



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química

“Estudio para establecer el mecanismo de reversión
de color inducido por vibración en zarzamora (*Rubus*
sp.)”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Doctor en Ciencias de los Alimentos

Presenta

M en C Ángel Ramón Flores Sosa

Dirigido por

Dr. Edmundo M. Mercado Silva

Querétaro, Qro. Junio del 2023



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



Estudio para establecer el mecanismo de reversión de
color inducido por vibración en zarzamora (Rubus sp.)

por

Ángel Ramón Flores Sosa

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0
Internacional](#).

Clave RI: FQDCC-283745



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Doctorado en Ciencias de los Alimentos

“Estudio para establecer el mecanismo de reversión de color inducido por vibración en
zarzamora (*Rubus sp.*)”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Doctor en Ciencias de los Alimentos

Presenta

M en C Ángel Ramón Flores Sosa

Dirigido por

Dr. Edmundo M. Mercado Silva

SINODALES

Dr. Edmundo M. Mercado Silva

Presidente

Dra. Dulce María Rivera Pastrana

Secretario

Dr. Luis Eugenio González de la Vara

Vocal

Dr. Mamadou Moustapha Bah

Suplente

Dr. Gerardo Manuel Nava Morales

Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.

Junio 2023

México

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DE ESTUDIANTE

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras.

Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.

A handwritten signature in blue ink, consisting of several overlapping loops and strokes, positioned centrally on the page.

Ángel Ramón Flores Sosa

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Fisiología y Bioquímica Poscosecha de Frutas y Hortalizas de la Universidad Autónoma de Querétaro, en el Laboratorio Nacional de Ciencias para la Investigación y Conservación del Patrimonio Cultural (LANCIC IF-UNAM) bajo la supervisión del Dr. José Luis Ruvalcaba Sil, en el Laboratorio de Microscopía del CINVESTAV-IPN Irapuato bajo la supervisión del Dr. Lino Sánchez Segura y el Dr. Luis González de la Vara y en el Instituto Mexicano del Transporte bajo la supervisión del Dr. Manuel Fabela Gallegos.

Este trabajo de investigación forma parte del proyecto FONDEC-UAQ-2022: “Implementación de tecnologías no destructivas para predecir niveles críticos de metabolitos clave relacionados con la inducción de diferentes tipos de estrés”, dirigido por el Dr. Edmundo Mercado Silva, profesor-investigador de la UAQ.

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)**, por la beca de manutención durante todo el doctorado.

A la **Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro**, por permitirme continuar mis estudios.

Al **Dr. Edmundo Mercado**, por todo su tiempo, apoyo y dedicación que permitieron concluir de forma satisfactoria este proyecto. Muchas gracias Dr. por su ejemplo de pasión y gusto por la investigación. Gracias Dr. por todos sus consejos y por guiarme durante todo este proceso. Gracias Dr. por haber sido un excelente director y amigo.

A los miembros de mi comité: **Dr. Gerardo Nava, Dra. Dulce Rivera, Dr. Moustapha y Dr. de la Vara**, por sus valiosas aportaciones y acertadas observaciones que permitieron alcanzar los objetivos de la investigación, por todo el tiempo que dedicaron en la resolución de dudas y revisión de mi escrito. Muchas gracias por apoyarme en alcanzar mis metas profesionales.

Al **Dr. José Luis Ruvalcaba Sil-LANCIC IF-UNAM** y a todo su equipo de trabajo, especialmente a los **Doctores Angélica García Bucio y Edgar Casanova-González**, por permitirme realizar parte del trabajo experimental en las instalaciones de su laboratorio, y por toda la asistencia y apoyo recibido en los experimentos de espectroscopía de Raman.

Al **Dr. Lino Sánchez Segura-CINVESTAV IRAPUATO**, por todo su apoyo en la realización y análisis de microscopía multifotónica.

Al **Dr. Manuel Fabela Gallegos** y a **Mauricio Cruz-IMT**, por sus aportes en la construcción y validación del equipo vibratorio portátil.

Al **Dr. Eloy Rodríguez**, por su valiosa ayuda en la interpretación de los espectros Raman.

A la **Dra. Viridiana Tejada-ITESM**, por su apoyo en la aplicación del tratamiento de Altas Presiones Hidrostáticas.

Al **Dr. Carlos Saldaña**, por su ayuda en los análisis de microscopía de fluorescencia.

A la **Dra. Elia Nora y Dra. Jimena**, por apoyarme en alcanzar mis metas profesionales. Por todos sus consejos y por su amistad.

A mis compañeros y queridos amigos del laboratorio del poscosecha:

Diana y Nayeli muchas gracias por iniciar este proyecto conmigo, por compartirme sus conocimientos, por apoyarme constantemente y por su valiosa amistad. Muchas gracias *Reversion team*.

Cristian, Esther, Lupita y Tsiseje muchas gracias por toda la ayuda que me brindaron tanto dentro como fuera del laboratorio; gracias por su amistad.

Paula, Vanesa y Judith muchas gracias por ser excelentes alumnas, compañeras y amigas. Gracias por toda la ayuda que me proporcionaron y por su amistad.

A mis grandes amigos:

Arely, Christopher, Josué y Vane gracias por estar siempre apoyándome y motivándome, por todos los buenos momentos, por formar parte importante de esta etapa de mi vida. Muchas gracias por ser excelentes amigos.

A los chicos de servicio social y de estancia que me apoyaron:

Camila, Carlita, Charlie, Miguel y Sandra muchas gracias por su apoyo en la realización de la parte experimental de mi proyecto.

Aldo, Borja y Fanny muchas gracias por su apoyo en la obtención de los protoplastos y por su gran ejemplo de interés por la ciencia.

A toda mi familia que siempre me ha apoyado, especialmente a mis tíos **Nico y Marina**, a mis primos **Jesús y Fanny** y mi sobrino **Mati** que me recibieron y apoyaron en mi adaptación a Qro, y que siempre están al pendiente de mí, aunque me pierda un poco. Muchas gracias.

A todos mis amigos que hicieron más ligero este camino, especialmente a **Mayra, Laura Karen, Joskua, Atalia, Ángel, Ema y Areli**.

DEDICATORIAS

Este trabajo lo dedico a mis amados padres, **Ramón y Lupita**, por el amor incondicional que siempre he obtenido de ellos, por apoyarme en cumplir todas mis metas, por ser mi mayor ejemplo de vida y por ser mi más grande motor que me impulsa a salir adelante. Gracias por ser los mejores padres del mundo. Los amo mucho.

A mi hermana **Rosita**, por ser mi mayor apoyo, por todo el amor que me brindas, por cuidarme y estar al pendiente de mí. Te quiero mucho hermanita.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1 Taxonomía y descripción botánica del fruto de zarzamora	4
2.2 Importancia económica	6
2.3 Contenido nutricional del fruto	8
2.4 Compuestos fenólicos	9
2.4.1 Ácidos fenólicos	10
2.4.2 Taninos	10
2.4.3 Flavonoides	11
2.4.4 Antocianinas	11
2.5 Inclusiones Vacuolares de Antocianinas (IVA)	17
2.6 Reversión de color	19
2.7 Factores que influyen en la reversión de color en frutos de zarzamora	20
2.7.1 Genotipo	20
2.7.2 Temperatura de almacenamiento	24
2.7.3 Momento de la cosecha	24
2.7.4 Fertilización con nitrógeno	25
2.7.5 Transporte	25
3. HIPÓTESIS	27
4. OBJETIVOS	28
5. METODOLOGÍA	29
5.1 Estrategia experimental	29
5.2 Modelo vibratorio para inducir la Reversión de Color (RC)	30
5.2.1 Equipo portátil de vibración para inducir la RC	30
5.1.2 Material biológico	32
5.1.3 Validación del método de vibración	32
5.1.4 Evaluación del método vibratorio en diferentes variedades de zarzamora ..	32
5.1.5 Inspección visual	32
5.1.6 Análisis de color	33
5.1.7 Análisis estadístico	33
5.2 Método de Altas Presiones Hidrostáticas para inducir la RC	33
5.2.1 Material biológico	33
5.2.2 Inducción de RC con altas presiones hidrostáticas	33

5.2.3	Análisis de homogeneidad de RC	34
5.2.4	Análisis estadístico	34
5.3	Cambios de la concentración de antocianinas de frutos revertidos y no revertidos durante el almacenamiento	34
5.3.1	Material biológico	35
5.3.2	Relación entre RC y contenido de antocianinas	35
5.3.3	Análisis de contenido de antocianinas	35
5.3.4	Análisis estadístico	36
5.4	Análisis microestructural de drupas de zarzamora	37
5.4.1	Microscopía Multifotónica.....	37
5.4.2	Obtención de protoplastos	38
5.4.3	Fluorescencia de protoplastos	38
5.5	Experimento de copigmentación <i>in vitro</i> de soluciones de antocianinas ..	38
5.5.1	Semipurificación de antocianinas.....	38
5.5.2	Preparación de soluciones de copigmentos	39
5.5.3	Copigmentación	39
5.6	Espectroscopía RAMAN	39
5.6.1	Fundamentos del uso de esta técnica.....	39
5.6.2	Procedimiento metodológico para el análisis por espectroscopia RAMAN de protoplastos de zarzamora no revertida y revertida.	41
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
6.1	Modelo vibratorio para inducir RC en frutos de zarzamora	43
6.1.1	Eficacia del sistema vibratorio.....	43
6.2	Uso de altas presiones para inducir RC en frutos de zarzamora.....	49
6.3	Estudio de correlación entre la RC y los cambios en el contenido de antocianinas	53
6.4	Cambios de los aglomerados de antocianinas en la RC	56
6.5	Participación de la copigmentación en la RC.....	61
6.6	Cambios moleculares de las antocianinas durante la RC. Análisis por espectroscopía Raman.....	65
7.	CONCLUSIONES	75
8.	REFERENCIAS	77

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Taxonomía de la zarzamora.	4
Cuadro 2. Producción de zarzamora por entidad federativa en el año 2021.....	7
Cuadro 3. Contenido nutricional del fruto de zarzamora.	8
Cuadro 4. Contenido de micronutrientes en zarzamora.	9
Cuadro 5. Efecto de la variedad en la presencia de reversión de color en zarzamora.	20
Cuadro 6. Bandas específicas del espectro RAMAN en el rango de 700 a 1700 cm ⁻¹ de protoplastos de frutos de zarzamora no revertida y revertida	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Flor de zarzamora.	5
Figura 2. Etapas de desarrollo del fruto de zarzamora.....	6
Figura 3. Producción nacional de zarzamora en el periodo 2012-2021.	7
Figura 4. Cianidina 3-glucósido	12
Figura 5. Efecto de la glicosilación en el color de las antocianinas extraídas de col roja, zanahoria y sorgo negros.	13
Figura 6. Mecanismos de interacción mediante los cuales se lleva a cabo la copigmentación.....	14
Figura 7. Reacciones químicas de malvidina 3-glucósido en medios con diferentes pH.....	16
Figura 8. IVA en células de pétalos de <i>Eustoma grandiflorum</i> y <i>Dianthus caryophyllus</i>	17
Figura 9. Modelo de la formación del aglomerado de antocianinas por microautofagia.	18
Figura 10. Reversión de color en frutos de zarzamora.....	19
Figura 11. Microestructura de drupa no revertida (A) y revertida (B).	22
Figura 12. Inducción de reversión de color en frutos de zarzamora por efecto de la vibración.....	25
Figura 13. Estrategia experimental para identificar el mecanismo de reversión de color en frutos de zarzamora.	30
Figura 14. Elementos del sistema de vibración portátil.	31
Figura 15. Efecto de los tiempos de vibración (10 Hz; 0.53 g) en la generación de RC en frutos de zarzamora	44
Figura 16. La vibración producida por el equipo vibratorio portátil induce la RC en diferentes variedades de zarzamora.	45
Figura 17. El equipo portátil de vibración permite evaluar la susceptibilidad a la RC de diferentes variedades.....	46
Figura 18. Las variedades de zarzamora presentan diferente susceptibilidad a la RC durante su almacenamiento a 1 °C.....	48
Figura 19. La RC es inducida por altas presiones hidrostáticas.....	50

