



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD

**“Compuestos fenólicos, actividad antioxidante y bioaccesibilidad intestinal *in vitro* de un jugo de zarzamora (*Rubus fruticosus spp*) termoultrasonicado”**

Tesis para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS Y DE LA SALUD**

Presenta:

**L.N. JOSÉ ANTONIO SÁNCHEZ FRANCO**

Directora de Tesis

**DRA. ESTHER RAMÍREZ MORENO**

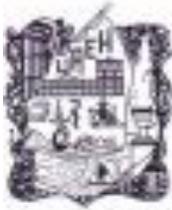
Co-Directores:

**DRA. NELLY DEL SOCORRO CRUZ CANSINO**

**DR. JOSÉ DE JESÚS MANRÍQUEZ TORRES**

San Agustín Tlaxiaca Hidalgo. a septiembre del 2015





**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO**  
**INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD**  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS Y DE LA SALUD**

Of. No MCBS/2015/102  
 Asunto: Asignación de Jurado de Examen

**L.N. José Antonio Sánchez Franco**  
 Candidato a Maestro en Ciencias Biomédicas y de la Salud

Por este conducto le comunico el jurado que le fue asignado a su Tesis titulada "Compuestos Fenólicos, Actividad Antioxidante y Bioaccesibilidad Intestinal in vitro de un Jugo de Zarcamora (*Rubus fruticosus* spp.) Termoultrasonificado.", con el cual obtendrá el **Grado de Maestro en Ciencias Biomédicas y de la Salud**; después de revisar la tesis mencionada y haber realizado las correcciones acordadas, han decidido autorizar la impresión de la misma.

A continuación se anotan las firmas de conformidad de los integrantes del jurado:

PRESIDENTE      DRA. NELLY DEL SOCORRO CRUZ CANSINO

PRIMER VOCAL    DRA. ESTHER RAMÍREZ MORENO

SECRETARIO      DR. JOSÉ DE JESÚS MANRIQUEZ TORRES

SUPLENTE        DRA. RAQUEL CARIÑO CORTES

SUPLENTE        DR. ERNESTO ALANÍS GARCÍA

Sin otro asunto en particular, reitero a usted la seguridad de mi atenta consideración.

Acentamiento  
 "AMOR, ORDEN Y PROGRESO"  
 San Agustín Tlaxiaca Hgo. a 2 de mayo 2015

M.C. ESP. JOSÉ MARÍA BUSTO VILLARREAL  
 DIRECTOR



DRA. ARACELL ORTIZ POLO  
 COORDINADORA DE POSGRADO ICSA

DR. JUAN ELIEZER ZAMARRIPA CALDERÓN  
 COORDINADOR DEL PROGRAMA



Laboratorio de Materiales Dentales / Clínica de Odontología Ciudad del Conocimiento carretera Pachuca Tlaxiaca Km. 4.5  
 Vialidad de la Reforma Hgo. C.P. 42194 Tel: (771) 7172000 ext. 6891 correo electrónico: mla\_blo\_sai@uah.edu.mx



---

Durante el desarrollo de estos estudios, se contó con una beca de manutención otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), número de beca 553044.

Se extiende el agradecimiento a la UAEH, por permitir la realización de estudios de posgrado en los laboratorios pertenecientes de esta Máxima Casa de Estudios.

Un profundo y grato agradecimiento a los responsables de los laboratorios en los que se desarrolló el presente proyecto: Laboratorio de alimentos funcionales y nutraceuticos y Laboratorio de indicadores biológicos, ya que sin su espacio, reactivos y apoyo, no se hubiesen logrado los objetivos establecidos.

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	6
ÍNDICE DE TABLAS .....	7
I. MARCO TEÓRICO.....	11
1.1 <i>Rubus fruticosus</i> .....	11
1.2 <i>Zarzamora</i> .....	12
1.3 <i>Antioxidantes</i> .....	17
1.4 <i>Compuestos fenólicos</i> .....	18
1.5 <i>Metabolismo de compuestos fenólicos</i> .....	23
1.6 <i>Bioaccesibilidad de compuestos fenólicos</i> .....	25
1.7 <i>Tecnologías para el procesamiento de zarzamora</i> .....	27
II. JUSTIFICACIÓN .....	31
III. HIPÓTESIS.....	32
IV. OBJETIVOS.....	32
4.1 <i>GENERAL</i> .....	32
4.2 <i>ESPECÍFICOS</i> .....	32
V. METODOLOGÍA .....	33
<i>Etapa 1</i> .....	34
5.1 <i>Obtención de la materia prima y jugos de zarzamora</i> .....	34
5.2 <i>Actividad antioxidante</i> .....	35
5.2.1 <i>Determinación de ácido ascórbico</i> .....	35
5.2.2 <i>Compuestos fenólicos totales</i> .....	35
5.2.3 <i>Antocianinas</i> .....	36
5.2.4 <i>Determinación de actividad antioxidante por ABTS<sup>•+</sup></i> .....	37
5.2.5 <i>Determinación de la actividad antirradical por el método DPPH</i> .....	38
<i>Etapa 2</i> .....	38
5.4 <i>Extracción de compuestos por disolventes</i> .....	38
5.4.1 <i>Obtención de extractos</i> .....	38
5.4.2 <i>Separación de compuestos puros</i> .....	¡Error! Marcador no definido.

<i>Etapa 3</i> .....	39
<i>5.3 Determinación de la bioaccesibilidad intestinal in vitro de compuestos antioxidantes y de la capacidad antioxidante</i> .....	39
<i>5.5 Análisis estadístico</i> .....	41
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	42
<i>Etapa 1</i> .....	42
<i>6.1 Obtención de jugos de zarzamora</i> .....	42
<i>6.2 Actividad antioxidante</i> .....	43
<i>6.2.1 Ácido ascórbico</i> .....	43
<i>6.2.2 Fenoles totales</i> .....	44
<i>6.2.3 Antocianinas</i> .....	45
<i>6.2.4 Actividad antioxidante por ABTS<sup>•+</sup> y DPPH</i> .....	46
<i>Etapa 2</i> .....	48
<i>6.3 Extracción de compuestos por disolventes</i> .....	48
<i>6.3.1 Obtención de extractos</i> .....	48
<i>Etapa 3</i> .....	53
<i>6.4 Fracción bioaccesible in vitro de los jugos de zarzamora</i> .....	53
<i>6.4.1 Actividad antioxidante de los jugos digeridos de zarzamora</i> .....	54
<i>6.4.1 Ácido ascórbico</i> .....	56
<i>6.4.2 Fenoles totales</i> .....	57
<i>6.4.3 Antocianinas</i> .....	58
<i>6.4.4 Actividad antioxidante por ABTS<sup>•+</sup> y DPPH</i> .....	59
VII. CONCLUSIONES .....	61
VIII. BIBLIOGRAFÍA .....	63

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fruto de la zarzamora.....	12
Figura 2. Producción de zarzamora en México. ....	15
Figura 3. Estructura química de algunos flavonoides. ....	20
Figura 4. Proceso de absorción, transporte y metabolismo de compuestos polifenólicos. ....	25
Figura 5. Clasificación y estructura química de polifenoles dietéticos más comunes. ....	26
Figura 6. Cavitación del ultrasonido. ....	29
Figura 7. Diseño metodológico. ....	33
Figura 8. Esquema del método para la determinación “ <i>in vitro</i> ” de la bioaccesibilidad intestinal de compuestos antioxidantes y capacidad antioxidante. ....	40
Figura 9. a) zarzamora, b) jugo de zarzamora y c) liofilizado de jugo. ....	42
Figura 10. Actividad antioxidante por ABTS de las extracciones por disolventes. ....	50
Figura 11. Actividad antioxidante por DPPH de las extracciones por disolventes. ....	51
Figura 12. Actividad antioxidante por ABTS de las fracciones por columna de sílica gel. ....	52
Figura 13. Actividad antioxidante por DPPH de las fracciones por columna de sílica gel. ....	53

---

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros de almacenamiento de zarzamoras.....	14
Tabla 2. Propiedades nutricionales y fisicoquímicas de la zarzamora.....	16
Tabla 3. Contenido de algunos compuestos antioxidantes en la zarzamora.....	21
Tabla 4. Compuestos antioxidantes y actividad antioxidante de los jugos de zarzamora control, pasteurizado y termoultrasonicado. ....	43
Tabla 5. Coeficientes de correlación entre la actividad antioxidante y los contenidos de antioxidantes de la zarzamora. ....	47
Tabla 6. Rendimiento de extracción de sólidos totales por disolventes (g/25 g bs).....	49
Tabla 7. Rendimiento de las muestras después del proceso de digestión <i>in vitro</i> (g /20 mL bs).....	54
Tabla 8. Compuestos antioxidantes y actividad antioxidante de los jugos de zarzamora tratados por PAS y TUS después del proceso de digestión <i>in vitro</i> .....	55

---

### ***Abreviaturas***

AA: ácido ascórbico

Abs: Absorbancia

ABTS: Ácido (2,2'-azino-bis (3-etilbenzodiazolin-6-sulfónico)

CTL: Control

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

EAG: equivalentes de ácido gálico

ERO: especies reactivas del oxígeno

ET: equivalentes de Trolox

nm: nanómetro

PAS: Pasteurizado

rpm: revoluciones por minuto

TUS: Termoultrasonificado

VC: vitamina C

## Resumen

La zarzamora (*Rubus fruticosus spp*) es una fruta polídrupe que presenta una importante actividad antioxidante ya que posee antocianinas y compuestos antioxidantes (flavonoles, ácidos fenólicos, ácido elágico, vitamina C y E), sustancias con gran actividad biológica. El uso de tratamientos térmicos, como la pasteurización para extender la vida de anaquel de jugos degrada compuestos antioxidantes y nutricionales. Por lo que se requiere de tecnologías emergentes como la termoultrasonificación, técnica que asegura una disminución microbiana, así como la liberación de compuestos con propiedades antioxidantes. Al igual, se permitiría obtener un valor agregado en el jugo de zarzamora, que conserve al producto sin alterar sus características físicas, sensoriales y nutricionales. Las muestras de jugo de zarzamora (control, pasteurizado y termoultrasonificado) fueron evaluadas en 3 etapas; 1) Contenido de compuestos antioxidantes (ácido ascórbico, fenoles totales y antocianinas) y actividad antioxidante (ABTS y DPPH); 2) Extracción de compuestos por polaridad utilizando diferentes disolventes (hexano, acetato de etilo y etanol); 3) Determinación de la bioaccesibilidad intestinal *in vitro* de los compuestos antioxidantes y actividad antioxidante. El tratamiento por termoultrasonido presentó una mayor cantidad de compuestos con capacidad antioxidante en el jugo; fenoles totales (1,011 mg EAG/L), antocianinas (118 mg A/L); y actividad antioxidante: ABTS (44 mg VC/L) y DPPH (2,665  $\mu$ mol ET/L), en comparación con las muestras control y pasteurizada. El jugo termoultrasonificado con extracción por etanol presentó mayor rendimiento de sólidos totales (60.4%) en comparación con las muestras control (56.8%) y pasteurizada (57.4%). El jugo termoultrasonificado presentó una mayor fracción bioaccesible *in vitro* de compuestos fenólicos totales (710 mg EAG/L), antocianinas (82 mg A/L); y con mayor capacidad antioxidante actividad antioxidante: ABTS (44 mg VC/L) y DPPH (2,360  $\mu$ mol ET/L), en comparación con las muestras control y pasteurizada. En conclusión, el tratamiento por termoultrasonido puede ser una alternativa a tratamientos térmicos, ya que mantiene y libera compuestos con mayor biodisponibilidad intestinal.

**Palabras clave:** zarzamora, compuestos antioxidantes, actividad antioxidante, bioaccesibilidad intestinal *in vitro*.

## Abstract

Blackberry (*Rubus fruticosus* spp) is a fruit that has a significant antioxidant activity, this because its content in anthocyanins and antioxidant compounds (flavonols, phenolic acids, ellagic acid, vitamin C and E), substances with high biological activity. The use of heat treatments such as pasteurization to extend the shelf life of juices, could degrade the nutritional and antioxidant content. Emerging technologies are required such thermoultrasound technique, that ensures microbial reduction and release of compounds with antioxidant properties. With the use of this technology in blackberry juice it could be preserved this product without altering their physical, sensory and nutritional characteristics. The blackberry juice samples (control, pasteurized and thermoultrasound) were evaluated in 3 stages: 1) antioxidants content (ascorbic acid, total phenols and anthocyanins) and antioxidant activity (DPPH and ABTS); 2) removing polarity compounds by using different solvents (hexane, ethyl acetate and ethanol); 3) determination of *in vitro* intestinal bioaccessibility of the antioxidant compounds and antioxidant activity. The thermoultrasounded juice had the highest amount of antioxidant compounds in the juice; total phenols (EAG 1,011 mg/L), anthocyanins (118 mg/L); and antioxidant activity: ABTS (44 mg VC/L) and DPPH (2,665  $\mu\text{mol TE/L}$ ), compared to the control and pasteurized samples. The thermoultrasounded juice extraction with ethanol, yielded the best total solids (60.4%) compared to control (56.8%) and pasteurized samples (57.4%). The thermoultrasounded juice got the highest *in vitro* bioavailability of total phenolic compounds (EAG 710 mg/L), anthocyanins (82 mg A/L); and antioxidant activity: ABTS (44 mg VC/L) and DPPH (2,360  $\mu\text{mol TE/L}$ ) compared with the control and pasteurized samples. In conclusion, thermoultrasound treatment can be an alternative to thermal treatments because it keeps and releases antioxidant bioavailable compounds.

**Key words:** blackberry, antioxidants content, antioxidant activity, *in vitro* intestinal bioaccessibility.

## I. MARCO TEÓRICO

### 1.1 *Rubus fruticosus*

El término *R. fruticosus* no se refiere a una sola especie, pero se utiliza para englobar cerca de 2,000 especies, subespecies, híbridos y variedades en referencia colectivamente como taxones, en la sección, subgénero y género *Rubus* (1).

Su nombre se basa en una mezcla de *Rubus plicatus* Weihe & Nees y *Rubus ulmifolius* Schott. Muchas de las especies surgieron como resultado de la hibridación y la apomixis (reproducción asexual, por semillas). Algunos de los taxones *Rubus* en este agregado incluyen: *Rubus anglocandicans* A. Newton, *Rubus cissburiensis* WC Barton & Ridd., *Rubus echinatus* Lindl., *Rubus erythrops* Edees y A. Newton, *Rubus laciniatus* Willd., *Rubus leightonii* Lees ex Leight., *Rubus leucostachys* Schleich. ex Sm., *Rubus phaeocarpus* W.C.R. Watson, *Rubus polyanthemus* Lindeb., *Rubus riddelsdellii* Rilstone, *Rubus rubritinctus* W.C.R. Watson, *Rubus ulmifolius* Schott (incluyendo *Rubus ulmifolius* var. *Ulmifolius* y *Rubus ulmifolius* var. *Anoplothyrus* Sudre) y *Rubus vestitus* Weihe (2).

Las especies frutales de *Rubus* pertenecen a dos subgéneros: las *Idaeobatus* (frambuesas) y las *Rubus* anteriormente *Eubatus* (zarzamoras). Los cultivos de frutas *Rubus* comerciales incluyen el rojo (*R. idaeus* L.), negro (*R. occidentalis* L.) y frambuesas púrpuras (híbrido frambuesa), zarzamoras (especies e híbridos *Rubus*), zarzamoras y moras (*R. chamaemorus* L.) (3).

En general, existen tres tipos de zarzamora: tipo erecto ('Navajo', 'Ouachita'); semi-erecto ('Chester' sin espinas, 'Loch Ness'); y rastrero ('Marion', 'Boysen'). Todos los tipos de zarzamora pueden ser cultivados para mercados como productos frescos y procesados, aunque el tipo rastrero, por su pequeña semilla, tamaño, sabor y aroma, se consideran superiores para los productos procesados. Los mayores países productores de zarzamora son México (Michoacán), Europa (Serbia), y los Estados Unidos (Oregon), donde los tipos predominantes de cultivo son: erecto, semi-erecto y rastrero, respectivamente (4).

## 1.2 Zarzamora

La planta zarzamora de nombre científico *Rubus fruticosus* pertenece al género *Rubus* y a la familia de la *Rosaceae*, es un arbusto delgado y flexible de ramas leñosas, arqueadas y espinosas, con hojas compuestas de 3 ó 5 hojas elípticas y de borde aserrado, dispuesto de forma palmeada, llega a medir hasta 2 m de alto por 7 m de longitud. Sus flores crecen en racimos compuestos con 5 sépalos y 5 pétalos blancos o rosados sobre un receptáculo ensanchado, con numerosos estambres (5).

Su fruto es un agregado de numerosas drupas carnosas (polídrupa), cada una contiene una semilla, las drupas presentan una forma en D, de base estrecha a punta amplia o en forma triangular redondeada, mide de 2 a 3 mm de largo por 1.5 a 2.8 mm de ancho y de 1 a 1.8 mm de espesor, con un peso entre 5 y 10 g por frutilla. El fruto de la zarzamora es verde al principio, pasa por tonalidades rojizas y finalmente es negra brillante cuando madura, como se puede observar en la figura 1, la planta de zarzamora con frutos en diferentes grados de maduración (5, 6).



**Figura 1.** Fruto de la zarzamora.

---

Las zarzamoras están lindadas a climas templados, con una precipitación anual de al menos 700 mm y en altitudes de hasta 1,950 m. Se cultiva en prados con precipitaciones inferiores a lo largo de cursos de agua. Su desarrollo es mejor en suelos ácidos a ligeramente ácidos, ricos en materia orgánica. El fruto presenta mejor crecimiento a pleno sol, pero también se cultiva en la sombra (5).

Existen factores pre y pos cosecha que influyen principalmente en el crecimiento, rendimiento y calidad de frutos de zarzamora, en climas con cambios ambientales estresantes como sequía, alta humedad, niveles altos de radiación solar, temperaturas extremas y el ataque de insectos y patógenos (7, 8), así como la cosecha manual en grandes extensiones, la hora del día en que se efectúa la cosecha, el transporte y su procesamiento (9), entre otras. Los principales meses de producción y cosecha de la zarzamora en México se encuentra entre los meses de agosto y octubre, sin embargo, las cosechas tipo perenne generan mayor producción de zarzamora (6, 10).

La zarzamora en México, es un cultivo de tipo erecto con moras firmes y con vida de anaquel de 7 días, el cual es un factor limitante en el almacenamiento prolongado (11). Lo anterior debido al alto contenido de humedad del tejido que incrementa el grado de perecibilidad y los cambios en las características físicas, que definen los estándares comerciales y la apariencia externa, siendo estos los principales factores de rechazo del producto en el mercado (8). Por lo tanto, para aumentar la vida útil de esta fruta, es necesario el seguimiento de parámetros específicos relacionados con la infraestructura y de almacenamiento para empacar, conservar y aumentar la vida útil comercial de los frutos de la zarzamora, como son la temperatura, humedad, entre otros factores mostrados en la tabla 1 (12, 13).

