



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

**OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DE ANTIOXIDANTES
DE UN RESIDUO DE ZARZAMORA (*Rubus fruticosus*), EMPLEANDO
TERMO-ULTRASONIDO, PARA SU UTILIZACIÓN COMO ADITIVO EN YOGURT**

TESIS DE MAESTRÍA

Para obtener el título de

Maestra en Ciencia de los Alimentos

P R E S E N T A

Zafra Rojas Quinatzin Yadira

Directores:

Dra. Aurora Quintero Lira

Dra. Esther Ramírez Moreno



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
 INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
 COORDINACION DE INVESTIGACION Y POSGRADO DEL ICAP

Actas de la reunión del Comité de Tesis de Maestría en Ciencia de los Alimentos

Apertura:

La reunión ordinaria para evaluar los avances de la tesis intitulada: "Optimización de la extracción de antioxidantes de un residuo de zarzamora (*Rubus fruticosus*), empleando termo-ultrasonido, para su utilización como aditivo en yogurt", que desarrolla el estudiante L.N. Quinatzin Yadira Zafra Rojas.

Asistentes:

- Dra. Aurora Quintero Lira
- Dra. Esther Ramírez Moreno
- Dra. Norma Güemes Vera
- Dra. Nelly del Socorro Cruz Cansino

A. Revisión de Trabajo de Tesis

Observaciones:

El comité revisó con antelación el trabajo de tesis en extenso propuesto por la estudiante, comunicando a la L.N. Quinatzin Yadira Zafra Rojas, oportunamente las correcciones, adiciones y/o modificaciones que debería considerar para mejorar su trabajo y poder continuar con el proceso de obtención de grado. La estudiante atendió de forma conveniente las sugerencias del comité.

B. Acuerdos

En esta fecha, se comunica atentamente que el comité conformado por los profesores firmantes, otorgamos nuestra autorización para que la estudiante imprima su trabajo final de tesis, y continúe con los trámites necesarios para la obtención del grado de maestría respectivo.



Tulancingo de Bravo, Hidalgo a 10 de junio del 2015.

Dra. Aurora Quintero Lira

Dra. Esther Ramírez Moreno

Dra. Norma Güemes Vera

Dra. Nelly del Socorro Cruz Cansino



INDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	5
INDICE DE TABLAS.....	6
INDICE DE FIGURAS	7
INDICE DE ECUACIONES.....	8
RESUMEN	9
ABSTRACT	11
1. Antecedentes	13
1.1. Zarzamora	13
1.2. Producción	14
1.3. Composición nutrimental de la zarzamora	17
1.4. Importancia de los compuestos fenólicos en las plantas.....	18
1.5. Zarzamora como fuente de fenoles.....	20
1.6. Propiedades funcionales de los fenoles	21
1.7. Consumo.....	21
2. Residuos industriales provenientes de frutas	22
3. Compuestos bioactivos provenientes de subproductos agroindustriales	23
4. Métodos de extracción de compuestos antioxidantes	24
4.1. Extracción líquido-líquido.....	25
4.2. Extracción sólido-líquido.....	25
4.3. Otros métodos de extracción	26
4.3.1. Ultrasonido como método de extracción.....	27
4.3.1.1. Efecto del ultrasonido sobre los alimentos	29
5. Optimización y aplicaciones de la metodología de superficie de respuesta	30
6. Antioxidantes como aditivos alimentarios.....	33
7. Yogurt.....	34
7.1. Yogurt como alimento funcional.....	36
8. Justificación.....	37
9. Objetivos	38

9.1. Objetivo general:.....	38
9.1.1. Objetivos específicos:.....	38
10. Hipótesis	39
11. METODOLOGÍA	40
11.1. Muestra.....	40
11.2. Extracción de compuestos antioxidantes del residuo de la zarzamora por diferentes métodos.....	40
11.2.1. Método de extracción por termo-ultrasonido	40
11.2.2. Método de extracción con agua.....	41
11.2.3. Método de extracción con solvente orgánico.....	41
11.3. Determinación de compuestos antioxidantes y actividad antioxidante del extracto	41
11.3.1. Determinación de compuestos fenólicos totales (CFT)	41
11.3.2. Determinación de Antocianinas	41
11.3.3. Actividad antioxidante.....	42
11.3.3.1. Por el método de ABTS.....	42
11.3.3.2. Por el método de DPPH	43
12. Diseño experimental	44
13. Elaboración de Yogurt.....	47
13.1. Adición del extracto de residuo de zarzamora	47
13.2. Análisis en el yogurt.....	47
13.3. Análisis fisicoquímico.....	48
13.3.1. Determinación de humedad.....	48
13.3.2. Determinación de cenizas	48
13.3.3. Determinación de proteína (Método de Kjeldahl)	49
13.3.4. Determinación de grasa por el método Gerber.....	50
13.3.5. Determinación de pH.....	51
13.3.6. Determinación de acidez titulable.....	51
13.4. Determinación de compuestos antioxidantes del yogurt.....	52
13.4.1. Determinación de compuestos fenólicos, antocianinas, ABTS y DPPH	52
13.5. Análisis sensorial del yogurt	52

14. Análisis estadístico.....	54
15. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	55
15.1. Modelización del proceso de extracción a partir del residuo de zarzamora..	55
15.2. Efecto de las variables de proceso sobre los compuestos fenólicos totales y antocianinas.....	57
15.3. Análisis de superficie de respuesta sobre la actividad antioxidante	59
15.4. Optimización del método de extracción y validación del modelo	61
15.5. Comparación de antioxidantes en los extractos	62
15.5.1. Compuestos fenólicos totales.....	63
15.5.2. Antocianinas.....	64
15.5.3. Actividad antioxidante (ABTS)	66
15.5.4. Actividad antioxidante (DPPH)	67
15.6. Evaluación del mejor extracto para adición a un yogurt	69
16. Efecto de la adición de extracto sobre las características del yogurt.....	69
16.1. Análisis fisicoquímico.....	69
16.2. Antioxidantes del yogurt	72
16.3. Análisis sensorial	75
17. Conclusiones	77
REFERENCIAS.....	78

LISTA DE ABREVIATURAS

T-US. Termo-ultrasonido

CFT. Compuestos fenólicos totales

EAG. Equivalentes de ácido gálico

bs. Base seca

p/v. Peso/Volumen

Cy-3-Gl. Cyanidin-3-Glucósido

ABTS. 2,2'-azinobis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6- ácido sulfónico)

DPPH. 1,1-difenil-2-picrilhidrazil

ET. Equivalentes de Trolox

Y-N. Yogurt natural

YN-E. Yogurt natural adicionado con extracto de residuo de zarzamora

Y-C. Yogurt comercial

µl. Microlitros

µmol. Micromol

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Producción de zarzamora en México	16
Tabla 2. Producción agrícola de zarzamora en el estado Hidalgo	16
Tabla 3. Composición química de zarzamora	17
Tabla 4. Composición química del residuo de zarzamora.....	23
Tabla 5. Diseño experimental	46
Tabla 6. Valores promedio de la extracción de CFT, antocianinas y actividad antioxidante en residuo de zarzamora termo-ultrasonicado.....	56
Tabla 7. Coeficientes de regresión y análisis de 2 variables de respuesta	57
Tabla 8. Valores predictivos y experimentales de las respuestas.....	62
Tabla 9. Composición fisicoquímica del yogurt	70
Tabla 10. Actividad antioxidante del yogurt.....	73

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Partes de la zarzamora (polidrupas)	14
Figura 2. Exportación de zarzamora	15
Figura 3. Estructura química básica de los flavonoides	18
Figura 4. Estructura química de algunos flavonoides	19
Figura 5. Reacción colorimétrica del DPPH en presencia de un compuesto con actividad antioxidante	44
Figura 6. Superficie de respuesta para compuestos fenólicos totales. Extracción por termo-ultrasonido.	58
Figura 7. Superficie de respuesta para antocianinas. Extracción por termo-ultrasonido.	58
Figura 8. Superficie de respuesta para actividad antioxidante por el método de abts. Extracción por termo-ultrasonido.	60
Figura 9. Superficie de respuesta para actividad antioxidante por el método de dpph. Extracción por termo-ultrasonido.	60
Figura 10. Superposición de todas las respuestas en la extracción por termo-ultrasonido de compuestos antioxidantes en el residuo de zarzamora.	61
Figura 11. Extracción de compuestos fenólicos totales con solventes y termo-ultrasonido del residuo de zarzamora	64
Figura 12. Extracción de antocianinas del residuo de zarzamora	65
Figura 13. Actividad antioxidante (ABTS)	66
Figura 14. Actividad antioxidante (DPPH)	67
Figura 15. Porcentaje de preferencia de yogurt adicionado con extracto y yogurt comercial.	76

INDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1: Contenido de Antocianinas.....	42
Ecuación 2: Modelo Polinomial de segundo orden	45
Ecuación 3: Porcentaje de humedad	48
Ecuación 4: Porcentaje de cenizas	49
Ecuación 5: Porcentaje de proteína total	50
Ecuación 6: Porcentaje de ácido láctico.....	51

RESUMEN

Debido al alto consumo y la transformación industrial de la parte comestible de la fruta, se generan desechos como la cáscara y semillas, y si existen en grandes cantidades pueden contaminar el ambiente. Por esta razón, se deben buscar recursos y/o el uso de valor añadido para los desechos de frutas. Una alternativa sería recuperar los componentes bioactivos, por ejemplo los compuestos fenólicos para hacer pleno uso de ellos en la industria alimentaria. Por lo que existe una gran demanda en desarrollar métodos de extracción de compuestos bioactivos eficientes para reducir el tiempo de extracción e incrementar el rendimiento y la actividad antioxidante. Las tecnologías emergentes pueden ser una alternativa para la extracción de compuestos. Se ha demostrado que el ultrasonido mejora el proceso de extracción siendo menos drástico por lo que el objetivo fue optimizar la extracción de antioxidantes de un residuo de zarzamora (*Rubus fruticosus*), empleando termo-ultrasonido (T-US) para su utilización como aditivo en yogurt. Se realizó la optimización de la extracción de compuestos fenólicos totales (CFT) y antocianinas del residuo de zarzamora liofilizado empleando la metodología de superficie de respuesta con un diseño central compuesto rotatable. Se utilizó un equipo de ultrasonido (VCX-1500) las variables independientes fueron amplitud (80 a 90%) y tiempo (10-15 min), se controló la temperatura de salida a 25°C. Se midió su actividad antioxidante por ABTS y DPPH. Después de la optimización, a manera de comparación, se obtuvo un extracto acuoso, etanólico y por termo-ultrasonido. Posteriormente, el extracto que obtuvo mayor cantidad de compuestos fenólicos así como su actividad antioxidante fue el que se agregó a un yogurt (YN-E), otra muestra sin extracto fue considerada como yogurt control (Y-N) y por último, un yogurt comercial (Y-C) fue analizado. Se evaluó actividad antioxidante en las muestras de yogurt y se realizó un análisis sensorial. Los resultados mostraron que las variables dependientes se ajustaron al diseño experimental mostrando $R^2 \geq 0.94$. En el análisis de regresión se observó mayor extracción de fenoles siendo influenciada por amplitud (b_{11}) y tiempo (b_{22}), ambos con $p < 0.0001$. Mientras que el tiempo (b_2) causó efecto sobre las antocianinas ($p < 0.0001$). La actividad antioxidante por ABTS

presentó cambios ($p < 0.0001$) con el tiempo (b_{22}) y para DPPH fue la interacción entre las variables. La condición óptima de extracción de los compuestos fenólicos y antocianinas, así como su actividad antioxidante del residuo de zarzamora, fue 90% de amplitud durante 15 min. En cuanto a los resultados obtenidos en la comparación de extractos, los CFT extraídos por T-US duplicó la cantidad (1201.23 mg EAG/100g bs) con respecto al control. Sin embargo, la mayor extracción de antocianinas fue con etanol (593.58 mg Cy-3-Gl/100g bs). El T-US presentó mayor actividad antioxidante por ABTS y DPPH (6318.98 $\mu\text{mol ET}/100\text{g bs}$; 9617.22 $\mu\text{mol ET}/100\text{g bs}$, respectivamente). Por lo tanto, el extracto obtenido por termo-ultrasonido fue el adicionado al yogurt. Dentro de los resultados del yogurt, se mostró que el YN-E presentó mayor cantidad tanto de CFT (109.55 mg EAG/L) y antocianinas (9.52 mg Cy-3-Gl/L), así como de actividad antioxidante por ABTS (330.44 $\mu\text{mol ET}/\text{L}$) y DPPH (68.58 $\mu\text{mol ET}/\text{L}$), respecto a las demás muestras. El extracto obtenido por Termo-ultrasonido demostró tener mayor cantidad de compuestos antioxidantes al igual que el yogurt adicionado con el extracto.

ABSTRACT

Due to the high consumption and industrial transformation of the edible portion of the fruit wastes such as skins and seeds are generated, and if there are large amounts can contaminate the environment. Therefore, look for resources and/or the use of added value for fruit waste. An alternative would recover bioactive compounds, such phenolic compounds for making full use of them in the food industry. So there is a great demand to develop efficient methods of extracting bioactive compounds to reduce the extraction time and increase performance and antioxidant activity. Emerging technologies may be an alternative for the extraction of compounds. It has been shown that ultrasound improves the extraction process being less drastic so the objective was to optimize the extraction of antioxidants from a residue of blackberry (*Rubus fruticosus*) using thermo-ultrasound (T-US) for use as an additive in yogurt. We are optimizing the extraction of total phenolics content (TPC) and anthocyanins blackberry residue lyophilized using the response surface methodology with a rotatable central composite design was performed. Ultrasound equipment (VCX-1500) were the independent variables amplitude (80-90%) and time (10-15 min), the outlet temperature was controlled at 25 °C was used. Their antioxidant activity by ABTS and DPPH was measured. After optimization, by way of comparison, an aqueous, ethanolic and thermo-ultrasonic extract was obtained. Subsequently, the extract obtained as phenolics and antioxidant activity was that a yogurt (YN-E) was added, another sample without extract was regarded as control yogurt (Y-N) and finally a commercial yogurt (Y-C) was analyzed. Antioxidant activity was evaluated in yogurt samples and a sensory analysis. The results showed that the dependent variables were adjusted to the experimental design showing $R^2 \geq 0.94$. In the regression analysis increased extraction of phenols being influenced by amplitude (b_{11}) and time (b_{22}), both with $p < 0.0001$ was observed. The time (b_2) causing effect on anthocyanins ($p < 0.0001$). The antioxidant activity by ABTS showed changes ($p < 0.0001$) over time (b_{22}) and DPPH was the interaction between variables. The optimum condition of extraction of phenolic compounds and anthocyanins and their antioxidant activity blackberry residue was 90% amplitude for 15 min. As for the

results of the comparison of extracts, extracted by T-US doubled the amount of TPC (1201.23 mg GAE/100g bs) respect to control. However, most anthocyanins extraction was with ethanol (593.58mg Cy-3-Gl/100g bs). The T-US presented higher antioxidant activity by ABTS and DPPH (6318.98 μ mol TE/100g bs; 9617.22 μ mol TE/100g bs, respectively). Therefore, the extract obtained by thermo-ultrasound was added to yogurt. Among the results of yogurt, it was shown that YN-E showed higher amount of both TPC (109.55 mg GAE/L) and anthocyanins (9.52 mg Cy-3-Gl/L) as well as antioxidant activity by ABTS (330.44 μ mol TE/L) and DPPH (68.58 μ mol TE/L) compared to the other samples. The extract obtained by thermo-ultrasound demonstrated more antioxidants compounds like yogurt added with the extract.

1. Antecedentes

1.1. Zarzamora

La zarzamora es un arbusto espinoso que alcanza una altura de 150 a 200 cm y una anchura entre 100 y 150 cm; cuando es nuevo el follaje tiende a ser de color verde claro en cual se torna verde oscuro al madurar la hoja, las flores pueden ser blancas o rosadas y el fruto es negro cuando madura. Bajo condiciones templadas, los tallos (llamados también cañas) de la planta de zarzamora inicialmente son herbáceos y de consistencia blanda; al final de su crecimiento se vuelven leñosos, hasta el segundo año florecen y producen frutos alcanzando su plena producción a los 3 años, después la caña completa muere siendo reemplazada por una nueva.

En climas subtropicales y tropicales, después de producir frutos la caña no muere, en el tallo principal ocurren brotes laterales donde se van a producir los nuevos frutos; sin embargo, por sanidad, facilidad de manejo y producción se realiza la poda y/o eliminación de cañas viejas (Pérez y Vázquez, 2004). La planta de este fruto es considerado una especie perennifolia (siempre verde) y la vida productiva es de 15 años o más (Strick, 1996; Pérez y Vázquez, 2004). En general los frutos se deben cosechar casi maduros ya que la calidad de consumo no mejora después de que los frutos son separados de las plantas (Pérez y Vázquez, 2004).

En condiciones naturales, la zarzamora se desarrolla en lugares frescos y fríos; hasta la fecha el cultivo se ha limitado a lugares con inviernos definidos; no obstante, cuando las temperaturas invernales bajan de -17 a -23 °C la mayoría de los cultivares sufren daño (Moore, 1994). Por otro lado, en climas con inviernos más calientes muchos cultivares no crecen bien (Moore, 1994). La zarzamora tiene poca vida de anaquel (2-3 días), y presenta además el fenómeno de la “regresión” (aceleración de su maduración) por lo que pierde valor comercial (SIAP, 2014).

Este fruto está compuesto por gran número de drupas (polidrupas), cada una de ellas desarrolla un pistilo individual y así se obtienen frutas grandes y bien formadas,

(Figura 1). La "baya" o polidrupa pesa de 3 a 12 g dependiendo de la variedad y cada drupa contiene una semilla (Strik, 2007). Este fruto es agrídulce, muy apreciado en todo el mundo para la preparación de jugos, mermeladas, dulces y mosto de frutas. Ésta es una fruta de interés debido a su alto contenido de antocianinas y elagitaninos (ET's), así como otros compuestos fenólicos que contribuyen a su alta capacidad antioxidante (Cho, *et al.*, 2004).

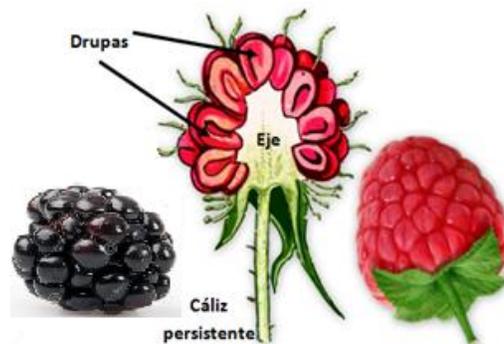


Figura 1. Partes de la zarzamora (polidrupas)

1.2. Producción

La zarzamora es una planta que se localiza en algunos países como Estados Unidos, España, Francia, Turquía, México y Guatemala. En Estados Unidos y Canadá la zarzamora era abundante como planta nativa y los colonizadores la utilizaban como producto de recolección; a pesar de su utilización en diversos platillos y otros fines, a nadie le parecía atractivo practicar su cultivo de manera comercial por las características de la planta (demasiadas espinas) (Strik, *et al.*, 2007).

La producción de fruta fresca comenzó a ser más común para las ventas locales en 1900, ya que es un fruto bastante perecedero (comienza su deterioro de modo sencillo y muy rápido). El desarrollo del híbrido frambuesa/zarzamora "Logan" en la década de 1880 se desempeñó como base para la industria de la conservación en el Pacífico Noroeste. Esta industria se expandió con el desarrollo de la tecnología de congelación (Clark, *et al.*, 2007). Mientras que la industria de la zarzamora fresca se expandió rápidamente en California en la década de 1990, estalló en México en el

2000. La producción de “Brazos” fue la base para el desarrollo en México en los años 90’s, además, en 1990 el cultivar brasileño “Tupy” fue traído a México. Se estimó que la producción de “Tupy” fue de 6,500 a 8,000 ha en el centro de México a partir de 2011 (Finn y Clark, 2011). Sin embargo, otros cultivares que no tienen requerimientos de frío y podrían adaptarse a las condiciones climáticas de los trópicos comerciales de zarzamora y debido a que en nuestro país existe diversidad de climas se produce zarzamora casi todo el año (Pérez y Vázquez, 2004). Por lo tanto, esta producción tiene previsto un suministro confiable de fruta durante los meses de octubre a junio, cuando Estados Unidos y Europa no producen (Finn y Clark, 2011). La producción en los Estados Unidos estuvo a la baja cuando se comparó con la de México, sin embargo, aunque no toda la producción se incluyó para exportación, se puede observar que el incremento fue justo por encima de 4,500 kg en el año 2000 a aproximadamente 54,545 kg en el 2010 (Figura 2). Mientras que el tonelaje de esta fruta fue en forma procesada, es mucho menor que el tonelaje exportado en fresco, con la tremenda expansión de la industria, ahora es una industria de transformación que antes no existía (Finn y Clark, 2011).