Figura 20. El tratamiento con altas presiones hidrostáticas es un método para inducir la RC de manera homogénea.....	52
Figura 21. La reversión de color en la fruta de zarzamora es un defecto permanente.....	54
Figura 22. La Reversión de Color no está relacionada con la reducción del contenido de antocianinas.	55
Figura 23. La vibración que genera la RC induce la pérdida de membranas en los frutos de zarzamora.....	57
Figura 24. La RC se asocia con la pérdida de aglomerados de antocianinas. Autofluorescencia de antocianinas en epidermis de drupas de zarzamora A) no revertida y B) revertida.....	58
Figura 25. Cambios en los aglomerados intracelulares de antocianinas observados en protoplastos extraídos de frutos A) no revertidos y B) revertidos.	59
Figura 26. La ruptura de aglomerados intracelulares por sonicación genera cambio de color en las antocianinas.	60
Figura 27. Las antocianinas de frutos de zarzamora no revertidas presentan mayor intensidad en emisión de fluorescencia que las antocianinas de frutos revertidos.	62
Figura 28. Efecto de la copigmentación y del pH en los espectros de emisión de fluorescencia de antocianinas de zarzamora.	64
Figura 29. Espectro Raman de protoplastos de frutos no revertidos (línea sólida negra) y revertidos (línea sólida roja) en el intervalo de 1400 a 1700 cm^{-1} ...	68
Figura 30. Espectro Raman de protoplastos de frutos no revertidos (línea sólida negra) y revertidos (línea sólida roja) en el intervalo de 1200 a 1500 cm^{-1} ...	71
Figura 31. Espectro Raman de protoplastos de frutos no revertidos (línea sólida negra) y revertidos (línea sólida roja) en intervalo de 1000 a 1300 cm^{-1}	72
Figura 32. Espectro Raman en intervalo de 700 a 1000 cm^{-1} de protoplastos de frutos no revertidos (línea sólida negra) y revertidos (línea sólida roja).	73
Figura 33. Mecanismo propuesto por el cual se genera la RC en zarzamora. .	74

RESUMEN

La Reversión de Color (RC) es un desorden fisiológico en el cual las drupas del fruto de zarzamora cambian de color negro a rojo. El objetivo del presente trabajo de investigación fue identificar el mecanismo por el cual se genera la RC inducida por vibración. Para alcanzar este objetivo, se construyó un equipo vibratorio que permita reproducir la vibración que se genera durante el transporte. La inspección visual y el análisis de color mostraron que los frutos vibrados por 5 min presentaron RC. A los frutos no revertidos y revertidos se les analizó el contenido de antocianinas por UV-VIS y HPLC. El análisis de antocianinas mostró que la RC no está asociada con una disminución en el contenido de antocianinas. Por lo que con muestras revertidas y no revertidas se prepararon protoplastos para su observación en microscopía visible y multifotónica, y para su análisis por espectroscopía Raman. El análisis mediante microscopía multifotónica reveló que en los frutos con RC existe ruptura de membranas intracelulares y dispersión de antocianinas. También, en los protoplastos se demostró que la ruptura de los aglomerados de antocianinas genera que estos pigmentos cambien de color morado oscuro a rojo. Mediante la espectroscopía de Raman *in situ* se comprobó que las antocianinas en los frutos no revertidos presentan una estructura de base quinoidal de color azul debido a que se encuentran en un pH cercano a la neutralidad; por otro lado, las antocianinas de los frutos revertidos presentan una estructura de catión flavilio de color rojo, debido a que fueron liberadas a un medio de pH ácido. Estos resultados señalan que el mecanismo por el cual se genera la RC es: el daño mecánico de vibración rompe la estructura de los aglomerados liberando las antocianinas contenidas en un medio de pH neutro al medio vacuolar ácido, provocando la formación del catión flavilio que da el característico color rojo de las antocianinas y generando la RC del fruto. En el texto se discuten con mayor profundidad las bases fisicoquímicas de este mecanismo.

Palabras clave: zarzamora, reversión de color, antocianinas, vibración, espectroscopía Raman.

ABSTRACT

Red Drupelet Reversion (RDR) is a postharvest physiological disorder in which blackberry drupelets change from black to red color. Based on this, the objective of this research was to identify the mechanism by which the RDR, induced by vibration, is generated. To achieve this objective, a portable vibrator system capable of reproducing at a laboratory level the vibration generated during transport was built. Visual inspection and color analysis showed that fruits vibrated for 5 min presented RDR. Non-reverted and reverted fruits were analyzed for anthocyanin content by UV-VIS and HPLC. Anthocyanin analysis revealed that RDR is not associated with a decrease in anthocyanin concentration. Due to, from non-reverted and reverted drupelet cell protoplasts were extracted, and they were evaluated with optical and multiphotonic microscopy, and analyzed by Raman spectroscopy. Multiphoton microscopy analysis revealed that reverted fruits showed loss of cellular and internal membranes, and anthocyanins were dispersed in cell medium. Also, in protoplasts, it was shown that rupture of anthocyanins agglomerates causes that anthocyanin change from dark purple to red color. By Raman spectroscopy, it was corroborated that anthocyanins in non-reverted fruits present a quinoidal structure, indicating that they are in a medium with neutral pH, while anthocyanins of reverted fruits present a flavylium cation structure, indicating that anthocyanins are in a medium with acidic pH. These results indicated that the RDR mechanism is: mechanical damage induced by vibration breaks structure of agglomerates, releasing anthocyanins contained in a neutral pH medium into acid vacuolar medium, this cause formation of flavylium cation that gives the characteristic red color of anthocyanins and generating the blackberry RDR. Text discusses in greater depth physicochemical bases of this mechanism.

Key words: blackberry, red drupelet reversion, anthocyanin, vibration, Raman spectroscopy.

1. INTRODUCCIÓN

La Reversión de Color (RC) en los frutos de zarzamora es un desorden fisiológico poscosecha en el cual las drupas maduras (de color negro) cambian a un color rojo similar al que presenta el fruto en estado inmaduro (Pérez-Pérez *et al.*, 2016; Segantini *et al.*, 2017). Este defecto visual genera el rechazo de los frutos en los mercados de destino, que se traduce en pérdidas económicas equivalentes al 5% del valor de la producción total de zarzamora (Dunteman, 2019; Edgley *et al.*, 2020; Pérez-Pérez *et al.*, 2016).

Una de las principales causas que genera la RC es el daño mecánico. Se ha reportado que las malas prácticas de cosecha generan hasta un 70% de RC (Edgley *et al.*, 2019a); por otra parte, la vibración que genera el transporte comercial de la zarzamora también se ha relacionada con la RC (Fernando *et al.*, 2019; Madrid & Beaudry, 2020). En nuestro laboratorio trabajando con la variedad Tupi, se identificó que un intervalo de frecuencias de 8 - 14 Hz y amplitud de 0.5 g induce una condición de rebote en los frutos, que genera el daño mecánico responsable de la RC (Pérez-Pérez *et al.*, 2016), identificándose que el daño mecánico está directamente asociado con dicho fenómeno. No obstante, el mecanismo molecular por el cual ocurre la RC se desconoce.

Algunos autores observaron que, durante el almacenamiento de los frutos, se generó la RC y se asoció con una reducción de hasta el 60 % del contenido de antocianinas en las variedades 'Chester', 'Ouachita', 'Triple Crown' y 'Apache' (Edgley *et al.*, 2020; Kim *et al.*, 2019; Park *et al.*, 2023). No obstante, para inducir la RC se almacenaron los frutos durante periodos prolongados (entre 1 y 14 días) sin controlar el momento preciso en que apareció el desorden, por lo que no se dio evidencia que la reducción en el contenido de antocianinas fuese el responsable del cambio de coloración observada en la RC.

Además de los cambios en el contenido de antocianinas, también pueden estar involucrados otros mecanismos que provoquen la RC, como las interacciones intermoleculares de las moléculas de antocianinas con copigmentos, así como el cambio de pH a nivel celular que pudiera provocar el cambio de color en las

moléculas. Las antocianinas pueden proporcionar diferente coloración dependiendo de los compuestos con los que se encuentren asociadas (copigmentos) (Trouillas *et al.*, 2016). Por ejemplo, las antocianinas en crisantemos (*Chrysanthemum morifolium*) pueden aportar diferente coloración, desde tonalidad rosa hasta azul intenso, dependiendo de las interacciones que presenten con otros compuestos como ácidos fenólicos, flavonoides, iones metálicos u otras antocianinas (Noda *et al.*, 2017); por lo que, con base en esta información, la copigmentación podría ser lo que provoque la RC del fruto de zarzamora.

Respecto al pH, ha sido ampliamente documentado que, en general, la estructura de la cianidina 3-O glucósido es dependiente del pH del medio en el que se encuentre, y este cambio estructural afecta el color que presentan esta molécula (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009); por ejemplo, a pH ácido, menor de 3, la antocianina adquiere una forma de catión flavilio con coloración roja; mientras que, a pH cercano a la neutralidad, la antocianina presenta una forma quinoidal, con coloración azul (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009). Esto parece sugerir que la RC sea provocada por un cambio del pH de las antocianinas a nivel subcelular.

En el Laboratorio de Fisiología y Bioquímica Poscosecha de la UAQ se realizan esfuerzos por identificar el mecanismo químico o fisicoquímico por el cual se presenta la RC. Se ha observado que la vibración produce la ruptura de la estructura celular del fruto (Soto-Magaña, 2020) lo que permite plantear que, probablemente, el daño mecánico podría propiciar cambios en las estructuras celulares donde se almacenan las antocianinas, modificando las interacciones intermoleculares o el pH del medio en que se encuentren, generando la RC.

Para abordar esos aspectos de la investigación, fue necesario desarrollar un procedimiento estandarizado mediante el cual se pudiera inducir la RC y obtener las muestras necesarias para estudiar su mecanismo.

En este trabajo, se planteó investigar si el contenido de antocianinas, la copigmentación o el cambio de pH intracelular podrían explicar el fenómeno de la RC en los frutos de zarzamora. Identificar este mecanismo ayudará a generar

estrategias tecnológicas para el adecuado manejo pre- y poscosecha que eliminen o reduzcan este problema.

2. ANTECEDENTES

2.1 Taxonomía y descripción botánica del fruto de zarzamora

Las zarzamoras pertenecen a la familia de las rosáceas, género *Rubus* y subgénero *Rubus*. Este subgénero agrupa a 12 secciones (*Allegheniesis*, *Arguti*, *Caesii*, *Canadenses*, *Corylifolii*, *Cuneifolii*, *Flagellaris*, *Hispidi*, *Persistentes*, *Rubus*, *Setosi* y *Ursini*), de las cuales se han generado las variedades de zarzamora que conocemos en el mercado (Clark *et al.*, 2007). En el Cuadro 1, se muestra la taxonomía de la planta de zarzamora.

Cuadro 1. Taxonomía de la zarzamora.

Reino	Plantae
Subreino	Trachebiota
Superdivisión	Spermatophyta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Rosidae
Orden	Rosal
Familia	Rosáceae
Género	<i>Rubus</i>
Especie	<i>fruticosus</i>

Se han desarrollado un gran número de variedades de zarzamora, atendiendo a la necesidad de adaptar a la planta a distintas condiciones ambientales, aumentar su productividad, su resistencia a enfermedades y plagas y mejorar las características sensoriales del fruto (firmeza, tamaño y contenido de azúcares) (Strik *et al.*, 2007).

En México, la variedad Brazos, desarrollada en Texas, fue la más importante en la década de los 90's. Sin embargo, en 2002 se introdujo la variedad Tupi,

desarrollada en Brasil por el EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria), la cual presenta mayor vida de anaquel, mejores características sensoriales y bajos requerimientos de horas frío; debido a lo anterior, es la variedad más cultivada en México y se produce entre los meses de septiembre a mayo (Clark *et al.*, 2007). En contraste, diferentes empresas dedicadas a la exportación están impulsando sus programas de mejoramiento genético para lograr variedades con mayor contenido de sólidos solubles, mejor firmeza, mayor tamaño, resistencia a enfermedades y mayor resistencia a la reversión de color (Clark *et al.*, 2007). No obstante, estas variedades son propiedad de dichas empresas y solo se producen a nivel comercial mediante contratos empresa-productor. Ejemplos de estas variedades son “Dasha”, “Vanessa”, “Elvira”, “Aketzalli”, “Amelali” y “Madeleine”.

Las distintas variedades de la planta de zarzamora pueden presentar diferentes hábitos de crecimiento como: erecto, semi erecto y postrado (Muratalla-Lúa, 2013). Su tallo puede crecer hasta 3 m y puede presentar o no espinas. Tienen un ciclo de crecimiento bianual. El desarrollo de la planta inicia cuando un brote emerge del suelo, convirtiéndose en primocaña. Después de un periodo de letargo, las cañas vegetativas florecen para dar fruto (floricañas) (Clark *et al.*, 2007). Sus hojas son trifoliadas y/o pentafoliadas de color verde oscuro en el haz y menos oscuro en el envés (Strik & Vance, 2017).

La flor se desarrolla en racimos terminales y laterales; está conformada de cinco pétalos de color blanco, violeta o rosa (Figura 1), un receptáculo con múltiples ovarios, estilos y estigmas, y a partir de cada uno de ellos se desarrolla un fruto o drupeola con características estructurales de una drupa (Strik & Vance, 2017).



Figura 1. Flor de zarzamora.