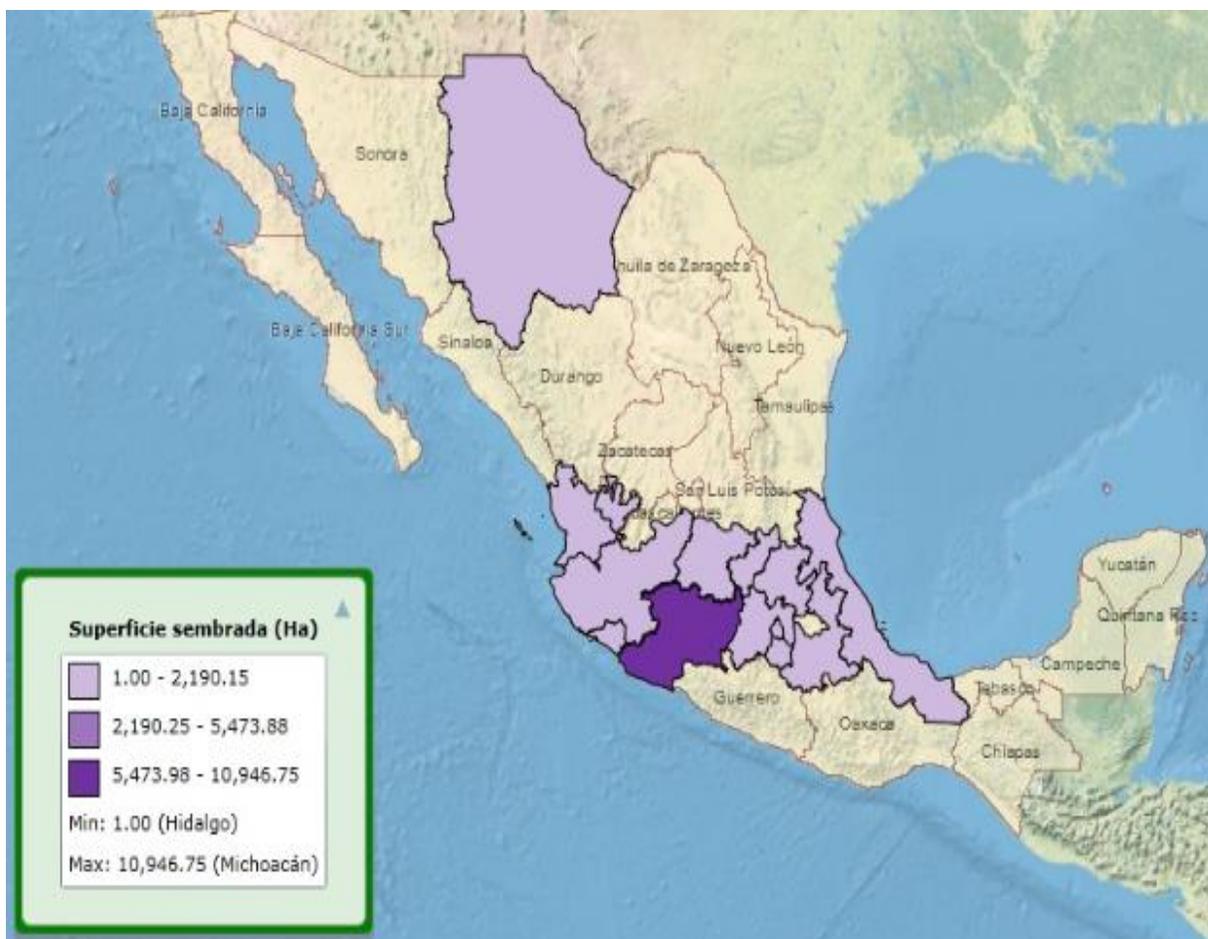
**Tabla 1.** Parámetros de almacenamiento de zarzamoras.

<b>Parámetro</b>	
<b>Punto de congelación (°C)</b>	-1.7
<b>Temperatura de almacenamiento (°C)</b>	-0.5–0
<b>Humedad relativa (%)</b>	90–95
<b>Periodo práctico de almacenamiento (días)</b>	2 a 3
<b>Contenido de humedad (%)</b>	84.8
<b>Tasa de respiración (0 °C) (mL CO<sub>2</sub>/kg/h)</b>	16 a 23

Fuente modificada: (12).

Diversos estudios (12, 13), han demostrado la necesidad de atemperar los frutos de la zarzamora al medio ambiente inmediatamente después de su cosecha para su posterior almacenamiento a 2 °C, con una humedad relativa de 90–95%. Después del almacenamiento en refrigeración, la zarzamora presenta 20% menor deterioro, sin cambios perjudiciales en sólidos totales, acidez titulable o antocianinas, que una fruta no refrigerada, donde, la fruta se torna inaceptable al gusto debido al desarrollo de mal sabor. En otros estudios (14, 15), se menciona que cuando la zarzamora se almacena a 2 °C en empaques de 250 g, se puede conservar por poco más de 10 días, después de dicho tiempo, la fruta comienza a deshidratarse y a presentar ataques por hongos, por lo que es de gran importancia dar opciones de consumo y uso de la zarzamora.

En México, la zarzamora es una frutilla con alta producción, en especial en los estados de Michoacán, Jalisco y Colima (Figura 2). En otros estados de la república también se tienen plantíos con producción menor que llegan a tener importancia comercial como Hidalgo y el Estado de México (16).



**Figura 2.** Producción de zarzamora en México.  
Fuente: (16).

La producción al 2013, fue de 11,889 hectáreas con 128,976 toneladas de cosecha (16). De esta producción, se exportó el 90% principalmente a Estados Unidos y sólo 10% se consume en fresco de la obtención total en el territorio mexicano (13). El bajo consumo de este fruto pudiera ser a la escasa cantidad que queda en el país, aunado a la poca difusión y fomento al consumo de la zarzamora y además de que los pequeños productores no cuentan con la infraestructura necesaria para su óptimo manejo y comercialización (6).

La composición nutrimental de zarzamoras en fresco (*Rubus spp*) por cada L de porción comestible fue reportado en el 2011 por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, por sus siglas en inglés) (Tabla 2).

Los frutos de zarzamora con madurez comercial, contienen un elevado porcentaje de agua, azúcares (sacarosa 0,07 g, glucosa 2,31 g, fructosa 2.40 g, maltosa 0,07 g, galactosa 0,03 g), sólidos totales, entre otros (17, 18).

Además, las zarzamoras presentan un alto contenido de pigmentos (carotenoides y antocianinas) y compuestos (ácido ascórbico y fenoles) que contribuyen a tener la actividad antioxidante que les caracteriza a estos frutos (17, 19, 20).

**Tabla 2.** Propiedades nutricionales y fisicoquímicas de la zarzamora

<b>Parámetro (g/L)</b>	
<b>Peso (g)</b>	2.7
<b>Humedad (%) (PF)</b>	85-88
<b>Cenizas (PS)</b>	3.1
<b>Energía (Kcal)</b>	43
<b>Proteína</b>	1.39
<b>Fibra dietética total</b>	5.3
<b>Hidratos de carbono</b>	9.61
<b>Lípidos totales</b>	0.49
<b>Azúcares totales</b>	4.88
<b>pH</b>	2.51
<b>Sólidos totales (PF)</b>	7.7

PF: peso fresco; PS: peso seco; AM: ácido málico.  
Fuente modificada:(17, 18).

Por lo tanto, la zarzamora se caracteriza como un fruto con propiedades antioxidantes de gran importancia por los beneficios que pudiera ofrecer a la salud (21-23).

### *1.3 Antioxidantes*

Los efectos dañinos de las especies reactivas del oxígeno (ERO) son balanceados por la acción de antioxidantes, los cuales son moléculas que neutralizan a los radicales libres aceptando o donando electrones para eliminar su condición impar. Los antioxidantes actúan directamente con los radicales reactivos y los inhibe, con lo que estos se convierten en nuevos radicales menos activos, con vida más larga y menos reactivos que aquellos radicales que neutralizaron. Estos al mismo tiempo pueden ser inhibidos por otros antioxidantes u otros mecanismos para eliminar con su estado radical (24).

Los radicales libres son moléculas o fragmentos de moléculas con uno o más electrones no apareados en las órbitas de valencia (25, 26). Estas son moléculas muy inestables y muy reactivas, ya que tienden a capturar un electrón de otras moléculas generando así su oxidación (27, 28). Cuando se hace reaccionar con otros radicales o moléculas, un radical libre puede formar nuevos radicales. Los ERO contienen radicales libres y formas reactivas de oxígeno. Los radicales libres son producidos por una transferencia de electrones que requiere un alto consumo de energía (29).

El estrés oxidativo ha sido implicado en el desarrollo de enfermedades crónicas degenerativas, así, el exceso de producción de ERO y otros radicales se relacionan como inductores de daño tisular en condiciones patológicas severas (30).

De la misma forma que los radicales libres, los antioxidantes pueden ser endógenos o exógenos (31). Dentro de los antioxidantes endógenos se encuentran: superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y catalasa, que pueden contrarrestar ambientes oxidativos mediante la quelación de diversos peróxidos y superperóxidos. Siendo los antioxidantes exógenos la vitamina E y C, coenzima Q,  $\beta$ -caroteno y glutatión, con capacidad de reprimir la actividad de los ERO (32). Los antioxidantes exógenos se consumen a través de la dieta, lo cual indicaría que una dieta saludable ayudaría a contrarrestar los efectos dañinos de los radicales libres (32, 33).

En la actualidad existe un interés creciente en el estudio de la composición química de las plantas y frutos, debido precisamente a las propiedades de algunos componentes que pueden estimular el sistema inmune, estabilizar concentraciones hormonales en el

organismo, reducir la presión arterial así como presentar cierta actividad antibacterial y antiviral (34). Al igual, estos compuestos pueden inhibir, interrumpir o frenar los procesos oxidativos y contrarrestar la actividad de los radicales libres (35, 36), un claro ejemplo de ello, son sustancias como el ácido ascórbico distribuido en los tejidos del fruto, pero en mayor concentración en la piel o cáscara (37, 38) y, los compuestos fenólicos contenidos tanto en plantas como sus frutos.

Existen diversos estudios en los que se ha observado una disminución en los indicadores de estrés oxidativo y una mejora en indicadores de síndrome metabólico con el consumo de antioxidantes. Por ejemplo, se observó (39) una mejor función pancreática en ratas diabéticas a las que se les administró compuestos fenólicos, debido a su acción protectora hacia las células beta del páncreas en caso de hipercolesterolemia y trigliceridemia

Otro autor (40), refiere que el consumo de fenoles se asociaba a un efecto protector removiendo depósitos vasculares de lípidos. Se pueden citar varios estudios con el consumo de antioxidantes y la mejora de indicadores de estrés oxidativo, siendo este no único del síndrome metabólico, sino también, se ha comprobado cierta recuperación en casos de carcinoma, tanto para su tratamiento (41, 42) como su prevención (43-45) y enfermedades neurodegenerativas (46, 47).

#### ***1.4 Compuestos fenólicos***

Existen diversos tipos de polifenoles y cientos de ellos se encuentran en las plantas y sus frutos. El tipo y contenido de polifenoles difiere de cada uno con diferentes porciones de contenido en los alimentos antes mencionados. Los polifenoles se dividen en grupos familiares en función de su estructura química. Hay 10 o más clases de polifenoles, pero las cuatro principales clases son: los ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos y lignanos (48).

Los flavonoides son referidos a un conjunto de compuestos, sin embargo, existen por lo menos seis subclases con diferencias en su estructura química. Los flavonoles están presentes en una amplia variedad de frutas y verduras. La quercetina y kaempferol son los flavonoles más comunes en los alimentos (49). Están presentes en forma monomérica y

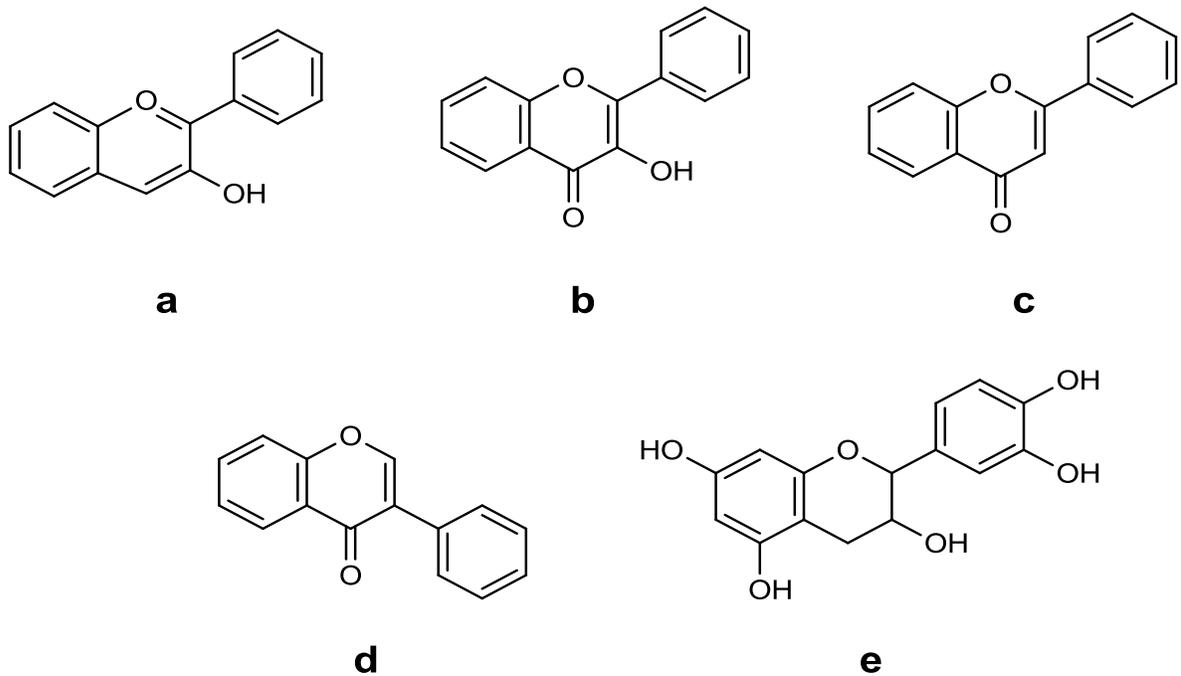
---

pueden ser absorbidos fácilmente cuando son conjugados (por ejemplo, glucósidos de quercetina); sin embargo, típicamente no se encuentran en cantidades abundantes en los frutos. Por lo tanto, su ingesta es generalmente baja, incluso con una dieta saludable (50). Esto puede ser un factor que contribuye a la popularidad de los suplementos alimenticios.

Diversos estudios han demostrado que dietas ricas en alimentos de origen vegetal ejercen efectos protectores en contra de enfermedades degenerativas, como cáncer y enfermedades cardiovasculares, además, proporcionan fibra dietética, vitaminas, fitosteroles, carotenoides, ácidos orgánicos y compuestos fenólicos (51). De esta forma, el estudio de diferentes plantas ha ganado un mayor interés en la investigación científica, como resultado de su contenido de antioxidantes naturales, que pueden proteger los componentes celulares contra el daño oxidativo y, por lo tanto, limitar el riesgo de diversas enfermedades degenerativas asociadas con el estrés oxidativo (51-53).

Los beneficios de estos antioxidantes en la salud se miden por medio de la actividad celular antioxidante, la capacidad de absorción de radicales del oxígeno así como de su capacidad quelante (54). Esto gracias a los antioxidantes contenidos en polifenoles y flavonoides.

Los compuestos fenólicos, en su mayoría flavonoides (Figura 3) (55), son sustancias fenólicas formadas en las plantas (56), a partir de aminoácidos como tirosina, fenilalanina y malonato (57, 58). Estas sustancias exhiben actividades biológicas: inhiben el crecimiento de células cancerosas (59, 60); reducen el estrés oxidativo, que es un aspecto fundamental en la enfermedad de Alzheimer, además, pueden prevenir la aterosclerosis, que se inicia por procesos de oxidación de proteínas de baja densidad (61).



**Figura 3.** Estructura química de algunos flavonoides.

a) Antocianina; b) Flavonol; c) Flavona; d) Isoflavona; e) Catequina.

Fuente modificada: (55).

Un estudio en el que cuantificaron los antioxidantes de diferentes moras, entre ellas zarzamora, mora azul y fresa, se encontró que el fruto que presentó la mayor actividad antioxidante y cantidad de compuestos fenólicos, fue la zarzamora (62).

Por otra parte, se han realizado diversos estudios, en donde se identificaron compuestos fenólicos con actividad antioxidante en diversos frutos, encontrando mayor concentración de estos compuestos en las hojas que en los tejidos carnosos o piel (63, 64), al igual, se han determinado los compuestos fenólicos en jugos de frutas, como: granada (65, 66), noni (67), arándano (68), mora tropical (17) y zarzamora (19, 69, 70).

En el caso de la zarzamora (*Rubus fruticosus*), esta frutilla presenta alto contenido de compuestos antioxidantes (Tabla 3) como antocianinas, flavonoles, ácidos fenólicos, vitamina C y E, y  $\beta$ -sitosterol, entre otros (17, 71). Las antocianinas han sido consideradas como los antioxidantes naturales más potente ya que han demostrado propiedades

supresoras de radicales libres importantes (72), una de las principales razones de su creciente popularidad en la dieta humana.

**Tabla 3.** Contenido de algunos compuestos antioxidantes en la zarzamora.

<b>Antocianinas</b>	
<b>Cianidin 3-glucósido</b> (mg Cy-3-glc/g)	8.3 ± 0.3
<b>Cianidin 3-(6' malonil) glucósido</b> (mg Cy-3-glc/g)	0.66 ± 0.04
<b>Flavonoles</b> (mg quercetin/g)	0.137 ± 0.002
<b>Ácido elágico</b> (mg AE/g)	0.202 ± 0.004
<b>Total</b> (μmol g) <sup>a</sup>	70 ± 0.3

Cy-3-glc= cianidin-3-glucósido; <sup>a</sup>= suma de μmol de ácido elágico, quercetin y cianidin-3-glucósico; AE= ácido elágico.  
Fuente modificada: (17).

Entre los beneficios que se le han adjudicado al consumo de zarzamora se encuentran: propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y propiedades quimiopreventivas, así como la actividad biológica contra cáncer oral, de esófago y de colon (22), hasta el mejoramiento de la memoria en adultos mayores (73).

De igual forma, en estudios epidemiológicos con animales, se ha establecido la disminución de nefropatía en ratas hipertensas debido a la disminución del estrés oxidativo (74); la protección coronaria en ratas con daño isquémico (75). En otros estudios, se observó la disminución de la inflamación en ratas con síndrome metabólico (23, 76), entre otros beneficios. Sin embargo, estos beneficios dependen de la cantidad de compuestos con actividad antioxidante que se absorben.

Por el contenido de estos compuestos antioxidantes y fibra dietética, los productos elaborados a base de zarzamora pueden ser considerados como alimento funcional. Un alimento funcional se define como un producto que posee una apariencia a la de un

---

alimento convencional, se consume como parte de una dieta normal y, además de su función nutritiva básica, presenta propiedades fisiológicas, beneficiosas y/o reduce el riesgo de contraer enfermedades crónicas (77, 78).

Este concepto expone por primera vez la existencia de “alimentos con efecto específico sobre la salud” (Foods for Specified Health Use, FOSHU por sus siglas en inglés) y en consecuencia, la población se puede obtener beneficios a partir de su consumo.

El sistema regulatorio japonés, FOSHU, describe 11 categorías de ingredientes con actividad fisiológica entre los que se destacan para este estudio los siguientes:

- Alcoholes y fenoles.
- Fibras alimentarias (77).

El alimento además debe garantizar inocuidad, características sensoriales y organolépticas sin cambios durante el almacenamiento, ser económicamente viable y consumido regularmente y en cantidades estimables por la población (79).

Sin embargo, los jugos de frutas pueden proveer la mayor parte de los nutrientes de su fuente natural, pero también tienen un alto contenido energético y con frecuencia presentan alteraciones en el contenido de fibra, vitaminas y otros beneficios no nutritivos presentes en la fruta entera antes de licuarla.

Los jugos de frutas se emplean cada vez en mayor cantidad en la industria como la bebida para reemplazar bebidas con alto contenido energético como los refrescos (80). Muchos jugos industrializados presentan la adición de azúcares ajenos a los propios de las frutas, en promedio, jugos de manzana, naranja y uva, contienen entre 88 y 128 Kcal por ración de 200 mL (81). De ello, es de suma importancia contemplar nuevas aplicaciones en ciertos frutos para la creación de bebidas que puedan contribuir beneficios a la salud, así como, conocer de dichos productos sus aportes energéticos y compuestos que contienen.

### ***1.5 Metabolismo de compuestos fenólicos***

Los polifenoles ingeridos a través de la dieta, se metabolizan en el tracto gastrointestinal. Los glucósidos son hidrolizados a sus correspondientes agliconas para ser absorbidas, de esta forma las agliconas con los polifenoles de bajo peso molecular son absorbidos directamente (48, 82). Los polifenoles que no son absorbidos son transportados al colon donde pueden ser hidrolizados por la microflora a compuestos más simples y pueden ser eliminados en las heces. Sin embargo, la fermentación realizada en las agliconas por las bacterias colónicas pueden liberar estos polifenoles de la fibra permitiendo un metabolismo similar al de estas gliconas (48).

