



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

Instituto de Ciencias de la Salud
Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería
Instituto de Ciencias Agropecuarias

DOCTORADO EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS Y SALUD HUMANA

TESIS DOCTORAL

**VALORIZACIÓN DE LOS SUBPRODUCTOS DEL PROCESAMIENTO DE LA
ZARZAMORA (*Rubus fruticosus*), POR SU CONTENIDO EN ANTIOXIDANTES Y
FIBRA DIETÉTICA**

Para obtener el grado de
Doctor en Ciencias de los Alimentos y Salud Humana

P R E S E N T A

M. en C. Quinatzin Yadira Zafra Rojas

Comité tutorial:

Dra. Esther Ramírez Moreno
Dra. Nelly del Socorro Cruz Cansino
Dra. Aurora Quintero Lira
Dra. Araceli Castañeda Ovando

San Agustín, Tlaxiaca, Hgo., julio 2019



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD
DOCTORADO EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS Y SALUD HUMANA

ICSa-DCASH-2019

Asunto: Asignación de Jurado de Examen

M. en A. JULIO CESAR LEINES MEDÉCIGO
COORDINACIÓN DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR

Por este medio se informa que el comité tutorial asignado a la M. en C. Quinatzin Yadira Zafra Rojas con número de cuenta 156284, estudiante del Doctorado en Ciencias de los Alimentos y Salud Humana dio terminación al trabajo de tesis titulado “Valorización de los subproductos del procesamiento de la zarzamora (*Rubus fruticosus*), por su contenido en antioxidantes y fibra dietética”, y por lo tanto se autoriza la impresión del documento de tesis en extenso propuesto por la estudiante.

Lo anterior, en función de que, la estudiante realizó todas las correcciones, adiciones y/o modificaciones sugeridas por el comité en la revisión previa con fecha del 15 de junio de 2019. Por tal motivo, solicito a usted tenga a bien permitir al doctorando dar continuidad al proceso necesario que conlleve a la obtención del grado de Doctor en Ciencias de los Alimentos y Salud Humana.

DRA. ESTHER RAMÍREZ MORENO
Directora de tesis

DRA. NELLY DEL SOCORRO CRUZ CANSINO
Codirectora de tesis

DRA. AURORA QUINTERO LIRA

DRA. ARACELI CASTAÑEDA OVANDO

A T E N T A M E N T E
Pachuca, Hidalgo, 24 de junio del 2019.
“Amor, Orden y Progreso”

M. C. Esp. Adrián Moya Escalera
Director del Instituto de Ciencias de la Salud
Dean

Dra. Lydia López Pontigo
Coordinadora de Posgrado del ICSa
Director of Graduate Studies of ICSa

M. en N.C Arianna Omaña Covarrubias
Jefa del Área Académica de Nutrición
Chair of Academic Area of Nutrition

Dra. Esther Ramírez Moreno
Coordinadora del Programa Educativo
Director of Graduate Studies

AGRADECIMIENTOS

Si estás leyendo esto, has de saber que soy de pocas palabras pero no quiere decir que no te agradezca todo el apoyo que me brindaste durante estos tres años y medio. Agradezco a mi familia que siempre me dieron su apoyo incondicional, confiaron en mi y me animaron aún estando lejos, cuando sentía que ya no podía, ellos me levantaban para seguir adelante, muchas gracias pa, ma, Gustavo y Ruben.

También agradezco a las doctoras que siempre estuvieron ahí para apoyarme, aunque a veces me jalaban las orejas pero al final creo valió la pena. Dra. Esther (mi jefecita), muchas gracias por todo su apoyo, enseñanza, paciencia y regaños. Recuerdo muy bien y aunque fue uno de tantos, el día que usted estaba muy cansada y con el Dr. José Arias, juntos me apoyaron a preparar un tema para una exposición muy importante. Nelly, la palabra gracias se queda corta para agradecer tu apoyo infinito, los conocimientos que me compartiste, los buenos consejos, regaños y todos esos buenos momentos que pasé en el laboratorio cuando festejábamos al que cumplía años jaja. Tú propiciaste un ambiente de trabajo muy agradable con los del laboratorio, también te aprendí todas esas buenas acciones que siempre tienes con los demás. Agradezco también a las doctoras Araceli Castañeda y Aurora Quintero por compartir sus conocimientos conmigo. Al Dr. Alanís y el Dr. Ariza por resolver mis dudas y apoyarme en todo lo que les pedía. A Claudia Valadez (Clau) que siempre me escuchó y me dio ánimo cuando lo necesitaba.

Agradezco a Alicia Cervantes que también me brindo su apoyo en todo momento y fue quién me animó para aceptar este reto tan grande de estudiar el doctorado.

Agradezco a todos los amigos y compañeros del laboratorio (Chava, Lili, Mariel, Abi, Eli, Ara, Gloria, Betty, Liss, Luis, Luis, Andrea), que hacían mi estancia más llevadera cuando la parte experimental se me dificultaba. Ese "ya vámonos..." que siempre decía y respondían con lo mismo y creer que faltaba menos tiempo para irnos aunque fueran las 7 am jaja.

Agradezco a los doctores Manuel López Cabanillas y Blanca Edelia González por haberme aceptado en su casa y compartir sus conocimientos cuando fui de estancia a Monterrey, regresé con resultados pero también con dos buenos amigos, muchas gracias.

A la Dra. Ángela Suárez Jacobo (Angelita) y a la Dra. Pamela Jaramillo Bustos (Pam) que me apoyaron mucho para el manejo de equipos y montaje de técnicas, también dos muy buenas amigas.

Por último y no menos importante, agradezco a Sandi Godinez que sé que siempre me apoyó en cualquier decisión que tomara. Gracias amiga!

ÍNDICE GENERAL

Lista de abreviaturas	1
Lista de figuras	2
Lista de tablas	3
Resumen	5
Abstract	7
1. Marco teórico.....	9
1.1. Zarzamora	9
1.1.1. Composición nutrimental y química de la zarzamora	9
1.1.2. Producción de la zarzamora	11
1.2.1. Diferencia entre desecho, subproducto y residuo	13
1.2.2. Utilización de subproductos ricos en compuestos fenólicos	16
1.3. Bioaccesibilidad de compuestos fenólicos en subproductos	17
1.4. Fibra dietética y usos	19
1.5. Metodologías de extracción de antioxidantes.....	22
2. Justificación.....	25
3. Objetivos	26
3.1. General.....	26
3.2. Específicos	26
4. Materiales y métodos	27
4.1. Zarzamora	27
4.1.1. Recolección y selección de los frutos.....	27
4.1.2. Evaluación del grado de maduración comercial	28
4.1.3. Determinación de pH y sólidos solubles totales	28
4.2. Subproducto de zarzamora y su extracto termoultrasonicado.....	29
4.2.1. Obtención del subproducto de zarzamora	29
4.2.2. Comparación del subproducto de zarzamora con un producto comercial	29
4.2.3. Obtención del extracto del subproducto de zarzamora	30
4.2.4. Comparación del extracto del subproducto de zarzamora con un producto comercial.....	31

4.3. Análisis fisicoquímico del subproducto y extracto ultrasonificado de zarzamora	31
4.3.1. Determinación de color.....	31
4.3.2. Contenido de ácidos orgánicos	33
4.3.3. Perfil de ácidos grasos	34
4.3.4. Determinación de compuestos fenólicos totales (CFT)	35
4.3.5. Determinación de antocianinas monoméricas.....	36
4.3.6. Capacidad antioxidante	37
4.3.6.1. ABTS ^{•+}	37
4.3.6.2. DPPH [•]	38
4.3.6.3. FRAP.....	38
4.3.7. Identificación y cuantificación de flavonoides por HPLC	39
4.4. Análisis microbiológico del subproducto y del extracto ultrasonificado de zarzamora	40
4.5. Estudio de la fibra dietética	41
4.5.1. Contenido de fibra dietética.....	41
4.5.2. Propiedades funcionales de la fibra dietética	41
4.5.2.1. Capacidad de retención de agua (CRA).....	41
4.5.2.2. Capacidad de hinchamiento (CH)	42
4.5.2.3. Capacidad de retención de lípidos (CRL).....	42
4.6. Ensayos de digestión in vitro.....	43
4.6.1. Bioaccesibilidad intestinal in vitro de compuestos antioxidantes.....	43
4.6.2. Fermentación colónica in vitro.....	45
4.6.2.1. Residuo no fermentable y materia seca desaparecida.....	47
4.6.2.2. Recuento de bacterias ácido lácticas	48
4.6.2.3. Cuantificación e identificación de ácidos grasos de cadena corta.....	48
4.6.2.4. Cuantificación e identificación de flavonoides en un sistema simulado de digestión en colon	49
4.7. Análisis estadístico.....	52
5. Resultados y discusiones.....	53
5.1. Maduración comercial de la zarzamora.....	53
5.2. Análisis físico y químico del subproducto de la zarzamora y del extracto ultrasonificado	54

5.2. Rendimiento del subproducto de la zarzamora	54
5.2.2. Evaluación del color	55
5.2.3. Cuantificación de ácidos orgánicos	58
5.2.4. Perfil de ácidos grasos del subproducto de zarzamora	59
5.2.5. Compuestos fenólicos y antocianinas monoméricas	60
5.2.6. Identificación de flavonoides (aglicones)	63
5.2.7. Capacidad antioxidante	65
5.4. Análisis microbiológico	67
5.10. Bioaccesibilidad.....	68
5.10.1. Compuestos fenólicos y antocianinas	68
5.10.2. Flavonoides	71
5.10.3. Capacidad antioxidante	75
5.11. Fibra dietética	76
5.11.1. Contenido	76
5.11.2. Propiedades funcionales	77
5.12. Fermentación colónica in vitro	80
5.12.1. Residuo no fermentado y materia seca desaparecida	81
5.12.2. pH durante la fermentación colónica in vitro.....	82
5.12.3. Recuento de bacterias ácido lácticas	83
5.12.4. Ácidos grasos de cadena corta (AGCC).....	85
5.12.5. Cuantificación de flavonoides en colon	87
6. Conclusiones.....	90
Referencias	91
ANEXOS	120
Anexo 1. Curvas de calibración del perfil de ácidos grasos	120
Anexo 2. Preparación del medio anaerobio (fermentación colónica <i>in vitro</i>).....	122
Anexo 3. Extracción en fase sólida	123

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Significado
ABTS	2,2'-azinobis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6- ácido sulfónico)
AGCC	Ácidos grasos de cadena corta
BRVG	Agar bilis rojo violeta glucosado
CFT	Compuestos fenólicos totales
CG	Cromatografía de gases
CH	Capacidad de hinchamiento
CP	Ciruela pasa
CRL	Capacidad de retención de lípidos
CRA	Capacidad de retención de agua
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
Ex-US	Extracto de subproducto de zarzamora ultrasonificado
Ex-US-B	Extracto de subproducto de zarzamora ultrasonificado bioaccesible
Ex-Uva	Extracto de cáscara de uva
FDI	Fibra dietética insoluble
FDS	Fibra dietética soluble
FDT	Fibra dietética total
FRAP	Poder antioxidante reductor de hierro
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
MSD	Materia seca desaparecida
RNF	Residuo no fermentado
SST	Sólidos solubles totales
Sub-Z	Subproducto de zarzamora
Sub-Z-B	Subproducto de zarzamora bioaccesible

Lista de figuras

Número de figura	Página
1. Porcentaje de producción mensual nacional de la zarzamora	12
2. Estructura de la pared celular primaria del material vegetal y su unión entre componentes estructurales y compuestos fenólicos	18
3. Diagrama del proyecto del subproducto de zarzamora y su extracto ultrasonificado	27
4. Color superficial de la zarzamora de acuerdo con su estado de madurez	28
5. Liofilización del subproducto de zarzamora y subproducto de zarzamora liofilizado	30
6. Subproducto de zarzamora molido y tamizado	31
7. Escala de color CIE <i>Lab</i> , hue y croma	32
8. Modelo de fermentación colónica <i>in vitro</i>	47
9. Zarzamora cosechada, color superficial negro azulado	53
10. Color superficial de las muestras de estudio	56

Lista de tablas

Número de tablas	Página
1. Composición nutrimental de la zarzamora	10
2. Porcentaje de subproductos del fruto y su contenido de fibra dietética total y fenoles totales	15
3. Estado de madurez comercial de la zarzamora	28
4. Condiciones de separación por HPLC	40
5. Condiciones de separación por cromatografía de gases	49
6. Condiciones de separación por HPLC. Flavonoides en colon	51
7. Condiciones de separación por HPLC. Ácidos fenólicos en colon	51
8. Parámetros de color obtenidos	55
9. Cuantificación de ácidos orgánicos del subproducto de zarzamora	58
10. Perfil de ácidos grasos en el subproducto de zarzamora	59
11. Compuestos fenólicos totales (CFT) y antocianinas monoméricas en las muestras de estudio	60
12. Límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) de los flavonoides en HPLC	63
13. Compuestos fenólicos presentes en el subproducto de zarzamora (Sub-Z) y extracto de subproducto de zarzamora ultrasonificado (Ex-US)	64
14. Capacidad antioxidante en las muestras de estudio	65
15. Análisis microbiológico en muestras de estudio	67
16. Compuestos fenólicos y antocianinas bioaccesibles en el subproducto de zarzamora y el extracto del subproducto de zarzamora ultrasonificado	69
17. Flavonoides en subproducto de zarzamora (Sub-Z), extracto de subproducto de zarzamora ultrasonificado (Ex-US) y su bioaccesibilidad	72
18. Capacidad antioxidante en la fracción bioaccesible del subproducto de zarzamora y el extracto del subproducto de zarzamora ultrasonificado	76
19. Fibra dietética y sus propiedades funcionales del subproducto de zarzamora y ciruela pasa	77
20. Residuo no fermentable (RNF) y porcentaje de materia seca	81

desaparecida (MSD) después de la fermentación colónica <i>in vitro</i>	
21. Medición de pH en la fermentación colónica <i>in vitro</i>	83
22. Recuento de bacterias ácido lácticas durante la fermentación colónica <i>in vitro</i>	84
23. Cuantificación de ácidos grasos de cadena corta después de la fermentación colónica <i>in vitro</i>	85
24. Cuantificación de flavonoides en la fermentación colónica <i>in vitro</i>	88

Resumen

El procesamiento de los frutos de la zarzamora en jugo genera subproductos los cuales contienen compuestos antioxidantes como los fenoles, además de fibra dietética que pueden ser aprovechados en la industria farmacéutica o de los alimentos. Por otro lado, se ha visto que el ultrasonido se utiliza como metodología para la extracción de compuestos fenólicos. Por tanto, el objetivo del presente estudio fue valorizar los subproductos del procesamiento de la zarzamora (género *Rubus*, familia *Rosaceae*) por su contenido en antioxidantes y fibra dietética. Los resultados mostraron que el subproducto de zarzamora (Sub-Z) presentó una elevada cantidad de compuestos fenólicos totales y antocianinas (4016.43 ± 13.44 mg y 364.53 ± 7.36 mg/100 g bs, respectivamente) en comparación con el extracto de subproducto de zarzamora ultrasonificado (Ex-US) y dos productos comerciales, a base de ciruela pasa (CP) y extracto de cáscara de uva (Ex-Uva). El Ex-US presentó mayor cantidad de aglicones con un total de 101.98 mg/100 g bs respecto al Sub-Z (75.91 mg/100g bs). En relación con la capacidad antioxidante, el Sub-Z tuvo alto valor para ABTS y FRAP (5422.38 ± 71.50 mg EAA/100 g bs y 12511.44 ± 147.39 μ mol Fe(II)/100g bs, respectivamente). Todas las muestras de estudio presentaron buena calidad microbiológica a excepción de los productos comerciales evaluados que presentaron mesófilos aerobios. El mayor porcentaje de bioaccesibilidad fue para el Ex-US-B (Ex-US-bioaccesible) con 68%, respecto al Sub-Z-B (Sub-Z-bioaccesible) (38%). De 9 flavonoides, 3 fueron bioaccesibles en el subproducto Sub-Z-B, destacando la luteolina y la Q-3-G $\geq 100\%$, seguido del ácido gálico (48%), en comparación con la muestra ultrasonificada (Ex-US-B). Después del proceso digestivo, la capacidad antioxidante (ABTS y FRAP) del Ex-US-B fue mayor al 100 % de la encontrada en la muestra. La Sub-Z presentó un alto contenido de fibra ($44.26 \pm 0.09\%$) en comparación con el CP ($8.06 \pm 0.12\%$), así como en propiedades funcionales. El elevado contenido de fibra dietética ocasionó una fermentación de esta en donde el Ex-US fue la muestra que tuvo más porcentaje de materia seca desaparecida ($93.70 \pm 1.27\%$), ácidos grasos de cadena corta como el ácido acético (387.65 ± 3.60 mg/L) y propiónico (20.17 ± 0.15 mg/L). Por último, el flavonoide miricetina en el Ex-US, se encontró en las fracciones del alimento que llegaron al

colon, considerándose con un porcentaje de 13.2% de bioaccesibilidad, respecto al Sub-Z. Por lo anterior, el subproducto de zarzamora contiene compuestos de interés para la salud como los compuestos fenólicos y fibra dietética, mientras que el ultrasonido es una tecnología que puede aprovecharse para obtener una mejor disponibilidad de sustrato para la microbiota intestinal, lo que está directamente relacionado con la prevención de enfermedades relacionadas con el tracto gastrointestinal.

Abstract

The processing of blackberry fruits produce by-products which contain antioxidant compounds such as phenols, as well as dietary fiber that could be exploited by pharmaceutical or food industry. On the other hand, it has been seen that ultrasound is used as a methodology for the extraction of phenolic compounds. Therefore, the objective of the present study was to value the by-products of blackberry processing for its antioxidant and dietary fiber content. The results showed that the sub-product of blackberry (Sub-Z) had high amount of total phenolic compounds and anthocyanin (4016.43 ± 13.44 mg and 364.53 ± 7.36 mg /100 g db, respectively) in comparison with ultrasonic blackberry (Ex-US) and two commercial products, based on prune (CP) and extract of grape skin (Ex-Uva). The Ex-US had a greater quantity of aglycones with a total of 101.98 mg/100 g db compared to the Sub-Z (75.91 mg/100 g db). In relation with the antioxidant capacity, the Sub-Z had high value for ABTS and FRAP (5422.38 ± 71.50 mg EAA/100 g db and 12511.44 ± 147.39 μ mol Fe (II)/100 g db, respectively). All the study samples had a good microbiological quality with exception commercial products which had aerobic mesophiles. The highest percentage of bioaccessibility was for Ex-US-B (Ex-US-bioaccessible) with 68%, with respect to Sub-Z-B (Sub-Z-bioaccessible) (38%). Of 9 flavonoids, 3 were bioaccessible in the RZ-B residue, highlighting luteolin and Q-3-G $\geq 100\%$, followed by gallic acid (48%), compared to the ultrasound sample (Ex-US-B). After the digestion process, the antioxidant capacity (ABTS and FRAP) in Ex-US-B was higher than 100 % than the original sample. The Sub-Z had a high content of total dietary fiber ($44.26 \pm 0.09\%$) compared to the CP ($8.06 \pm 0.12\%$), as well as in functional properties. The high content of dietary fiber caused a fermentation of this in which the Ex-US was the sample that had more percentage of dry matter disappeared ($93.70 \pm 1.27\%$), short chain fatty acids as acetic acid (387.65 ± 3.60 mg/L) and propionic (20.17 ± 0.15 mg/L). Finally, the flavonoid myricetin was found in the fractions evaluated in colon, considering a percentage of 13.2% of bioavailability, with respect to the Sub-Z. Therefore, the residue of blackberry contains compounds of interest for health such as phenolic compounds and dietary fiber, while ultrasound presented better substrate

available for the intestinal microbiota, which leads to the prevention of diseases related to the gastrointestinal tract.

1. Marco teórico

1.1. Zarzamora

La zarzamora, también llamada frutilla, baya, blackberry o berry (por su nombre en inglés), proviene del género y familia *Rubus* y *Rosaceae*, respectivamente, este fruto se cultiva en México, así como en Centroamérica y Sudamérica (Acosta-Montoya, Vaillant, Cozzano, Mertz, Pérez y Castro, 2010). La zarzamora se caracteriza por ser un fruto carnoso, de tamaño pequeño, entre 3 y 12 g de peso total, se encuentra formado por múltiples drupas y cada una de ellas contiene una semilla (Strik, 2007). En general, estos frutos se cosechan casi en su última etapa de madurez, ya que cuando son cortados de la planta ya no siguen madurando (Pérez y Vázquez, 2004).

1.1.1. Composición nutrimental y química de la zarzamora

De acuerdo con la Tabla 1, la zarzamora tiene alto contenido en carbohidratos, así como en fibra dietética total, potasio, vitamina C y ácidos grasos poliinsaturados (USDA 2018; Kaume, Howard y Devareddy, 2012). Dicho fruto presenta un sabor ácido debido a la presencia de ácidos orgánicos (ácido málico, cítrico, tartárico, fumárico y shikímico) y su concentración total es de 45.1 mmol/kg (Mikulic-Petkovsek, Schmitzer, Slatnar, Stampar y Veberic, 2012).

La zarzamora también se caracteriza por tener sabor dulce y su coloración va cambiando de rojizo intenso hasta llegar a color negro, dependiendo de su estado de maduración (Vacaro, Lopes, Perin y Da Silva, 2018; Strik, 2007; Acosta-Montoya y colaboradores, 2010). Respecto al sabor dulce, es porque existe una biosíntesis de azúcares simples debido a la degradación del almidón, y esto ocurre en las últimas etapas de maduración, sin embargo, la firmeza del fruto disminuye (Kluge, Nachtigal, Fachinello y Bilhalva, 2002). Es por ello que, esta frutilla se consume principalmente en fresco, siendo el consumo per cápita nacional de 1.6 kg (SIAP, 2018a).

Tabla 1. Composición nutrimental de la zarzamora (100 g en peso fresco)

Componente	Valor nutrimental
Energía (kcal)	43
Proteína (g)	1.39
Lípidos totales (g)	0.49
Carbohidratos (g)	9.61
Fibra dietética total (g)	5.3
Azúcares totales (g)	4.88
Minerales (mg)	
Calcio	29
Hierro	0.62
Magnesio	20
Fósforo	22
Potasio	162
Vitaminas	
Vitamina C (mg)	21
Vitamina B1 (mg)	0.020
Vitamina B2 (mg)	0.026
Vitamina B3 (mg)	0.646
Vitamina B6 (mg)	0.030
Folato (µg)	25
Vitamina A (µg)	11
Vitamina E (mg)	1.17
Lípidos	
Ácidos grasos saturados (g)	0.014
Ácidos grasos monoinsaturados (g)	0.047
Ácidos grasos poliinsaturados (g)	0.280

USDA, 2018; Kaume *et al.*, 2012.

Los compuestos fenólicos están formados por anillos de benceno y pueden contener uno o más grupos hidroxilo, estos compuestos pueden ser moléculas simples o compuestos polimerizados (Velderrain-Rodríguez y colaboradores, 2014). Algunos ejemplos son los ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos, los flavonoides como

las flavonas, los flavonoles, las flavononas y antocianidinas, lignanos, estilbenos y polímeros fenólicos como las proantocianidinas y los taninos hidrolizables (Craft, Kerrihard, Amarowicz y Pegg, 2012).

Otros componentes presentes en las diferentes bayas son los compuestos fenólicos totales (37-922 mg equivalentes de ácido gálico (EAG)/kg) (Mikulic-Petkovsek *et al.*, 2012). Se ha reportado que la zarzamora contiene entre 208 y 618 mg EAG/100 g en base fresca (bf) (Rutz, Voss y Zambiasi, 2012), y numerosos compuestos fenólicos contribuyen a la pigmentación de las células de las plantas, como las antocianinas, las cuales proporcionan colores rojos, azules, violetas, naranjas y púrpuras (Moreno-Montoro, Olalla-Herrera, Gimenez-Martinez, Navarro-Alarcon y Rufian-Henares, 2015) y la concentración es de 222 mg de cianidina-3-glucósido (Cy-3-G)/100 g bf (Van de Velde, Pirovani y Drago, 2018).

En la zarzamora se encuentran los flavonoides totales (276 y 312 mg/100 g bf), así como elagitanos (14.6 mg equivalentes de ácido elágico (AE)/g en base seca (bs)) y ácidos fenólicos (135 a 210 mg/100 g bf) (Sellappan, Akoh y Krewer, 2002; Acosta-Montoya y colaboradores, 2010; Rutz y colaboradores, 2012). El contenido de estos compuestos dependen del cultivar (Guedes, Abreu, Maro, Pio, Abreu & Oliveira, 2013; Curi, Pio, Moura, Tadeu, Nogueira y Pasqual, 2015), así como la maduración, a mayor estado de madurez, mayor contenido de fenoles (Rutz y colaboradores, 2012). Las condiciones climatológicas también influyen, cuando la planta está expuesta a los UV, se estresa para proteger al fruto provocando un aumento en la producción de estos metabolitos (Sellappan y colaboradores, 2002; Naczki y Shahidi, 2006; Koubaa, Mhemdi y Vorobiev, 2015).

1.1.2. Producción de la zarzamora

En el 2012, México era el segundo lugar en producción mundial de zarzamora, con 139,803 toneladas, y para el 2017 subió al primer lugar con 270,399 toneladas. Son 61 países los que cosechan este fruto y México aporta alrededor de una cuarta parte del total producido, por lo tanto, nuestro país es excelente exportador de zarzamora,

ya que en el 2012 alcanzó a 25 países y para el 2017 fueron 31 países, siendo Estados Unidos el principal país que recibió zarzamora (SIAP, 2018a).

La producción a nivel nacional ha ido en aumento, en el 2008 fue de 118 mil toneladas, mientras que para el 2017 su producción fue el doble con 270 mil toneladas (SIAP, 2018a). Los estados productores son Michoacán, Jalisco, Colima, Baja California, México, Puebla, Guanajuato, Morelos, Querétaro, Veracruz, Ciudad de México e Hidalgo, y en el año 2018, la producción total nacional se proyectó a 289 911 toneladas. El estado con mayor estimación fue Michoacán, con 279 273 toneladas (96.3%), seguido de Jalisco (2.6%), siendo Hidalgo el estado con menor intención de cosecha nacional con sólo 3 toneladas (< 1%) (SIAP, 2018b).

Para la siembra de este fruto, se requiere un ambiente fresco y soleado (entre 16 y 25°C), sin embargo, en el invierno también se pueden cultivar y para su desarrollo debe encontrarse entre 1200 y 2000 metros sobre el nivel del mar (SIAP, 2016; Strik, 2007). Los meses con mayor cosecha en el territorio mexicano son en mayo, junio y noviembre con 14.6, 11.9 y 10.5%, respectivamente (SIAP, 2018a) (Figura 1).



Figura 1. Porcentaje de producción mensual nacional de la zarzamora. ■ Mayor disponibilidad; ■ Disponibilidad media; ■ Disponibilidad baja o nula (SIAP, 2018a).

La zarzamora se utiliza en la industria alimentaria para la elaboración de mermeladas, dando sabor al yogurt y/o helados, vinos o licor, ate, concentrados de pulpa, extractos y jugos (Van de Velde y colaboradores, 2016; SIAP, 2016; Siriwoharn, Wrolstad y Durst, 2005). Una vez procesado el fruto, se obtienen subproductos ya sea piel, semillas o pulpa, los cuales se usan en la alimentación para animales o compostas (Rohm y colaboradores, 2015).

1.2.1. Diferencia entre desecho, subproducto y residuo

Para diferenciar los términos desecho, subproducto y residuo, se hace la aclaración ya que suelen usarse como sinónimos. Los tres se obtienen del procesamiento industrial de la materia prima, los *desechos* no tienen algún atributo por el cual tengan que comercializarse o emplearse en otros procesos, es decir, no tienen un uso posterior, por lo tanto, no es de interés y se considera como basura. El *subproducto* generalmente tiene una utilidad, se comercializa y entonces presenta un valor agregado (Ravindran y Jaiswal, 2016). Por último, el *residuo* puede ser o no comercializado debido a que no es tan común, o porque se produce en pequeñas cantidades, sin embargo, algunos de sus componentes pueden tener provecho para su utilización (Saval, 2012).

Los subproductos contienen elevadas cantidades de agua y materia orgánica, los cuales pueden ser fácilmente fermentables, siendo una fuente para la proliferación de cucarachas, moscas, mosquitos, ratones y toda la fauna nociva para el hombre. Mucho de estos subproductos son eliminados incorrectamente en grandes espacios, creando basura y produciendo sustancias tóxicas después de su descomposición (Aktar y Abdul, 2017). En la mayoría de los casos, han sido utilizados como alimento para rumiantes, cerdos, aves o como abono para las tierras agrícolas (Saval, 2012; Rosas, Ortiz, Herrera y Leyva, 2016).

Dentro de la materia orgánica, los subproductos presentan componentes como fibra dietética, pigmentos, ácidos grasos y antioxidantes, que son importantes para la nutrición humana (Kodal y Aksu, 2017). Por lo tanto, en estos subproductos se pueden recuperar ingredientes de alto valor dentro de la cadena alimentaria (Galanakis, 2012).

De acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, a nivel mundial se pierde aproximadamente un tercio de la parte comestible de los alimentos producidos para el consumo humano, esta cantidad representa aproximadamente 1.3 mil millones ton/año (FAO, 2014).

Los subproductos generados por la industria de alimentos son baratos y fácilmente disponibles, por lo cual la investigación ha desplazado su interés por su contenido en antioxidantes y otros componentes (Babbar, Oberoi, Uppal y Patil, 2011).

En la Tabla 2 se presenta el porcentaje de subproductos por fruto, el porcentaje de la parte comestible en frutos como la guayaba, mandarina y manzana es elevado (mayor al 80%), mientras que la obtención de subproductos en general es del 10 al 66%. Estos subproductos aportan cantidades considerables de fibra dietética total (de 27 a 74% aproximadamente) y compuestos fenólicos. Estos componentes provenientes de los subproductos pueden dar beneficios a la salud humana (Rohm y colaboradores, 2015).

Entre los frutos donde se obtienen subproductos por su procesamiento se encuentran las berries, el subproductos se ha utilizado como ingrediente alimentario incorporando fibra dietética en productos a base de cereales horneados (Rohm y colaboradores, 2015). Entre estas berries, se encuentran la grosella, la frambuesa, el arándano y la zarzamora, los cuales se utilizan en la elaboración de jugos, generando entre el 20 y 30% de subproductos y sus componentes son principalmente piel, semillas o en ocasiones tallos, y representan un material importante debido a la presencia de fibra dietética (Struck, Plaza, Turner y Rohm, 2016; Rohm y colaboradores, 2015).

Tabla 2. Porcentaje de subproductos del fruto y su contenido de fibra dietética total y fenoles totales

Fruto	Subproductos	Parte comestible	FDT ^a	CFT ^b	Referencia
Guayaba	10-15% (piel y semillas)	85-90%	48.6	5870.0**	Schieber y colaboradores, (2001) Sánchez-Zapata y colaboradores, (2009) Jimenez-Escrig y colaboradores, (2001)
Mandarina	16% (cáscara)	84%	NR	641.0**	Ayala-Zavala y colaboradores, (2010) Deng y colaboradores, (2012)
Mango	13.5% (semilla), 11% (cáscara), 17.9% (pulpa inutilizable)	58%	74.0	3049.0**	Ayala-Zavala y colaboradores, (2010) Larrauri y colaboradores, (1996) Deng y colaboradores, (2012)
Manzana	11% (núcleo de la pulpa y semillas)	89%	44.0	3300.0*	Ayala-Zavala y colaboradores, (2010) Walter y colaboradores, (1985) Wolfe y Liu (2003)
Naranja	66% (cáscara)	44%	57.0	179.0**	Li y colaboradores, (2006) Chau y Huang, (2003) Gorinstein y colaboradores, (2001)
Papaya	6.5% (semillas), 8.5% (cáscara), 32.1% (pulpa inutilizable)	53%	NR	8.0**	Ayala-Zavala y colaboradores, (2010) Norshazila y colaboradores, (2010)
Piña	9.1% (núcleo), 13.5% (cáscara), 14.9% (corona), 14.5% (pulpa)	48%	70.6	362.0**	Ayala-Zavala y colaboradores, (2010) Larrauri y colaboradores, (1997) Deng y colaboradores, (2012)
Plátano	Hasta 30% (cáscara)	70%	NR	907.0*	Schieber y colaboradores, (2001) Someya y colaboradores, (2002)
Tuna	45% (semillas, cáscara y pulpa inutilizable)	65%	27.0-45.0	NR	Bensadón y colaboradores, (2010)
Zanahoria	30-40% (bagazo)	60-70%	45.4	1371.0*	Schieber y colaboradores, (2001) Chantaro y colaboradores, (2008)

^aFDT: Fibra dietética total (g/100 g); ^bCFT: Contenido fenólico total (mg/100 g): * peso seco, ** peso fresco. NR. No reportado

1.2.2. Utilización de subproductos ricos en compuestos fenólicos

De forma natural, algunos compuestos como los ácidos fenólicos se presentan en su forma insoluble o unidos entre sí, mientras que los flavonoides se presentan en su forma soluble (tienen unido a su estructura los glucósidos, ya sea uno o varios por medio de enlaces O-glucosídico o a través de enlaces C-glucósidos) (Acosta-Estrada, Gutiérrez-Urbe y Serna-Saldívar, 2014).