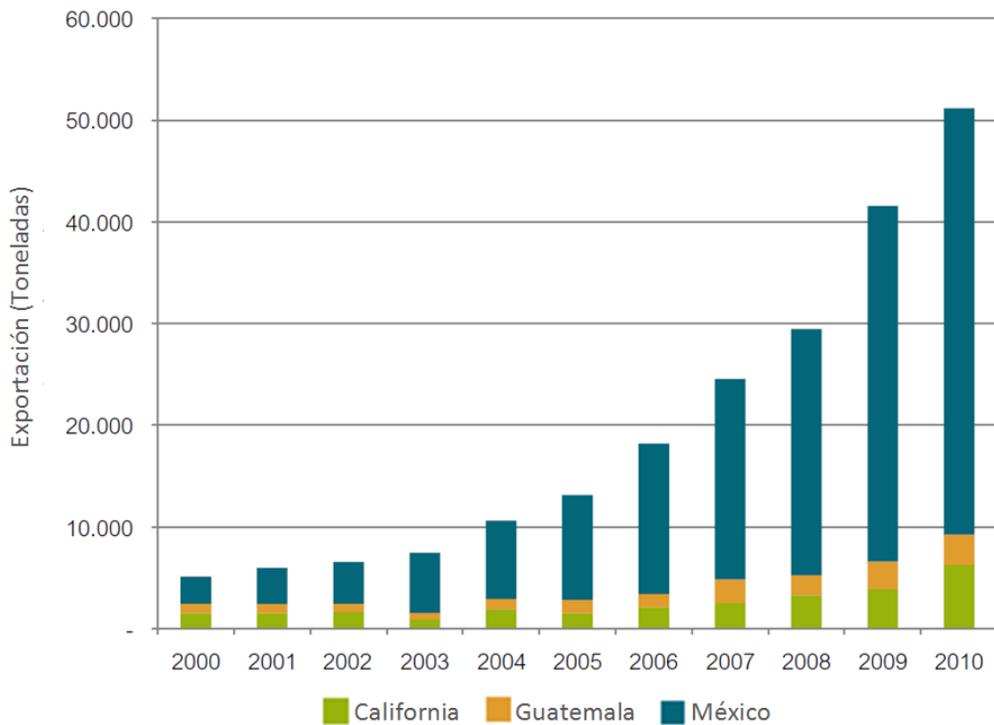


Figura 2. Exportación de zarzamora

La superficie sembrada de zarzamora en México pasó de 7000 hectáreas en 2001 a poco más de 20 000 en 2011, siendo los estados productores: Michoacán, Veracruz, Toluca, Estado de México, Guerrero, Chiapas, Sonora, Chihuahua, Puebla, Hidalgo, Durango, Zacatecas, Jalisco y Colima (SAGARPA, 2012). En la Tabla 1 se muestra la producción y valor de producción de los estados más importantes en el 2012.

Tabla 1. Producción de zarzamora en México (2012)

Estado	Superficie cosechada (ha)	Producción (Ton)	Valor de producción (\$)	Porcentaje (%)
Michoacán	10,941.75	134,708.16	3,801,340.65	96.3
Jalisco	317.75	3,883.60	31,375.70	2.7
Colima	99.00	915.00	32,402.01	0.6
Otros(México, D.F., Nayarit, Hidalgo)	61.00	261.33	3,820.98	0.1
Total	11,419.50	139,768.09	3,868,939.34	100

Fuente: Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP, 2014)

Por otro lado, en Hidalgo, existe la producción por distritos, y estos son conformados por Pachuca, Mixquiahuala, Tulancingo, Huichapan, Huejutla y Zacualtipan. En el 2012, Pachuca y Mixquiahuala tuvieron la mayor superficie cosechada, representando el 29.6% y 19.9%, respectivamente (Tabla 2).

Tabla 2. Producción agrícola de zarzamora en el Estado Hidalgo (2012)

Distrito	Superficie sembrada (ha)	Superficie cosechada (ha)	Superficie siniestrada (ha)	Valor de producción (\$)
Pachuca	136,120.42	131,579.42	4,541.00	1,078,561.65
Mixquiahuala	99,522.85	88,553.85	10,969.00	1,685,630.48
Tulancingo	86,890.50	86,418.00	472.50	899,963.93
Huichapan	55,469.96	54,325.96	1,144.00	717,085.18
Huejutla	48,026.00	48,026.00	0	368,567.68
Zacualtipan	34,722.50	34,281.40	441.10	453,530.46
Total	460,752.23	443,184.63	17,567.60	5,203,339.38

Fuente: Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP, 2014)

1.3. Composición nutrimental de la zarzamora

La composición de la zarzamora puede variar por las condiciones de crecimiento, etapa de madurez, cosecha, almacenamiento y variedad (Talcott, 2007). En la Tabla 3 se muestra su composición química en donde cabe destacar el elevado contenido de fibra y polifenoles, así como de antocianinas. Además de los compuestos fenólicos, las zarzamoras contienen hidratos de carbono, principalmente glucosa, fructosa, y sacarosa; vitaminas como la C (ácido ascórbico) y minerales, entre los que se encuentra el magnesio, fósforo, calcio y potasio (USDA, 2010). Estos compuestos solubles aumentan notablemente a medida que la fruta madura y pasa de color rojo a las etapas maduras siendo púrpura o azul oscuro (Acosta-Montoya, *et al.*, 2010).

Tabla 3. Composición química de zarzamora (100 g peso fresco)

Composición	Cantidad
Agua (g)	88.20 ⁽¹⁾
Proteína (g)	1.39 ⁽¹⁾
Lípidos totales (g)	0.49 ⁽¹⁾
Cenizas (g)	0.37 ⁽¹⁾
Carbohidratos (g)	9.61 ⁽¹⁾
Fibra total (g)	5.30 ⁽¹⁾
Azúcares totales (g)	4.88 ⁽¹⁾
Polifenoles totales (mg)	833.00 ⁽²⁾
Antocianinas totales (mg)	189.50 ⁽²⁾

Fuente: ⁽¹⁾ USDA, 2010; ⁽²⁾ Kaume, *et al.*, 2012

La zarzamora contiene ácido málico como el ácido orgánico primario, aunque se ha detectado en pequeñas cantidades el ácido shikímico, fumárico, y succínico (Fan-Chiang y Wrolstad, 2010). Estos ácidos son importantes para la estabilización de las antocianinas y la extensión de la vida útil de la zarzamora. Los ácidos orgánicos y fenólicos se evalúan para proporcionar un índice de calidad de la fruta, ya que un pH bajo se considera un indicador de mala calidad (Talcott, 2007).

1.4. Importancia de los compuestos fenólicos en las plantas

Las plantas con frecuencia tienen que hacer frente a los cambios de estrés ambiental, como la sequía, la radiación, temperaturas extremas, la salinidad del suelo y la agresión de insectos y otros depredadores. El estrés puede generar algunos radicales libres de oxígeno molecular, y si las plantas no tienen defensa ante tal situación para eliminar estas moléculas, habría daño en las estructuras como las proteínas, pigmentos, lípidos, polisacáridos y el ADN (Klein y Kurilich, 2000).

Las plantas pueden eliminar los radicales libres de dos formas, la primera es involucrando su desglose enzimático, utilizando superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), ascorbato peroxidasa (APX), peroxidasa (POD), la glutatión reductasa (GR) y mono dehidro ascorbato reductasa (MDARI). Este sistema enzimático transforma a los radicales secuestrados y así se desintoxica la planta. La segunda estrategia es que las plantas sintetizan diversos antioxidantes, tales como ácido ascórbico y α -tocoferol (vitamina E), que son capaces de atrapar especies reactivas de oxígeno (ROS) (Atkinson, Nestby, Ford y Dodds, 2005).

Otros son los compuestos fenólicos incluyendo antocianinas y flavonoides que también pueden actuar como antioxidantes (Klein y Kurilich, 2000). Los flavonoides constituyen el grupo de compuestos fenólicos más diversos y ampliamente distribuidos en las plantas. Su esqueleto básico de difenilpropano ($C_6-C_3-C_6$) consta de dos grupos fenilo (A y B) unidos por un puente de tres carbonos que forma un anillo heterocíclico oxigenado (Figura 3) (Shahidi y Naczki, 1995).

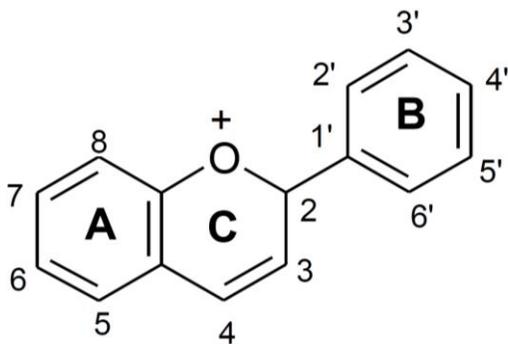


Figura 3. Estructura química básica de los flavonoides (Shahidi y Naczki, 1995).

La presencia o ausencia de un grupo hidroxilo unido a la posición 3 determina la subdivisión en las dos clases principales de flavonoides (García, 2005):

- a) Los 3-hidroxi flavonoides (flavanoles, flavonoles, flavanonoles, flavan-3,4-dioles o leucoantocianidinas, antocianidinas, proantocianidinas o taninos condensados) y,
- b) Los flavonoides no hidroxilados en la posición 3 (flavonas, isoflavonas, flavanovas).

A continuación se presentan las estructuras de algunos flavonoides presentes en los vegetales:

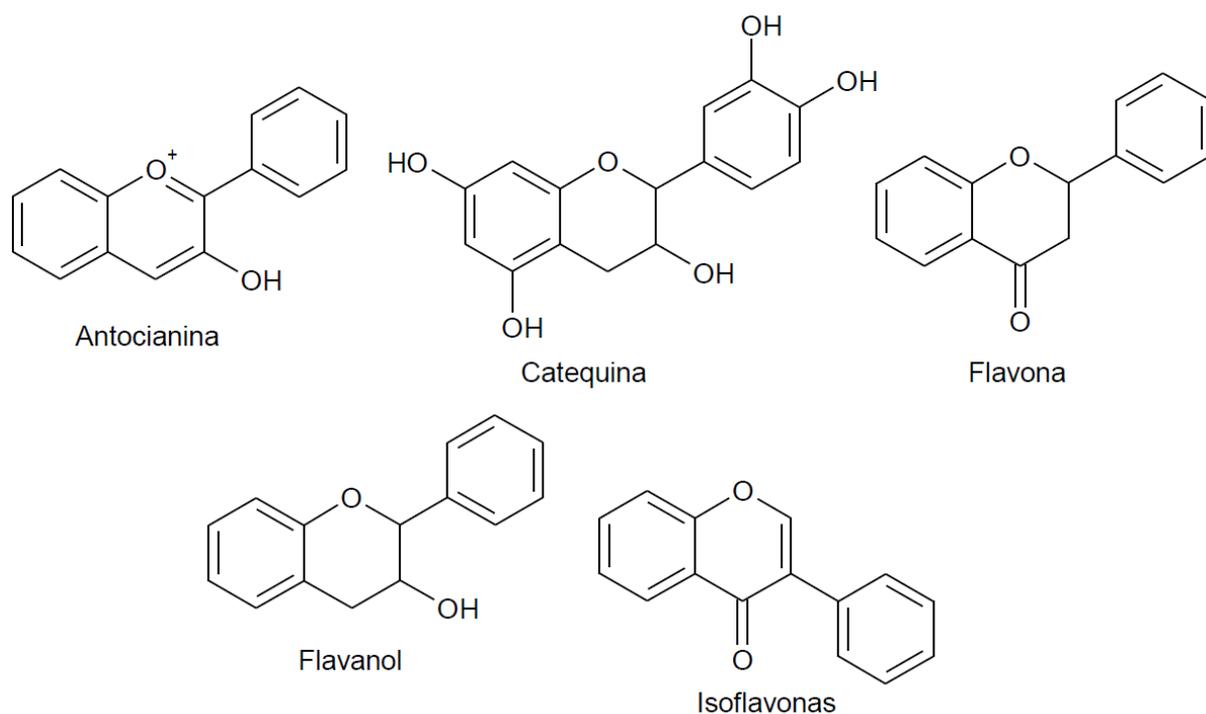


Figura 4. Estructura química de algunos flavonoides (Shahidi y Naczki, 1995).

Las propiedades bioactivas de los fenoles juegan un papel importante en el crecimiento de la planta y la reproducción, proporcionan una protección eficaz frente

a patógenos y depredadores (Popa, *et al.*, 2002; Bravo, 1998) y contribuyen a las características sensoriales y de color de las verduras y frutas (Alasalvar, *et al.*, 2001).

1.5. Zarzamora como fuente de fenoles

Las zarzamoras son una fuente rica en polifenoles, incluyendo antocianinas, ETs (elagitaninos), flavonoles, flavan-3-oles y procianidinas. Estas también contienen niveles apreciables de ácidos fenólicos y bajos niveles de lignina. Los compuestos fenólicos totales en las zarzamoras ha sido demostrado que puede variar desde 114 hasta 1056 mg/100g de peso fresco. Además de la genética, la madurez de la fruta puede influir en los niveles de fenoles totales en la zarzamora (Kaume, *et al.*, 2012).

La palabra antocianina deriva del griego *anthos* (flor) y *kyanos* (azul oscuro) y se encuentran en mayor proporción en este fruto (189.50 mg/100g de peso fresco) (Kaume, *et al.*, 2012). Las antocianinas son las responsables del color azulado de la zarzamora y otras frutas y vegetales. Esta coloración se debe al número y orientación de grupos hidroxilo y metoxilo que forman parte de la molécula. Se producen tonalidades azules con aumentos en la hidroxilación, mientras que cuando hay incrementos en la metoxilación se producen coloraciones rojas. La principal antocianina presente en la zarzamora es la cianidina-3-glucósido (Castañeda-Ovando, *et al.*, 2009). Las antocianinas siempre presentan sustituciones glicosídicas con mono, di o trisacáridos, en las posiciones 3 y/o 5, lo que provoca un incremento en su solubilidad. Algunos sacáridos glicosilantes son la glucosa, galactosa, xilosa, ramnosa, arabinosa, rutinosa, soforosa, sambubiosa y gentobiosa. Pudiera existir otra variación en su estructura por la acilación de los residuos de azúcares de la molécula con ácidos orgánicos alifáticos como: malónico, acético, málico, succínico u oxálico; o aromáticos, tales como: *p*-coumárico, caféico, ferúlico, sinápico, gálico, o *p*-hidroxibenzóico (Garzón, 2008).

Factores como su misma estructura química, pH, concentración, temperatura, presencia de oxígeno, ácido ascórbico, y actividad de agua de la matriz determinan

la estabilidad del pigmento (Garzón, 2008). Existen factores que pueden afectar éste parámetro tales como: el pH de la célula, el efecto de copigmentación determinado por la presencia de otros flavonoides, temperatura, luz, entre otros (Jimenez, *et al.*, 2004).

1.6. Propiedades funcionales de los fenoles

La baja tasa de mortalidad en la población se ha atribuido a las elevadas concentraciones de fitoquímicos, especialmente polifenoles que están presentes en las frutas y verduras en cantidades abundantes con potencial antioxidante, disminuyen el riesgo de obesidad, enfermedades coronarias, enfermedades degenerativas, y varios tipos de cáncer, también tienen efectos antivirales, antiinflamatorios y habilidad para inhibir la agregación de las plaquetas humanas (Bravo 1998; Kaume, *et al.*, 2012).

Los fenoles pueden moderar la peroxidación de los lípidos involucrados en la aterogénesis, trombosis y carcinogénesis. Sus propiedades conocidas incluyen la captura de radicales libres, fuerte actividad antioxidante, inhibición de las enzimas hidrolíticas y oxidativas (fosfolipasa A2, cicloxigenasa, lipoxigenasa) (Siddhuraju y Becker, 2003).

El consumo de dietas controladas, elevadas en frutas y verduras se asocia con mayor expectativa de vida. Estudios epidemiológicos han demostrado una asociación negativa significativa entre la ingesta de frutas y verduras y la mortalidad debido a enfermedades cardíacas (Kähkönen, 1999). Como se mencionó anteriormente, la zarzamora se caracteriza por contener antocianinas, por lo que su consumo es benéfico para la salud humana.

1.7. Consumo

La zarzamora en su mayoría es consumida fresca pero se puede procesar y ser vendida en paquetes individuales congelados, a granel congelado, sin semillas o

puré, liofilizado, jugo o concentrado (Strik, 2007). En la industria, las zarzamoras se utilizan para la producción de suplementos dietéticos, helados, ates, licores, mermeladas y otros productos de confitería, esto es, productos donde el consumidor final, no exige la presentación de frutos enteros y atractivos, sino que solicitan la incorporación del sabor, color, aroma y presencia de la zarzamora (Kafkas, *et al.*, 2006). De todo ello se deriva que durante el procesamiento de esta fruta se obtiene alrededor del 20% de residuos, involucrando piel y semillas principalmente que aun contienen elevadas cantidades de compuestos bioactivos (Ignat, Volf y Popa, 2011).

2. Residuos industriales provenientes de frutas

Debido al alto consumo y la transformación industrial de la parte comestible de la fruta, desechos de fruta, cáscara de fruta, residuos de piña, bagazo de caña de azúcar y otros residuos de frutas (principalmente las cáscaras y semillas) se generan en grandes cantidades en las grandes ciudades. El residuo de la fruta se ha convertido en una de las principales fuentes de residuos sólidos municipales (RSM), que han sido un problema ambiental cada vez más difícil, problemático, etc. (Deng, *et al.*, 2012).

Existen dos técnicas principalmente para los RSM y son para los vertederos y la incineración. Sin embargo, el inapropiado trabajo de los vertederos da lugar a exposición de metano y dióxido de carbono (Qdais, *et al.*, 2010) y la incineración implica la formación posterior y las emisiones de contaminantes y residuos secundarios, como las dioxinas, furanos y gases ácidos (Buekens y Huang, 1998), lo que plantea graves riesgos ambientales y de salud. Por esta razón, se deben buscar recursos y/o el uso de valor añadido para los desechos de frutas. Su uso es barato y muy disponible ya que los residuos que provienen de la industria agroalimentaria son altamente rentables y minimiza el impacto ambiental. Una alternativa sería recuperar los componentes bioactivos, por ejemplo los compuestos fenólicos para hacer pleno uso de ellos principalmente en la industria alimentaria, (Makris, *et al.*, 2007). Por lo

tanto, la utilización de los desechos de fruta como fuente de compuestos bioactivos puede ser considerado como beneficio económico.

En la Tabla 4 se muestra el contenido de nutrimentos del residuo en la fruta de zarzamora (Fang, *et al.*, 2011). Este residuo pudiera tener una aplicación como un ingrediente de alimentos funcionales, ya que es buena fuente de fibra (30%) y la mayoría de los compuestos bioactivos (polifenoles y antocianinas) permanecieron en el subproducto.

Tabla 4. Composición química del residuo de zarzamora

Componente	Porcentaje (%)
Proteína cruda	14.00
Grasa cruda	10.78
Fibra cruda	30.74
Cenizas	1.88
Carbohidratos	3.02
Polifenoles	4.54
Antocianinas	0.14

Fuente: Fang, *et al.*, (2011)

3. Compuestos bioactivos provenientes de subproductos agroindustriales

En el procesamiento de alimentos de origen vegetal se obtienen subproductos que son fuentes de compuestos bioactivos, incluyendo compuestos fenólicos (Schieber, *et al.*, 2001). Se ha encontrado que las cáscaras y semillas de varias frutas contienen mayores cantidades de compuestos fenólicos que las partes carnosas comestibles. En la cáscara de manzana se encontraron valores de 3300 mg/100g en base seca de compuestos fenólicos (Wolfe y Liu, 2003), mientras que la pulpa de manzana liofilizada contiene aproximadamente 116 mg/100g de compuestos fenólicos (Schieber, *et al.*, 2003). En la cáscara del mango se encontró mayor cantidad de polifenoles comparado con las semillas, se reportó 23 y 7 mg de equivalentes de ácido gálico por gramo (EAG/g), respectivamente.

Otro fruto importante es el arándano azul, se estudió la fracción liposoluble e hidrosoluble de la piel y se encontró alrededor de 6 y 3 mg EAG/g, respectivamente, con un total de 9 mg EAG/g (Deng, *et al.*, 2012). Además, la industria de los cítricos produce grandes cantidades de residuos que pueden ser de hasta el 50% del peso total de la fruta (Bocco, *et al.*, 1998). De acuerdo al estudio realizado por Fang, *et al.*, (2011), se obtuvo que el contenido de polifenoles y antocianinas del residuo de zarzamora fue de 4.54% y 0.14% (Tabla 4). Por lo tanto, se dice que los compuestos antioxidantes también se encuentran en los residuos de frutas, incluso en algunos casos en mayor proporción que en la parte comestible.

4. Métodos de extracción de compuestos antioxidantes

Existe una gran demanda en desarrollar métodos de extracción de compuestos bioactivos eficientes para reducir el tiempo de extracción e incrementar el rendimiento y la actividad antioxidante. La extracción es un paso muy importante en el aislamiento, identificación y el uso de compuestos fenólicos y no hay un único y método de extracción estándar.

La extracción por solventes (Baydar, *et al.*, 2004; Bucic-kójico, *et al.*, 2007) y la extracción con fluido supercrítico (Bleve, *et al.*, 2008) son las técnicas más comunes usadas para el aislamiento de compuestos fenólicos. Un gran número de artículos en la literatura se centra en la extracción y el análisis de los polifenoles a partir de materiales derivados de plantas, incluyendo frutas, verduras, vinos, café, té, hierbas, cereales y leguminosas como los frijoles (Balasundram, *et al.*, 2006; Luthria y Pastor-Corrales, 2006; Naczki y Shahidi, 2006).

Los compuestos fenólicos se han extraído por trituración, secado o liofilización de frutas, verduras y hierbas o sólo por remojo de plantas frescas con posterior extracción por solvente (Merken y Beecher, 2000). Estas metodologías pueden extraer también compuestos o agregados como azúcares, ácidos orgánicos y proteínas, por lo que se requiere de procesos de purificación posteriores (por ejemplo

extracción en fase sólida, SPE) (Castañeda-Ovando, *et al.*, 2009). La utilización de solventes para la extracción de la biomasa puede ser ya sea una extracción líquido-líquido o extracción sólido-líquido (Ignat, *et al.*, 2011).