Los polifenoles de alto peso molecular como los elagitanos no pueden ser absorbidos intactos a torrente sanguíneo por lo que son hidrolizados a ácido elágico y urolitinos para su posterior absorción. Posterior a su absorción, estos son conjugados en el hígado, donde pueden ser excretados en la orina o bilis; o pueden ser almacenados en diferentes tejidos, como en la próstata, colon y seno (83). De los compuestos excretados por la bilis pueden ser reciclados, después de una desconjugación por circulación enterohepática y así ser reabsorbido.

Estudios farmacocinéticos de absorción y eliminación de polifenoles indican que los niveles máximos por lo general se encuentran a 2 horas después de la ingesta y la vida media de este polifenol es de entre 5 y 7 horas (84).

Estudios *in vitro*, han señalado los efectos antioxidantes de los flavonoides que tienen la capacidad de inhibir enzimas pro-oxidantes o para formar complejos con iones pro-oxidantes tales como  $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$  protector de  $Cu^{2+}$ . Los flavonoides tienen una acción directa sobre la captura de ERO por donación directa de un átomo de hidrógeno (85).

Los mecanismos implicados en el proceso de digestión y absorción de los compuestos fenólicos en el lumen gastrointestinal son complejos. Según estudios *in vitro*, se ha encontrado que la interacción de compuestos como el hierro en el lumen junto con compuestos fenólicos durante la digestión, forman complejos quelantes (86), estos provocan una disminución en las concentraciones de los derivados de hidroxicinamina, flavonas y flavonoles (87), además, el aumento de los polifenoles unidos a lípidos en

---

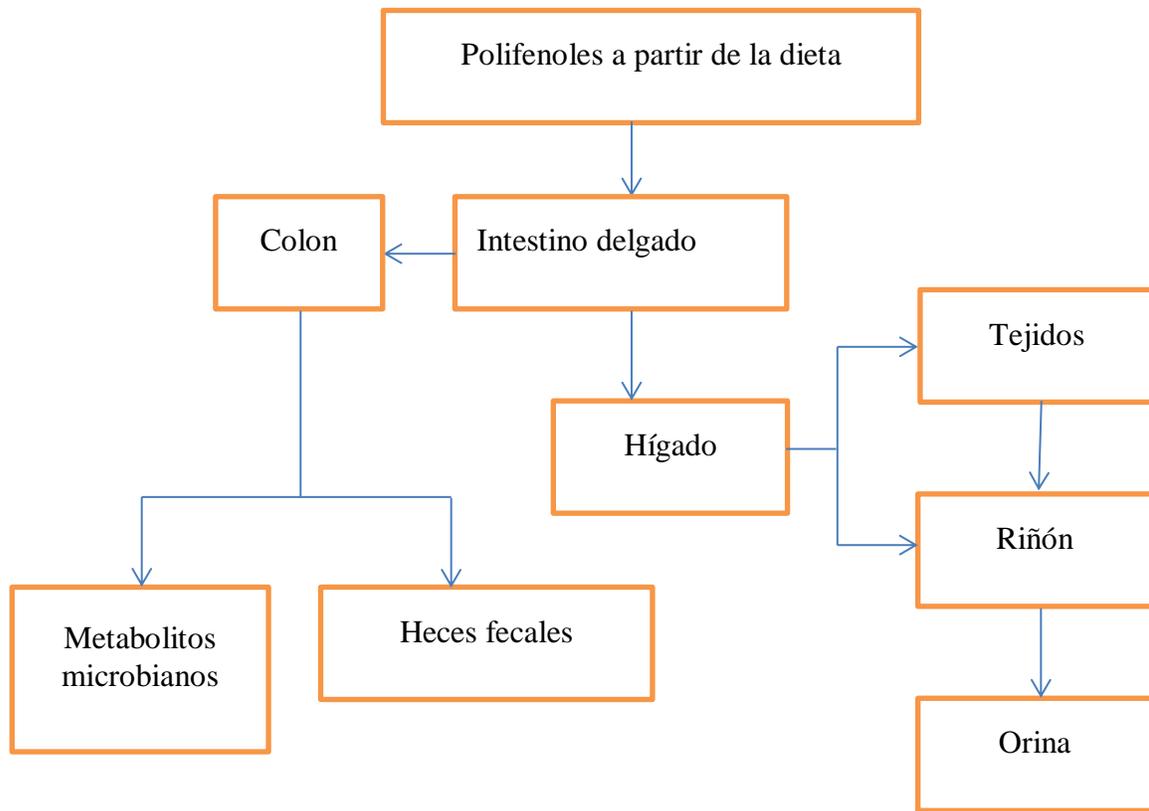
plasma podría disminuir significativamente la peroxidación lipídica en plasma como resultado de la bioactividad de los polifenoles (88), disminución del estrés oxidativo (45), así como, prevención y tratamiento en presencia de carcinoma (42).

Diferentes estudios han demostrado una rápida absorción de polifenoles, tales como procianidinas, quercetina y flavonoles en plasma a partir del consumo de frutos, alcanzando concentraciones plasmáticas máximas después de dos o tres horas de su ingesta (88, 89).

Los métodos *in vitro* sobre bioaccesibilidad, ofrecen una alternativa para el estudio en humanos y en animales, ya que son simples, rápidos, de bajo costo y pueden predecir la biodisponibilidad relativa en estudios del procesamiento en alimentos (90).

La aplicación de modelos *in vitro*, consiste en una simulación de la fase inicial de la digestión intraluminal, seguido de una absorción intestinal utilizando un modelo de diálisis (91). Los compuestos fenólicos son extensamente metabolizados tanto en tejidos como en el colon por la microflora (92).

En la figura 4, se muestra el proceso de absorción, transporte y metabolismo hepático e intestinal de los compuestos polifenólicos. El proceso inicia con los polifenoles a partir de la dieta y van a ser absorbidos en el intestino delgado para ser transportados a hígado o colon como metabolitos secundarios. De misma forma, los polifenoles pueden ser excretados a través de las heces fecales u orina.



**Figura 4.** Proceso de absorción, transporte y metabolismo de compuestos polifenólicos.

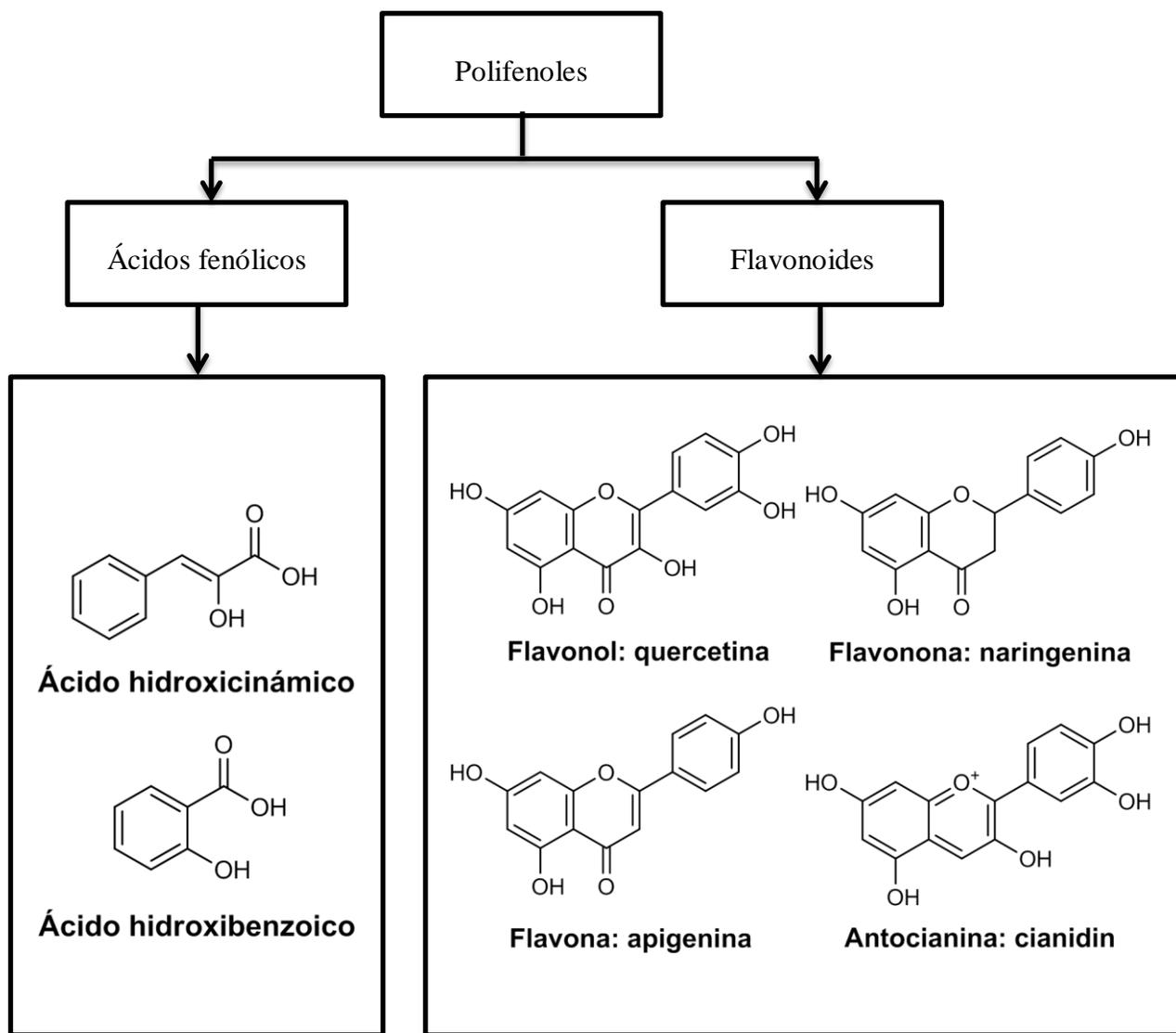
Fuente modificada: (92).

Los compuestos antioxidantes de la zarzamora son un buen objetivo de análisis, por lo que es importante estimar la liberación de sus compuestos y bioaccesibilidad intestinal *in vitro* después de la aplicación de tratamientos como la pasteurización y termoultrasonido.

### ***1.6 Bioaccesibilidad de compuestos fenólicos***

El consumo de alimentos ricos en polifenoles puede variar considerablemente y puede llegar a ser muy alto, pero el impacto nutricional y los efectos sistémicos subsecuentes dependen del destino que tengan los polifenoles en el sistema digestivo. Las características físico-químicas de los polifenoles dictan que debe existir una absorción y metabolismo rápido (48, 93).

La estructura, el grado de modificación química, el tamaño molecular, el grado de polimerización y la solubilidad, son factores importantes para conocer la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos. Los polifenoles (Figura 5), cuentan con un peso molecular pequeño, especialmente los ácidos fenólicos, como el ácido gálico y las Isoflavonas, los cuáles aparentemente son fácilmente absorbidos por el intestino delgado, estos seguidos por las catequinas, los flavononas y la quercitina glucosilada (48).



**Figura 5.** Clasificación y estructura química de polifenoles dietéticos más comunes.  
Fuente modificada: (84).

Se ha estudiado la bioaccesibilidad de estos compuestos en roedores y se encontró que la bioaccesibilidad estimada es en promedio del 10%, con un rango de 2% a 20% (94).

Datos acerca de bioaccesibilidad de polifenoles en humanos es limitado, ya que se necesitan de poblaciones grandes, sin embargo, en un estudio (92), se evaluó la bioaccesibilidad de polifenoles, en dicho estudio se concluyó que por medio de concentraciones plasmáticas de los metabolitos de los polifenoles, existía una bioaccesibilidad del 0 – 4  $\mu\text{mol/L}$  con un consumo de 50 mg equivalentes de aglicona y una excreción urinaria del 0.3% – 43% de la dosis ingerida, al igual se mencionó que la bioaccesibilidad varía dependiendo del polifenol estudiado.

La conservación de productos conllevan a la utilización de tratamientos térmicos, procesos que han sido relacionados con la degradación de compuestos bioactivos importantes (95).

### ***1.7 Tecnologías para el procesamiento de zarzamora***

Una alternativa para la completa utilización de la producción de la zarzamora es su procesamiento. Según la Food and Agriculture Organization (FAO, por sus siglas en inglés), de este fruto se pueden obtener los siguientes productos industrializados: néctares y jugos, pulpas congeladas, mermeladas y jaleas, concentrados y vinos, mismos que pueden ser empleados para el mejor aprovechamiento de su producción y cosecha (5, 6).

Durante el procesamiento de jugos de frutas, los tratamientos térmicos y otras condiciones físicas como la oxidación, exposición a luz, adición de azúcares, cambios en el pH y temperatura, reducen fácilmente el contenido de compuestos antioxidantes y propiedades nutricionales (95).

Desde hace tiempo, se han utilizado tratamientos térmicos como la pasteurización y la ultra-pasteurización para extender la vida de anaquel de ciertos alimentos, procesos que operan temperaturas mayores a los 100 °C en lapsos muy cortos de tiempo (segundos). Estos sistemas térmicos son los únicos que operan por inactivación y se usan de forma mayoritaria en la industria alimentaria, sin embargo, dichos procesos modifican el “flavor”

---

y textura de los productos frescos, así como la degradación de compuestos con capacidad antioxidante (96, 97).

En los últimos años, el consumidor demanda productos de alimentos de alta calidad, microbiológicamente seguros y estables. De esta forma, se ha despertado un creciente interés en las técnicas de conservación no térmicas capaces de inactivar microorganismos y enzimas, asegurando características físicas como el “flavor”, texturas más naturales y los compuestos con capacidad antioxidante (95, 98).

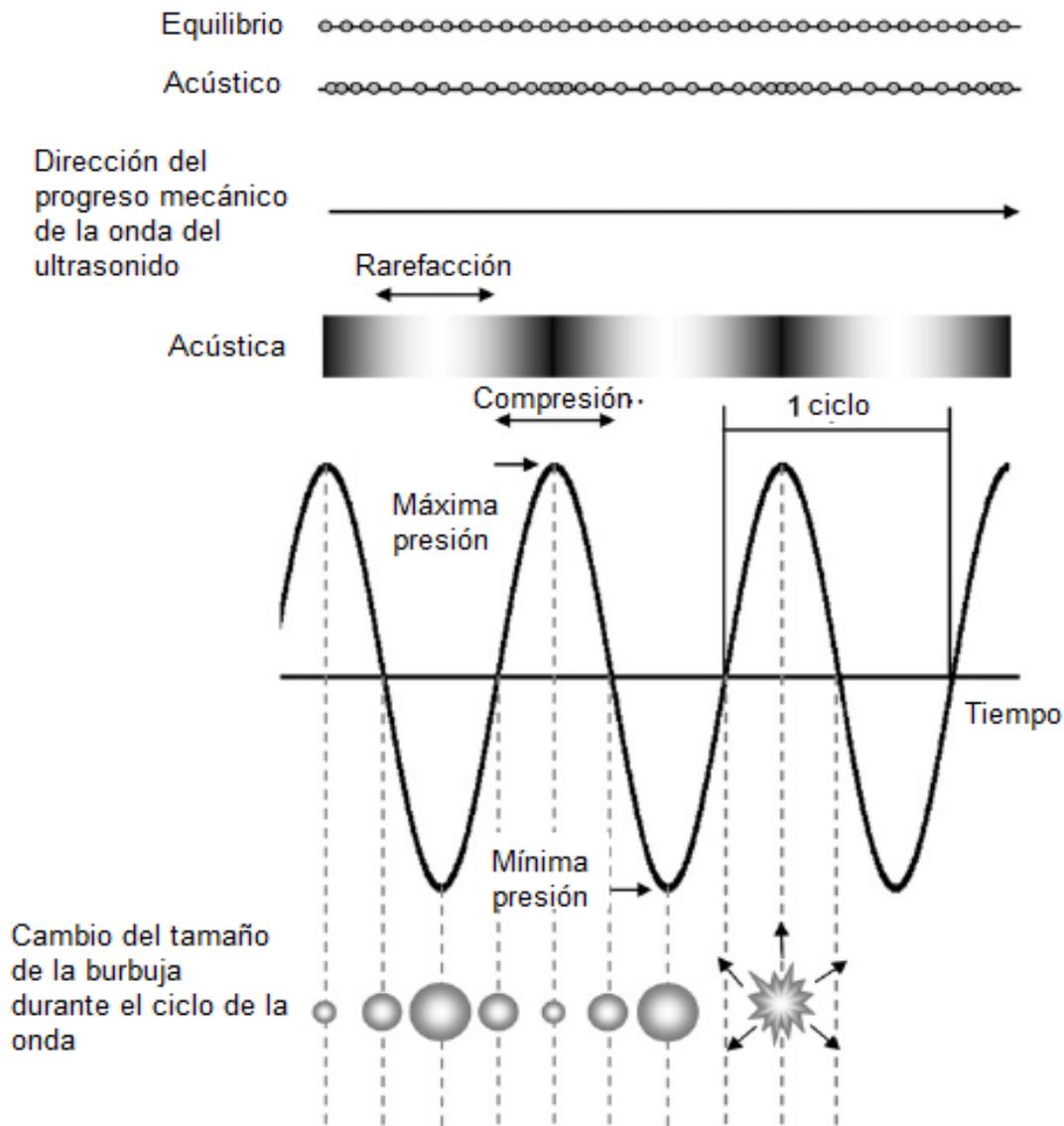
Actualmente existen tecnologías emergentes, como la ozonización, campo de pulsos eléctricos, alta-presión, ultrasonido entre otros, que pueden ser utilizados en el proceso de conservación de la materia prima y de esta forma preservar sus propiedades nutricionales, así como prolongar su vida de anaquel sin que sus características se vean modificadas (99, 100).

El ultrasonido es un proceso tecnológico no térmico que puede remplazar a tratamientos térmicos convencionales como la pasteurización y lograr una seguridad microbiana en los jugos de frutas. Esta tecnología emergente ha sido utilizada desde hace más de 30 años en la industria alimentaria, el cual consiste en someter a un alimento a ondas acústicas de frecuencia superior a los 20 kHz (101).

Esta técnica ha tenido distintos propósitos a través de los años, como la limpieza de material de laboratorio, extracción de componentes alimentarios, pre-tratamiento de cáscaras o extracción de aceites vegetales, además de la inactivación microbiana y enzimática (102, 103).

En la ultrasonicación existe un fenómeno complejo de cavitación gaseosa, que explica la generación y evolución de microburbujas en un medio líquido. La cavitación se origina en las regiones de un líquido que se someten a presiones de alta amplitud que alternan rápidamente, como se puede observar en la figura 6. Durante el ciclo negativo de presión, el líquido se encuentra sometido a un esfuerzo tensional y durante el ciclo positivo sufre una compresión y tiene como resultado la formación de microburbujas cuyo tamaño aumenta miles de veces en la alternancia de los ciclos de presión. Las microburbujas que alcanzan un tamaño crítico colapsan violentamente para volver al tamaño original.(104),

La implosión libera la energía acumulada, ocasionando incrementos de temperatura instantáneos y focales, que se disipan sin que supongan una elevación sustancial de la temperatura del líquido tratado. La energía liberada, así como el choque mecánico asociadas al fenómeno de implosión, afectan tanto a estructuras celulares situadas en el microentorno, como a microorganismos y en algunos casos, liberan compuestos antioxidantes con actividad biológica (105).



**Figura 6.** Cavitación del ultrasonido.  
Fuente: (104).

---

La ultrasonicación ha sido probada en diversos jugos de frutas, como en bebidas de soya (106), vino tinto (107), jugo de toronja (108), jugo de uva roja (109) jugo de tuna (101) y en la zarzamora (110), en donde se han comprobado beneficios, como la conservación de propiedades físicas (pH y grados Brix) y cualidades antioxidantes del jugo, al igual, se ha logrado una liberación de compuestos fenólicos así como la disminución de carga bacteriana e inactivación enzimática (101, 105).