En los últimos años, se están utilizando los subproductos agroindustriales como ingredientes, debido a que son ricos en compuestos antioxidantes y fibra dietética, principalmente. Varios estudios han reportaron la adición de pulpa de cereza agria, extracto de orujo de uva, orujo de uva seco y extracto de cáscara de granada a yogurt, en los que han observado que el contenido de compuestos fenólicos se incrementa cuando se le adicionan los subproductos (Sengül, Erkaya, Sengül y Yildiz, 2012; Tseng y Zhao, 2013; Mohamed, Zayan y Nadia, 2014; El-Said, Haggag, El-Din, Gad y Farahat, 2014).

También en los productos de panificación como la adición de fenoles de un extracto de pulpa de kiwi en un pan sin gluten (Sun-Waterhouse y colaboradores, 2009). En un muffin se adicionó cáscara de manzana en polvo (Rupasinghe, Wang, Huber y Pitts, 2007) y en galletas, se sustituyó cierto porcentaje de harina de trigo con polvo de cáscara de mango (Ajila, Leelavathi y Prasada-Rao, 2008).

Otros estudios han utilizado semillas de uva con efecto antioxidante en la pechuga y muslo de pollo crudo, pescado crudo congelado y pechuga de pavo (Brannan & Mah, 2007; Lau y King, 2003; Pazos, Gallardo, Torres y Medina, 2004).

Por lo anterior, los subproductos agroindustriales adicionados a los alimentos ayudan a su buena conservación, asimismo, los compuestos adicionados impactan positivamente en la salud del hombre. Mazzoni y colaboradores, (2016) consideran que el cáncer y otras enfermedades pueden prevenirse con una alimentación adecuada, en la que se incluya la ingesta de compuestos antioxidantes, como los

fenoles. Sin embargo, se debe tomar en cuenta que, para tener un efecto positivo en la salud, los compuestos fenólicos de los alimentos que son ingeridos se absorben después de un proceso digestivo (Le Bourvellec y Renard, 2012), por lo tanto, es necesario estimar su bioaccesibilidad.

1.3. Bioaccesibilidad de compuestos fenólicos en subproductos

La bioaccesibilidad se define como la cantidad de alimento constituyente que está presente en el intestino, como consecuencia de la liberación de este constituyente de la matriz de alimentos sólidos, y puede ser capaz de pasar a través de la barrera intestinal (Saura-Calixto, Serrano y Goñi, 2007).

Por otro lado, la biodisponibilidad es la fracción de nutriente o compuesto ingerido que alcanza la circulación sistémica y es utilizada e incluye digestión gastrointestinal, absorción, metabolismo, distribución de tejidos y bioactividad (Wood, 2005; Carbonell-Capella, Buniowska, Barba, Esteve y Frígola, 2014).

La bioaccesibilidad se realiza a través de métodos *in vitro*, son de bajo costo y tiempo, relativamente sencillos y hay mayor control respecto a los estudios *in vivo* (You, Zhao, Regenstein y Ren, 2010). De hecho, existen estudios donde evalúan la bioaccesibilidad *in vitro* de compuestos fenólicos presentes en subproductos agroindustriales, como la piel y orujo de zanahoria, así como en cáscara de mango (Kamiloglu y colaboradores, 2015; Blancas-Benitez, Mercado-Mercado, Quirós-Sauceda, Montalvo-González, González-Aguilar y Sáyago-Ayerdi, 2015).

La absorción de estos compuestos va a depender de varios factores como el peso molecular, su estructura, el grado de polimerización, la solubilidad o interacción con otros fenoles, por ejemplo, el ácido gálico puede absorberse con facilidad en el intestino delgado, mientras que los fenoles con peso molecular mayor como las proantocianidinas, deben hidrolizarse para liberar estructuras más pequeñas (monómeros o dímeros) y así poder atravesar la pared celular (Martin y Apple, 2010; Hackman, Polagruto, Zhu, Sun, Fujii y Keen, 2008).

Los compuestos fenólicos insolubles se ligan a través de enlaces covalentes a los componentes que le dan estructura a la pared celular, como la celulosa, hemicelulosa (como los arabinoxilanos), ligninas, pectinas y proteínas estructurales en forma de barra (Wong, 2006) (Figura 2).

Los enlaces covalentes éter ocurren entre la lignina y el grupo hidroxilo del anillo aromático de los fenoles, principalmente ácidos hidroxicinámicos e hidroxibenzoicos, mientras que los carbohidratos y proteínas estructurales se unen por enlace éster al grupo carboxílico de los fenoles (Bhanja, Kumari y Banerjee, 2009; Liu, 2007; Liyana-Pathirana y Shahidi, 2006).

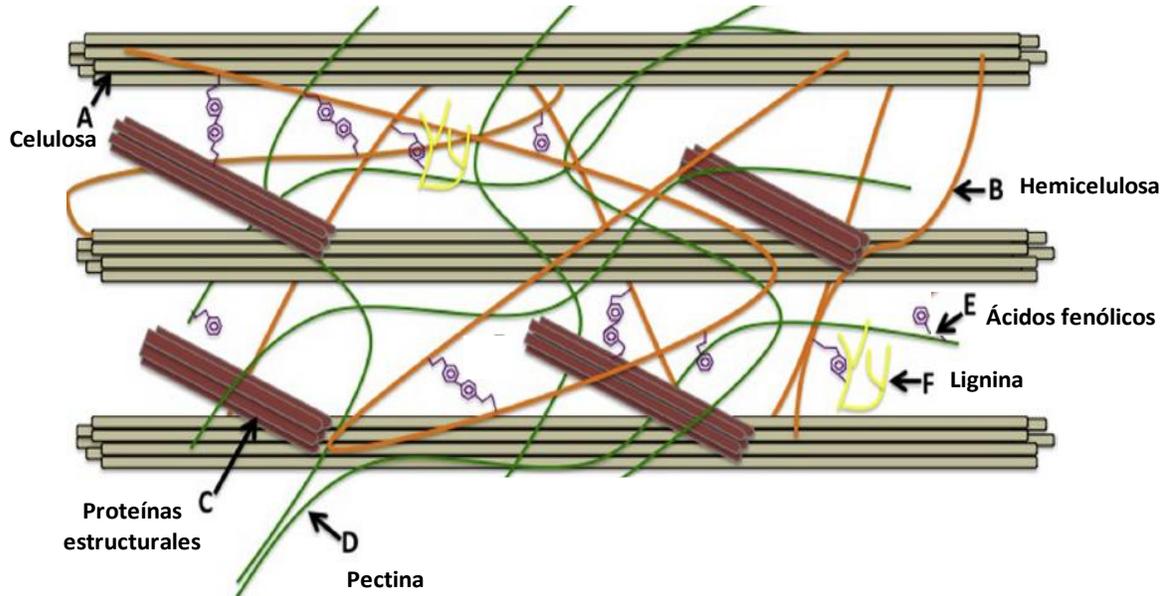


Figura 2. Estructura de la pared celular primaria del material vegetal y su unión entre componentes estructurales y compuestos fenólicos (Modificado de Acosta-Estrada *et al.*, 2014).

Los fenoles tienen funciones importantes dentro de la pared celular, ya que sirven como barrera física y química para la protección de agentes patógenos, poseen poder astringente que puede resultar en el alejamiento de insectos, son antimicrobianos, antifúngicos y antioxidantes (Liu, 2007; Sancho, Bartolomé, Gómez-Cordovés, Williamson y Faulds, 2001).

Los compuestos fenólicos se absorben en intestino delgado, su bioaccesibilidad es total o parcial, ya que depende del peso molecular, la estructura conformacional y la interacción con otros componentes como las proteínas, lípidos o carbohidratos (Oliveira, Amaro y Pintado, 2018). Los compuestos que no son absorbidos en intestino delgado son transportados al colon y ahí se metabolizan en compuestos más pequeños (como los ácidos benzoicos, fenilpropiónicos, fenilacéticos) para su absorción (Gil-Sánchez, Cueva, Sanz-Buenhombre, Guadarrama, Moreno-Arribas y Bartolomé, 2018; Muñoz-González, Jiménez-Girón, Martín-Álvarez, Bartolomé y Moreno-Arribas, 2013; Ozdal, Sela, Xiao, Boyacioglu, Chen y Capanoglu, 2016).

1.4.Fibra dietética y usos

La fibra dietética se define como aquellos carbohidratos poliméricos que son consumidos y que no se hidrolizan por las enzimas del intestino delgado del hombre y que además aportan beneficios fisiológicos a la salud, entre ellos se encuentran los carbohidratos sintéticos con o sin modificaciones físicas, enzimáticas o químicas (Zielinski, DeVries, Craig y Bridges, 2013). Por lo tanto, la fibra dietética permanece intacta en intestino delgado y pasa a colon donde es fermentada por la microbiota intestinal (Sonnenburg y Sonnenburg, 2014). Algunos enlaces glucosídicos pueden hidrolizarse sólo parcialmente en presencia de la enzima amilasa pancreática y/o sacarasa, los cuales se encuentran en el borde del cepillo que se localiza en el intestino delgado, y maltasa o glucoamilasa, mientras que otros enlaces como los β -glicosídicos no pueden hidrolizarse, debido a que los mamíferos no tienen esas enzimas necesarias (Wang, Wichienchot, He, Fu, Huang y Zhang, 2019).

Se ha venido agrupando tradicionalmente a la fibra en función de su mayor o menor solubilidad de agua. Dentro de la fibra dietética soluble se encuentran las pectinas, β -glucanos, galactomanos, fructanos, oligosacáridos y mucílagos, mientras que las hemicelulosas, celulosas y ligninas conforman a la fibra dietética insoluble (McCleary y colaboradores, 2012).

La interacción que se lleva a cabo entre las fibras y el agua ha sido ampliamente estudiada como la capacidad de hidratación (las más conocidas capacidad de hinchamiento y retención de agua), solubilidad, viscosidad, formación de geles y la capacidad de unir moléculas de orgánicas o minerales (Mcorrie y Fahey, 2013).

Las propiedades relacionadas con la capacidad de hidratación se relacionan con los efectos fisiológicos de la fibra, ya que aportan volumen al bolo fecal, retienen agua e intervienen en el intercambio de iones y moléculas orgánicas (González-Aguilar, Blancas-Benitez y Sayago-Ayerdi, 2017). Los componentes de la fibra dietética como pectinas, β -glucanos o gomas, con un alto peso molecular, se hidratan e hinchan en el estómago incrementando la viscosidad del bolo alimenticio, haciendo más difícil la absorción de nutrientes (glucosa, grasa, minerales, etc.) en la mucosa intestinal (Guillon y Champ, 2000).

La fermentación bacteriana a nivel de colon ocurre en presencia de carbohidratos y proteínas, que tiene como resultado la generación de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), lo cual depende en gran medida de aspectos nutricionales, patológicos y la microbiota (Ríos-Covián, Ruas-Madiedo, Margolles, Gueimonde, De los Reyes-Gavilán y Salazar, 2016).

Estos AGCC producidos por la microbiota son ácido acético, propiónico y butírico en proporción relativa en el colon siendo 6:3:1 y su concentración total es de aproximadamente 100 mM (Ganapathy, Thangaraju, Prasad, Martin y Singh, 2013). La fermentación sacarolítica se produce mayormente en el colon proximal, mientras que en el colon distal es la fermentación proteolítica, la cual es menos propicia, ya que tiende a la formación de productos tóxicos finales (amoníaco, compuestos de azufre y compuestos fenólicos) (Vanhoutvin y colaboradores, 2009).

Por lo tanto, se ha observado que existe una relación inversa con el progreso de enfermedades no transmisibles, como la obesidad, diabetes y cáncer (Lee y Hase, 2014). Una dieta rica en fibra dietética puede prevenir el cáncer de colon, ya que

debido a la fermentación, especialmente de la fibra soluble, se producen ácidos grasos de cadena corta por la microbiota presente en el intestino grueso (Saikia y Mahanta, 2016).

Los frutos y vegetales se consideran altos en fibra dietética, y en la piel, cáscara y semillas se concentra este componente, por lo tanto, los subproductos agroindustriales son los principales recursos de este componente (Saikia y Mahanta, 2016).

Diversos estudios han aprovechado la fibra proveniente de subproductos para la adición de alimentos como la fibra dietética de cáscara de mango en macarrones, extracto de orujo de uva y fibra de naranja a un yogurt, subproducto de uva roja a un pan de centeno y salchicha adicionada con fibra de naranja (Ajila, Aalami, Leelavathi y Rao, 2010; Sendra, Kuri, Fernández-López, Sayas-Barberá, Navarro y Pérez-Alvarez, 2010; Tseng y Zhao, 2013; Mildner-Szkudlarz, Zawirska-Wojtasiak, Szwengiel y Pacyński, 2011; Fernández-López, Sendra, Sayas-Barberá, Navarro y Pérez-Alvarez, 2008). La adición de fibra en alimentos es recomendada sobre todo en poblaciones en que ha disminuido la ingesta de este componente por el incremento de alimentos procesados con el consecuente incremento de enfermedades no transmisibles (Sonnenburg y Sonnenburg, 2014).

De acuerdo con el Food and Nutrition Board & Institute of Medicine (2001), los requerimientos del consumo de fibra dietética en mujeres adultas (< 50 años) debe ser de 25 g al día y las mujeres mayores a 50 años de 21 g al día; mientras que para los hombres adultos < 50 años es de 38 g al día y de 30 g/día en adultos >50 años. Sin embargo, la OMS/FAO (2003), refiere que la recomendación para la ingesta de fibra dietética en adultos a nivel mundial es mayor a 25 g al día.

1.5. Metodologías de extracción de antioxidantes

Los compuestos que se encuentran en una matriz sólida se pueden extraer mediante metodologías convencionales y no convencionales (Viganó y Martínez, 2015).

Las metodologías convencionales pueden extraer azúcares, ácidos orgánicos y proteínas. Una de sus ventajas es la simplicidad del procedimiento, además de ser poco costosas. Sin embargo, los inconvenientes son el tiempo de extracción tan largo, el uso de mayor proporción de disolvente, poca selectividad, el impedimento para que la muestra se encuentre sin solvente, ya que se tiene que evaporar, así como la pérdida de compuestos termolábiles (Santos, Cavalcanti, Rostagno, Queiroga, Eberlin y Meireles, 2013; Wijngaard, Hossain, Rai y Brunton, 2012). El método de extracción más común es el de extracción sólido-líquido, y algunas metodologías convencionales son usadas como Soxhlet, maceración, percolación y decocción (Ayala-Zavala y colaboradores, 2011; Albuquerque y colaboradores, 2017; Flórez-Santiago, Grande-Tovar y Díaz-Urbe, 2019; Aliakbarlu, Ghiasi y Bazargani-Gilani, 2018).

Las técnicas convencionales de extracción podrían complementarse y así mejorar el rendimiento de extracción utilizando tecnologías emergentes, para ello existe la extracción con fluidos supercríticos (SFE), la extracción asistida por microondas y extracción asistida por ultrasonido (EAU), entre otras (Ramić, Vidović, Zeković, Vladić, Cvejic y Pavlić, 2015).

Estas metodologías emergentes o no convencionales son usadas para la producción de combustibles como el bioetanol, así como en obtención de pectinas, pigmentos (carotenoides, antocianinas, betalaínas) y antioxidantes como los compuestos fenólicos (Lenucci, Durante, Anna, Dalessandro y Piro, 2013; Moorthy, Maran, Ilakya, Anitha, Sabarima y Priya, 2017; Benmeziane y colaboradores, 2018; Zafra-Rojas y colaboradores, 2016; Kushwaha, Kumar, Vyas y Kaur, 2017; Da Fonseca, Pasquel-Reátegui, Fernández y Martínez, 2015) a partir de subproductos de frutos y

vegetales que podrían ser utilizados en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica.

Cuando se realiza la extracción se debe considerar la relación solvente:muestra, el tamaño de partícula de la muestra sólida, la temperatura y tiempo (Wijngaard y colaboradores, 2012). Por lo que varios estudios han tratado de optimizar estas condiciones para un mayor rendimiento. Sin embargo, la concentración de los compuestos extraídos puede variar y eso depende de la matriz del alimento estudiado y la tecnología de extracción usada (Barba, Zhu, Koubaa, Sant'Ana y Orlie, 2016).

El ultrasonido se utiliza a menudo para aumentar el rendimiento de extracción de los lípidos, proteínas y compuestos fenólicos de la muestra, ya que permite su contacto directo con el disolvente (Ignat, Volf y Popa, 2011). El ultrasonido emite ondas sonoras inaudibles a una frecuencia mayor a 20 kHz y para una mejor extracción se ha empleado el ultrasonido de baja frecuencia (18 a 100 kHz) y alta intensidad (10 a 1000 W/cm²) (Dujmić y colaboradores, 2013).

La extracción con el ultrasonido se relaciona con la cavitación, la cual consiste en la formación, crecimiento y colapso violento de microburbujas preexistentes en un medio líquido (Galanakis, 2012). La implosión violenta de las microburbujas provoca una liberación de la energía retenida, lo que conlleva al aumento momentáneo de temperatura en los micrositos (los cuales se encuentran dispersos), esto no interfiere en el aumento de la temperatura de la muestra líquida sometida a este tratamiento. Aunado a la energía que se libera, el choque mecánico de las microburbujas puede afectar la estructura de las células que se encuentran en el microambiente (Zinoviadou y colaboradores, 2015).

Por su mecanismo de acción, el ultrasonido es utilizado para la extracción de compuestos antioxidantes, tales como los compuestos fenólicos en frutos como en subproductos como en orujo de uva, cáscara de mandarina y granada, así como

subproducto de zarzamora (González-Centeno, Comas-Serra, Femenia, Rosselló y Simal, 2015; Nipornram, Tochampa, Rattanatraiwong y Singanusong, 2018; Sumere y colaboradores, 2018; Zafra-Rojas y colaboradores, 2016).

2. Justificación

El procesamiento de alimentos de origen vegetal genera cerca de 15 millones de toneladas al año de subproductos, dependiendo del fruto, los cuales son poco utilizados o constituyen un recurso como fuente de alimento para animales y/o contaminan el medio ambiente.

Dentro de los productos que mayores subproductos produce son los cítricos, los vegetales mínimamente procesados, entre otros, generando hasta el 40% de residuos. El procesamiento de frutos como la zarzamora en jugo ocasiona alrededor de 23% de subproductos (piel y semillas), los cuales son buena fuente de fibra dietética y compuestos antioxidantes. Dado que los subproductos de frutos son de bajo costo, de fácil acceso, y con compuestos de moléculas bioactivas, la utilización de éstos, como la producción de nutraceuticos o como aditivos alimentarios puede contribuir a su aprovechamiento y por lo tanto a reducir la contaminación ocasionada por el procesamiento de alimentos de origen vegetal.

Los compuestos bioactivos que presentan los subproductos vegetales derivados del procesamiento generalmente están inmersos en estructuras celulares (pared celular, vacuolas, etc.) compuestas principalmente de fibra dietética que ocasiona una baja disponibilidad de estos compuestos en el tracto gastrointestinal o una incompleta extracción. Por lo que es necesario contar con el apoyo de tecnologías de extracción como el ultrasonido que además de liberar estos compuestos de la matriz del alimento, se pueda maximizar el rendimiento de estos compuestos en menor tiempo.

Desde nuestro conocimiento no existen reportes sobre los subproductos de la zarzamora y su aplicación de ultrasonido, en donde se evalué la absorción intestinal de los compuestos antioxidantes presentes en los subproductos de la zarzamora.

3. Objetivos

3.1. General

Valorizar los subproductos (residuo y extracto) del procesamiento de la zarzamora (*Rubus fruticosus*), evaluando la absorción intestinal de los compuestos antioxidantes y fibra dietética contribuyendo a la utilización de los subproductos en la industria alimentaria en beneficio de los productores de estos frutos.

3.2. Específicos

- Determinar el estado de madurez comercial de la zarzamora en estudio mediante el color superficial, pH y sólidos solubles totales.
- Identificar los ácidos orgánicos en el subproducto de zarzamora por cromatografía líquida de alta resolución.
- Determinar e identificar por espectrofotometría y cromatografía líquida de alta resolución los compuestos fenólicos, antocianinas y flavonoides, capacidad antioxidante (ABTS, DPPH y FRAP) y la bioaccesibilidad intestinal *in vitro* de estos compuestos en el subproducto de zarzamora y su extracto obtenido por ultrasonido, que permita identificar la contribución de compuestos bioactivos de estas fracciones del alimento en la industria alimentaria.
- Determinar fibra dietética y sus propiedades funcionales (capacidad de retención de agua, hinchamiento y retención de lípidos) del subproducto de zarzamora que permita relacionar los beneficios de la fibra dietética a nivel fisiológico y en las propiedades funcionales del subproducto como aditivo en la industria alimentaria.
- Evaluar parámetros de la fermentación colónica *in vitro* (pH, conteo de bacterias ácido lácticas, ácidos grasos de cadena corta y flavonoides) del subproducto de zarzamora y su extracto ultrasonificado que permita relacionar la absorción a nivel del tracto intestinal.

4. Materiales y métodos

La Figura 3 muestra un diagrama metodológico del proyecto realizado.

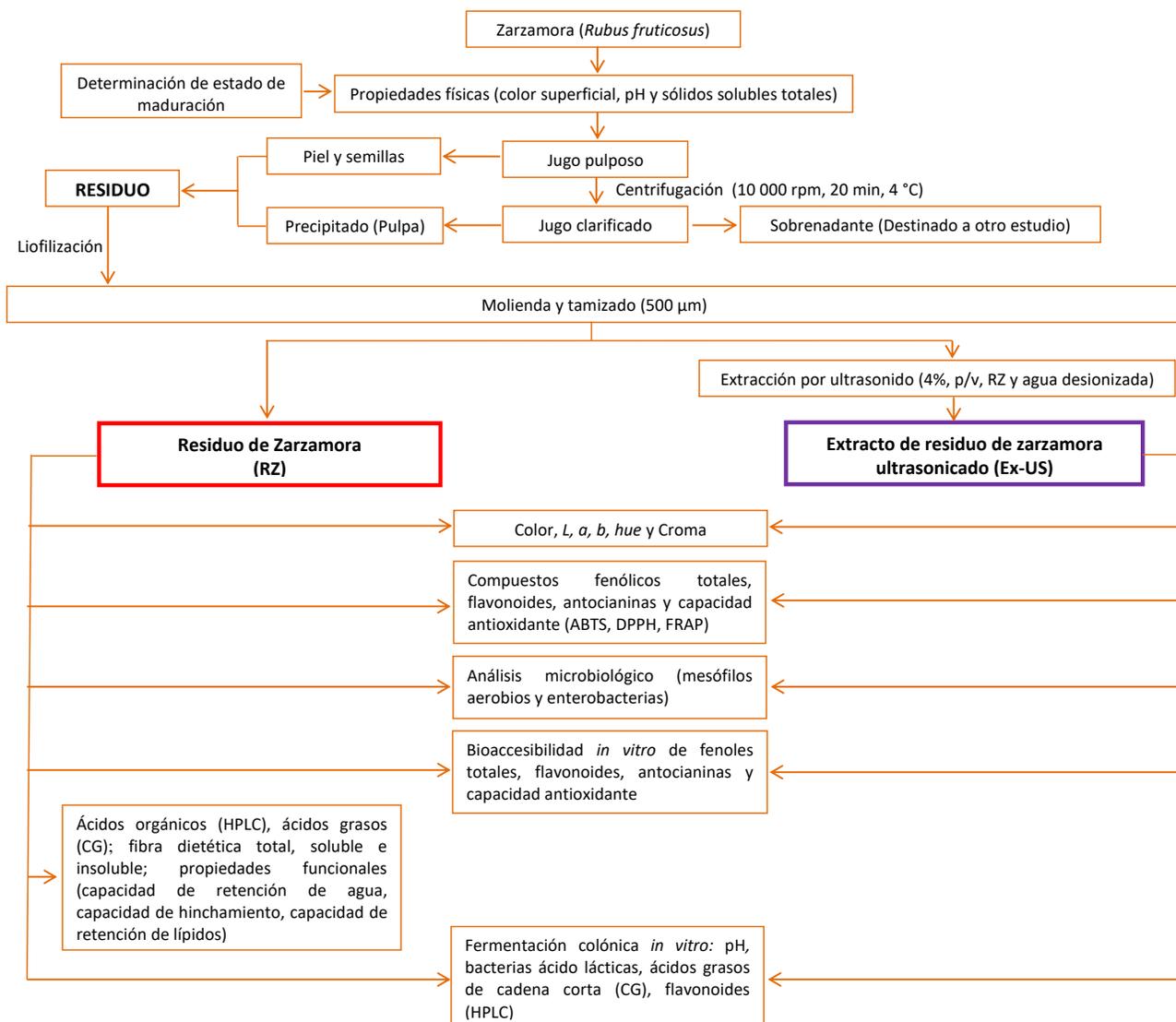


Figura 3. Diagrama del proyecto de los subproductos de zarzamora y su extracto ultrasonificado.

4.1. Zarzamora

4.1.1. Recolección y selección de los frutos

Las zarzamoras (*Rubus fruticosus*) cv. Tupy, se obtuvieron de Atotonilco el Grande, Hidalgo, México, en enero de 2016, región donde el cultivo es común. Se seleccionaron los frutos sin heridas externas y con color superficial homogéneo.

4.1.2. Evaluación del grado de maduración comercial

Se tomaron en consideración características físicas (color superficial, pH y sólidos solubles totales) para evaluar el grado de maduración comercial del fruto de acuerdo con la metodología propuesta por Acosta-Montoya y colaboradores, (2010) y Rutz y colaboradores, (2012), quienes establecieron esta clasificación de zarzamoras considerando el color superficial, pH y sólidos solubles totales, en donde el rojo brillante, púrpura y negro azulado corresponden al grado 1, 2 y 3, respectivamente (Tabla 3 y Figura 4).

Tabla 3. Estado de madurez comercial de la zarzamora

Parámetros	Estado de maduración comercial		
	Grado 1/inmaduro	Grado 2/intermedio	Grado 3/maduro
Color superficial ⁽¹⁾	Rojo brillante	Púrpura	Negro azulado
pH ⁽²⁾	2.27	2.62	2.89
SST* ⁽²⁾	4.50	5.57	7.00

⁽¹⁾ Acosta-Montoya y colaboradores 2010); ⁽²⁾ Rutz y colaboradores , 2012); *SST: Sólidos solubles totales (°Brix)



Figura 4. Color superficial de la zarzamora de acuerdo con su estado de madurez, de izquierda a derecha, se encuentra la zarzamora en estado inmaduro, intermedio y maduro

4.1.3. Determinación de pH y sólidos solubles totales

Para la medición de pH y sólidos solubles totales del fruto, se licuó la zarzamora y se tomaron 5 mL de jugo (Moreno y Oyola, 2016). Se calibró el potenciómetro (210, Hanna Instruments, USA) con soluciones buffer de pH 4.0 y 7.0 estandarizados para el análisis (Rutz y colaboradores, 2012). Los sólidos solubles totales se midieron utilizando un refractómetro (°Brix/ATC FG-113, Hangzhou Chincan Trading Co., Ltd., China) con una escala de 0-32% y fue expresado como °Brix (Rutz y colaboradores,

2012). Posteriormente, las zarzamoras se almacenaron en congelación (-30 °C) hasta su utilización. El fruto se distribuyó en bolsas con cierre hermético, 0.5 kg en cada bolsa para evitar daños al fruto por sobreposición al momento de la congelación.

4.2. Subproducto de zarzamora y su extracto termoultrasonicado

4.2.1. Obtención del subproducto de zarzamora

Para la obtención del subproducto de zarzamora, los frutos se descongelaron y lavaron con agua corriente. Se utilizó una licuadora casera (9014, American, USA) para obtener un jugo pulposo, se separó la piel y semillas a través de un colador casero. La piel y semillas se almacenaron en bolsas con cierre hermético y se congelaron a -30°C, mientras que el jugo se centrifugó a 10 000 rpm por 30 min a 4°C (Allegra 25™, Beckman Coulter, USA). El precipitado (pulpa) se almacenó en las mismas condiciones antes mencionadas. En conjunto, la piel, semillas y pulpa se denominó subproducto de zarzamora (Sub-Z), el cual se liofilizó (-56°C y 0.045 mBar) (7753020, LABCONCO, USA) (Figura 5a-b), molió (WCG75, Waring comercial® ProPrep™ Chopper Grinder, China; IKA®A11 basic, Mill Analytical, USA) y tamizó a un tamaño de partícula de 500 µm (Figura 6a-d). Finalmente, el subproducto de zarzamora se almacenó en bolsas con cierre hermético, oscuras y en congelación hasta su análisis.

4.2.2. Comparación del subproducto de zarzamora con un producto comercial

Una vez obtenido el subproducto, éste se comparó con tabletas masticables (Ciruela Pasa, Anahuac), como producto comercial. Los componentes principales de tabletas masticables fueron ciruela pasa (*Prunus domestica*) y fibra de ciruela (*Prunus domestica*). La muestra se denominó ciruela pasa (CP), se analizó y comparó con el Sub-Z (subproducto de zarzamora) para las determinaciones de antioxidantes, fibra dietética y sus propiedades funcionales.

4.2.3. Obtención del extracto del subproducto de zarzamora

Para la obtención del extracto del subproducto de zarzamora ultrasonificado (Ex-US) se preparó una solución al 4% (p/v) del subproducto de zarzamora y agua desionizada, se sometió a un procesador de ultrasonido (VCX-1500, Sonics and Materials Inc., Newtown, CT, USA), a 1500 W de potencia, con frecuencia constante de 20 kHz. La energía de entrada se controló ajustando la amplitud del equipo.

Las duraciones de pulso fueron de 4 segundos de encendido y 2 segundos de apagado. La temperatura de la muestra se controló a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ con un baño de agua (MX06S135-AA1B, Polyscience, USA).

Las condiciones de amplitud y tiempo se establecieron a partir de un estudio previo de optimización de antioxidantes realizada por Zafra-Rojas y colaboradores, (2016), las cuales fueron 91% y 15 min, respectivamente. La muestra se centrifugó a 10 000 rpm por 30 min a temperatura de 4°C . El sobrenadante se denominó extracto del subproducto de zarzamora ultrasonificado (Ex-US), el cual se congeló a -30°C hasta su análisis.



Figura 5. a) Liofilización del subproducto de zarzamora), b) subproducto de zarzamora liofilizado.



Figura 6. Subproducto de zarzamora molido y tamizado, a) molienda general, b) primer tamizado, c) molienda de semilla, d) segundo tamizado (tamaño de partícula: 500 μm).

4.2.4. Comparación del extracto del subproducto de zarzamora con un producto comercial

El Ex-US se comparó con una bebida concentrada (resveratrol, extracto de cáscara de uva roja, con acai y granada, Farmacias Similares). Dentro de sus ingredientes se encontró la vitamina C, resveratrol, coenzima Q-10, extracto de acai (*Euterpe oleracea*) y extracto de granada (*Punica granatum*). La muestra se denominó extracto de cáscara de uva (Ex-Uva), se analizó y comparó con Ex-US para determinar los compuestos antioxidantes. Cabe mencionar que tanto a los productos comerciales como a las muestras del presente estudio se les realizó un análisis microbiológico (mesófilos aerobios y enterobacterias) (Figura 3).