4.1. Extracción líquido-líquido

La extracción líquido-líquido es una operación de transferencia de masa en la que una solución líquida (la alimentación) que contiene inicialmente uno o más solutos es bien mezclado con un líquido inmiscible o casi inmiscible (disolvente). La exposición con solventes tienen afinidad preferencial o selectividad hacia uno o más de los componentes en la alimentación y tienen diferentes densidades. Dos corrientes son el resultado de este contacto: el extracto, que es la solución rica que contiene el soluto extraído deseado, y el refinado, la solución de alimentación residual que contiene poco soluto (Müller, *et al.*, 2008). La extracción es una herramienta muy útil si se elige un disolvente adecuado para dicha extracción. La extracción líquido-líquido es utilizada cuando se requiere la separación de fenoles de subproductos resultantes de la industria de bebidas (Ignat, *et al.*, 2011).

4.2. Extracción sólido-líquido

La extracción sólido-líquido, o lixiviación se pueden definir como un fenómeno de transporte de masa en el que los sólidos presentes en una matriz sólida migran en un disolvente puesto en contacto con la matriz. Los fenómenos de transporte de masa se pueden mejorar mediante cambios en los gradientes de concentración, coeficientes de difusión o de la capa límite (Corrales, *et al.*, 2009).

Se utilizan operaciones unitarias para recuperar muchos componentes de los alimentos (sacarosa en la caña, lípidos en semillas oleaginosas, proteínas en las semillas oleaginosas, fitoquímicos de las plantas y compuestos polifenólicos de plantas, frutas, verduras, etc.) (Ignat, *et al.*, 2011).

Varios factores afectan la concentración de los componentes deseados en el extracto: temperatura, relación líquido-sólido, la tasa de flujo y tamaño de las partículas (Ignat, *et al.*, 2011).

Los métodos de extracción más comunes con disolventes son los que utilizan metanol o etanol acidificado como extractantes (Amr y Al-Tamimi, 2007). De estos métodos, la extracción con metanol es el más eficiente (Kapasakalidis, Rastall, y Gordon, 2006).

Se ha encontrado que en extracciones de antocianinas de pulpa de uva, la extracción con metanol es 20% más eficaz que la con etanol, y el 73% más eficaz que la extracción de agua (Castañeda- Ovando, *et al.*, 2009), sin embargo, en la industria de los alimentos el etanol se prefiere debido a la toxicidad del metanol (Ignat, *et al.*, 2011).

Por lo general, el procedimiento de extracción es secuencial y sistemático, libera a los compuestos fenólicos de sus respectivas formas. Cuando se habla de los ácidos fenólicos (ácidos libres o unidos), el primer paso del procedimiento implica típicamente el uso de un solvente acuoso orgánico para extraer los ácidos fenólicos solubles/extraíbles (libres, ésteres solubles, y glucósidos solubles) (Russell, *et al.*, 2008). En segundo lugar, estos ácidos también forman complejos que son insolubles, los cuales están acoplados a polímeros de la pared celular a través de enlaces glicosídicos y éster y no son extraíbles por disolventes orgánicos, sino por hidrólisis básica, hidrólisis ácida o ambos (Mattila y Kumpulainen, 2002).

4.3. Otros métodos de extracción

La extracción con métodos convencionales como calentamiento, ebullición, o reflujo puede ser utilizado para extraer compuestos fenólicos, sin embargo, las desventajas son la pérdida de polifenoles debido a la ionización, la hidrólisis y la oxidación

durante la extracción, así como el tiempo de extracción largo (Hui, Bo, y Shouzhuo, 2005).

En los últimos años, diversas técnicas de extracción nuevas han sido desarrolladas para la extracción de nutraceuticos a partir de plantas, incluyendo la extracción asistida por ultrasonido, la extracción asistida por microondas, extracción con fluidos supercríticos y la extracción de alta presión hidrostática (HHP) (Wang y Weller, 2006). Entre ellas, la extracción asistida por ultrasonido es una alternativa barata, simple y eficiente a las técnicas de extracción convencionales (Jing, *et al.*, 2008). Este método describe un procedimiento para la extracción de compuestos orgánicos volátiles y semivolátiles de sólidos, tales como suelos, lodos y desechos.

El proceso ultrasónico garantiza un contacto íntimo de la matriz de la muestra con la extracción del disolvente. El ultrasonido se utiliza a menudo para mejorar la extracción de lípidos, proteínas y compuestos fenólicos de las plantas (Ignat, *et al.*, 2011).

4.3.1. Ultrasonido como método de extracción

La tecnología del ultrasonido está basada en ondas mecánicas a una frecuencia por encima del umbral de la audición humana (>16 kHz). Estas ondas viajan a través de la masa del material, o en su superficie a una velocidad que es característica de la naturaleza de la onda y del material sobre el que está propagándose (Povey y McClements, 1988; Mason, 1998; Knorr, *et al.*, 2004). Los ultrasonidos pueden dividirse en diferentes rangos de frecuencias. Hasta hace poco, la mayoría de las aplicaciones del ultrasonido en la tecnología de alimentos involucró un análisis no destructivo que se refiere en particular a la evaluación de la calidad; tales aplicaciones utilizan alta frecuencia (100 kHz - 1 MHz) y baja potencia (<1 Wcm⁻²) de ultrasonido.

Los de baja intensidad son los utilizados normalmente como técnicas de análisis para proporcionar información de las propiedades físico-químicas en alimentos, como firmeza, madurez, contenido en azúcares, acidez, etc. (Demirdöven, y Baysal, 2009). Por el contrario, los niveles de potencia usados en aplicaciones de baja frecuencia (16 – 100 kHz) son tan amplios ($10 - 1000 \text{ Wcm}^{-2}$) que se usan para alterar, ya sea física o químicamente, las propiedades de los alimentos (McClements, 1995).

El efecto del ultrasonido en los líquidos está principalmente relacionado al fenómeno de cavitación. El ultrasonido es propagado a través de una serie de ondas de compresión y rarefacción (expansión) inducidas en las moléculas del medio que traspasan (Mason, *et al.*, 2005). A una potencia suficientemente alta, el ciclo de rarefacción puede que exceda las fuerzas de atracción de las moléculas del líquido y las burbujas de la cavitación del gas nucleico existente dentro del fluido. Estas burbujas, distribuidas a lo largo de todo el líquido, crecen durante el periodo de unos pocos ciclos a tamaño crítico hasta que se convierte en inestable y colapsa violentamente (Shukla, 1992; Mason, 1998; Barbosa-Cánovas y Rodríguez, 2002). La implosión de las burbujas de cavitación unida a la acumulación de energía en puntos calientes, generan temperaturas (5000 K) y presiones extremas (1000 atm), las cuales producen, a su vez, una muy alta energía de cizallamiento y turbulencias en la zona de cavitación.

La combinación de estos factores (presión, calor y turbulencia) tiene una variedad de efectos en el sistema de irradiación de ultrasonidos. La energía (en kWh L^{-1}) y la intensidad (en Wcm^{-2}) junto con la viscosidad del medio, tensión superficial, presión de vapor, naturaleza y concentración del gas disuelto, presencia de partículas sólidas, temperatura y presión del tratamiento, determinan la extensión de la cavitación (Patist y Bates, 2008).

4.3.1.1. Efecto del ultrasonido sobre los alimentos

Actualmente, en la búsqueda de tecnologías no contaminantes y consideradas “verdes”, se ha encontrado que la extracción asistida con ultrasonido llena estos requisitos ya que emplea menos solventes y energía (Robles-Ozuna y Ochoa-Martínez, 2012). Los ultrasonidos de alta intensidad son usados como un método alternativo, barato, reproducible, simple y efectivo para mejorar el proceso de extracción de compuestos bioactivos presentes en los alimentos (Soria y Villamiel, 2010).

Los efectos mecánicos involucrados en el ultrasonido pueden acelerar la difusión interna incrementando la transferencia de masa (Jian-Bing, *et al.*, 2006), y permiten una mayor penetración del solvente en la matriz de la muestra (Rostagno, *et al.*, 2003). Si el sustrato está seco, entonces el ultrasonido puede ser usado para facilitar la hinchazón e hidratación y causar una ampliación de los poros de la pared celular (Vinatoru, 2001).

Otros beneficios son la debilidad o rompimiento de las paredes celulares biológicas durante la cavitación inducida ultrasónicamente para facilitar la liberación de los compuestos (Dolatowski, *et al.*, 2007). Además, las condiciones leves de funcionamiento por lo general trabajan en extracción asistida por ultrasonido (EAU) y no muestran cambios significativos en las propiedades estructurales/moleculares así como en la funcionalidad de la mayoría de los compuestos bioactivos, siendo este aspecto de suma importancia en el caso de componentes de los alimentos sensibles al calor (Soria y Villamiel, 2010).

La aplicación de la EAU en el procesamiento de alimentos es extremadamente interesante, ya que permite un aumento tanto en el rendimiento de extracción de compuestos como en la reducción significativa en el tiempo de extracción (Mason, *et al.*, 2005; Dolatowski, *et al.*, 2007). La EAU se puede aplicar para mejorar la extracción acuosa y también en casos en que se pretenda hacer uso de los

disolventes orgánicos y éstos podrían ser reemplazados como disolventes generalmente reconocidos como seguros (GRAS) que no dañan al ambiente (Vilkhu, *et al.*, 2008). Además, se han realizado estudios donde el ultrasonido es utilizado para la liberación de compuestos bioactivos (polifenoles) como en el jugo de uva roja, jugo de limón kasturi, jugo de tuna púrpura y verde (Tiwari, *et al.*, 2010; Bhat, *et al.*, 2011; Zafra-Rojas, *et al.*, 2013; Cansino, *et al.*, 2013).

Los polifenoles tienen muchas aplicaciones industriales, por ejemplo, se puede utilizar en la producción de pinturas, papel, y cosméticos, así como también pueden considerarse colorantes y conservantes naturales para los alimentos. La demanda del consumidor para los alimentos nutritivos, que se procesan mínimamente y, naturalmente, conduce a un interés por las tecnologías no térmicas (Rawson, *et al.*, 2011). Además, el procesamiento con temperatura suave en la EAU también puede dar lugar a una extracción mejorada de bioactivos de los alimentos termolábiles (Soria y Villamiel, 2010). Por lo tanto, la termoultrasonificación (combinación de temperatura y ultrasonido) podría ser una buena alternativa para la extracción de compuestos antioxidantes, ya que se ha informado que tienen un efecto mínimo en la calidad de los jugos de frutas como jugo de naranja (Valero, *et al.*, 2007; Tiwari, *et al.*, 2008) y jitomate (Wu, *et al.*, 2008), por mencionar algunos.

5. Optimización y aplicaciones de la metodología de superficie de respuesta (RSM)

Optimización se refiere a mejorar el rendimiento de un sistema, un proceso o un producto con el fin de obtener el máximo beneficio de ella (Araujo y Brereton, 1996). La optimización de los procedimientos se ha llevado a cabo mediante el uso de estadística de técnicas multivariante, entre las que se encuentra la metodología de superficie de respuesta (RSM, por sus siglas en inglés: Response Surface Methodology). La metodología de superficie de respuesta es una colección de matemáticas y técnicas estadísticas basadas en el ajuste de una ecuación polinómica a los datos experimentales, que deben describir el comportamiento de un

conjunto con el objetivo de hacer previsiones estadísticas de datos. Puede ser bien aplicada cuando una respuesta o un conjunto de respuestas de interés están influenciados por varias variables. El objetivo es simultáneamente optimizar los niveles de estas variables para alcanzar el mejor sistema de rendimiento (Bezerra, *et al.*, 2008).

Antes de aplicar la metodología de RSM, es primero necesario elegir un diseño experimental que definirá qué experimentos debe llevarse a cabo en la región del estudio experimental. Los diseños experimentales para los modelos de primer orden (por ejemplo, diseños factoriales) pueden utilizarse cuando el conjunto de datos no presenta curvatura (Hanrahan y Lu, 2006).

Sin embargo, para aproximar una función de respuesta a los datos experimentales que no pueden ser descritos por funciones lineales, deberán ser utilizados los diseños experimentales para superficies de respuesta de segundo grado, como diseños factoriales de tres niveles de Box-Behnken y central compuesto. Por lo tanto, un punto central en los diseños factoriales puede ser utilizado para la evaluación de curvatura (Bezerra, *et al.*, 2008).

Numerosas variables pueden afectar la respuesta del sistema estudiado, y es prácticamente imposible identificar y controlar las pequeñas contribuciones de cada uno de ellos. Por lo tanto, es necesario seleccionar esas variables con los principales efectos. Deben realizarse diseños para determinar cuál de las variables experimentales y sus interacciones presentan los efectos más significativos (Lundstedt, *et al.*, 1998).

Algunas etapas en la aplicación de RSM como una técnica de optimización son las siguientes: (1) la selección de variables independientes de los principales efectos en el sistema y la delimitación de la región experimental, de acuerdo con el objetivo del estudio; (2) la elección del diseño experimental y llevar a cabo los experimentos de

acuerdo con la matriz experimental seleccionado; (3) el diseño matemático estadístico de los datos experimentales obtenidos mediante el ajuste de una función polinómica; (4) la evaluación del modelo; (5) y la posibilidad de realizar un desplazamiento en dirección a la región óptima (Bezerra, *et al.*, 2008).

La manera más fiable para evaluar la calidad del modelo ajustado es por la aplicación de análisis de varianza (ANOVA). La idea central de ANOVA es comparar la variación debido al tratamiento (cambio en la combinación de niveles variables) con la variación debido a errores aleatorios inherentes a las mediciones de las respuestas generadas. A partir de esta comparación, es posible evaluar la importancia de la regresión que se utiliza para prever respuestas teniendo en cuenta las fuentes de varianza experimental (Bezerra, *et al.*, 2008).

La utilización de esta metodología (RSM) se ha empleado sobre todo en la industria de los alimentos, ya sea para optimizar las condiciones de proceso e incrementar el rendimiento de extracción de compuestos importantes, tales como los compuestos antioxidantes. En un estudio realizado en la mejorana (*Origanum majorana* L.), se utilizó la metodología de superficie de respuesta para optimizar las condiciones de extracción asistida por ultrasonido maximizando la actividad antioxidante, así como el contenido de fenoles totales y el contenido individual de los fenoles del extracto de la planta (Hossain, *et al.*, 2012).

Ghafoor, *et al.*, (2009), realizaron combinaciones en las concentraciones de etanol, temperatura y tiempo de extracción aplicando ultrasonido, con el objetivo de maximizar la extracción de compuestos fenólicos, actividad antioxidante y antocianinas de las semillas de uva (*Vitis vinífera*), por lo cual utilizaron la metodología de superficie de respuesta.

Se han extraído pigmentos de la tuna (*Opuntia ficus-indica*), principalmente betacianinas y betaxantinas, en donde se optimizaron los parámetros de proceso

(temperatura, tiempo de extracción y peso de la fruta) con tres factores (Box & Behnken) a través de superficie de respuesta (Maran y Manikandan, 2012).

6. Antioxidantes como aditivos alimentarios

Cada vez son más los intereses en la aplicación de residuos de procesamiento de frutas como ingredientes de un alimento funcional ya que son rica fuente de fibra dietética, y la mayoría de los compuestos bioactivos beneficiosos se mantienen en los subproductos. Además, los residuos (por ejemplo, cáscaras de frutas) procedentes de la transformación de productos agrícolas podría ofrecer fuentes prácticas y económicas de antioxidantes que podrían reemplazar a los sintéticos (Balasundram, *et al.*, 2006).

Los antioxidantes naturales que provienen de residuos pueden ser utilizados para incrementar la vida útil de los alimentos previniendo la peroxidación lipídica y dando protección por daños oxidativos. El aumento de la estabilidad a la oxidación de aceites vegetales y muchas pruebas antioxidantes se basan en esta capacidad para retardar o inhibir la rancidez del aceite (Moure, *et al.*, 2001).

Los antioxidantes pueden ser utilizados en varios alimentos como en la panificación, productos cárnicos y lácticos por mencionar algunos. En un estudio reportado por Sun-Waterhouse, *et al.*, (2009), se elaboró pan sin gluten y fue adicionado con polifenoles y antioxidantes provenientes de un extracto a partir de la pulpa de kiwi (*Actinidia deliciosa*) verde.

En otro estudio, se evaluaron las características del pan integral enriquecido con α -tocoferol comercial y un extracto de romero, se realizó un perfil sensorial, análisis de compuestos volátiles y se determinó su actividad antioxidante durante el almacenamiento (Jensen, *et al.*, 2011).

Xin-lei y Wu, (2013) extrajeron polifenoles del té y éstos fueron aplicados en la carne de cerdo con la finalidad de conservarla. Se evaluaron bacterias, color e indicadores físicos como el pH.

En el sector lácteo también se han realizado estudios sobre la adición de compuestos antioxidantes como es el caso de un queso madurado bajo en grasa que fue fortificado con catequina, se examinó durante 90 días y se evaluó el contenido fenólico total y las propiedades antioxidantes (Rashidinejad, *et al.*, 2015).

Daniel, *et al.*, (2013) evaluaron las condiciones de secado y el efecto que tuvo sobre la retención de compuestos fenólicos, antocianinas y la actividad antioxidante de la Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.), el extracto obtenido fue añadido a una bebida láctea (yogur).

7. Yogurt

Yogurt, yogur, yoghurt, yoghurth o yogurth, es el producto obtenido de la fermentación de leche, estandarizada o no, por medio de la acción de microorganismos *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus*, y teniendo como resultado la reducción del pH (NOM-181-SCFI-2010), además favorece al consumidor debido a sus efectos de mejorar la microbiota e inmunidad del cuerpo (Michael, *et al.*, 2010).

El yogurt consiste en una red de caseína agregada a través de la precipitación isoeléctrica por las bacterias de ácido-lácticas (Tamime y Robinson, 1999). La leche fermentada con múltiples especies de cultivos iniciadores es el resultado de una estructura de gel más fuerte que ha fermentado con una sola especie de cultivo iniciador (Skriver, Baek-Madsen y Jelle, 1997). Las bacterias Gram-positivo *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* (llamado *Streptococcus*) y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* (llamado *Lactobacillus*) se utilizan comúnmente para metabolizar la lactosa en ácido láctico durante la fermentación (Tamine, 2006).

Los *Streptococcus* aparecen como cadenas de forma esférica, mientras que los *Lactobacillus* están en varillas rectas largas y delgadas, barras cortas pero cocoides o células pleomórficas (Tamime, 2006). Los *Streptococcus* crecen más rápidamente en el inicio de la fermentación, la producción de ácido fórmico y la reducción de oxígeno que estimula el crecimiento de los *Lactobacillus*. Los *Lactobacillus* generan péptidos, estimulando el crecimiento de los *Streptococcus* (Tamime y Robinson, 1999).

Algunos estabilizadores tales como pectinas se utilizan para añadir pequeños glóbulos de grasa en la red de proteínas de la leche disminuyendo la sinéresis, aumentando la viscosidad y fuerza de gelación (Ares, *et al.*, 2007; Teles y Flores, 2007). Las pectinas de alto metoxilo (HM) y bajo metoxilo (LM) tienen diferentes contenidos de metoxilo, que influyen en sus reacciones químicas y comportamiento reológico de los distintos matrices de alimentos, por ejemplo, sensibilidad a los cambios del contenido de sólidos solubles, pH, iones como Ca^{2+} (Imeson, 1997; Phillips y Williams, 2000).

Un gel de yogurt es un tipo de sólido blando con sistemas relativamente dinámicos y vulnerables a reordenamientos dentro de su estructura. Las propiedades físicas del yogurt pueden expresarse cualitativamente mediante las interacciones de caseína haciendo equilibrio entre las fuerzas atractivas, por ejemplo, atracciones hidrofóbicas, entrecruzamientos de caseína aportados por racimos de fosfato de calcio y enlaces covalente disulfuro cruzados entre las caseínas y proteínas del suero desnaturalizadas; y las fuerzas de repulsión como, carga electrostática o de repulsión, principalmente siendo negativos al inicio de la fermentación.

En algunas investigaciones se discuten diversas variables de procesamiento que influyen en las propiedades texturales del yogurt, tales como el contenido total de sólidos, el calor de tratamiento y temperaturas de incubación (Lee y Lucey, 2010).

7.1. Yogurt como alimento funcional

En los últimos años se ha incrementado el interés por parte de la industria alimentaria y el consumidor por el concepto de “alimento funcional”. Así, como consumidores cada vez más interesados en alimentos más saludables y una industria alimentaria que ha comprendido la potencialidad del mercado de los alimentos funcionales, se ha iniciado a nivel mundial una intensa actividad investigadora en el área de estos nuevos alimentos. El término alimento funcional hace referencia a alimentos o ingredientes que mejoran el estado general de salud y/o reducen el riesgo de enfermedad (Rafter, 2002). Se trata de productos alimenticios que deben consumirse dentro de la dieta habitual para conseguir efectos beneficiosos que van más allá de los requerimientos nutricionales tradicionales (Roberfroid, 2002). Bebidas de yogur mejorado con ingredientes de valor añadido tienen mayor aceptación entre los consumidores (Allgeyer, *et. al*, 2010).

El yogurt es el producto lácteo fermentado mayormente conocido y consumido con alto valor nutricional debido a su aportación de probióticos, pero no está considerado como una fuente significativa de polifenoles (Lubbers, *et al.*, 2004). Algunos estudios han reportado que existe buena estabilidad de los compuestos fenólicos a partir de la uva y otro extracto de la planta en el yogurt fortificado (Karaaslan, Ozden, Vardin y Turkoglu, 2011; Wallace y Giusti, 2008). Otros autores elaboraron un yogurt a partir leche de cabra (*Capra hircus*), el cual fue saborizado con una mermelada de tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* Sendtn.) para incrementar su capacidad antioxidante debido a su contenido de polifenoles y otros componentes bioactivos (Alvarado-Carrasco, *et al.*, 2011).