Dado que cada ovario es fecundado de forma independiente, cada drupeola es un fruto independiente, aunque esté unido a un receptáculo único. El ciclo de desarrollo del fruto se lleva a cabo en un periodo de 40 a 60 días después de la polinización. Durante su crecimiento, se aprecian tres fases: la primera caracterizada por una rápida división celular y síntesis de clorofila; en la segunda etapa, la división celular es más lenta, se forma el embrión y el endocarpio se endurece, disminuye la concentración de clorofila e inicia la síntesis de antocianinas; por último, en la última fase se incrementa la síntesis de antocianinas que dan la coloración negra típica de este fruto (Figura 2). Al finalizar esta etapa, se tiene un fruto que pesa entre 3 y 12 g, con forma elipsoidal conformado por alrededor de 50 a 100 drupeolas agregadas en un receptáculo (Jennings, 1988).



Figura 2. Etapas de desarrollo del fruto de zarzamora.

2.2 Importancia económica

La producción nacional de zarzamora se ha incrementado considerablemente en los últimos años, mostrando el mayor aumento en el 2016, cuando la producción superó en 100% a la del año anterior (Figura 3). Para el año 2017, México se convirtió en el primer productor mundial de zarzamora con 270,399 toneladas, que representó el 25% de la producción mundial (FAOSTAT, 2018). Este notable incremento en la producción se ha debido, entre otros factores, al uso generalizado de producción en macro túneles que incrementaron los rendimientos por hectárea cultivada, además de promover un mejor control del crecimiento, de plagas y enfermedades. La implementación de este sistema de producción y sistema de riego ha facilitado su cultivo en otras regiones del país;

por ello, los estados de Jalisco, Colima, Baja California y Guanajuato han incrementado su volumen de producción en 50% en los últimos 5 años. No obstante, el estado de Michoacán concentra casi la totalidad de la producción nacional, aportando 260,143 ton., que representaron el 97.7% (Cuadro 2) (SIAP, 2022).

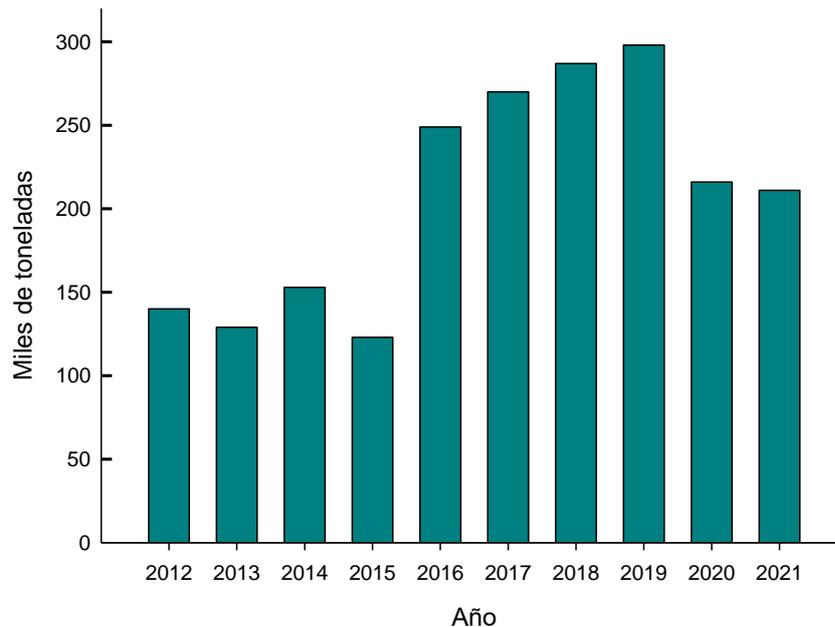


Figura 3. Producción nacional de zarzamora en el periodo 2012-2021.
Fuente: SIAP, 2022

Debido a la actual demanda en el mercado internacional por este fruto, el mayor porcentaje de la producción nacional se destina para su exportación en fresco. Estados Unidos es el principal importador de zarzamora mexicana; aproximadamente el 93% del total exportado por México se destina a este país. En 2022, se exportaron 782,086 toneladas de zarzamora a Estados Unidos, con valor de 653 millones de dólares (USDA, 2022).

Cuadro 2. Producción de zarzamora por entidad federativa en el año 2021.

Entidad federativa	Volumen (ton.)
Michoacán	260,143
Jalisco	7,566

Colima	1,670
Baja California	722
Estado de México	123
Guanajuato	59
Morelos	36
Querétaro	33
Veracruz	17
Ciudad de México	16

2.3 Contenido nutricional del fruto de zarzamora

El fruto de zarzamora está formado principalmente por agua, casi el 90% de su composición. De los macronutrientes, los carbohidratos son los más abundantes, por lo que es rico en fibra y azúcares, de los cuales la glucosa y la fructosa son los principales azúcares (Cuadro 3) (Talcott, 2007). También presenta alta concentración de ácidos orgánicos, particularmente cítrico y málico con concentración que oscila de 1004.26 a 1739.52, y de 145.43 a 478.10 mg 100 g⁻¹, respectivamente (Mikulic-Petkovsek *et al.*, 2012). Estos compuestos, junto con el ácido ascórbico, son responsables del bajo pH que presenta el fruto (entre 2.29 y 2.92) (Horvitz *et al.*, 2017).

Cuadro 3. Contenido nutricional del fruto de zarzamora.

Componente	g 100 g⁻¹
Humedad	88.2
Proteína	1.39
Lípidos	0.49
Cenizas	0.37
Carbohidratos	9.61
Fibra	5.30
Azúcares	4.31
Sacarosa	0.07
Glucosa	2.31

Fructosa	2.40
Maltosa	0.07
Galactosa	0.03

Respecto a los micronutrientes (vitaminas y minerales), de acuerdo con el Cuadro 4, se observa que la zarzamora es rica en ácido ascórbico, folatos, Vitaminas A y K, además de potasio, fósforo y magnesio (de Souza *et al.*, 2014; Talcott, 2007).

Cuadro 4. Contenido de micronutrientes en zarzamora.

Vitaminas	mg 100 g⁻¹	Minerales	mg 100 g⁻¹
Ácido ascórbico	21.00	Calcio	29.00
Tiamina	0.02	Hierro	0.62
Riboflavina	0.03	Magnesio	20.00
Niacina	0.65	Fósforo	22.00
Vitamina B ₅	0.28	Potasio	162.00
Vitamina B ₆	0.03	Sodio	1.00
Folatos	25.00	Zinc	0.53
Vitamina A	214.00	Cobre	0.17
α-Tocoferol	1.17	Manganeso	0.65
β-Tocoferol	0.04	Selenio	0.40
γ-Tocoferol	1.34		
Vitamina K	19.8		

2.4 Compuestos fenólicos

La zarzamora es rica en compuestos fenólicos, los cuales tienen actividad antioxidante y pueden prevenir distintas enfermedades. La concentración de estos compuestos depende de distintos factores como la variedad, condiciones ambientales y manejo del cultivo. En polifenoles totales, se han reportado concentraciones de 176 a 1020 mg 100 g⁻¹ de tejido fresco (de Souza *et al.*, 2014;

Kostecka-Gugała *et al.*, 2015). En este contenido, se incluyen los ácidos fenólicos, flavonoides, antocianinas y taninos.

2.4.1 Ácidos fenólicos

Los ácidos fenólicos se caracterizan por presentar un grupo carboxílico en su estructura. Se distinguen dos clases, los ácidos hidroxibenzoicos como el ácido gálico, vainillínico, elágico y siríngico; y los ácidos hidroxicinámicos como el ácido *p*-cumárico, cafeico, ferúlico y sinápico.

En frutos de zarzamora, se han reportado concentraciones de ácidos hidroxicinámicos totales de 381.8 a 852.2 mg kg⁻¹ en tejido fresco, mientras que de ácido gálico y vainillínico de 54.8 a 256.1 y de 185.5 a 1126.0 mg kg⁻¹ en tejido fresco, respectivamente (Kim *et al.*, 2015). Otros compuestos que también se han reportado en este fruto, pero en menor concentración, son el ácido *p*-cumárico, ferúlico y elágico (Kolniak-Ostek *et al.*, 2015).

2.4.2 Taninos

Los taninos son formas oligoméricas o poliméricas de ácidos fenólicos. Se clasifican en dos grupos: condensados e hidrolizables. Los taninos condensados o proantocianidinas son dímeros, oligómeros y polímeros de catequinas de alto peso molecular. En berries, se encuentran principalmente como procianidinas, las cuales están compuestas exclusivamente de unidades de epicatequina (Talcott, 2007). La zarzamora contiene 27.0 mg 100 g⁻¹ de procianidinas en tejido fresco (Gu *et al.*, 2004).

Los taninos hidrolizables, se subdividen en dos conjuntos: galotaninos y elagitaninos. Los primeros están conformados por unidades de ácido gálico, mientras que los segundos tienen como base estructural al ácido hexa hidroxifénico, que es un dímero del ácido gálico y puede lactonizar en ácido elágico. En zarzamora, se han identificado en semilla, receptáculo y pulpa distintos elagitaninos como: pedunculagino, casuarictino, castalagino, lambertanino A, C y D, siendo los lambertaninos A y C los más abundantes en las tres fracciones (Hager *et al.*, 2008; Sánchez-Velázquez *et al.*, 2019).

2.4.3 Flavonoides

Su estructura está conformada por un esqueleto común difenilpirano (C6-C3-C6'), compuesto por dos anillos fenilo (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano heterocíclico (Quiñones *et al.*, 2012). Cuando están vinculados a una o más moléculas de azúcar, se conocen como glucósidos de flavonoides, y cuando no lo están se les denomina agliconas. En la naturaleza se encuentran mayoritariamente como glucósidos, aunque también pueden presentarse como ésteres, en forma libre, como sulfatos, dímeros o polímeros (Haminiuk *et al.*, 2012; Williamson, 2004).

La quercetina, miricetina, kaempferol, catequina y epicatequina son los flavonoles que principalmente se han identificado en frutillas. En zarzamora, se ha reportado contenido de epicatequina en intervalo de 1.43 a 4.41 mg 100 g⁻¹ de tejido fresco, siendo la semilla la principal fuente de este flavonoide (Siriwoharn *et al.*, 2004); también se ha observado contenido de quercetina 3-galactósido y 3-glucósido en un rango de 84.6 a 421.1; y de 41.0 a 327.4 mg 100 g⁻¹ en tejido fresco, respectivamente (Kim *et al.*, 2015).

2.4.4 Antocianinas

Las antocianinas son un subgrupo de flavonoides responsables de la coloración azul y roja en flores y frutos. Son compuestos hidrosolubles que se encuentran en las vacuolas celulares (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009). Se definen como glicósidos polihidroxilados y/o polimetoxilados del catión 2-fenilbenzopirilo (catión flavilio). El catión flavilio o aglicona también es llamado antocianidina. Seis son las antocianidinas que frecuentemente se encuentran en los vegetales: pelargonidina, cianidina, peonidina, delphinidina, malvidina y petunidina (Delgado-Vargas & Paredes-López, 2003). Estas difieren en el número de grupos hidroxilo y metoxilo adheridos al catión flavilio. El número de grupos hidroxilo y metoxilo es determinante en la coloración de la antocianina, ya que entre mayor sea el número de grupos hidroxilo más intensa será la coloración azul, mientras que el

incremento en grupos metoxilo aumenta la pigmentación roja (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009).

Las antocianinas mayoritarias en el fruto de zarzamora son derivados de la cianidina, siendo la cianidina-3-glucósido (Figura 4) la principal (Edgley *et al.*, 2019b). Otras antocianinas como la cianidina-3-rutinósido, 3-xilósido, 3-malonilglucósido y 3-dioxaloilglucósido también se han reportado, aunque en menor proporción (Kim *et al.*, 2015). Adicionalmente, se ha encontrado un bajo contenido de cianidina-3-glucósido acilada con ácido malónico (Siriwoharn *et al.*, 2004) y pelargonidina-3-glucósido. No obstante, el perfil de antocianinas de la zarzamora varía de acuerdo con la variedad (Segantini *et al.*, 2017).

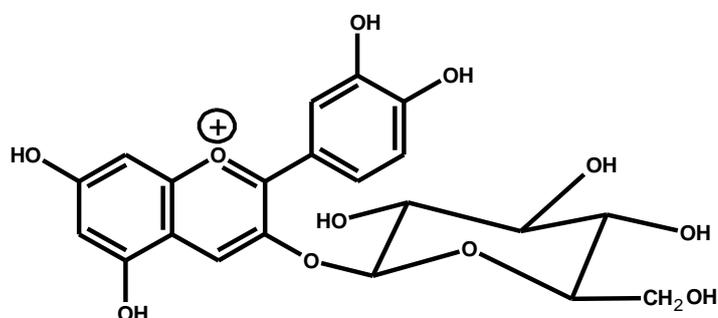


Figura 4. Cianidina 3-glucósido.

Las antocianinas son moléculas altamente inestables y su coloración se ve afectada por distintos factores como pH, temperatura, oxígeno, luz, concentración y la interacción que presente con otros compuestos (Rein, 2005). En estudios previos de reversión de color en diferentes genotipos de zarzamora se sugiere que la disminución en el contenido de antocianinas, así como cambios de los compuestos con los que se encuentren asociadas, son la probable causa que provoca la reversión de color (Edgley *et al.*, 2019b). Es importante señalar que los principales compuestos con los que se asocian las antocianinas son azúcares, ácidos orgánicos, compuestos fenólicos y otras antocianinas.