4.3. Análisis fisicoquímico del subproducto y del extracto ultrasonificado de zarzamora

4.3.1. Determinación de color

Para la medición de color se utilizó un colorímetro portátil (CM-608d, Minolta, Japón). Se aplicó el iluminante D65 con un ángulo de observación de 2°. Se obtuvieron los valores según la escala CIE *Lab*, de *L*, *a*, *b*, *Hue* y *Croma*, donde *L* corresponde a la luminosidad con valores de 0 (negro) a 100 (blanco) y las coordenadas *a* (+rojo a -verde) y *b* (-azul a +amarillo). *Hue* es la tonalidad o tono, se obtiene a partir de la ecuación 1, y se mide de 0° a 360°, representando el tono rojo (0°), amarillo (90°), verde (180°) y azul (270°). *Croma* se refiere a la

saturación o intensidad de color (Wrolstad, Durst y Lee, 2005) y se muestra en la ecuación 2. L , a y b fueron utilizadas para calcular la diferencia de color (ΔE) a partir de la ecuación 3 (Arias, Ospino y Zapata, 2018), es decir, el Sub-Z y Ex-US se compararon con las demás muestras.

$$h^{\circ}_{ab} = \arctan\left(\frac{b}{a}\right) \quad (1)$$

$$C = \sqrt{(a^2 + b^2)} \quad (2)$$

$$\Delta E = \sqrt{\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2} \quad (3)$$

El espacio de color con L , a , b , Hue y $Croma$ se muestra en la Figura 7. Una vez obtenidos los valores de L , a y b , se introdujeron a un calculador de color en una página WEB (Easy RGB, 2019), el cual convirtió los datos en colores característicos de acuerdo a cada muestra (Sub-Z, Ex-US, CP y Ex-Uva).

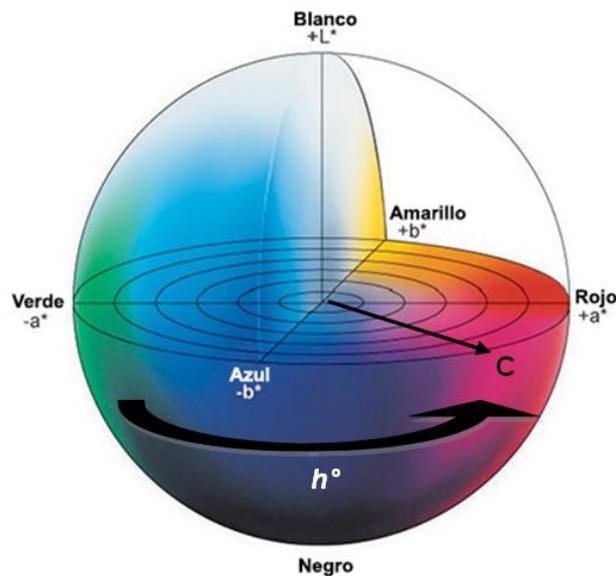


Figura 7. Escala de color CIE *Lab*, hue y croma (Tomado y modificado de Konica Minolta (2005).

4.3.2. Contenido de ácidos orgánicos

Los ácidos orgánicos, como el ácido oxálico, málico, cítrico, fumárico y ascórbico se identificaron y cuantificaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), de acuerdo con la metodología de Ruiz-Rodríguez y colaboradores, (2011). Se pesaron 500 mg de muestra (Sub-Z), se adicionaron 20 mL de ácido meta fosfórico (Sigma-Aldrich, USA) al 4.5 % y se agitó con barra magnética (P-Selecta, Asincro, España) durante 15 min en la oscuridad.

La mezcla se centrifugó (Allegra 25, Beckman Coulter, USA) a 9000 rpm por 15 min, el sobrenadante se aforó a 25 mL con ácido meta fosfórico (4.5 %). Previo a la inyección dentro del HPLC, el extracto se filtró a través de papel filtro no. 1242 y después con un filtro Millipore (PVDF, 33 mm, 0.45 µm, GVSLGV033RB, Millex, Ireland) (Prohens y colaboradores, 2005).

El cromatógrafo de líquidos de alta resolución (Micron Analítica, España) estaba equipado con una bomba isocrática (PU II, Micron Analítica, España), inyector automático AS-1555 (Jasco, Japón), con Sphereclone ODS (2) (250 x 4.60 mm, 5 µm) columna Phenomenex (Torrance, USA), un detector de UV-visible (UV100, Thermo Separation Spectra, USA); y el uso de software Cromanec XP (Micronec, España). La fase móvil fue 1.8 mM H₂SO₄ (pH 2.6). La detección UV fue a 215 nm y la velocidad de flujo de 0.4 mL/min para los ácidos oxálico, málico, cítrico y fumárico, mientras que para el ácido ascórbico fue a 245 nm y velocidad de flujo de 0.9 mL/min.

La identificación se realizó comparando los tiempos de retención de los estándares puros y la cuantificación se basó en la respuesta de la señal UV, las áreas de los picos resultantes en los cromatogramas, las cuales se representaron en función de las concentraciones obtenidas a partir de estándares, para los siguientes ácidos orgánicos, ácido oxálico (1.34 mg/mL), málico (1.40 mg/mL), cítrico (1.39 mg/mL), fumárico (1.45 mg/mL) y ascórbico (1.53 mg/mL), en ácido meta fosfórico al 4.5 %. A partir de los cuales se construyeron las curvas de calibración

(0, 10, 20, 30, 40 y 50 mg/mL). Finalmente, se procedió a inyectar en el HPLC 50 μ L de cada extracto filtrado. Los valores fueron expresados como miligramos en cada 100 g de base seca (mg/100 g bs).

4.3.3. Perfil de ácidos grasos

Previo a la identificación de ácidos grasos mediante cromatografía de gases (CG), se realizaron lavados de la muestra de acuerdo con Zafra-Rojas y colaboradores, (2016) y Siriwoharn y colaboradores, (2005) con pequeñas modificaciones. Se tomaron 10 g de muestra (Sub-Z) y se adicionaron 160 mL de agua desionizada, se agitó en vórtex (SI-0236, Vortex-Genie 2, Scientific Industries, USA) por 15 min, se centrifugó (Allegra 25, Beckman Coulter, USA) a 10,000 rpm por 10 min, se descartó el sobrenadante, al pellet se le adicionaron 80 mL de agua desionizada, se siguió el mismo procedimiento de agitación y centrifugación, sustituyendo el agua desionizada por metanol (JT Baker, México) hasta completar 6 lavados o hasta que el sobrenadante ya no presentó el color rojo intenso o fue incoloro.

Se tomaron 10 g de muestra pretratada (lavada), se colocaron en un tubo de ensayo con tapón de rosca y se añadieron 110 mL de cloroformo-metanol (CHCl_3 :MeOH, 2:1 vol/vol; Sigma-Aldrich, USA, JT Baker, México). Los tubos se agitaron en vórtex durante 5 min y se almacenaron a 4°C por más de 48 h para su análisis. Posteriormente, se tomaron 500 μ L de la fase acuosa el cual contenía CHCl_3 :MeOH y se transfirieron a un tubo con tapón de rosca para la derivatización. Después, se adicionó 1 mL de trifluoruro de boro-metanol (BF_3 :MeOH) (12.5:100; v/v; Sigma-Aldrich, USA) y se calentó la muestra a 95°C en un baño de agua (WNB 14, Memmert, Alemania) durante 6 min (Metcalf y Schmitz, 1961).

Se dejó enfriar y se agregó 1 mL de hexano (JT Baker, México) y 1 mL de agua saturada de hexano, se agitó en vórtex (SI-0236, Vortex-Genie 2, Scientific Industries, USA). A continuación, con una pipeta Pasteur se tomó la fase acuosa y se descartó.

Se agregaron 2 mL de agua saturada de hexano, se agitó y se reservó en congelación hasta su uso. Antes del análisis, la fase orgánica se evaporó con gas nitrógeno y los metil ésteres se recuperaron en hexano (Añorve-Morga y colaboradores, 2015). Los FAMES (Fatty acid methyl esters) fueron identificados y cuantificados por comparación del tiempo de retención con los estándares puros de referencia (FAME Mix C4-C24 Supelco, Sigma-Aldrich, USA). Se realizó una curva de calibración estándar con concentraciones de 2-10 mg/L (ANEXO 1). La cantidad de ácidos grasos se expresó como miligramos por cada 100 g en base seca (mg/100 g bs).

Para el perfil de los ácidos grasos se utilizó un cromatógrafo de gases (AutoSystem XL, Perkin Elmer, Australia) equipado con un detector de ionización de llama (FID) y una columna capilar (75 m × 0.18 mm × 0.14 µm; TM-2560, Supelco® SP, USA) usando el modo de inyección splitless (1 µL).

La temperatura inicial de la columna se fijó a 150°C, aumentó a una velocidad de 4°C/min a 214 °C, se mantuvo durante 2 min, y luego incrementó 2.5°C/min a 244 °C y se mantuvo durante 5 min. Las temperaturas del inyector y detector fueron de 230 y 250°C, respectivamente. La rampa split fue de aproximadamente 1 µL y se utilizó nitrógeno como gas acarreador a un flujo constante de 1 mL/min (Olloqui y colaboradores, 2018).

4.3.4. Determinación de compuestos fenólicos totales (CFT)

Se realizó una extracción acuosa-orgánica de los compuestos de acuerdo con Saura-Calixto y colaboradores, (2007). Se pesaron 250 mg para las muestras en polvo (Sub-Z y CP), se añadieron 10 mL de metanol/agua (50:50 v/v; JT Baker, México) y se mantuvieron en agitación (300 rpm por 30 min) con una agitadora orbital (LSI-3016A, LabTech, Korea). Posteriormente, se centrifugó por 20 min a 3400 rpm (V6500, Hamilton Bell VanGuard, USA).

El sobrenadante se reservó y al precipitado se le agregaron 10 mL de acetona/agua (70:30 v/v; JT Baker, México), y se siguió el mismo procedimiento antes descrito. Los sobrenadantes obtenidos se combinaron y aforaron a 25 mL con la mezcla de metanol/agua y acetona/agua (50:50 v/v). La extracción obtenida fue para cuantificar compuestos fenólicos totales, antocianinas y medir su capacidad antioxidante.

El contenido de fenoles totales se determinó mediante el procedimiento de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich, USA) (Stintzing y colaboradores, 2005). Se tomaron 100 μ L de muestra (Sub-Z, Ex-US, CP y Ex-Uva) y 500 μ L de la solución con el reactivo Folin-Ciocalteu (1:10), se añadieron 400 μ L de solución de carbonato de sodio (Meyer, México) al 7.5 %.

La mezcla se agitó en vórtex (SI-0236, Vortex-Genie 2, Scientific Industries, USA) y se dejó reposar por 30 min. Se midió la absorbancia de la mezcla a 765 nm con un espectrofotómetro (lector de microplacas, Power Wave XS UV - Biotek, software Gen5, versión 2.09, USA). El ácido gálico (Meyer, México) se utilizó como patrón de referencia y los resultados se expresaron como miligramos de equivalentes de ácido gálico por cada 100 g en base seca (mg EAG/100 g bs).

4.3.5. Determinación de antocianinas monoméricas

Las antocianinas monoméricas se determinaron con la metodología de Giusti y Wrolstad (2001), con pequeñas modificaciones. Se prepararon dos soluciones buffer: cloruro de potasio (Meyer, México) 0.025 M a pH 1.0 y acetato de sodio (Meyer, México) 0.4 M a pH 4.5. El pH se ajustó mediante la adición de HCl (Reasol, México) concentrado. Las muestras (Sub-Z, Ex-US, CP y Ex-Uva) se diluyeron en cada solución buffer (0.5 mL de muestra y 4.5 mL de solución buffer), se dejó en reposo por 15 min en la oscuridad a temperatura ambiente. La absorbancia de cada dilución se midió a 510 nm y 700 nm con un espectrofotómetro (lector de microplacas, Power Wave XS UV-Biotek, software

Gen5, versión 2.09, USA). El contenido de antocianinas se calculó con la ecuación 4.

$$\text{Contenido de antocianinas } \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \frac{(A * PM * FD)}{(E * Tp)} * 1000 \quad (4)$$

Donde: A = (Abs_{510 nm - 700 nm})_{pH 1.0} - (Abs_{510 nm - 700 nm})_{pH 4.5}. PM = Peso molecular de Cianidina-3-glucósido (449.2 g/mol), FD = Factor de dilución (1:10), ε = coeficiente de absortividad molar (26900 L mol⁻¹ cm⁻¹), Tp = Longitud del recorrido del pozo de la microplaca (0.52 cm). El contenido de antocianinas se expresó como miligramos de cianidina-3-glucósido por cada 100 g en base seca (mg/100 g bs).

4.3.6. Capacidad antioxidante

Las metodologías más comunes para medir la capacidad antioxidante de los compuestos son ABTS, DPPH y FRAP y cuando éstas se aplican al análisis de alimentos, su medición puede ser diferente dependiendo del ensayo usado (Kuskoski, Asuero, Troncoso, Mancini-Filho y Fett, 2005; Floegel, Kim, Chung, Koo y Chun, 2011).

4.3.6.1. ABTS^{•+}

La capacidad antioxidante por ABTS se realizó de acuerdo con Re, Pellegrini, Proteggente, Pannala, Yang y Rice-Evans, (1999). El radical ABTS^{•+} (ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico; Sigma-Aldrich, USA) se formó por la reacción de ABTS al 7 mmol/L con 2.45 mmol/L de persulfato de potasio (Meyer, México), se dejó reposar en condiciones de oscuridad, temperatura ambiente y durante 16 h.

Posteriormente, se diluyó la solución de ABTS^{•+} con agua desionizada hasta obtener una absorbancia de 0.70 ± 0.10 a 754 nm. Después, se tomaron 20 µL de muestra (Sub-Z, Ex-US, CP y Ex-Uva) y se adicionaron 980 µL de solución de ABTS diluido, se dejó reposar por 7 min y se tomó la lectura de absorbancia a 754

nm con un espectrofotómetro (lector de microplacas, Power Wave XS UV- Biotek, software Gen5, versión 2.09, USA). Se utilizó como patrón de referencia el ácido ascórbico (Sigma-Aldrich, USA). La capacidad antioxidante se expresó como miligramos equivalentes de ácido ascórbico por cada 100 g en base seca (mg EAA/100 g bs).

4.3.6.2. DPPH•

La capacidad antioxidante por DPPH se realizó de acuerdo con el procedimiento de Morales y Jiménez-Pérez (2001). Se preparó una solución etanólica (7.4 mg/100 mL) del radical estable DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) (Meyer, México; Sigma-Aldrich, USA). Se colocaron 100 µL de muestra (Sub-Z, Ex-US, CP y Ex-Uva) en viales y se añadieron 500 µL de solución de DPPH, la mezcla se dejó reposar 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, se midió la absorbancia a 520 nm utilizando un espectrofotómetro (lector de microplacas, Power Wave XS UV- Biotek, software Gen5, versión 2.09, USA). Como patrón de referencia se utilizó Trolox (Sigma-Aldrich, USA) y se expresó como micromol equivalentes de Trolox por 100 g en base seca (µmol ET/100 g bs).

4.3.6.3. FRAP

Por sus siglas en inglés FRAP (ferric-reducing antioxidant power) es un método para la medición del poder antioxidante (Benzie y Strain, 1996; Pulido, Bravo y Saura-Calixto, 2000). Se prepararon tres soluciones, buffer de acetatos: ácido acético glacial ($C_2H_4O_2$; Meyer, México) y acetato de sodio ($C_2H_3NaO_2 \cdot 3H_2O$; Meyer, México) 3 mM a pH 3.6; TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina; Sigma-Aldrich, USA) 10 mM en 40 mM de HCl (Reasol, México) y cloruro férrico ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$; Sigma-Aldrich, USA) 20 mM.

Se colocaron 900 µL del reactivo FRAP, el cual fue una mezcla de las tres soluciones en una relación de 10:1:1 (buffer de acetatos, TPTZ y $FeCl_3$, respectivamente), se añadieron 90 µL de agua desionizada y 30 µL de la muestra (Sub-Z, Ex-US, CP y Ex-Uva). Posteriormente, se dejaron en reposo durante 10

min en un baño de agua (180, Thermo Electron Corporation Precision, USA) a 37°C. La absorbancia se midió a 593 nm utilizando un espectrofotómetro (lector de microplacas, Power Wave XS UV-Biotek, software Gen5, versión 2.09, USA) Se utilizó sulfato ferroso (FeSO₄; Sigma-Aldrich, USA) 5 M como patrón de referencia y los resultados se expresaron como micromol de ion ferroso por 100 g en base seca (µmol Fe(II)/100 g bs).

4.3.7. Identificación y cuantificación de flavonoides por HPLC

La identificación y cuantificación de flavonoides libres se llevó a cabo por HPLC. Previo al análisis, la muestra Ex-US se liofilizó, la cual se sometió a una hidrólisis ácida, para obtener los aglicones, siguiendo el método propuesto por Taga y colaboradores, (1984) con pequeñas modificaciones. Se pesaron 0.1 g de muestra (Sub-Z y Ex-US) y se agregaron 2 mL de HCl-metanol (1.66 mL en 10 mL) (Reasol, México; JT Baker, México) 2 M, se colocaron las muestras en un baño seco (D1200, Accublock, Labnet International, USA) a 100°C por 45 min y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregaron 3 mL de agua destilada y 2 mL de éter dietílico (JT Baker, México), se agitó y colocó en un embudo de separación. Se realizaron 4 lavados, las fases acuosas se descartaron, las fases etéreas se combinaron y evaporaron en el baño seco a 50°C durante 2.5 h. Se adicionaron 500 µL de metanol al 70%, se filtró (Nylon, 0.45 µm), se colocó en un vial de vidrio y se inyectaron 20 µL al HPLC.

Por otro lado, se pesaron 0.1 g de muestra (Sub-Z y Ex-US) en viales eppendorf y se agregaron 500 µL de metanol al 70%, se dejaron en agitación (S0200-230 V-EU, Vortex Mixer, Labnet International, USA) a 250 rpm durante 16 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó a 10 000 rpm por 10 min (F-45-12-11, Eppendorf, MiniSpin Plus, USA), se filtraron las muestras (Nylon, 0.45 µm) y se inyectaron 20 µL en el HPLC.

El HPLC (Thermo Scientific Spectra System, USA) estaba equipado con un detector UV/visible fijado en 270 nm y 354 nm, se utilizó una columna Acclaim™

120, C18 (250 mm x 4.6 mm x 5 µm; Dionex Bonded Silica Products, Thermo Scientific). Se mantuvo la temperatura a 35 °C. Tomando como base el método sugerido por Wang, Ying, Sun, Zhang, Zhu y Xu (2011), se realizaron curvas de calibración de 0 a 0.2 mg/mL utilizando estándares de ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido gálico, apigenina, luteolina, quercetina, miricetina, kaempferol e isoquercitrina (quercetina-3-O-β-D-glucósido) (Sigma-Aldrich). Las soluciones estándar y los extractos se filtraron (Nylon, 0.45 µm). Los solventes y el gradiente de elución base fueron de acuerdo con la Tabla 4. El volumen de flujo y tiempo de corrida fue de 1 mL/min y 35 min, respectivamente.

Tabla 4. Condiciones de separación por HPLC.

Tiempo (min)	Fase móvil A	Fase móvil B
0.0-9.9	79	21
10.0-20.9	55	45
21.0-29.9	20	80
30.0-35.0	79	21

MeCN: Acetonitrilo. Fase móvil A: MeCN 3% + ácido acético 0.5%;

Fase móvil B: MeCN 50% + ácido acético 0.5%

4.4. Análisis microbiológico del subproducto y del extracto ultrasonificado de zarzamora

Para la determinación de la calidad microbiológica se utilizó 1 g o mL de muestra (Sub-Z, Ex-US, CP y Ex-Uva) la cual fue diluida en 9 mL de caldo peptonado (DIBICO, México) previamente esterilizado (LAC5040S, LabTech, Korea). Se prepararon diluciones decimales de las muestras en caldo peptonado y la siembra se realizó por vaciado en placa. Para el conteo de mesófilos aerobios se utilizó agar para métodos estándar (DIBICO, México) y se incubó a 30 °C durante 48 h, mientras que para el conteo de enterobacterias se utilizó agar bilis rojo violeta glucosado (VRBG, DIBICO, México) y se incubó a 37°C durante 24 h (Cruz, Capellas, Hernández, Trujillo, Guamis y Ferragut, 2007).

4.5. Estudio de la fibra dietética

4.5.1. Contenido de fibra dietética

El contenido de fibra dietética total se realizó de acuerdo con el método enzimático-gravimétrico de la AOAC (Prosky, Asp, Schweizer, De Vries y Furda, 1992) con pequeñas modificaciones (Mañas y Saura-Calixto, 1995). La muestra (Sub-Z y CP) se trató enzimáticamente con α -amilasa termoestable (Sigma-Aldrich, USA) (pH 6, 100°C, 35 min); proteasa (Sigma-Aldrich, USA) (pH 7.5, 60 °C, 35 min) y amiloglucosidasa (Sigma-Aldrich, USA) (pH 4.5, 60°C, 35 min) para eliminar los componentes digestibles proteína y almidón. Posteriormente, se realizó una separación de las fracciones de fibra dietética soluble e insoluble por centrifugación (Allegra 25, Beckman Coulter, USA) a 10 000 rpm por 15 min.

La fibra dietética insoluble se cuantificó gravimétricamente en el residuo que se obtuvo después de los tratamientos enzimáticos, los cuales se recuperaron por centrifugación, corrigiendo los valores de proteína y minerales de este residuo. La fibra dietética total (FDT) se expresó como la suma de fibra dietética soluble (FDS) e insoluble (FDI) en g/100 de muestra.

4.5.2. Propiedades funcionales de la fibra dietética

Las propiedades funcionales de la fibra dietética como la de retener agua, aceite, e hincharse son asociados con los efectos benéficos a la salud y con poseer efectos positivos al adicionarla en los alimentos (Zúñiga, 2005).

4.5.2.1. Capacidad de retención de agua (CRA)

Se colocaron 0.5 g de muestra (Sub-Z y el CP) en tubos de centrifuga, se adicionaron 10 mL de agua destilada y se agitaron manualmente con una espátula durante 10 min, se dejó en reposo durante 24 h a temperatura ambiente y se centrifugó a 3400 rpm (V6500, Hamilton Bell VanGuard, USA) durante 20 min. Después, se retiró el sobrenadante y se pesó el sedimento. La capacidad de retención de agua se calculó (ecuación 5) como la cantidad de agua retenida por la muestra seca (g/g) (Lajolo y Wensel, 1998; Robertson, De Monredon, Dysseler, Guillon, Amado y Thibault, 2000).

$$\text{CRA} \left(\frac{\text{g}}{\text{g}} \right) = \frac{(\text{PMF} - \text{PMS})}{(\text{PMS})} \quad (5)$$

Donde: PMF: peso de la muestra fresca (g), PMS: peso de la muestra seca (g).

4.5.2.2. Capacidad de hinchamiento (CH)

Se colocaron 200 mg del Sub-Z y del CP en cada probeta graduada de 25 mL con escala de 0.1 mL, y se midió el volumen ocupado (V_0) (mL) por la muestra, se adicionaron 10 mL de agua desionizada y se agitó manualmente con una espátula durante 5 min. Se dejó reposar durante 24 h a temperatura ambiente, posteriormente se midió el volumen final (V_1) (mL) de las muestras (Lajolo y Wensel, 1998; Raghavendra, Ramachandra, Rastogi, Raghavarao, Kumar y Tharanathan, 2006). La capacidad de hinchamiento (mL/g) se calculó mediante la ecuación 6.

$$\text{CH} \left(\frac{\text{mL}}{\text{g}} \right) = \frac{(V_1 - V_0)}{(PM)} \quad (6)$$

Donde: V_1 : volumen final de la muestra (mL), V_0 : volumen ocupado por la muestra liofilizada (mL), PM: peso de la muestra (g).

4.5.2.3. Capacidad de retención de lípidos (CRL)

Se pesaron 0.5 g de cada muestra (Sub-Z y el CP) en tubos de centrifuga, se adicionaron 10 mL de aceite de semilla de girasol y se agitó manualmente con una espátula durante 10 min, se dejó en reposo durante 24 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó a 3400 rpm (V6500, Hamilton Bell VanGuard, USA) por 20 min. Después, se retiró el sobrenadante y se pesó el sedimento.

La capacidad de retención de lípidos se calculó mediante la ecuación 7 como la cantidad de aceite retenida por la muestra seca (g/g) (Lajolo y Wensel, 1998; Robertson y colaboradores, 2000).

$$\text{CRL} \left(\frac{\text{g}}{\text{g}} \right) = \frac{(\text{PMF} - \text{PMS})}{(\text{PMS})} \quad (7)$$

Donde: PMF: peso de la muestra fresca (g), PMS: peso de la muestra liofilizada (g).

4.6. Ensayos de digestión *in vitro*

4.6.1. Bioaccesibilidad intestinal *in vitro* de compuestos antioxidantes

La bioaccesibilidad intestinal *in vitro* de los compuestos fenólicos (fenoles totales, antocianinas y flavonoides) y su capacidad antioxidante se determinó mediante una fase inicial de simulación de digestión intraluminal, seguida por una fase de diálisis simulando la absorción intestinal (Trinidad, Wolever y Thompson, 1996). Lo anterior se llevó a cabo utilizando un modelo de digestión *in vitro* (Miller, Parsons, Ullrey y Ku, 1981) con algunas modificaciones (Ramírez-Moreno, Zafra-Rojas, Arias-Rico, Ariza-Ortega, Alanís-García y Cruz-Cansino, 2018).

Se colocaron 500 mg de muestra (Sub-Z y Ex-US) en tubos de centrifuga de 50 mL, se agregaron 20 mL de agua desionizada y se usó HCl 6 M para ajustar el pH a 2 de las muestras. Una vez alcanzado el pH, se agregaron 120 µL de pepsina (40 mg pepsina (P-7000, Sigma Aldrich, USA) en 1 mL de HCl 0.1 M), para ser incubada en agitación (37 °C, 60 rpm por 2 h) usando un baño de agitación (LSI-3016, LabTech, USA). Posteriormente, se agregaron 1.5 mL de una disolución de pancreatina, colato de sodio y desoxicolato de sodio, en donde se pesaron 5 mg de pancreatina (P-1750 Sigma-Aldrich, USA), 12.5 mg de colato de sodio hidratado (C6445, Sigma-Aldrich, USA) y 12.5 mg de desoxicolato de sodio (D6750, Sigma-Aldrich, USA) por cada 1 mL de bicarbonato de sodio 0.1 M).

Las muestras digeridas por las enzimas se colocaron en una membrana de diálisis (tamaño de corte 12 kDa, Sigma-Aldrich, USA) y se dializaron en una solución de bicarbonato de sodio a pH 7.5, incubadas a 37°C, 60 rpm por 16 h. Transcurrido el tiempo, la fracción dializada, es decir, aquella que traspasó la membrana de

diálisis se utilizó para determinar la cantidad de compuestos antioxidantes bioaccesibles (compuestos fenólicos totales, antocianinas, capacidad antioxidante (ABTS, DPPH y FRAP) y flavonoides), siguiendo las metodologías descritas en la sección 4.3.6. Capacidad antioxidante.

La bioaccesibilidad se calculó como la diferencia de los parámetros obtenidos antes (muestra original) y después del tratamiento de digestión *in vitro*, el resultado se usó como indicador de la bioaccesibilidad en intestino delgado.

Por otro lado, el contenido dentro de la membrana de diálisis (fracción no dializada y no digerible) se colocó en un tubo de centrífuga (50 mL), el precipitado obtenido considerado como la fracción indigestible (Saura-Calixto y Goñi, 2004) se liofilizó y fue el sustrato utilizado por la microbiota intestinal en la metodología de fermentación colónica *in vitro* que será descrita posteriormente (4.6.2. Fermentación colónica *in vitro*).

Para estimar la bioaccesibilidad en intestino delgado (BI) y en colon (BC), y para calcular la bioaccesibilidad total es la suma de %BI y %BC (Van de Velde, Pirovani & Drago, 2018). Los cálculos se realizaron utilizando las ecuaciones 8-10.

$$BI (\%) = \frac{\text{mg fenoles dializados en intestino delgado}}{\text{mg fenoles en la muestra inicial}} \times 100 \quad (8)$$

$$BC (\%) = \frac{\text{mg fenoles en colon}}{\text{mg fenoles en la muestra inicial}} \times 100 \quad (9)$$

$$BT (\%) = \% BI + \% BC \quad (10)$$

4.6.2. Fermentación colónica *in vitro*

La fracción indigestible que permaneció en la membrana semipermeable en el proceso de bioaccesibilidad *in vitro* (intestino delgado), se utilizó en el modelo de fermentación colónica *in vitro*. Se llevó a cabo en estrictas condiciones anaeróbicas, suministrando bióxido de carbono para desplazar el oxígeno (Saura-Calixto y colaboradores, 2007). El método de fermentación *in vitro* fue descrito por Barry y colaboradores, (1995) y estandarizado por Goñi y Martin-Carrón (1998), con pequeñas modificaciones. El medio anaerobio adaptado por Goering y Van Soest (1970), contenía tripticaseína, solución micromineral, buffer, macromineral y resazurina (como indicador anaeróbico redox). En el Anexo 1 se muestran las proporciones de cada solución requerida para la preparación del medio anaerobio por litro de agua desionizada y a su vez las soluciones individualmente.

El medio anaerobio y la solución reductora se esterilizaron (Wacs-1080, Wise clave, USA) independientemente, después, al medio anaerobio se le agregaron 33.5 mL de la solución reductora. La mezcla se agitó y se inyectó CO₂ hasta alcanzar un cambio de coloración de rosa intenso a rosa pálido.

Para la preparación del inóculo se utilizó el contenido cecal (proveniente del ciego) de ratas Wistar macho (peso corporal 200 ± 5 g), las cuales se alimentaron con dieta de mantenimiento estándar, ajustado a sus necesidades dietéticas. Previo a ello, los roedores fueron solicitados al consejo institucional ético para el cuidado y uso de animales de laboratorio (CIECUAL) de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH), ubicado en el Instituto de Ciencias de la Salud (ICSa) y dicha solicitud fue aprobada.

La dieta de mantenimiento de las ratas fue suministrada por el bioterio de UAEH-ICSa. Estas ratas se sacrificaron en una cámara de CO₂ en el mismo bioterio. Para la recuperación del ciego de cada rata, se realizó una incisión en la línea media del abdomen y se recolectó el material cecal, el cual se pesó en un vaso estéril de 100 mL (NIPRO, México) y se añadió la solución anaerobia estéril

previamente preparada para obtener el inóculo al 10% (p/v, material cecal y medio anaerobio). Se agitó, se usaron gasas estériles para filtrar la mezcla, se llevó a cabo en condiciones de anaerobiosis inyectando la solución con CO₂ y se mantuvo a 37°C hasta su uso.

La Figura 8 representa el modelo de la fermentación colónica *in vitro* adaptada de Goering y Van Soest (1970). En este modelo se utilizaron matraces Erlenmeyer de 50 mL, en los que se colocó la muestra (Sub-Z y Ex-US) y el inóculo, a la vez que se encontraban en un baño de agua (180, Thermo Electron Corporation Precision, USA) con el fin de mantener la temperatura adecuada durante todo el experimento.

Los matraces se mantuvieron cerrados con un tapón de goma # 1, en el que se insertaron dos agujas hipodérmicas de 21 x 32 mm (NIPRO, México) y un catéter con tapón de 2.20 x 50 mm (14G) (NIPRO, México). En una de las agujas se colocó una llave de 3 vías con extensión (B.D., USA), la cual se conectó a un distribuidor de CO₂. La otra aguja fue para evitar que el CO₂ se acumulara en exceso, mientras que el catéter (acoplado a una jeringa graduada de 3 mL (B.D. USA)) se usó para tomar alícuotas en los tiempos establecidos.