8. Justificación

La gama de residuos industriales provenientes de frutas y verduras es muy amplia, debido a que en la mayoría de los casos cada fruta genera un subproducto diferente y que en numerosas ocasiones, se constituyen en un recurso importante como fuente de alimento para animales.

La producción de residuos que supone la normal actividad frutícola en los procesos de industrialización, hace necesario la implementación de técnicas de aprovechamiento de residuos orgánicos y así mejorar la disposición y manejo de subproductos frutícolas, generando esto ventajas no solo en el ámbito ambiental y social, sino también de tipo económico.

Los residuos de algunos vegetales han sido extraídos mediante solventes pero pudieran resultar tóxicos, por lo tanto, se están buscando técnicas de extracción sin la aplicación de éstos. Una alternativa, son las tecnologías emergentes en donde se puede evitar el uso de solventes y maximizar el rendimiento de extracción, entre ellas se encuentra el termo-ultrasonido, que es una técnica de extracción suave.

Por lo anterior, esta investigación se enfocará en el análisis y uso del extracto del residuo de zarzamora, al cual se le determinará el contenido de compuestos fenólicos totales, capacidad antioxidante y características fisicoquímicas, así como su adición en un producto alimenticio como es el yogurt.

9. Objetivos

9.1. Objetivo general:

Optimizar la extracción de antioxidantes de un residuo de zarzamora (*Rubus fruticosus*), empleando termo-ultrasonido para su utilización como aditivo en yogurt.

9.1.1. Objetivos específicos:

- Utilizar la metodología de superficie de respuesta para determinar las condiciones óptimas de termo-ultrasonido para la extracción de compuestos fenólicos y actividad antioxidante.
- Comparar el contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante del residuo de zarzamora con extracción acuosa, solvente orgánico y por termo-ultrasonido.
- Elaborar un yogurt adicionando el mejor extracto obtenido del residuo de zarzamora.
- Analizar las características fisicoquímicas, actividad antioxidante y evaluación sensorial del yogurt adicionado con el extracto del residuo de zarzamora.

10. Hipótesis

El extracto del residuo de zarzamora obtenido por termo-ultrasonido presenta cantidades elevadas de compuestos fenólicos, el cual favorece a un yogurt como aditivo.

11. METODOLOGÍA

11.1. Muestra

Las zarzamoras (*Rubus fruticosus*) se obtuvieron de forma local en un mercado de Atotonilco, Hidalgo, México, en marzo de 2014, donde el cultivo es común en esta región. Se seleccionaron los frutos sin heridas externas y la zarzamora se licuó con una licuadora industrial (modelo 38BL52 LBC10, Waring Comercial®, USA) para obtener el jugo. Éste se hizo pasar por un colador casero para separarlo del bagazo y las semillas.

Posteriormente, se centrifugó a 10 000 rpm por 30 min a 4°C, se separó el precipitado del jugo y se mezcló con el bagazo antes separado. El residuo (bagazo, semillas y precipitado) fue liofilizado y tamizado a un tamaño de partícula de 500 µm para su posterior análisis.

11.2. Extracción de compuestos antioxidantes del residuo de la zarzamora por diferentes métodos

11.2.1. Método de extracción por termo-ultrasonido

Para este método de extracción se preparó una solución al 4% (p/v) del residuo de zarzamora liofilizado y agua desionizada. Posteriormente se utilizó un procesador de ultrasonido (VCX-1500, Sonics and Materials Inc., Newtown, CT, USA), a 1500 W. se utilizó una frecuencia constante de 20 kHz. La energía de entrada se controló ajustando la amplitud del equipo. Los parámetros de amplitud fueron 80% y 90 % con tiempo de 10 y 15 min, respectivamente. Las duraciones de pulso fueron de 4 segundos encendido y 2 segundos apagado. La temperatura de las muestras fue controlada a 25 ± 1.0 °C (Tiwari, *et al.*, 2009). Por último, la muestra fue centrifugada (BeckmanCoulter, mod. Allegra 25R) a 10 000 rpm por 30 min a temperatura de 4°C. La extracción por termo-ultrasonido (T-US) fue almacenada en congelación a -30 °C hasta su posterior análisis.

11.2.2. Método de extracción con agua

Se llevó a cabo la extracción de antioxidantes en donde la muestra liofilizada (20 g) se extrajo mediante tres lavados (60 min-160 mL, 30 min-80 mL, 30 min-80 mL) con un homogenizador Wisestir®, Wisd, laboratory instruments, HS-50A. Después de cada tiempo, la muestra fue centrifugada a 10000 rpm, por 30 min a 25°C. La extracción se realizó con agua desionizada. Las muestras se realizaron por triplicado y fue almacenada en congelación a -30 °C hasta su posterior análisis (Vulic, *et al.*, 2011).

11.2.3. Método de extracción con solvente orgánico

La extracción con etanol fue bajo las mismas condiciones antes descritas (Vulic, *et al.*, 2011).

11.3. Determinación de compuestos antioxidantes y actividad antioxidante del extracto

11.3.1. Determinación de compuestos fenólicos totales (CFT)

El contenido de fenoles totales se determinó mediante el procedimiento de Folin-Ciocalteu (Stintzing, *et al.*, 2005). Se mezcló 100 µL del extracto de residuo de zarzamora con 500 µL de la solución con el reactivo de Folin-Ciocalteu (1:10) y se añadieron 400 µL de solución de carbonato de sodio al 7.5 % y se mezcló. Se dejó reposar por 30 min. La absorbancia de la mezcla se midió a 765 nm en un lector de microplacas (Power Wave XS UV - Biotek, software de KC Junior, USA). El ácido gálico se utilizó como patrón de referencia y los resultados se expresaron como mg de equivalentes de ácido gálico por 100g en base seca (mg EAG/100g bs). Las muestras se realizaron por triplicado.

11.3.2. Determinación de Antocianinas

La medición de antocianinas se basó en el método espectrofotométrico de pH diferencial, que se basa en la transformación estructural de las antocianinas cromóforas como una función del pH, se puede medir usando espectroscopia óptica con pequeñas modificaciones (Giusti y Wrolstad, 2001). Se tomaron 0.5 mL de

extracto del residuo de zarzamora y se diluyó usando 4.5 mL de solución buffer de cloruro de potasio al 0.025 M, ajustado a pH de 1.0 y otra muestra (0.5 mL de extracto) se diluyó con 4.5 mL de solución de acetato de sodio al 0.4 M, ajustado a pH 4.5 con HCl. Posteriormente, se dejó en la oscuridad durante 15 min a temperatura ambiente (25°C). La absorbancia de cada dilución se midió a 510 nm y 700 nm usando un lector de microplacas (Power Wave XS UV-Biotek, software KC Junior, USA). El agua destilada se usó como blanco. Las muestras se realizaron por triplicado. El contenido de antocianinas fue calculado por la siguiente ecuación.

Ecuación 1: Contenido de antocianinas

$$\text{Contenido de antocianinas (mg/100g)} = (A \cdot PM \cdot FD \cdot 100) / (E \cdot T_p) \quad (1)$$

Donde:

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

PM = Peso molecular de Cianidin-3-Glucósido (449.2 g/mol).

FD = Factor de dilución (1:10).

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

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

El contenido de antocianinas fue expresado como mg de Cianidin-3-Glucósido por 100g en base seca (mg Cy-3-Gl/100g bs).

11.3.3. Actividad antioxidante

11.3.3.1. Por el método de ABTS

El ABTS^{•+} (2,2'-azinobis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6- ácido sulfónico)) es un radical con un nitrógeno central que presenta un color característico azul-verde y se obtiene tras la reacción de ABTS con persulfato de potasio incubados a temperatura

ambiente (25 °C) y en la oscuridad durante 16 h. Este reactivo se mantiene estable por 2 a 3 días si se guarda en la oscuridad. Cuando este catión radical es reducido por un antioxidante a la forma no radical, presenta una pérdida de color (Kuskoski, *et al.*, 2005).

El catión radical (ABTS^{•+}) fue formado por la reacción de ABTS al 7 mmol/L con 2.45 mmol/L de persulfato de potasio bajo condiciones de oscuridad y temperatura ambiente durante 16 h antes de su uso. Para la determinación, se diluyó la solución de ABTS con agua desionizada hasta obtener una absorbancia de 0.70 ± 0.10 a 754 nm.

Posteriormente, se tomaron 20 µL del extracto del residuo de zarzamora y se adicionaron 980 µL de solución de ABTS diluida, se dejó reposar por 7 min, se tomó lectura de absorbancia a 754 nm en un lector de microplacas (Power Wave XS UV-Biotek, software KC Junior, USA). Se utilizó como patrón de referencia Trolox (Carboxílico 6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilcromo). Las muestras se realizaron por triplicado. La actividad antioxidante se expresó como µmol de equivalentes de Trolox por 100g en base seca (µmol ET/100g bs).

11.3.3.2. Por el método de DPPH

La actividad antioxidante en base al radical DPPH[•] (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) se evalúa de acuerdo al procedimiento reportado por Morales y Jiménez-Pérez (2001). El reactivo DPPH[•] es un radical libre estable, que en solución etanólica presenta una coloración violeta fuerte y su máxima absorbancia se obtiene a una longitud de onda de 520 nm. Si se adiciona a este medio una sustancia susceptible de atrapar radicales libres, como lo es el Trolox, el electrón no apareado del DPPH[•] se aparea e inmediatamente se presenta una decoloración de la solución que puede ir hasta amarillo en razón del número de electrones apareados (Figura 5).



Figura 5. Reacción colorimétrica del DPPH en presencia de un compuesto con actividad antioxidante

La actividad antioxidante se midió con el radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) tal como lo describen Morales y Jiménez-Pérez (2001). Se preparó una solución etanólica (7.4 mg/100 mL) del radical estable DPPH. Posteriormente, se colocaron 100 μ L del extracto de residuo de zarzamora en viales y se añadieron 500 μ L de solución de DPPH, la mezcla se dejó reposar 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, se midió la absorbancia a 520 nm utilizando un lector de microplacas (Power Wave XS UV-Biotek, software KC Junior, USA). Las muestras se realizaron por triplicado. Como patrón de referencia se utilizó Trolox y se expresó como μ mol de equivalentes de Trolox por 100 g en base seca (μ mol ET/100g bs).

12. Diseño experimental

Recientemente, la metodología de superficie de respuesta (MSR) se ha estado utilizado cada vez más para optimizar los parámetros de proceso porque esto permite más facilidad de interpretación de experimentos comparados con otros métodos (Box y Behnken, 1960; Gan, *et al.*, 2010). El diseño experimental empleado fue un diseño central compuesto rotatorio por dos variables independientes cada uno en cinco niveles. El orden experimental fue al azar. Los niveles de variables independientes, es decir, el nivel de amplitud (X_1 , %) y tiempo de extracción por termo-ultrasonido (X_2 , min) fueron seleccionados en base a los valores obtenidos en experimentos preliminares y basados en lo reportado por Tiwari, *et al.*, (2009). Los niveles de amplitud (X_1) fueron 80% y 90% y el tiempo de extracción (X_2) entre 10 y 15 min. Los valores codificados de las variables independientes fueron $-\alpha$, -1, 0, +1,

+ α . El diseño arrojó 13 experimentos, de los cuales, 5 fueron puntos centrales, 4 puntos factoriales y 4 puntos axiales (Tabla 5), a una distancia de 1.414 de cada diseño central. El análisis de regresión se realizó sobre los datos de las variables dependientes obtenidos por triplicado como observaciones efectuadas por las condiciones de extracción y el valor medio de cada atributo se tomó como la respuesta Y . Los datos experimentales fueron sometidos a análisis de regresión lineal múltiple utilizando JMP® 5,1 software estadístico (SAS Institute, Cary, NC, USA) y se ajustaron a un modelo polinomial de segundo orden como se muestra en la siguiente ecuación.

Ecuación 2: modelo polinomial de segundo orden

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^2 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^2 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_i \sum_{j=i+1} \beta_{ij} X_i X_j \quad (2)$$

Donde:

Y = respuesta prevista

β_0 = coeficiente constante

β_i = coeficiente lineal

β_{ii} = coeficiente cuadrático

β_{ij} = coeficiente de interacción

X_i y X_j = variables independientes

Y es la variable de prevista o de respuesta, β_0 son los coeficientes constantes de regresión de variables para interceptar el término lineal, cuadrático y la interacción, y X_i y X_j son variables independientes. Los parámetros elegidos de ajuste de la ecuación del modelo polinomial se calcularon usando el mismo software. La significación (p) de los coeficientes de regresión del modelo se evaluó mediante análisis de la varianza. La superficie de respuesta generó curvas en tres dimensiones y se desarrollaron utilizando SigmaPlot 12.0 software de gráficos (SYSTAT Software Inc., San Jose, CA, USA), mientras se mantienen las variables constantes en el

modelo polinomial de segundo orden. La validez del modelo se determinó comparando el experimental y los valores pronosticados.

Tabla 5. Diseño experimental utilizado para la extracción de antioxidantes en el residuo de zarzamora.

Experimentos	Modelo	X₁, Amplitud (%)	X₂, Tiempo (min)
1	a0	77.92	12.5
2*	00	85	12.5
3	+-	90	10
4	--	80	10
5	0a	85	8.96
6	0A	85	16.03
7*	00	85	12.5
8*	00	85	12.5
9	A0	92.07	12.5
10*	00	85	12.5
11	-+	80	15
12*	00	85	12.5
13	++	90	15

*Puntos centrales

13. Elaboración de Yogurt

Se utilizó leche comercial pasteurizada, la cual fue calentada a una temperatura de 45 °C, a continuación se le agregó el 3% de azúcar, así como de leche en polvo. Se mezcló perfectamente hasta la desaparición de grumos. Posteriormente, se le agregó el cultivo láctico (starter) siendo una mezcla de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus*. Previamente éste se revivificó con un poco de leche caliente y se dejó reposar por media hora. Inmediatamente se agregó el starter al resto de la leche. Se incubó por 4.5 horas a temperatura de 43-45°C y se sometió a refrigeración para detener el proceso de fermentación. Una vez obtenido el yogurt, se le agregó una solución al 10% de azúcar (Walstra, *et al.*, 2001). Se mezcló perfectamente y se almacenó para los análisis posteriores. Esta primera muestra fue tomada como control y se le llamó *yogurt natural* (Y-N).

13.1. Adición del extracto de residuo de zarzamora

En el proceso de elaboración para este tipo de yogurt, se utilizó la metodología descrita anteriormente realizando una modificación en la que fue agregado el 25% de extracto líquido del residuo de zarzamora. Cabe mencionar que ese porcentaje se eligió de acuerdo a pruebas preliminares. El azúcar fue disuelta previamente en el extracto y se mezcló bien. La muestra obtenida se le llamó *yogurt natural adicionado con extracto de residuo de zarzamora* (YN-E), donde el extracto fue obtenido por termo-ultrasonido a las condiciones de 90% de amplitud por 15 min.

13.2. Análisis en el yogurt

Se realizaron pruebas fisicoquímicas, determinación de antioxidantes y análisis sensorial en las muestras de yogurt. Se sometieron a análisis tres muestras de yogurt: *yogurt natural* (Y-N), *yogurt natural adicionado con extracto* (YN-E) y la tercera muestra fue un yogurt comercial de frutos rojos (adicionado con el 10% de fruta), al que se le llamó *yogurt comercial* (Y-C).

13.3. Análisis fisicoquímico

Se realizó un análisis fisicoquímico en las tres muestras de yogurt (Y-N, YN-E y Y-C). Los análisis fueron los siguientes: humedad, cenizas, proteína, grasa, pH y acidez titulable.

13.3.1. Determinación de humedad

El contenido de humedad es un indicador de estabilidad y calidad del alimento y una medida indirecta del contenido de sólidos totales. El método de acuerdo a la AOAC 2005, se basa en una determinación gravimétrica en la que se determina la diferencia de pesos obtenidos en una muestra antes y después de secarla a una temperatura constante. Se procedió a pesar 1 gramo de cada muestra en una cápsula de porcelana, puesta previamente a peso constante. Las muestras se colocaron en un horno a 105 °C durante 1.5 horas. El cálculo se realizó mediante la siguiente ecuación.

Ecuación 3: porcentaje de humedad

$$\% \text{ Humedad} = \frac{P_i - P_f}{P_i} \times 100 \quad (3)$$

Donde:

P_i: peso de la muestra húmeda

P_f: peso de la muestra seca

13.3.2. Determinación de cenizas

Las cenizas de un alimento representan el contenido mineral, es decir, toda la materia orgánica se oxida en ausencia de flama a una temperatura que fluctúa entre los 550-600°C y el material inorgánico que no se volatiliza a esta temperatura se conoce como ceniza (Nollet, 1996; Hart y Fisher, 1991).

En un crisol de porcelana se colocaron 2 g de muestra y se realizó la carbonización con mechero de bunsen para después llevar a incineración en la mufla (Thermolyne modelo 1500, USA) a 500 °C durante 5 h. Al término de ese tiempo, se disminuyó la

temperatura a 200 °C y se pasaron las muestras a un desecador para dejar enfriar durante 1 h. Posteriormente, se pesó en una balanza analítica obteniendo el porcentaje de cenizas por diferencia de peso (AOAC 923.03, 2005). Los cálculos se obtuvieron con la siguiente ecuación.

Ecuación 4: porcentaje de cenizas

$$\% \text{ de Cenizas} = \frac{A - B}{C} \times 100 \quad (4)$$

Donde:

A: peso del crisol a peso constante con muestra seca (g)

B: peso del crisol con ceniza (g)

C: peso de la muestra seca (g)

13.3.3. Determinación de proteína (Método de Kjeldahl)

El procedimiento determina la materia nitrogenada total, basándose en la digestión de la muestra utilizando ácido sulfúrico para reducir el nitrógeno orgánico hasta amoníaco el cual queda en forma de sulfato de amonio. Concluida la digestión se alcaliniza y se destila directamente o por arrastre con vapor para desprender el amoníaco, el cual es atrapado en una solución ácida y titulada automáticamente por el equipo.

La determinación de nitrógeno total se realizó por el método de Kjeldahl, utilizando la metodología oficial de la AOAC, 2005 (método 991.20) utilizando el factor de 6.38 para obtener el porcentaje de proteína.

En esta medición se utilizó un equipo de digestión, destilación y neutralización (Gerhardt modelo Vapodest 50, USA). Se pesó 0.5 g de la muestra y se colocó en un tubo de digestión junto con una tableta catalizadora (KjetabsGerhardt). Se adicionaron 2 mL de agua destilada y 15 mL de H₂SO₄ (ácido sulfúrico) al 97.9%. Fue necesaria la utilización de dos blancos durante todo el proceso. La determinación se llevó a cabo en 3 pasos:

a) Digestión: cuando el digestor alcanzó la temperatura de 230 °C, se colocaron los tubos de digestión y se conectaron al sistema de neutralización, se verificó que los gases formados fueran neutralizados con la solución de NaOH (hidróxido de sodio) al 32%. Se mantuvo a la misma temperatura durante 30 min. Posteriormente, se elevó la temperatura a 260 °C durante 5 min, 300 °C por 10 min, 400 °C por 20 min y finalmente 405°C hasta observar un tono verde esmeralda (aproximadamente 20-30 min).

b) Destilación: una vez enfriados los tubos, se colocaron en el destilador automático, el cual fue programado para realizar la destilación de amoníaco adicionando automáticamente NaOH al 32%.

c) Titulación: se tituló automáticamente el ácido bórico H_3BO_3 (ácido bórico) con H_2SO_4 0.1N. El porcentaje de nitrógeno presentado por el equipo fue utilizado para calcular el porcentaje de proteína total de acuerdo con la siguiente ecuación.

Ecuación 5: porcentaje de proteína total

$$\% \text{ de Proteína} = \% \text{ de Nitrógeno} \times 6.38 \quad (5)$$

13.3.4. Determinación de grasa por el método Gerber

El método Gerber, es un método volumétrico que presenta carácter un tanto cuanto empírico ya que varios factores afectan la gravedad específica de la grasa separada, variaciones propias de la grasa, ácidos grasos presentes, solubilidad de la grasa en los disolventes, etc. Con este método volumétrico la muestra se sitúa en un butirómetro y se descompone utilizando ácidos o álcalis de manera que la grasa es liberada, esta se separa por un método mecánico (centrifuga) y se colecta en el cuello calibrado (Boekenoogen, 1964). La determinación de grasa en yogurt se realizó de la siguiente manera:

Se preparó H₂SO₄ con densidad 1.552 y se colocaron 10 mL en el butirómetro, se agregaron 3g de muestra, 1 mL de alcohol isoamílico y 7 mL de agua destilada. Se colocó el tapón y la muestra fue homogenizada moviendo el butirómetro cuidadosamente de arriba hacia abajo. Una vez homogenizada, se centrifugó a 2000 rpm por 10 min. Posteriormente, se sacaron las muestras y se colocaron en un baño de agua a 65 °C por 5 min hasta que se observó la separación de la grasa en la escala del butirómetro de forma directa.

13.3.5. Determinación de pH

Se midió el pH de las muestras de yogurt después de la calibración del potenciómetro (Hanna Instruments, modelo 210) con soluciones buffer de pH 4.0 y 7.0 estandarizados para el análisis.

13.3.6. Determinación de acidez titulable

De acuerdo con Chandan y O'Rell, (2006) se preparó una solución de NaOH al 0.1 N. En un matraz Erlenmeyer se pesó 9 g de muestra, se añadieron 2 gotas de fenolftaleína, fue homogenizada y se procedió a titular hasta la obtención de un ligero color rosa, que persistió por 30 segundos aproximadamente, comparando con la muestra testigo. Se anotaron los mililitros gastados de NaOH para neutralizar cada muestra. La acidez titulable se expresó como porcentaje de ácido láctico, de acuerdo a la siguiente ecuación.