2.4.4.1 Glicosilación de las antocianinas

La glicosilación de antocianidinas da O-glicósidos o C-glicósidos con monosacáridos como glucosa, ramnosa, manosa y xilosa, y disacáridos como

rutinosa (Siriwoharn *et al.*, 2004). La posición más común para formar el enlace es C3 seguido por C5, aunque también se pueden presentar en C7, C3', C4' y C5'. De manera general, se ha demostrado que la glicosilación incide en la coloración de la antocianina produciendo un efecto hipsocrómico y coloración azul, siendo la posición del enlace y número de azúcares, los factores de mayor importancia (Zhao *et al.*, 2014). Respecto a la posición del enlace, se ha reportado que el enlace 3-glucósido aporta mayor intensidad de color, en comparación con el 5-glucósido y el 3,5-glucósido; en cuanto al número de azúcares, en antocianinas extraídas de col roja, zanahoria y sorgo negro, se observó que la unión de trisacáridos produce coloración azul, mientras que monosacáridos proporcionan color rojo (Figura 5) (Sigurdson *et al.*, 2018). Este aspecto no ha sido explorado como un posible mecanismo de la reversión de color de la zarzamora.

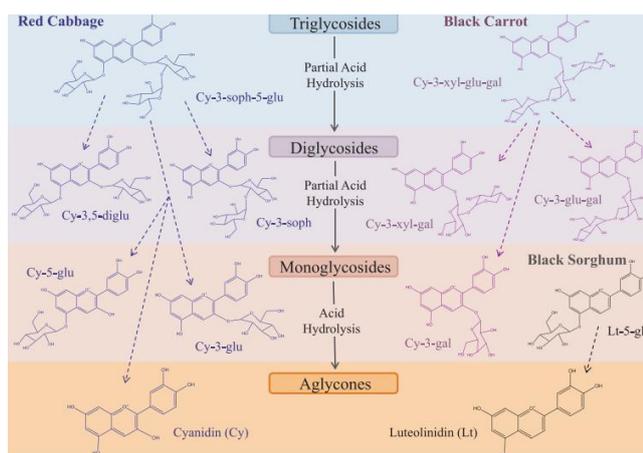


Figura 5. Efecto de la glicosilación en el color de las antocianinas extraídas de col roja, zanahoria y sorgo negro. Fuente: Sigurdson *et al.*, 2018

2.4.4.2 Acilación

La acilación es el cambio estructural de la antocianina que tiene mayor efecto en su estabilidad (Zhao *et al.*, 2017). Las antocianinas pueden unirse a ácidos orgánicos, como fenólicos y alifáticos, siendo los más comunes los ácidos hidroxicinámicos, hidroxibenzoicos, malónico, acético y málico (Rein, 2005). La acilación de la antocianina provoca aumento en la intensidad de color y estabilidad ante factores que provocan su degradación (Castañeda-Ovando *et*

al., 2009). El número y tipo de ácido orgánico es determinante en la estabilidad de la antocianina. Entre mayor sea el número de ácidos orgánicos enlazados a la antocianina se incrementará la estabilidad de ésta, mientras que la unión de antocianinas con ácidos fenólicos mantiene en mayor medida la coloración que aquellas unidas a ácidos alifáticos (Rein, 2005).

2.4.4.3 Copigmentación

La copigmentación también incrementa la estabilidad de las antocianinas. Durante el almacenamiento, se ha demostrado que la cantidad de antocianinas disminuye, pero aquellas que se encuentran copigmentadas se mantienen sin cambio (Bimpilas *et al.*, 2015). Este fenómeno se presenta cuando las antocianinas interactúan con otros compuestos, denominados copigmentos. Los principales copigmentos que interactúan con las antocianinas son taninos hidrolizables, flavonoides, ácidos fenólicos y otras antocianinas. Los alcaloides, aminoácidos, ácidos orgánicos y polisacáridos también pueden actuar como copigmentos, aunque es menos común (Trouillas *et al.*, 2016). La interacción entre antocianina y copigmento puede presentarse de diferentes maneras: A) copigmentación intermolecular, B) asociación entre antocianinas, C) interacción intramolecular en antocianinas aciladas, D) asociación entre antocianinas aciladas, E) intercalación en copigmentación intermolecular y F) copigmentación en complejo antocianina-metal (Figura 6) (Trouillas *et al.*, 2016).

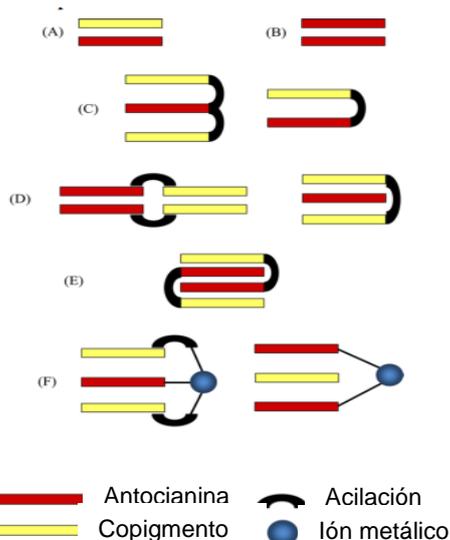


Figura 6. Mecanismos de interacción mediante los cuales se lleva a cabo la copigmentación. Fuente: Trouillas *et al.*, 2016.

Los copigmentos son generalmente incoloros, pero cuando se enlazan o interaccionan con una antocianina, se produce un efecto hiperocrómico y batocrómico en el espectro de absorción; el primer término se refiere a que la intensidad de la coloración original de antocianina se incrementa, y el segundo indica que aumenta la longitud de onda de máxima absorción, por lo que puede ocurrir cambio de color rojo a azul por efecto de la copigmentación (Baranac *et al.*, 1996).

La copigmentación ha sido ampliamente estudiada en flores y vinos (Boulton, 2001; Saito *et al.*, 2012). En vinos, se observó que la variedad de uva utilizada en su elaboración influye en el porcentaje de coloración que aporta la copigmentación. Se estimó que, dependiendo de la variedad de uva, la copigmentación es responsable desde el 9 hasta el 31% de la coloración del vino. Esta variación se atribuyó a que la concentración de pigmentos (antocianinas) y copigmentos es diferente entre genotipos de uvas (Heras-Roger *et al.*, 2014).

En frutillas, se tienen pocos estudios sobre el efecto de la copigmentación en la coloración del fruto. En arándano se ha relacionado con la coloración que presenta, la cual es debida a la interacción de antocianinas con iones de aluminio y que la interacción de vitexina y orientina, principalmente, estabiliza las antocianinas del fruto, evitando su degradación (Osawa, 1982). En jugo de açai se observó que la interacción de flavonas C-glucósidos tiene efecto hiperocrómico e incrementa la estabilidad de la cianidina (Wilska-Jeszka & Korzuchowska, 1996). En el caso de zarzamora, no se han realizado estudios sobre el efecto de la copigmentación en la coloración del fruto fresco, pero se sabe que las antocianinas extraídas de este fruto tienen la capacidad de copigmentarse con otros compuestos (Weber *et al.*, 2017).

2.4.4.4 Auto-asociación

Este fenómeno se lleva a cabo cuando dos o más antocianinas se asocian a través de interacciones hidrófobas entre sus anillos aromáticos. Se ha demostrado que las antocianinas en alta concentración provocan desviación

positiva de la ley de Beer como consecuencia de su asociación (Asen *et al.*, 1972). Este fenómeno se comprobó con la cianidina 3,5-diglucósido, la cual al aumentar su concentración de 10^{-4} a 10^{-2} M su absorbancia se incrementó 300 veces, además de observarse desplazamiento batocrómico (Achenbach *et al.*, 1987), por lo cual se sugirió que las antocianinas en alta concentración son capaces de auto-asociarse; no obstante, las fuerzas que las mantienen unidas son débiles, por lo que su dilución o un aumento en su temperatura rompen estas interacciones, provocando su separación y en consecuencia cambio de color.

En distintas antocianinas (cianidina, pelargonidina, petunidina, delfinidina, peonidina y malvidina 3-glucósido), se ha demostrado que la auto-asociación incrementa su estabilidad, evitando el ataque nucleofílico del agua en la posición 2 del catión flavilio; además, un aumento en la cantidad de sustituyentes OH y MeOH en los anillos aromáticos de la antocianina favorecen este fenómeno, aunque la concentración es el factor más determinante para que se lleve a cabo (Leydet *et al.*, 2012).

Las constantes termodinámicas como las de hidratación (K_h) y desprotonación (K_a) pueden usarse para comprobar la presencia de auto-asociación (González-Manzano *et al.*, 2008). En solución acuosa, dependiendo del pH, existen cuatro formas en las cuales se puede presentar la antocianina: base quinonoidal (A), con coloración azul; catión flavilio (AH^+), con coloración roja; hemiacetal (B), incolora; y chalcona (C), coloración amarilla (Figura 7) (Dangles *et al.*, 1993).

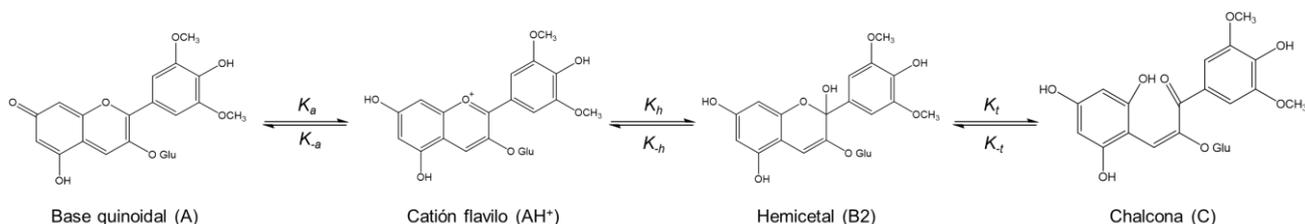


Figura 7. Reacciones químicas de malvidina 3-glucósido en medios con diferentes pH.

Fuente: Leydet *et al.*, 2012

AH^+ es la forma predominante en la que se encuentran las antocianinas en condiciones ligeramente ácidas, pero cuando el pH se incrementa, dos

reacciones ocurren simultáneamente: desprotonación para formar la base quinoidal y la hidratación en la posición 2 para dar la forma hemiacetal. La constante de hidratación (K_h) y la de desprotonación (K_a) permiten definir la distribución de la forma en que se encuentran las antocianinas en medio ácido o neutro. Un aumento en los valores de estas constantes indica mayor estabilidad para mantenerse en su forma AH^+ , lo que nos estaría indicando la presencia de auto-asociación (González-Manzano *et al.*, 2008; Mendoza *et al.*, 2018).

La auto-asociación de las antocianinas se puede presentar cuando estos compuestos se encuentran en aglomerados dentro de la vacuola celular. Estas estructuras reciben el nombre de inclusiones vacuolares de antocianinas.

2.5 Inclusiones Vacuolares de Antocianinas (IVA)

Las antocianinas frecuentemente se encuentran distribuidas uniformemente en la vacuola celular; sin embargo, en algunas especies de plantas, se ha observado que las antocianinas se encuentran localizadas en regiones específicas de la vacuola formando cuerpos esféricos de tonalidad azul (Figura 8) (Markham *et al.*, 2000). Esta aglomeración de antocianinas se denomina inclusiones vacuolares de antocianina (IVA) o antocianoplastos (Kallam *et al.*, 2017).

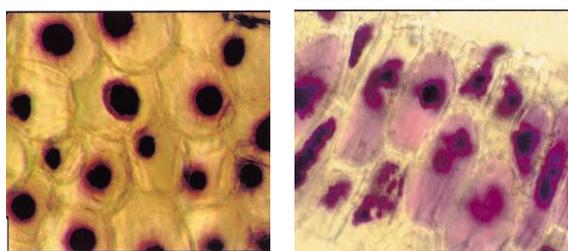


Figura 8. IVA en células de pétalos de *Eustoma grandiflorum* y *Dianthus caryophyllus*. Fuente: Markham *et al.*, 2000.

El aglomerado de antocianinas puede formarse por microautofagia. Con base en observaciones con microscopio confocal y multifotónico en tiempo real (FLIM), se ha propuesto un modelo que consta de tres etapas para explicar dicho mecanismo: 1) las antocianinas se asocian con la parte externa del tonoplasto y son envueltas por una doble membrana de tonoplasto. Inicialmente, el aglomerado presenta protuberancias, pero eventualmente estas desaparecen;

II) las dos membranas comienzan a separarse; III) las membranas se separan completamente, dejando un aglomerado de antocianina rodeado por una membrana derivada del tonoplasto (Figura 9) y generando una estructura esférica denominada antocianoplasto (Chanoca *et al.*, 2015; Pecket & Small, 1980). En este caso, genes glutatión S-transferasa y antoMATEs son esenciales para la formación del antocianoplasto, ya que regulan el transporte de las antocianinas desde el retículo endoplásmico hasta el tonoplasto, y del tonoplasto al interior de la vacuola, respectivamente (Gomez *et al.*, 2011).