Se pesaron 100 mg de muestra (fracción indigestible de Sub-Z y Ex-US previamente liofilizada) en un matraz Erlenmeyer de 50 mL. Se agregaron 16 mL de medio anaerobio y se colocó un tapón de goma, se mantuvo en agitación suave (20 rpm) para hidratar la muestra y con CO₂ para mantener el estado anaerobio durante 16 h a 4°C. Pasado el tiempo, se adicionó a cada matraz 2 mL de inóculo al 10% y se mantuvo en agitación suave a 37°C por 24 h, todo en condiciones anaerobias.



Figura 8. Modelo de fermentación colónica *in vitro*

Los blancos que se utilizaron en el estudio fue la muestra que no contenía sustrato (blanco negativo, (B-)) y el que contenía lactulosa (L-7877, Sigma-Aldrich, USA) como blanco positivo (B+) (sustrato completamente fermentable). La fermentación se detuvo con la adición de 2 mL de hidróxido de sodio (JT Baker, México) 1 M. Previo a esto, se tomaron alícuotas al inicio del estudio (0 h) y al primer día (24 h) para la medición de pH (210, Hanna Instruments, USA) y conteo de bacterias ácido lácticas. Las muestras se centrifugaron (Allegra 25, Beckman Coulter, USA) a 10000 rpm por 10 min y el sobrenadante se almacenó a -30°C para el análisis de los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y los flavonoides disponibles después de la fermentación colónica *in vitro*.

4.6.2.1. Residuo no fermentable y materia seca desaparecida

El residuo no fermentable (RNF) es la fracción que no se utiliza por la microbiota intestinal y que es excretada (Goñi y Martín-Carrón, 1998). El RNF se calculó en peso seco (ecuación 11) y se expresó en miligramos (Saura-Calixto, Goñi, Martín y Ferrer, 2003).

RNF (mg) = peso del residuo de la muestra – peso del residuo del blanco sin sustrato

Mientras que el porcentaje de la materia seca desaparecida (MSD) es la predicción de la producción de los metabolitos finales (Goñi y Martín-Carrón, 1998). El sustrato no fermentado se valoró gravimétricamente, se utilizó la ecuación 12 para su cálculo y se expresó en porcentaje (Saura-Calixto y colaboradores, 2003). Estas metodologías se calcularon para las muestras Sub-Z, Ex-US y blanco positivo.

$$\text{MSD (\%)} = \frac{(\text{Peso inicial del sustrato seco} - \text{RNF})}{(\text{Peso inicial del sustrato seco})} \times 100 \quad (12)$$

4.6.2.2. Recuento de bacterias ácido lácticas

Se realizó el recuento de bacterias ácido lácticas (BAL) en Sub-Z, Ex-US, B+ y B-, al tiempo 0 y 24 h después de la fermentación colónica *in vitro*. Para la preparación de diluciones decimales de las muestras, se tomaron 100 µL y se diluyó en 900 µL de caldo peptonado (DIBICO, México) previamente esterilizado (Wacs-1080, Wise clave, USA). Se tomó 20 µL de cada dilución y la siembra se realizó por extensión en placa. Para el conteo de bacterias ácido lácticas se utilizó agar Man, Rogosa y Sharpe (MRS) (DIBICO, México) se incubó a 37°C durante 48 h (IDF, 1997).

4.6.2.3. Cuantificación e identificación de ácidos grasos de cadena corta

El método utilizado fue el reportado por Goñi y Martín-Carrón (1998), para lo cual, se tomaron 400 µL de muestra (sobrenadante después de la fermentación colónica *in vitro* de Sub-Z, Ex-US, B+ y B-), se adicionaron 50 µL de ácido 2-etilbutírico (Sigma-Aldrich, USA) como estándar interno, 50 µL de ácido fosfórico (Fisher, Scientific, USA) grado HPLC y 500 µL de agua milli-Q. La mezcla se agitó y filtró (0.22 µm y 33 mm, SLGV033RB, Millex-GV, PVDF, Ireland).

Para la preparación de la curva de calibración, se utilizó el estándar puro de ácido acético, ácido propiónico y ácido butírico (Sigma-Aldrich, USA) a concentraciones

de 20-400, 5-100 y 1.25-20 mg/L, respectivamente. Se inyectó manualmente 1 μ L (Microliter, 701, HA-80330, Hamilton, USA) en el cromatógrafo de gases Perkin Elmer (Clarus 500, USA) el cual contó con una columna capilar DB-FFAP (Free Fatty Acid Phase, 15 m x 0.53 mm x 0.50 μ m, Agilent J&W GC, USA) y un detector de ionización de llama (Zhao, Nyman y Jonsson, 2006). Se utilizó helio como gas portador. La temperatura del detector e inyector fue de 240°C. Las condiciones establecidas (rampas de temperatura, tiempo y velocidad) se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Condiciones de separación por cromatografía de gases

	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Velocidad
Inicial	70	2.00	16°C/min
2	180	1.00	20°C/min
3	200	15.00	Fin

La concentración de AGCC se expresó como mg/L y calculó en función de las cantidades de ácido acético, propiónico y butírico producidos en la fermentación colónica *in vitro*.

4.6.2.4. Cuantificación e identificación de flavonoides en un sistema simulado de digestión en colon

La cuantificación de flavonoides se realizó siguiendo la metodología propuesta por Saura-Calixto y colaboradores, (2010) con ligeras modificaciones. Las muestras fermentadas por la microbiota intestinal se trataron previo a su cuantificación.

Se tomaron 20 mg de muestra fermentada liofilizada (Sub-Z y Ex-US) previamente y se suspendieron en 500 μ L de agua desionizada y se agitó. Posteriormente, se realizó una extracción en fase sólida en la cual se activó el cartucho Oasis HLB (60 mg, 3cc, WAT094226, Waters, USA) con 1 mL de metanol (Meyer, México) y 2 mL de agua desionizada. Después la muestra se colocó dentro del cartucho. Para

remover los componentes interferentes, la muestra se lavó con 9 mL de agua que contenía 5% de metanol y 2% de ácido acético glacial (Meyer, México). Los compuestos de interés (flavonoides) se eluyeron con 1 mL de metanol (Anexo 2).

Posteriormente, el metanol se evaporó con nitrógeno hasta sequedad y se reconstituyó con 200 μ L de solución acuosa de ácido acético grado HPLC (Sigma-Aldrich, USA) (fase móvil inicial de HPLC). Las muestras se pasaron por un filtro Gelman (membrana GHP (hydrophilic polypropylene), 4426, Acrodisc 13 mm, Syringe Filters, Pall Life Sciences, USA) de 0.45 μ m y se almacenaron a -20°C hasta su análisis.

Los flavonoides se cuantificaron por HPLC de acuerdo con la metodología establecida por Díaz-Batalla y colaboradores, (2018), usando un detector con arreglo de diodos (Waters 2996, USA) con automuestreador (Waters 717, USA) y una columna Symmetry C18 (5 μ m x 4.6 mm x 250 mm, WAT054275, Waters, Ireland). La fase móvil A fue acetonitrilo (JT Baker, USA) y la fase móvil B fue agua desionizada a pH de 2.8 ajustado con ácido acético grado HPLC (Sigma-Aldrich, USA). Para la elución de los flavonoides y ácidos fenólicos, el gradiente utilizado se describe en las Tablas 6 y 7, respectivamente. El volumen de inyección fue de 20 μ L.

Tabla 6. Condiciones de separación por HPLC. Flavonoides en colon

Tiempo (min)	% Fase móvil A	% Fase móvil B
0	0	100
10	65	35
15	80	20
16	95	5
17	96	4
18	20	80
19	0	100
20	0	100

Flujo: 1mL/min. Fase móvil A: acetonitrilo, Fase móvil B: agua desionizada con ácido acético, pH 2.8.

Se utilizaron los espectros UV-vis para detectar flavonoides y ácidos fenólicos. La absorbancia para miricetina, quercetina, apigenina y kaempferol fue a 252, 254, 266 y 265 nm, respectivamente. Los ácidos fenólicos (ácido gálico, cafeico, vanílico, cumárico, ferúlico, protocatecuico y cinámico; Sigma-Aldrich, USA) se midieron a 269, 323, 260, 309, 322, 259 y 274 nm, respectivamente.

Tabla 7. Condiciones de separación por HPLC. Ácidos fenólicos en colon

Tiempo (min)	% Fase móvil A	% Fase móvil B
0	0	100
15	50	50
16	50	50
18	65	35
20	95	5
21	96	4
22	20	80
23	0	100
24	0	100

Flujo: 1mL/min. Fase móvil A: acetonitrilo, Fase móvil B: agua desionizada con ácido acético, pH 2.8.

4.7. Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron por triplicado y se expresaron como la media \pm desviación estándar (DE). Se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y las diferencias entre las medias se determinaron a través de una prueba de Tukey, con un nivel de significancia de $p < 0.05$. Los resultados que se analizaron de esta manera fueron los correspondientes a color, compuestos fenólicos totales, antocianinas, capacidad antioxidante (ABTS, DPPH, FRAP) y ácidos grasos de cadena corta.

Se realizó un análisis de t de Student con nivel de significancia de $p < 0.05$. Las respuestas utilizadas para esta prueba fue el resultado de las agliconas, análisis microbiológico, bioaccesibilidad de compuestos fenólicos totales, antocianinas, flavonoides, capacidad antioxidante, contenido de fibra dietética y propiedades funcionales, residuo no fermentable y materia seca desaparecida.

Por último, se utilizó ANOVA y la prueba de Tukey, así como un análisis de t de Student para el pH y las bacterias ácido lácticas, después del proceso de fermentación colónica. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete estadístico SPSS versión 15.0, Sistema SPSS® para WINTM (SPSS Inc, Chicago, Illinois).

5. Resultados y discusiones

5.1. Maduración comercial de la zarzamora

La maduración de la zarzamora se caracteriza cuando todas las frutillas, por completo, alcanzan un color más oscuro, es decir, menos rojo y más azul-púrpura, así como un aumento en la acidez (Acosta-Montoya y colaboradores, 2010). El estado de maduración de la zarzamora impacta directamente en las concentraciones de los compuestos fenólicos y su capacidad antioxidante, así como el contenido de fibra dietética (Rutz y colaboradores, 2012; Ferreira y colaboradores, 2015).

Previo a la utilización y procesamiento de las zarzamoras (*Rubus fruticosus* cv. Tupy), se obtuvo el grado de maduración comercial del fruto, para ello, se observó el color superficial, se midió el pH así como los sólidos solubles totales (SST).

De las frutillas analizadas, el color superficial resultante fue negro, esto se puede apreciar en la Figura 9, mientras que los valores de pH y SST fueron de 2.67 ± 0.009 y $10.90 \pm 0.1^\circ\text{Brix}$, respectivamente. De acuerdo con los datos presentados en la Tabla 3, los valores encontrados en el presente estudio indican que las zarzamoras se encontraron en el grado de maduración comercial 3 (maduro).



Figura 9. Zarzamora cosechada (grado de maduración 3, color superficial negro azulado)

En otros estudios se han reportado resultados similares, en zarzamoras (*Rubus* spp. cv. Tupy) cultivadas en Brasil obtuvieron valores de pH y SST de 2.89 y 7 °Brix, respectivamente (Rutz y colaboradores, 2012), mientras que en zarzamoras (*Rubus adenotrichus* Schltl) cultivadas en Costa Rica, el pH fue de 2.51, (Acosta-Montoya y colaboradores, 2010), los frutos de ambos estudios se clasificaron en el grado 3 de maduración comercial.

5.2. Análisis físico y químico del subproducto de la zarzamora y del extracto ultrasonificado

5.2. Rendimiento del subproducto de la zarzamora

El subproducto de zarzamora (Sub-Z) fue obtenido al procesar la fruto en jugo, el rendimiento alcanzado fue de 42.3% (423 g/kg de subproducto fresco o 4230 kg de subproducto por tonelada de fruto). Este resultado fue alto en comparación con lo encontrado en otros frutos, como en piel y semillas de guayaba (alrededor del 12.5%) y en el procesamiento de mandarina, cuyo contenido de residuo en cáscara fue de 16% (Schiebe y colaboradores, 2001; Ayala-Zavala, Rosas-Domínguez, Vega-Vega y González-Aguilar, 2010)

En zarzamora se ha reportado un rendimiento del suproducto del 20 al 30% (Struck y colaboradores 2016), las diferencias obtenidas se deben probablemente a las condiciones de proceso para la elaboración del jugo y las variedades de frutos.

Los subproductos agroindustriales son importantes, ya que representan una buena fuente de compuestos bioactivos (Vatai, Škerget y colaboradores, 2009), los cuales pueden ser utilizados en la industria alimentaria, farmacéutica o cosmética (Da Fonseca y colaboradores, 2015). Además, el aprovechamiento de estos subproductos disminuye la contaminación ambiental, debido a que la mayoría de esta materia orgánica (subproductos), ya no será desechada y por lo tanto no propiciará la formación de fauna nociva, agentes patógenos y sustancias tóxicas en los cuales dañe al suelo, agua y aire y por consiguiente a los animales y los

humanos (Aktar y Abdul, 2017; Pfaltzgraff, Cooper, Budarin y Clark, 2013; Saval y colaboradores, 2012).

5.2.2. Evaluación del color

El color es un parámetro de calidad que el consumidor toma en cuenta cuando selecciona y compra sus alimentos (Ngo, Wrolstad y Zhao, 2007). El color fue un parámetro que se analizó en el subproducto de zarzamora (Sub-Z), el extracto ultrasonificado (Ex-US), el producto de ciruela pasa (CP) y el extracto de cáscara de uva (Ex-Uva).

En la Tabla 8 se puede observar que el Sub-Z y el Ex-Uva no mostraron diferencias significativas ($p>0.05$) en el parámetro de luminosidad (L), arrojando menores valores ($p<0.05$) en comparación con las otras muestras. Esto se puede apreciar en la Figura 10, en donde se puede ver que fueron ligeramente más oscuras, ya que los valores reportados estuvieron próximos al cero, en una escala del 0 al 100, donde cero es negro y cien es blanco. Mientras que en las coordenadas a y b , todas las muestras se ubicaron en el cuadrante rojo amarillo, siendo mayor y menor significativamente la muestra de Ex-US.

Tabla 8. Parámetros de color obtenidos

	Sub-Z	Ex-US	CP	Ex-Uva
L	16.73 ± 0.00 ^a	35.77 ± 0.94 ^b	37.97 ± 0.68 ^b	18.85 ± 8.70 ^a
a	16.77 ± 0.03 ^{bc}	22.08 ± 1.30 ^c	2.49 ± 0.08 ^a	16.02 ± 4.03 ^b
b	10.88 ± 0.00 ^b	5.97 ± 0.71 ^a	11.38 ± 0.35 ^b	9.84 ± 2.64 ^b
h°	32.98 ± 0.06 ^a	15.09 ± 0.86 ^a	77.64 ± 0.63 ^b	32.44 ± 13.77 ^a
<i>Croma</i>	20.00 ± 0.02 ^{bc}	22.87 ± 1.45 ^c	11.65 ± 0.33 ^a	19.16 ± 1.81 ^b
ΔE		20.40 ± 0.69	25.60 ± 0.58	7.41 ± 5.08
ΔE	20.36 ± 0.00		20.45 ± 0.20	19.70 ± 4.89

Sub-Z: subproducto de zarzamora, Ex-US: extracto ultrasonificado, CP: ciruela pasa, Ex-UVA: extracto de cáscara de uva.^{a-c} Diferencia significativa ($p<0.05$) entre las muestras.

Para tener una idea más clara mediante la percepción a través del lente de una cámara, la apariencia visual de todas las muestras se observa en la Figura 10 (a-d). Se aprecia que todas las muestras cuentan con colores rojizos, a excepción de la CP, quien tuvo un color café claro. Pero para tener una percepción objetiva, los colores de cada muestra se expresaron de manera sistemática (numérica), utilizando los valores de L , a y b obtenidos de cada muestra (Tabla 8), mediante un calculador de color (Easy RGB, 2019).

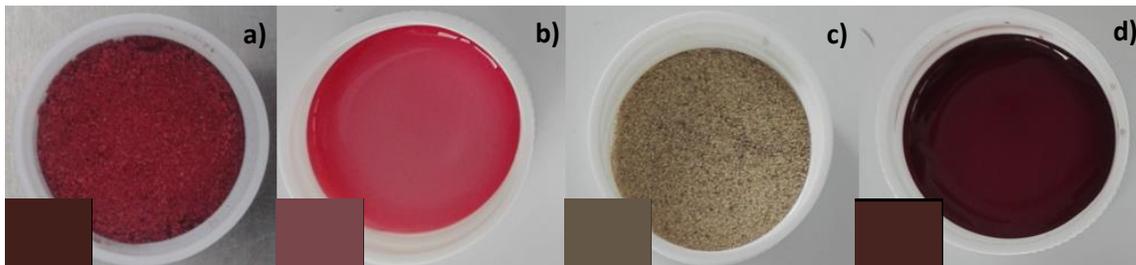


Figura 10. Color superficial de a) subproducto de zarzamora, b) extracto del subproducto de zarzamora ultrasonificado, c) ciruela pasa y d) extracto de cáscara de uva.

De estos resultados, en la parte inferior izquierda de la Figura 10 (a-d), se presenta un recuadro del color particular de cada muestra. Se observa que los colores entre el calculador de color y el lente de la cámara son diferentes, aunque sea la misma muestra. Esto pudiera ser debido al tamaño de partícula, a la luz reflejada en el objeto, la iluminación, la profundidad y la superficie (Stinco, Fernández-Vázquez, Escudero-Gilete, Heredia, Meléndez-Martínez y Vicario, 2012; Delmoro, Muñoz, Nadal, Clementz y Pranzetti, 2010).

Continuando con los parámetros de color, el ángulo h° se mide de 0° a 360° , representando el tono rojo (0°), amarillo (90°), verde (180°) y azul (270°) y están relacionados con la tonalidad del color (Wrolstad y colaboradores, 2005). En contexto con lo anterior, la muestra de CP presentó mayor valor en h° ($p < 0.05$) con respecto a las demás muestras (Tabla 8), mostrando un tono por lo tanto amarillo, y las demás muestras tuvieron tonos rojos, ya que se acercaron a 0° . Mendes, France de Souza, Da Silva, Oliveira y Pinto de Lima (2017) evaluaron

frutillas como el arándano azul, zarzamora y fresa, y sus valores oscilaron entre 9 y 29°, presentando tonos rojizos.

En cuanto a *Croma*, este corresponde a la saturación del color, y valores más altos representan la intensidad percibida por el ojo humano. Las muestras de Sub-Z, Ex-US y Ex-Uva tuvieron altos valores de saturación ($p < 0.05$) en comparación con la CP. En extractos comerciales de otras fuentes naturales (Malien-Aubert, Dangles y Amiot, 2001), especialmente de col roja (*Brassica oleracea*) y chokeberry (*Aronia melanocarpa*), se obtuvieron valores de saturación de color (en promedio de 20) similares al presente trabajo con las muestras de Sub-Z, Ex-US y el Ex-Uva.

Respecto a diferencia de color (ΔE) (Tabla 8), se puede observar que al comparar el Sub-Z y Ex-US entre las muestras, todas presentaron mayores diferencias, excepto el Ex-Uva con el Sub-Z (7.41 ± 5.08), sin embargo estas diferencias todavía son perceptibles ya que según Choi, Kim y Lee, (2002), un valor mayor a 2, indica una diferencia notable del color.

Los pigmentos como las antocianinas son los responsables de dar coloración a los frutos como las berries y pueden ir desde rojos intensos, azules y hasta morados (Rodríguez, Guzmán, Andrade y Hernández, 2010). Sin embargo, para dar estas coloraciones, es importante el número y orientación de grupos hidroxilo y metoxilo que conforma la estructura de las antocianinas; es decir, un incremento en la hidroxilación darán tonalidades azules, mientras que las metoxilaciones darán tonos rojos (Garzón, 2008).

De acuerdo con la Unión Europea, todos los colorantes derivados de las antocianinas son reconocidos como colorantes naturales bajo la clasificación de E163, los cuales van desde E163a (cianidina: colorante alimentario rojo) hasta E165f (petunidina: colorante alimentario rojo oscuro) (Wrolstad, 2004). Por lo

tanto, ambas muestras (Sub-Z y Ex-US) podrían ser buena fuente de colorantes naturales debido a la presencia de antocianinas.

5.2.3. Cuantificación de ácidos orgánicos

Los frutos acumulan ácidos orgánicos, los cuales se encuentran principalmente en la pulpa y cáscara en ciertas etapas de su desarrollo (Famiani, Battistelli, Moscatello, Cruz-Castillo & Walker, 2015; Pande y Akoh, 2010). Estos ácidos orgánicos junto con los azúcares simples, proporcionan el sabor de los frutos, por lo tanto, estos compuestos le dan el aspecto sensorial que es de gran valor para el consumidor (Mikulic-Petkovsek y colaboradores, 2012).

En el Sub-Z se identificaron y cuantificaron cinco ácidos orgánicos (ácido oxálico, málico, cítrico, fumárico y ascórbico) (Tabla 9). El ácido málico fue el que presentó mayor porcentaje 93.1% con respecto a los demás ácidos orgánicos encontrados, mientras que el ácido ascórbico representó el menor porcentaje (0.09%).

Tabla 9. Cuantificación de ácidos orgánicos (\pm DE) del subproducto de zarzamora

Ácido orgánico	mg/100 g bs
Oxálico	59.51 \pm 8.18
Málico	5706.37 \pm 123.38
Cítrico	125.54 \pm 0.61
Fumárico	230.25 \pm 2.47
Ascórbico	6.00 \pm 1.00
Total	6127.67

Media \pm desviación estándar (n=3).

En varias frutos el ácido málico es el más predominante, como la baya silvestre (*Arbutus unedo* L., Ericaceae), zarzamora (*R. ulmifolius* Schott), manzana (*Malus domestica* Borkh), uva de mesa (*Vitis vinifera* L.) (Ruiz-Rodríguez y colaboradores, 2011; Morales y colaboradores, 2013; Liu, Zhang, y Zhao, 2013; Muñoz-Robredo, Robledo, Manríquez, Molina y Defilippi, 2011). Blando, Gerardi, Renna, Castellano

y Serio (2018) reportaron un contenido de ácido málico en zarzamora con valores similares al presente estudio. Cabe mencionar, que este compuesto es comúnmente utilizado en la industria alimentaria como acidulante en bebidas, así como potenciador de sabor (Chi, Wang, Wang, Khan y Chi, 2016), por lo que el subproducto de zarzamora con este contenido de ácido málico, podría ser buena fuente como aditivo natural, además proveerle un color atractivo y otras propiedades que pudiera presentar.

5.2.4. Perfil de ácidos grasos del subproducto de zarzamora

Los resultados obtenidos del perfil de ácidos grasos en el Sub-Z se presentan en la Tabla 10. Los ácidos grasos que se identificaron y cuantificaron en la muestra fueron el ácido palmítico (C16:0), linolénico (C18:3n-3), araquídico (C20:0) y eicosanoico (C20:1), obteniendo una concentración total de 9.99 mg/100 g en base seca (bs). El ácido araquídico (ácido graso saturado) fue la que se encontró en mayor concentración y las más bajas fueron el ácido linolénico y eicosanoico (ácidos grasos poliinsaturados y monoinsaturados, respectivamente).

Tabla 10. Perfil de ácidos grasos en el subproducto de zarzamora

Ácidos grasos	mg/100 g bs
Palmítico (C16:0)	1.68 ± 0.40
Linolénico (C18:3n-3)	0.43 ± 0.07
Araquídico (C20:0)	7.68 ± 1.88
Eicosanoico (C20:1)	0.20 ± 0.00
Total	9.99

Media ± desviación estándar (n=3).

Los ácidos grasos en las frutillas como arándano azul (*Vaccinium myrtillus*), arándano silvestre (*Vaccinium vitis-idaea*), frambuesa (*Rubus idaeus*), arándano negro (*Aronia melanocarpa*) y zarzamora (*Rubus fruticosus*), están mayormente en las semillas y se encuentran entre 4.4 y 12.2% de masa respecto al fruto en

fresco, aunque esto depende de la variedad (Dulf, Andrei, Bunea y Socaciu, 2012; Van Hoed y colaboradores, 2009).

La cantidad encontrada de ácidos grasos en el Sub-Z fue menor en comparación con semillas de bayas como la frambuesa (*Rubus idaeus* L.), boysenberry (*Rubus ursinus* × *idaeus*), zarzamora Marion (*Rubus ursinus*) y evergreen (*Rubus laciniatus* Willd); saúco (*Sambucus nigra* L.); arándano rojo (*Vaccinium macrocarpon*), arándano azul (*Vaccinium corymbosum*) y fresa (*Fragaria F. x ananassa*) (Bushman, Phillips, Isbell, Ou, Crane y Knapp, 2004; Fazio, Plastina, Meijerink, Witkamp y Gabriele, 2013; Van Hoed y colaboradores, 2009).

5.2.5. Compuestos fenólicos y antocianinas monoméricas

Después del procesamiento de la zarzamora para la obtención de jugo, se generan alrededor del 20-30% de subproductos, los cuales contienen compuestos antioxidantes (Ignat y colaboradores, 2011; Struck y colaboradores, 2016) y otros compuestos bioactivos que pueden ser aprovechados. En el presente estudio se determinó el contenido de compuestos fenólicos totales (CFT) y antocianinas en el subproducto de zarzamora (Sub-Z), extracto de subproducto de zarzamora ultrasonificado (Ex-US), ciruela pasa (CP) y extracto de cáscara de uva (Ex-Uva) (Tabla 11).

Tabla 11. Compuestos fenólicos totales (CFT) y antocianinas monoméricas en las muestras de estudio

Muestra	CFT (mg EAG/100 g bs)	Antocianinas (mg/100 g bs)
Sub-Z	4016.43±13.44 ^d	364.53±7.36 ^d
Ex-US	1906.29±42.27 ^c	272.96±12.15 ^c
CP	1362.98±52.84 ^b	ND*
Ex-Uva	950.15±8.39 ^a	19.49±1.88 ^b

Sub-Z: subproducto de zarzamora; Ex-US: Extracto obtenido por ultrasonido (91% de amplitud/15 min); CP: ciruela pasa, Ex-Uva: extracto de cáscara de uva. ^{a-d} Indica diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las muestras. *ND. No detectado

Al analizar las muestras, el Sub-Z presentó mayor cantidad de CFT ($p < 0.05$) (4016.43 ± 13.44 mg/100 g bs), incluso dos y cuatro veces más su contenido con respecto a las otras muestras evaluadas. El mismo comportamiento fue observado con el contenido de antocianinas, excepto en la CP, a la cual no se detectaron estos compuestos, probablemente a la completa degradación de las antocianinas cuando se procesó la ciruela fresca a ciruela pasa (Donovan, Meyer y Waterhouse, 1998).

Las antocianinas contenidas en las muestras representaron diferentes porcentajes con relación a la cantidad total de compuestos fenólicos, siendo de 9% para el Sub-Z, de 14% para el Ex-US y de 2% para el Ex-Uva.

Estudios han reportado cantidades diferentes de fenoles totales, así como en antocianinas, tanto en fruto, pulpa y subproductos. Se han encontrado concentraciones de compuestos fenólicos totales en arándano, zarzamora y fresa de entre 272 y 944 mg EAG/100 g bs (Huang, Zhang, Liu y Li, 2012), concentraciones menores respecto a lo reportado en el presente trabajo.

Acosta-Montoya y colaboradores, (2010), evaluaron en el fruto completo el contenido fenólico y antocianinas en la zarzamora (*Rubus adenotrichus* Schltl), y los valores encontrados para los compuestos fenólicos fueron menores (3500 mg EAG/100 g bs) y para las antocianinas ligeramente mayores (520 mg/100 g) en comparación con el Sub-Z.

También, se han analizado el contenido de fenoles y antocianinas en diferentes cultivares de zarzamora entre los años 2005 y 2006 (Hull-2005, Chester-2006 y Black Satin-2006), reportando valores de entre 1200 y 1400 mg EAG/100 g bs y 451 a 788 mg cianidin-3-glucósido/100 g bs, respectivamente (Dai, Gupte, Gates y Mumper, 2009), teniendo la muestra estudiada en el presente trabajo, mayor contenido de fenoles totales y menor contenido de antocianinas.

En pulpa de diferentes frutillas como arándano negro, black elder, arándano común, zarzamora y frambuesa, reportaron las antocianinas en un rango de 49.1 hasta 844.4 mg/100 g bs Sadowska, Andrzejewska y Klóska (2017), y la zarzamora (405.1 mg/100 g bs) fue la que presentó valores similares a lo obtenido en el Sub-Z.

A pesar del contenido de fenoles y antocianinas reportado en frutos y pulpa, el alto contenido de compuestos como las antocianinas, pueden permanecer en el subproducto (semillas, piel y fibras), aunque las antocianinas presentan cierta solubilidad, la gran mayoría de estos compuestos quedan unidos a la fibra dietética (Struck y colaboradores, 2016).

Por ejemplo, en el orujo (semillas, piel y fibras) de zarzamora de cuatro variedades, se evaluó el contenido de fenoles totales destacando la variedad Chester Thornless y Wild blackberry, con concentraciones de 3540 y 4828 mg EAG/100 g bs, respectivamente (Jazić, Kukrić, Vulić y Četojević-Simin, 2019). Con el RZ estudiado, este fue ligeramente mayor a la variedad Chester Thornless y menor en comparación con Wild blackberry, incluso presenta casi dos veces mayor concentración en comparación con subproductos de frutos, como las fresas (*Fragaria vesca*), chokeberry (*Aronia melanocarpa*) y grosella negra (*Ribes nigrum*), a pesar de haber obtenido la mayor cantidad de antocianinas en el subproducto de chokeberry (191.03 mg/100 g bs) (Pieszka, Gogol, Pietras y Pieszka, 2015).

Las diferencias encontradas entre los resultados del presente estudio y lo reportado en la literatura, se puede deber a la composición de la matriz alimentaria, origen geográfico, cultivo, estado de maduración, tiempo y tipo de secado, métodos de extracción (temperatura, tiempo y tipo de solvente), así como también el pH, luz, oxígeno, algunas enzimas y a los tratamientos térmicos (Babbar, Harinder, Dewinder y Ramabhau, 2011; Ramić y colaboradores, 2015; Pasquel, Da Fonseca, Barbero, Rezende y Martínez, 2014; Francis, 1989;

Jackman, Yada, Tung & Speers, 1987; Wang y Xu, 2007; Solyom, Solá, Cocero y Mato, 2014).

5.2.6. Identificación de flavonoides (aglicones)

Generalmente, los flavonoides se encuentran en matrices complejas y para su fácil identificación y cuantificación deben estar como aglicones, es decir, flavonoides libres de su azúcar y para ello, se realizan hidrólisis básica o ácida (Nuutila, Kammiovirta y Oksman-Caldentey, 2002; Stalikas, 2007).

Para su cuantificación se realizó el análisis por HPLC, en la Tabla 12 se presentan los parámetros analíticos obtenidos para cada uno de los aglicones (curvas de regresión, coeficientes de determinación, límites de detección y límites de cuantificación) y los tiempos de retención.

Tabla 12. Límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) de los flavonoides en HPLC

Estándar	Tiempo de retención (min)	R ²	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)
Ácido gálico	3.75	0.9996	0.1	2
Ácido clorogénico	6.64	0.9997	0.6	3
Ácido cafeico	9.12	0.9983	0.3	1
Quercetina-3-O-β-D-glucósido	13.12	0.9998	0.2	4
Miricetina	17.68	0.9994	0.2	2
Luteolina	21.58	0.9999	0.5	3
Quercetina	22.01	0.9998	0.1	1
Apigenina	24.96	0.9996	0.7	5
Kaempferol	25.93	0.9986	0.3	4

En la Tabla 13 se muestran los resultados obtenidos de aglicones del Sub-Z, así como del Ex-US. Los aglicones se encontraron en un intervalo de 1.34 a 55.87 mg/100 g bs para el Sub-Z y en el Ex-US fue de 0.25 a 80.68 mg/100 g bs. Se observa que en el Ex-US se incrementó el contenido de agliconas (101.98 mg/100

g bs), 1.3 veces más que el Sub-Z. Esto probablemente es debido al ultrasonido, ya que puede existir fragmentación de la matriz provocando una mejor penetración del líquido y por consiguiente, una mejor extracción de estos compuestos (Chemat, Rombaut, Sicaire, Meullemiestre, Fabiano-Tixier y Abert-Vian, 2017).