Ecuación 6: porcentaje de ácido láctico

$$\% \text{ de Ácido láctico} = \frac{N * V * \text{Peq}}{\text{g de muestra}} \times 100 \quad (6)$$

Donde:

N = Normalidad del NaOH (0.1 N).

V = Volumen de hidróxido de sodio gastados, expresado en litros.

Peq = Peso equivalente del ácido láctico (90).

13.4. Determinación de compuestos antioxidantes del yogurt

13.4.1. Determinación de compuestos fenólicos, antocianinas, ABTS y DPPH

Los compuestos antioxidantes fueron extraídos a partir de muestras de yogurt utilizando el método descrito por Wallace y Giusti (2008) con pequeñas modificaciones. Se tomaron 10 g de yogurt y se mezclaron con 30 mL de metanol acidificado con HCl al 0,1% y se agitaron durante 15 minutos. Se centrifugó a 10 000 rpm durante 10 min usando una centrífuga refrigerada. El sobrenadante se recuperó y se almacenó para su posterior análisis. Se determinó compuestos fenólicos totales, antocianinas, ABTS y DPPH en los extractos del yogurt, se realizó de acuerdo a la metodología para los extractos mencionada anteriormente (apartado correspondiente a 11.3.1 al 11.3.3.2).

13.5. Análisis sensorial del yogurt

El análisis sensorial se utiliza para responder a preguntas sobre la calidad de un producto relacionado con la descripción o preferencia. Las pruebas de preferencia y aceptabilidad tienen por objetivo establecer si el consumidor reconoce diferencias en el producto, y si estas mejoran el grado de satisfacción o aceptación del mismo. Entre las pruebas de aceptación se encuentra un método para presentar las muestras y es en presentación apareada en la que se presentan dos muestras a la vez (Carpenter, *et al.*, 2000).

Se realizó una prueba de comparación apareada (preferencia) para el análisis sensorial del yogurt. Los consumidores fueron estudiantes de la licenciatura en Nutrición del Instituto de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, entre las edades de 20 a 22 años. Se les presentó dos productos codificados que fueron identificados por un número de tres dígitos asignado al azar y se les pidió que indicaran cual prefieren. El análisis sensorial lo realizaron 50 consumidores. A continuación se presenta el formato aplicado para la realización de esta prueba sensorial.



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo
INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
Prueba Sensorial de Yogurt



Edad: _____

Fecha: _____

Escolaridad: Superior

Posgrado

Sexo: M

F

Instrucciones: Frente a usted tiene dos muestras de yogurt, las cuales han sido codificadas, pruebe cada una de ellas de izquierda a derecha. Favor de enjuagar su boca antes de iniciar la prueba. A continuación indique cuál de las dos muestras prefiere.

193

582

Gracias por su participación

14. Análisis estadístico

Todos los valores fueron obtenidos por triplicado. Se realizó un análisis unidireccional de varianza (ANOVA) y las diferencias entre las medias (\pm desviación estándar (DE)) fueron comparadas con una prueba de Tukey con una confiabilidad del 95 %, utilizando el paquete estadístico SPSS versión 15.0, Sistema SPSS® para WIN™ (SPSS Inc, Chicago, Illinois).

15. RESULTADOS Y DISCUSIONES

15.1. Modelización del proceso de extracción a partir del residuo de zarzamora

La optimización del proceso de extracción de los compuestos fenólicos totales, antocianinas y actividad antioxidante sobre la base del diseño central compuesto se presentan en la Tabla 6. El efecto de nivel de amplitud del termo-ultrasonido (T-US) y el tiempo de extracción ocasionó una liberación de compuestos fenólicos totales entre 933 y 1438 mg de equivalentes de ácido gálico en 100 g de base seca (EAG/100g bs). Para las antocianinas el intervalo fue de 332 y 378 mg de Cyanidin-3-Glucósido en 100 g de base seca (Cy-3-Gl/100g bs). La actividad antioxidante medida por ABTS y DPPH se presentó en un intervalo de 3478 y 6953 μmol equivalentes de Trolox en 100 g de base seca (ET/100g bs); 7050 y 9571 μmol ET/100 g bs, respectivamente. En general, las extracciones obtenidas por T-US fueron mayores a la muestra control de fenoles totales, antocianinas, ABTS y DPPH. Esto es debido a que el ultrasonido provoca que las ondas sonoras que viajan por el medio líquido rompan las células de la matriz vegetal y los contenidos sean liberados de la célula en el medio de extracción (Vinatoru, *et al.*, 1997). En este sistema de extracción sólido-líquido, la masa (sólidos contenidos en la matriz vegetal) migra hacia el disolvente que ha sido puesto en contacto con la matriz. Esta migración de masa puede mejorarse con cambios en los coeficientes de difusión inducida por el termo-ultrasonido, entre otros (Corrales, *et al.*, 2009).

En la Tabla 7 se muestra el análisis de regresión de los datos experimentales. Los resultados indican los modelos de respuesta predictivos. Se observaron cambios significativos con el nivel de amplitud del T-US y tiempo de extracción aplicados. Estos cambios se reflejaron en término lineal (b_1 , b_2), cuadrático (b_{11} , b_{22}), o su interacción (b_{12}). Los modelos mostraron altos coeficientes de correlación (R^2) de 0.97, 0.97, 0.94 y 0.95, de compuestos fenólicos totales, antocianinas, ABTS y DPPH, respectivamente, por lo que se ajustaron al modelo matemático con un mínimo margen de error de 0.06.

Tabla 6. Valores promedio (\pm DE) de la extracción de CFT, antocianinas y actividad antioxidante en residuo de zarzamora termo-ultrasonificado en 100 g en base seca.

Número de Extracción	Condición de extracción**	CFT *** (mg EAG/100g bs)	Antocianinas**** (mg/100g bs)	ABTS (μ mol ET/100g bs)	DPPH (μ mol ET/100g bs)
*Control	-----	746.75 \pm 5.70	255.25 \pm 3.50	4540.82 \pm 333.27	6623.03 \pm 90.68
1 (a0)	78% 12.5 min	1094.44 \pm 70	345.53 \pm 18	6953.86 \pm 300	9237.42 \pm 194
2 (00)	85% 12.5 min	1201.24 \pm 13	352.10 \pm 29	6165.36 \pm 645	8575.23 \pm 485
3 (+-)	90% 10 min	1124.52 \pm 31	340.25 \pm 3	5601.75 \pm 104	7815.00 \pm 74
4 (--)	80% 10 min	1311.19 \pm 45	346.32 \pm 2	5873.31 \pm 166	9089.02 \pm 22
5 (0a)	85% 9 min	1438.14 \pm 62	332.04 \pm 7	3478.45 \pm 604	7585.90 \pm 108
6 (0A)	85% 16 min	1433.79 \pm 17	374.68 \pm 1	4538.77 \pm 499	7050.25 \pm 163
7 (00)	85% 12.5 min	1205.84 \pm 84	356.66 \pm 2	6124.96 \pm 0	8557.20 \pm 190
8 (00)	85% 12.5 min	1220.31 \pm 45	352.58 \pm 1	6226.79 \pm 270	8474.86 \pm 417
9 (A0)	92% 12.5 min	933.63 \pm 39	357.52 \pm 3	6841.88 \pm 458	9219.67 \pm 207
10 (00)	85% 12.5 min	1245.28 \pm 99	352.87 \pm 0	6400.90 \pm 834	8627.29 \pm 542
11 (-+)	80% 15 min	1329.90 \pm 18	358.91 \pm 19	6185.99 \pm 62	7593.98 \pm 561
12 (00)	85% 12.5 min	1226.87 \pm 50	354.55 \pm 3	6207.71 \pm 333	8609.17 \pm 340
13 (++)	90% 15 min	1242.89 \pm 101	378.32 \pm 4	6234.75 \pm 419	9571.14 \pm 59

* Control no fue comparado estadísticamente con las condiciones de extracción

** Amplitud (%), tiempo de extracción (min).

*** CFT: Compuestos fenólicos totales.

**** Antocianinas (mg de Cy-3-Gl/100g bs).

Tabla 7. Coeficientes de regresión y análisis del modelo de 2 variables de respuesta

Coeficiente	CFT*	Antocianinas **	ABTS	DPPH
b_0 (intercepto)	1219.908 ^a	353.752 ^a	6225.144 ^a	8568.75 ^a
b_1 (amplitud)	-52.030 ^c	3.787 ^c	-47.645	84.754
b_2 (tiempo)	16.366	13.870 ^a	305.649 ^d	-62.052
b_{11} (amplitud*amplitud)	-84.905 ^a	-0.236	466.540 ^c	390.891 ^c
b_{22} (tiempo*tiempo)	111.059 ^a	0.680	-978.089 ^a	-564.343 ^b
b_{12} (amplitud*tiempo)	24.915	6.37 ^c	80.08	812.795 ^a
R^2	0.97	0.97	0.94	0.95

* CFT: Compuestos fenólicos totales.

** Antocianinas (mg de Cy-3-Gl/100g bs).

Niveles de significancia: ^a $p < 0.0001$; ^b $p < 0.001$; ^c $p < 0.01$; ^d $p < 0.05$.

15.2. Efecto de las variables de proceso sobre los compuestos fenólicos totales y antocianinas

El efecto de la amplitud (b_{11}) y tiempo (b_{22}) para la extracción de CFT fue altamente significativo presentando $p < 0.0001$, como se muestra en la Tabla 7. En la Figura 6 se presenta un gráfico de sábana con los datos obtenidos por superficie de respuesta y corrobora lo antes mencionado. Se observó que los valores de CFT disminuyeron cuando se aplicó mayor nivel de amplitud. Con respecto al tiempo, el comportamiento fue a la inversa, con el incremento del tiempo, la liberación de los compuestos fue en aumento. La liberación de compuestos es debido al incremento del tiempo, los solutos permanecen más en contacto con el disolvente facilitando así la difusión (Ghafoor, *et al.*, 2009). Mismo efecto fue encontrado por Aybastier, *et al.*, (2013), quienes obtuvieron un mayor rendimiento de los compuestos fenólicos en las hojas de la planta de zarzamora cuando la extracción se realizó por más tiempo.

El efecto de la interacción entre la amplitud y tiempo (b_{12}) sobre las antocianinas fue significativo ($p < 0.001$) (Tabla 7). Hubo mayor extracción cuando el nivel de amplitud y tiempo se incrementó (Figura 7). Sin embargo, el tiempo (b_2) también tuvo influencia ($p < 0.0001$). Estudios realizados en piel de uva (Li, *et al.*, 2010), coinciden

con los resultados obtenidos, quienes explican que el tiempo de extracción relativamente largo, es el mejor parámetro para la extracción de las antocianinas.

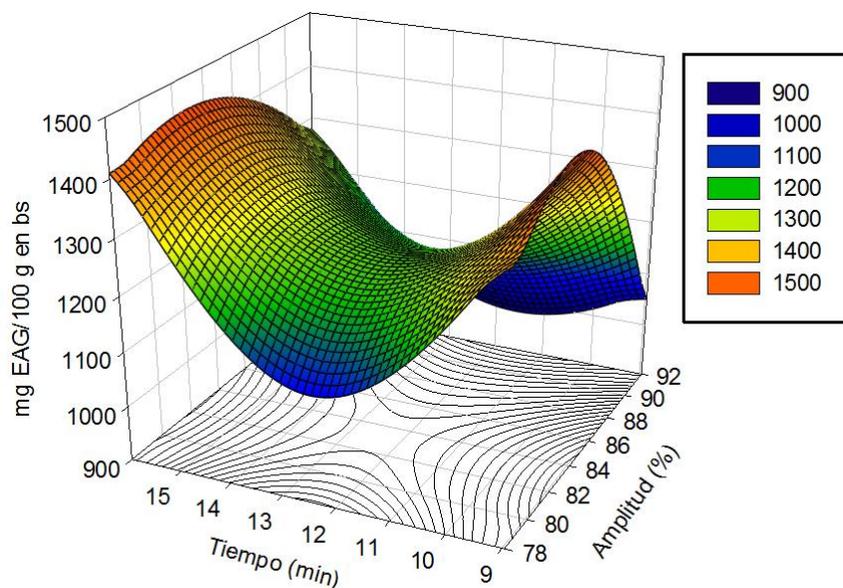


Figura 6. Superficie de respuesta para compuestos fenólicos totales. Extracción por termo-ultrasonido.

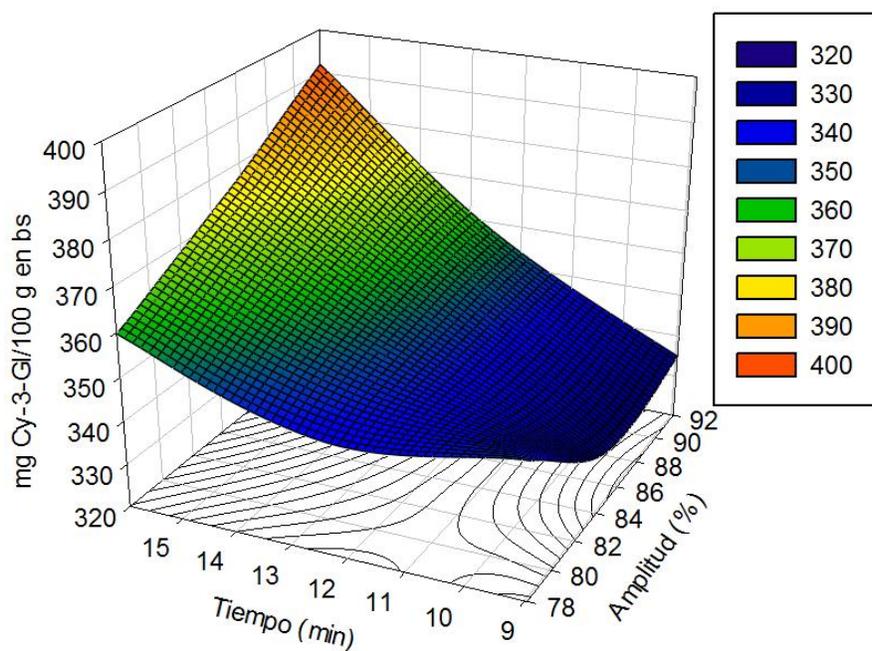


Figura 7. Superficie de respuesta para antocianinas. Extracción por termo-ultrasonido.

15.3. Análisis de superficie de respuesta sobre la actividad antioxidante

La actividad antioxidante de los compuestos presentes en el residuo de la zarzamora, fue determinada por los métodos de ABTS y DPPH. En ABTS, la amplitud (b_{11}) influyó sobre la actividad antioxidante, ya que tuvo una significancia de $p < 0.01$ (Tabla 7). Sin embargo, el tiempo (b_{22}) tuvo mayor influencia ($p < 0.0001$) lo cual provocó que la actividad antioxidante se incrementara (Figura 8).

Los resultados se asemejan al comportamiento de CFT, ya que el tiempo también fue significativo. El ABTS+ suele reaccionar con compuestos donantes de átomos de hidrógeno, como los fenoles, convirtiendo al ABTS en su forma no coloreada (Roginsky y Lissi, 2005).

Por otro lado, la actividad captadora de radicales libres DPPH, se vio influenciada en primera instancia por la amplitud (b_{11}) con una $p < 0.01$ (Tabla 7), pero fue más efectivo el tiempo (b_{22}) ($p < 0.001$). Se observó que a tiempos menores existió mayor actividad antioxidante. Sin embargo, la interacción (b_{12}) entre el nivel de amplitud y el tiempo de extracción reflejó mayor actividad antioxidante ($p < 0.0001$). La Figura 9 muestra la interacción entre las dos variables independientes, corroborando el efecto significativo. Similares resultados se encontraron en las antocianinas, donde la interacción entre las variables fue significativa. Al contrario del ABTS, el DPPH reacciona con flavonoides que contengan en su anillo B por lo menos un $-OH$ y con ácidos aromáticos que en su estructura tengan más de un $-OH$ (Yokozawa, *et al.*, 1998; Von Gadov, *et al.*, 1997), por lo tanto las antocianinas podrían ser responsables de esta actividad antioxidante.

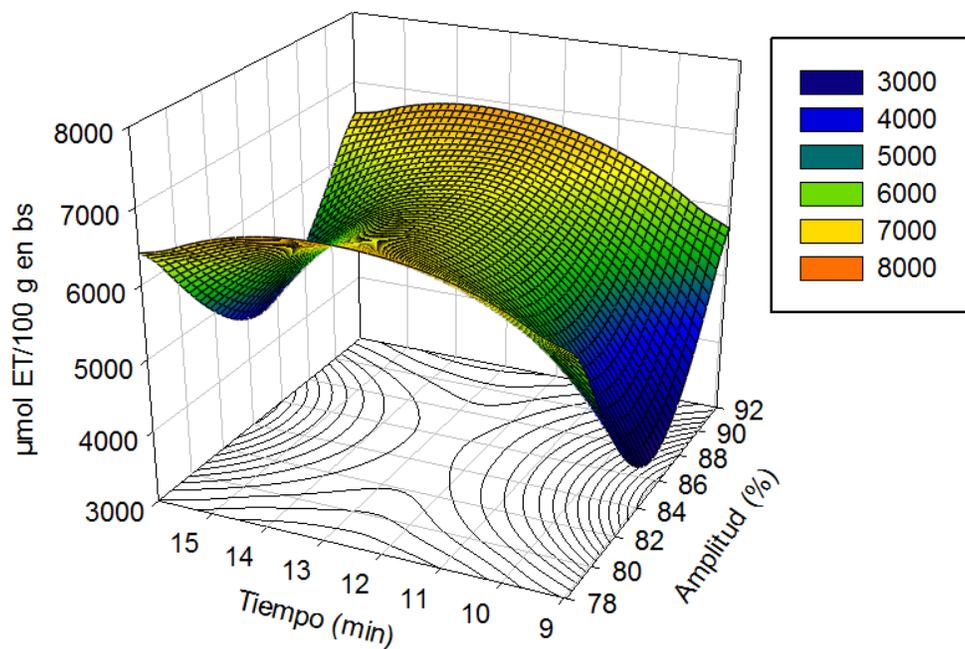


Figura 8. Superficie de respuesta para actividad antioxidante por el método de ABTS. Extracción por termo-ultrasonido.

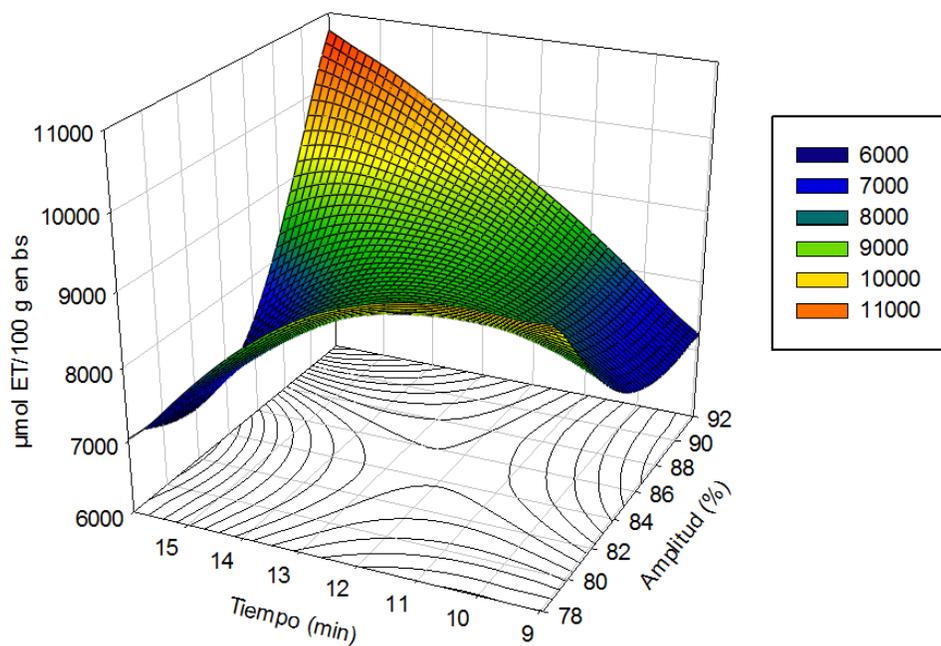


Figura 9. Superficie de respuesta para actividad antioxidante por el método de DPPH. Extracción por termo-ultrasonido.

15.4. Optimización del método de extracción y validación del modelo

Para la optimización del proceso de extracción de los compuestos antioxidantes en el residuo de zarzamora, se tomó en consideración que la superposición de las variables de respuesta fuera en una zona donde hubiera cantidades elevadas tanto de compuestos CFT y antocianinas como de su actividad antioxidante (ABTS y DPPH). En la Figura 10, se presenta la superposición de las variables de respuesta y se observó una intersección importante a niveles de amplitud y tiempo altos, tales como 90% y 15 min. En la zona óptima, los valores fueron 1200 mg EAG/100g bs y 380 mg Cy-3-Gl/100g bs, para CFT y antocianinas, respectivamente. Mientras que para la actividad antioxidante fue de 6300 y 9600 $\mu\text{mol ET}/100\text{g bs}$ para ABTS y DPPH, respectivamente.

