buniowska, M., Barba, F., Esteve, M. y Frígola, A. 2014. Analytical methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables: a review. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 13: 155-171.

12. Cárdenas, N. y Pedraza, J. 2006. Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes: aspectos básicos. *Educación Química*. 17: 164 -173.
13. Cassani, L., Gerbinob, E., Moreiraa, M. y Gómez Z. A. 2018. Influence of non-thermal processing and storage conditions on the release of health-related compounds after in vitro gastrointestinal digestion of fiber enriched strawberry juices. *J Funct Foods*. 40: 128–136.
14. Cevallos, C. B. y Cisneros, Z. L. 2004. Stability of anthocyanin-based aqueous extracts of Andean purple corn and red-fleshed sweet potato compared to synthetic and natural colorants. *Food Chem*. 86: 69–77.
15. Chávez, J. 2004 Curso Principios bioactivos de plantas andinas y amazonicas del Perú. En: *Capacidad antioxidante de compuestos bioactivos*. Facultad de Ciencias, Departamento de Química. UNALM.
16. Chemat, F., Zill-e-Huma y Kamran, M. K. 2011. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrason Sonochem*. 18: 813-835.
17. Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A., Meullemiestre, A., Fabiano, T. A. y Abert, V. M. 2017. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrason Sonochem*. 34: 540–560.
18. Citta, A., Folda, A., Scalcon, V., Scutari, G., Bindoli, A., Bellamio, M., Feller E. y Rigobello, M. 2017. Oxidative changes in lipids, proteins, and antioxidants in yogurt during the shelf life. *Food Sci Nutr*. 5: 1079–1087.
19. Coisson, J., Travaglia F., Piana G., Capasso M. y Arlorio M. 2005. Euterpe oleracea juice as a functional pigment for yogurt. *Food Res Int*. 38: 893–897.
20. Dahl, W. y Stewart, M. 2015. Position of the academy of nutrition and dietetics: health implications of dietary fiber. *J Academ Nutr Diet*. 15: 1861-1870.
21. Delgado, O. L., Betanzos, C. G. y Sumaya, M. M. 2010. Importancia de los antioxidantes dietarios en la disminución del estrés oxidativo. *Invest Ciencia*. 50: 10-15.
22. Desobry, S., Vetier, N & Hardy, J. (1999) Health benefits of yogurt consumption. A review, *Int J Food Prop*, 2:1, 1-12.

23. Dolatowski, Z., Stadnik, J., y Stasiak, D. 2007. Applications of ultrasound in food technology. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.* 6: 89-99.
24. Downham, A. y Collins, P. 2000. Colouring our foods in the last and next millennium. *International J Food Sci Technol.* 35: 5-22.
25. Dudonné, S., Vitrac, X., Coutiere, P., Woillez, M. y Mérillon, J. 2009. A comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *J. Agric. Food Chem.* 57: 1768–1774.
26. Eghbaliferiz, S. y Iranshahi, M. 2016. Prooxidant activity of polyphenols, flavonoids, anthocyanins and carotenoids: updated review of mechanisms and catalyzing metals. *Phytother Res.* 30: 1379–1391.
27. Elleuch, M., Bedigian, D., Roiseux, O., Besbes, S., Blecker, C. y Attia, H. 2011. Dietary fibre and fibre-rich by-products of food processing: Characterisation, technological functionality and commercial applications: A review. *Food Chem.* 124: 411–421.
28. Fang, Z. y Bhandari, B. 2011. Effect of spray drying and storage on the stability of bayberry polyphenols. *Food Chem.* 129:1139–1147.
29. Fernandez, M. y Murette, A. 2017. Potential health benefits of combining yogurt and fruits based on their probiotic and prebiotic properties. *Adv Nutr.* 8(Suppl): 155S–164S.
30. Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura (FIRA). 2016. En: Panorama Agroalimentario. Berries. 4-34.
31. Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. 2001. Dietary reference intakes. Proposed definition of dietary fiber. En: *A report of the panel on the definition of dietary fiber and the standing committee on the scientific evaluation of dietary reference intakes.* Washington, DC: National Academy Press.
32. Gad, A., Ghita, E., El-Din, H., Badran, S. y El-Messery, T. 2015. Evaluation yogurt fortifier with vegetable and fruit juice as a natural sources of antioxidant. *International J Food Nutri Sci.* 4: 21-28.
33. Genskowsky, E., Puente, L., Pérez, A. J., Fernández, L. J., Muñoz, L. y Viuda, M. M. 2016. Determination of polyphenolic profile, antioxidant activity and antibacterial