El uso de la ultrasonicación por sí sola puede incrementar la temperatura del jugo tratado, de ello, existen diversas publicaciones en las que se han incorporado temperaturas controladas en conjunto con el ultrasonido obteniéndose resultados favorables. Aunado a este fenómeno, se menciona que la combinación de estas tecnologías, aumenta la vida de anaquel de jugos por inactivación enzimática, así como, la liberación de compuestos con actividad antioxidante como ácido ascórbico, polifenoles y licopenos, estos resultados han sido probados en jugos de manzana y sandía (111, 112).

En un estudio (113), se determinó la influencia del tratamiento de ultrasonido en la pulpa del tomate, en donde, investigaron la bioaccesibilidad *in vitro* del licopeno, en este caso, la ultrasonicación fue responsable del aumento de las propiedades del tomate que la muestra sin tratamiento, aunque la bioaccesibilidad *in vitro* del licopeno disminuyo, quizá debido a la interacción entre compuestos propios del tomate.

Al igual, en otro estudio se observó que la aplicación de sonicación a un jugo de zarzamora, retuvo significativamente el contenido de antocianinas, de esta forma, la sonicación se puede utilizar como una técnica de preservación de antocianinas y en donde su retención es deseable en el procesamiento de la zarzamora (110).

---

## II. JUSTIFICACIÓN

Aunque en México existe una producción anual importante de zarzamora (128,976 toneladas), el 90% de la producción se exporta a E.U. y el 10% se consume como fruta en fresco o de temporada. Durante el proceso pre y pos cosecha se presentan grandes pérdidas del producto debido a que la infraestructura con la que se cuenta para la comercialización de la frutilla es inadecuada. Dicha infraestructura debe poseer requerimientos específicos debido a la alta perecibilidad del fruto, ya que se necesitan ambientes controlados para aprovechar al máximo la producción y comercialización de la zarzamora.

Tratamientos térmicos convencionales como la pasteurización se ha utilizado comúnmente para extender la vida comercial de alimentos con el objetivo de inactivar microorganismos y enzimas. Sin embargo, la aplicación de dichas técnicas genera un alto consumo de energía, tiempo y costos, por otra parte, ocasiona la degradación de compuestos nutricionales así como la modificación del sabor y color de los alimentos.

A fechas recientes, se han incorporado nuevas técnicas de preservación de alimentos, como la ultrasonicación, tecnología limpia que puede completarse en menor tiempo y con menor temperatura, reduciendo de esta forma el costo del procesamiento, al igual, el producto no sufre modificaciones organolépticas, razón por la que se podría omitir la adición de sustancias para conservar sus propiedades sensoriales.

Por estudios previos en diversos frutos, se ha encontrado que el ultrasonido en conjunto con un tratamiento térmico con temperatura baja (termoultrasonido), pueden ser una alternativa a utilizar que sólo la aplicación de tratamientos térmicos altos para incrementar la vida de anaquel de jugos, ya que podría asegurar una disminución importante de actividad enzimática y de carga microbiana, así como, la liberación de compuestos con propiedades antioxidantes. Aunado a esto, se podrían ofrecer nuevas presentaciones de consumo, como el jugo de zarzamora termoultrasonificado y por ende, se otorgaría un valor agregado a la zarzamora.

### **III. HIPÓTESIS**

El jugo de zarzamora (*Rubus fruticosus spp.*), con tratamiento de termoultrasonificación y evaluación de la bioaccesibilidad intestinal *in vitro* posee un alto contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante.

### **IV. OBJETIVOS**

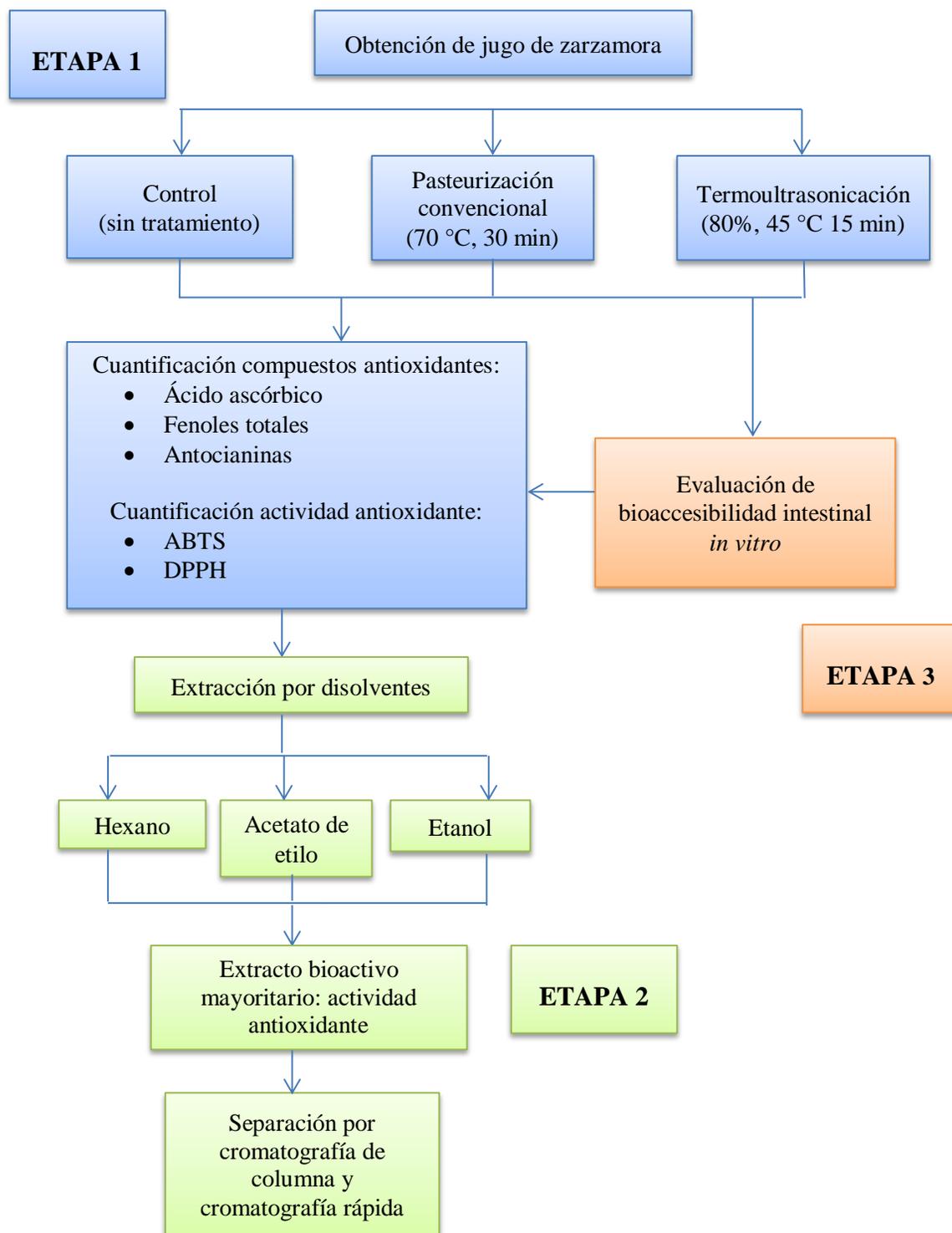
#### ***4.1 GENERAL***

Analizar la concentración de compuestos antioxidantes, capacidad antioxidante, extracción de compuestos considerando su polaridad, evaluación de la bioaccesibilidad intestinal *in vitro* de estos compuestos de jugo de zarzamora (*Rubus fruticosus spp.*) con tratamiento de termoultrasonificación en comparación con la pasteurización.

#### ***4.2 ESPECÍFICOS***

- 4.2.1 Obtener un jugo de zarzamora (CTL) y aplicar el tratamiento de o termoultrasonificación (TUS) y pasteurización (PAS) .
- 4.2.2 Cuantificar los compuestos antioxidantes y actividad antioxidante (determinada por ABTS y DPPH) de los jugos de zarzamora CTL y sometidos a tratamiento de TUS y PAS.
- 4.2.3 Extraer los compuestos bioactivos mayoritarios utilizando disolventes (hexano, acetato de etilo y etanol) de los jugos de zarzamora CTL y con tratamiento de TUS y PAS.
- 4.2.4 Cuantificar la actividad antioxidante de los compuestos bioactivos mayoritarios presentes en los jugos de zarzamora con extracción por disolventes.
- 4.2.5 Evaluar y cuantificar la bioaccesibilidad intestinal *in vitro* de los compuestos antioxidantes y actividad antioxidante presentes en los jugos de zarzamora CTL, TUS y PAS.

## V. METODOLOGÍA



**Figura 7.** Diseño metodológico.

El diseño metodológico constó de 3 etapas, en la primera, se tomaron alícuotas de las muestras control (CTL), tratamiento pasteurizado (PAS) y termoultrasonido (TUS) para ser liofilizadas y almacenadas en congelación. Se realizó la cuantificación de compuestos antioxidantes y actividad antioxidante. En la segunda etapa, se aplicó una extracción de los compuestos por disolventes de polaridad creciente (hexano, acetato de etilo y etanol) para su separación por medio de cromatografía rápida y cromatografía en columna. En la tercera etapa, se realizó un ensayo de bioaccesibilidad intestinal *in vitro* y posteriormente se realizó la cuantificación de compuestos antioxidantes y la actividad antioxidante (Figura 7).

## ***Etapas 1***

### ***5.1 Obtención de la materia prima y jugos de zarzamora.***

Las zarzamoras (*Rubus fruticosus spp*) fueron proporcionadas por productores de la localidad de Atotonilco, Hidalgo, México, durante los meses de diciembre del 2013 y enero del 2014, se seleccionaron sólo las frutas sin daños externos.

Las zarzamoras fueron homogeneizadas con una licuadora comercial (Hamilton Beach<sup>®</sup> Health Smart<sup>®</sup> modelo 67900-MX) para obtener su jugo. Una vez obtenido el jugo, se filtró dos veces con un colador comercial de plástico para eliminar residuos sólidos y tejidos del fruto.

Fueron utilizados tres jugos de zarzamora para realizar el presente trabajo. El primero sin tratamiento (usado como control), el segundo sometido a tratamiento por pasteurización (70 °C, 30 min) y el tercero se sometió a tratamiento por termoultrasonido (Ultrasonic Processor VCX-1500, Sonics & Materials, Inc. Newtown, CT, USA), con las siguientes condiciones: 45 °C de temperatura constante usando un baño de agua (Cole-Parmer 12108-10 U.S.A.), frecuencia constante de 20 kHz usando una celda con capacidad de 400 mL, amplitud de 80% durante 15 min con duración de pulso de 4 s encendido y 2 s apagado, las características anteriores fueron en base a un estudio de superficie respuesta. Posteriormente, los jugos se sometieron a congelación (-32 °C) para ser liofilizados (Liofilizadora Labconco, FreeZone<sup>6</sup>, Kansas USA.) durante 4 días a una temperatura constante de  $-55 \pm 1$  °C y vacío constante de 0.140 mbar.

---

## ***5.2 Actividad antioxidante***

### ***5.2.1 Determinación de ácido ascórbico***

Para la determinación de ácido ascórbico (AA), se empleó el método colorimétrico (114), empleando el reactivo DCPI que tiene una coloración azul-violeta y al reaccionar con el AA ocurre una decoloración a rosa tenue o incoloro. Se prepararon las siguientes soluciones: DCPI, amortiguador de acetato al 1 M con pH de 6 y solución de AA. Se realizó una curva estándar, para ello, se efectuaron concentraciones a partir de la solución de AA: 0, 10, 20, 30, 40, y 50 mg/L, se tomaron 100  $\mu$ L de cada concentración para la obtener la curva de referencia.

La técnica para la curva y para la muestra de estudio se realizó vertiendo 100  $\mu$ L de la muestra, 100  $\mu$ L de amortiguador de acetatos y 800  $\mu$ L de DCPI en viales Eppendor color ámbar con capacidad de 2 mL. Se determinó la absorbancia (Abs) a 520 nm (Lector de microplacas Power Wave XS UV-Biotek, software KC Junior, USA) y se utilizó ácido oxálico como blanco al 0.4%. Los resultados se expresaron como miligramos de ácido ascórbico por litro de muestra (mg AA/L).

### ***5.2.2 Compuestos fenólicos totales***

La determinación de compuestos fenólicos totales (CFT) se realizó por medio del método Folin-Ciocalteu (115). El Folin-Ciocalteu, es una mezcla de ácido fosfotúngstico y ácido fosfomolibdico, los cuales son reducidos a óxidos azules de tungsteno y molibdeno durante la oxidación fenólica, esta reducción ocurre bajo condiciones alcalinas mediante la presencia de carbonato de sodio.

Se realizó una curva estándar de la concentración de compuestos fenólicos, para esto, se preparó una solución con 400 mg de ácido gálico por litro de agua desionizada. A partir de esta solución se prepararon las siguientes concentraciones: 0, 100, 200 y 300 mg/L, se tomaron 100  $\mu$ L de cada concentración para la obtención de la curva.

La técnica para la curva y para la muestra de estudio consistió en verter 100  $\mu$ L de solución de Folin-Ciocalteu al 7% (1:10 en agua desionizada) y 400  $\mu$ L de solución de carbonato de

sodio al 7.5% en viales Eppendor color ámbar de 2 mL de capacidad. Las muestras se agitaron en vortex y se reposaron a temperatura ambiente durante 30 min. Se realizó la lectura de Abs a 765 nm (Lector de microplacas Power Wave XS UV-Biotek, software KC Junior, USA) al finalizar dicho tiempo. Los resultados se reportaron como miligramos equivalentes de ácido gálico por litro de muestra (mg EAG/L).

### 5.2.3 Antocianinas

Para la determinación de antocianinas se empleó el método diferencial de pH (116). Los pigmentos de antocianinas sufren transformaciones estructurales reversibles con un cambio en el pH que se manifiesta por diferentes espectros de absorbancia. La forma de color oxonio predomina a pH de 1.0 y la forma incolora hemiacetal a pH de 4.5. El método diferencial de pH, se basa en esta reacción y permite la medición precisa y rápida de antocianinas totales, incluso en la presencia de pigmentos degradados polimerizados y otros compuestos de interferencia.

Se prepararon reactivos de cloruro de potasio a 0.025 M (pH de 1.0) y acetato de sodio a 0.4 M (pH de 4.5). Se obtuvo el sobrenadante del jugo, del cual, se tomaron 500 µL y se vertieron en tubos de plástico con capacidad de 15 mL con los reactivos; 4.5 mL de cloruro de potasio y 4.5 mL de acetato de sodio, respectivamente en tubos separados. Posteriormente se taparon los tubos y se agitaron en Vortex para reposarlos en baño de agua (PolyScience MX06S135-AA1B U.S.A.) a 25 °C durante 15 min. Concluido el tiempo, se tomaron 200 µL de cada tubo para su lectura. La absorbancia se midió a 510 nm y 700 nm (Lector de microplacas Power Wave XS UV-Biotek, software KC Junior, USA) para ambas placas, en donde se empleó la siguiente fórmula para el cálculo de antocianinas totales:

$$\text{Antocianinas totales (mg/L)} = (A * MW * DF * 10,000) / (\epsilon * Tc)$$

En donde:

A = absorbancia de la resta entre valores (510 – 700) correspondiente a cloruro de potasio menos la absorbancia de la resta de valores (510 – 700) de acetato de sodio.

MW = tamaño de la molécula de cianidin-3-glucósido (449.2 g/mol).

DF= factor de dilución (1:100).

$\epsilon$ = absorción molar (26,900 L/cm/mg).

Tc= tamaño de la cubeta de la microplaca (0.52 cm).

Los resultados se reportaron como miligramos de cianidin-3-glucósido por litro de muestra (mg cianidin-3-glucósido/L).

#### ***5.2.4 Determinación de actividad antioxidante por ABTS<sup>•+</sup>***

La determinación de actividad antioxidante por ABTS se realizó de acuerdo al método químico para determinar actividad antioxidante (117). Se preparó una solución de ABTS<sup>•+</sup> al 7 mM/L con persulfato de potasio al 2.45 mM/L, se incubó durante 16 h en completa oscuridad a temperatura ambiente, transcurrido el tiempo, se diluyó en agua desionizada (proporción 1:15) hasta obtener una Abs de entre 0.7 y 0.9. Se realizó una curva estándar, para esto se efectuaron concentraciones a partir de la solución de etanol con ácido ascórbico: 0, 5, 10, 20, 30, 40, y 50 mg/L, se tomaron 20  $\mu$ L de cada concentración para la obtención de la curva de referencia.

La técnica para la curva y para la muestra de estudio se realizó vertiendo 20  $\mu$ L de la muestra en viales Eppendorf de 2 mL color ámbar, 980  $\mu$ L de solución ABTS previamente diluida con agua desionizada, se agitó el vial por Vortex y se reposó durante 7 min, posteriormente se determinó la Abs a 754 nm (Lector de microplacas Power Wave XS UV-Biotek, software KC Junior, USA). Se utilizó agua desionizada como blanco. Los resultados se expresaron como miligramos de vitamina C por litro de muestra (mg VC/L).

### ***5.2.5 Determinación de la actividad antirradical por el método DPPH***

Para la determinación de actividad antirradical se empleó el método DPPH (118), el cual es un radical libre estable que en una solución etanólica, presenta una coloración violeta intenso, si a ésta solución se le agrega una sustancia susceptible de atrapar radicales libres (Trolox), el electrón no apareado del DPPH se aparea e inmediatamente presenta una decoloración que puede ir hasta un tono amarillo

Se realizó una disolución de DPPH al 0.07% en etanol y una curva estándar de Trolox (molécula de referencia), con las siguientes concentraciones en etanol: 0, 50, 100, 200 y 300  $\mu\text{mol}$  Trolox/L, para la obtención de la curva estándar.

La técnica para la curva y para la muestra de estudio consistió en verter 100  $\mu\text{L}$  de la muestra diluida y 500  $\mu\text{L}$  de la solución de DPPH en viales Eppendorf color ámbar de 2 mL, se agitaron en vortex y se reposaron a temperatura ambiente durante 60 min, transcurrido el tiempo se centrifugaron (Centrífuga Beckman Coulter, Allegra™ 25R California) a 10,000 rpm durante 5 min, a 4 °C y se midió la Abs del sobrenadante a 520 nm (Lector de microplacas Power Wave XS UV-Biotek, software KC Junior, USA). La actividad antioxidante por DPPH se reportó en  $\mu\text{mol}$  equivalente de Trolox por litro de muestra ( $\mu\text{mol}$  ET/L).

## ***Etapa 2***

### ***5.4 Extracción de compuestos por disolventes***

#### ***5.4.1 Obtención de extractos***

Se procedió a obtener los extractos del jugo liofilizado por hexano ( $\text{C}_6\text{H}_{14}$ ), acetato de etilo ( $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$ ) y etanol ( $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ ), mediante la dilución de 25 g de muestra en 250 mL del disolvente, posteriormente se agitó y se sometió a filtrado (filtro de papel Whatman # 4, 110 mm) y concentrado en rotavapor (Rotavapor Büchi labortechnik, AG CH-9230 Suiza) a 45 °C.