El ácido cafeico fue el compuesto mayoritario en ambas muestras, siendo el Ex-US el que presentó mayor concentración. El segundo componente mayoritario para el Sub-Z fue la miricetina, mientras que para el Ex-US fue la apigenina, incluso en esta muestra se detectó concentraciones de ácido clorogénico, no encontrado en el Sub-Z.

Tabla 13. Compuestos fenólicos presentes en el subproducto de zarzamora (Sub-Z) y extracto del subproducto de zarzamora ultrasonificado (Ex-US) (mg/100 g bs)

	Sub-Z	Ex-US
Ácidos fenólicos		
Ácido clorogénico	ND ^A	0.25±0.00
Ácido cafeico	55.87 ± 5.05 *	80.68 ± 0.95
Ácido gálico	ND	ND
Flavonas		
Apigenina	2.00 ± 0.19 *	6.09 ± 0.15
Luteolina	2.76 ± 0.35 *	3.81 ± 0.31
Flavonoles		
Quercetina	4.36 ± 0.22 *	3.08 ± 0.27
Miricetina	9.58 ± 0.72 *	3.17 ± 0.10
Kaempferol	1.34 ± 0.04 *	4.90 ± 0.14
Flavonol glucosilado		
Quercetina-3-glucósido	ND	ND
Agliconas totales	75.91	101.98

^A ND: No detectado, *Existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las muestras

Probablemente el ultrasonido contribuyó a la liberación de los flavonoides, ya que hay rupturas del material vegetal y en consecuencia la liberación de estos compuestos (Barbosa-Cánovas y Rodríguez, 2002).

En zarzamoras de la variedad Choctaw no se detectó miricetina, quercetina y kaempferol, mientras que en la variedad Kiowa sólo la miricetina estuvo presente (Sellappan y colaboradores, 2002), Häkkinen, Kärenlampi, Heinonen, Mykkänen y Törrönen (1999), encontraron que en frutillas de grosella negra y arándano, la concentración de miricetina fue más alta que la quercetina, similares a los obtenidos para el Sub-Z. Las diferencias sobre la concentración de los flavonoides pudiera ser por las condiciones climáticas, grado de maduración o estrés de la planta (Rutz y colaboradores, 2012) y la parte del fruto donde se encuentre.

5.2.7. Capacidad antioxidante

En los alimentos se encuentran compuestos antioxidantes hidrosolubles, liposolubles o unidos a las paredes celulares, que no permiten una reacción total para estabilizar a los compuestos oxidantes (Kedare y Singh, 2011). Sin embargo, se aplican diferentes métodos como ABTS, DPPH y FRAP para estimar esta capacidad antioxidante. Los valores de la capacidad antioxidante del Sub-Z, Ex-US, CP y Ex-Uva se presentan en la Tabla 14.

Tabla 14. Capacidad antioxidante en las muestras de estudio

Muestra	ABTS (mg EAA/100 g bs)	DPPH (μ mol ET/100 g bs)	FRAP (μ mol Fe(II)/100g bs)
Sub-Z	5422.38 \pm 71.50 ^c	13656.27 \pm 532.66 ^b	12511.44 \pm 147.39 ^d
Ex-US	563.86 \pm 21.91 ^b	21744.79 \pm 729.16 ^d	3248.42 \pm 34.51 ^c
CP	267.06 \pm 13.86 ^a	16655.88 \pm 272.02 ^c	2842.23 \pm 109.41 ^b
Ex-Uva	264.20 \pm 4.70 ^a	106.20 \pm 11.63 ^a	2095.73 \pm 33.3 ^a

Sub-Z: subproducto de zarzamora; Ex-US: Extracto obtenido por ultrasonido (91% de amplitud/15 min); CP: ciruela pasa, Ex-Uva: extracto de cáscara de uva. ^{a-d} Indican diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las muestras.

La mayor capacidad antioxidante por ABTS ($p < 0.05$) fue para el Sub-Z (5422.38 ± 71.50 mg EAA/100 g bs), obteniendo casi 10 veces más respecto al Ex-US (563.86 ± 21.91 mg EAA/100 g bs), siendo esta la segunda muestra con mayor capacidad antioxidante por este método. El mismo comportamiento se observó en la cuantificación de actividad antioxidante por FRAP, el Sub-Z tuvo mayor capacidad para reducir el hierro (12511.44 ± 147.39 $\mu\text{mol Fe(II)}/100$ g bs), casi 4 veces más la capacidad antioxidante respecto a Ex-US (3248.42 ± 34.51 $\mu\text{mol Fe(II)}/100$ g bs). Mientras que en DPPH, el Ex-US presentó significativamente mayor capacidad antioxidante (21744.79 ± 729.16 $\mu\text{mol ET}/100$ g bs), 1.3 veces más respecto a CP (16655.88 ± 272.02 $\mu\text{mol ET}/100$ g bs).

Es importante evaluar la capacidad antioxidante con otros subproductos de frutos que han sido estudiados. Saikia y Mahanta, (2016), evaluaron la capacidad antioxidante por FRAP en subproductos de frutos, entre ellas la cáscara de mandarina (*Citrus reticulata* Blanco), uva birmana (*Baccurea sapida* Muell. Arg) y sandía (*Citrullus lanatus*), además del orujo de piña (*Ananas comosus* L. Merr), y carambola (*Averrhoa carambola* L.), y encontraron un intervalo entre 685 a 6006 $\mu\text{mol Fe(II)}/100$ g bs; sobresaliendo la carambola, ya que presentó valores de 12250 $\mu\text{mol Fe(II)}/100$ g bs. Esta capacidad antioxidante de reducir hierro fue similar a lo encontrado en el Sub-Z del presente estudio.

Los compuestos responsables de la actividad antioxidante medida por el método de FRAP, son principalmente los compuestos fenólicos ya que contribuyen transfiriendo un electrón para reducir al ion férrico (III) a su forma ferrosa (II) (Huang, Ou y Prior, 2005), aunque la presencia de otros compuestos como los tocoferoles, también pueden influir en la actividad antioxidante.

Según Roginsky (2003), la orientación de la estructura de los compuestos antioxidantes determina su actividad, ya que el grupo hidroxilo es el que mayormente puede donar los átomos de hidrógeno y estabilizar a los radicales libres, por lo que es de mayor relevancia la ubicación de los grupos hidroxilo que

su número (Rice-Evans, Miller y Paganga, 1996; Mishra, Ojha y Chaudhury, 2012). Por otro lado, el incremento de la capacidad antioxidante por DPPH en la muestra del Ex-US, pudiera deberse a que el ultrasonido libera compuestos de la matriz fibrosa y entre ellos los lipofílicos. De acuerdo con Pérez-Jiménez, Díaz-Rubio y Saura-Calixto, (2013) establece que algunos compuestos fenólicos permanecen en los residuos después de la extracción, llamados polifenoles no extraíbles, los cuales están asociados a macromoléculas como la fibra dietética y con aplicación de tecnologías como el ultrasonido pudieran ser liberados y contribuir con la capacidad antioxidante.

5.4. Análisis microbiológico

El recuento de mesófilos aerobios indica la calidad sanitaria de los alimentos mediante el número de colonias totales de microorganismos presentes en un alimento, mientras que el recuento de las enterobacterias indican el número de coliformes totales (Anderson y Calderón, 1999).

Se realizó un análisis microbiológico de mesófilos aerobios y enterobacterias al Sub-Z, el Ex-US, la CP y el Ex-Uva (Tabla 15). En los productos comerciales (CP y Ex-Uva) se encontraron mesófilos aerobios (3.25 y 2.7 log UFC/g o mL, respectivamente), mientras que en el Sub-Z y el Ex-US no se detectaron estos microorganismos. Para enterobacterias no se presentó crecimiento en ninguna de las muestras. Estos resultados indican la inocuidad de las muestras de zarzamora.

Tabla 15. Análisis microbiológico en muestras de estudio

Muestras	Mesófilos aerobios (log UFC/mL)	Enterobacterias (log UFC/mL)
Sub-Z	ND ^A	ND
Ex-US	ND	ND
CP	3.25 ± .03 ^a	ND
Ex-Uva	2.70 ± 0.82 ^a	ND

^a Indica diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las muestras; ND: No detectado. Sub-Z: subproducto de zarzamora, Ex-US: extracto ultrasonificado, CP: ciruela pasa, Ex-Uva: extracto de uva

Según la NORMA Oficial Mexicana NOM-218-SSA1-2011, en los polvos para preparar bebidas saborizadas no alcohólicas, los límites máximos permitidos son de 3.69 log UFC/g y para extractos de 1.69 log UFC/mL, por lo que la muestra de CP se encontró dentro de lo establecido, mientras que el Ex-Uva sobrepasó los límites permitidos.

Los productos comerciales del presente estudio son suplementos alimenticios, y de acuerdo al Diario Oficial de la Federación en el reglamento de control sanitario de productos y servicios menciona que “*la materia prima de los suplementos alimenticios, deberá someterse a tratamientos, controles o procedimientos que abatan la flora microbiana que la acompaña*” (DOF-12-02-2016). Probablemente el almacenamiento de Ex-Uva a temperatura ambiente tuvo impacto debido a que el crecimiento de estos microorganismos es alrededor de 30 °C. Otros factores podrían ser la contaminación de la materia prima o manipulación excesiva durante el proceso de elaboración.

5.10. Bioaccesibilidad

5.10.1. Compuestos fenólicos y antocianinas

Los antioxidantes comúnmente están unidos de forma natural con diferentes macromoléculas como los hidratos de carbono, lípidos y proteínas de la matriz alimentaria (Palafox-Carlos, Ayala-Zavala y González-Aguilar, 2011). Para ser absorbidos por la barrera intestinal, el complejo de moléculas presentes en el alimento pasa por enzimas digestivas provocando la hidrólisis parcial de su forma conjugada a su forma libre.

Los compuestos antioxidantes que se encuentran en los alimentos poseen propiedades biológicas, sin embargo, esto depende de la cantidad que se libera en el intestino delgado (Carbonell-Capella y colaboradores, 2014). Por lo que la bioaccesibilidad intestinal *in vitro* permite evaluar la liberación de los compuestos de la matriz alimentaria (Saura-Calixto, 2007).

Los resultados de bioaccesibilidad *in vitro* de fenoles totales se pueden apreciar en la Tabla 16. El subproducto de zarzamora bioaccesible (Sub-Z-B) presentó mayor cantidad de fenoles en la fracción bioaccesible respecto al extracto ultrasonificado bioaccesible (Ex-US-B), lo cual es proporcional al contenido de la muestra original (sin someterlo a condiciones gastrointestinales), como se puede observar en los resultados presentados en la Tabla 13.

Tabla 16. Compuestos fenólicos y antocianinas bioaccesibles en el subproducto de zarzamora y el extracto del subproducto de zarzamora ultrasonificado

	Sub-Z-B	Ex-US-B
CFT (mg EAG/100 g bs)	1526.74 ± 37.19 *	1313.72 ± 25.09
Antocianinas (mg/100 g bs)	123.02 ± 9.26	138.47 ± 9.23

* Indica diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las muestras. Sub-Z-B: subproducto de zarzamora bioaccesible, Ex-US-B: extracto del subproducto de zarzamora ultrasonificado bioaccesible

Sin embargo, después del proceso digestivo los valores de compuestos fenólicos en la muestra fueron menores respecto a la muestra original (Sub-Z y Ex-US) (Tabla 13), representando el 38 y 68% para el Sub-Z-B y el Ex-US-B, respectivamente. Este comportamiento fue similar a lo reportado en la cáscara de granada y moras negras (mulberry), ya que se encontró que el porcentaje de absorción de los compuestos fenólicos fue de 85 y 19 %, respectivamente (Fawole y Opara, 2016; Tomas, Toydemir, Boyacioglu, Hall, Beekwilder & Capanoglu, 2015).

La baja absorción de los compuestos fenólicos totales a nivel intestinal puede atribuirse a la degradación que presentan estos compuestos, debido a las condiciones alcalinas durante la digestión (Bouayed, Hoffmann y Bohn, 2011).

Por otro lado, durante o después del proceso de digestión los compuestos fenólicos pueden cambiar su conformación estructural o unirse a otros

componentes del alimento ocasionando productos con baja absorción (McDougall, Dobson, Smith, Blake y Stewart, 2005; Dutra y colaboradores, 2017).

Otros factores pueden también afectar la liberación de los compuestos antioxidantes son la matriz del alimento, estructura química, solubilidad, peso molecular y la posible interacción con carbohidratos, lípidos o proteínas (Tagliazucchi, Verzelloni, Bertolini y Conte, 2010; Barba, Mariutti, Bragagnolo, Mercadante, Barbosa-Cánovas y Orlie, 2017; Saura-Calixto, 2011; Quirós-Sauceda y colaboradores, 2014).

Por otro lado, la mayor bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos observada en la muestra de Ex-US sometida a un tratamiento de bioaccesibilidad (Ex-US-B) respecto al subproducto Sub-Z-B, expuesto al mismo proceso se ha observado en investigaciones previas (Ramírez-Moreno y colaboradores, 2018; Buniowska, Carbonell-Capella, Frigola y Esteve, 2017), en las que demostró que jugos de zarzamora y frutos exóticos tratados con ultrasonido tienen mayor bioaccesibilidad (15 y 35%, respectivamente) comparado con muestras sin tratamiento. Esto puede deberse a que el ultrasonido rompe las paredes celulares a través de la cavitación (crecimiento y colapso de burbujas en el medio) para su posible liberación de los compuestos (Hossain y colaboradores, 2012).

Respecto a la cantidad de antocianinas, las fracciones bioaccesibles no presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre las muestras (Tabla 16). Sin embargo, la absorción en el Sub-Z-B y el Ex-US-B fue de 33.7 y 50.7%, respectivamente. Este comportamiento fue similar a lo mencionado anteriormente para los compuestos fenólicos y al igual que los fenoles, las antocianinas se encuentran en mayor concentración en el Ex-US-B. Sin embargo, al momento de consumir alimentos que son ricos en antocianinas se dificulta su absorción en intestino delgado. Por lo tanto, el primer paso de la digestión es la hidrólisis de antocianinas a aglicones (antocianidinas), es decir, la estructura sin la molécula de azúcar, o bien, se degradan adicionalmente a ácidos fenólicos para lograr el

transporte y el paso a la vía porta incrementando su biodisponibilidad (Manach, Williamson, Morand, Scalbert y Rémésy, 2005).

5.10.2. Flavonoides

Los flavonoides son considerados como compuestos antioxidantes los cuales benefician a la salud humana, ya que se ha visto que disminuyen el riesgo de enfermedades no transmisibles (cáncer, enfermedades cardiovasculares) (Knekt y colaboradores, 2002; Vargas y colaboradores, 2018; Lovegrove, Stainer y Hobbs, 2017). En la Tabla 17 se presenta el contenido de flavonoides en la muestra y después del proceso de digestión *in vitro* (fracción bioaccesible). En las muestras evaluadas (Sub-Z y Ex-US), la concentración de flavonoides estuvo representada por el ácido clorogénico (28.16 ± 0.74 y 85.30 ± 8.92 mg/100 g bs, respectivamente).

Rutz y colaboradores, (2012), encontraron que los niveles de ácido gálico incrementan con la maduración comercial del fruto, mientras que el ácido cafeico y la quercetina disminuyen. Como se mencionó anteriormente, el estado de maduración de los frutos evaluados fue un estadio comercial considerado como grado 3, por lo tanto, los resultados coinciden con lo reportado en la literatura.

Por otro lado, el ácido clorogénico (85.30 ± 8.92 mg/100 g bs), el ácido gálico (3.80 ± 0.41 mg/100 g bs) y Q-3-G (3.11 ± 0.77 mg/100 g bs) fueron significativamente mayores en el Ex-US en comparación con el Sub-Z, mientras que el contenido de luteolina fue similar ($p > 0.05$) entre ambas muestras. El contenido total de flavonoides en la muestra original de Sub-Z y Ex-US fue de 29.49 y 92.36 mg/100 bs, respectivamente.

Lo anterior indica que el ultrasonido liberó alrededor de 3 veces más el valor reportado por el Sub-Z. Un incremento (1.3 veces) de estos compuestos también fue observado en jugo de toronja en comparación con un jugo de toronja sin tratamiento por ultrasonido (Aadil, Zeng, Han y Sun, 2013).

Tabla 17. Flavonoides en el subproducto de zarzamora (Sub-Z), extracto del subproducto de zarzamora ultrasonificado (Ex-US) (mg/100 g bs) y su bioaccesibilidad

Compuesto	Sub-Z	Ex-US	Sub-Z bioaccesible (Sub-Z-B)	Ex-US bioaccesible (Ex-US-B)
Ácidos fenólicos				
Ácido clorogénico	28.16±0.74 *	85.30±8.92	ND	ND
Ácido cafeico	ND	ND	ND	ND
Ácido gálico	0.93±0.02*	3.80±0.41	0.45±0.00	0.46±0.02
Flavonas				
Apigenina	ND	ND	ND	ND
Luteolina	0.16±0.00	0.15±0.00	0.19±0.02	0.15±0.00
Flavonoles				
Quercetina	ND	ND	ND	ND
Miricetina	ND	ND	ND	ND
Kaempferol	ND	ND	ND	ND
Flavonol glucosilado				
Quercetina-3-glucosido	0.24±0.02*	3.11±0.77	0.97±0.12**	0.18±0.02
Flavonoides totales	29.49	92.36	1.61	0.80

ND: No detectado. *Existen diferencias significativas ($p<0.05$) entre las muestras originales.

**Existen diferencias significativas ($p<0.05$) entre las muestras bioaccesibles.

La aplicación del ultrasonido libera compuestos que se encuentran unidos generalmente a la celulosa, hemicelulosa, lignina y proteínas (componentes de la pared celular) (Wong, 2006).

Saikia y Mahanta, (2016) realizaron la cuantificación del ácido gálico, clorogénico y la quercetina presentes en cáscara de mandarina, uva birmana y sandía, así como

en el orujo de piña y carambola, después de la obtención del jugo sólo la cáscara de sandía presentó cantidades de ácido clorogénico (4.53 mg/100 g bs), el ácido cafeico y la quercetina no se detectaron en la cáscara de sandía, mientras que el ácido gálico mostró concentraciones de 5.51 mg/100 g bs, y la cáscara de uva birmana presentó 0.46 mg/100 g bs.

Comparado con el presente estudio, el Sub-Z mostró seis veces menos concentración del ácido clorogénico, no se detectó ácido cafeico y quercetina y presentó dos veces más concentración del ácido gálico.

En la Tabla 17 se presenta la concentración de los flavonoides bioaccesibles en la muestra Sub-Z-B y Ex-US-B. Se observó que a excepción del ácido clorogénico, los flavonoides como el ácido gálico, luteolina y Q-3-G se mantuvieron estables después del proceso digestivo.

En general, los flavonoides bioaccesibles no presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$) a excepción del Q-3-G ($p < 0.05$), ya que el Sub-Z-B presentó mayor concentración respecto al Ex-US-B. El porcentaje de bioaccesibilidad del ácido gálico y la Q-3-G fue mayor en el Sub-Z-B (48 y $> 100\%$, respectivamente) en comparación con la muestra ultrasonicada (Ex-US-B), mientras que la luteolina fue totalmente bioaccesible en ambas muestras.

Aunque el ultrasonido liberó algunos compuestos fenólicos de la matriz fibrosa (muestra original, Ex-US), el mayor porcentaje de flavonoides totales bioaccesibles fue para Sub-Z-B (5.45%), mientras que el Ex-US-B fue bajo ($< 1\%$). Esto se puede deber a la reorganización molecular de las pectinas (formación de una red de fibra más fuerte), que impide la absorción de los flavonoides cuando las muestras se someten a un tratamiento de ultrasonido (Anese, Mirolo, Beraldo y Lippe, 2013).

Los flavonoides como el ácido cafeico, apigenina, quercetina, miricetina y kaempferol, no se encontraron en la fracción dializada indicando que no están disponibles para su absorción en el intestino delgado. Probablemente, puede deberse a que estos compuestos forman complejos o se unen con fibra, lípidos o proteínas. De acuerdo con otros autores, los flavonoides que permanecen unidos a otros compuestos como fibra, lípidos o proteínas y llegan al intestino grueso y pueden estar disponibles para su absorción después de que la microbiota intestinal establece su actividad enzimática sobre ellos, o quizás contribuir con cierta actividad quimiopreventiva en el colon (Selma, Espín y Tomás-Barberán, 2009; Acosta-Estrada y colaboradores, 2014)

La bioaccesibilidad intestinal *in vitro* del ácido clorogénico y la Q-3-G se ha evaluado en cuatro variedades de manzana (Jonaprinz, Jonagold, Mutzu y Golden Delicious), en la manzana Jonagold no se encontró ácido clorogénico en la fracción dializada y la Q-3-G fue absorbida en su totalidad, incluso mayor al 100%, comportamiento similar a lo encontrado en el Sub-Z-B del presente estudio (Bouayed, Deußner, Hoffmann y Bohn (2012)

El ácido clorogénico no fue bioaccesible probablemente debido a su isomerización (Farah, Guigon & Trugo, 2006; Kahle y colaboradores, 2011). Mientras que la quercetina glucosilada es absorbida intacta por el transportador de sodio-glucosa 1 (SGLT 1) e hidrolizada por la β -glucosidasa en los enterocitos (Lotito, Zhang, Yang, Crozier y Frei, 2011). Por lo tanto, algunos fenoles son transportados como glucósidos en el borde del cepillo de la mucosa intestinal y los encargados son los transportadores de azúcar (Acosta-Estrada y colaboradores, 2014).

El consumo de ácido gálico está relacionado con beneficios en la salud, como en el cáncer. La apoptosis está dada por un mecanismo fisiológico en el cual se provoca muerte celular de las células malignas sin afectar a las células normales o sin provocar daños en los tejidos cercanos (Tsai y colaboradores, 2018). Recientemente se demostró que una concentración baja de ácido gálico (5 μ M)

extraído de una hierba China (*Galla chinenses*) indujo la apoptosis de células cancerígenas de estómago cuando se sometieron a largo tiempo de exposición (24 a 72 h) (Tsai y colaboradores, 2018).

Sin embargo, la concentración de compuestos antioxidantes que presenta algún beneficio fisiológico va a depender del propio compuesto y/o condiciones circundantes, como el pH, temperatura, interacción de compuestos fenólicos con otros constituyentes de la dieta liberados durante la digestión, como hierro y otros minerales, fibra dietética o proteínas, peso molecular y conformación estructural (Argyri, Komaitis y Kapsokefalou, 2006; Manach y colaboradores, 2004; Saura-Calixto y colaboradores, 2007).

5.10.3. Capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante medida por ABTS y FRAP fue mayor significativamente para el Sub-Z respecto al Ex-US, mientras que el Ex-US mostró elevada capacidad antioxidante por DPPH en comparación con el Sub-Z (Tabla 14). Después del proceso digestivo (Tabla 18), la capacidad antioxidante disminuyó el Sub-Z-B hasta en un 60 % en las tres metodologías evaluadas. Mientras que para el Ex-US-B se retuvo alrededor del 100 % en la determinación por ABTS y FRAP. Sin embargo, la capacidad antioxidante dada por DPPH fue baja en ambas muestras, 8.6% para el Sub-Z y 6.1% para el Ex-US. La drástica disminución en esta fracción se puede atribuir a la disminución de los compuestos antioxidantes como lo revisamos anteriormente, además de los cambios conformacionales que sufren los compuestos fenólicos debido a las modificaciones del pH (Arenas y Trinidad, 2017), ya que la capacidad de atrapamiento de radicales libres depende principalmente del número y posición de grupos hidroxilo donador de hidrógeno en los anillos aromáticos de los compuestos fenólicos (Tagliazucchi y colaboradores, 2010).

Tabla 18. Capacidad antioxidante en la fracción bioaccesible del subproducto de zarzamora (Sub-Z) y el extracto del subproducto de zarzamora ultrasonificado (Ex-US)

Capacidad antioxidante	Sub-Z-B	Ex-US-B
ABTS (mg EAA/100 g bs)	870.18 ± 95.46 *	560.74 ± 5.37
DPPH (µmol ET/100 g bs)	1183.32 ± 18.89 *	1346.19 ± 28.09
FRAP (µmol Fe(II)/100 g bs)	4725.81 ± 57.59 *	3899.57 ± 186.55

* Indica diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las muestras Sub-Z-B: subproducto de zarzamora bioaccesible, Ex-US-B: extracto del subproducto de zarzamora ultrasonificado bioaccesible.

Respecto al porcentaje tan elevado de la capacidad antioxidante evaluada con el método de FRAP después del proceso digestivo, se debió probablemente a que esta metodología se establece con valores bajos de pH (alrededor de 3.6), lo cual permite una mayor estabilidad de los compuestos fenólicos y, por lo tanto, ejerce su poder antioxidante reductor sobre el Fe^{+3} (oxidante) (Benzie y colaboradores, 1996).

5.11. Fibra dietética

5.11.1. Contenido

Es bien conocido que los subproductos agroindustriales son ricos en fibra dietética (FD). La FD contiene cantidades apreciables de colorantes, compuestos antioxidantes y otras sustancias con efectos positivos sobre la salud (Ayala-Zavala y colaboradores, 2011). La fibra dietética total, soluble e insoluble (FDT, FDS, FDI), así como sus propiedades funcionales del Sub-Z y un producto comercial a base de ciruela pasa (CP) se muestran en la Tabla 19.

El elevado porcentaje de fibra dietética total fue alta para el subproducto (Sub-Z) (44%) comparado con los productos comerciales como el CP que presentó un 8%. Se encontró el mismo comportamiento para la FDS (6%) y la FDI (38 %).

Tabla 19. Fibra dietética y sus propiedades funcionales del subproducto de zarzamora y ciruela pasa

Contenido de fibra dietética	Sub-Z	CP
Total (%)	44.26 ± 0.09*	8.06 ± 0.12
Soluble (%)	5.90 ± 0.52*	1.96 ± 0.08
Insoluble (%)	38.35 ± 0.39*	6.09 ± 0.29
Propiedad funcional		
Capacidad de retención de agua (g/g)	2.94 ± 0.10*	0.00 ± 0.00
Capacidad de hinchamiento (mL/g)	5.00 ± 0.00*	0.00 ± 0.00
Capacidad de retención de lípidos (g/g)	1.98 ± 0.03*	1.49 ± 0.02

Sub-Z: subproducto de zarzamora, CP: Ciruela pasa (producto comercial); * Indica diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las muestras.

El contenido de fibra dietética del Sub-Z (44.26 %) fue similar a lo encontrado por Figuerola, Hurtado, Estévez, Chiffelle y Asenjo, (2005), ya que evaluaron el contenido de este componente en variedades de manzana y cítricos (toronja, limón y naranja), siendo la toronja Marsh la cual presentó valores similares (FDT, FDS y FDI, 44.2, 6.4 y 37.8%, respectivamente). También se ha reportado el contenido de FDI en la fresa (2.15%) y bagazo de uva roja (71.5%) Goñi, Díaz-Rubio, Pérez-Jiménez y Saura-Calixto, (2009).

5.11.2. Propiedades funcionales

Las propiedades funcionales como la capacidad de retención de agua (CRA) y la capacidad de hinchamiento (CH) se presentaron únicamente en el Sub-Z, mientras que en la capacidad de retención de lípidos (CRL) fue en ambas muestras (Sub-Z y CP) (Tabla 19). La muestra Sub-Z presentó una mayor capacidad de retener lípidos en comparación con la otra muestra. Por lo tanto, el subproducto de zarzamora pudiera ser considerado como un ingrediente con alto contenido de fibra dietética para adicionarlo a alimentos con buenas propiedades de hidratación. Si estas propiedades funcionales se mantienen en los productos que son agregados, les aportará beneficios fisiológicos relacionados con la fibra, al mismo

tiempo que me mejorará los parámetros de calidad relacionados con la textura de estos productos.

La fibra dietética tiene importantes propiedades funcionales que se relacionan con beneficios fisiológicos. La capacidad de retención de agua (CRA) del subproducto de zarzamora presentó un valor de 2.94 g/g de muestra (Tabla 19). Este valor fue similar a lo encontrado a la toronja Marsh (2.26 g/g) (Figueroa y colaboradores, 2005).

La capacidad de hidratación (CH) encontrada en la muestra del subproducto de zarzamora fue de 5.00 mL/g y los valores de la CRL fueron de 1.98 g/g. Estos valores fueron similares con lo encontrado por Figueroa y colaboradores, (2005), en fibra de naranja valencia (6.11 mL/g) y mayor que los valores presentados en fibras de avena y manzana (2.3 y 3.4 mL/g respectivamente) de acuerdo con Valencia y Román (2006). La CRL (1.81 g/g), en la fibra de naranja valencia encontrada por este mismo autor fue similar a lo encontrado para el subproducto de zarzamora del presente estudio.

Las características estructurales y la composición química de la fibra (afinidad del agua a sus componentes) juegan un papel importante en la absorción de agua (Figueroa y colaboradores, 2005).

Las propiedades funcionales de la fibra dietética son dependientes de la proporción de FDI/FDS, del método de extracción de la fibra, así como del tamaño de partícula (Maurya, Pandey, Rai, Porwal y Rai, 2015; Struck y colaboradores, 2016). De acuerdo con Auffret, Ralet, Guillon, Barry y Thibault (1994) y Raghavendra y colaboradores, (2006) observaron que a menor tamaño de partícula que presentaba el subproducto de coco, aumentan las propiedades de hidratación (aprox. 550 μm) y menor a eso, las propiedades disminuyen debido al daño de la matriz fibrosa y al colapso de los poros durante la molienda.

La fibra dietética soluble se dispersa en agua, es decir, el agua se va introduciendo en la estructura de la matriz fibrosa y esto provoca una propagación de macromoléculas (hinchazón) dispersándose completamente (Thebaudin, Lefebvre, Harrington y Bourgeois, 1997). La FDS está relacionada con la capacidad de hinchamiento, ya que se caracteriza por la formación de geles viscosos, se le atribuyen propiedades fisiológicas como el provocar saciedad en el individuo, fermentación por la microbiota intestinal y en consecuencia la producción de ácidos grasos de cadena corta, reducción del tiempo de tránsito gastrointestinal, lo que conlleva a una mejor absorción y digestión de los alimentos (Matos-Chamorro y Chambilla-Mamani, 2010; Saikia y Mahanta, 2016).

La fibra insoluble no se dispersa en agua, sino que atrapa a los compuestos liposolubles y el agua quedando retenidos en la superficie de la fibra. Lo anterior debido a la tensión superficial en los poros de la matriz fibrosa o por que el agua se une con puentes de hidrógeno, enlaces iónicos y/o por las interacciones hidrofóbicas, esto sucede mayormente por mecanismos físicos como la centrifugación (Matos-Chamorro y Chambilla-Mamani 2010; Thebaudin y colaboradores, 1997).

Las propiedades fisiológicas de esta fibra insoluble es el de retener agua y lípidos, por lo que puede arrastrar agua al colon para la formación de heces más consistentes y blandas, además de aumentar su volumen hasta 20 veces su masa, por lo tanto, es ideal para la prevención de estreñimiento (Zambrano, Meléndez y Gallardo, 2001).

La fibra insoluble también puede transportar en su superficie a sales biliares, colesterol y compuestos carcinogénicos, por lo que el paso acelerado de dichos componentes por el intestino, permite la disminución del tiempo que los compuestos cancerígenos entran en contacto con las paredes intestinales, haciendo que su eliminación sea a través de las heces (Matos-Chamorro y Chambilla-Mamani, 2010; Khattak, 2002; Saura-Calixto y colaboradores, 2003).