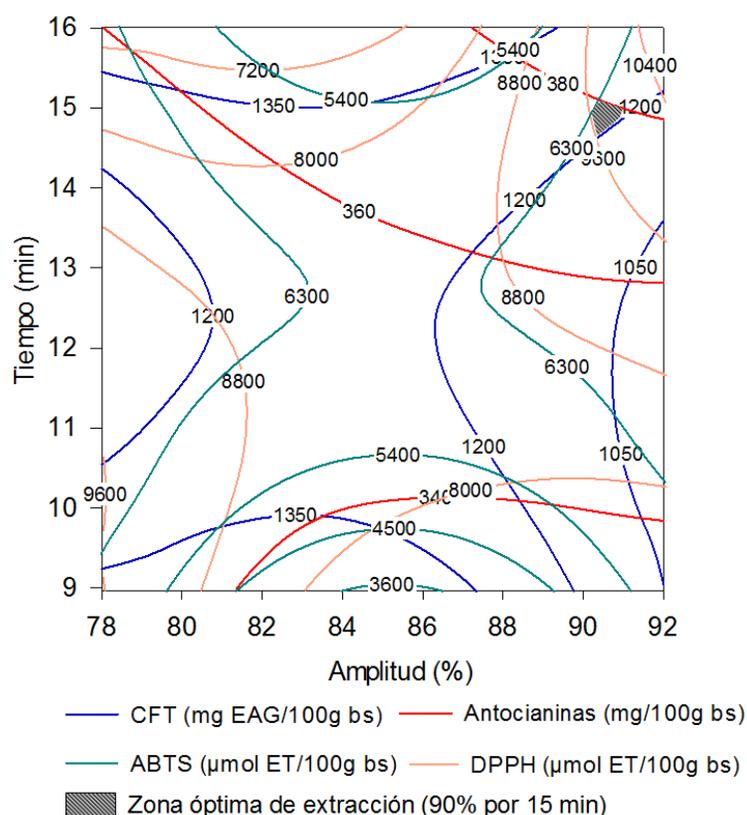


Figura 10. Superposición de todas las respuestas en la extracción por termo-ultrasonido de compuestos antioxidantes en el residuo de zarzamora.

Los valores de fenoles, antocianinas, ABTS y DPPH que se presentan en la Tabla 8 fueron predichos por el modelo y se compararon con los valores experimentales. Se encontró que ningún parámetro tuvo diferencia significativa ($p>0.05$) por lo que estos resultados reales validan el modelo de la metodología de superficie de respuesta. La buena correlación entre los resultados confirmó que el modelo de respuesta fue adecuado reflejando la optimización esperada.

Tabla 8. Valores predictivos y experimentales de las respuestas en las mejores condiciones

Parámetros	Valor predictivo	Valor experimental*
Fenoles (mg EAG/100g bs)	1200	1201.23 ± 13.06
Antocianinas (mg Cy-3-Gl/100g bs)	380	379.12 ± 6.07
ABTS (µmol ET/100g bs)	6300	6318.98 ± 76.84
DPPH (µmol ET/100g bs)	9600	9617.22 ± 120.92

*Los resultados obtenidos se realizaron por triplicado (n=3).

15.5. Comparación de antioxidantes en los extractos

Generalmente, la extracción de los compuestos orgánicos de plantas o semillas, se ha basado en la combinación del disolvente, calor y/o agitación. Los solventes como metanol, acetona, acetonitrilo, etilacetato, entre otros, son utilizados para la extracción de polifenoles. Posteriormente, los extractos son evaporados al vacío para remover el solvente. La seguridad de estas extracciones industriales está asociada con el uso de solventes orgánicos, incluye residuos en el producto, exposición de los trabajadores, eliminación de los disolventes residuales y contaminación al medio ambiente (Shi, *et al.*, 2003). Sin embargo, esto se puede mejorar significativamente con el uso de ultrasonido de alta potencia, como la energía generada a partir del colapso de burbujas durante la cavitación y que proporciona una mayor penetración del disolvente en el material celular y mejora la transferencia hacia y desde las interfaces (Knorr, 2003).

15.5.1. Compuestos fenólicos totales

De acuerdo a otros estudios, el fruto de la zarzamora contiene aproximadamente 830 mg EAG/100g de peso fresco (Kaume, *et al.*, 2012). El residuo de zarzamora presentó cantidades importantes de fenoles, alrededor de 800 mg EAG/100g de residuo fresco (Vulic, *et al.*, 2011). Estos resultados fueron menores a lo que se encontró en este estudio (746.74 ± 5.69 mg EAG/100g bs), ya que se reportó en base seca (Figura 11). Las discrepancias encontradas también pueden ser en parte debido a los distintos estados de madurez de los frutos. Además, las diferencias metodológicas pueden contribuir a la variabilidad en las concentraciones compuestos fenólicos reportados (Vulic, *et al.*, 2011).

El método de extracción propuesto (termo-ultrasonido) para los compuestos fenólicos totales se comparó con el método convencional (agua y solvente). En este método la etapa de extracción se llevó a cabo por agitación de la muestra sólida y disolvente (agua y etanol) durante 2 horas. La Figura 11 muestra los resultados para la extracción óptima (90% de amplitud por 15 min) por termo-ultrasonificación, así como los métodos convencionales. Todas las extracciones fueron mayores significativamente ($p < 0.05$) con respecto a la muestra control (746.74 ± 5.69 mg EAG/100g bs). Sin embargo, los métodos de extracción convencionales con agua y etanol (904.49 ± 0.62 y 908.40 ± 3.01 mg EAG/100g bs, respectivamente) fueron menores que las condiciones óptimas de extracción dadas por el T-US (1201.23 ± 13.06 mg EAG/100g bs). La optimización duplicó la cantidad de compuestos fenólicos del control. Estos resultados fueron similares a lo reportado por Pingret, *et al.*, (2012) que comparó la extracción convencional (maceración) y la optimización de la extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos totales del residuo de manzana y el incremento fue más del 30% en la extracción por ultrasonido. Además, la eficiencia de la extracción por T-US podría explicarse por el hecho de que la sonicación mejora simultáneamente la hidratación y la fragmentación de la matriz del alimento, al mismo tiempo que se facilita la transferencia de masa de solutos para el disolvente de extracción (Soria y Villamiel, 2010).

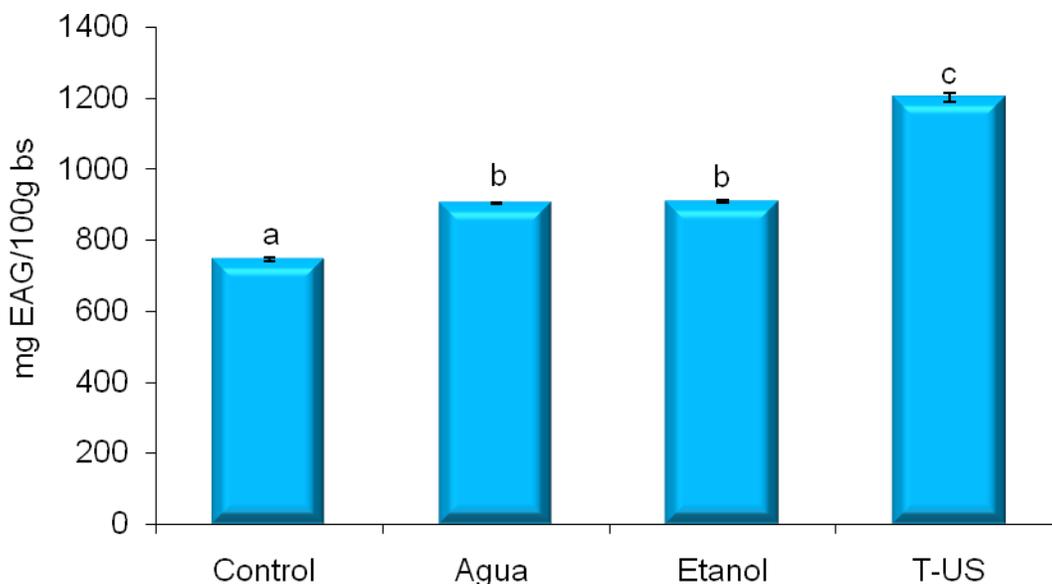


Figura 11. Extracción de compuestos fenólicos totales con solventes y termo-ultrasonido del residuo de zarzamora. Control (muestra sin tratamiento). ^aLetras diferentes indican una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las extracciones. Se utilizó la prueba de Tukey para la diferencia entre las medias. $n=3$.

15.5.2. Antocianinas

Las antocianinas son un grupo perteneciente a los compuestos fenólicos y están relacionados con el color de varios órganos aéreos y subterráneos de muchas plantas (Mazza y Miniatti, 1993). Además, son moléculas polares, por tanto, los disolventes más comunes utilizados en las extracciones son mezclas acuosas de etanol, metanol o acetona (Castañeda-Ovando, *et al.*, 2009).

En este estudio fue importante analizar la comparación de estos métodos (tecnología convencional y emergente) para la extracción de antocianinas. Los resultados se muestran en la Figura 12. La extracción con agua y el T-US fueron mayores al control (255.25 ± 3.50 mg Cy-3-Gl/100g bs). El método de extracción más eficaz fue el etanol. La polaridad del disolvente para la extracción con etanol tuvo un efecto significativo sobre el residuo de zarzamora (593.58 ± 16.44 mg Cy-3-Gl/100g bs) al incrementar la extracción sobre sus compuestos. Los resultados obtenidos están de acuerdo con lo reportado por D'Alessandro, *et al.*, (2014), donde extrajeron antocianinas con ultrasonido asistido en el residuo de arándano negro y muestra que la extracción con etanol fue mayor que el ultrasonido.

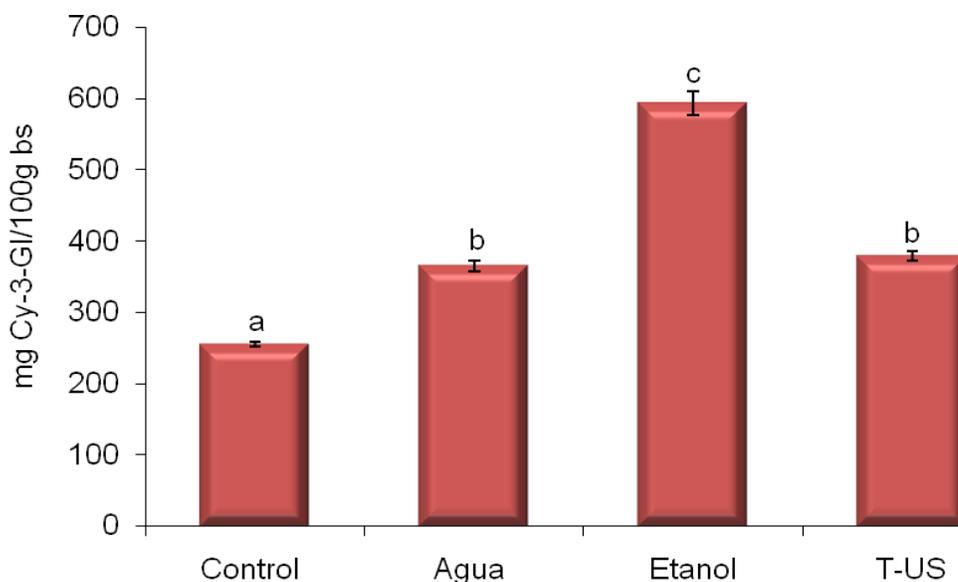


Figura 12. Extracción de antocianinas del residuo de zarzamora. Control (muestra sin tratamiento). ^aLetras diferentes indican una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las extracciones. Se utilizó la prueba de Tukey para la diferencia entre las medias. $n=3$.

La eficiencia de extracción se debe quizá a que está influenciada por parámetros operacionales, como la composición del solvente, la proporción del sólido en el solvente y el tiempo de extracción, entre otros (D'Alessandro, *et al.*, 2014).

Posiblemente en la muestra extraída por T-US, la cavitación producida causó reacciones en donde las antocianinas fueron polimerizadas, teniendo así una degradación de estos compuestos (Floros y Liang, 1994). Además, la degradación de antocianinas pudo ser debido a la sonolisis del agua por la cavitación, donde se indujo la formación de radicales hidroxilo (-OH) generando la descomposición química (Castellanos, Reyman, Sieiro y Calle, 2001). Otra posible causa es por la formación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) producido por la cavitación y que puede participaren la degradación de antocianinas por apertura de anillos y la formación de chalcona debido principalmente al aumento de temperatura que se produce durante la sonicación (Sadilova, Carle y Stintzing, 2007; Tiwari, *et al.*, 2010).

15.5.3. Actividad antioxidante (ABTS)

La actividad antioxidante fue evaluada por ambos métodos de extracción, tanto la convencional como la extracción por termo-ultrasonido (Figura 13). Se puede observar que la extracción con agua y etanol (2567.91 ± 110.97 y 1857.65 ± 240.47 $\mu\text{mol ET}/100\text{g bs}$, respectivamente) no presentaron diferencias significativas y tuvieron menor actividad antioxidante comparado con la muestra control (4540.81 ± 333.27 $\mu\text{mol ET}/100\text{g bs}$). La extracción optimizada por termo-ultrasonido (6318.98 ± 76.84 $\mu\text{mol ET}/100\text{g bs}$) presentó los valores más altos.

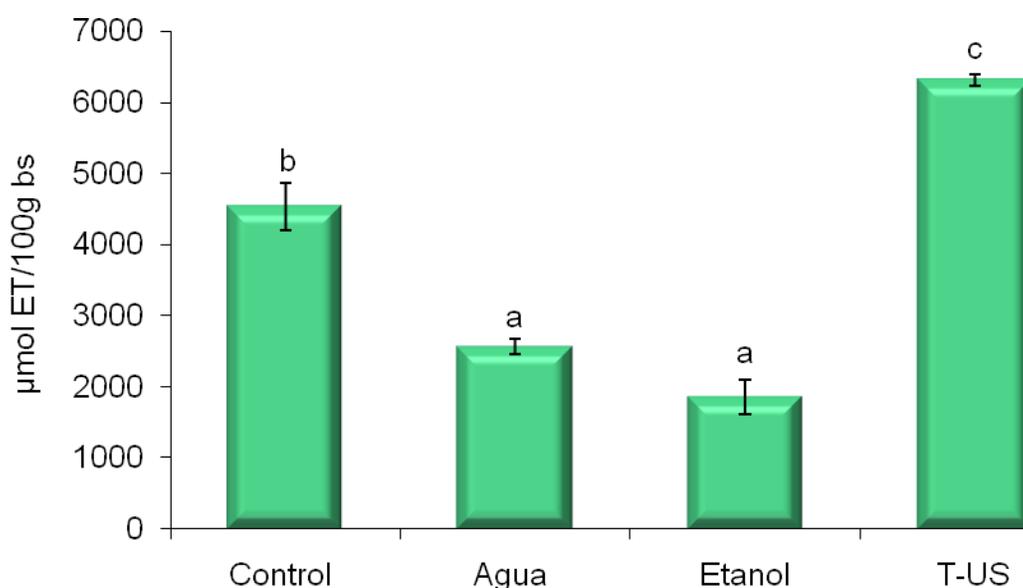


Figura 13. Actividad antioxidante (ABTS). Comparación de diferentes métodos. Control (muestra sin tratamiento). ^aLetras diferentes indican una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las extracciones. Se utilizó la prueba de Tukey para la diferencia entre las medias. $n=3$.

La metodología de $\text{ABTS}^{\bullet+}$ proporciona datos sobre la presencia de agentes reductores y donantes de hidrógeno en una muestra específica. La reducción del $\text{ABTS}^{\bullet+}$ se traduce en una disminución de la absorbancia y se correlaciona directamente con la capacidad antioxidante de los compuestos hidrosolubles del volumen añadido en la muestra estudiada (Corrales, *et al.*, 2009). Los polifenoles son solubles en agua debido a que son compuestos polares (contienen gran cantidad de grupos $-\text{OH}$). Sin embargo, algunos factores pueden afectar el contenido de estos

compuestos, la extracción por largo tiempo y la presencia de oxígeno. (Shi, *et al.*, 2003). En el termo- ultrasonido el tiempo de extracción fue de 15 min, mientras que en las otras metodologías fue de dos horas. Es posible que esto afectara significativamente en la extracción de estos compuestos.

15.5.4. Actividad antioxidante (DPPH)

La disminución de la absorbancia por la conversión del color morado a amarillo en esta determinación, es debido a la actividad donante de protones para estabilizar al radical DPPH (Aadil, *et al.*, 2013). En la Figura 14 se muestra la actividad antioxidante por DPPH en diferentes métodos de extracción de compuestos antioxidantes. Todas las muestras presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$). La extracción por T-US reflejó mayor actividad antioxidante ($9617.22 \pm 120.92 \mu\text{mol ET}/100\text{g bs}$) comparado con el control y los métodos convencionales (6623.03 ± 90.67 ; 6992.90 ± 39.77 y $7817.65 \pm 15.48 \mu\text{mol ET}/100\text{g bs}$, respectivamente).

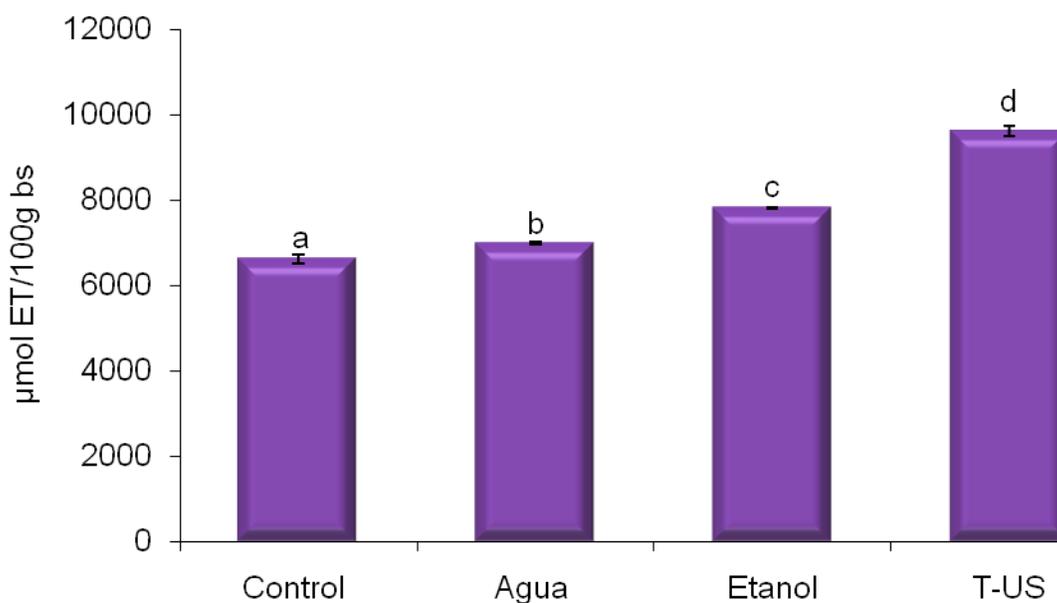


Figura 14. Actividad antioxidante (DPPH). Diferentes métodos de extracción. Control (muestra sin tratamiento). ^aLetras diferentes indican una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los tratamientos. Se utilizó la prueba de Tukey para la diferencia entre las medias. $n=3$.

El ultrasonido es beneficioso en la extracción de componentes bioactivos porque daña la pared celular de la planta o matriz del alimento en el que se aumenta la absorción del disolvente por la célula durante la sonicación aumentando así el rendimiento de extracción (Toma, Vinatoru, Paniwnyk, y Mason, 2001). Los compuestos fenólicos son los responsables principalmente del atrapamiento de radicales libres DPPH (Aadil, *et al.*, 2013). Este incremento significativo en la actividad antioxidante pudiera ser debido a la presencia de las altas concentraciones del contenido total de polifenoles presentes en el extracto como resultado de termo-sonicación que ya se mencionó anteriormente.

15.6. Evaluación del mejor extracto para adición a un yogurt

Como resultado de las extracciones del residuo de zarzamora, se obtuvo que a partir de la extracción por T-US a 90% de amplitud y 15 min fue el extracto que presentó mayor contenido de CFT y actividad antioxidante (ABTS y DPPH). Por lo tanto, el extracto fue añadido a un yogurt para evaluar su utilización en este alimento.

16. Efecto de la adición de extracto sobre las características del yogurt

El yogurt es un producto lácteo muy importante, particularmente para consumidores con intolerancia a la lactosa. El yogurt es considerado como un alimento saludable porque contiene bacterias viables que son considerados como probióticos (Mohamed, Zayan y Nadia, 2014). Además, la utilización de residuos del procesado de frutas como parte de los ingredientes, contribuyen con compuestos bioactivos a estos productos considerados como alimentos funcionales (Balasundram, *et al.*, 2006). El 25% de extracto líquido del residuo de zarzamora fue agregado a un yogurt y se evaluaron sus características fisicoquímicas, antioxidantes y sensoriales.

16.1. Análisis fisicoquímico

Los análisis comprendidos dentro de este grupo, también conocido como análisis proximales Weende, se aplican en primer lugar a los materiales que se usarán para formular una dieta como fuente de proteína o de energía y a los alimentos terminados, como un control para verificar que cumplan con las especificaciones o requerimientos establecidos durante la formulación. Estos análisis indican el contenido de humedad, proteína cruda (nitrógeno total), fibra cruda, lípidos crudos y ceniza en la muestra (FAO, 1993).

Los resultados de la composición química proximal del yogurt se muestran en la Tabla 9. Como se puede observar, el yogurt es un alimento con alto contenido de agua. De acuerdo a la norma mexicana para yogurt o leche búlgara (NMX-F-444-1983), el porcentaje de humedad para yogurt natural y yogurt aromatizado (al que se le ha adicionado saborizantes) no debe ser mayor al 87%, mientras que para el

yogurt con fruta y aromatizado deberá contener un máximo de 78%. Por lo tanto, el yogurt natural (Y-N) y el yogurt natural adicionado con el extracto del residuo de zarzamora (YN-E) estuvieron dentro del valor estipulado por la norma. Sin embargo, el yogurt comercial (Y-C) fue mayor a 78%, lo cual se vio reflejado en la disminución del contenido de sólidos, debido a la agregación pectinas principalmente, las cuales le confieren al yogurt un aumento en la viscosidad y fuerza de gel, además de la reducción en la sinéresis (Sun-Waterhouse, *et al.*, 2013). Por otro lado, el contenido de humedad en las muestras fueron diferentes significativamente ($p < 0.05$), encontrando menor humedad en el YN-E y mayor en Y-C.