### ***Etapa 3***

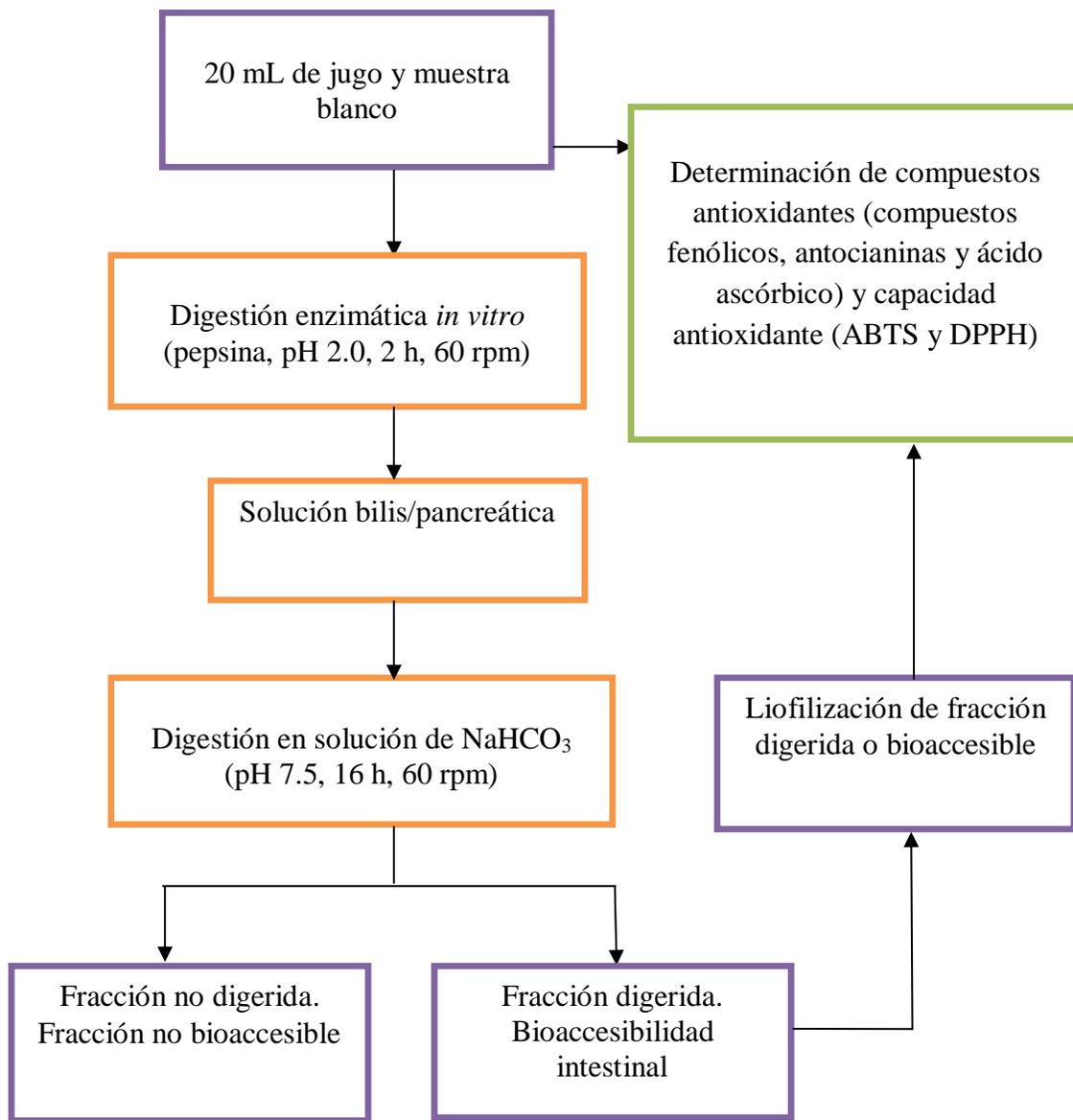
#### ***5.3 Determinación de la bioaccesibilidad intestinal in vitro de compuestos antioxidantes y de la capacidad antioxidante***

La bioaccesibilidad intestinal de los compuestos antioxidantes y capacidad antioxidante fueron determinados mediante una fase inicial de simulación de digestión intraluminal, seguida por una fase de diálisis simulando la absorción intestinal. Lo anterior se llevó a cabo utilizando un modelo de digestión *in vitro* (119), con algunas modificaciones (120). La bioaccesibilidad intestinal de los compuestos antioxidantes (compuestos fenólicos y ácido ascórbico) y de la capacidad antioxidante (ABTS y DPPH), fueron determinadas como la diferencia de los parámetros (compuestos antioxidantes y capacidad antioxidante) en la muestra sin tratamiento y en la fracción dializada aislada de la muestra.

Se tomaron 20 mL de cada jugo de zarzamora y una muestra blanco, se ajustó el pH a 2 con HCl 6 M. La muestra fue incubada con 120  $\mu$ L de una disolución de pepsina (40 mg pepsina - Sigma Aldrich P-7000 por mL de HCL 0,1 M) en una incubadora (LabTech, Shaking incubators, modelo LSI-306R, Nueva Delhi) con agitación de 60 rpm a 37 °C por 2 h. Después de la incubación se agregaron 1,5 mL de una disolución bilis-pancreatina (5 mg de enzima pancreatina P-1750 Sigma Aldrich - más 25 mg bilis porcina B-8631 Sigma Aldrich - por mL de NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M).

Las muestras digeridas por las enzimas fueron depositadas en una bolsa de diálisis con tamaño de corte de 12 KDa, y se sometieron a diálisis (transferencia de compuestos de bajo peso molecular) en una solución de bicarbonato de sodio (pH 7,5) durante 16 h en una incubadora (LabTech, modelo LSI-306R, N Delhi) con agitación de 60 rpm. Transcurrido el tiempo, se obtuvieron dos fracciones: 1) la fracción digerida y; 2) la fracción no digerida.

Posteriormente, las fracciones digeridas o bioaccesibles se sometieron a congelación (-32 °C) para ser liofilizadas (Liofilizadora Labconco, FreeZone<sup>6</sup>, Kansas USA.) durante 4 días a una temperatura constante de  $-55 \pm 1$  °C y vacío constante de 0.140 mbar para obtener el rendimiento de estas muestras (figura 8).



**Figura 8.** Esquema del método para la determinación “*in vitro*” de la bioaccesibilidad intestinal de compuestos antioxidantes y capacidad antioxidante.

---

### ***5.5 Análisis estadístico***

Todas las pruebas fueron realizadas por triplicado. Se realizó un diseño experimental cuantitativo con la aplicación de un análisis de varianza (ANOVA) mediante modelo lineal general multivariante y una comparación de medias para determinar diferencias entre los tratamientos mediante la prueba de Tukey utilizando el Software SPSS versión 15.0. Las diferencias en  $p \leq 0.05$  fueron consideradas estadísticamente significativas. Se realizó un coeficiente de correlación bivalente a nivel  $p \leq 0.01$  por Pearson ( $R^2 = 0.9$  y  $R^2 = 0.8$ ) para la actividad antioxidante. Las variables dependientes fueron: compuestos antioxidantes (ácido ascórbico, fenoles totales y antocianinas totales) actividad antioxidante (determinación por ABTS y DPPH); las variables independientes fueron: tratamientos aplicados a las muestras (control, pasteurizado y termoultrasonificado).

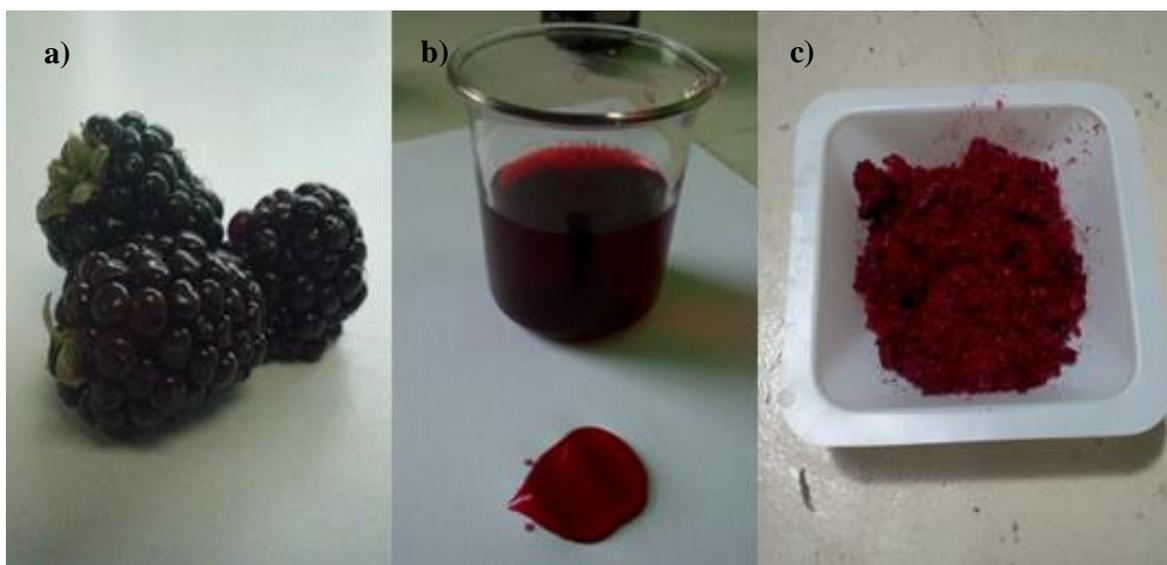
## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### *Etapa 1*

#### *6.1 Obtención de jugos de zarzamora*

Se elaboraron los diferentes jugos de zarzamora; control (CTL), pasteurizado (PAS) y termoultrasonificado (TUS), de los cuales, se obtuvo un rendimiento del  $57 \pm 1\%$  correspondiente al jugo y  $43 \pm 1\%$  al residuo. En un estudio (121), se determinó que el procesamiento de la zarzamora genera un 20% de residuo. En el presente trabajo existió menor cantidad de jugo, posiblemente a que el fruto fue sometido a pocos pulsos de licuado para evitar homogeneizar las semillas y otros tejidos. La muestra obtenida fue colada dos veces para recuperar solo el jugo clarificado de la zarzamora.

Las muestras presentaron un color rojo intenso característico del fruto (Figura 9). Posteriormente los jugos fueron sometidos a liofilización obteniendo  $91 \pm 1\%$  de humedad total.



**Figura 9.** a) zarzamora, b) jugo de zarzamora y c) liofilizado de jugo.

## 6.2 Actividad antioxidante

En la tabla 4, se muestran los resultados obtenidos del contenido de compuestos antioxidantes y de la actividad antioxidante correspondiente a los jugos de zarzamora.

**Tabla 4.** Compuestos antioxidantes y actividad antioxidante de los jugos de zarzamora control, pasteurizado y termoultrasonificado.

	<b>Jugo CTL</b>	<b>Jugo PAS</b>	<b>Jugo TUS</b>
<b>Ácido ascórbico</b> mg AA/L	27.75 ± 0.83 <sup>c</sup>	25.23 ± 0.83 <sup>b</sup>	21.26 ± 0.62 <sup>a</sup>
<b>Fenoles totales</b> mg EAG/L	726.20 ± 4.77 <sup>a</sup>	789.59 ± 3.87 <sup>b</sup>	1,011.56 ± 3.93 <sup>c</sup>
<b>Antocianinas</b> mg A/L	106.31 ± 1.27 <sup>b</sup>	94.38 ± 4.23 <sup>a</sup>	118.69 ± 1.44 <sup>c</sup>
<b>ABTS</b> mg VC/L	13.55 ± 0.17 <sup>b</sup>	11.47 ± 0.36 <sup>a</sup>	44.69 ± 1.20 <sup>c</sup>
<b>DPPH</b> µmol ET/L	1,146.48 ± 1.86 <sup>a</sup>	1,319.76 ± 1.04 <sup>b</sup>	2,655.89 ± 14.0 <sup>c</sup>

Diferentes letras en la misma línea indican diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre los jugos. AA= ácido ascórbico; EAG=equivalentes de ácido gálico; ET= equivalentes de Trolox; VC= vitamina C; A= antocianinas; CTL= control; PAS= pasteurizado; TUS = Termoultrasonificado.

### 6.2.1 Ácido ascórbico.

Los valores obtenidos en el jugo de zarzamora fueron de 27 mg AA/L. Estos resultados tienden a ser diferentes en comparación con otros estudios, Pantelidis y colaboradores (2006) (19), obtuvieron valores entre 14 y 17 mg AA/L, mientras que De Souza y colaboradores (2014) (70), obtuvieron un promedio mayor (52 mg AA/L) de contenido de ácido ascórbico.

El ácido ascórbico disminuyó por los tratamientos aplicados, tanto en el jugo pasteurizado como en el termoultrasonido, aunque en este último la disminución de este compuesto fue más drástica (24%), en comparación con el pasteurizado (9%). Este comportamiento pudiera ser causado a las reacciones de oxidación del ácido ascórbico ocasionada por la temperatura que se utilizó como tratamiento. La aplicación de ambos tratamientos en la conservación del jugo de zarzamora conllevan una temperatura mayor de 45 °C (termoultrasonido 45 °C y pasteurización 72 °C). Según diferentes autores, el ácido ascórbico sufre reacciones de oxidación con estas temperaturas alcanzadas (95, 122).

Por otra parte, investigadores (110) establecen que cuando la sonicación se lleva a cabo con temperaturas mayores de 45 °C y tiempos prolongados (15–30 min), la degradación del ácido ascórbico aumenta, debido a las condiciones físicas extremas que se producen dentro de las burbujas que colapsan a micro escala durante el proceso de ultrasonificación. Por lo tanto, la combinación de condiciones como la temperatura aplicada, tiempo de tratamiento y cavitación del ultrasonido conllevan a una mayor oxidación de ácido ascórbico.

### ***6.2.2 Fenoles totales.***

Con respecto a los valores de fenoles totales, los resultados del jugo de zarzamora fueron de 726 mg EAG/L, siendo estos valores mayores que los obtenidos por Isik y colaboradores (2011) (123) en este mismo fruto (435 mg EAG/L). Los valores presentados por la muestra control fueron menores significativamente, en comparación con el jugo pasteurizado y el jugo termoultrasonido.

A diferencia del comportamiento del ácido ascórbico, siendo el tratamiento con termoultrasonido el que presentó un mayor incremento de compuestos fenólicos (39%) en comparación con el jugo pasteurizado (9%). Los tratamientos aplicados al jugo de zarzamora presentaron una mayor concentración de compuestos fenólicos totales en comparación con la muestra control.

Esta diferencia de incremento de compuestos fenólicos entre los tratamientos, pudiera deberse principalmente en el jugo pasteurizado a la aplicación de temperatura. Según lo establecido por Rawson y colaboradores (2011) (112), mencionan que a temperaturas de 45

°C se produce una liberación de compuestos fenólicos en un jugo de sandía, debido a la ruptura de estructuras celulares, sin embargo, también establece que a temperaturas cercanas o mayores de 70 °C, puede llegar a existir una degradación de estos compuestos. La temperatura antes mencionada fue aplicada en este estudio, en el que el jugo de zarzamora pasteurizado alcanzó una temperatura de 70 °C transcurridos 30 minutos de proceso.

Esta disminución de compuestos fenólicos ocasionado a los tratamientos de pasteurización también ha sido presentada por Aguilar-Rosas y colaboradores (2007) (124) en un jugo de manzana, siendo de forma importante esta degradación a la temperatura de 80 °C durante 15 min.

El jugo termoultrasonificado presentó una mayor liberación de compuestos fenólicos (1,011 mg EAG/L), lo cual pudo deberse a una efecto sinérgico entre la temperatura alcanzada, tiempo de procesamiento y cavitación ejercida por el tratamiento, efecto que rompe los tejidos celulares y libera compuestos. Este resultado de liberación de compuestos fenólicos fue similar a lo encontrado en otro estudio en jugo de sandía (112), no obstante, en el presente estudio se utilizó menor temperatura, aunque mayor tiempo de procesamiento.

### **6.2.3 Antocianinas.**

Los valores correspondientes a antocianinas en el jugo de zarzamora control fueron de 106 mg de cianidin-3-glucósido/L. Estos valores fueron mayores a los presentados por Acosta-Montoya y colaboradores (2009) (17), de 77 mg de cianidin-3-glucósido/L. La diferencia en estos resultados en el contenido de antocianinas en la zarzamora depende de diferentes factores, tanto genéticos, climáticos, así como el manejo de la cosecha (70). Los valores encontrados en el presente estudio fueron menores para el jugo pasteurizado (94 mg de cianidin-3-glucósido/L) mientras que el jugo termoultrasonificado, presentó la mayor extracción de antocianinas ( $p \leq 0.05$ ) estadísticamente significativa.

Las antocianinas son compuestos muy inestables, su degradación puede ser producida por el pH, la luz, oxígeno, enzimas, ácido ascórbico y tratamientos térmicos (110), lo que

conlleva a que el tratamiento por pasteurización haya provocado cierta oxidación de las antocianinas.

Los valores obtenidos de antocianinas en el jugo de zarzamora tratado con termoultrasonido (118 mg de cianidin-3-glucósido/L), coinciden con los obtenidos por Ivanovic y colaboradores (2014) (125), en donde el mayor rendimiento de extracción y liberación de antocianinas en un jugo de zarzamora ultrasonificado, se presentó en condiciones de tratamiento, 40 °C durante un lapso de 15 min, obteniendo de esta forma, un incremento del 20% de los valores de antocianinas.

Por otra parte, estos resultados fueron mayores a los encontrados por Tiwari y colaboradores (2009) (110), quienes refirieron valores entre 96 y 99 mg de cianidin-3-glucósido/L, para un jugo de zarzamora ultrasonificado usando un diseño de superficie respuesta (amplitud del 70%,  $25 \pm 1$  °C, 10 min). Posiblemente, este comportamiento pudo deberse a la diferencia de las temperaturas que se mantuvieron en el presente trabajo (45 °C), mientras que en el estudio referido en comparación, la temperatura durante el proceso fue menor.

Es evidente que la combinación de temperatura aplicada y ultrasonificación pueden ser clave para la extracción de una mayor cantidad de antocianinas en el jugo de zarzamora.

#### ***6.2.4 Actividad antioxidante por ABTS<sup>•+</sup> y DPPH.***

La actividad antioxidante en el jugo de zarzamora control (determinada por ABTS), fue de 13 mg VC/L, similar a lo reportado por Acosta-Montoya y colaboradores (2009) (17). Después de la aplicación de los tratamientos, el jugo pasteurizado fue el que presentó menor valor ( $p \leq 0.05$ ) de actividad antioxidante por ABTS (11 mg VC/L), mientras que el jugo termoultrasonificado fue el que presentó mayor actividad estadísticamente significativa con valores de 44 mg VC/L.

La actividad antioxidante por DPPH, se realizó una correlación con los contenidos de antioxidantes a un nivel de significancia de  $p \leq 0.01$  y se observó una mayor correlación con el contenido de ácido ascórbico y con fenoles totales ( $R^2 = 0.99$  y  $0.93$ , respectivamente), y

en menor medida con las antocianinas totales, mientras que la actividad antioxidante por ABTS tuvo correlación con mayor con el contenido de fenoles totales ( $R^2 = 0.96$ ) y antocianinas totales ( $R^2 = 0.92$ ), y en menor medida con el ácido ascórbico (Tabla 5), este último se debió posiblemente por la reducción con el ácido ascórbico durante los tratamientos utilizados, especialmente en la pasteurización como ya se hizo referencia en apartados anteriores. Lo anterior ha sido también referido en los estudios establecidos por Pellegrini y colaboradores (2003), considerando a la zarzamora como el fruto con mayor capacidad antioxidante por su importante contenido de ácidos fenólicos, flavonoides y antocianinas (126).

**Tabla 5.** Coeficientes de correlación entre la actividad antioxidante y los contenidos de antioxidantes de la zarzamora.

	<b>ABTS</b>	<b>DPPH</b>
<b>Ácido ascórbico</b>	0.87 *	0.93 *
<b>Fenoles totales</b>	0.96 *	0.99 *
<b>Antocianinas totales</b>	0.92 *	0.85 *

\* Correlación con nivel de significativa al nivel  $p \leq 0.01$  (bilateral).

Los valores obtenidos de los jugos de zarzamora de la actividad antioxidante utilizando como antirradical DPPH, fueron de 1,146  $\mu\text{mol ET/L}$  en el jugo control. Estos valores fueron menores (Tabla 4) que los presentados por Acosta-Montoya y colaboradores (2009) (17), quienes cuantificaron la actividad antioxidante utilizando el antirradical DPPH en la zarzamora obteniendo valores de 2,142  $\mu\text{mol ET/L}$ .