properties of maqui [*Aristotelia chilensis* (Molina) Stuntz] a Chilean blackberry. *J Sci Food Agric.* 96: 4235–4242.

34. Georgakouli, K., Mpesios, A., Kouretas, D., Petrotos, K., Mitsagga, C., Giavasis, I. y Jamurtas, A. 2016. The effects of an olive fruit polyphenol-enriched yogurt on body composition, blood redox status, physiological and metabolic parameters and yogurt microflora. *Nutrients.* 8: 1-14. doi:10.3390/nu8060344.
35. Giusti, M. y Wrolstad, R. 2003. Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. *Biochem Eng J.* 14: 217–225.
36. Gonzalez, N., Adhikari, K. y Sancho, M. M. 2011. Sensory characteristics of peach-flavored yogurt drinks containing prebiotics and synbiotics. *Food Sci Technol.* 44:158-163.
37. Gyawali, R. y Ibrahim S. 2016. Effects of hydrocolloids and processing conditions on acid whey production with reference to Greek yogurt. *Trends Food Sci Technol.* 56: 61-76.
38. Hauser, C., Thielmann, J. y Muranyi, P. 2016. Organic acids: usage and potential in antimicrobial packaging. *Antimicrobial Food Packaging.* 563-580.
39. Harish, K. y Varghese, T. 2006. Probiotics in humans – evidence based review. *Calicut Medl J* 4: e3.
40. Hummer, K. E. y Janick, J. 2007 *Rubus* iconography: antiquity to the renaissance. *Acta Hort.* 759: 89–105.
41. Jakobek, L. 2015. Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins. *Food Chem.* 174: 556-567.
42. Jenner, M., Rafter, J. y Halliwell, B. 2005. Human fecal water content of phenolics: The extent of colonic exposure to aromatic compounds. *Free Radic Biol Med.* 38: 763–772.
43. Joyner, H. y Daubert, C. 2017. Rheological principles for food analysis. En: *Food Analysis.* 5th Edition. (ed) Nielsen, S. Springer, West Lafayette, Indiana, USA. Pp: 511-527.
44. Julkunen, R. T. 1985. Phenolic constituents in the leaves of Northern willows: Methods for the analysis of certain phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chem.* 33 (2): 213-217.