Tabla 9. Composición fisicoquímica del yogurt

Composición	Yogurt		
	Y-N ⁺	YN-E ⁺⁺	Y-C ⁺⁺⁺
Humedad (%)	78.37±0.12 ^b	77.82±0.09 ^a	82.56±0.02 ^c
Cenizas (%)	0.52±0.043 ^b	0.52±0.035 ^b	0.41±0.005 ^a
Proteína (%)	4.20±0.07 ^b	4.00±0.12 ^b	3.50±0.07 ^a
Grasa (%)	2.83±0.28 ^b	1.43±0.40 ^a	1.90±0.20 ^a
pH	4.54±0.005 ^c	4.37±0.005 ^b	4.10±0.005 ^a
Acidez (%)	0.81±0.005 ^b	0.57±0.011 ^a	0.86±0.015 ^c

⁺ Y-N: Yogurt natural

⁺⁺ YN-E: Yogurt natural adicionado con extracto de residuo de zarzamora (termo-ultrasonificado por 90% y 15 min).

⁺⁺⁺Y-C: Yogurt comercial

^aIndica diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las muestras.

Las cenizas de un alimento son un término analítico equivalente al residuo inorgánico que queda después de quemar la materia orgánica; representan el contenido mineral (Hart y Fisher, 1991). El porcentaje de cenizas en el Y-C presentó un menor contenido de minerales con respecto a las otras muestras indicando que el extracto no afectó el contenido de minerales.

Las proteínas constituyen el principal componente de las sustancias nitrogenadas, ocupando una posición de primera importancia en las producciones agroalimentarias,

porque condiciona las propiedades funcionales de numerosos productos; además, desempeña un papel específico en el campo nutricional (Adrián, *et al.*, 2000). La proteína láctea es propia de la leche y está conformada por diversos componentes propios de la leche cuya proporción debe mantenerse durante el proceso de fabricación del yogurt (NOM-181-SCFI-2010). Se observó que el porcentaje de proteína de las muestras de yogurt estuvo dentro de lo establecido por la norma mexicana NOM-181-SCFI-2010, ya que marca que debe ser mínimo el 2.9%. Por otro lado, se presentó diferencia significativa ($p < 0.05$) entre el Y-C y las otras dos muestras en donde el porcentaje de proteína fue mayor. Las proteínas desempeñan un papel determinante en la textura y la materia grasa sobre las características sensoriales como sabor y aroma (Mahaut, *et al.*, 2004).

De acuerdo a la Norma Oficial Mexicana Yogurt-Denominación, especificaciones fisicoquímicas y microbiológicas, información comercial y métodos de prueba (NOM-181-SCFI-2010), la definición de grasa butírica es la grasa que se obtiene de la leche, que se caracteriza por tener un alto contenido de ácidos grasos saturados, incluyendo el ácido butírico. En la Tabla 9 se muestra el porcentaje de grasa del yogurt y de acuerdo a la norma antes mencionada y a la Norma del CODEX para leches fermentadas, establecen que no debe exceder del 15%, por lo tanto, todas las muestras cumplen con las normas. Además, el Y-N presentó mayor cantidad de grasa comparada con el YN-E y el Y-C. Este comportamiento fue similar a lo reportado por Sengül, *et al.*, (2012), utilizaron pulpa de cereza y Bakirci y Kavaz, 2008, en donde agregaron puré de plátano a un yogurt y se observó que en estos estudios el porcentaje de grasa de todas las muestras disminuyó con respecto al control. La disminución de este parámetro es beneficioso, ya que de acuerdo a recomendaciones nutricionales se debe buscar la disminución de la grasa en los alimentos.

De acuerdo a la NOM-181-SCFI-2010, el yogurt debe presentar mínimo el 0.5% de ácido láctico (% de acidez), lo cual las tres muestras de yogurt estuvieron dentro de los lineamientos establecidos por la norma. Cabe destacar que se presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$). En la Tabla 9 se muestran los valores de pH y acidez del yogurt. Se observó que la adición del extracto del residuo de zarzamora disminuyó el pH y aumentó la acidez del yogurt. El pH del Y-N fue de 4.54 y acidez de 0.81% de ácido láctico, mientras que el YN-E presentó valor de 4.37 con una acidez de 0.57% de ácido láctico. La adición del extracto ocasionó una reducción del pH e incremento de la acidez, tomando en cuenta que el valor de pH del extracto fue de 3.52 ± 0.02 . Mismo comportamiento se observó en el Y-C, ya que dentro del proceso de elaboración le fueron añadidos tres frutos rojos, lo cual también contribuyó a la disminución de este parámetro. Este comportamiento concuerda con la disminución del pH en yogurt por la adición de residuos como el orujo de uva de vino y cereza (Tseng y Zhao, 2013; Sengül, *et al.*, 2012).

16.2. Antioxidantes del yogurt

Alimento funcional es un término que se utiliza para definir los alimentos que proporcionan compuestos bioactivos naturales a la dieta humana más allá sus características básicas de suministrar nutrimentos. Estos compuestos bioactivos a menudo benefician la salud por su actividad antioxidante (Kris-Etherton, *et al.*, 2004). Por lo tanto, los diversos estudios se han enfocado en el desarrollo de alimentos fortificados con vitaminas, fibras, ácidos grasos y otros compuestos naturales (polifenoles) lo que contribuye con características funcionales novedosas (Karaaslan, *et al.*, 2011).

Como se ha mencionado, la zarzamora es reconocida por ser una buena fuente de antioxidantes, la cual contiene niveles apreciables de compuestos fenólicos (Cho, *et al.*, 2005), y el residuo del procesamiento aún contienen estos compuestos.

En la Tabla 10 se muestran los compuestos fenólicos totales (CFT), antocianinas y su actividad antioxidante del yogurt adicionado con el extracto de residuo de zarzamora. El yogurt con menor cantidad de compuestos fenólicos fue el Y-N y el mayor lo obtuvo el YN-E. Los compuestos fenólicos se encuentran en cantidades notables en la leche de los rumiantes. Una parte de estos compuestos son los productos del catabolismo de los aminoácidos; sin embargo, en su mayoría derivan de la alimentación, y las diferencias en el perfil fenólico de la leche pueden ser causadas por las variaciones en la alimentación (O'Connell y Fox, 2001).

Tabla 10. Actividad antioxidante del yogurt

Antioxidantes	Yogurt		
	Y-N ⁺	YN-E ⁺⁺	Y-C ⁺⁺⁺
CFT* (mg EAG/L)	37.94 ± 0.63 ^a	109.55 ± 1.58 ^c	51.38 ± 0.09 ^b
Antocianinas (mg Cy-3-Gl/L)	ND ^{**}	9.52 ± 0.18 ^b	0.96 ± 0.00 ^a
ABTS (μmol ET/L)	227.11 ± 10.71 ^b	330.44 ± 18.36 ^c	160.44 ± 25.01 ^a
DPPH (μmol ET/L)	10.83 ± 0.14 ^a	68.58 ± 0.94 ^c	18.00 ± 0.66 ^b

⁺ Y-N: Yogurt natural

⁺⁺ YN-E: Yogurt natural adicionado con extracto de residuo de zarzamora (termo-ultrasonificado por 90% y 15 min).

⁺⁺⁺Y-C: Yogurt comercial

^a Indica diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las muestras.

Los polifenoles son conocidos por ejercer una afinidad de unión con las proteínas, lo que conduce a la formación de complejos de proteína-polifenol soluble o insolubles (Papadopoulou y Frazier, 2004; Rawel, Kroll y Hohland, 2001). Estas interacciones son particularmente con proteínas ricas en prolina tales como caseínas (Luck, *et al.*, 1994; O'Connell y Fox, 2001). El incremento sobre los valores observados en el yogurt adicionado (YN-E) indica la presencia de fenoles contenidos en el extracto del residuo de zarzamora en el producto final.

Estos resultados fueron comparados con otro estudio (Karaaslan, *et al.*, 2011) en donde al yogurt le agregaron variedades de uva como Syrah, Merlot, Chardonnay y Cabernet sauvignon, y la cantidad de fenoles obtenidos fue en un intervalo de 70 a 80 mg EAG/Kg. El yogurt adicionado con extracto del residuo de zarzamora (YN-E) presentó mayor concentración (109 mg EAG/L) que lo reportado en el estudio mencionado. Además, otros estudios reportaron que con el aumento en la concentración de pulpa de cereza agria, extracto de orujo de uva y orujo de uva seco (Sengül, *et al.*, 2012; Tseng y Zhao, 2013; Mohamed, *et al.*, 2014), el contenido de compuestos fenólicos incrementó.

Las antocianinas representan el grupo más importante de pigmentos hidrosolubles detectables en la región visible por el ojo humano (Strack y Wray, 1994). Estos pigmentos son responsables de la gama de colores que abarcan desde el rojo hasta el azul en varias frutas, vegetales y cereales, y se encuentran acumulados en las vacuolas de la célula (Wagner, 1982). Debido a su importancia y a la calidad del color de las frutas y hortalizas frescas y transformadas, los colorantes basados en antocianinas son fabricados para el uso alimentario, así como del procesamiento de desechos. Además de su papel funcional como colorantes, los extractos de antocianinas pueden mejorar la calidad nutricional de los alimentos y bebidas (Wrolstad, 2004).

Las antocianinas presentes en el yogurt fueron detectadas en la muestra YN-E y Y-C en las que se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) (Tabla 10), encontrándose mayor contenido de antocianinas en el YN-E (9.52 mg Cy-3-GI/L). Es posible que se haya presentado una degradación de antocianinas en el YN-E, ya que el extracto que se adicionó tuvo cantidad de 378.32 ± 4.70 mg Cy-3-GI/100g bs. Esta degradación pudiera ser ocasionada por el pH del yogurt, siendo desfavorable para las antocianinas, que mantienen la mayor estabilidad y una absorbancia máxima a pH de 1.0 (Wrolstad, 2004). Las antocianinas son fácilmente inestables y pueden formar compuestos incoloros o de color marrón debido a la su alta reactividad. La

estabilidad de antocianinas se ve afectada por el pH, almacenamiento, temperatura, enzimas, actividad microbiana, ácidos e iones metálicos presentes en el medio (Jackman, Yada, Tung y Speers, 1987). Por otro lado, las antocianinas podrían interactuar con varios componentes de la matriz de la leche, por ejemplo con las proteínas y otras macromoléculas presentes en el yogurt (Jing y Giusti, 2005) limitando la posibilidad de cuantificarlas y sus propiedades antioxidantes.

La actividad antioxidante del yogurt fue medida por ABTS y DPPH. El YN-E fue el que presentó mayor actividad medida por ambos métodos. Estos comportamientos fueron similares a lo reportado por El-Said *et al.*, (2014), quienes agregaron al yogurt extracto de cáscara de granada y encontraron un incremento de la actividad antioxidante por ABTS y DPPH. El incremento está dado por la cantidad de compuestos fenólicos presentes en el yogurt.

Por otro lado, cuando se lleva a cabo la unión covalente entre proteínas y compuestos fenólicos, los grupos hidroxilo de los fenoles libres pueden actuar como antioxidantes (Viljanen, *et al.*, 2004). Sin embargo, la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos puede ser enmascarado por interacciones con proteínas que dependen tanto del tipo, cantidad de proteína, así como del compuesto bioactivo y se ha encontrado que es en la combinación de la caseína en la leche con ácido gálico en el té (Arts, *et al.*, 2002; Heinonen, *et al.*, 1998).

16.3. Análisis sensorial

El análisis sensorial del yogurt fue realizado por una prueba de preferencia en la que se colocaron dos muestras de yogurt codificadas con 193 y 582 para el yogurt natural adicionado con extracto del residuo de zarzamora y yogurt comercial adicionado con frutos rojos, respectivamente. A los consumidores se les pidió que indicaran cual de las dos muestras preferían y se observó que el 50% tuvo preferencia por el YN-E (Figura 15). Cabe mencionar que las muestras fueron de yogurt para beber, presentaron color rosa tenue, olor y sabor característico, por lo cual pudieron

diferenciar una de otra muestra. Por lo tanto, aunque la preferencia por un yogurt u otro fue por igual, se puede concluir que el YN-E fue aceptado por el consumidor como si fuera un producto disponible en el mercado. Sin embargo, el YN-E presentó mayor beneficios ya que tuvo elevada cantidad de compuestos antioxidantes.

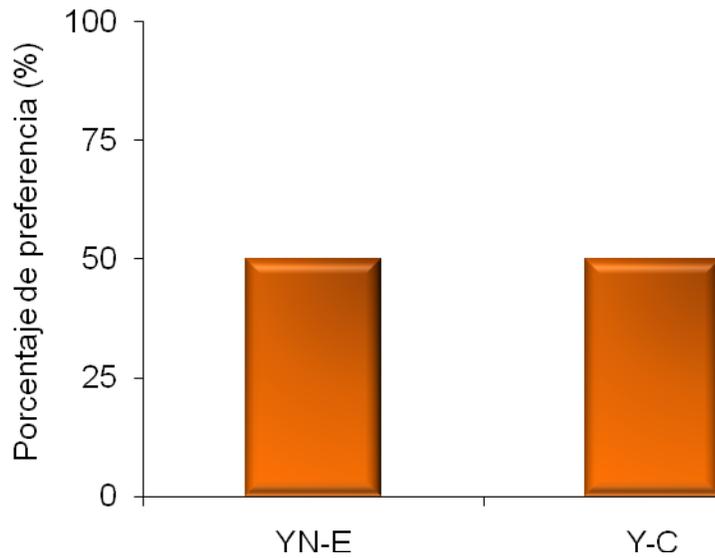


Figura 15. Porcentaje de preferencia de yogurt adicionado con extracto y yogurt comercial.

17. Conclusiones

- De acuerdo a la metodología de superficie de respuesta, la condición óptima de termo-ultrasonido para la extracción de compuestos fenólicos y actividad antioxidante del residuo de zarzamora fue 90% de amplitud por 15 min.
- Se realizó una comparación de extractos (acuoso, etanólico y por termo-ultrasonido) y la extracción por termo-ultrasonido presentó mayor contenido de fenoles y actividad antioxidante.
- El yogurt fue adicionado con el extracto del residuo de zarzamora obtenido por termo-ultrasonido y presentó un aumento en el porcentaje de proteína y mayor cantidad de compuestos antioxidantes comparado con el yogurt comercial. Además, los consumidores que realizaron la prueba de preferencia en el análisis sensorial, el 50 % eligieron el yogurt adicionado con el extracto de zarzamora.

REFERENCIAS

Aadil, R.M., Zeng, X.A., Han, Z., & Sun, D.W. (2013). Effects of ultrasound treatments on quality of grape fruit juice. *Food chemistry*, 141(3), 3201-3206.

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

Adrián, J., Potus, J., Poiffait, A., & Dauvillier, P. Métodos fisicoquímicos generales. En: *Análisis nutricional de los alimentos*. Ed. Acribia, España, 2000. Capítulo 3, páginas: 41-47.

Alasalvar, C., Grigor, J.M., Zhang, D., Quantick, P.C., & Shahidi, F. (2001). Comparison of volatiles, phenolics, sugars, antioxidant vitamins, and sensory quality of different colored carrot varieties. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 49, 1410–1416.

Allgeyer, L.C., Miller, M. J., & Lee, S.-Y. (2010). Drivers of liking for yogurt drinks with prebiotics and probiotics. *Journal of Food Science*, 75(4), 212-219.

Alvarado-Carrasco, C.E., Coronado, M., Prósperi, F., & Guerra, M. (2011). Development of yogurt with antioxidant capacity made from goat (*Capra hircus*) milk and tree tomato fruit (*Cyphomandra betacea* Sendtn.). *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 2(2), 293-312.

Amr, A., & Al-Tamimi, E. (2007). Stability of the crude extracts of *Ranunculus asiaticus* anthocyanins and their use as food colourants. *Journal of Food Science and Technology*, 42, 985–991.

AOAC, 2005. Official Methods of Analysis of AOAC International, 18th ed. Gaithersburg. MD: AOAC International.

AOAC, 2005, 923.03. Official Methods of Analysis of AOAC International, 18th ed. Gaithersburg. MD: AOAC International.

AOAC, 2005, 991.20. Official Methods of Analysis of AOAC International, 18th ed. Gaithersburg. MD: AOAC International.

Araujo, P.W., & Brereton, R.G. (1996). Experimental design II. Optimization. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 15(2), 63-70.

Ares, G., Goncalvez, D., Perez, C., Reolon, G., Segura, N., Lema, P., et al. (2007). Influence of gelatin and starch on the instrumental and sensory texture of stirred yoghurt. *International Journal of Dairy Technology*, 60(4), 263-269.

Arts, M.J.T.J., Haenen, G.R.M.M., Wilms, L.C., Beetstra, S.A.J.N., Heijnen, C.G.M., Voss, H.P., et al. (2002). Interactions between flavonoids and proteins: Effect on the total antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(5), 1184–1187.

Atkinson, C.J., Nestby, R., Ford, Y.Y., & Dodds, P.A.A. (2005). Enhancing beneficial antioxidants in fruits: A plant physiological perspective. *Biofactors*, 23(4), 229–234.

Aybastier, Ö., Işık, E., Şahin, S., & Demir, C. (2013). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of antioxidant compounds from blackberry leaves using response surface methodology. *Industrial Crops and Products*, 44, 558-565.

Bakirci, I., & Kavaz, A. (2008). An investigation of some properties of banana yogurts made with commercial ABT-2 starter culture during storage. *International Journal of Dairy Technology*, 61(3), 270-276.

Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential luses. *Food Chemistry*, 99, 191–203.

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, 513-518.

Baydar, N.G., Ozkan, G., & Sagdic, O. (2004). Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (*Vitis vinifera* L.) extracts. *Food Chemistry*, 15,335–339.

Bhat, R., Kamaruddin, N.S.B.C., Min-Tze, L., & Karim, A.A. (2011). Sonication improves kasturi lime (*Citrus microcarpa*) juice quality. *Ultrasonics sonochemistry*, 18(6), 1295-1300.

Bleve, M., Ciurlia, L., Erroi, E., Lionetto, G., Longoc, L., Rescioa, L., et al. (2008). An innovative method for the purification of anthocyanins from grape skin extracts by using liquid and sub-critical carbon dioxide. *Separation and Purification Technology*, 64, 192–197.

Bezerra, M.A., Santelli, R.E., Oliveira, E.P., Villar, L.S., & Escaleira, L.A. (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76(5), 965-977.

Bocco, A., Cuvelier, M-E., Richard, H., & Berset, C. (1998). Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 2123–2129.

Boekenoogen, H.A. Analysis and characterization of oils, fat, and fat products; London, 1964.

Box, G. E., & Behnken, D. W. (1960). Some new three level designs for the study of quantitative variables. *Technometrics*, 2(4), 455-475.

Bucic-Kójico, A., Planinic, M., Tomas, S., Bilic, M., & Velic, D. (2007). Study of solid–liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. *Journal of Food Engineering*, 81, 236–242.

Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutrition Reviews* 56:317–33.

Buekens, A., Huang, H. (1998). Comparative evaluation of techniques for controlling the formation and emission of chlorinated dioxins furans in municipal waste incineration. *Journal of Hazardous Materials*.62, 1–33.

Cansino, N.C., Carrera, G.P., Rojas, Q.Z., Olivares, L.D., & García, E.A. (2013). Ultrasound Processing on Green Cactus Pear (*Opuntia ficus Indica*) Juice: Physical, Microbiological and Antioxidant Properties. *Journal of Food Processing & Technology*. 4(9): 1-6.

Carpenter, R.L., Lyon, D.H. & Hasdell, T.A. Cómo utilizar el análisis sensorial para alcanzar el objetivo. 2000. En: *Análisis sensorial en el desarrollo y control de la calidad de alimentos*. España, ed. Acribia. Capítulo 3, páginas: 33-49.

Castañeda-Ovando, A., de Lourdes Pacheco-Hernández, M., Páez-Hernández, M. E., Rodríguez, J. A., & Galán-Vidal, C. A. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food chemistry*, 113 (4), 859-871.

Castellanos, M.M., Reyman, D., Sieiro, C., and Calle, P. (2001). ESR-spin trapping study on the sonochemistry of liquids in the presence of oxygen. Evidence for the superoxide radical anion formation. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8, 17–22.

Chandan, R. C., & O'Rell, K. R. (2006). Yogurt plant: quality assurance. In R. C. Chandan (Ed.), *Manufacturing yogurt and fermented milks* (1st ed.). (pp. 256) Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd.

Cho, M.J., Howard, L.R., Prior, R.L., Clark, J.R. (2004). Flavonoid glycosides and antioxidant capacity of various blackberry and red grape genotypes determined by high-performance liquid chromatography/ mass spectrometry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 84, 1771–1782.

Cho, M. J., Howard, L. R., Prior, R. L., & Clark, J. R. (2005). Flavonol glycosides and antioxidant capacity of various blackberry and blueberry genotypes determined by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(13), 2149–2158.

Clark, J.R., Stafne, E.T., Hall, H.K. and Finn, C.E. (2007). Blackberry breeding and genetics. *Plant Breeding Reviews*, 29:19-144.

Corrales, M., García, A.F., Butz, P. and Tauscher, B. (2009). Extraction of anthocyanins from grape skins assisted by high hydrostatic pressure. *Journal of Food Engineering*, 90, 415-421.