Los tratamientos utilizados incrementaron esta actividad antioxidante, el jugo pasteurizado presentó una mayor actividad antioxidante (1,319  $\mu\text{mol ET/L}$ ) en comparación con el jgo control, mientras que el jugo termoultrasonificado, presentó el doble de los valores (2,655  $\mu\text{mol ET/L}$ ), probablemente a causa del ablandamiento de la matriz, concentración y el

---

aumento de capacidad de extracción de compuestos antioxidantes ocasionados por la aplicación de temperatura (127).

Según diversos autores establecen que el efecto del ultrasonido puede romper la estructura celular de las vacuolas, afectando de igual forma a la fibra contenida en la fruta y por ende se liberan polifenoles y otros compuestos con capacidad antioxidante (101, 108, 110). Estos valores se correlacionaron principalmente con los fenoles totales y con la determinación de ácido ascórbico y en menor medida con las antocianinas como se muestra en la tabla 5.

## ***Etapa 2***

### ***6.3 Extracción de compuestos por disolventes***

#### ***6.3.1 Obtención de extractos***

Se efectuaron diferentes extracciones de compuestos en los jugos liofilizados de zarzamora; CTL, PAS y TUS, de los cuales, se obtuvo su rendimiento presentado en la tabla 6. Las extracciones se llevaron a cabo en polaridad creciente de los disolventes, iniciando con hexano, seguido por acetato de etilo y finalizando con etanol.

El jugo liofilizado presentó una menor extracción de compuestos con hexano y acetato de etilo, disolventes no polares. En contraparte, existió mejor solubilidad de compuestos y extracción de los mismos con disolventes como el etanol, por lo que obtuvo mayor rendimiento de compuestos con mediana y alta polaridad.

**Tabla 6.** Rendimiento de extracción de sólidos totales por disolventes (g/25 g bs)

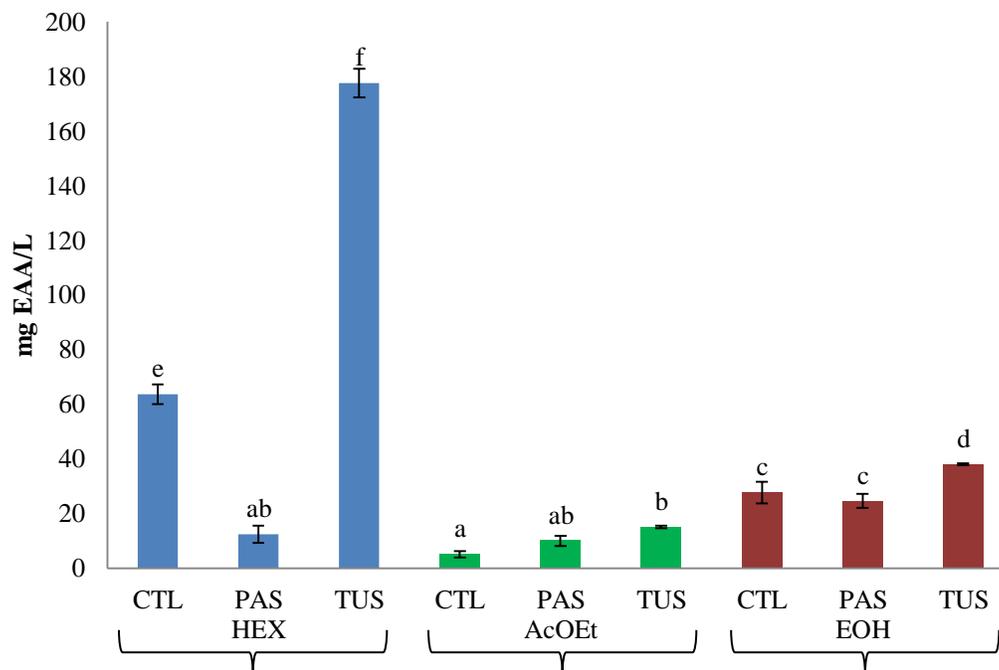
	<b>Jugo CTL</b>	<b>Jugo PAS</b>	<b>Jugo TUS</b>
<b>Hexano</b>	0.031 ± 0.04 <sup>ab</sup>	0.042 ± 0.05 <sup>b</sup>	0.024 ± 0.04 <sup>a</sup>
<b>Acetato de etilo</b>	0.179 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.250 ± 0.06 <sup>b</sup>	0.240 ± 0.01 <sup>b</sup>
<b>Etanol</b>	14.202 ± 0.49 <sup>a</sup>	14.632 ± 2.42 <sup>a</sup>	15.113 ± 0.46 <sup>a</sup>

Diferentes letras en la misma línea indican diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre los jugos en la misma determinación.

bs= base seca; CTL= control; PAS= pasteurizado; TUS = Termoultrasonico.

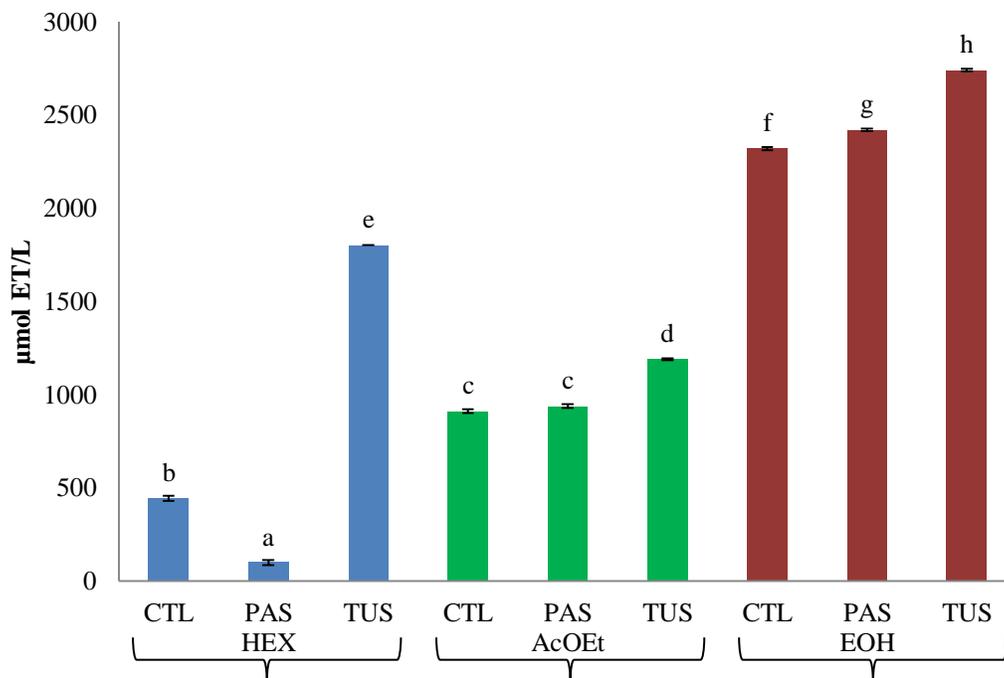
Posteriormente se realizó la actividad antioxidante por ABTS de los diferentes extractos, lo cual se muestra en la figura 10. En la determinación por ABTS, la extracción con hexano del jugo termoultrasonico fue la muestra que presentó mayor concentración de ácido ascórbico ( $p \leq 0.05$ ). Es posible que esta muestra también contenga ácidos grasos liberados por el proceso de termoultrasonido, que pudieran contribuir con la actividad antioxidante de la muestra de estudio (128).

En la determinación por DPPH (Figura 11), la extracción con etanol del jugo termoultrasonico, fue la muestra que presentó valores significativamente mayor de actividad antioxidante comparando con las otras extracciones. El incremento de la actividad antioxidante fue mayor conforme se incrementó la polaridad de los disolventes para la extracción de compuestos. Este incremento pudo deberse al contenido de compuestos polares mencionados anteriormente como polifenoles y antocianinas (17, 125).



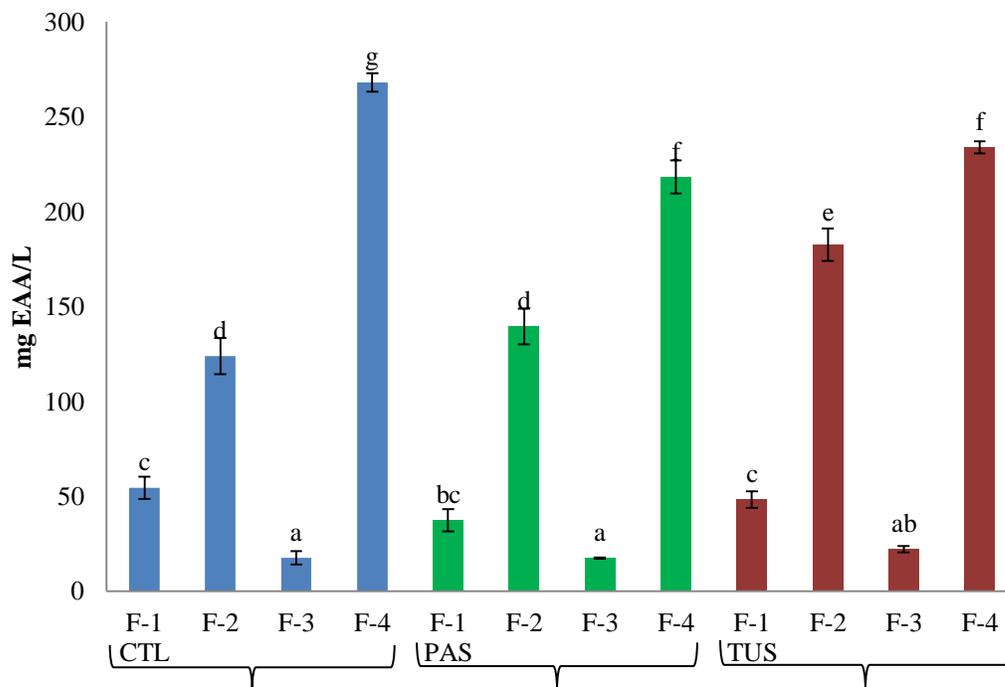
**Figura 10.** Actividad antioxidante por ABTS de las extracciones por disolventes. <sup>a-f</sup> Diferentes letras indica diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre las fracciones de extracción por disolventes.

En ambas determinaciones (ABTS y DPPH), la actividad antioxidante de los jugos se incrementó con el tratamiento de pasteurización. Sin embargo, el tratamiento de termoultrasonido, presentó una mayor capacidad para liberar compuestos antioxidantes. El termoultrasonido además pudiera ocasionar inhibición de reacciones enzimáticas y por lo tanto, evita la degradación de diferentes compuestos antioxidantes como el ácido ascórbico, polifenoles, entre otros (102, 105).



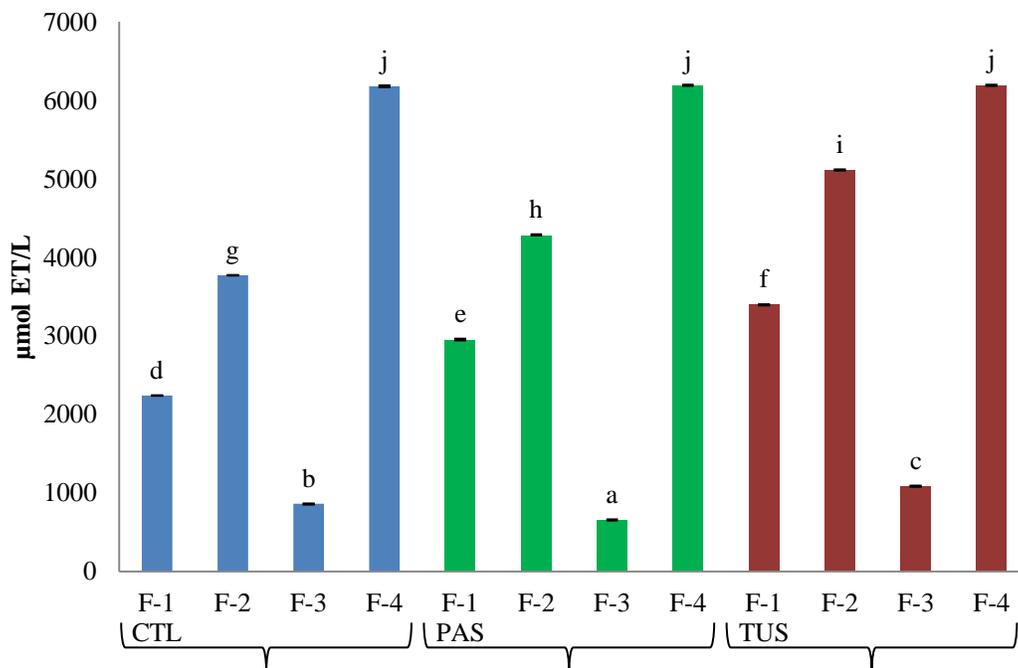
**Figura 11.** Actividad antioxidante por DPPH de las extracciones por disolventes. <sup>a-h</sup> Diferentes letras indica diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre las fracciones de extracción por disolventes.

Debido a que la muestra extraída por etanol fue la que presentó mayor rendimiento de compuestos así como de actividad antioxidante por DPPH, se realizó la separación de la muestra en fracciones mediante una columna de vidrio con diámetro interno de 2 cm y sílice gel grado técnico, poro 60 Å y tamaño de partícula 40 – 634 µm, obteniéndose cuatro fracciones. De las fracciones obtenidas la última presentó mayor actividad antioxidante por DPPH en las muestras CTL, PAS y TUS (2,320 µmol ET/L; 2,420 µmol ET/L y 2,741 µmol ET/L respectivamente). Estos resultados se presentan en las figuras 12 y 13.



**Figura 12.** Actividad antioxidante por ABTS de las fracciones por columna de sílica gel.  
<sup>a-g</sup> Diferentes letras indica diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre las fracciones de extracción etanólica.

Como ya se había mencionado anteriormente, la actividad antioxidante de la zarzamora es la suma de todos los compuestos antioxidantes presentes, polifenoles, incluyendo antocianinas, flavonoles, ácido clorogénico y procianidinas (129), entre otros. Es por esto que se sometieron dichas extracciones a nueva fracción en sílica gel con polaridad creciente por acetato de etilo y metanol para dividir y determinar sus compuestos.



**Figura 13.** Actividad antioxidante por DPPH de las fracciones por columna de sílica gel. <sup>a-j</sup> Diferentes letras indica diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre las fracciones de extracción etanólica.

### ***Etapa 3***

#### ***6.4 Fracción bioaccesible in vitro de los jugos de zarzamora***

Se llevó a cabo la bioaccesibilidad intestinal *in vitro* de los diferentes jugos de zarzamora, de los cuales, se obtuvieron los rendimientos a partir de 20 mL de muestra (Tabla 7). Posteriormente, las fracciones dializadas de los jugos fueron sometidos a liofilización.

Los resultados en el presente trabajo refieren que los tratamientos por PAS y TUS, obtuvieron mayor liberación de compuestos totales, en donde el TUS, como ya se ha mencionado anteriormente, generó el rompimiento de vacuolas, paredes celulares entre otras estructuras (104, 130) contenidas en la muestra, lo que pudo ocasionar la liberación de sólidos totales, fibra, entre otros compuestos, lo que conllevó a un mayor rendimiento por parte de este tratamiento.

**Tabla 7.** Rendimiento de las muestras después del proceso de digestión *in vitro* (g/20mL bs).

	<b>Jugo CTL</b>	<b>Jugo PAS</b>	<b>Jugo TUS</b>
<b>Rendimiento</b>	1.681 ± 0.02 <sup>a</sup>	1.807 ± 0.01 <sup>b</sup>	2.005 ± 0.04 <sup>c</sup>

<sup>a-c</sup> Diferentes letras en la misma línea indican diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ).  
bs= base seca; CTL= control; PAS= pasteurizado; TUS = Termoultrasonificado.

#### ***6.4.1 Actividad antioxidante de los jugos digeridos de zarzamora***

En la tabla 8, se muestran los resultados de los compuestos antioxidantes y actividad antioxidante correspondiente a los jugos de zarzamora y a su posterior digestión intestinal *in vitro*.

**Tabla 8.** Compuestos antioxidantes y actividad antioxidante de los jugos de zarzamora tratados por PAS y TUS después del proceso de digestión *in vitro*.

		CTL	PAS	TUS
<b>Ácido ascórbico</b> mg AA/L	JL	27.7 ± 0.8 <sup>c</sup>	25.2 ± 0.8 <sup>b</sup>	21.2 ± 0.6 <sup>a</sup>
	FB	27.5 ± 1.2 <sup>b</sup>	25.5 ± 0.5 <sup>ab</sup>	25.2 ± 0.5 <sup>a</sup> **
<b>Fenoles totales</b> mg EAG/L	JL	726.2 ± 4.7 <sup>a</sup>	789.5 ± 3.8 <sup>b</sup>	1,011.5 ± 3.9 <sup>c</sup>
	FB	609.7 ± 6.5 <sup>a</sup> ***	593.9 ± 8.5 a ***	710.1 ± 2.6 <sup>b</sup> ***
<b>Antocianinas</b> mg A/L	JL	106.3 ± 1.2 <sup>b</sup>	94.3 ± 4.2 <sup>a</sup>	118.6 ± 1.4 <sup>c</sup>
	FB	69.9 ± 1.6 <sup>b</sup> ***	62.8 ± 2 <sup>a</sup> ***	82.2 ± 3.4 <sup>c</sup> ***
<b>ABTS<sup>•+</sup></b> mg VC/L	JL	13.5 ± 0.1 <sup>b</sup>	11.4 ± 0.3 <sup>a</sup>	44.6 ± 1.2 <sup>c</sup>
	FB	40.6 ± 0.6 <sup>b</sup> ***	33.3 ± 0.3 <sup>a</sup> ***	44.4 ± 0.6 <sup>c</sup>
<b>DPPH</b> μmol ET/L	JL	1,146.4 ± 1.8 <sup>a</sup>	1,319.7 ± 1 <sup>b</sup>	2,655.8 ± 14 <sup>c</sup>
	FB	2,269.4±5 <sup>b</sup> ***	2,240.8±6.8 <sup>a</sup> ***	2,360.4±5 <sup>c</sup> ***

Diferentes letras en la misma línea indican diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ).

Asteriscos indican diferencia significativa (\*\* =  $p \leq 0.001$ ; \*\*\* =  $p \leq 0.001$ ), entre el jugo de zarzamora liofilizado y la fracción bioaccesible en el mismo tratamiento.

JL= jugo liofilizado; FB= fracción bioaccesible; AA= ácido ascórbico; EAG= equivalentes de ácido gálico; ET= equivalentes de Trolox; VC= vitamina C; A= antocianinas; CTL= control; PAS= pasteurizado; TUS= Termoultrasonicado.

#### 6.4.1 Ácido ascórbico

Los valores obtenidos del jugo control de zarzamora (27 mg AA/L) y en el proceso de PAS (25 mg AA/L), no presentaron cambios estadísticamente significativos después de la aplicación del proceso digestivo. Un estudio (131), en base a jugos de frutas (naranja, kiwi, piña y mango) encontraron que existió una degradación de la vitamina C (entre 11 y 13%), después de un proceso digestivo *in vitro*, tanto en jugos sin tratamiento térmico como en aquellos pasteurizados. Por lo tanto, se puede referir que en actual trabajo, el ácido ascórbico contenido en el jugo de zarzamora presenta cierta estabilidad de dicho compuesto durante el tránsito intestinal.

Por otra parte, aunque el ácido ascórbico encontrado en el jugo de zarzamora con tratamiento de TUS fue menor después del proceso digestivo *in vitro*, el contenido de este compuesto se incrementó en un 16%.

Como se ha mencionado en apartados anteriores, las condiciones con las que se llevó a cabo el ultrasonido pudieron haber ocasionado una degradación o exposición del ácido ascórbico a dichas condiciones, por lo que existió una disminución de su concentración. Sin embargo, después del proceso digestivo, el incremento de esta vitamina pudo deberse a la presencia de tejidos del fruto, como la piel, tejido con alto contenido de vitamina C (37, 38), así como pigmentos y polifenoles del fruto, dichos compuestos contienen moléculas de ácido ascórbico y por efecto del proceso de TUS, se pudieron romper estructuras celulares como vacuolas, paredes celulares, entre otras (104, 130), lo que pudo ocasionar la liberación y bioaccesibilidad de compuestos antioxidantes como el ácido ascórbico (105).