45. Juraga, E., Šalamon, B., Herceg, Z. y Jambrak, A. 2011. Application of high intensity ultrasound treatment on *Enterobacteriae* count in milk. *Mljekarstvo*. 61(2): 125-134.
46. Kaume, L., Howard, L. y Devareddy, L. 2012. The blackberry fruit: a review on its composition and chemistry, metabolism and bioavailability, and health benefits. *J Agric Food Chem*. 60: 5716–5727.
47. Kuskoski, E., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., Mancini, J. F. y Fett, R. 2005. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciencia Tecnol Alime*. 25: 726-732.
48. Lamothe, S., Azimy, N., Bazinet, L., Couillardc, C. y Britten, M. 2014. Interaction of green tea polyphenols with dairy matrices in a simulated gastrointestinal environment. *Food Funct*. 5: 2621–2631.
49. Lee, W. J. y Lucey, J. A. 2010. Structure and physical properties of yogurt gels: effect of inoculation rate and incubation temperature. *J. Dairy Sci*. 87: 3153–3164.
50. León, G. A., Auger, C. y Schini, K. V. 2015. Pro-oxidant activity of polyphenols and its implication on cancer chemoprevention and chemotherapy. *Biochem Pharmacol*. 98: 371–380.
51. Li, X., He, X., LV, Y. y He, Q. 2014. Extraction and functional properties of water-soluble dietary fiber from apple pomace. *J Food Proc Eng*. 37: 293–298.
52. Lin, M. y Yen, C. 1999. Reactive oxygen species and lipid peroxidation product-scavenging ability of yogurt organisms. *J Dairy Sci*. 82:1629–1634.
53. Majid, I., Ahmad, N. G. y Nanda, V. 2015. Ultrasonication and food technology: A review. *Cogent Food Agr*. 1: 1071022.
54. Marco, M., Heeney, D., Binda, S., Cifelli, C., Cotter, P., Foligne, B., Ganzle, M., Kort, R., Pasin, G., Pihlanto, A., Smid E. y Hutkins, R. 2017. Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond. *Curr Opin Biotechnol*. 44:94-102.
55. Mathias, R. K. y Ah, H. K. 2014. Color in food as a measurable quality criterion. *Agro Sur*. 42(2): 39-48.
56. Miller, D. D., Schricker, B. R., Rasmussen, R. R., y VanCampen, D. 1981. An in vitro method for estimation of iron availability from meals. *Am J Clin Nutr*. 34: 2248–2256.

57. Mudgil, D. y Barak, S. 2013. Composition, properties and health benefits of indigestible carbohydrate polymers as dietary fiber: A review. *International J Biol Macromol.* 61: 1– 6.
58. Muniandy, P., Shori, A. B. y Baba, A. S. 2016. Influence of green, white and black tea addition on the antioxidant activity of probiotic yogurt during refrigerated storage. *J Food Pack Shelf Life.* 8: 1-8.
59. Nair, M., Chouhan, D., Sen, G. S. y Chattopadhyay, S. 2016. Fermented foods: are they tasty medicines for helicobacter pylori associated peptic ulcer and gastric cancer. *Front Microbiol.* 7: 1-9.
60. Nardone, G. y Rocco, A. 2004. Probiotics: a potential target for the prevention and treatment of steatohepatitis. *J Clin Gastroenterol.* 38: S121-2.
61. NMX-F-444-1983. Alimentos. Yoghurt o leche búlgara. Foods. Yoghurt or bulgarian milk. Normas mexicanas. Dirección general de normas. En línea: <http://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-F-444-1983.PDF>. Fecha de consulta: 22/08/2017.
62. NOM-181-SCFI-2010 NORMA Oficial Mexicana NOM-181-SCFI-2010, Yogurt - Denominación, especificaciones fisicoquímicas y microbiológicas, información comercial y métodos de prueba.
63. http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5167303yfecha=16/11/2010. Fecha de consulta: 22/08/2017.
64. Oliveira, A., Alexandre, E., Coelho, M., Lopes, C., Almeida, D. y Pintado, M. 2015. Incorporation of strawberries preparation in yoghurt: Impact on phytochemicals and milk proteins. *Food Chem.* 171: 370–378.
65. Ozcan, T. y Kurtuldu, O. 2014. Influence of dietary fiber addition on the properties of probiotic yogurt. *Int J Chem Eng.* 5(5): 397-401.
66. Palafox, C. H., Ayala, Z. J. y González, A. G. 2011. The role of dietary fiber in the bioaccessibility and bioavailability of fruit and vegetable antioxidants. *Con Rev Food Sci.* 76(1): 6-15.
67. Parnell, E. C., Kakuda, Y., Mullen, K., Arnott, D. y deMan, J. 1986. physical properties of yogurt: a comparison of vat versus continuous heating systems of milk. *J Dairy Sci.* 69: 2593-2603.