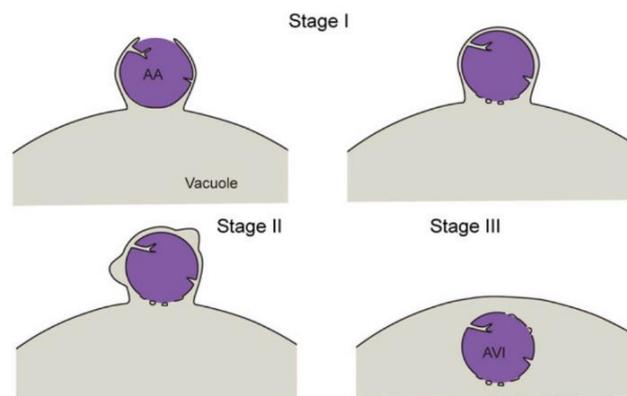


Figura 9. Modelo de la formación del aglomerado de antocianinas por microautofagia. Fuente: Chanoca *et al.*, 2015.

También los aglomerados pueden formarse por la elevada concentración de antocianinas dentro de la vacuola, en este caso la estructura carece de membrana y se denomina inclusiones vacuolares de antocianinas (Bae *et al.*, 2006). En frutos y hortalizas como manzana (Bae *et al.*, 2006), papa (Nozue *et al.*, 1997) y col roja (Small & Pecket, 1982) se han observado IVA, aunque la mayoría de los estudios sobre este tema se han centrado en flores (Kallam *et al.*, 2017). La función de la IVA en la célula no se conoce con precisión, pero se sabe que intensifica la coloración azul en los pétalos de las flores que las poseen e incrementa la estabilidad de las antocianinas. La formación de la IVA se relaciona con la síntesis de 3-O-glucosil cianidina (C3G) en el retículo endoplásmico. Estas antocianinas en particular son transportadas del sitio de biosíntesis a la vacuola y se almacenan en esta estructura (Pourcel *et al.*, 2010).

Se ha identificado que la acilación y glicosilación tienen efectos en la formación de la IVA (Markham *et al.*, 2000). No obstante, también se ha observado que la formación de IVA en *R. solandri* se da por la asociación entre antocianinas, pelargonidina-3-glucósido y la cianidina-3-glucósido, en ausencia de acilación y glicosilación, donde el factor de mayor importancia que interviene en la formación de IVA es la concentración de antocianinas (Zhang *et al.*, 2014).

2.6 Reversión de color

Uno de los principales problemas poscosecha que enfrenta el manejo del cultivo de zarzamora es la reversión de color (Edgley *et al.*, 2020). De manera natural, al inicio del desarrollo, el fruto es color verde. A medida que los frutos maduran cambian a rojo que posteriormente se vuelven parcialmente negros y finalmente las drupas, de manera uniforme, adquieren coloración negra; no obstante, una vez cosechado el fruto puede cambiar su color de negro a rojo (Figura 10) (Edgley *et al.*, 2019b). Este fenómeno se conoce como reversión de color y provoca el rechazo en los puntos de inspección, causando pérdidas entre el 2 y 5% del producto exportado (Pérez-Pérez *et al.*, 2016).



Figura 10. Reversión de color en frutos de zarzamora.

Aunque no se conoce el mecanismo por el cual se da este problema, se ha documentado que factores genéticos, almacenamiento, hora de cosecha y vibraciones durante el transporte generan su presencia (Edgley *et al.*, 2020; Pérez-Pérez *et al.*, 2016).

2.7 Factores que influyen en la reversión de color en frutos de zarzamora

2.7.1 Genotipo

Se ha reportado que el genotipo influye en la susceptibilidad que presenta la zarzamora a la reversión de color. Variedades como la Tupi, Ouachita y Natchez son altamente susceptibles a presentar reversión de color (Finn & Clark, 2011). El Cuadro 5 muestra una recopilación reportada en donde se observa que las variedades presentan distinto grado de susceptibilidad a la reversión de color (Edgley *et al.*, 2020).

Cuadro 5. Efecto de la variedad en la presencia de reversión de color en zarzamora.

Variedad	1+ drupas rojas	3+ drupas rojas	5+drupas rojas
Crispy	13.2	-----	-----
No crispy	41.0	-----	-----
Apache	-----	0.0-4.7	32-49
Arapaho	-----	0.0-6.1	44-51
BlackMagic	72.9	15.3-66.1	-----
Choctaw	-----	47.5	-----
Chester Thornless	-----	0-10	19-34
Cheyenne	-----	41.3	-----
Natchez	43.0-72.0	5.0-66.6	49-66
Navaho	-----	0.0-18.8	9-14
Osage	19.3-40.7	1.0-18.4	30-40
Ouachita	18.8-85.0	0.0-81.0	30-40
Prime Ark Traveler	17.8-45.3	9.0	19-49
Prime Ark 45	16.8-45.4	0.0-25.3	-----
APF-8	-----	4.7	-----
APF-12	-----	75.3	-----
Shawnee	-----	56.3	-----
Triple Crown	-----	-----	66-73
Tupy	26.3-60.7	5.2-31.5	-----
Von	-----	-----	45-71

Fuente: Edgley *et al.*, 2020

Aunque se desconoce la causa por la cual algunas variedades son resistentes a la reversión de color, con base en la literatura y en resultados experimentales obtenidos dentro del mismo grupo de trabajo, sugerimos que la firmeza, resistencia de la membrana, y bajo contenido de copigmentos, particularmente ácidos orgánicos, son los factores que podrían determinar la baja susceptibilidad de algunas variedades a la reversión de color.

En diversos reportes, se encontró que los frutos con mayor firmeza son menos susceptibles a la reversión de color (Segantini *et al.*, 2017). Probablemente, esta correlación se deba en que la firmeza está estrechamente relacionada con la resistencia al daño mecánico, el cual es una de las principales causas que inducen la reversión de color (Pérez-Pérez *et al.*, 2016).

La firmeza de los frutos depende, principalmente, de la pared celular. La pared celular es la estructura que da forma a las células y las mantiene unidas, dando fuerza mecánica y rigidez. La pared celular es una red de microfibrillas de celulosa en una matriz hidrofílica de hemicelulosas y pectinas (Cosgrove, 2005). En plantas, su composición general es aproximadamente de 30% de celulosa, 30% de hemicelulosas, 35% de pectinas y 5% de proteínas estructurales, aunque en paredes celulares de frutos el contenido de pectinas puede ser sustancialmente mayor. La pérdida o ruptura de la pared celular se produce cuando la pectina y/o hemicelulosa que la conforman se degrada (Salazar Iribe & Gamboa de Buen, 2013).

Durante el desarrollo del fruto de zarzamora, se ha evaluado la actividad de distintas enzimas relacionadas con la degradación de la pared celular, como lo son poligalacturonasa (PG), pectinmetilesterasa (PME), β -galactosidasa, α -L-arabinofuranosidasa (α -L-Af), celulasa, xiloglucan endotransglicosilasa (XET), de las cuales, se encontró una significativa correlación entre el aumento de la actividad de la PG con la reducción de la pared celular y firmeza del fruto (Zhang *et al.*, 2019). Debido a esto, se ha sugerido que en variedades de zarzamora resistentes a la reversión de color, la inhibición de genes relacionados con PG, como *PG1*, ha producido frutos más firmes (Edgley *et al.*, 2020). No obstante, se ha demostrado que un solo gen no regula la integridad de la pared celular.

Además de los genes *PG1*; β -*GAL1*, β -*GAL2* y α -*AF2*, son importantes marcadores genéticos que regulan la firmeza de los frutos (Gwanpua *et al.*, 2016).

En frambuesa, se ha demostrado que variedades firmes presentan mayor porcentaje de metil esterificación de pectina en comparación con las suaves (Stewart *et al.*, 2001), esto probablemente debido a la menor actividad de la enzima PME. En caso de zarzamora, variedades firmes presentan menor actividad de PME en comparación con variedades suaves (Zhang *et al.*, 2019), por lo que la inhibición de esta enzima podría generar variedades de zarzamora resistentes al daño mecánico y por tanto a la reversión de color. La regulación de esta enzima se ha relacionado con tres genes, denominados *PME1*, *PME2* y *PME3* (Gwanpua *et al.*, 2016).

No obstante, aunque en la literatura se señala a la firmeza como posiblemente el único factor por el cual algunas variedades no revierten su color, en estudios previos realizados por nuestro grupo de trabajo, observamos que las células de las drupas revertidas mantienen la pared celular (teñida de color verde-azul), pero pierden la forma y, aparentemente, la integridad de la membrana (observada de color rojizo) en comparación con las células de la drupa no revertida (Figura 11). Esto supone que para que se presente la reversión de color, no necesariamente deberá presentarse ruptura de pared celular, pero sí de membrana, por lo que es posible que las variedades que no revierten su color presenten una membrana más resistente o carezcan de las enzimas que la degradan.

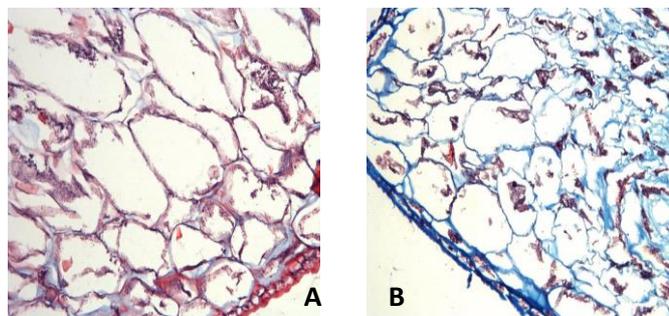


Figura 11. Microestructura de drupa no revertida (A) y revertida (B).
Fuente: Soto-Magaña, 2020.

Aunque no se ha determinado la causa por la cual se da el cambio o ruptura de la membrana en la reversión de color, es posible que ocurra aumento en la actividad de enzimas que degradan los fosfolípidos de la membrana, como ocurre en otros frutos y plantas expuestos al daño mecánico (Zhao *et al.*, 2010). Las enzimas que probablemente se encuentren relacionadas con la pérdida de membrana son la lipoxigenasa y la fosfolipasa D (Bargmann *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2017).

En caso de que en variedades susceptibles y resistentes se presente ruptura de membrana después de exponerse al daño mecánico (vibración), podríamos asumir que el contenido de copigmentos es el factor que determina la presencia o ausencia de la reversión de color. En este sentido, se ha determinado que variedades resistentes y susceptibles tienen similar perfil de fenoles libres, enlazados y conjugados (Soto-Magaña, 2020). Sin embargo, en acidez titulable difieren significativamente, ya que la variedad susceptible (Tupi) presenta contenido 32% superior al mostrado en la variedad resistente (Dasha) (Datos no publicados). La cantidad de ácidos orgánicos podría provocar la reversión de color al actuar como copigmentos y reduciendo el pH del medio celular.

Hasta el momento, no existe evidencia que variedades resistentes muestren una modificación en los genes de síntesis de antocianinas, ya que presentan similar contenido que variedades susceptibles; por tal motivo, no son contemplados como un factor que genere resistencia de la reversión de color. En caso de genes que participan en transporte y acumulación de antocianinas (GST y antoMATEs), por el momento estos no son considerados, ya que no se ha demostrado que las antocianinas en las células de las drupas de variedades resistentes se acumulan de forma distinta en comparación con las susceptibles. En caso de que surja nueva evidencia respecto a esto, se consideraría que la regulación de los genes GST y antoMATEs podría reducir la incidencia de RC.

2.7.2 Temperatura de almacenamiento

Se ha documentado que las condiciones de almacenamiento afectan la calidad de los frutos de zarzamora (Peretto *et al.*, 2012). En el caso de la reversión de color, se ha estudiado que la baja temperatura de almacenamiento minimiza la incidencia, por el contrario, el incremento en este parámetro la aumenta.

Kim *et al.* (2015) evaluaron el grado de reversión de color de zarzamora almacenada bajo dos condiciones de temperatura (1 °C por 15 días y 1 °C por 13 días + 2 días a 20 °C). El cambio en la coloración de las drupas se presentó en ambas condiciones; sin embargo, reportaron que frutos almacenados a mayor temperatura mostraron mayor reversión, concluyendo que la temperatura de almacenamiento influyó en la coloración de la zarzamora y que mantener el fruto a baja temperatura reduce la aparición de este fenómeno.