La ingesta diaria recomendada de vitamina C varía entre 25 y 75 mg AA para niños y adultos y  $130 \pm 5$  mg AA en caso de embarazadas y lactantes (132). Considerando la porción equivalente para el jugo de zarzamora (250 mL), contendría aproximadamente 25 mg AA y un equivalente de dicho jugo aportaría un porcentaje importante de los requerimientos diarios de vitamina C para una persona.

#### 6.4.2 Fenoles totales

El jugo de zarzamora control presentó valores de 726 mg EAG/L de muestra, sin embargo, el procesamiento de estos por PAS y TUS, conllevó un incremento de estos compuestos. Después del proceso digestivo, se presentó una concentración menor de estas sustancias antioxidantes, entre 17 y 30%, siendo mayor la pérdida de los ácidos fenólicos por el tratamiento de TUS. Resultados similares fueron encontrados en estudios de frutos como: granada, uvas y bebidas de frutas, que fueron sometidos a un proceso digestivo *in vitro*, demostraron que existió una degradación del 80%, 62% y 47%, respectivamente (133-135).

El metabolismo de los polifenoles inicia principalmente en el estómago y la mayor parte en el intestino delgado donde se presentan algunas reacciones para su liberación. La transición del medio estomacal al intestinal induce a cambios estructurales de las compuestos fenólicos (hidroxilación, glicosilación, acilación), el grado de polimerización y la solubilidad, son elementos para determinar la bioaccesibilidad de los polifenoles. La relación de estos factores conlleva a una mayor absorción y metabolismo de los polifenoles y a la formación de metabolitos como ácido gálico, isoflavonas, catequinas, flavononas y quercetina sustancias con actividad biológica importante (93, 134).

Algunos autores establecen que una parte de la degradación de estos compuestos se debe a la transición de la acidez gástrica hacia medio alcalino intestinal, que ocasiona un cambio en la polaridad de los fenoles así como la unión a otras sustancias (48, 93, 136) y el impedimento en el paso de moléculas de mayor tamaño por la barrera de la membrana de celulosa semipermeable (85). Razones por las que pudiera existir una disminución en la cantidad de bioaccesible de los polifenoles totales.

La concentración de compuestos fenólicos después de la simulación gástrica *in vitro*, fue similar entre los jugos CTL y PAS, a pesar de que el tratamiento térmico a altas temperaturas conlleva a la degradación general de compuestos fenólicos, además de carotenoides, y por lo tanto de la actividad antioxidante total (137, 138). Aunque el tratamiento por TUS presentó una menor concentración de compuestos fenólicos, en comparación con las otras muestras de análisis, después de proceso de digestión, es posible

que el TUS ocasionara una mayor liberación de compuestos de menor peso molecular, y por lo tanto, ocasionara una mayor bioaccesibilidad de estos compuestos.

La cantidad de compuestos fenólicos en una porción de jugo de zarzamora (250 mL) PAS y TUS, contendría entre 0.58 y 0.7 g EAG, respectivamente. Según diferentes autores (139, 140), establecen que siguiendo la recomendación de consumir 5 frutas y vegetales diariamente, se aportaría una cantidad de polifenoles mayor de 0.5 g. De esta forma, la porción equivalente del jugo de zarzamora (250 mL) contribuiría con una concentración similar a la recomendada por estos investigadores.

### **6.4.3 Antocianinas**

Las antocianinas son un componente común en los alimentos y se encuentran en verduras, frutas, vinos, entre otros, dichos compuestos contienen cantidades significativas de pigmentos y por lo tanto, presentan capacidad antioxidante importante (72, 141). Sin embargo, para lograr los efectos beneficiosos en la salud atribuidos a estos compuestos bioactivos, que a su vez, deben ser bioaccesibles, absorbidos eficazmente desde el intestino a la circulación y finalmente disponibles para el metabolismo (93, 142).

Los valores correspondientes a antocianinas en el jugo CTL de zarzamora fueron de 106 mg A/L. Posterior a la simulación gastrointestinal, estos valores disminuyeron en un 35%. Diversos estudios sobre la bioaccesibilidad *in vitro* de antocianinas de la granada (133) y variedades de manzanas (85), demostraron que la degradación de dichos compuestos en estos frutos fue importante, ya que existió una degradación del 88% y 100%, respectivamente. Mismos autores refieren esta disminución encontrada pudiera deberse a que existe una mayor degradación de las antocianinas a productos secundarios como las chalconas, principalmente durante la digestión pancreática, aunque también se puede llevar a cabo durante la digestión gástrica.

El procesamiento como la pasteurización y el ultrasonido, ocasionan cambios químicos en las antocianinas, como se ha mencionado anteriormente, dichos compuestos son muy inestables, por lo que en adición de un tratamiento térmico, exposición a la luz, cambios en el pH (110), la digestión gástrica y pancreática de la bioaccesibilidad *in vitro* pudieron

disminuir considerablemente sus valores. Razón por la que las muestras con tratamiento de TUS y PAS digeridas presentaron entre 30 y 35%, respectivamente, menor cantidad de antocianinas que en los jugos liofilizados. Sin embargo, ambos tratamientos presentaron una bioaccesibilidad intestinal del 65 – 70%, valores importantes para los jugos de zarzamora en comparación con la degradación total de los estudios anteriormente citados.

#### **6.4.4 Actividad antioxidante por ABTS<sup>•+</sup> y DPPH<sup>•</sup>.**

El proceso de digestión *in vitro*, ocasionó el incremento de la actividad antioxidante en las muestras CTL y PAS, por las determinaciones de ABTS<sup>•+</sup> y DPPH<sup>•</sup>, en una proporción mayor al 100% con respecto a los valores sin el proceso digestivo (Tabla 8).

Este incremento en la actividad antioxidante en el presente trabajo, pudo deberse al ablandamiento de ciertas estructuras del fruto y al aumento de la capacidad de extracción de los compuestos antioxidantes. Además, la acción de la temperatura libera ciertas moléculas de su estructura celular (pared celular, vacuolas, citoplasma), y estas podrían ser parcialmente transformadas en compuestos químicos más antioxidantes, como efecto de la modificación de la estructura química de los polifenoles (metilación, sulfatación, glucuronidación o combinación con otros elementos como la fibra, azúcares entre otros) (93).

Estos cambios en la composición química, influyen en la concentración y disponibilidad de los compuestos bioactivos (127). Un alto incremento de la actividad antioxidante después de proceso digestivo ha sido referido en diferentes estudios como en cereales, vegetales y legumbres (143).

Sin embargo, en otros estudios determinados por metodologías como ABTS y DPPH, se ha encontrado la disminución de la actividad antioxidante de diversos frutos entre el 15 y 68% posterior a su digestión (85, 131, 136). Según, otros autores, esta disminución pudiera ser debido a la mayor exposición al oxígeno, cambios de pH, humedad y luz de los compuestos antioxidantes después de ser extraídos de su estructura celular (110, 133, 136).

---

Por otra parte, el jugo digerido del tratamiento por TUS en la determinación por ABTS presentó resultados similares antes y después de la digestión gástrica, y sólo en la determinación por DPPH, se presentó una ligera disminución de sus valores con un 11%.

La aplicación del termoultrasonido en el jugo de zarzamora, ocasionó la liberación de compuestos antioxidantes de los componentes del fruto, y la concentración de dichos compuestos se mantuvieron sin cambio después del proceso digestivo. Lo anterior pudiera deberse a la inactivación enzimática ocasionada por los efectos del ultrasonido referida en otros estudios (102, 105). De acuerdo a diversos estudios, es posible que estos compuestos liberados no se degraden, únicamente cambian su estructura molecular y adicionalmente la disminución del peso molecular (126, 130).

Los resultados anteriores podrían ser comparados con otras tecnologías emergentes, como la utilización de altas presiones y campos eléctricos de alta intensidad, ya que dichas tecnologías se han utilizado en un jugo de frutas (naranja, kiwi, piña y mango). Los valores en la determinación de DPPH disminuyeron en 14% para altas presiones y 19% para campos eléctricos, después de someter a digestión *in vitro* la muestra, cabe mencionar que en ambas tecnologías no se emplea el uso de temperaturas elevadas (131), al igual que el termoultrasonido en el presente trabajo.

## VII. CONCLUSIONES

- Las muestras obtenidas presentaron un rendimiento de jugo de zarzamora del  $57 \pm 1\%$ , humedad de  $91 \pm 1\%$ , con un color rojo violeta característico del fruto. El procesamiento del jugo generó residuos del  $43 \pm 1\%$ .
- El jugo termoultrasonificado fue el tratamiento que obtuvo un mayor contenido de compuestos antioxidantes; fenoles totales (1,011 mg EAG/L), antocianinas (118 mg A/L), y actividad antioxidante por ABTS (44 mg VC/L) y DPPH (2,665  $\mu$ mol ET/L), en comparación con las muestras CTL y PAS.
- El etanol puede ser una alternativa en la extracción de compuestos antioxidantes ya que presentaron un mayor rendimiento (60.4%) de sólidos totales, comparado con las muestras CTL (56.8%) y PAS (57.4%).
- Los compuestos mayoritarios extraídos por solventes se caracterizaron por un alto contenido de fenoles en la muestra termoultrasonificada con una capacidad antioxidante considerable.
- El jugo termoultrasonificado digerido presentó un mayor porcentaje de sólidos (10%) (2.005 g/20 mL) de, en comparación con las muestras CTL (8%) (1.681 g/20 mL) y PAS (9%) (1.807 g/20 mL), estos resultados son estadísticamente significativos.
- Después del proceso de digestión, el jugo termoultrasonificado presentó mayor concentración de compuestos fenólicos (710 mg EAG/L) en comparación con las muestras control (609 mg EAG/L) y pasteurizada (593 mg EAG/L).
- Después del proceso de digestión, la actividad antioxidante de los jugos de zarzamora control y pasteurizado, presentaron un incremento de sus valores (mayor al 100%), mientras que el termoultrasonido no afectó la actividad antioxidante.

---

## VIII. RECOMENDACIONES

Incluir la determinación de flavonoides para aportar un estudio más completo en la zarzamora.

Efectuar seguimiento por HPLC de las sustancias encontradas en la zarzamora.

Efectuar seguimiento por HPLC de las muestras bioaccesibles para identificar cada una de ellas.

Analizaron mediante métodos físicos, químicos y espectroscópicos, principalmente Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  (protón) y  $^{13}\text{C}$  (carbono trece), incluyendo experimentos de naturaleza de carbono (APT; Attached Proton Test), acoplamiento entre protones (COSY: Correlation Spectroscopy; NOESY: Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy), acoplamiento entre protones y carbono trece a uno (HETCOR: Heteronuclear Correlated Spectroscopy; HMQC: Heteronuclear Multiple Quantum Coherence) y a dos y tres enlaces (HMBC: Heteronuclear Multiple Bond Coherence) los extractos y fracciones obtenidos a partir de la zarzamora.

## IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Scher J. *Rubus fruticosus* L. agg. (complex) Unites States: Federal Noxious Weed Disseminules of the U.S.; 2010. Available from: <http://keys.lucidcentral.org/keys/FNW/FNW%20seeds/html/fact%20sheets/Rubus%20fruticosus.htm> .
2. Evans KJ SD, Whalen MA, Hosking JR, Barker RM, Oliver JA. Systematics of the *Rubus fruticosus* aggregate (Rosaceae) and other exotic *Rubus* taxa in Australia. *Aust Syst Bot.* 2007;1(20):187-251.
3. Thompson M. Survey of chromosome number in *Rubus* (Rosaceae: Rosoideae). *Ann Missouri Bot Gard.* 1997;1(84):128-64.
4. Strik BF, CE. Blackberry production systems - A worldwide perspective KU Leuven: ISHS; 2012. Available from: [http://www.actahort.org/books/946/946\\_56.htm](http://www.actahort.org/books/946/946_56.htm).
5. Lim TK. *Rubus fruticosus* aggr. *Edible Medicinal And Non-Medicinal Plants*: Springer Netherlands; 2012. p. 544-54.
6. SAGARPA. México diversificará producción de berries integrando pequeños productores México: FAO; 2013. Available from: <http://www.fao.org/agronoticias/agronoticias/detalle/es/c/194881/>.
7. Atkinson CJ, Nestby R, Ford YY, Dodds PA. Enhancing beneficial antioxidants in fruits: A plant physiological perspective. *Biofactors.* 2005;23(4):229-34.
8. Giraldo A. Conservación de frutas por un método combinado. *Revista de Investigaciones.* 2004;1(14):121-8.
9. FAO. Procesamiento de frutas y hortalizas mediante métodos artesanales y de pequeña escala Latinoamérica y Caribe: Agriculture and Consumer Protection Ceparment; 1993. Available from: <http://www.fao.org/docrep/x5062s/x5062s06.htm>.
10. Sánchez GP. *Manual Nutrición Zarzamora México*: SAGARPA; 2011. Available: [http://www.chapingo.mx/scru/cruco/index.php?option=com\\_remository&Itemid=70&func=fileinfo&id=7](http://www.chapingo.mx/scru/cruco/index.php?option=com_remository&Itemid=70&func=fileinfo&id=7).
11. Perkins-Veazie P, Collins JK, Clark JR. Interaction of cultivar and storage temperature on the shelflife of blackberry fruit. *Fruit Var J.* 1999;1(534):201-8.
12. Bejarano W. *Manual de Mora (Rubus glaucus Benth)*. Ecuador: Proexant; 1992.
13. Parra-Quezada RA, Acosta-Rodríguez GF, Arreola-Ávila JG. Crecimiento y producción de zarzamora cv. Cheyenne con cubiertas orgánicas. *TERRA Latinoamericana.* 2005;23(2):233-40.
14. Galvis J, Herrera A. *Manejo Poscosecha de Mora*. (SENA) SNdA, editor. Colombia: Universidad Nacional de Colombia; 1995.
15. Perkins-Veazie P, Collins JK. Quality of erect-type blackberry fruit after short intervals of controlled atmosphere storage. *Postharvest Biol Technol.* 2002;1(25):235-9.
16. SIAP SdIAyP. *Agricultura Producción Anual México*: SAGARPA; 2014. Available from: <http://www.siap.gob.mx/agricultura-produccion-anual/>.

17. Acosta-Montoya O, Vaillant F, Cozzano S, Mertz C, Pérez AM, Castro MV. Phenolic content and antioxidant capacity of tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichus* Schltdl.) during three edible maturity stages. *Food Chem.* 2009;119(2010):1497-501.
18. U.S. Department of Agriculture. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 24 United States: USDA; 2011. Available from: <http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl>.
19. Pantelidis GE, Vasilakakis M, Manganaris GA, Diamantidis G. Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and Cornelian cherries. *Food Chem.* 2006;102(2007):777-83.
20. Martínez-Cruz NS, Arévalo-Niño K, M.J. V-S, Rivas-Morales C, Oranday-Cárdenas A, Núñez-González MA. Antocianinas y actividad anti radicales libres de *Rubus adenotrichus* Schltdl (zarzamora). *Comunicación Técnica UANL.* 2011;42(4):66-71.
21. Srivastava A, Greenspan P, Hartle DK, Hargrove JL, Amarowicz R, Pegg RB. Antioxidant and anti-inflammatory activities of polyphenolics from Southeastern U.S. range blackberry cultivars. *Journal of agricultural and food chemistry.* 2010;58(10):6102-9.
22. Bowen-Forbes CS, Zhang Y, Nair MG. Anthocyanin content, antioxidant, anti-inflammatory and anticancer properties of blackberry and raspberry fruits. *Journal of Food Composition and Analysis.* 2010;23(6):554-60.
23. Vendrame S, Daugherty A, Kristo AS, Riso P, Klimis-Zacas D. Wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) consumption improves inflammatory status in the obese Zucker rat model of the metabolic syndrome. *The Journal of nutritional biochemistry.* 2013.
24. Lu JM, Lin PH, Yao Q, Chen C. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *Journal of cellular and molecular medicine.* 2010;14(4):840-60.
25. Jenkins RR. Free radical chemistry. Relationship to exercise. *Sports medicine.* 1988;5(3):156-70.
26. Rimbach G, Hohler D, Fischer A, Roy S, Virgili F, Pallauf J. Methods to assess free radicals and oxidative stress in biological systems. *Archiv fur Tierernahrung.* 1999;52(3):203-22.
27. Sen CK. Antioxidant and redox regulation of cellular signaling: introduction. *Medicine and science in sports and exercise.* 2001;33(3):368-70.
28. Vassalle C, Masini S, Carpeggiani C, L'Abbate A, Boni C, Zucchelli GC. In vivo total antioxidant capacity: comparison of two different analytical methods. *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC.* 2004;42(1):84-9.
29. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *British medical bulletin.* 1993;49(3):481-93.
30. Govindarajan R, Vijayakumar M, Pushpangadan P. Antioxidant approach to disease management and the role of 'Rasayana' herbs of Ayurveda. *Journal of ethnopharmacology.* 2005;99(2):165-78.

31. Rahman K. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clinical interventions in aging*. 2007;2(2):219-36.
32. Ziech D, Franco R, Georgakilas AG, Georgakila S, Malamou-Mitsi V, Schoneveld O. The role of reactive oxygen species and oxidative stress in environmental carcinogenesis and biomarker development. *Chemico-biological interactions*. 2010;188(2):334-9.
33. Janicki-Deverts D, Cohen S, Matthews KA, Gross MD, Jacobs DR, Jr. Socioeconomic status, antioxidant micronutrients, and correlates of oxidative damage: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) study. *Psychosomatic medicine*. 2009;71(5):541-8.
34. Lampe JW. Health effects of vegetables and fruit: assessing mechanisms of action in human experimental studies. *The American journal of clinical nutrition*. 1999;70(3 Suppl):475S-90S.
35. Meyer S, Cerovic ZG, Goulas Y, Montpied P, Demotes-Mainard S, Bidel LP. Relationships between optically assessed polyphenols and chlorophyll contents, and leaf mass per area ratio in woody plants: a signature of the carbon-nitrogen balance within leaves? *Plant, cell & environment*. 2006;29(7):1338-48.
36. Symonowicz M, Sykula-Zajac A, Lodyga-Chruscinska E, Rumora I, Straukas M. Evaluation of polyphenols and anthocyanins contents in black chokeberry--*Photinia melanocarpa* (Michx.) fruits extract. *Acta poloniae pharmaceutica*. 2012;69(3):381-7.
37. Li M-J, Ma F-W, Zhang M, Pu F. Distribution and metabolism of ascorbic acid in apple fruits (*Malus domestica* Borkh cv. Gala). *Plant Science*. 2008;174(6):606-12.
38. Cocetta G, Karppinen K, Suokas M, Hohtola A, Häggman H, Spinardi A. Ascorbic acid metabolism during bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) fruit development. *Journal of Plant Physiology*. 2012;169(11):1059-65.
39. Kim EK, Kwon KB, Song MY, Seo SW, Park SJ, Ka SO. Genistein protects pancreatic beta cells against cytokine-mediated toxicity. *Molecular and cellular endocrinology*. 2007;278(1-2):18-28.
40. Klatsky AL. Alcohol and cardiovascular health. *Physiology & behavior*. 2010;100(1):76-81.
41. Naziroglu M, Tokat S, Demirci S. Role of melatonin on electromagnetic radiation-induced oxidative stress and Ca<sup>2+</sup> signaling molecular pathways in breast cancer. *Journal of receptor and signal transduction research*. 2012;32(6):290-7.
42. Wang HC, Pao J, Lin SY, Sheen LY. Molecular mechanisms of garlic-derived allyl sulfides in the inhibition of skin cancer progression. *Ann N Y Acad Sci*. 2012;1271:44-52.
43. Janakiram NB, Rao CV. iNOS-selective inhibitors for cancer prevention: promise and progress. *Future medicinal chemistry*. 2012;4(17):2193-204.
44. Monsuez JJ. Detection and prevention of cardiac complications of cancer chemotherapy. *Archives of cardiovascular diseases*. 2012;105(11):593-604.
45. Sharoni Y, Linnewiel-Hermoni K, Zango G, Khanin M, Salman H, Veprik A. The role of lycopene and its derivatives in the regulation of transcription systems: implications for cancer prevention. *Am J Clin Nutr*. 2012;96(5):1173S-8S.