68. Parra, H. R. 2012. Yogur en la salud humana. *Rev Lasallista de Investig.* 9(2): 162-177.
69. Pérez, H., y Vázquez, V. 2004. Zarzamora (*Rubus* spp), Su Cultivo y Producción en el Trópico Mexicano. En: *INFAP. Folleto Técnico.* (2): 1-32.
70. Peterson, G. 1979. Review of the Folin protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Anal Biochem.* 100(2): 201-220.
71. Polanco, T., Rodriguez, R. y Beaver, J. 1996. Microgotas: Método de inoculación con *Rhizoctonia solani Kühn* para evaluar genotipos de habichuela (*Phaseolus vulgaris L.*). *J. Agríc. Univ. P.R.* 80(3): 113 - 122.
72. Prior, R. 2015. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC): New horizons in relating dietary antioxidants/bioactives and health benefits. *J Funct Foods.* 18: 797–810.
73. Ramírez, M. E., Zafra, R. Q., Arias, R. J., Ariza, O. J., Alanís, G. E. y Cruz, C. N. 2018. Effect of ultrasound on microbiological load and antioxidant properties of blackberry juice. *J Food Process Preserv.* 42:e13489.
74. Ray, B. y Bhunia, A. 2008. Introducción a la microbiología de los alimentos. En: *Fundamentos de Microbiología de los Alimentos.* 1ra Edición. Mc Graw-Hill Interamericana Editores S. A. de C. V. New York, USA. Pp: 3-7.
75. Re, R., Pellegrini N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. y Rice C. E. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.* 26(9-10):1231-1237.
76. Rimpapa, Z., Toromanovic, J., Tahirovic, I., Šapčanin, A. y Sofic, E. 2007. Total content of phenols and anthocyanins in edible fruits from Bosnia. *BJBMS.* 7 (2): 119-122.
77. Roginsky, V. y Lissi, E. 2005. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chem.* 92: 235–254.
78. Romero, J. C. y Yépez V. B. 2015. Ultrasound as pretreatment to convective drying of Andean blackberry (*Rubus glaucus Benth.*).. *Ultrason Sonochem.* 22: 205-210.
79. Sah, B.N.P., Vasiljevic, T., McKechnie, S. y Donkor, O.N. 2016. Physicochemical, textural and rheological properties of probiotic yogurt fortified with fibre-rich pineapple peel powder during refrigerated storage. *Food Sci Technol.* 65: 978-986.

80. Samano, L. 1986. Estreñimiento. En: Plantas curativas de México. 4ta Edición. Gomez Gomez Hnos. Editores S. de R. L. D.F. México. Pp: 70-72.
81. Saura, C. F. 2011. Dietary Fiber as a Carrier of Dietary Antioxidants: An Essential Physiological Function. *J. Agric. Food Chem.* 59: 43–49.
82. Saura, C. F., Serrano, J. y Goñi, I. 2007. Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chem.* 101: 492–501.
83. Scalbert, A. y Williamson, G. 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *Journal of Nutrition.* 2073S-2085S.
84. Scalbert, A., Morand, C., Manach, C. y Rémésy, C. 2002. Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomed Pharmacother.* 56: 276–282.
85. Selvamuthukumar, M. y Farhath, K. 2014. Evaluation of shelf stability of antioxidant rich seabuckthorn fruit yoghurt. *Int Food Res J.* 21(2): 759-765.
86. Sengottuvelan, M. y Namasivayam, N. 2006. Dietary supplementation of resveratrol suppresses colonic tumour incidence in 1,2-dimethylhydrazine-treated rats by modulating biotransforming enzymes and aberrant crypt foci development. *Br J Nutr.* 96: 145–153.
87. Sengul, H., Surek, E. y Nilufer, D. 2014. Investigating the effects of food matrix and food components on bioaccessibility of pomegranate (*Punica granatum*) phenolics and anthocyanins using an in-vitro gastrointestinal digestion model. *Food Res Int.* 62: 1069–1079.
88. Settachaimongkon, S., Nout, R., Antunes, F. E., Hettinga, K., Vervoort, J., Hooijdonk, T., Zwietering, M., Smid, E. y Valenberg, H. 2014. Influence of different proteolytic strains of *Streptococcus thermophilus* in co-culture with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* on the metabolite profile of set-yoghurt. *International J Food Microbiol.* 177: 29–36.
89. Sfakianakis, P. y Tzia, C. 2014. Conventional and innovative processing of milk for yogurt manufacture; development of texture and flavor: a review. *Foods.* 3: 176-193.
90. Sistema de Información de Agentes Promotores (SIAP). 2017. Zaramora. En línea: http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola_siap_gb/identidad/index.jsp. Fecha de consulta: 12/09/2018.