2.7.3 Momento de la cosecha

Se ha reportado que la hora de cosecha tiene efecto en la presencia de reversión de color en zarzamora, observando que entre menor sea la temperatura ambiental en el momento de la cosecha menor será el porcentaje de drupas rojas. Yin (2017) analizó frutos cosechados en tres momentos del día: 7:00, 12:00 y 16:00 h y observó que la RC se incrementó conforme la cosecha se realizaba más tarde. A las 7:00 h, hubo menor temperatura ambiental y menor temperatura en la superficie del fruto, mientras que a las 16:00, se presentó la mayor temperatura, por lo que se atribuye que este parámetro influye en la reversión de color. Asimismo, McCoy *et al.* (2016) analizaron la reversión de color en zarzamora cosechada en cuatro tiempos diferentes: 7:00, 10:00, 13:00 y 16:00. Reportaron que la reversión se presenta, en mayor medida, en los frutos cosechados a las 16:00 h; esto se asoció a que la temperatura de la superficie del fruto fue de 29 °C en comparación con los frutos cosechados a las 7:00 con temperatura de 23 °C. De manera similar Edgley *et al.* (2019a) observaron que a las 12:00, cuando la temperatura de la superficie del fruto fue de 25 °C, la incidencia de reversión de color se presentó en mayor porcentaje. Estos estudios asumen que la exposición a elevada temperatura afecta la estabilidad de los

compuestos que proporcionan el color a los frutos. No obstante, también es posible que las altas temperaturas tengan un efecto en la microestructura que contiene los pigmentos, propiciando así el fenómeno.

2.7.4 Fertilización con nitrógeno

Se ha reportado que un exceso en los aportes de nitrógeno aumenta la incidencia de reversión de color; Edgley *et al.* (2019c) evaluaron frutos de cinco cosechas del 2016 y seis del 2017 fertilizados con tres diferentes concentraciones de nitrógeno (53, 106 y 212 kg ha⁻¹) indicando que, en ambos años, excepto en una cosecha de cada año, los frutos fertilizados con mayor cantidad de nitrógeno presentaron mayor reversión de color. El mecanismo por el cual el exceso de nitrógeno promueve la reversión de color se desconoce, no obstante, se ha determinado que el incremento de nitrógeno disminuye la firmeza del fruto, por lo cual, probablemente los frutos podrían ser más susceptible al daño mecánico y en consecuencia, facilitar la reversión de color.

2.7.5 Transporte

Se ha demostrado que las condiciones de transporte pueden alterar su calidad, debido al daño mecánico producido por las vibraciones generadas durante el transporte, particularmente aquellas vibraciones en intervalo entre 10 y 15 Hz con amplitud de 0.5 g's, ya que son capaces de inducir la RC (Figura 12) (Pérez-Pérez *et al.*, 2016).



Figura 12. Inducción de reversión de color en frutos de zarzamora por efecto de la vibración. Fuente: Pérez-Pérez *et al.*, 2016

En este estudio, también se evaluó el contenido de antocianinas monoméricas y poliméricas, observándose una disminución en el contenido de antocianinas monoméricas en los frutos revertidos, y un incremento en el contenido de antocianinas poliméricas. Los autores señalaron que posiblemente la reversión

de color es consecuencia de la polimerización de las antocianinas. Adicionalmente, se realizaron observaciones de la ultraestructura de los frutos, observándose una pérdida de la integridad celular, por lo que confirmaron que la vibración provocó daño en la estructura celular del fruto, lo cual probablemente facilita el desarrollo de reacciones químicas o bioquímicas que inducen la reversión de color.

Recientemente, en el grupo de trabajo de la UAQ, Soto-Magaña (2020), ha observado que el daño mecánico producido por la vibración (en la frecuencia, aceleración y tiempo que induce la reversión de color) provoca rupturas celulares en las drupas del fruto, pero no se mostró diferencia en contenido de antocianinas monoméricas. Es posible que la vibración rompa la pared celular y/o membranas, lo cual favorecería la interacción de las antocianinas, que originalmente se encontraban en la vacuola, con el resto del contenido celular, esto modificaría las asociaciones que presentan las antocianinas y en consecuencia cambian el color sin alterar su contenido.

Los trabajos señalados hasta el momento respecto de la reversión de color se han enfocado al estudio de los factores que provocan la incidencia del fenómeno, pero no se han aportado datos acerca de los mecanismos moleculares que llevan al cambio de color. Dado que las antocianinas son las responsables del color de estos frutos y que este color cambia en función de su contenido y las condiciones en las que se encuentren dichos pigmentos, es factible que la reversión de color implique cambios en la estructura molecular de dichos pigmentos. Hasta este momento, y de acuerdo con los estudios reportados, parece que el fenómeno de RC puede estar motivado por diferentes factores como el cambio de pH en el medio celular en el que se encuentran las antocianinas o la formación de copigmentos y/o la asociación con otras moléculas de antocianinas.

Este trabajo doctoral pretende, mediante el uso de diferentes técnicas analíticas, identificar el mecanismo molecular que lleva a la reversión de color en los frutos de zarzamora.

3. HIPÓTESIS

La vibración causa la ruptura de la estructura celular de los frutos de zarzamora, lo cual propicia que el pH del medio donde se encuentran las antocianinas y las interacciones intermoleculares de autoasociación o copigmentación se modifiquen, generando el color rojo característico de los frutos con reversión de color.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Identificar el mecanismo que explique la reversión de color inducido por vibración de los frutos de zarzamora.

4.2 Objetivos específicos.

Etapa 1. Desarrollar un modelo que permita el estudio de la reversión de color.

1. Desarrollar un equipo vibratorio portátil que reproduzca la vibración con la frecuencia y aceleración que se presenta durante el transporte comercial de la zarzamora.
2. Evaluar el tiempo que se requiere para inducir la reversión de color con el equipo vibratorio portátil.
3. Evaluar si las altas presiones hidrostáticas inducen la reversión de color.

Etapa 2. Identificar el mecanismo químico o fisicoquímico que genera la reversión de color.

1. Evaluar el efecto de la concentración de antocianinas en la reversión de color en frutos de zarzamora inducida por vibración.
2. Evaluar, mediante microscopía de fluorescencia multifotónica, los cambios en la integridad de la membrana celular y de los aglomerados de antocianinas en frutos no revertidos y revertidos.
3. Determinar las modificaciones en interacciones intermoleculares de las antocianinas que expliquen la reversión de color.
4. Evaluar el efecto del pH en el color que presentan las drupas de zarzamora no revertidas y revertidas.

5. METODOLOGÍA

5.1 Estrategia experimental

Para cumplir con los objetivos propuestos, el presente trabajo de investigación se dividió en dos etapas (**Figura 13**). El propósito de la etapa 1 fue encontrar un modelo para inducir de manera sistemática la reversión de color (RC). En esta etapa se probaron dos métodos: por vibración y por altas presiones hidrostáticas. Una vez que se encontró el modelo que induce la RC en condiciones controladas, se procedió con la etapa 2. En la etapa 2, se evaluaron muestras no revertidas y revertidas con el objetivo de conocer la causa por la cual las antocianinas cambian de coloración en la RC: a) si se debe a la concentración, b) a la forma en cómo se almacenan dentro de la célula, c) si involucra interacciones intermoleculares o d) si se debe al cambio de pH intracelular.

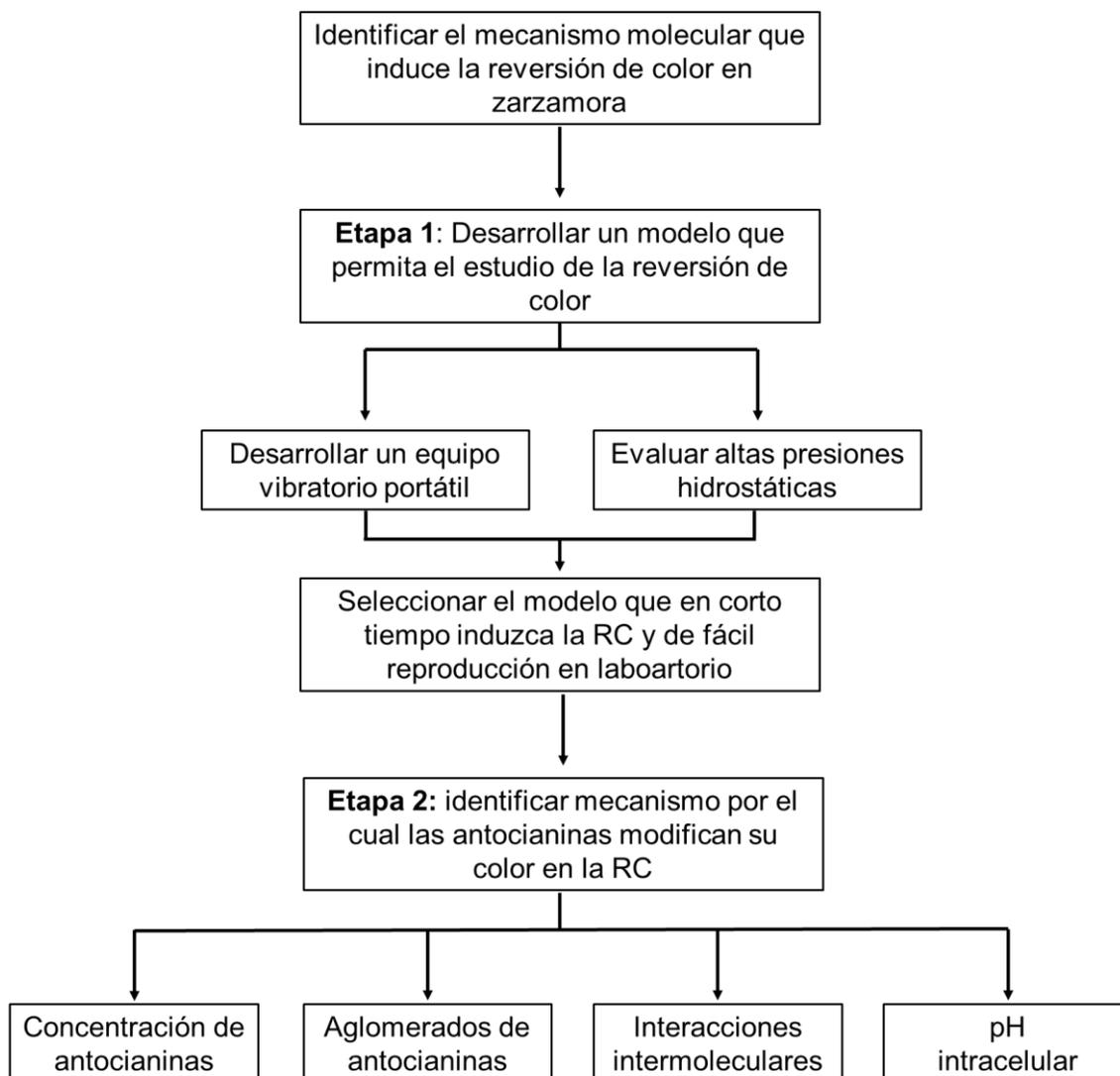


Figura 13. Estrategia experimental para identificar el mecanismo de reversión de color en frutos de zarzamora.

5.2 Modelo vibratorio para inducir la Reversión de Color (RC)

5.2.1 Equipo portátil de vibración para inducir la RC

Se construyó un sistema de vibración portátil para reproducir, a nivel de laboratorio, los niveles de vibración alcanzados durante el transporte comercial de la zarzamora. El sistema se integró con un módulo generador de señal eléctrica DDS HS (con frecuencia de 1 Hz a 8 MHz; con etapas de frecuencia de: 1, 10, 100, 1000, 10000 Hz; con forma de la onda: seno, cuadrangular,

triangular, sierra, sierra reversa y electrocardiograma; potencia: +5 V/+12 V/-12 V); un amplificador monoaural (voltaje: doble 24–32 VAC; potencia de salida: 350 W; tipo de canal: mono), un subwoofer tipo bocina (potencia de música: 1300 W; potencia nominal: 350 W; longitud de la bocina: 30 cm; peso: 3.60 kg), y un osciloscopio DS0138 para monitorear la calidad de la señal producida (**Figura 14**).