46. Kovacic P, Somanathan R. Redox processes in neurodegenerative disease involving reactive oxygen species. *Current neuropharmacology*. 2012;10(4):289-302.
47. Mi W, van Wijk N, Cansev M, Sijben JW, Kamphuis PJ. Nutritional approaches in the risk reduction and management of Alzheimer's disease. *Nutrition*. 2013.
48. Bravo L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutrition reviews*. 1998;56(11):317-33.
49. de Vries JH, Hollman PC, Meyboom S, Buysman MN, Zock PL, van Staveren WA. Plasma concentrations and urinary excretion of the antioxidant flavonols quercetin and kaempferol as biomarkers for dietary intake. *The American journal of clinical nutrition*. 1998;68(1):60-5.
50. Murphy MM, Barraj LM, Herman D, Bi X, Cheatham R, Randolph RK. Phytonutrient intake by adults in the United States in relation to fruit and vegetable consumption. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*. 2012;112(2):222-9.
51. Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Remesy C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American journal of clinical nutrition*. 2005;81(1 Suppl):230S-42S.
52. Shahidi F, Wanasundara PK. Phenolic antioxidants. *Critical reviews in food science and nutrition*. 1992;32(1):67-103.
53. Wang L, Wang Z, Li X. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of phenolic antioxidants from *Malus baccata* (Linn.) Borkh. using response surface methodology. *Journal of separation science*. 2013;36(9-10):1652-8.
54. Wolfe KL, Kang X, He X, Dong M, Zhang Q, Liu RH. Cellular antioxidant activity of common fruits. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2008;56(18):8418-26.
55. Yang JG, Liu BG, Liang GZ, Ning ZX. Structure-activity relationship of flavonoids active against lard oil oxidation based on quantum chemical analysis. *Molecules*. 2009;14(1):46-52.
56. Choi SH, Ahn JB, Kozukue N, Levin CE, Friedman M. Distribution of free amino acids, flavonoids, total phenolics, and antioxidative activities of Jujube (*Ziziphus jujuba*) fruits and seeds harvested from plants grown in Korea. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2011;59(12):6594-604.
57. Wedworth SM, Lynch S. Dietary flavonoids in atherosclerosis prevention. *The Annals of pharmacotherapy*. 1995;29(6):627-8.
58. Willcox JK, Catignani GL, Roberts LJ, 2nd. Dietary flavonoids fail to suppress F2-isoprostane formation in vivo. *Free radical biology & medicine*. 2003;34(7):795-9.
59. Soleas GJ, Grass L, Josephy PD, Goldberg DM, Diamandis EP. A comparison of the anticarcinogenic properties of four red wine polyphenols. *Clinical biochemistry*. 2002;35(2):119-24.
60. Mudnic I, Budimir D, Modun D, Gunjaca G, Generalic I, Skroza D. Antioxidant and vasodilatory effects of blackberry and grape wines. *Journal of medicinal food*. 2012;15(3):315-21.

61. Noguchi N, Niki E. Phenolic antioxidants: a rationale for design and evaluation of novel antioxidant drug for atherosclerosis. *Free radical biology & medicine*. 2000;28(10):1538-46.
62. Huang WY, Zhang HC, Liu WX, Li CY. Survey of antioxidant capacity and phenolic composition of blueberry, blackberry, and strawberry in Nanjing. *Journal of Zhejiang University Science B*. 2012;13(2):94-102.
63. Teleszko M, Wojdyło A. Comparison of phenolic compounds and antioxidant potential between selected edible fruits and their leaves. *Journal of Functional Foods*. 2015;14(0):736-46.
64. Cyboran S, Bonarska-Kujawa D, Pruchnik H, Żyłka R, Oszmiański J, Kleszczyńska H. Phenolic content and biological activity of extracts of blackcurrant fruit and leaves. *Food Research International*. 2014;65, Part A(0):47-58.
65. Rinaldi M, Caligiani A, Borgese R, Palla G, Barbanti D, Massini R. The effect of fruit processing and enzymatic treatments on pomegranate juice composition, antioxidant activity and polyphenols content. *LWT - Food Science and Technology*. 2013;53(1):355-9.
66. Mousavinejad G, Emam-Djomeh Z, Rezaei K, Khodaparast MHH. Identification and quantification of phenolic compounds and their effects on antioxidant activity in pomegranate juices of eight Iranian cultivars. *Food Chemistry*. 2009;115(4):1274-8.
67. Liu C-h, Xue Y-r, Ye Y-h, Yuan F-f, Liu J-y, Shuang J-l. Extraction and Characterization of Antioxidant Compositions From Fermented Fruit Juice of *Morinda citrifolia* (Noni). *Agricultural Sciences in China*. 2007;6(12):1494-501.
68. Vu KD, Carlettini H, Bouvet J, Côté J, Doyon G, Sylvain J-F. Effect of different cranberry extracts and juices during cranberry juice processing on the antiproliferative activity against two colon cancer cell lines. *Food Chemistry*. 2012;132(2):959-67.
69. Koca I, Karadeniz B. Antioxidant properties of blackberry and blueberry fruits grown in the Black Sea Region of Turkey. *Scientia Horticulturae*. 2009;121(4):447-50.
70. de Souza VR, Pereira PA, da Silva TL, de Oliveira Lima LC, Pio R, Queiroz F. Determination of the bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Brazilian blackberry, red raspberry, strawberry, blueberry and sweet cherry fruits. *Food Chem*. 2014;156:362-8.
71. Boivin D, Blanchette M, Barrette S, Moghrabi A, Beliveau R. Inhibition of cancer cell proliferation and suppression of TNF-induced activation of NFkappaB by edible berry juice. *Anticancer research*. 2007;27(2):937-48.
72. Srivastava A, Akoh CC, Fischer J, Krewer G. Effect of anthocyanin fractions from selected cultivars of Georgia-grown blueberries on apoptosis and phase II enzymes. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2007;55(8):3180-5.
73. Krikorian R, Shidler MD, Nash TA, Kalt W, Vinqvist-Tymchuk MR, Shukitt-Hale B. Blueberry supplementation improves memory in older adults. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2010;58(7):3996-4000.

74. Elks CM, Reed SD, Mariappan N, Shukitt-Hale B, Joseph JA, Ingram DK. A blueberry-enriched diet attenuates nephropathy in a rat model of hypertension via reduction in oxidative stress. *PloS one*. 2011;6(9):e24028.
75. Ahmet I, Spangler E, Shukitt-Hale B, Juhaszova M, Sollott SJ, Joseph JA. Blueberry-enriched diet protects rat heart from ischemic damage. *PloS one*. 2009;4(6):e5954.
76. Cotelle N. Role of flavonoids in oxidative stress. *Current topics in medicinal chemistry*. 2001;1(6):569-90.
77. Mazza G. *Alimentos Funcionales: Aspectos Bioquímicos y de Procesado*: Acribia, Editorial, S.A.; 2000.
78. Hirai S, Takahashi N, Goto T, Lin S, Uemura T, Yu R. Functional food targeting the regulation of obesity-induced inflammatory responses and pathologies. *Mediators of inflammation*. 2010.
79. Cortés RM, Chiralt BA, Puente DL. Alimentos funcionales: una historia con mucho presente y futuro. *Vitae*. 2005;12(1):5-14.
80. Rivera JA, Muñoz-Hernández O, Rosas-Peralta M, Aguilar-Salinas CA, Popkin BM, Willett WC. Consumo de bebidas para una vida saludable: recomendaciones para la población mexicana. *Salud Pública de México*. 2008;50:173-95.
81. Consumidor Rd. *Estudio de Calidad de Jugos envasados México*: PROFECO; 2012. Available from: <http://revistadelconsumidor.gob.mx/?tag=jugos-ensados>.
82. Scalbert A, Manach C, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical reviews in food science and nutrition*. 2005;45(4):287-306.
83. Heber D. Multitargeted therapy of cancer by ellagitannins. *Cancer letters*. 2008;269(2):262-8. PubMed PMID: 18468784.
84. Myburgh K. Polyphenol Supplementation: Benefits for Exercise Performance or Oxidative Stress? *Sports medicine*. 2014;44(1):57-70.
85. Bouayed J, Hoffmann L, Bohn T. Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake. *Food Chemistry*. 2011;128(1):14-21.
86. Hurrell RF, Reddy M, Cook JD. Inhibition of non-haem iron absorption in man by polyphenolic-containing beverages. *The British journal of nutrition*. 1999;81(4):289-95.
87. Khokhar S, Richard K, Apenten O. Iron binding characteristics of phenolic compounds: some tentative structure-activity relations. *Food Chemistry*. 2003;81(1):133-40.
88. Garcia-Alonso J, Ros G, Vidal-Guevara M, Periago M. Acute intake of phenolic-rich juice improves antioxidant status in healthy subjects. *Nutrition Research*. 2006;26(7):330-9.
89. Bell JR, Donovan JL, Wong R, Waterhouse AL, German JB, Walzem RL. (+)-Catechin in human plasma after ingestion of a single serving of reconstituted red wine. *The American journal of clinical nutrition*. 2000;71(1):103-8.

90. Saura-Calixto F, García-Alonso A, Goñi I, Bravo L. In vitro determination of the indigestible fraction in foods: an alternative to dietary fiber analysis. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2000;1(48):3342-7.
91. Bosscher D, Van Caillie-Bertrand M, Van Dyck K, Robberecht H, Van Cauwenbergh R, Deelstra H. Thickening infant formula with digestible and indigestible carbohydrate: availability of calcium, iron, and zinc in vitro. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2000;30(4):373-8.
92. Scalbert A, Morand C, Manach C, Remesy C. Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2002;56(6):276-82.
93. Scalbert A, Williamson G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *The Journal of nutrition*. 2000;130(8S Suppl):2073S-85S.
94. Hu M. Commentary: bioavailability of flavonoids and polyphenols: call to arms. *Molecular pharmaceutics*. 2007;4(6):803-6.
95. Sadilova E, Stintzing FC, Kammerer DR, Carle R. Matrix dependent impact of sugar and ascorbic acid addition on color and anthocyanin stability of black carrot, elderberry and strawberry single strength and from concentrate juices upon thermal treatment. *Food Res Int*. 2009;1(42):1023-33.
96. Lee SH, Coates GA. Effect of thermal pasteurization on Valencia orange juice color and pigments. *Food Sci Tech*. 2003;36(1):153-6.
97. Wells JH, Singh RP. Application of Time-Temperature Indicators in Monitoring Changes in Quality Attributes of Perishable and Semiperishable Foods. *Journal of food science*. 1988;53(1):148-52.
98. Cardello AV. Consumer concerns and expectations about novel food processing technologies: effects on product liking. *Appetite*. 2003;40(3):217-33.
99. Patras A, Brunton NP, Da Pieve S, Butler F. Impact of high pressure processing on total antioxidant activity, phenolic, ascorbic acid, anthocyanin content and colour of strawberry and blackberry purées. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2009;10(3):308-13.
100. Barba FJ, Jäger H, Meneses N, Esteve MJ, Frígola A, Knorr D. Evaluation of quality changes of blueberry juice during refrigerated storage after high-pressure and pulsed electric fields processing. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2012;14(0):18-24.
101. Zafra-Rojas QY, Cruz-Cansino N, Ramírez-Moreno E, Delgado-Olivares L, Villanueva-Sánchez J, Alanís-García E. Effects of ultrasound treatment in purple cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) juice. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2013;20(5):1283-8.
102. Riera E, Golas Y, Blanco A, Gallego JA, Blasco M, Mulet A. Mass transfer enhancement in supercritical fluids extraction by means of power ultrasound. *Ultrason Sonochem*. 2004;11(3-4):241-4.
103. Balachandran S, Kentish SE, Mawson R, Ashokkumar M. Ultrasonic enhancement of the supercritical extraction from ginger. *Ultrason Sonochem*. 2006;13(6):471-9.

104. Soria AC, Villamiel M. Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review. *Trends in Food Science & Technology*. 2010;21(7):323-31.
105. Feng H, Yang W. *Ultrasonic Processing*. Zhang HQ B-CG, Balasubramaniam VM, Dunne CP, Farkas DF, J.T.C. Y, Editores, editor. United States of America: Wiley-Blackwell; 2011.
106. Rostagno MA, Palma M, Barroso CG. Ultrasound-assisted extraction of isoflavones from soy beverages blended with fruit juices. *Analytica chimica acta*. 2007;597(2):265-72.
107. You X, Wang S, Liu F, Shi K. Ultrasound-assisted surfactant-enhanced emulsification microextraction based on the solidification of a floating organic droplet used for the simultaneous determination of six fungicide residues in juices and red wine. *Journal of chromatography A*. 2013;1300:64-9.
108. Aadil RM, Zeng X-A, Han Z, Sun D-W. Effects of ultrasound treatments on quality of grapefruit juice. *Food Chemistry*. 2013;141(3):3201-6.
109. Tiwari BK, Patras A, Brunton N, Cullen PJ, O'Donnell CP. Effect of ultrasound processing on anthocyanins and color of red grape juice. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2010;17(3):598-604.
110. Tiwari BK, O'Donnell CP, Cullen PJ. Effect of sonication on retention of anthocyanins in blackberry juice. *Journal of Food Engineering*. 2009;93(2):166-71.
111. Muñoz A, Caminiti IM, Palgan I, Pataro G, Noci F, Morgan DJ. Effects on *Escherichia coli* inactivation and quality attributes in apple juice treated by combinations of pulsed light and thermosonication. *Food Research International*. 2012;45(1):299-305.
112. Rawson A, Tiwari BK, Patras A, Brunton N, Brennan C, Cullen PJ. Effect of thermosonication on bioactive compounds in watermelon juice. *Food Research International*. 2011;44(5):1168-73.
113. Anese M, Mirolo G, Beraldo P, Lippe G. Effect of ultrasound treatments of tomato pulp on microstructure and lycopene in vitro bioaccessibility. *Food Chemistry*. 2013;136(2):458-63.
114. Dürüst N, Dogan S, Dürüst Y. Ascorbic acid and element contents of food of Trabzon (Turkey). *Journal of agricultural and food chemistry*. 1997;45(6):2085-7.
115. Georgé S, Brat P, Alter P, Amiot MJ. Rapid determinations of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2005;53(5):1370-3.
116. Giusti MM, Wrolstad RE. *Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy*. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*: John Wiley & Sons, Inc.; 2001.
117. Kuskoski E, Asuero AG, Troncoso AM, Mancini-Filho J, Fett R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 2005;1(25):726-32.
118. Morales F, Jiménez-Pérez S. Radical scavenging capacity of Maillard reaction products as related color and fluorescence. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2001;72(1):119-25.

119. Miller DD, Schrickler BR, Rasmussen RR, Van Campen D. An in vitro method for estimation of iron availability from meals. *The American journal of clinical nutrition*. 1981;34(10):2248-56.
120. Trinidad TP, Wolever TM, Thompson LU. Availability of calcium for absorption in the small intestine and colon from diets containing available and unavailable carbohydrates: an in vitro assessment. *Int journal of food sciences and nutrition*. 1996;47(1):83-8.
121. Ignat I, Volf I, Popa VI. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*. 2011;126(4):1821-35.
122. Lee SH, Coates GA. Effect of thermal pasteurization on Valencia orange juice color and pigments. *Food Science and Technology*. 2003;36(1):153-6.
123. Işık E, Şahin S, Demir C, Türkben C. Determination of total phenolic content of raspberry and blackberry cultivars by immobilized horseradish peroxidase bioreactor. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2011;24(7):944-9.
124. Aguilar-Rosas SF, Ballinas-Casarrubias ML, Nevarez-Moorillon GV, Martín-Belloso O, Ortega-Rivas E. Thermal and pulsed electric fields pasteurization of apple juice: Effects on physicochemical properties and flavour compounds. *Journal of Food Engineering*. 2007;83(1):41-6.
125. Ivanovic J, Tadic V, Dimitrijevic S, Stamenic M, Petrovic S, Zizovic I. Antioxidant properties of the anthocyanin-containing ultrasonic extract from blackberry cultivar “Čačanska Bestrna”. *Industrial Crops and Products*. 2014;53(0):274-81.
126. Pellegrini N, Serafini M, Colombi B, Del Rio D, Salvatore S, Bianchi M. Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *The Journal of nutrition*. 2003;133(9):2812-9.
127. Miglio C, Chiavaro E, Visconti A, Fogliano V, Pellegrini N. Effects of different cooking methods on nutritional and physicochemical characteristics of selected vegetables. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2008;56(1):139-47.
128. Kamiya K, Tanaka Y, Endang H, Umar M, Satake T. Chemical constituents of *Morinda citrifolia* fruits inhibit copper-induced low-density lipoprotein oxidation. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2004;52(19):5843-8.
129. Moure A, Cruz JM, Franco D, Domínguez JM, Sineiro J, Domínguez H. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*. 2001;72(2):145-71.
130. Vilkhuk K, Mawson R, Simons L, Bates D. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry — A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2008;9(2):161-9.
131. Rodríguez-Roque MJ, de Ancos B, Sánchez-Moreno C, Cano MP, Elez-Martínez P, Martín-Belloso O. Impact of food matrix and processing on the in vitro bioaccessibility of vitamin C, phenolic compounds, and hydrophilic antioxidant activity from fruit juice-based beverages. *Journal of Functional Foods*. 2015;14(0):33-43.
132. Casanueva E, Kaufer M, Perez AB. *Nutriologia medica/ Medical Nutriologia: Editorial Medica Panamericana Sa de*; 2008.

133. Sengul H, Surek E, Nilufer-Erdil D. 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 Research International*. 2014;62(0):1069-79.
134. Tagliazucchi D, Verzelloni E, Bertolini D, Conte A. In vitro bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. *Food Chemistry*. 2010;120(2):599-606.
135. Cilla A, González-Sarriás A, Tomás-Barberán FA, Espín JC, Barberá R. Availability of polyphenols in fruit beverages subjected to in vitro gastrointestinal digestion and their effects on proliferation, cell-cycle and apoptosis in human colon cancer Caco-2 cells. *Food Chemistry*. 2009;114(3):813-20.
136. Liang L, Wu X, Zhao T, Zhao J, Li F, Zou Y. In vitro bioaccessibility and antioxidant activity of anthocyanins from mulberry (*Morus atropurpurea* Roxb.) following simulated gastro-intestinal digestion. *Food Research International*. 2012;46(1):76-82.
137. Mazzeo T, N'Dri D, Chiavaro E, Visconti A, Fogliano V, Pellegrini N. Effect of two cooking procedures on phytochemical compounds, total antioxidant capacity and colour of selected frozen vegetables. *Food Chemistry*. 2011;128(3):627-33.
138. Paciulli M, Ganino T, Pellegrini N, Rinaldi M, Zaupa M, Fabbri A. Impact of the industrial freezing process on selected vegetables — Part I. Structure, texture and antioxidant capacity. *Food Research International*. (0).
139. Williamson G, Holst B. Dietary reference intake (DRI) value for dietary polyphenols: are we heading in the right direction? *The British journal of nutrition*. 2008;99 Suppl 3:S55-8.
140. Chun OK, Kim D-O, Smith N, Schroeder D, Han JT, Lee CY. Daily consumption of phenolics and total antioxidant capacity from fruit and vegetables in the American diet. *Journal of the science of food and agriculture*. 2005;85(10):1715-24.
141. Mane C, Souquet JM, Olle D, Verries C, Veran F, Mazerolles G. Optimization of simultaneous flavanol, phenolic acid, and anthocyanin extraction from grapes using an experimental design: application to the characterization of champagne grape varieties. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2007;55(18):7224-33.
142. Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*. 2004;79(5):727-47.
143. Serrano J, Goñi I, Saura-Calixto F. Food antioxidant capacity determined by chemical methods may underestimate the physiological antioxidant capacity. *Food Research International*. 2007;40(1):15-21.