91. Sindhu, R., Kuttiraja, M., Preeti, V., Vani, S., Sukumaran, R. y Binod, P. 2013. A novel surfactant-assisted ultrasound pretreatment of sugarcane tops for improved enzymatic release of sugars. *Bioresour Technol.* 135: 67–72.
92. Siqueira, B. W., Parente, L. B. y Paim, A. 2015. Simultaneous determination of synthetic colorants in yogurt by HPLC. *Food Chem.* 183: 154–160.
93. Skrede, C. y Wrolstad, R. 2002. Flavonoids from berries and grapes. En: *Functional Foods: Biochemical and Processing Aspects*. Eds.: Shi, J., Mazza, G., Maguer, L. M. Boca Raton, FL. 2: 71-133.
94. Soria, A. y Villamiel, M. 2010. Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review. *Trends in Food Science y Technology.* 21: 323-331.
95. Sung, J., Kim, Y., Kum, J., Choi, Y., Seo, D., Choi, H. y Park, J. 2015. Effects of freeze-dried mulberry on antioxidant activities and fermented characteristics of yogurt during refrigerated storage. *Korean J. Food Sci. An.* 35(6): 807-814.
96. Tagliacruzchi, D., Verzelloni, E., Bertolini D. y Conte, A. 2010. In vitro bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. *Food Chem.* 120: 599–606.
97. Tarakçı, Z. y Küçüköner, E. 2003. Physical, chemical, microbiological and sensory characteristics of some fruit-flavored yoghurt. *YYÜ Vet Fak Derg.* 14(2): 10-14.
98. Tiwari, B., Donnell, C., Muthukumarappan K. y Cullen P. 2009. Effect of sonication on orange juice quality parameters during storage. *Int. J. Food Sci. Technol.* 44 586–595.
99. Tiwari, B. 2015. Ultrasound: A clean, green extraction technology. *Trends in Analytical Chemistry.* 71:100-109.
100. Toma, M., Vintarou, M., Paniwnyk, L. y Mason, T. 2001 Investigation of the effects of ultrasoun on vegetal tissues during solvent extraction. *Ultrason Sonochem.* 8: 137-142.
101. Tongtawee, T., Dechsukhum, C., Leraanansaksiri, W., Kaewpitoon, S., Kaewpitoon, N., Loyd, R., Matrakool, L. y Panpimanmas, S. 2015. Improved detection of *Helicobacter pylori* infection and premalignant gastric mucosa using “site specific biopsy”: a randomized control clinical trial. *Asian Pac J Cancer Prev.* 16: 8487- 8490.