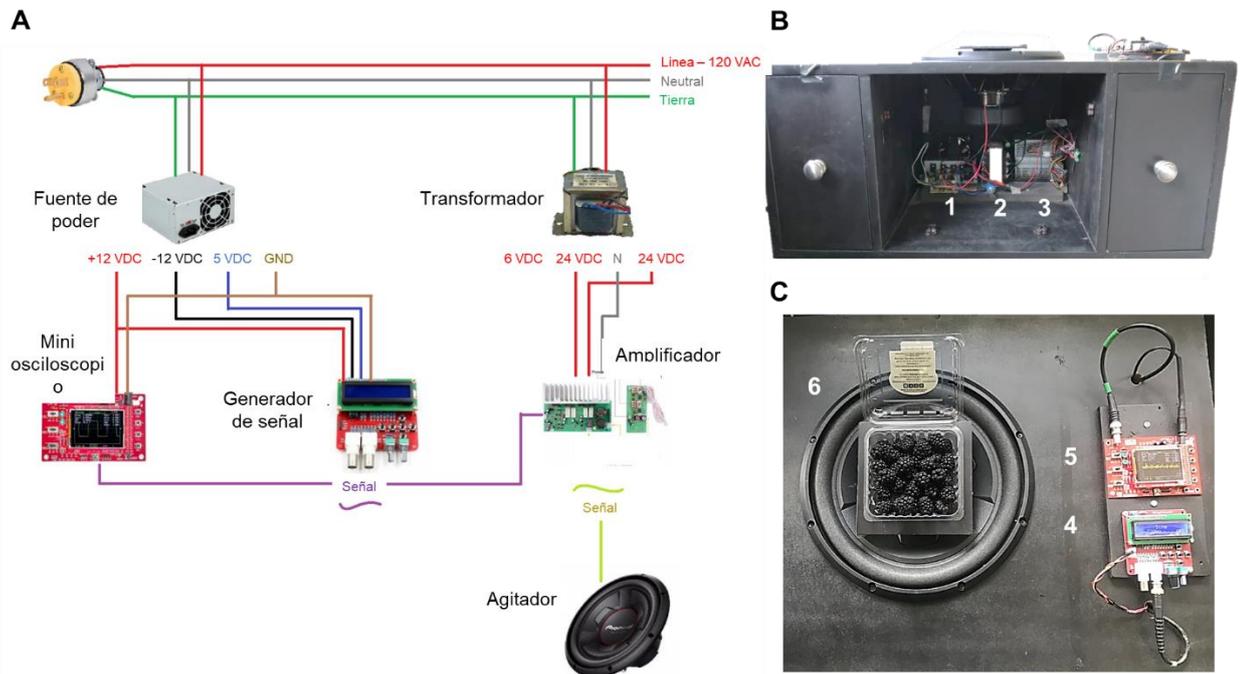


Figura 14. Elementos del sistema de vibración portátil. **(A)** Diagrama de los principales componentes. Vista frontal **(B)** y vista superior del equipo **(C)**. 1: amplificador; 2: transformador; 3: fuente de poder; 4: generador de señal; 5: mini osciloscopio; y 6: bocina (agitador).

En este sistema, el generador de señal produce una señal sinusoidal de bajo voltaje, con frecuencia entre 0 a 100 Hz; después, por medio de un amplificador, esta señal se incrementa y se convierte en una señal eléctrica; finalmente, la bocina recibe la señal eléctrica produciendo la vibración. El nivel y frecuencia de la vibración se monitorean en el osciloscopio. Para realizar el tratamiento de vibración a la frecuencia y aceleración requerida (10 Hz y 0.5 g's), los clamshells de zarzamora (170 g) se colocaron sobre la bocina.

5.1.2 Material biológico

En este experimento se utilizaron tres variedades (*Rubus* sp. 'Ak2340, 'Am1510, y 'Tupi') proporcionadas por una huerta comercial ubicada en el municipio de Zamora, Michoacán (19°59'00"N 102°17'00"O). Clamshells (n = 12 para cada variedad) con ~170 g de frutos con coloración completamente negra fueron transportados, en condiciones de refrigeración, al laboratorio de Fisiología y Bioquímica Poscosecha de Frutas y Hortalizas de la UAQ. Al llegar al laboratorio, se seleccionaron los frutos libres de defectos y se almacenaron a 1°C y 95% de humedad relativa (HR) durante 24 h.

5.1.3 Validación del método de vibración

Para estandarizar a nivel de laboratorio las condiciones que inducen la RC, clamshells de la variedad 'Tupi' se colocaron en el sistema vibratorio portátil y se vibraron durante 0, 1, 3 y 5 min. Después del tratamiento de vibración, los clamshells fueron fotografiados y los frutos individuales (n = 15) se sometieron a la inspección visual y al análisis de color.

5.1.4 Evaluación del método vibratorio en diferentes variedades de zarzamora

Para evaluar el potencial uso del equipo vibratorio portátil para diferenciar la susceptibilidad a la RC entre variedades de zarzamora, tres variedades 'Ak234', 'Am151' y 'Tupi' fueron vibradas y analizadas. Clamshells con ~170 g de frutos fueron vibrados durante 0, 1, 3 y 5 min; después de este tratamiento de vibración, los clamshells se refrigeraron (1 °C y 95 % HR). A los días 0, 1, 2, 3, 4 y 5 los clamshells fueron fotografiados y los frutos individuales (n = 15) se sometieron a la inspección visual y al análisis de color.

5.1.5 Inspección visual

Los clamshells fueron visualmente inspeccionados para determinar el porcentaje de frutos con RC. Las zarzamoras (n = 15) fueron aleatoriamente seleccionadas para estimar la prevalencia de RC. Se consideró que un fruto tenía RC cuando al menos 5 drupas por zarzamora presentaban coloración roja.

5.1.6 Análisis de color

Los valores del espacio de color CIELa*b* fueron medidos en tres puntos de la zona ecuatorial del fruto de zarzamora con un espectrofotómetro CM-600D (Konica Minolta, Japón) con ángulo de 10° e iluminante D65. Los valores de cromaticidad (C*) y ángulo de matiz (h°) fueron estimados de acuerdo con las ecuaciones descritas por McGuire (1992).

5.1.7 Análisis estadístico

Los resultados del análisis de color se sometieron a una prueba de ANOVA de una vía usando un modelo lineal generalizado; luego, se utilizó la prueba de Tukey para hacer comparaciones múltiples de medias. Estos análisis estadísticos se realizaron en el software JMP 6 (SAS Institute Inc., USA); el nivel de significancia se estableció a $P \leq 0.05$. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

5.2 Método de Altas Presiones Hidrostáticas para inducir la RC

5.2.1 Material biológico

En este experimento se utilizó zarzamora *Rubus* sp. variedad 'Am1510' proporcionada por una empresa de exportación (Giddings) ubicada en el municipio de Los Reyes, Michoacán (19°38'57"N 102°24'49"O). Clamshells (n = 48) con ~170 g de frutos en madurez comercial y de color totalmente negro se transportaron, en refrigeración, al laboratorio de Fisiología y Bioquímica Poscosecha de Frutas y Hortalizas de la UAQ. Al llegar al laboratorio, se seleccionaron los frutos libres de defectos y se almacenaron a 1 °C y 95% de humedad relativa durante 24 h.

5.2.2 Inducción de RC con altas presiones hidrostáticas

Los frutos de zarzamora (~170 g) se empacaron en bolsas y se les añadió 250 mL de agua; posteriormente fueron sellados al vacío. Las bolsas con las muestras se introdujeron en un equipo de altas presiones con capacidad de 100

L (Avure Technologies, Middletown, OH, USA) y se utilizó agua como medio presurizador. Se realizaron corridas de 200, 350 y 500 MPa por Come Up Time o CUT (tiempo mínimo necesario para alcanzar la presión del tratamiento, 0.37 min), 3, 5 y 10 min. Después del tiempo de tratamiento, para evaluar la inducción de la RC se realizó una inspección visual.

Posteriormente, con base en los resultados que se obtuvieron se seleccionó el tratamiento de 200 MPa. Se siguió el procedimiento anteriormente descrito, pero únicamente los frutos se trataron a la condición de 200 MPa por CUT, 3, 5 y 10 min; después del tratamiento los frutos fueron almacenados a 1°C con 95% de HR durante 2 días. A los días 0, 1 y 2 se realizó una inspección visual (como se describe en el apartado 5.1.5), análisis de color (como se describe en el apartado 5.1.6) y homogeneidad de RC.

5.2.3 Análisis de homogeneidad de RC

Las zarzamoras ($n = 15$) fueron aleatoriamente seleccionadas para estimar la homogeneidad de la RC inducida en los frutos. En cada fruto se cuantificó el número total de drupas y el número de drupas que presentaban color rojo después del tratamiento. Con base en estos datos se estimó el % de RC que tenía cada fruto.

5.2.4 Análisis estadístico

Los resultados del análisis de color y % de RC se sometieron a una prueba de ANOVA de una vía usando un modelo lineal generalizado; luego, se utilizó la prueba de Tukey para hacer comparaciones múltiples de medias. Estos análisis estadísticos se realizaron en el software JMP 6 (SAS Institute Inc., USA); el nivel de significancia se estableció a $P \leq 0.05$. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

5.3 Cambios de la concentración de antocianinas de frutos revertidos y no revertidos durante el almacenamiento

5.3.1 Material biológico

Los frutos de zarzamora (*Rubus* spp. cv APF-122) fueron obtenidos de un empaque comercial ubicado en Guanajuato, México (20°40'18" N, 101°20'48" O). Frutos completamente maduros de color negro brillante se transportaron al Laboratorio de Fisiología y Bioquímica Poscosecha de Frutas y Hortalizas de la UAQ. Se seleccionaron los frutos que no presentaban defectos visuales y se almacenaron a 1 °C y 95 % de HR por 24 h.

5.3.2 Relación entre RC y contenido de antocianinas

Clamshells de zarzamora de ~170 g se sometieron a dos tratamientos: fruta revertida (5 min de vibración con frecuencia de 10 a 15 Hz y aceleración de 0.5 g) y fruta no revertida (0 min de vibración); este experimento se realizó por triplicado. Los clamshells se almacenaron por 0, 24, 48, 72, 96 y 120 h a 1 °C y 95% de HR. Las muestras fueron fotografiadas y se midió color; posteriormente, drupas con y sin reversión de color fueron congeladas en nitrógeno líquido para el análisis de antocianinas.

5.3.3 Análisis de contenido de antocianinas

Se obtuvo un extracto de antocianinas a partir de 3 g de drupas y 25 mL de una mezcla de solventes [metanol, agua, y ácido fórmico (80:19.9:0.1)]. La muestra se homogenizó (T-25, IKA, Alemania) y posteriormente se centrifugó (13,500 rpm) durante 15 min a 4°C; el sobrenadante se filtró (Whatman no. 4) y se analizó el contenido de antocianinas por espectrofotometría y por HPLC.

5.3.3.1 Antocianinas monoméricas por espectrofotometría

Quinientos microlitros del extracto de antocianinas se diluyeron en 2 mL de solución amortiguadora de cloruro de potasio (0.025 M, pH 1.0) y de acetato de sodio (0.4 M, pH 4.5). Para cada solución, se determinó el espectro de absorción de 400 a 700 nm en un espectrofotómetro (Lambda 365, Perkin Elmer, Inc.,

EUA). El contenido de antocianinas monoméricas (AM) se estimó con la siguiente ecuación:

$$MA = (A \times MW \times DF \times 1000) / (\epsilon \times 1)$$

Donde $A = (A_{\lambda_{vismax}} - A_{700})_{pH1.0} - (A_{\lambda_{vismax}} - A_{700})_{pH4.5}$; MW corresponde al peso molecular de 3-O-glucosil cianidina (449.2 g mol^{-1}); ϵ es el coeficiente de absorptividad molar de la 3-O-glucosil cianidina ($26,900 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$); DF representa el factor de dilución y 1 el grosor de la celda (1 cm). Los resultados se expresaron en equivalentes de 3-O-glucosil cianidina en mg g^{-1} de muestra (Giusti & Wrolstad, 2001).

5.3.3.2 Perfil de antocianinas por HPLC

El análisis de antocianinas por HPLC se realizó en un equipo Waters (Waters, EUA) compuesto de una bomba cuaternaria (modelo Alliance e2695) y un detector PDA (modelo 2998). Treinta microlitros del extracto de antocianinas se inyectaron en la bomba y la separación de los compuestos se realizó con una columna symmetry C-18 ($5 \mu\text{m}$, $150 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$), la cual se mantuvo a una temperatura de $35 \text{ }^\circ\text{C}$. La fase móvil consistió en un solvente A [agua/ácido fórmico (99.9:0.1, v/v)] y un solvente B (acetonitrilo) con flujo de 0.5 mL min^{-1} . El gradiente usado fue: 0 min, 5% B; 0 a 20 min, 20% B; 20 a 25 min, 40% B; y 25 a 30 min, 5% B (Yang *et al.*, 2017). La detección de antocianinas se realizó a 520 nm y la identificación se hizo con base en la comparación del tiempo de retención y espectro UV-VIS de un estándar de 3-O-glucosil cianidina. La cuantificación de antocianinas se realizó con una curva estándar de 3-O-glucosil cianidina (de 0.006 a 0.10 mg mL^{-1}); las antocianinas no identificadas se cuantificaron como equivalentes de 3-O-glucosil cianidina (García-Viguera *et al.*, 1997).

5.3.4 Análisis estadístico

Dos bases de datos, parámetros de color y contenido de antocianinas, con sus respectivas repeticiones se realizaron para cada tratamiento. Para evaluar el efecto del tiempo de vibración en los parámetros de color, se realizó un análisis

de ANOVA de una vía y en las variables de respuesta donde se encontró diferencia significativa, se realizó una prueba de Tukey. Para comparar el contenido de las antocianinas de los frutos revertidos y no revertidos, se realizó una prueba *t* de Student. El nivel de significancia se estableció a $P \leq 0.05$. Ambos análisis se realizaron con el software JMP 6 (SAS Institute Inc., USA).