Se ha reportado que las frutillas como la zarzamora contienen pectina, componente importante de la fibra dietética soluble, además de celulosa y hemicelulosa (FDI), las cuales se encuentran formando parte de la fibra dietética (Ferreira y colaboradores, 2015). Por todo lo anterior, el Sub-Z puede contribuir a provocar saciedad en el individuo debido a su contenido de fibra dietética soluble y por consiguiente prevenir el sobrepeso, además de prevenir el riesgo de cáncer de colon o hipocolesterolemia debido a su contenido en fibra dietética insoluble.

Desde el punto de vista tecnológico, las características fisicoquímicas de la fibra dietética también pueden ser aprovechadas por sus propiedades funcionales (capacidad de unión al agua y formación de geles, antiadherente, texturizantes y efectos espesantes), ya que se pueden adicionar a los sistemas alimentarios. Esta fibra dietética interviene en mejorar la textura, características sensoriales y vida útil de los alimentos (Thebaudin y colaboradores, 1997).

Finalmente, las propiedades funcionales de la fibra dietética son las responsables de los efectos fisiológicos y tecnológicos, los cuales están influenciados por la relación de fibra insoluble y soluble, así como el tamaño de partícula, fuente de fibra, grado y tipo de procesamiento llevado a cabo (Figuerola y colaboradores, 2005).

5.12. Fermentación colónica *in vitro*

Los compuestos provenientes de la alimentación que no son digeridos por las enzimas digestivas en intestino delgado, pueden alcanzar el colon y ser metabolizados por la microbiota intestinal (intestino grueso), a este proceso se le llama fermentación colónica en el cual los productos finales son ácidos grasos de cadena corta, CO₂ y agua (Saura-Calixto y colaboradores, 2003), aunque la disponibilidad del sustrato depende de su hidratación antes de que se lleve a cabo la fermentación colónica (Fernando, Brennan, Flint, Ranaweera, Bamunuarachchi y Morton, 2010).

5.12.1. Residuo no fermentado y materia seca desaparecida

Posterior a la fermentación colónica, se obtiene el residuo no fermentable (RNF), que es la fracción que no fue utilizada por la microbiota intestinal y que es excretada, así como la materia seca desaparecida (MSD), que es la predicción de la producción de metabolitos finales (Goñi y Martín-Carrón, 1998). Los resultados de estos parámetros, después del proceso de fermentación colónica *in vitro*, se muestran en la Tabla 20.

Tabla 20. Residuo no fermentable (RNF) y porcentaje de materia seca desaparecida (MSD) después de la fermentación colónica *in vitro*

	Lactulosa	Sub-Z	Ex-US
RNF (mg)	0.00	61.45 ± 0.21*	6.3 ± 1.27
MSD (%)	100.00 ± 0.45	38.55 ± 0.21*	93.70 ± 1.27

*Indica diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las muestras de estudio. Lactulosa: Blanco positivo

Para el RNF se tomó de referencia a la lactulosa como sustrato totalmente fermentable (blanco positivo). Se observó que la microbiota no dejó lactulosa sin fermentar (RNF), lo cual indica que los microorganismos la usaron en su totalidad (Tabla 20).

El Ex-US fue el más usado por las bacterias del colon, ya que quedaron sólo 6.3 mg de residuo no fermentado con relación a la cantidad total del sustrato inicial (100 mg), en comparación con el Sub-Z, el cual se fermentó menos del 50%, lo cual corresponde a 38 mg de la muestra.

La muestra ultrasonicada (Ex-US) presentó una mayor concentración de materia seca desaparecida (MSD) (90 %), muy similar a los valores presentados para la lactulosa (100 %) indicando que esta muestra es altamente fermentable. Este valor presentado por la muestra Ex-US fue mayor a lo presentado por la muestra del Sub-Z, quien tuvo cerca del 40% (Tabla 20). Estos sustratos son metabolizados en menor o mayor grado por la microbiota intestinal, como fuente

de carbono en el medio de fermentación (Kaplan y Hutkins, 2000; Rossi y colaboradores, 2005). Estos valores fueron similares a los presentados por Saura-Calixto y colaboradores, (2003).

Los valores que encontraron estos autores (Saura-Calixto y colaboradores, 2003) fueron de RNF de 1.20 mg y MSD del 98 % en muestras de fibra dietética en cervezas (clara, oscura y sin alcohol) con diferentes grados de alcohol. En otros estudios, en los cuales se evaluaron diferentes fibras comerciales, el valor para la MSD en fibra kneipp (fibra de frutos, salvado de trigo y goma guar) y metamucil (plántago), fue de 50 y 87%, respectivamente (Goñi y Martín-Carrón, 1998).

Comparando los resultados obtenidos en el presente trabajo, el Sub-Z reflejó resultados similares a fibra kneipp, al igual que el Ex-US con respecto al metamucil. Sin embargo, la MSD puede variar dependiendo del contenido y composición de la fibra, ya que la actividad de las enzimas que produce la microbiota es específica para poder consumir los compuestos metabolizables (Wang y colaboradores, 2019).

5.12.2. pH durante la fermentación colónica *in vitro*

El valor más alto ($p < 0.05$) de pH que presentaron las muestras evaluadas durante la fermentación colónica en el momento cero (antes de la fermentación colónica *in vitro*), fue para el Sub-Z en comparación con las otras muestras (Tabla 21). Transcurridas las 24 h, la lactulosa obtuvo el menor valor ($p < 0.05$). Comparando antes y después de la fermentación colónica *in vitro* (0 y 24 horas), se puede ver que en todas las muestras disminuyó el pH significativamente, siendo el Sub-Z el que disminuyó considerablemente con 1.51, seguido de la lactulosa con 1, respecto al tiempo inicial.

Tabla 21. Medición de pH en la fermentación colónica *in vitro*

Muestra	0 h	24 h
Lactulosa	7.84 ± 0.30 ^{a,*}	6.84 ± 0.08 ^a
Blanco negativo	7.83 ± 0.01 ^{a,*}	7.24 ± 0.01 ^c
Sub-Z	8.66 ± 0.08 ^{b,*}	7.15 ± 0.03 ^{bc}
Ex-US	7.85 ± 0.03 ^{a,*}	7.02 ± 0.11 ^b

^{a-c} Indica diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las muestras de la misma columna. * Indica diferencia significativa ($p < 0.05$) entre 0 y 24 h entre las filas. Lactulosa: blanco positivo. Blanco negativo: muestra sin sustrato.

Este comportamiento fue similar al Ex-US (0.83), mientras que con el Sub-Z fue cercano al doble (1.51). La diferencia del pH en las muestras después del proceso de fermentación colónica es de gran relevancia, ya que al fermentarse la fibra dietética se lleva a cabo la formación de ácidos grasos de cadena corta (ácido acético, propiónico y butírico) y algunos ácidos fenólicos en el medio (Saura-Calixto y colaboradores, 2010).

Los resultados del presente estudio en muestras de zarzamora fueron similares a lo reportado por Diaz-Vela, Totosaus, Cruz-Guerrero y Pérez-Chabela, (2013), quienes evaluaron el pH después de la fermentación colónica *in vitro* en harina de cáscara de tuna y piña, se encontró que hubo una disminución en el tiempo final (10 h). Saura-Calixto y colaboradores, (2010), analizaron la diferencia de pH en fibra dietética antioxidante de uva, cuando fue sometido al proceso de fermentación colónica *in vitro*, ellos obtuvieron un valor de 0.71 entre el pH inicial y el final.

5.12.3. Recuento de bacterias ácido lácticas

En la Tabla 22, se muestra el recuento de bacterias ácido lácticas (BAL) de las muestras de estudio después de la simulación de fermentación colónica, el cual fue de 24 h. Respecto a la hora 0, se cuantificaron 1.27 Log UFC/mL más en la

lactulosa ($p < 0.05$), el Sub-Z y el Ex-US fueron menores significativamente, comportándose ambos de manera similar ($p > 0.05$).

Tabla 22. Recuento de bacterias ácido lácticas durante la fermentación colónica *in vitro*

Muestra	0 h	24 h
	Log UFC/mL	Log UFC/mL
Lactulosa	5.27 ± 0.04 ^{c, *}	7.07 ± 0.11 ^b
Blanco negativo	4.71 ± 0.04 ^{b, *}	7.02 ± 0.03 ^a
Sub-Z	4.00 ± 0.02 ^{a, *}	6.54 ± 0.04 ^a
Ex-US	4.01 ± 0.02 ^{a, *}	6.97 ± 0.08 ^a

^{a-c} Indica diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las muestras. * Indica diferencia significativa ($p < 0.05$) entre 0 y 24 h. Lactulosa: blanco positivo. Blanco negativo: muestra sin sustrato.

Al finalizar la fermentación colónica *in vitro* (24 h), se observó el mismo comportamiento que la hora 0. Finalmente, se puede ver que en todas las muestras existe un aumento ($p < 0.05$) en la masa bacteriana al transcurrir 24 h con respecto al recuento inicial, siendo el Ex-US el que presentó el mayor crecimiento de BAL, el cual fue de 2.97 Log UFC/mL.

Este comportamiento en la muestra de Ex-US, puede estar relacionado con la fermentabilidad del sustrato (ver Tabla 20), de acuerdo con Saura-Calixto y colaboradores, (2003), el aumento de masa bacteriana es considerado como uno de los productos del proceso de fermentación colónica y como se mencionó anteriormente, el Ex-US presentó mayor porcentaje de materia seca desaparecida y por lo tanto hubo mayor crecimiento de bacterias ácido lácticas (BAL).

Por otro lado, la menor carga microbiana encontrada a las 24 horas en las muestras de estudio comparado con la lactulosa, probablemente se debe a la presencia de algunos compuestos antimicrobianos como los fenoles, los cuales pudieran estar inhibiendo su crecimiento (Cueva y colaboradores, 2013).

5.12.4. Ácidos grasos de cadena corta (AGCC)

Los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) son los productos finales cuando se fermenta la fibra dietética (principalmente fibra soluble) en el colon (Saura-Calixto y colaboradores, 2010). En la Tabla 23 se presenta el contenido de ácidos grasos de cadena corta derivado de la fermentación colónica *in vitro*. El ácido acético y propiónico se presentaron en mayor concentración en la muestra Ex-US. La muestra del Sub-Z y el Ex-US presentaron resultados similares en la producción de ácido butírico ($p>0.05$), mientras que la lactulosa mostró 5 veces más la concentración de las muestras de estudio.

Tabla 23. Cuantificación de ácidos grasos de cadena corta después de la fermentación colónica *in vitro* (mg/L)

Muestra	Ácido acético	Ácido propiónico	Ácido butírico
Lactulosa	120.36 ± 3.68 ^a	17.47 ± 0.29 ^c	8.78 ± 0.57 ^c
Blanco negativo	254.91 ± 2.96 ^c	15.23 ± 0.11 ^b	2.77 ± 0.03 ^b
Sub-Z	178.16 ± 3.06 ^b	10.62 ± 0.04 ^a	1.67 ± 0.04 ^a
Ex-US	387.65 ± 3.60 ^d	20.17 ± 0.15 ^d	1.67 ± 0.03 ^a

^{a-d} Indica diferencia significativa ($p<0.05$) entre las muestras. Lactulosa: blanco positivo,. Blanco negativo: muestra sin sustrato.

En general, en las muestras de estudios se observó que el compuesto mayormente producido fue el ácido acético, mientras que el menor fue el ácido butírico. La concentración del ácido butírico es muy baja en comparación con un estudio realizado por Kamiloglu y colaboradores, (2015), analizaron la producción de ácidos grasos de cadena corta cuando fue fermentada la fibra dietética contenida en zanahoria negra entera (*Daucus carota* L. spp. *sativus* var. *atrorubens* Alef.), piel y orujo. Se observó que cuando transcurrieron 24 h, el contenido de ácido butírico fue de 45 mg/L y no se presentaron diferencias significativas entre las partes del fruto evaluadas.

Los resultados obtenidos en las muestras de Ex-US y el Sub-Z para el ácido acético, fueron similares a un estudio con harina de cáscara de tuna y piña, los

cuales son subproductos agroindustriales con elevado contenido en fibra dietética, estos se sometieron al proceso de fermentación colónica *in vitro*, se observó que la producción de ácido acético fue de 380 y 220 mg/L para la cáscara de tuna y piña, respectivamente (Diaz-Vela y colaboradores, 2013). Estos AGCC se encuentran generalmente en porcentajes de 60 al 75% para el ácido acético, del 15 al 25% para el ácido propiónico y del 10 al 15% para el ácido butírico. Sin embargo, Ros, Martínez y Valencia, (2011), establecen que la producción de ácidos grasos de cadena corta en el colon puede depender de la edad y de la dieta, ya que una restricción dietética provocará una concentración total menor de AGCC.

Este comportamiento ha sido observado en trabajos previos (Cantu-Jungles, Cipriani, Lacomini, Hamaker y Cordeiro, 2017), en el que se realizó la fermentación colónica de polisacáridos presentes en los duraznos de palma (*Bactris gasipaes* Kunth), fruto consumido en Brasil. Posterior a la fermentación, se llevó a cabo la cuantificación de AGCC, entre ellos, el ácido propiónico. Los resultados fueron comparados con un blanco sin sustrato y fructooligosacáridos, y obtuvieron concentraciones en orden ascendente, el blanco sin sustrato, los fructooligosacáridos y los polisacáridos del durazno de palma.

Las diferencias entre los estudios comparados pueden ser debido a que se utilizan diferentes metodologías y sistemas para realizar el proceso de fermentación colónica *in vitro*. En el presente estudio se usó un sistema cerrado discontinuo, mientras que Kamiloglu y colaboradores, (2015) utilizaron un sistema complejo y costoso llamando simulador de ecosistema microbiano intestinal humano (SHIME, por sus siglas en inglés), en donde probablemente las condiciones son más controladas.

La presencia de los AGCC en el colon, proveniente de la fermentación es de gran importancia fisiológica. El ácido acético tiene una función fisiológica muy importante, ya que participa como fuente de energía en tejidos periféricos,

mientras que el ácido propiónico posee efecto hipocolesterolémico, regulando el metabolismo de los lípidos (Goñi, Díaz-Rubio y Saura-Calixto, 2009; Wolever, Spadafora y Eshuis, 1991).

El ácido butírico es la fuente principal de energía de los colonocitos, y se ha reportado que previene el cáncer de colorrectal, ya que nutre a la mucosa del colon, además participa en la diferenciación de las células y en la apoptosis de las células cancerígenas (Wu, Wu, He, Wu, Wang y Liu, 2018; Cantu-Jungles y colaboradores, 2017), sin embargo, es el AGCC se encontró en baja concentración en las muestras de los subproductos de zarzamora.

Por otro lado, la disminución del pH contribuye a una composición adecuada de la microbiota intestinal, ya que aumenta el número y variedad de bacterias benéficas como Lactobacilos y Bifidobacterias, y la disminución de otras bacterias como *Clostridium*, Bacteroides, etc. (Goñi y colaboradores, 2009). Además estos ácidos grasos promueven la absorción de agua, con lo cual ayuda a una pronta recuperación en problemas diarreicos (Younes, Coudray, Bellanger, Demigné, Rayssiguier y Rémésy, 2001; Topping, Fukushima y Bird, 2003).

Sin embargo, la producción y cantidad de los AGCC va a depender de la microbiota del colon, así como la disponibilidad del sustrato y el tiempo para que sea utilizado por dicha microbiota (Fernando y colaboradores, 2010; Ríos-Covián y colaboradores, 2016). Mientras que la absorción de la mayoría de estos AGCC depende de los colonocitos, los cuales son metabolizados por las células en distintos tejidos, incluyendo las células del intestino grueso, mientras que un porcentaje pequeño (5-10%) es excretado por las heces (Wang y colaboradores, 2019).

5.12.5. Cuantificación de flavonoides en colon

Los fenoles y otros compuestos no digeribles llegan al colon y pueden convertirse en sustrato, el cual es fermentado por la microbiota intestinal (Saura-Calixto y

colaboradores, 2007). Durante el proceso de fermentación colónica *in vitro* algunos flavonoides pudieran ser liberados de la matriz fibrosa por medio de las enzimas que produce la microbiota intestinal en condiciones normales.

En la muestra del Sub-Z la quercetina se encontró en mayor concentración en comparación con el Ex-US. Esto quizás está relacionado con la cantidad total de dicho compuesto en el Sub-Z, ya que cuando se realizó la hidrólisis química (Tabla 13) la quercetina estaba en mayor cantidad en el Sub-Z (4.36 mg/100 g bs) respecto al Ex-US (3.08 mg/100 g bs) (Tabla 24). Por lo tanto, el porcentaje de bioaccesibilidad de quercetina en intestino grueso fue de 6.8 y 6.1 %, respectivamente. Un comportamiento opuesto ocurrió en la miricetina, en donde el Ex-US fue el que tuvo mayor valor respecto al Sub-Z, presentando un 13.2% de bioaccesibilidad en colon.

Tabla 24. Cuantificación de flavonoides en la fermentación colónica *in vitro* (mg/100 g bs)

Flavonoides	Sub-Z	Ex-US
Quercetina	0.30 ± 0.04	0.19 ± 0.03
Miricetina	ND	0.42 ± 0.03
Total	0.30	0.61

ND. No determinado

El contenido total de flavonoides liberados por la microbiota intestinal y que llegaron intactos al colon fue el doble para el Ex-US (0.30 mg/100 g bs) respecto al Sub-Z (0.61 mg/100 g bs) (Tabla 24). Los flavonoides restantes no identificados en esta sección del tracto gastrointestinal probablemente fueron transformados por la microbiota a compuestos más pequeños (Van de Velde y colaboradores, 2018).

Existen dos rutas por las que los compuestos fenólicos pueden encontrarse en el colon, la primera es que después de 24 h de fermentación colónica los fenoles llegan intactos, una vez que las enzimas de la microbiota los liberan de la matriz

alimentaria; y la segunda es que se pueden producir metabolitos después de esta fermentación, tales como los ácidos fenilacéticos, fenilpropiónicos y fenilvaléricos (Ozidal y colaboradores, 2016).

Este hecho puede tener importantes repercusiones en la salud del huésped ya que el intestino grueso está expuesto constantemente a agentes oxidantes y cuya acción requiere sistemas antioxidantes endógenos y exógenos, para contrarrestar dichos procesos oxidativos (Deprez, Mila, Huneau, Tomé y Scalbert, 2001; Halliwell Zhao y Whitean, 2000; Saura-Calixto y colaboradores, 2007).

6. Conclusiones

El subproducto de zarzamora fue caracterizado por la presencia de ácidos orgánicos ácido oxálico, cítrico, fumárico, ascórbico y en mayor concentración ácido málico contribuyendo con un sabor ácido.

La presencia de compuestos fenólicos totales, antocianinas en gran concentración en el subproducto de zarzamora contribuyó a la capacidad antioxidante.

De los compuestos fenólicos presentes en el extracto ultrasonificado, el ácido clorogénico se identificó en mayor concentración en ambas muestras (Sub-Z y Ex-US). Sin embargo, los compuestos que presentaron una mayor bioaccesibilidad intestinal *in vitro* fueron el ácido gálico y la luteolina en el subproducto de zarzamora.

El contenido de fibra dietética presente en el subproducto de zarzamora es alto (44%) en comparación con otras frutas. Las propiedades que presenta esta fibra fueron la capacidad de retención de agua, capacidad de hinchamiento y la capacidad de retención de lípidos en comparación con un producto comercial a base de ciruela pasa.

El extracto ultrasonificado presentó mayor porcentaje de materia seca desaparecida, así como mayor recuento de bacterias ácido lácticas, la generación de ácidos grasos de cadena corta (ácido acético y propiónico) y elevado porcentaje bioaccesible de miricetina en colon, respecto al subproducto de zarzamora. Por lo que el ultrasonido permite mayor disponibilidad del sustrato para dichas bacterias y en consecuencia la formación de los productos mencionados.

Este trabajo contribuye a demostrar que los productos derivados del procesamiento de la zarzamora constituyen importantes fuentes de nutrientes y antioxidantes que pueden ser utilizados como aditivo en los alimentos o como nutraceuticos en lugar de ser desechados y considerados como una fuente importante de contaminación en los suelos. El ultrasonido es una tecnología emergente que puede ser utilizada para una liberación de compuestos antioxidantes de la matriz alimentaria de los residuos de zarzamora y por lo tanto contar con el beneficio fisiológico atribuido a estos compuestos antioxidantes. Lo anterior, por tanto contribuye a dar un valor agregado a los productores de este fruto.

Referencias

- Aadil, R.M., Zeng, X.A., Han, Z. & Sun, D.W. (2013). Effects of ultrasound treatments on quality of grapefruit juice. *Food Chemistry*, 141, 3201-3206.
- Acosta-Estrada, B.A., Gutiérrez-Urbe, J.A. & Serna-Saldívar, S.O. (2014). Bound phenolics in foods, a review. *Food Chemistry*, 152, 46-55.
- Acosta-Montoya, Ó., Vaillant, F., Cozzano, S., Mertz, C., Pérez, A.M. & Castro, M.V. (2010). Phenolic content and antioxidant capacity of tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichus* Schltdl.) during three edible maturity stages. *Food Chemistry*, 119(4), 1497-1501.
- Aimaretti, N.R., Ybalo, C.V., Rojas, M.L., Plou, F.J. & Yori, J.C. (2012). Production of bioethanol from carrot discards. *Bioresource Technology*, 123, 727-732.
- Ajila, C.M., Aalami, M., Leelavathi, K. & Rao, U.P. (2010). Mango peel powder: A potential source of antioxidant and dietary fiber in macaroni preparations. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11(1), 219-224.
- Ajila, C.M., Leelavathi, K. & Prasada-Rao, U.J.S. (2008). Improvement of dietary fiber content and antioxidant properties in soft dough biscuits with the incorporation of mango peel powder. *Journal of Cereal Science*, 48(2), 319–326.
- Albuquerque, B.R., Prieto, M.A., Barreiro, M.F., Rodrigues, A., Curran, T.P., Barros, L. & Ferreira, I.C. (2017). Catechin-based extract optimization obtained from *Arbutus unedo* L. fruits using maceration/microwave/ultrasound extraction techniques. *Industrial Crops and Products*, 95, 404-415.
- Aliakbarlu, J., Ghiasi, S., & Bazargani-Gilani, B. (2018). Effect of extraction conditions on antioxidant activity of barberry (*Berberis vulgaris* L.) fruit extracts. *Veterinary Research Forum*, 9(4), 361-365.
- Aparicio-Fernández, X., Vega-Ahuatzin, A., Ochoa-Velasco, C. E., Cid-Pérez, S., Hernández-Carranza, P., & Ávila-Sosa, R. (2018). Physical and antioxidant characterization of edible films added with red prickly pear (*Opuntia ficus-indica*

- L.) cv. San Martín peel and/or its aqueous extracts. *Food and Bioprocess Technology*, 11(2), 368-379.
- Aktar, N.T.A. & Abdul, M.M. (2017). Valorization of vegetable wastes. In: *Food processing by-products and their utilization*, Anal, A.K. ed. John Wiley & Sons, capítulo 4., pp. 53.
 - Anderson, M. D. R. P., & Calderón, V. (1999). *Microbiología alimentaria: metodología analítica para alimentos y bebidas*. Ed. Diaz de Santos.
 - Anese, M., Mirolo, G., Beraldo, P. & Lippe, G. (2013). Effect of ultrasound treatments of tomato pulp on microstructure and lycopene in vitro bioaccessibility. *Food Chemistry*, 136, 458–463.
 - Añorve-Morga, J., Castañeda-Ovando, A., Cepeda-Saez, A., Archibold, A.D., Jaimez-Ordaz, J., Contreras-López, E., González-Olivares, L.G. & Rodríguez-Rodríguez, J.L. (2015). Microextraction method of medium and long chain fatty acids from milk. *Food Chemistry*, 172, 456-461.
 - Arenas, E.H. & Trinidad, T.P. (2017). Fate of polyphenols in pili (*Canarium ovatum* Engl.) pomace after in vitro simulated digestion. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7, 53-58.
 - Argyri, K., Komaitis, M. & Kapsokefalou, M. (2006). Iron decreases the antioxidant capacity of red wine under conditions of in vitro digestion. *Food Chemistry*, 96, 281–289.
 - Arias, L., Ospino, K.S., & Zapata, J.E. (2018). Elaboración de leche saborizada fortificada con hierro hémico proveniente de hidrolizados de hemoglobina bovina. *Información Tecnológica*, 29(4), 65-74.
 - Auffret, A., Ralet, M.C., Guillon, F., Barry, J.L. & Thibault, J.F. (1994). Effect of grinding and experimental conditions on the measurement of hydration properties of dietary fibres. *LWT-Food Science and Technology*, 27(2), 166-172.
 - Ayala-Zavala, J.F., Rosas-Domínguez, C., Vega-Vega, V. & González-Aguilar, G.A. (2010). Antioxidant Enrichment and Antimicrobial Protection of Fresh-Cut Fruits Using Their Own By-products: Looking for Integral Exploitation. *Journal of Food Science*, 75(8), R175-R181.

- Ayala-Zavala, J.F., Vega-Vega, V. Rosas-Dominguez, C. Palafox-Carlos, H. Villa-Rodriguez, J.A, Wasim Siddiqui, M.W. Dávila-Aviña F.E. & González-Aguilar, G.A. (2011). Agro-industrial potential of exotic fruit byproducts as a source of food additives. *Food Research International*, 44(7), 1866–1874.
- Babbar, N., Harinder, S.O., Dewinder, S.U. & Ramabhau, T.P. (2011). Total phenolic content and antioxidant capacity of extracts obtained from six important fruit residues. *Food Research International*, 44, 391-396.
- Babbar, N., Oberoi, H.S., Uppal, D.S., & Patil, R.T. (2011). Total phenolic content and antioxidant capacity of extracts obtained from six important fruit residues. *Food Research International*, 44(1), 391-396.
- Barba, F.J., Mariutti, L.R., Bragagnolo, N., Mercadante, A.Z., Barbosa-Cánovas, G.V. & Orlie, V. (2017). Bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables after thermal and non-thermal processing. *Trends in Food Science & Technology*, 67, 195-206.
- Barba, F.J., Zhu, Z., Koubaa, M., Sant'Ana, A.S., & Orlie, V. (2016). Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by-products: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 49, 96-109.
- Barbosa-Cánovas, G.V. & Rodríguez, J.J. (2002). Update on nonthermal food processing technologies: pulsed electric field, high hydrostatic pressure, irradiation and ultrasound. *Food Australia*, 54(11), 513-520.
- Barry, J.L., Hoebler, C., MacFarlane, G.T., MacFarlane, S., Mathers, J.C., Reed, K.A., Mortensen, P.B., Nordgaard, I., Rowland, I.R., Rumney, C.J. (1995). Estimation of the fermentability of dietary fiber *in vitro*: a European interlaboratory study. *British Journal of Nutrition*, 74, 303–322.
- Benmeziane, A., Boulekbache-Makhlouf, L., Mapelli-Brahm, P., Khodja, N.K., Remini, H., Madani, K. & Meléndez-Martínez, A.J. (2018). Extraction of carotenoids from cantaloupe waste and determination of its mineral composition. *Food Research International*, 111, 391-398.

- Bensadón, S., Hervert-Hernández, D., Sáyago-Ayerdi, S.G. & Goñi, I. (2010). By-products of *Opuntia ficus-indica* as a source of antioxidant dietary fiber. *Plant Foods for Human Nutrition*, 65(3), 210-216.
- Benzie, I.F.F. & Strain, J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70–76.
- Bhanja, T., Kumari, A. & Banerjee, R. (2009). Enrichment of phenolics and free radical scavenging property of wheat koji prepared with two filamentous fungi. *Bioresource Technology*, 100(11), 2861–2866.
- Blancas-Benitez, F.J., Mercado-Mercado, G., Quirós-Sauceda, A.E., Montalvo-González, E., González-Aguilar, G.A. & Sáyago-Ayerdi, S.G. (2015). Bioaccessibility of polyphenols associated with dietary fiber and in vitro kinetics release of polyphenols in Mexican ‘Ataulfo’ mango (*Mangifera Indica* L.) by-products. *Food & function*, 6(3), 859-868.
- Blando, F., Gerardi, C., Renna, M., Castellano, S. & Serio, F. (2018). Characterisation of bioactive compounds in berries from plants grown under innovative photovoltaic greenhouses. *Journal of Berry Research*, 8, 55-69.
- Bouayed, J., Deußer, H., Hoffmann, L. & Bohn, T. (2012). Bioaccessible and dialysable polyphenols in selected apple varieties following *in vitro* digestion vs. their native patterns. *Food Chemistry*, 131, 1466-1472.
- Bouayed, J., Hoffmann, L. & Bohn, T. (2011). Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: bioaccessibility and potential uptake. *Food Chemistry*, 128, 14-21.
- Brannan, R.G. & Mah, E. (2007). Grape seed extract inhibits lipid oxidation in muscle from different species during refrigerated and frozen storage and oxidation catalyzed by peroxynitrite and iron/ascorbate in a pyrogallol red model system. *Meat Science*, 77(4), 540-546.
- Buniowska, M., Carbonell-Capella, J.M., Frigola, A. & Esteve, M.J. (2017). Bioaccessibility of bioactive compounds after non-thermal processing of an

exotic fruit juice blend sweetened with *Stevia rebaudiana*. *Food Chemistry*, 221, 1834–1842.

- Bushman, B.S., Phillips, B., Isbell, T., Ou, B., Crane, J.M., & Knapp, S.J. (2004). Chemical composition of caneberry (*Rubus* spp.) seeds and oils and their antioxidant potential. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 7982-7987.
- Cantu-Jungles, T.M., Cipriani, T.R., Iacomini, M., Hamaker, B.R. & Cordeiro, L. M. (2017). A pectic polysaccharide from peach palm fruits (*Bactris gasipaes*) and its fermentation profile by the human gut microbiota *in vitro*. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 9, 1-6.
- Carbonell-Capella, J.M., Buniowska, M., Barba, F.J., Esteve, M.J., Frígola, A., (2014). Analytical methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13, 155–171.
- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A.G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A.S., & Abert-Vian, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 540-560.
- Chantaro, P., Devahastin, S. & Chiewchan, N. (2008). Production of antioxidant high dietary fiber powder from carrot peels. *LWT-Food Science and Technology*, 41(10), 1987-1994.
- Chau, C. & Huang, Y. (2003). Comparison of the chemical composition and physicochemical properties of different fibers prepared from the peel of *Citrus sinensis* L. cv. Liucheng. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(9), 2615-2618.
- Chi, Z., Wang, Z.P., Wang, G.Y., Khan, I. & Chi, Z.M. (2016). Microbial biosynthesis and secretion of l-malic acid and its applications. *Critical reviews in biotechnology*, 36, 99-107.
- Choi, M.H., Kim, G.H., & Lee, H.S. (2002). Effects of ascorbic acid retention on juice color and pigment stability in blood orange (*Citrus sinensis*) juice during refrigerated storage. *Food Research International*, 35(8), 753-759.

- Craft, B.D., Kerrihard, A.L., Amarowicz, R. & Pegg, R.B. (2012). Phenol-based antioxidants and the in vitro methods used for their assessment. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11(2), 148-173.
- Cruz, N., Capellas, M., Hernández, M., Trujillo, A., Guamis, B., Ferragut, V. (2007). Ultra high pressure homogenization of soymilk: microbiological, physicochemical and microstructural characteristics, *Food Research International*, 40(6), 725–732.
- Cueva, C., Sánchez-Patán, F., Monagas, M., Walton, G.E., Gibson, G.R., Martín-Álvarez, P.J., Bartolomé, B. & Moreno-Arribas, M.V. (2013). *In vitro* fermentation of grape seed flavan-3-ol fractions by human faecal microbiota: changes in microbial groups and phenolic metabolites. *FEMS Microbiology Ecology*, 83(3), 792-805.
- Curi, P.N., Pio, R., Moura, P.H.A., Tadeu, M.H., Nogueira, P.V., Pasqual, M. (2015). Produção de amora-preta e amora-vermelha em Lavras-MG. *Ciência Rural*, 45(8), 1368-1374.
- Da Fonseca, M.A.P., Pasquel-Reátegui, J.L., Fernández, B.G. & Martínez, J. (2015). Pressurized liquid extraction of bioactive compounds from blackberry (*Rubus fruticosus* L.) residues: a comparison with conventional methods. *Food Research International*, 77, 675-683.
- Dai, J., Gupte, A., Gates, L. & Mumper, R.J. (2009). A comprehensive study of anthocyanin-containing extracts from selected blackberry cultivars: extraction methods, stability, anticancer properties and mechanisms. *Food and Chemical Toxicology*, 47(4), 837-847.
- Delmoro, J., Muñoz, D., Nadal, V., Clementz, A. & Pranzetti, V. (2010). El color en los alimentos: determinación de color en mieles. *Invenio: Revista de Investigación Académica*, (25), 145-152.
- Deng, G.F., Shen, C., Xu, X.R., Kuang, R.D., Guo, Y.J., Zeng, L.S. & Li, H.B. (2012). Potential of fruit wastes as natural resources of bioactive compounds. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(7), 8308-8323.