102. Trigueros, L., Wojdyło, A. y Sendra, E. 2014. Antioxidant activity and protein–polyphenol interactions in a pomegranate (*Punica granatum L.*) yogurt. *J. Agric. Food Chem.* 62: 6417–6425.
103. Tsao, R. 2010. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients.* 2: 1231-1246.
104. Tseng, A. y Zhao, Y. 2013. Wine grape pomace as antioxidant dietary fibre for enhancing nutritional value and improving storability of yogurt and salad dressing. *Food Chem.* 138: 356–365.
105. Türemis, N., Kafkas, S., Kafkas, E., y Onur, C. 2003. Fruit characteristics of nine thornless blackberry genotypes. *J Am Pomol Soc.* 57(4): 161–165.
106. Tyl, C. y Sadler, G. 2017. pH and titratable acidity. En: *Food Analysis.* 5th Edition. (ed) Nielsen, S. Springer, West Lafayette, Indiana, USA. Pp: 389-406.
107. United States Department of Agriculture (USDA). 2018. Blackberries, raw - USDA Food Composition Databases. En línea: <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/301063>. Fecha de consulta: 15/09/2018.
108. United States Department of Agriculture (USDA). 2018. Yogurt, plain, whole milk - USDA Food Composition Databases. En línea: <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/105?manu=yfgcd>. Fecha de consulta: 15/09/2018.
109. Van de Velde, F., Pirovani, M. y Drago, S. 2018. Bioaccessibility analysis of anthocyanins and ellagitannins from blackberry at simulated gastrointestinal and colonic levels. *J Food Compos Anal.* 72: 22–31.
110. Venancio, V., Kim, H., Sirven, M., Tekwe, C., Honvoh, G., Talcott, S. y Mertens, S. T. 2018. Mango (*Mangifera indica L.*) polyphenols ameliorate functional constipation symptoms in humans beyond equivalent amount of fiber. *Mol Nutr y Food Res.* 1-25.
111. Wallace, T., y Giusti, M. 2008. Determination of color, pigment, and phenolic stability in yogurt systems colored with nonacylated anthocyanins from berberis boliviana I. as compared to other natural/synthetic colorants. *J Food Sci.* 73(4): 241-248.
112. Wu, T., Yu, Z., Tang, Q., Song, H., Gao, Z., Chen, W. y Zheng, X. 2013. Honeysuckle anthocyanin supplementation prevents diet-induced obesity in C57BL/6 mice. *Food Funct.* DOI: 10.1039/c3fo60251f.

113. Wu, X., Beecher, G., Holden, J., Haytowitz, D., Gebhardt, S. y Prior, R. 2006. Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption. *J Agric Food Chem.* 54: 4069-4075.
114. Yilmaz, K., Yasar, Z., Ercisli, S., Serce, S., Gunduz, K., Sengul, M. y Asma, B. 2009. Some selected physico-chemical characteristics of wild and cultivated blackberry fruits (*Rubus fruticosus L.*) from Turkey. *Rom. Biotechnol. Lett.* 14: 4152–4163.
115. Yuan, H., Lv, J., Gong, J., Xiao, H., Zhao, G., Xiao, G., Xu, H. y Wang, W. 2018. Microbial transglutaminase enhances antioxidant activity of yogurt through altering pattern of water-soluble peptides and increasing release of amino acids. *J Food Sci Technol.* 53: 1030–1044.
116. Zafra, R. Q. 2015. Optimización de la extracción de antioxidantes de un residuo de zarzamora (*Rubus fruticosus*), empleando termo-ultrasonido, para su utilización como aditivo en yogurt. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. En: *Tesis en Maestría en Ciencia de los Alimentos*. Pp: 47.
117. Zafra, R. Q., Cruz, C. N., Delgadillo, A. R., Alanís, G. E. Añorve, J. M., Quintero, A. L., Castañeda, A. O. y Ramírez, M. E. 2018. Organic acids, antioxidants, and dietary fiber of mexican blackberry (*Rubus fruticosus*) residues cv. Tupy. *J Food Qual.* Article ID 5950761.
118. Zafra, R. Q., Cruz, C. N., Quintero, A. L., Gómez, C. A., Alanís, G. E., Cervantes, E. A., Güemes, N. V. y Ramírez, M. E. 2016. Application of ultrasound in a closed system: optimum condition for antioxidants extraction of blackberry (*rubus fruticosus*) residues. *Molecules.* 21(950); doi:10.3390/molecules21070950.
119. Zia-UI-Haq, M., Riaz, M., De Feo, V., Jaafar, H., y Moga, M. 2014. *Rubus fruticosus L.*: constituents, biological activities and health related uses. *Molecules.* 19: 10998-11029.