D'Alessandro, L. G., Dimitrov, K., Vauchel, P., & Nikov, I. (2014). Kinetics of ultrasound assisted extraction of anthocyanins from *Aronia melanocarpa* (black chokeberry) wastes. *Chemical Engineering Research and Design*, 92(10), 1818-1826.

Daniel, L., Diana, E., Barragán Huerta, B. E., Vizcarra Mendoza, M. G., & Anaya Sosa, I. (2013). Effect of drying conditions on the retention of phenolic compounds, anthocyanins and antioxidant activity of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) added to yogurt. *International Journal of Food Science & Technology*, 48(11), 2283-2291.

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.

Demirdöven, A. & Baysal, T. (2009). The use of ultrasound and combined technologies in food preservation. *Food Reviews International*, 25, 1-11.

Dolatowski, Z. J., Stadnik, J., & Stasiak, D. (2007). Applications of ultrasound in food technology. *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria*, 6, 89-99.

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.

Fan-Chiang, H. J., & Wrolstad, R. E. (2010). Sugar and nonvolatile acid composition of blackberries. *Journal of AOAC International*, 93(3), 956-965.

Fang, L., WU, W.L., Gao, M.J., Zhao, H.F., Lv., L.F. & Li, W.L. (2011). Analysis of Nutrient Content and Utilization Value of Blackberry Fruit Residue. *Acta Agriculturae Jiangxi*, 4, 041.

FAO, 1993. Análisis proximales. En línea:

<http://www.fao.org/docrep/field/003/ab489s/ab489s03.htm>, fecha de consulta: 12 de abril de 2015.

Finn, C.E., Clark, J.R. (2011). Emergence of Blackberry as a World Crop. Horticultural Science News, 51(3), 13-18.

Floros, J.D., Liang, H. (1994). Acoustically assisted diffusion through membranes and biomaterials. Food Technology, 48 (12), 79–8.

Gan, C.Y., Manaf, N.H.A. & Latiff, A.A. (2010). Optimization of alcohol insoluble polysaccharides (AIPS) extraction from the *Parkia speciosa* pod using response surface methodology (RSM). Carbohydrate Polymers, 79(4), 825-831.

García, A. (2005). Evaluación in vitro e in vivo de la funcionalidad de un producto rico en antioxidantes. Tesis doctoral Europea. Facultad de Veterinaria y Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Universidad de Murcia, España.

Garzón, G.A. (2008). Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: revisión. Acta biológica Colombiana, 13(3), 27-36.

Ghafoor, K., Choi, Y. H., Jeon, J. Y., & Jo, I. H. (2009). Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from grape (*Vitis vinifera*) seeds. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57(11), 4988-4994.

Giusti, M.M., & Wrolstad, R.E. (2001). Anthocyanins, characterization and measurement with UV-visible spectroscopy, in current protocols in food analytical chemistry. New York: John Wiley & Sons (Chapter 6).

Hanrahan, G., & Lu, K. (2006). Application of factorial and response surface methodology in modern experimental design and optimization. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 36(3-4), 141-151.

Hart, F.L., Fischer, H.J. *Análisis Moderno de los Alimentos*, 1991. Editorial Acribia Zaragoza, España, capítulo 1, pág. 1 – 4.

Heinonen, M., Rein, D., Satué-Gracia, M. T., Huang, S.-W., German, J. B., & Frankel, E.N. (1998). Effect of protein on the antioxidant activity of phenolic compounds in a lecithin liposome oxidation system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(3), 917–922.

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.

Hui, L., Bo, C. & Shouzhuo, Y. (2005). Application of ultrasonic technique for extracting chlorogenic acid from *Eucommia ulmoides* Oliv. (*E. ulmoides*). *Ultrasonics Sonochemistry*, 12, 295–300.

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.

Imeson, A. (1997). *Thickening and gelling agents for food* (2nd ed.). London, UK: Blackie Academic and Professional.

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.

Jensen, S., Ostdal, H., Skibsted, L. H., & Thybo, A. K. (2011). Antioxidants and shelf life of whole wheat bread. *Journal of Cereal Science*, 53(3), 291-297.

Jian-Bing, J., Xiang-hong, L., Mei-qiang, C., & Zhi-chao, X. (2006). Improvement of leaching process of Geniposide with ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, 13, 455-462.

Jimenez M., Zambrano M., Aguilar M. (2004). Estabilidad de pigmentos en frutas sometidas a tratamiento con energía de microondas. *Información tecnológica*, 15(3).

Jing, P. & Giusti, M.M. (2005). Characterization of anthocyanin-rich waste from purple corncobs (*Zea mays L.*) and its application to color milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53:8775–8781.

Jing, W., Baoguo, S., Yanping, C., Yuan, T., & Xuehong, L. (2008). Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. *Food Chemistry*, 106, 804–810.

Kähkönen, M.P., Hopia, A.I., Vuorela, H.J., Rauha, J.P., Pihlaja, K., Kujala, T.S. & Heinonen, M. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 47(10), 3954-3962.

Kafkas, E., Kosar, M., Türemis, N., Baser, K.H.C. (2006). Analysis of sugars, organic acids and vitamin C contents of blackberry genotypes from Turkey. *Food Chemistry*, 97, 732–736.

Kapasakalidis, P.G., Rastall, R.A., & Gordon, M.H. (2006). Extraction of polyphenols from processed black currant (*Ribes nigrum L.*) residues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4016–4021.

Karaaslan, M., Ozden, M., Vardin, H., & Turkoglu, H. (2011). Phenolic fortification of yogurt using grape and callus extracts. *LWT – Food Science and Technology*, 44(4), 1065–1072.

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.

Klein, B.P. and Kurilich, A.C. (2000). Processing effects on dietary antioxidants from plant food, *Hort Science*, 35, 580–584.

Kris-Etherton, P.M., Lefevre, M., Beecher, G.R., Gross, M.D., Keen, C.L. & Etherton, T. D. (2004). Bioactive compounds in nutrition and health-research methodologies for establishing biological function: the antioxidant and anti inflammatory effects of flavonoids on atherosclerosis. *Annual Reviews of Nutrition*, 24, 511-538.

Knorr, D. (2003). Impact of non-thermal processing on plant metabolites. *Journal of Food Engineering*, 56, 131–134.

Knorr, D., Zenker, M., Heinz, V., & Lee, D.U. (2004). Applications and potential of ultrasonics in food processing. *Trends in Food Science and Technology*, 15, 261-266.

Kuskoski, E., 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.

Lee, W. J., & Lucey, J. A. (2010). Formation and physical properties of yogurt. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 23(9), 1127-1136.

Li, Z., Pan, Q., Cui, X., & Duan, C. (2010). Optimization on anthocyanins extraction from wine grape skins using orthogonal test design. *Food Science and Biotechnology*, 19(4), 1047-1053.

Lubbers, S., Decourcelle, N., Vallet, N., & Guichard, E. (2004). Flavor release and rheology behavior of strawberry fat free stirred yogurt during storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(10), 3077–3082.

Luck, G., Liao, H., Murray, N. J., Grimmer, H. R., Warminski, E. E., Williamson, M. P., Liley, T.H. & Haslam, E. (1994). Polyphenols, astringency and proline-rich proteins. *Phytochemistry*, 37, 357-371.

Lundstedt, T., Seifert, E., Abramo, L., Thelin, B., Nyström, Å., Pettersen, J., & Bergman, R. (1998). Experimental design and optimization. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 42(1), 3-40.

Luthria, D. L., & Pastor-Corrales, M. A. (2006). Phenolic acids content of 15 dry edible bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 205–211.

Mahaut, M., Jeantet, R., Brulé, G., & Schuck, P. Productos fermentados y postres lácteos. En: *Productos lácteos industriales*. Ed. Acribia, España, 2004. Capítulo 2, páginas: 23-45.

Makris, D.P., Boskou, G., Andrikopoulos, N.K. (2007). Recovery of antioxidant phenolics from white vinification solid by-products employing water/ethanol mixtures. *Bioresource Technology*, 98, 2963–2967.

Maran, J. P. & Manikandan, S. (2012). Response surface modeling and optimization of process parameters for aqueous extraction of pigments from prickly pear (*Opuntia ficus-indica*) fruit. *Dyes and Pigments*, 95(3), 465-472.

Mason, T.J. (1998). Power ultrasound in food processing-The way forward. In M.J.W. Povey, & T.J. Mason (Eds.), *Ultrasound in food processing* (pp. 105-126). London: Blackie Academic and Professional).

Mason, T., Riera, E., Vercet, A., & Lopez-Buesa, P. (2005). Application of ultrasound. In D.W. Sun (Ed.), *Emerging technologies for food processing* (pp. 323-350). California: Elsevier Academic Press.

Mazza, G. y Miniati, E. (1993). *Anthocyanins in Fruits, Vegetables and Grains*; CRC Press: Boca Raton, FL.

Mattila, P., & Kumpulainen, J.J. (2002). Determination of free and total phenolic acids in plant derived foods by HPLC and diode array detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3660–3667.

McClements, D.J. (1995). Advances in the application of ultrasound in food analysis and processing. *Trends in Food Science and Technology*, 6, 293-299.

Merken, H.M., & Beecher, G.R. (2000). Measurement of food flavonoids by high performance liquid chromatography: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 577–599.

Michael, M., Phebus, R.K., Schmidt, K.A., 2010. Impact of a plant extract on the viability of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* in non fat yoghurt. *International Dairy Journal*, 20,665–672.

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).

Moore, J.N. (1994). Blackberry breeding, management and prospects in North América. En: *Primera Reunión Internacional y Segunda Reunión Nacional de frutales nativos e introducidos con demanda Nacional e Internacional Montecillos, México*. pag.167 -178.

Morales, F.J. y Jiménez-Pérez, S. (2001). Free radical scavenging capacity of Maillard reaction products as related to colour and fluorescence. *Food Chemistry*, 72, 1119-1125.

Moure, A., Cruz, J.M., Franco, D., Dominguez, J.M., Sineiro, J., Dominguez, H., Nuñez, M.J., Parajó, J.C. (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 72, 145–171.

Müller, E., Berger, R., Blass E., Sluyts, D., & Pfennig, A. (2008). Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry, Liquid–Liquid Extraction.

Naczki, M., & Shahidi, F. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 1523–1542.

NMX-F-444-1983. Alimentos. yoghurt o leche búlgara. foods. yoghurt or bulgarian milk. Normas mexicanas. Dirección general de normas. En línea: <http://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-F-444-1983.PDF>, fecha de consulta: 12 de abril de 2015.

Nollet, L.M.L.; Handbook of food analysis; M. Dekker, New York. 1996.

NORMA Oficial Mexicana NOM-181-SCFI-2010, Yogurt-Denominación, especificaciones fisicoquímicas y microbiológicas, información comercial y métodos de prueba. En línea:

http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5167303&fecha=16/11/2010, Fecha de consulta: 20/08/14.

O'Connell, J.E., & Fox, P.F. (2001). Significance and applications of phenolic compounds in the production and quality of milk and dairy products: a review. *International Dairy Journal*, 11(3), 103-120.

Papadopoulou, A., & Frazier, R.A. (2004). Characterization of protein polyphenol interactions. *Trends in Food Science & Technology*, 15, 186-190.

Patist, A., & Bates, D. (2008). Ultrasonic innovations in the food industry: from the laboratory to commercial production. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9, 147-154.

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.

Pingret, D., Fabiano-Tixier, A.S., Bourvellec, C.L., Renard, C.M. & Chemat, F. (2012). Lab and pilot-scale ultrasound-assisted water extraction of polyphenols from apple pomace. *Journal of food engineering*, 111(1), 73-81.

Popa, V.I., Agache, C., Beleca, C., & Popa, M. (2002). Polyphenols from spruce bark as plant growth regulator. *Crop Research*, 24, 398–406

Povey, M.J.W., & McClements, D.J. (1988). Ultrasonics in food engineering. Part I: introduction and experimental methods. *Journal of Food Engineering*, 8, 217-245.

Phillips, G. O. & Williams, P. A. (2000). Handbook of hydrocolloids. Boca Raton, FL: CRC Press LLC.

Qdais, H.A., Abdulla, F., Qrenawi, L. (2010). Solid waste landfills as a source of green energy: Case study of Al Akeed erlandfill. Jordan Journal of Mechanical and Industrial Engineering, 4, 69–74.

Rafter, J.J. (2002). Scientific basis of biomarkers and benefits of functional foods for reduction of disease risk: cancer. British Journal of Nutrition, 88(S2), 219-224.

Rashidinejad, A., Birch, E. J., Sun-Waterhouse, D. & Everett, D.W. (2015). Total phenolic content and antioxidant properties of hard low-fat cheese fortified with catechin as affected by *in vitro* gastrointestinal digestion. LWT-Food Science and Technology.

Rawel, H. M., Kroll, J., & Hohland, U. C. (2001). Model studies on reactions of plant phenols with whey proteins. Nahrung/Food, 45, 72-81.

Rawson, A., Tiwari, B.K., Patras, A., Brunton, N., Brennan, C., Cullen, P.J. & O'Donnell, C. (2011). Effect of thermosonication on bioactive compounds in watermelon juice. Food Research International, 44(5), 1168-1173.

Roberfroid, M. B. (2002). Global view on functional foods: European perspectives. British Journal of Nutrition, 88(S2), S133-S138.

Robles-Ozuna, L.E y Ochoa--Martínez, L.A. (2012). Ultrasonido y sus aplicaciones en el procesamiento de alimentos. Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha, Sin mes, 109-122.

Roginsky, V. & Lissi, E.A. (2005). Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food chemistry*, 92(2), 235-254.

Rostagno, M.A., Palma, M. & Barroso, C.G. (2003). Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. *Journal of Chromatography A*, 1012, 119-128.

Russell, W.R., Scobbie L., Labat, A., Duncan, G.J. Duthie, G.G., (2008). Phenolic acid content of fruits commonly consumed and locally produced in Scotland. *Food Chemistry*. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.11.086.

Sadilova, E., Carle, R., & Stintzing, F.C. (2007). Thermal degradation of anthocyanins and its impact on color and in vitro antioxidant capacity. *Molecular nutrition & food research*, 51(12), 1461-1471.

SAGARPA, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. (2012). Boletín de prensa. Fortalece México la producción de berries, generador de empleos y nuevos mercados. En línea: <http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/boletines2/Paginas/2012B528.aspx>, fecha de acceso: 03/03/14.

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. Sistema de información de agentes promotores. (2014). Zaramora. En línea: <http://www.siap.gob.mx/zaramora/>, fecha de consulta: 29/30/14.

Siddhuraju, P. and K. Becker (2003). Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of

drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(8): 2144-2155.

Soria, A.C. and Villamiel, M. (2010). Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: A review. *Trends in Food Science and Technology* 21(7): 323-331.

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 and Technology*, 12, 401–413.

Schieber, A., Hilt, P., Streker, P., Endreb, H.U., Rentschler, C., & Carle, R. (2003). A new process for the combined recovery of pectin and phenolic compounds from apple pomace. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 4, 99–107.

Shahidi, F. & Naczk, M. (1995). Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications. Technomic Publishing., Inc. pag: 247-260.

Shi, J., Yu, J., Pohorly, J., Young, J. C., Bryan, M., & Wu, Y. (2003). Optimization of the extraction of polyphenols from grape seed meal by aqueous ethanol solution. *Journal of Food Agriculture and Environment's* 1(2).

Shukla, T.P. (1992). Microwave ultrasonics in food processing. *Cereal Food World*, 37, 332-333.

Skriver, A., Baek-Madsen, C., & Jelle, B. (1997). Texture characterization of yoghurt fermented with different bacterial cultures. In: IDF symposium, Vicenza, Italy.

Stintzing, F. C., Herbach, K. M., Mosshammer, M. R., Carle, R., Yi, W., Sellapan, S., Akoh, C. C., Bunch, R. y 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.

Strack, D. & Wray, V. The Anthocyanins. In: HARBONE JB, editor. *The Flavonoides. Advances in Research Since 1986*. Boca Raton FL: CRC Press; 1994.

Strick, B. 1996. Blackberry production in Oregon. University of Idaho. U.S.A. p. 5

Strik, B.C. Berry crops: worldwide area and production systems. In *Berry Fruit Value Added Products for Health Promotion*, 1st ed.; Zhao, Y., Ed.; CRC: Boca Raton, FL, 2007. Vol. 1.,pp 3-49.

Strik, B.C., Clark, J.R., Finn, C.E., & Bañados, M.P. (2007). Worldwide blackberry production. *Hort Technology*, 17(2), 205-213.

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.

Sun-Waterhouse, D., Zhou, J., & Wadhwa, S. S. (2013). Drinking yoghurts with berry polyphenols added before and after fermentation. *Food Control*, 32(2), 450-460.

Talcott, S.T. Chemical components of berry fruits. En: *Berry Fruit Value Added Products for Health Promotion*, 1st ed.; Zhao, Y., Ed.; CRC: Boca Raton, FL, 2007; Vol. 1, pp 51-72.

Tamine, A.Y. (2006). *Probiotics dairy products*. Oxford, UK: Blackwell Publication.

Tamime, A.Y., & Robinson, R. K. (1999). *Yoghurt: Science and technology* (2nd ed.).

Boca Raton, FL: CRC Press LLC.

Teles, C.D. & Flores, S.H. (2007). The influence of additives on the rheological and sensory properties of nonfat yoghurt. *International Journal of Dairy Technology*, 60(4), 270-276.

Tiwari, B.K., Muthukumarappan, K., O'Donnell, C.P., & Cullen, P.J. (2008). Color degradation and quality parameters of sonicated orange juice using response surface methodology. *LWT Food Science and Technology*, 41, 1876–1883.

Tiwari, B.K., O'Donnell, C.P., & Cullen, P.J. (2009). Effect of sonication on retention of anthocyanins in blackberry juice. *Journal of Food Engineering*, 93 (2), 166-171.

Tiwari, B. K., Patras, A., Brunton, N., Cullen, P. J., & O'Donnell, C. P. (2010). Effect of ultrasound processing on anthocyanins and color of red grape juice. *Ultrasonics sonochemistry*, 17(3), 598-604.

Toma, M., Vinatoru, M., Paniwnyk, L., Mason, T.J. (2001). Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction. *Ultrasonics sonochemistry*, 8, 137–142.

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(1), 356-365.

USDA, 2010. U.S. Department of Agriculture (USDA) national nutrient database for standard reference, en línea: <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/>. Fecha de acceso: 23/04/14.

Valero, M., Recrosio, N., Saura, D., Muñoz, N., Martí, N., & Lizama, V. (2007). Effects of ultrasonic treatments in orange juice processing. *Journal of Food Engineering*, 80(2), 509-516.

Vilkhu, K., Mawson, R., Simons, L. & Bates, D. (2008). Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry - A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9, 161-169.

Viljanen, K., Kylli, P., Kivikari, R., & Heinonen, M. (2004). Inhibition of protein and lipid oxidation in liposomes by berry phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(24), 7419–7424.

Vinatoru, M., Toma, M., Radu, O., Filip, P.I., Lazurca, D., and Mason, T.J. (1997). The use of ultrasound for the extraction of bioactive principles from plant materials. *Ultrasonics sonochemistry*, 4, 135-139.

Vinatoru, M. (2001). An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8, 303-313.

Von Gadov, A., Joubert, E. & Hansmann (1997). Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of Rooibos tea (*Aspalathus linearis*), α -tocopherol, BHT, and BHA. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 45, 632–638.

Vulic, J.J., Tumbas, V.T., Savatović, S.M., Đilas, S.M., Četković, G.S., & Čanadanović-Brunet, J.M. (2011). Polyphenolic content and antioxidant activity of the four berry fruits pomace extracts. *Acta periodica technologica*, (42), 271-279.

Wagner, G.J. Cellular and Subcellular Location in Plant Metabolism. In: CREASY L, HRAZDINA G. editors. Recent advances in Phytochemistry. New York: Plenum Press; 1982. p. 1-45.

Walstra, P., Geurts, T.J., Noomen, A., Jellema, & Van Boekel, M.A.J.S. Leches fermentadas. 2001. En: Ciencia de la leche y tecnología de los productos lácteos. España, ed. Acribia. Capítulo 20, páginas: 532-543.

Wallace, T.C., & Giusti, M.M. (2008). Determination of color, pigment, and phenolic stability in yogurt systems colored with nonacylated anthocyanins from *Berberis boliviana* L. as compared to other natural/synthetic colorants. *Journal of Food Science*, 73(4), 241–248.

Wang, L., & Weller, C. L. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science and Technology*, 17, 300–312.

Wolfe, K.L., & Liu, R.H. (2003). Apple peels as a value-added food ingredient. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1676–1683.

Wu, J., Gamage, T. V., Vilku, K. S., Simons, L. K., & Mawson, R. (2008). Effect of thermosonication on quality improvement of tomato juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9, 186–195.

Wrolstad, R.E. (2004). Anthocyanin pigments—Bioactivity and coloring properties. *Journal of Food Science*, 69(5), 419-425.

Xin-lei, Y.A.N.G., & Wu, D.I.N.G. (2013). Study on Application of Tea Polyphenols Extracts in Preservation of Chilled Pork Meat. *Food Research and Development*, 14, 038.

Yokozawa, T., Chen, C.P., Dong, E., Tanaka, T., Nonaka, G.I., & Nishioka, I. (1998). Study on the inhibitory effect of tannins and flavonoids against 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Biochemical Pharmacology*, 56, 213–222.

Zafra-Rojas, Q.Y., Cruz-Cansino, N., Ramírez-Moreno, E., Delgado-Olivares, L., Villanueva-Sánchez, J., & Alanís-García, E. (2013). Effects of ultrasound treatment in purple cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) juice. *Ultrasonics sonochemistry*, 20(5), 1283-1288.