- Deprez, S., Mila, I., Huneau, J.F., Tomé, D., Scalbert, A. (2001). Transport of proanthocyanidin dimer, trimer and polymer across monolayers of human intestinal epithelial Caco-2 cells. *Antioxidant Redox Signal*, 3, 957-67.
- Díaz-Batalla, L., Hernández-Urbe, J., Gutiérrez-Dorado, R., Téllez-Jurado, A., Castro-Rosas, J., Pérez-Cadena, R. & Gómez-Aldapa, C. (2018). Nutritional Characterization of *Prosopis laevigata* Legume Tree (Mesquite) Seed Flour and the Effect of Extrusion Cooking on its Bioactive Components. *Foods*, 7(8), 124-133.
- Diaz-Vela, J., Totosaus, A., Cruz-Guerrero, A.E. & Pérez-Chabela, M.L. (2013). *In vitro* evaluation of the fermentation of added-value agroindustrial by-products: cactus pear (*Opuntia ficus-indica* L.) peel and pineapple (*A. nanas comosus*) peel as functional ingredients. *International Journal of Food Science & Technology*, 48(7), 1460-1467.
- DOF-12-02-2016. Diario Oficial de la Federación. Reglamento de control sanitario de productos y servicios. (2016). En línea: <http://www.cofepris.gob.mx/MJ/Documents/Reglamentos/prodyser060409.pdf>, fecha de acceso: 14 de octubre de 2016.
- Donovan, J.L., Meyer, A.S. & Waterhouse, A.L. (1998). Phenolic composition and antioxidant activity of prunes and prune juice (*Prunus domestica*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(4), 1247–1252.
- Dujmić, F., Brnčić, M., Karlović, S., Bosiljkov, T., Ježek, D., Tripalo, B. & Mofardin, I. (2013). Ultrasound-assisted infrared drying of pear slices: textural issues. *Journal of Food Process Engineering*, 36(3), 397-406.
- Dulf, F.V., Andrei, S., Bunea, A. & Socaciu, C. (2012). Fatty acid and phytosterol contents of some Romanian wild and cultivated berry pomaces. *Chemical Papers*, 66(10), 925-934.
- Dutra, R.L.T., Dantas, A.M., De Araújo, M.D., Batista, J.D.F., De Albuquerque, M.B.R.L., De Magalhães C.Â.M.T., Magnani, M. & Borges, G.D.S.C. (2017). Bioaccessibility and antioxidant activity of phenolic compounds in frozen pulps of Brazilian exotic fruits exposed to simulated gastrointestinal conditions. *Food Research International*, 100, 650-657.

- Easy RGB (2019). Convert color data into different standards and color spaces. En línea: <http://www.easyrgb.com/en/convert.php#inputFORM>, fecha de acceso: 30 de junio de 2019.
- El-Said, M.M., Haggag, H.F., El-Din, H.M.F., Gad, A.S. & Farahat, A.M. (2014). Antioxidant activities and physical properties of stirred yoghurt fortified with pomegranate peel extracts. *Annals of Agricultural Sciences*, 59(2), 207-212.
- Famiani, F., Battistelli, A., Moscatello, S., Cruz-Castillo, J.G., & Walker, R.P. (2015). The organic acids that are accumulated in the flesh of fruits: occurrence, metabolism and factors affecting their contents-a review. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 21, 97-128.
- FAO. (2014). Definitional framework of food losses and waste. Rome, Italy: FAO.
- Farah, A., Guigon, F. & Trugo, L.C. (2006). 5-Caffeoylquinic acid digestibility in human digestive fluids. *Colloque Scientifique International sur le Café*, 21st, Montpellier, Frankreich, 11–15, September 2006, pp. 97–100.
- Fawole, O.A. & Opara, U.L. (2016). Stability of total phenolic concentration and antioxidant capacity of extracts from pomegranate co-products subjected to in vitro digestion. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16, (358), 2-10.
- Fazio, A., Plastina, P., Meijerink, J., Witkamp, R.F. & Gabriele, B. (2013). Comparative analyses of seeds of wild fruits of *Rubus* and *Sambucus* species from Southern Italy: Fatty acid composition of the oil, total phenolic content, antioxidant and anti-inflammatory properties of the methanolic extracts. *Food Chemistry*, 140(4), 817-824.
- Fernández-López, J., Sendra, E., Sayas-Barberá, E., Navarro, C. & Pérez-Alvarez, J.A. (2008). Physico-chemical and microbiological profiles of salchichón (Spanish dry-fermented sausage) enriched with orange fiber. *Meat Science*, 80(2), 410-417.
- Fernando, W.M., Brennan, C.S., Flint, S., Ranaweera, K.K., Bamunuarachchi, A. & Morton, H.R. (2010). Enhancement of short chain fatty acid formation by pure cultures of probiotics on rice fibre. *International Journal of Food Science & Technology*, 45(4), 690-696.

- Ferreira, Z.A.A., Goltz, C., Casagrande, Y.M.A., Ávila, S., Hirooka, E. Y., Wosiacki, G., Nogueira, A. & Demiate, I.M. (2015). Blackberry (*Rubus* spp.): influence of ripening and processing on levels of phenolic compounds and antioxidant activity of the 'Brazos' and 'Tupy' varieties grown in Brazil. *Ciência Rural*, 45(4), 744-749.
- Figuerola, F., Hurtado, M.L., Estévez, A.M., Chiffelle, I. & Asenjo, F. (2005). Fibre concentrates from apple pomace and citrus peel as potential fibre sources for food enrichment. *Food Chemistry*, 91(3), 395–401.
- Floegel, A., Kim, D.O., Chung, S.J., Koo, S.I., & Chun, O.K. (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(7), 1043-1048.
- Flórez-Santiago, J.J., Grande-Tovar, C.D. & Díaz-Uribe, C.E. (2019). Quenching of singlet oxygen by extract of peels of the fruit of *syzygiumcumini*. *ITECKNE*, 16(1), 7-11.
- Food and Nutrition Board & Institute of Medicine. Panel on the Definition of Dietary Fiber Staff. (2001). *Dietary reference intakes: Proposed definition of dietary fiber: A report of the panel on the definition of dietary fiber and the standing committee on the scientific evaluation of dietary reference intakes*. Washington, DC: National Academy Press.
- Francis, F.J. (1989). Food colorants: anthocyanins. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 28, 273–314.
- Galanakis, C.M. (2012). Recovery of high added-value components from food wastes: conventional, emerging technologies and commercialized applications. *Trends in Food Science & Technology*, 26(2), 68-87.
- Ganapathy, V., Thangaraju, M., Prasad, P.D., Martin, P.M. & Singh, N. (2013). Transporters and receptors for short-chain fatty acids as the molecular link between colonic bacteria and the host. *Current opinion in pharmacology*, 13(6), 869-874.
- Garzón, G. (2008). Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: revisión. *Acta biológica Colombiana* 13(3), 27-36.

- Gil-Sánchez, I., Cueva, C., Sanz-Buenhombre, M., Guadarrama, A., Moreno-Arribas, M.V. & Bartolomé, B. (2018). Dynamic gastrointestinal digestion of grape pomace extracts: Bioaccessible phenolic metabolites and impact on human gut microbiota. *Journal of Food Composition and Analysis*, 68, 41-52.
- Giusti, M.M. & Wrolstad, R.E. (2001). Anthocyanins, characterization and measurement with UV-visible spectroscopy. En: *Current protocols in food analytical chemistry*. New York: John Wiley & Sons, USA, Capítulo 6, F1.2.1-F1.2.13.
- Goering, H.K. & Van Soest, P.J. (1970). Forage fiber analyses (apparatus, reagents, procedures and some applications). In *United States Department of Agriculture (Ed.). Agricultural handbook (Vol. 379)*. Washington, DC: USA, Government Printing Office.
- Gonzalez-Aguilar, G.A., Blancas-Benitez, F.J. & Sayago-Ayerdi, S.G. (2017). Polyphenols associated with dietary fibers in plant foods: Molecular interactions and bioaccessibility. *Current Opinion in Food Science*, 13, 84-88.
- González-Centeno, M.R., Comas-Serra, F., Femenia, A., Rosselló, C. & Simal, S. (2015). Effect of power ultrasound application on aqueous extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity from grape pomace (*Vitis vinifera* L.): experimental kinetics and modeling. *Ultrasonics Sonochemistry*, 22, 506-514.
- Goñi, I. & Martin-Carrón, N. (1998). *In vitro* fermentation and hydration properties of commercial dietary fiber-rich supplements. *Nutrition Research*, 18(6), 1077-1089.
- Goñi, I., Díaz-Rubio, M. E., Pérez-Jiménez, J. & Saura-Calixto, F. (2009). Towards an updated methodology for measurement of dietary fiber, including associated polyphenols, in food and beverages. *Food Research International*, 42(7), 840-846.
- Goñi, I., Díaz-Rubio, M.E. & Saura-Calixto, F. (2009). Dietary fiber in beer: content, composition, colonic fermentability, and contribution to the diet. In: *Beer in health and disease prevention (pp. 299-307)*. Academic Press.

- Gorinstein, S., Martín-Belloso, O., Park, Y.S., Haruenkit, R., Lojek, A., Číž, M., Caspif, A., Libmanf, I. & Trakhtenberg, S. (2001). Comparison of some biochemical characteristics of different citrus fruits. *Food Chemistry*, 74(3), 309-315.
- Guedes, M.N.S., Abreu, C.M.P., Maro, L.A.C., Pio, R., Abreu, J.R. & Oliveira, J.O. (2013). Chemical characterization and mineral levels in the fruits of blackberry cultivars grown in a tropical climate at an elevation. *Acta Scientiarum Agronomy*, 35(2), 191-196.
- Guillon, F. & Champ, M. (2000). Structural and physical properties of dietary fibres, and consequences of processing on human physiology. *Food Research International*, 33(3-4), 233-245.
- Hackman, R.M., Polagruto, J.A., Zhu, Q.Y., Sun, B., Fujii, H. & Keen, C.L. (2008). Flavanols: digestion, absorption and bioactivity. *Phytochemistry Reviews*, 7, 195-208.
- Häkkinen, S.H., Kärenlampi, S.O., Heinonen, I.M., Mykkänen, H.M. & Törrönen, A.R. (1999). Content of the flavonols quercetin, myricetin, and kaempferol in 25 edible berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 2274-2279.
- Halliwell B., Zhao, K., Whitean, M. (2000). The gastrointestinal tract; a major site de antioxidant action? *Free Radical Research*, 33, 819-830.
- Hossain, M.B., Brunton, N.P., Patras, A., Tiwari, B., O'donnell, C.P., Martin-Diana, A.B. & Barry-Ryan, C. (2012). Optimization of ultrasound assisted extraction of antioxidant compounds from marjoram (*Origanum majorana* L.) using response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 19(3), 582-590.
- Huang, D., Ou, B. & Prior, R.L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841-1856.
- Huang, W.Y., Zhang, H.C., Liu, W.X. & Li, C.Y. (2012). Survey of antioxidant capacity and phenolic composition of blueberry, blackberry, and strawberry in Nanjing. *Journal of Zhejiang University Science B*, 13(2), 94-102.

- IDF. (1997). Sensory Evaluation of Dairy Products by Scoring—Reference Method. IDF Standard 99C:1997. International Dairy Federation, Brussels, Belgium.
- Ignat, I., Volf, I. & Popa, V.I. (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 126(4), 1821- 1835.
- Jackman, R.L., Yada, R.Y., Tung, M.A. & Speers, R.A. (1987). Anthocyanins as food colorants-a review. *Journal of Food Biochemistry* 11, 201–247.
- Jazić, M., Kukrić, Z., Vulić, J. & Četojević-Simin, D. (2019). Polyphenolic composition, antioxidant and antiproliferative effects of wild and cultivated blackberries (*Rubus fruticosus* L.) pomace. *International Journal of Food Science & Technology*, 54, 194-201.
- Jiménez-Escrig, A., Rincón, M., Pulido, R. & Saura-Calixto, F. (2001). Guava fruit (*Psidium guajava* L.) as a new source of antioxidant dietary fiber. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5489-5493.
- Kahle, K., Kempf, M., Schreier, P., Scheppach, W., Schrenk, D., Kautenburger, T., Hecker, D., Huemmer, W., Ackermann, M. & Richling, E. (2011). Intestinal transit and systemic metabolism of apple polyphenols. *European journal of nutrition*, 50(7), 507-522.
- Kamiloglu, S., Capanoglu, E., Bilen, F.D., Gonzales, G.B., Grootaert, C., Van de Wiele, T. & Van Camp, J. (2015). Bioaccessibility of polyphenols from plant-processing byproducts of black carrot (*Daucus carota* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(12), 2450-2458.
- Kaplan, H. & Hutkins, R.W. (2000). Fermentation of fructooligosaccharides by lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 2582–2684.
- Kaume, L., Howard, L.R. & Devareddy, L. (2012). The blackberry fruit: A review on its composition and chemistry, metabolism and bioavailability, and health benefits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(23), 5716-5727.
- Kedare, S.B. & Singh, R.P. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*, 48(4), 412-422.

- Khattak, M.M.A.K. (2002). Physiological effects of dietary complex carbohydrates and its metabolites role in certain diseases. *Pakistan Journal of Nutrition*, 1(4), 161-168.
- Kluge, R.A. Nachtigal, J.C. Fachinello J.C. & Bilhalva, A.B. (2002). *Physiology and Postharvest Handling of Temperate Fruits*, 2nd Edition, Livraria e Editora Rural, Campinas.
- Knekt, P., Kumpulainen, J., Järvinen, R., Rissanen, H., Heliövaara, M., Reunanen, A., Hakulinen T. & Aromaa, A. (2002). Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 76, 560-568.
- Kodal, S.P. & Aksu, Z. (2017). Phenolic pigment extraction from orange peels: kinetic model-ing. In *15th International Conference on Environmental Science and Technology*. Rhodes, Greece, 31, 798-803.
- Koubaa, M., Mhemdi, H. & Vorobiev, E. (2015). Seed oil polyphenols: rapid and sensitive extraction method and high resolution-mass spectrometry identification. *Analytical Biochemistry*, 476, 91-93.
- Kushwaha, R., Kumar, V., Vyas, G. & Kaur, J. (2017). Optimization of different variable for eco-friendly extraction of betalains and phytochemicals from beetroot pomace. *Waste and Biomass Valorization*, 9(9), 1485-1494.
- Kuskoski, E.M., Asuero, A.G., Troncoso, A.M., Mancini-Filho, J. & Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 25, 726–732.
- Lajolo, S.A. y Wensel, D.N. (1998). *Temas en tecnología de alimentos. Fibra dietética*. México, D.F., Instituto Politécnico Nacional, 2, 29-42.
- Larrauri, J.A. Rupérez, P., Borroto, B. & Saura-Calixto, F. (1996). Mango peels as a new tropical fibre: preparation and characterization. *LWT-Food Science and Technology*, 29(8), 729-733.
- Larrauri, J.A., Rupérez, P. & Calixto, F.S. (1997). Pineapple shell as a source of dietary fiber with associated polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(10), 4028-4031.

- Lau, D.W. & King, A.J. (2003). Pre-and post-mortem use of grape seed extract in dark poultry meat to inhibit development of thiobarbituric acid reactive substances. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(6), 1602-1607.
- Le Bourvellec, C. & Renard, C.M.G.C. (2012). Interactions between polyphenols and macromolecules: quantification methods and mechanisms. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52(3), 213-248.
- Lee, W.J., & Hase, K. (2014). Gut microbiota-generated metabolites in animal health and disease. *Nature Chemical Biology*, 10(6), 416-424.
- Lenucci, M.S., Durante, M., Anna, M., Dalessandro, G., & Piro, G. (2013). Possible use of the carbohydrates present in tomato pomace and in byproducts of the supercritical carbon dioxide lycopene extraction process as biomass for bioethanol production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(15), 3683-3692.
- Li, Y., Guo, C., Yang, J., Wei, J., Xu, J. & Cheng, S. (2006). Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. *Food Chemistry*, 96(2), 254-260.
- Liu, R. (2007). Whole grain phytochemicals and health. *Journal of Cereal Science*, 46(3), 207–219.
- Liu, Y., Zhang, X. & Zhao, Z. (2013). Effects of fruit bagging on anthocyanins, sugars, organic acids, and color properties of Granny Smith and Golden Delicious during fruit maturation. *European Food Research and Technology*. 236, 329-339.
- Liyana-Pathirana, C.M., & Shahidi, F. (2006). Importance of insoluble-bound phenolics to antioxidant properties of wheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(4), 1256–1264.
- Lotito, S.B., Zhang, W.J., Yang, C.S., Crozier, A. & Frei, B. (2011). Metabolic conversion of dietary flavonoids alters their anti-inflammatory and antioxidant properties. *Free Radical Biology and Medicine*, 51, 454-463.
- Lovegrove, J.A., Stainer, A. & Hobbs, D.A. (2017). Role of flavonoids and nitrates in cardiovascular health. *Proceedings of the Nutrition Society*, 76, 83-95.

- Malien-Aubert, C., Dangles, O. & Amiot, M.J. (2001). Color stability of commercial anthocyanin-based extracts in relation to the phenolic composition. Protective effects by intra-and intermolecular copigmentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(1), 170–176.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C. & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: Food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 727–747.
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A. & Rémésy, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81, 230S–242S.
- Mañas, E. & Saura-Calixto, F. (1995). Dietary fibre analysis: methodological error sources. *European Journal of Clinical Nutrition*, 49(3), 158-162.
- Martin, K.R. & Appel, C.L. (2010). Polyphenols as dietary supplements: a double-edged sword. *Nutrition and Dietary Supplements*, 2, 1-12.
- Matos-Chamorro, A. & Chambilla-Mamani, E. (2010). Importancia de la fibra dietética, sus propiedades funcionales en la alimentación humana y en la industria alimentaria. *Revista de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 1, 4-17.
- Maurya, A.K., Pandey, R.K., Rai, D., Porwal, P. & Rai, D.C. (2015). Waste product of fruits and vegetables processing as a source of dietary fibre: a review. *Trends in Biosciences*, 8 (19), 5129-5140.
- Mazzoni, L., Perez-Lopez, P., Giampieri, F., Alvarez-Suarez, J.M., Gasparrini, M., Forbes-Hernandez, T.Y., Quiles, J.L., Mezzetti, B. & Battino, M. (2016). The genetic aspects of berries: from field to health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(2), 365-371.
- McCleary, B.V., DeVries, J.W., Rader, J.I., Cohen, G., Prosky, L., Mugford, D.C., Martine, C. & Okuma, K. (2012). Determination of insoluble, soluble, and total dietary fiber (CODEX definition) by enzymatic-gravimetric method and liquid chromatography: collaborative study. *Journal of AOAC International*, 95(3), 824-844.

- McDougall, G.J., Dobson, P., Smith, P., Blake, A. & Stewart, D. (2005). Assessing potential bioavailability of raspberry anthocyanins using an in vitro digestion system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(15), 5896–5904.
- Mccrorie, J.W., Fahey, G.C. (2013). A review of gastrointestinal physiology and the mechanisms underlying the health benefits of dietary fiber: Matching an effective fiber with specific patient needs. *Clinical Nursing Studies*, 1, 82-92.
- Mendes, R.L., France de Souza, D., Da Silva, E.A., De Oliveira, T.O. & Pinto de Lima, J. (2017). Physical and chemical characterization and quantification of bioactive compounds in berries and berry jams. *Semina: Ciências Agrárias*, 38(4).
- Metcalfe, L.D., & Schmitz, A.A. (1961). Preparation of fatty acid esters for gas chromatography analysis. *Analytical Chemistry*, 33, 363–364.
- Mikulic-Petkovsek, M., Schmitzer, V., Slatnar, A., Stampar, F., & Veberic, R. (2012). Composition of sugars, organic acids, and total phenolics in 25 wild or cultivated berry species. *Journal of Food Science*, 77(10), C1064-C1070.
- Mildner-Szkudlarz, S., Zawirska-Wojtasiak, R., Szwengiel, A. & Pacyński, M. (2011). Use of grape by-product as a source of dietary fibre and phenolic compounds in sourdough mixed rye bread. *International Journal of Food Science & Technology*, 46(7), 1485-1493.
- Miller, E.R., Parsons, M.J., Ullrey, D.E. & Ku, P.K. (1981). Bioavailability of iron from ferric choline citrate and a ferric copper cobalt choline citrate complex for young pigs. *Journal of Animal Science*, 52(4), 783-787.
- Mishra, K., Ojha, H. & Chaudhury, N.K. (2012). Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food Chemistry*, 130(4), 1036-1043.
- Mohamed, A.G., Zayan, A.F. & Nadia, M. (2014). Physiochemical and sensory evaluation of yoghurt fortified with dietary fiber and phenolic compounds. *Life Science Journal*, 11(9), 816-822.

- Moorthy, I.G., Maran, J.P., Ilakya, S., Anitha, S.L., Sabarima, S.P., & Priya, B. (2017). Ultrasound assisted extraction of pectin from waste *Artocarpus heterophyllus* fruit peel. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 525-530.
- Morales, F.J. & Jiménez-Pérez, S. (2001). Free radical scavenging capacity of Maillard reaction products as related to colour and fluorescence. *Food Chemistry*, 72, 1119-1125.
- Morales, P., Ferreira, I.C., Carvalho, A.M., Fernández-Ruiz, V., Sánchez-Mata, M., Cámara, M., Morales, R. & Tardío, J. (2013). Wild edible fruits as a potential source of phytochemicals with capacity to inhibit lipid peroxidation. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 115, 176-185.
- Moreno, B.L. & Oyola, Y.A.D. (2016). Caracterización de parámetros fisicoquímicos en frutos de mora (*Rubus alpinus* Macfad). *Acta Agronómica*, 65(2), 130-136.
- Moreno-Montoro, M., Olalla-Herrera, M., Gimenez-Martinez, R., Navarro-Alarcon, M. & Rufian-Henares, J.A. (2015). Phenolic compounds and antioxidant activity of Spanish commercial grape juices. *Journal of Food Composition and Analysis*, 38, 19-26.
- Muñoz-González, I., Jiménez-Girón, A., Martín-Álvarez, P.J., Bartolomé, B., & Moreno-Arribas, M.V. (2013). Profiling of microbial-derived phenolic metabolites in human feces after moderate red wine intake. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(39), 9470-9479.
- Muñoz-Robredo, P., Robledo, P., Manríquez, D., Molina, R., & Defilippi, B. G. (2011). Characterization of sugars and organic acids in commercial varieties of table grapes. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 71(3), 452-458.
- Naczki, M. & Shahidi, F. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 1523–1542.
- Ngo, T., Wrolstad, R.E. & Zhao, Y. (2007). Color quality of Oregon strawberries—impact of genotype, composition, and processing. *Journal of Food Science*, 72, C025-C032.

- Nipornram, S., Tochampa, W., Rattanatraiwong, P. & Singanusong, R. (2018). Optimization of low power ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from mandarin (*Citrus reticulata* Blanco cv. Sainampung) peel. *Food Chemistry*, 241, 338-345.
- NORMA Oficial Mexicana. NOM-218-SSA1-2011, Productos y servicios. Bebidas saborizadas no alcohólicas, sus congelados, productos concentrados para prepararlas y bebidas adicionadas con cafeína. Especificaciones y disposiciones sanitarias. Métodos de prueba. En línea: <http://www.salud.gob.mx/cdi/nom/compi/NOM-218-SSA1-2011.pdf>, fecha de acceso: 22 de septiembre de 2016.
- Norshazila, S., Syed, Z.I., Mustapha, S.K., Aisyah, M.R. & Kamarul, R.K. (2010). Antioxidant levels and activities of selected seeds of malaysian tropical fruits. *Malaysian Journal of Nutrition*, 16(1), 149-159.
- Nuutila, A.M., Kammiovirta, K., & Oksman-Caldentey, K.M. (2002). Comparison of methods for the hydrolysis of flavonoids and phenolic acids from onion and spinach for HPLC analysis. *Food Chemistry*, 76, 519-525.
- Oliveira, A., Amaro, A.L., & Pintado, M. (2018). Impact of food matrix components on nutritional and functional properties of fruit-based products. *Current Opinion in Food Science*, 22, 153-159.
- Olloqui, E.J., Castañeda-Ovando, A., Contreras-López, E., Hernandez-Sanchez, D., Tapia-Maruri, D., Piloni-Martini, J., & Añorve-Morga, J. (2018). Encapsulation of fish oil into low-cost alginate beads and EPA-DHA release in a rumino-intestinal in vitro digestion model. *European journal of lipid science and technology*, 120(9).
- OMS/FAO. (2003). World Health Organization. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. Report of a Joint WHO/FAO Expert Consultation. WHO Technical Report Series 916, Geneva.
- Ozdal, T., Sela, D.A., Xiao, J., Boyacioglu, D., Chen, F., Capanoglu, E., (2016). The reciprocal interactions between polyphenols and gut microbiota and effects on bioaccessibility. *Nutrient*, 8(2), 78-114.

- Palafox-Carlos, H., Ayala-Zavala, F. & González-Aguilar, G.A. (2011). The role of dietary fiber in the bioaccessibility and bioavailability of fruit and vegetable antioxidants. *Journal of Food Science*, 76, 6–15.
- Pande, G. & Akoh, C.C. (2010). Organic acids, antioxidant capacity, phenolic content and lipid characterisation of Georgia-grown underutilized fruit crops. *Food Chemistry* 120, 1067-1075.
- Pasquel R.J.L., Da Fonseca M.A.P., Barbero, G.F., Rezende, C.A., & Martínez, J. (2014). Extraction of antioxidant compounds from blackberry (*Rubus* sp.) bagasse using supercritical CO₂ assisted by ultrasound. *The Journal of Supercritical Fluids*, 94, 223-233.
- Pazos, M., Gallardo, J.M., Torres, J.L., Medina, I. (2004). Activity of grape polyphenols as inhibitors of the oxidation of fish lipids and frozen fish muscle. *Food Chemistry*, 92(3), 547-557.
- Pérez, B.M.H. y Vázquez, V.V. (2004). Zarzamora (*Rubus* spp), su cultivo y producción en el trópico mexicano. INIFAP, CIRPAC. Campo Experimental Santiago, Ixcuintla.
- Pérez-Jiménez, J., Díaz-Rubio, M. E., & Saura-Calixto, F. (2013). Non-extractable polyphenols, a major dietary antioxidant: occurrence, metabolic fate and health effects. *Nutrition Research Reviews*, 26(2), 118-129.
- Pfaltzgraff, L.A., Cooper, E.C., Budarin, V. & Clark, J.H. (2013). Food waste biomass: a resource for high-value chemicals. *Green Chemistry*, 15(2), 307-314.
- Pieszka, M., Gogol, P., Pietras, M., & Pieszka, M. (2015). Valuable components of dried pomaces of chokeberry, black currant, strawberry, apple and carrot as a source of natural antioxidants and nutraceuticals in the animal diet. *Annals of Animal Science*, 15(2), 475-491.
- Prohens, J., Sánchez, M.C., Rodríguez-Burruezo, A., Cámara, M., Torija, E. & Nuez, F. (2005). Morphological and physico-chemical characteristics of fruits of pepino (*Solanum muricatum*), wild relatives (*S. caripense* and *S. tabanoense*) and interspecific hybrids. Implications in pepino breeding. *European Journal of Horticultural Science*, 70(5), 224–230.

- Prosky, L., Asp, N.G., Schweizer, T.F., De Vries, J.W. & Furda, I. (1992). Determination of insoluble and soluble dietary fiber in foods and food products: collaborative study. *Journal of AOAC International*, 75(2), 360-367.
- Pulido, R., Bravo, L. & Saura-Calixto, F. (2000). Antioxidant capacity of dietary polyphenols as determined by a modiWed ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 48, 3396– 3402.
- Quirós-Sauceda, A.E., Palafox-Carlos, H., Sáyago-Ayerdi, S.G., Ayala-Zavala, J.F., Bello-Perez, L.A., Alvarez-Parrilla, E., De la Rosa, L.A., González-Córdova, A.F. & Gonzalez-Aguilar, G.A. (2014). Dietary fiber and phenolic compounds as functional ingredients: interaction and possible effect after ingestion. *Food & Function*, 5, 1063-1072.
- Raghavendra, S.N., Ramachandra, S.R., Rastogi, N.K., Raghavarao, K.S.M.S., Kumar, S. & Tharanathan, R.N. (2006). Grinding characteristics and hydration properties of coconut residue: A source of dietary fiber. *Journal of Food Engineering*, 72, 281-286.
- Ramić, M., Vidović, S., Zeković, Z., Vladić, J., Cvejic, A. & Pavlić, B. (2015). Modeling and optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenolic compounds from *Aronia melanocarpa* by-products from filter-tea factory. *Ultrasonics Sonochemistry*, 23, 360-368.
- Ramírez-Moreno, E., Zafra-Rojas, Q.Y., Arias-Rico, J., Ariza-Ortega, J.A., Alanís-García, E. & Cruz-Cansino, N. (2018). Effect of ultrasound on microbiological load and antioxidant properties of blackberry juice. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(2), e13489, 1-6.
- Ravindran, R. & Jaiswal, A.K. (2016). Exploitation of food industry waste for high-value products. *Trends in Biotechnology*, 34(1), 58-69.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9), 1231-1237.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. & Paganga, G. (1996). Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine* 20(7), 933-956.

- Ríos-Covián, D., Ruas-Madiedo, P., Margolles, A., Gueimonde, M., de los Reyes-Gavilán, C. G., & Salazar, N. (2016). Intestinal short chain fatty acids and their link with diet and human health. *Frontiers in microbiology*, 7 (185), 1-9.
- Robertson, J.A., De Monredon, F.D., Dysseler, P., Guillon, F., Amado, R. & Thibault, J.F. (2000). Hydration properties of dietary fibre and resistant starch: a European collaborative study. *LWT-Food Science and Technology*, 33(2), 72-79.
- Rodríguez, G.M., Guzmán, M.S., Andrade, E., & Hernández, L. (2010). Evaluación de las propiedades fisicoquímicas y funcionales de jugo obtenido mediante el tratamiento enzimático en zarzamora comercial (*Rubus spp*) del estado de Michoacán. Guanajuato, México.
- Roginsky, V. (2003). Chain-breaking antioxidant activity of natural polyphenols as determined during the chain oxidation of methyl linoleate in triton X-100 micelles. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 414(2), 261-270.
- Rohm, H., Brennan, C., Turner, C., Günther, E., Campbell, G., Hernando, I., Struck, S. & Kontogiorgos, V. (2015). Adding value to fruit processing waste: innovative ways to incorporate fibers from berry pomace in baked and extruded cereal-based foods—a SUSFOOD project. *Foods*, 4(4), 690-697.
- Ros, B.G., Martínez, G.C. & Valencia, J.A. (2011). Biodisponibilidad de los ácidos grasos de cadena corta: mecanismos de absorción.
- Rosas, D., Ortiz, H., Herrera, J., & Leyva, O. (2016). Revalorización de algunos residuos agroindustriales y su potencial de aplicación a suelos agrícolas. *Agroproductividad*, 9(8), 18-23.
- Rossi, M., Corradini, C., Amaretti, A., Nicolini, M., Pompei, A., Zanoni, S. & Matteuzzi, D. (2005). Fermentation of fructooligosaccharides and inulin by bifidobacteria: a comparative study of pure and fecal cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(10), 6150-6158.
- Ruiz-Rodríguez, B. M., Morales, P., Fernández-Ruiz, V., Sánchez-Mata, M. C., Cámara, M., Díez-Marqués, C., Pardo-De-Santayana, M., Molina, M., & Tardío, J. (2011). Valorization of wild strawberry-tree fruits (*Arbutus unedo* L.) through

nutritional assessment and natural production data. *Food Research International*, 44(5), 1244-1253.

- Rupasinghe, H., Wang, L., Huber, G., & Pitts, N. (2007). Effect of baking on dietary fibre and phenolics of muffins incorporated with apple skin powder. *Food Chemistry*, 107(3), 1217–1224.
- Rutz, J.K., Voss, G.B. & Zambiasi, R.C. (2012). Influence of the Degree of Maturation on the Bioactive Compounds in Blackberry (*Rubus* spp.) cv. Tupy. *Food and Nutrition Sciences*, 3, 1453-1460.
- Sadowska, K., Andrzejewska, J. & Klóska, Ł. (2017). Influence of freezing, lyophilisation and air-drying on the total monomeric anthocyanins, vitamin C and antioxidant capacity of selected berries. *International Journal of Food Science & Technology*, 52(5), 1246-1251.
- Saikia, S. & Mahanta, C.L. (2016). *In vitro* physicochemical, phytochemical and functional properties of fiber rich fractions derived from by-products of six fruits. *Journal of Food Science and Technology*, 53(3), 1496-1504.
- Sánchez-Zapata, E., Fuentes-Zaragoza, E., Fernández-López, J., Sendra, E., Sayas, E., Navarro, C. & Pérez-Álvarez, J.A. (2009). Preparation of dietary fiber powder from tiger nut (*Cyperus esculentus*) milk (“Horchata”) byproducts and its physicochemical properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(17), 7719-7725.
- Sancho, A.I., Bartolomé, B., Gómez-Cordovés, C., Williamson, G. & Faulds, C.B. (2001). Release of ferulic acid from cereal residues by barley enzymatic extracts. *Journal of Cereal Science*, 34(2), 173–179.
- Santos, D.T., Cavalcanti, R.N., Rostagno, M.A., Queiroga, C.L., Eberlin, M.N., Meireles, M.A.A. (2013). Extraction of polyphenols and anthocyanins from the Jambul (*Syzygium cumini*) fruit peels. *Food and Public Health*, 3(1), 12-20.
- Saura-Calixto, F. (2011). Dietary fiber as a carrier of dietary antioxidants: an essential physiological function. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 43-49.
- Saura-Calixto, F., Pérez-Jiménez, J., Touriño, S., Serrano, J., Fuguet, E., Torres, J.L. & Goñi, I. (2010). Proanthocyanidin metabolites associated with

dietary fibre from in vitro colonic fermentation and proanthocyanidin metabolites in human plasma. *Molecular Nutrition & Food Research*, 54(7), 939-946.

- Saura-Calixto, F., Serrano, J. & Goñi, I. (2007). Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chemistry*, 101(2), 492-501.
- Saura-Calixto, F.D. & Goñi, I. (2004). The intake of dietary indigestible fraction in the Spanish diet shows the limitations of dietary fibre data for nutritional studies. *European Journal of Clinical Nutrition*, 58(7), 1078.
- Saura-Calixto, F.D., Goñi, I., Martín, C. & Ferrer, R. (2003). Fibra dietética en cerveza: contenido, composición y evaluación nutricional. *Cerveza y Malta*, XI-2, 158: 51-60.
- Saval, S. (2012). Aprovechamiento de residuos agroindustriales: pasado, presente y futuro. *Revista de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería*, 16(2), 14-46.
- Schieber, A., Stintzing, F.C. & Carle, R. (2001). By-products of plant food processing as a source of functional compounds—recent developments. *Trends in Food Science & Technology*, 12(11), 401-413.
- Sellappan, S., Akoh, C.C., & Krewer, G. (2002). Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-grown blueberries and blackberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2432-2438.
- Selma, M.V., Espín, J.C. & Tomás-Barberán, F.A. (2009). Interaction between phenolics and gut microbiota: Role in human health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 6485–6501.
- Sendra, E., Kuri, V., Fernández-López, J., Sayas-Barberá, E., Navarro, C. & Pérez- Alvarez, J.A. (2010). Viscoelastic properties of orange fiber enriched yogurt as a function of fiber dose, size and thermal treatment. *LWT – Food Science and Technology*, 43(4), 708–714.
- Sengül, M., Erkaya, T., Sengül, M. & Yildiz, H. (2012). The effect of adding sour cherry pulp into yoghurt on the physicochemical properties, phenolic content and antioxidant activity during storage. *International Journal of Dairy Technology*, 65(3), 429-436.

- SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2016. En línea: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/166535/zarzamora_monograf_a.pdf, fecha de acceso: 8 de junio de 2019.
- SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2018a. Atlas agroalimentario 2012-2018. En línea: www.gob.mx/siap, fecha de acceso: 8 de junio de 2019.
- SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2018b. Intención de siembra y de cosecha. En línea: <https://www.gob.mx/siap/documentos/intencion-de-siembra-y-de-cosecha>, fecha de acceso: 8 de junio de 2019.
- Siriwoharn, T., Wrolstad, R.E. & Durst, R.W. (2005). Identification of ellagic acid in blackberry juice sediment. *Journal of Food Science*, 70(3), C189-C197.
- Solyom, K., Solá, R., Cocero, M.J. & Mato, R.B. (2014). Thermal degradation of grape marc polyphenols. *Food Chemistry*, 159, 361-366.
- Someya, S., Yoshiki, Y. & Okubo, K. (2002). Antioxidant compounds from bananas (*Musa Cavendish*). *Food Chemistry*, 79(3), 351-354.
- Sonnenburg, E.D. & Sonnenburg, J.L. (2014). Starving our microbial self: the deleterious consequences of a diet deficient in microbiota-accessible carbohydrates. *Cell metabolism*, 20(5), 779-786.
- Stalikas, C.D. (2007). Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*, 30, 3268–3295.
- Stinco, C.M., Fernández-Vázquez, R., Escudero-Gilete, M.L., Heredia, F.J., Meléndez-Martínez, A.J. & Vicario, I.M. (2012). Effect of orange juice's processing on the color, particle size, and bioaccessibility of carotenoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(6), 1447-1455.
- Stintzing, F.C., Herbach, K.M., Mosshammer, M.R., Carle, R., Yi, W., Sellapan, S., Akoh, C.C., Bunch, R. & Felker, P. (2005). Color, betalain pattern, and antioxidant properties of cactus pear (*Opuntia* spp.) clones. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(2), 442-451.

- Strik, B.C. (2007). Berry crops: worldwide area and production systems. En: Berry fruit: value-added products for health promotion. USA. 1st ed.; Zhao, Y., Ed.; CRC: Boca Raton, FL., capítulo 1, pp. 3-50.
- Struck, S., Plaza, M., Turner, C. & Rohm, H. (2016). Berry pomace—a review of processing and chemical analysis of its polyphenols. *International Journal of Food Science & Technology*, 51(6), 1305-1318.
- Sumere, B.R., de Souza, M.C., Dos Santos, M.P., Bezerra, R.M.N., Da Cunha, D.T., Martinez, J., & Rostagno, M.A. (2018). Combining pressurized liquids with ultrasound to improve the extraction of phenolic compounds from pomegranate peel (*Punica granatum* L.). *Ultrasonics Sonochemistry*, 48, 151-162.
- Sun-Waterhouse, D., Chen, J., Chuah, C., Wibisono, R., Melton, L.D., Laing, W. & Skinner, M.A. (2009). Kiwifruit-based polyphenols and related antioxidants for functional foods: kiwifruit extract-enhanced gluten-free bread. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 60(7), 251-264.
- Taga, M.S., Miller, E.E. & Pratt, D.E. (1984). Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 61(5), 928-931.
- Tagliazucchi, D., Verzelloni, E., Bertolini, D. & Conte, A. (2010). *In vitro* bioaccessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. *Food Chemistry*, 120, 599-606.
- Thebaudin, J.Y., Lefebvre, A.C., Harrington, M. & Bourgeois, C.M. (1997). Dietary fibres: Nutritional and technological interest. *Trends in Food Science & Technology*, 8(2), 41–48.
- Tomas, M., Toydemir, G., Boyacioglu, D., Hall, R., Beekwilder, J. & Capanoglu, E. (2015). The effects of juice processing on black mulberry antioxidants. *Food chemistry*, 186, 277-284.
- Topping, D.L., Fukushima, M. & Bird, A.R. (2003). Resistant starch as a prebiotic and synbiotic: state of the art. *Proceedings of the Nutrition Society*, 62, 171-176.

- Trinidad, P., Wolever, T. & Thompson, L. (1996). Availability of calcium for unavailable carbohydrates: An in vitro assessment. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 47, 83–88.
- Tsai, C.L., Chiu, Y.M., Ho, T.Y., Hsieh, C.T., Shieh, D.C., Lee, Y.J., Tsay, G.J. & Wu, Y.Y. (2018). Gallic acid induces apoptosis in human gastric adenocarcinoma cells. *Anticancer research*, 38(4), 2057-2067.
- Tseng, A. & Zhao, Y. (2013). Wine grape pomace as antioxidant dietary fibre for enhancing nutritional value and improving storability of yogurt and salad dressing. *Food Chemistry*, 138, 356-365.
- USDA. National Nutrient Data Base. En línea: <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/09042?fgcd=&manu=&format=&count=&max=25&offset=&sort=default&order=asc&qlookup=blackberry&ds=SR&qt=&qp=&qq=&qn=&q=&ing=>, fecha de acceso: 8 noviembre 2018.
- Vacaro, S.A., Lopes, V.R., Perin, G.E. & Da Silva V.M.R. (2018). Biochemical characterization of blackberry fruit (*Rubus* sp) and jellies. *Australian Journal of Crop Science*, 12(4), 624-630.
- Valencia, F.E. & Román, M.O. (2006). Caracterización fisicoquímica y funcional de tres concentrados comerciales de fibra dietaria. *Vitae*, 13(2), 54-60.
- Van de Velde, F., Grace, M.H., Esposito, D., Pirovani, M.É. & Lila, M.A. (2016). Quantitative comparison of phytochemical profile, antioxidant, and anti-inflammatory properties of blackberry fruits adapted to Argentina. *Journal of Food Composition and Analysis*, 47, 82-91.
- Van de Velde, F., Pirovani, M.E., & Drago, S.R. (2018). Bioaccessibility analysis of anthocyanins and ellagitannins from blackberry at simulated gastrointestinal and colonic levels. *Journal of Food Composition and Analysis*, 72, 22-31.
- Van Hoed, V., De Clercq, N., Echim, C., Andjelkovic, M., Leber, E., Dewettinck, K. & Verhé, R. (2009). Berry seeds: a source of specialty oils with high content of bioactives and nutritional value. *Journal of Food Lipids*, 16, 33-49.
- Vanhoutvin, S.A., Troost, F.J., Kilkens, T.O., Lindsey, P.J., Hamer, H.M., Jonkers, D.M., Venema, K., Brummer, R.J. (2009). The effects of butyrate

enemas on visceral perception in healthy volunteers. *Neurogastroenterology & Motility*, 21(9), 952-976.

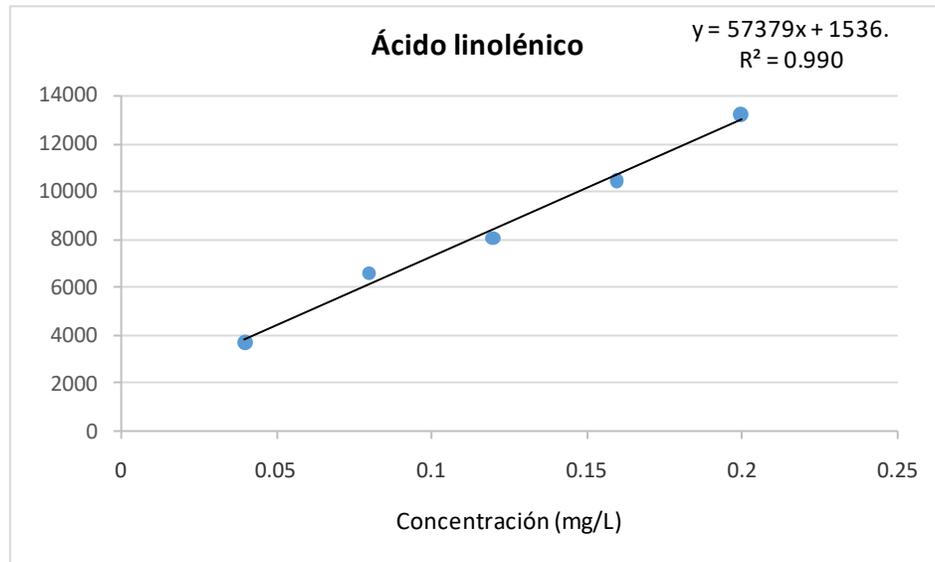
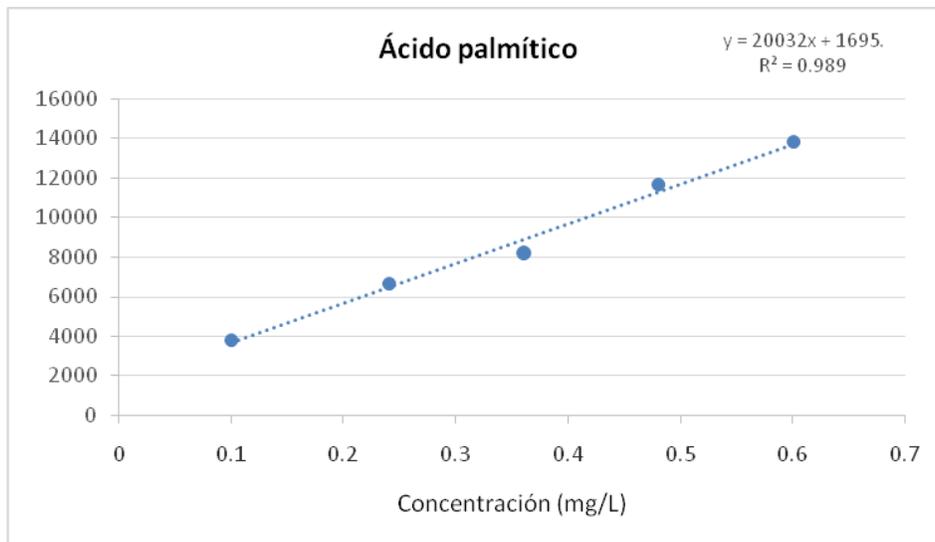
- Vargas, F., Romecín, P., García-Guillén, A.I., Wangensteen, R., Vargas-Tendero, P., Paredes, M.D., Atucha, N.M., & García-Estañ, J. (2018). Flavonoids in kidney health and disease. *Frontiers in Physiology*, 9, (394), 1-12.
- Vatai, T., Škerget, M., & Knez, Ž. (2009). Extraction of phenolic compounds from elderberry and different grape marc varieties using organic solvents and/or supercritical carbon dioxide. *Journal of Food Engineering*, 90(2), 246–254.
- Velderrain-Rodríguez, G.R., Palafox-Carlos, H., Wall-Medrano, A., Ayala-Zavala, J.F., Chen, C.Y.O., Robles-Sanchez, M., Astiazaran-García, Alvarez-Parrilla, E. & González-Aguilar, G.A. (2014). Phenolic compounds: Their journey after intake. *Food & function*, 5(2), 189–197.
- Viganó, J. & Martínez, J. (2015). Trends for the application of passion fruit industrial by-products: A review on the chemical composition and extraction techniques of phytochemicals. *Food and Public Health*, 5(5), 164-173.
- Walter, R.H., Rao, M.A., Sherman, R.M. & Cooley, H.J. (1985). Edible fibers from apple pomace. *Journal of Food Science*, 50(3), 747-749.
- Wang, M., Wichienchot, S., He, X., Fu, X., Huang, Q., Zhang, B. (2019). *In vitro* colonic fermentation of dietary fibers: Fermentation rate, short-chain fatty acid production and changes in microbiota, *Trends in Food Science & Technology*, 88, 1-9.
- Wang, W. & Xu, S., (2007). Degradation kinetics of anthocyanins in blackberry juice and concentrate. *Journal of Food Engineering* 82, 271–275.
- Wang, Y., Ying, L., Sun, D., Zhang, S., Zhu, Y. & Xu, P. (2011). Supercritical carbon dioxide extraction of bioactive compounds from *Ampelopsis grossedentata* stems: process optimization and antioxidant activity. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(10), 6856-6870.
- Wijngaard, H. Hossain, M.B. Rai, D.K. & Brunton, N. (2012). Techniques to extract bioactive compounds from food by-products of plant origin. *Food Research International*, 46(2), 505-513.

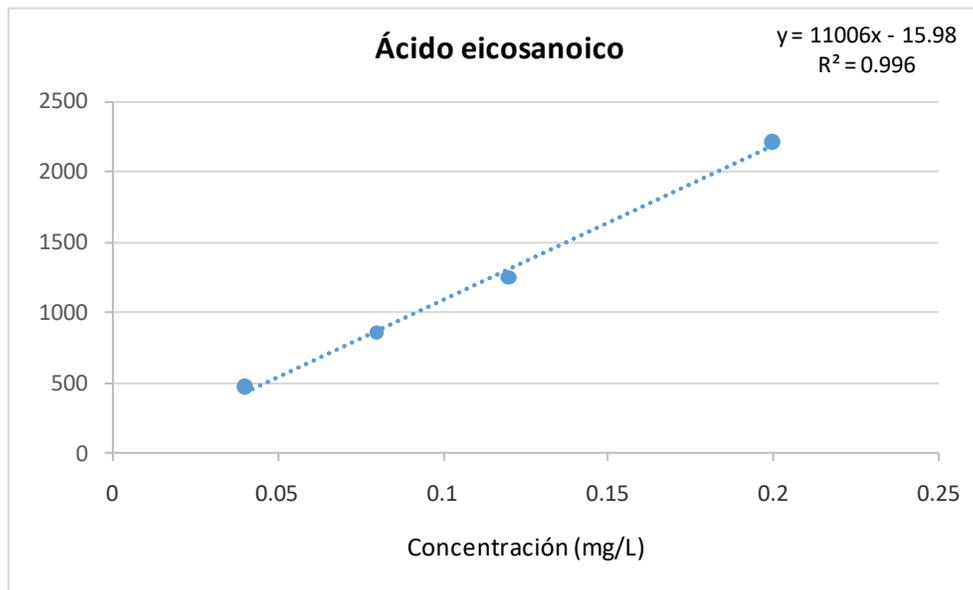
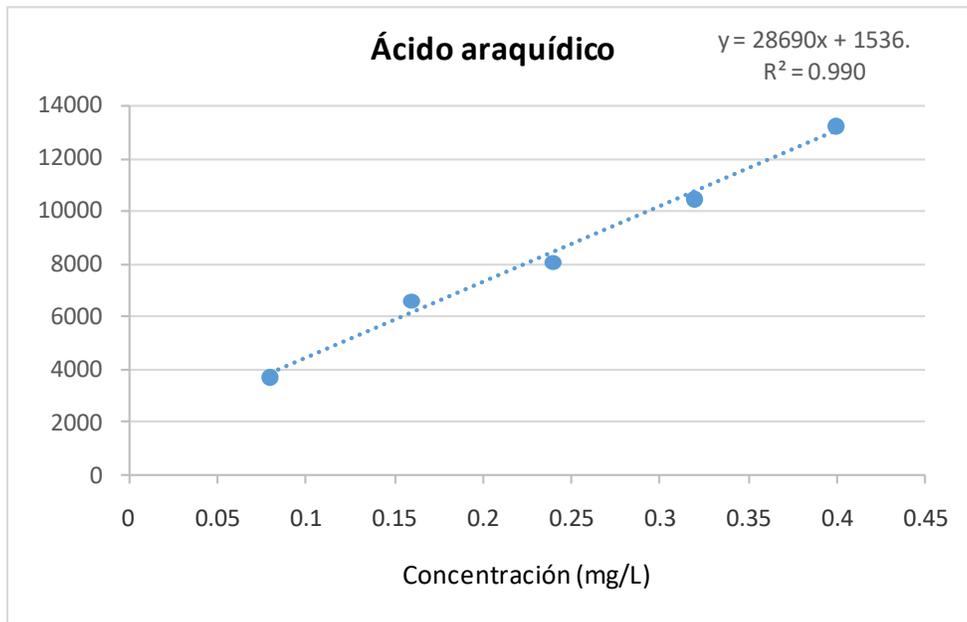
- Wolever, T.M., Spadafora, P. & Eshuis, H. (1991). Interaction between colonic acetate and propionate in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 53(3), 681-687.
- Wolfe, K.L. & Liu, R.H. (2003). Apple peels as a value-added food ingredient. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(6), 1676-1683.
- Wong, D.W.S. (2006). Feruloyl esterase: A key enzyme in biomass degradation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 133, 87–112.
- Wood, R.J. (2005). Bioavailability: definition, general aspects and fortificants. En: Caballero, B., Prentice, A., Allen, L., editors. *Encyclopedia of human nutrition*. 2nd ed. Oxford: Elsevier Ltd.
- Wrolstad, R.E. (2004). Anthocyanin pigments—Bioactivity and coloring properties. *Journal of Food Science*, 69(5), C419-C425.
- Wrolstad, R.E., Durst, R.W. & Lee, J. (2005). Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. *Trends in Food Science & Technology*, 16(9), 423-428.
- Wu, X., Wu, Y., He, L., Wu, L., Wang, X., & Liu, Z. (2018). Effects of the intestinal microbial metabolite butyrate on the development of colorectal cancer. *Journal of Cancer*, 9(14), 2510-2517.
- You, L., Zhao, M., Regenstein, J.M., & Ren, J. (2010). Changes in the antioxidant activity of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysates during a simulated gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 120(3), 810-816.
- Younes, H., Coudray, C., Bellanger, J., Demigné, C., Rayssiguier, Y. & Rémésy, C. (2001). Effects of two fermentable carbohydrates (inulin and resistant starch) and their combination on calcium and magnesium balance in rats. *British Journal of Nutrition*, 86(4), 479-485.
- Zafra-Rojas, Q.Y., Cruz-Cansino, N.S., Quintero-Lira, A., Gómez-Aldapa, C.A., Alanís-García, E., Cervantes-Elizarrarás, A., Güemes-Vera, N. & Ramírez-Moreno, E. (2016). Application of ultrasound in a closed system: optimum condition for antioxidants extraction of blackberry (*Rubus fruticosus*) residues. *Molecules*, 21(7), 950-963.

- Zambrano, M., Meléndez, R. & Gallardo, Y. (2001). Propiedades funcionales y metodología para su evaluación en fibra dietética. *Fibra dietética en Iberoamérica: Tecnología y Salud*. Varela, Sao Paulo, 195-209.
- Zhao, G., Nyman, M. & Jönsson, J.A. (2006). Rapid determination of short-chain fatty acids in colonic contents and faeces of humans and rats by acidified water-extraction and direct-injection gas chromatography. *Biomedical Chromatography*, 20(8), 674-682.
- Zielinski, G., DeVries, J.W., Craig, S.A. & Bridges, A.R. (2013). Dietary fiber methods in Codex Alimentarius: Current status and ongoing discussions. *Cereal Foods World*, 58(3), 148-152.
- Zinoviadou, K.G., Galanakis, C.M., Brnčić, M., Grimi, N., Boussetta, N., Mota, M. Saraiva, J., Patras, A., Tiwari, B. & Barba, F.J. (2015). Fruit juice sonication: Implications on food safety and physicochemical and nutritional properties. *Food Research International*, 77(4), 743-752.
- Zúñiga, M. (2005). Caracterización de fibra dietaria en orujo y capacidad antioxidante en vino, hollejo y semilla de uva. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile, Chile.

ANEXOS

Anexo 1. Curvas de calibración del perfil de ácidos grasos





Anexo 2. Preparación del medio anaerobio (fermentación colónica *in vitro*)

Medio anaerobio (por 1000 mL de agua desionizada)

2.5 g de tripticaseína (DIBICO, México)

125 µL de solución micromineral

250 mL de solución buffer

250 mL de solución macromineral

1.25 mL de solución de resazurina 0.1% (p/v) (Sigma-Aldrich, USA)

● **Solución micromineral** (por 5 mL de agua desionizada)

660 mg de cloruro de calcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Sigma-Aldrich, USA)

500 mg de cloruro de manganeso tetrahidratado ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) (Sigma-Aldrich, USA)

50 mg de cloruro de cobalto hexahidratado ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (Sigma-Aldrich, USA)

400 mg de cloruro férrico hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (Sigma-Aldrich, USA)

● **Solución buffer** (por 250 mL agua desionizada)

1.0 g de bicarbonato de amonio ($(\text{NH}_4) \text{HCO}_3$) (JT Baker, México)

8.75 g de bicarbonato de sodio (NaHCO_3) (JT Baker, México)

● **Solución macromineral** (por 250 mL de agua desionizada)

1.42 g de fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4) (Meyer, México)

1.55 g de fosfato de sodio monobásico (KH_2PO_4) (Meyer, México)

0.15 g de sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (Sigma-Aldrich, USA)

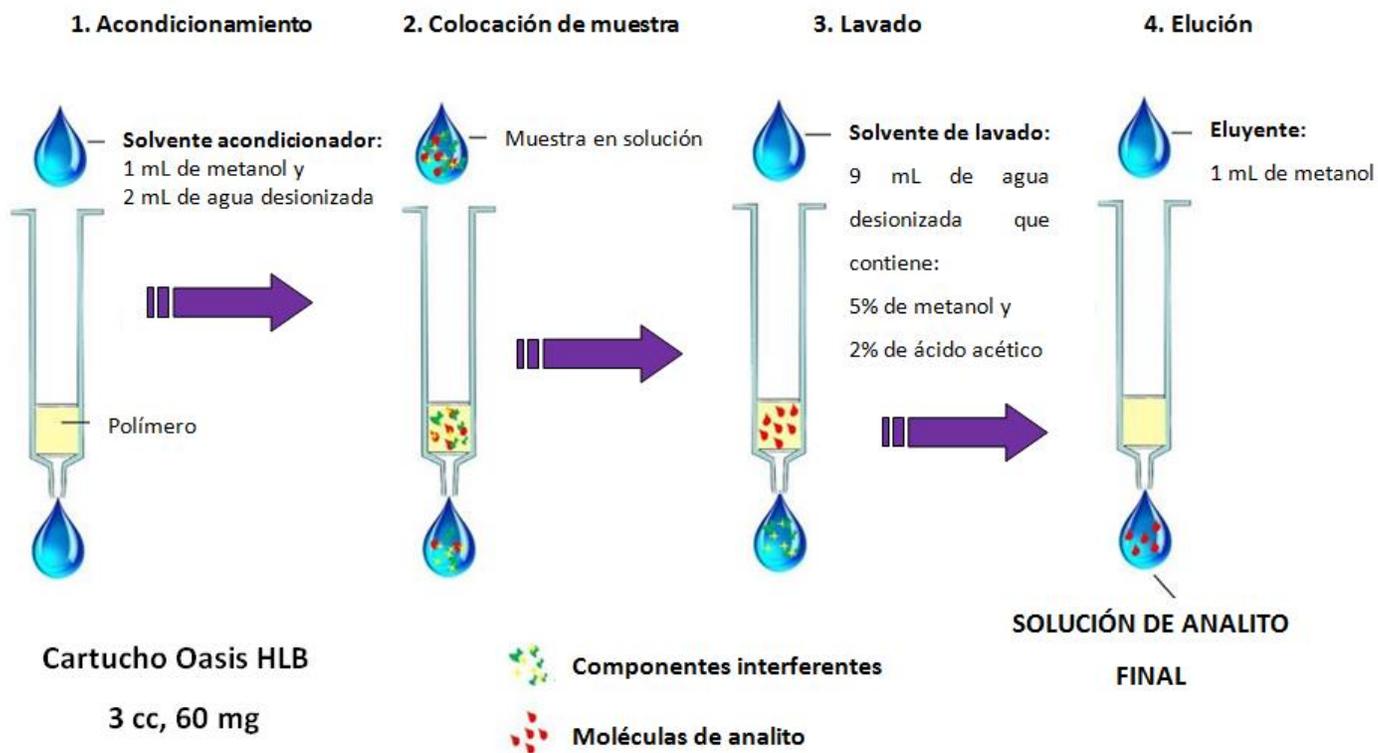
● **Solución reductora** (por 33.5 mL de agua desionizada)

0.20 g de clorhidrato de cisteína (Sigma-Aldrich, USA)

0.20 g de sulfuro de sodio nonahidratado ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) (Sigma-Aldrich, USA)

1.34 mL de hidróxido de sodio (NaOH) 1 M (JT Baker, México)

Anexo 3. Extracción en fase sólida



Research Article

Organic Acids, Antioxidants, and Dietary Fiber of Mexican Blackberry (*Rubus fruticosus*) Residues cv. Tupy

Quinatzin Zafra-Rojas,¹ Nelly Cruz-Cansino ¹,
Alma Delgado-Ramírez,¹ Ernesto Alanís-García,¹
Javier Añorve-Morga ², Aurora Quintero-Lira,³
Araceli Castañeda-Ovando ², and Esther Ramírez-Moreno ¹

¹Centro de Investigación Interdisciplinario, Área Académica de Nutrición, Instituto de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Circuito Actopan-Tilcuautla s/n, Ex Hacienda La Concepción, 42160 San Agustín Tlaxiaca, HGO, Mexico

²Centro de Investigaciones Químicas, Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Centro Universitario, Carretera Pachuca-Tulancingo Km 4.5, 42183 Mineral de la Reforma, HGO, Mexico

³Instituto de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Av. Universidad Km 1, Rancho Universitario, 43600 Tulancingo de Bravo, HGO, Mexico

Correspondence should be addressed to Esther Ramírez-Moreno; esther_ramirez@uaeh.edu.mx

Received 22 November 2017; Revised 2 February 2018; Accepted 20 February 2018; Published 1 April 2018

Academic Editor: Alessandro Attanzio

Copyright © 2018 Quinatzin Zafra-Rojas et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Blackberry fruit processing generates residues comprised of peel, seeds, and pulp that are abundant in flavonoids, colorants, and organic acids. The objective of this study was to determine the organic acids, antioxidants, and dietary fiber content of blackberry residues and compare antioxidants and dietary fiber content of a prune-based commercial product. The ABTS, DPPH, and FRAP methodologies were used for antioxidant capacity. The blackberry residues exhibited a high amount of malic acid (5706.37 mg/100 g db), phenols (4016.43 mg GAE/100 g db), and anthocyanins content (364.53 mg/100 g db) compared with the commercial product. These compounds contributed to the antioxidant capacity (by ABTS) of both products but were 20 times higher in blackberry residues. The fruit residues were able to reduce iron (by FRAP) 4.4 times compared to the prune-based product. Total dietary fiber (44.26%) and functional properties as water retention capacity (2.94 g/g), swelling capacity (5.00 mL/g), and fat absorption capacity (1.98 mL/g) of blackberry residues were significantly higher than those of the commercial sample. The results demonstrated that, due to its antioxidant compounds and functional properties, the blackberry residue can be considered a source of components with potential benefit to human health.

1. Introduction

Berries are mainly consumed fresh but are also used to manufacture products such as juices and concentrates [1]. The residues generated after separation of peels, seeds (4.4% to 12.2%), and pulp are commonly discarded by the industry but still have flavonoids, colorants, pectins, and organic acids [2–4] that can be used or recovered.

Organic acids and sugars are soluble constituents in berries that are responsible for taste and serve as an index of fruit ripeness; both factors affect consumer acceptability [5].

Previous research has reported that different species of whole berries contain organic acids such as citric, malic, tartaric, fumaric, and shikimic acids in total content ranges of 21.5 to 235 mmol/kg, specifically of 45.1 mmol/kg for the *fruticosus* species [6]. Published literature about the content of these individual compounds in blackberry (*Rubus fruticosus*) residues was not found.

Blackberry (*Rubus fruticosus*) fruits also contain phenolic compounds as anthocyanins, flavonols, chlorogenic acid, and procyanidins, which can have beneficial effects on human health [7]. Phenols are considered compounds with potent