5.4 Análisis microestructural de drupas de zarzamora

5.4.1 Microscopía Multifotónica

5.4.1.1 Observaciones de membranas

Para la detección de membranas, drupas de frutos de zarzamora revertidos y no revertidos se fijaron con paraformaldehído al 4% disuelto en una solución amortiguadora de fosfatos (0.16 M, pH = 7.2). Posteriormente, para remover el paraformaldehído, las drupas fueron lavadas con solución amortiguadora de fosfatos (0.16 M, pH = 7.2) y se incubaron en una solución 1:100 de SynaptoRed C2 disuelto en solución amortiguadora de fosfatos (0.16 M, pH = 7.2) durante 1 h a 4°C. Transcurrido el periodo de incubación, se realizaron cortes a mano de la drupa y se colocaron los tejidos en un portaobjetos y cubiertos con un cubreobjetos ($D = 0.17 \text{ mm} \pm 0.005 \text{ mm}$, índice de refracción = 1.5255 ± 0.0015 , Abbe número = 56 ± 2). La visualización de las membranas se realizó con un microscopio multifotónico (LSM 880-NLO, Zeiss, Alemania) acoplado a un láser Ti: Zafiro (Chameleon Vision II, COHERENT, EUA). Los análisis se realizaron con un objetivo de inmersión (40X/1.3, NA α -0.17, Zeiss Plan NEOFLUAR) y el espectro de fluorescencia fue determinado con el láser sintonizado a 510 nm.

5.4.1.2 Observaciones de aglomerados de antocianinas

Para la observación de la fluorescencia de las antocianinas, los frutos fueron fijados con *p*-formaldehído al 4 %. Se realizaron cortes a mano y los tejidos se colocaron en un portaobjetos y cubiertos con un cubreobjetos ($D = 0.17 \text{ mm} \pm 0.005 \text{ mm}$, índice de refracción = 1.5255 ± 0.0015 , Abbe número = 56 ± 2). La detección de antocianinas se realizó con un microscopio multifotónico con las

características previamente descritas. Los análisis se realizaron con un objetivo de inmersión (40X/1.3, NA α -0.17, Zeiss Plan NEOFLUAR) y el espectro de fluorescencia fue determinado con el láser sintonizado a 710 nm con 1.2% de poder.

5.4.2 Obtención de protoplastos

Para la obtención de los protoplastos, a dos gramos de drupas del fruto se añadieron 4 mL de medio de digestión [manitol a 0.7 M, Mes-NaOH a 50 mM (pH 5.5)], MgCl₂ a 5 mM, solución enzimática compuesta de celulasa (2%) y pectinasa (1%), y se agitó la mezcla durante 2.5 horas a 45 rpm a 30 °C. Posteriormente, para permitir la sedimentación de los protoplastos, el digerido se lavó con medio de resuspensión [manitol a 0.5 M, Tris-HCl a 25 mM, y EGTA a 5 mM (pH 8.0)] y se dejó reposar durante 12 h a 4 °C (Mellado-Mojica *et al.*, 2017). Para verificar que se extrajeron los protoplastos, 10 μ L del sedimento de la digestión se colocaron en un portaobjetos y se examinaron en un microscopio óptico.

5.4.3 Fluorescencia de protoplastos

Ciento cincuenta microlitros de sedimento de los protoplastos no revertidos y revertidos se colocaron en una placa de 96 pozos, se excitaron con un láser sintonizado a 350 nm y se determinó el espectro de emisión de fluorescencia en un intervalo de 400 a 780 nm en un espectrofluorómetro Varioskan (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA).

5.5 Experimento de copigmentación *in vitro* de soluciones de antocianinas

5.5.1 Semipurificación de antocianinas

La purificación de antocianinas se realizó con una columna C18 (Sep-Pak Cartidge Vac 3cc). Primeramente, se activó la columna, pasando 6 mL de metanol y 6 mL de agua destilada acidificada al 0.01% con HCl. Posteriormente,

se añadieron entre 6 y 8 mL del extracto de antocianinas (sección 5.3.3), al que previamente se removió el metanol con un rotavapor a 40 °C. Una vez que las antocianinas se encontraban dentro del cartucho, se añadieron 9 mL de agua acidificada, para eliminar azúcares y ácidos orgánicos. Después, se lavó el cartucho con 9 mL de acetato de etilo para remover ácidos fenólicos. Finalmente, se extrajeron las antocianinas semipurificadas con metanol (80%). Para eliminar el metanol, se utilizó un rotavapor a 40°C y las antocianinas se resuspendieron en agua a una concentración de 1.5 mg mL⁻¹ (Jackman & Smith, 1996).

5.5.2 Preparación de soluciones de copigmentos

Se prepararon soluciones de los copigmentos reportados como los más abundantes en fruto de zarzamora: dos ácidos fenólicos (ácido *p*-cumárico y ácido ferúlico), un flavonoide (catequina) y dos ácidos orgánicos (ácido málico y ácido cítrico). Las soluciones fueron preparadas en una concentración de 0.1 mg mL⁻¹.

5.5.3 Copigmentación

Con la finalidad de evaluar la capacidad de los compuestos anteriormente descritos para copigmentar a las antocianinas de la zarzamora, se prepararon soluciones, combinando las antocianinas con los diferentes ácidos fenólicos, flavonoides y ácidos orgánicos. Una solución con antocianinas se tomó como control. Las mezclas se realizaron a dos diferentes valores de pH (3.3 y 7.0). De estas soluciones, se registró el espectro de emisión de fluorescencia en un intervalo de 320 a 600 nm. Las mediciones de fluorescencia se realizaron en un Varioskan (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) con un láser de excitación sintonizado en 300 nm.

5.6 Espectroscopía RAMAN

5.6.1 Fundamentos del uso de esta técnica

Esta técnica se basa en hacer incidir un haz de luz monocromática de una determinada frecuencia V_0 sobre una muestra cuyas características moleculares

se desean determinar. Al impactar el haz de luz sobre la molécula, se puede dispersar en diferentes formas: a) presentar la misma frecuencia que la luz incidente: esto se conoce como dispersión Rayleigh, la cual no aporta ninguna información sobre la estructura de la molécula, aunque es la de mayor proporción; b) presentar frecuencias distintas a la radiación incidente, lo cual se conoce como dispersión Raman y es la que proporciona información sobre la estructura molecular de la muestra.

Los fotones de luz dispersados por la molécula pueden tener una frecuencia menor a la luz incidente (transferencia de energía del fotón a la molécula); a esto se le conoce como dispersión Raman Stokes; o también esos fotones pueden tener una frecuencia mayor que la luz incidente (la molécula transmite energía al fotón), lo cual se conoce como dispersión Raman anti Stokes.

Cada molécula tiene un conjunto de valores de frecuencia característicos de su estructura poliatómica y de la naturaleza de los enlaces químicos que la conforman. Si a esta molécula se le hace incidir un haz de luz, su estado energético cambiará a un estado mayor (cambiado su movimiento vibracional o flexional) retornando posteriormente a su estado basal, liberando esa energía al fotón o haz de luz saliente (dispersión Raman), lo cual genera un espectro característico de cada uno de los grupos estructurales que la conforman.

Por ello, se puede decir que las moléculas sujetas a la exposición de un haz de luz experimentan un cambio de energía en la polaridad durante la vibración molecular que conduce a la emisión de un conjunto de huellas dactilares de los grupos atómicos que las conforman. Dichas huellas se utilizan para identificar sus características moleculares o los cambios que estas sufren al cambiar el medio fisicoquímico donde se encuentren. Con base en lo anterior, se estableció que esta técnica puede ser de gran utilidad si se piensa que la reversión de color pueda ser causada por cambios moleculares de las antocianinas al cambiar el pH del medio donde se encuentran contenidas.

Ventajas de la técnica:

- Dado que la respuesta del agua (o medio acuoso) al haz de luz para el espectro Raman es muy débil, esta técnica se puede emplear para el análisis de moléculas disueltas en agua o suspendidas en un medio acuoso.
- De forma general, no se requiere de un proceso de preparación de la muestra.
- Se puede aplicar en muestras que pueden estar en diferentes presentaciones como sólido o líquido, en nuestro caso, las antocianinas contenidas en antocianoplastos o las antocianinas disueltas en el medio celular.
- Puede ser utilizada en muestras biológicas.
- Es una técnica no invasiva.
- Su aplicación para el análisis es muy rápida.

5.6.2 Procedimiento metodológico para el análisis por espectroscopia RAMAN de protoplastos de zarzamora no revertida y revertida.

El análisis se realizó en el Laboratorio Nacional de Ciencias para la Investigación y Conservación del Patrimonio Cultural (LANCIC), en el Instituto de Física de la UNAM. Se utilizó un espectrómetro i-Raman EX portátil de la marca BWTek modelo BWS485III equipado con láser de excitación de 1064 nm con una potencia de salida de 330 mW, con un control de potencia de 0-100% (ajustable a incrementos del 1%). El equipo cubre un rango espectral de 175 cm^{-1} hasta 2500 cm^{-1} con una resolución de $< 10\text{ cm}^{-1}$ a 1296 nm y está acoplado con un detector InGaAs con tiempos de detección de 200 μs – 5 min. Todo el equipo estaba acoplado a un microscopio óptico que permitió localizar los sitios específicos de los protoplastos a analizar y permitir que el láser de excitación llegue al sitio elegido. El sistema estuvo operado por una computadora PC cargada con los programas Vision software y BWIQ multivariate data analysis, software con el que se operó el equipo y se procesaron los datos de la señal de salida.

Para la toma de los espectros Raman, las muestras de protoplastos de frutos no revertidos y revertidos fueron colocadas bajo el microscopio del equipo y visualizadas con el objetivo 20X; los aglomerados de antocianinas de los frutos no revertidos fueron colocados al centro del campo del microscopio para su enfoque con el haz de luz del láser. De igual forma, se colocó la zona de color rojo de las antocianinas dispersas dentro de los protoplastos de los frutos revertidos. En ambas preparaciones se incidió el haz de luz láser de 1064 nm, con 70% de potencia. Los datos obtenidos fueron almacenados y posteriormente analizados para su interpretación.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Modelo vibratorio para inducir RC en frutos de zarzamora

Datos previos generados en nuestro laboratorio y en el IMT (Pérez-Pérez *et al.*, 2016) indicaron que, cuando el movimiento vibratorio del vehículo que transporta la fruta se encuentra en un margen de frecuencias entre 8 y 14 Hz a una amplitud de 0.5 g, se genera la reversión de color. Estos niveles de vibración provocan una condición de rebote que favorece pequeños impactos entre los frutos, generando daño mecánico y la reversión de color. Para reproducir la condición de vibración generadora de la reversión de color, a nivel de laboratorio, se construyó un sistema vibratorio portátil que permitiera estudiar el fenómeno utilizando un clamshell de 6 onzas de capacidad (170 -190 g).

La disposición de este sistema permitió someter un clamshell de 170 g a vibración controlada de 10 Hz y 0.53 g de amplitud durante los tiempos necesarios para inducir la RC (Pérez-Pérez *et al.*, 2016).

6.1.1 Eficacia del sistema vibratorio

Para verificar si el sistema vibratorio reproduce el fenómeno de RC, clamshells con frutos de zarzamora fueron vibrados (10 Hz y 0.5 g) durante 0, 1, 3 y 5 min. Después del tratamiento de vibración por 0, 1 y 3 min, no se observó desarrollo de RC; por otro lado, todas las frutas vibradas durante 5 min mostraron RC (**Figura 15A**). Estos cambios se expresaron mediante el análisis de color de los frutos. La cromaticidad y ángulo de matiz de las zarzamoras vibradas por 5 min exhibían un color rojo de mayor intensidad ($C^* = 3.2$, $h^\circ = 70$) en comparación con frutos vibrados por 0, 1 y 3 min ($C^* = 1.6 - 2.2$, $h^\circ = 155 -170$; $P < 0.05$; **Figura 15B**) (McGuire, 1992). Estos resultados demostraron que el sistema portátil de vibración es capaz de inducir la RC en condiciones de laboratorio de forma rápida sin que sea necesario el almacenamiento de los frutos por amplios periodos de tiempo.

La variedad 'Ak234', después del tratamiento de vibración por 0, 1, 3 y 5 min, mostró incidencia de RC de 0%, 20%, 10% y 40%, respectivamente, valores que se incrementaron a 15%, 75%, 70% y 80%, después de 5 días de almacenamiento a 1 °C (**Figuras 16A y 17A**). En la variedad 'Am151', después del tratamiento, no se observó RC con la vibración por 0, 1 y 3 min; sin embargo, la vibración por 5 min indujo la RC en 15% de los frutos. Esta incidencia aumentó después de 5 días de almacenamiento a un 30%, 85%, 90% y 100%, respectivamente (**Figuras 16B y 17B**). La variedad 'Tupi' sometida a las mismas condiciones de vibración por los mismos tiempos señalados, mostró una incidencia de RC de 0%, 15%, 45% y 60%, respectivamente, al término de la vibración, los cuales se incrementaron a 15%, 30%, 100% y 100% después de 5 días de almacenamiento a 1 °C (**Figura 16C y 17C**).

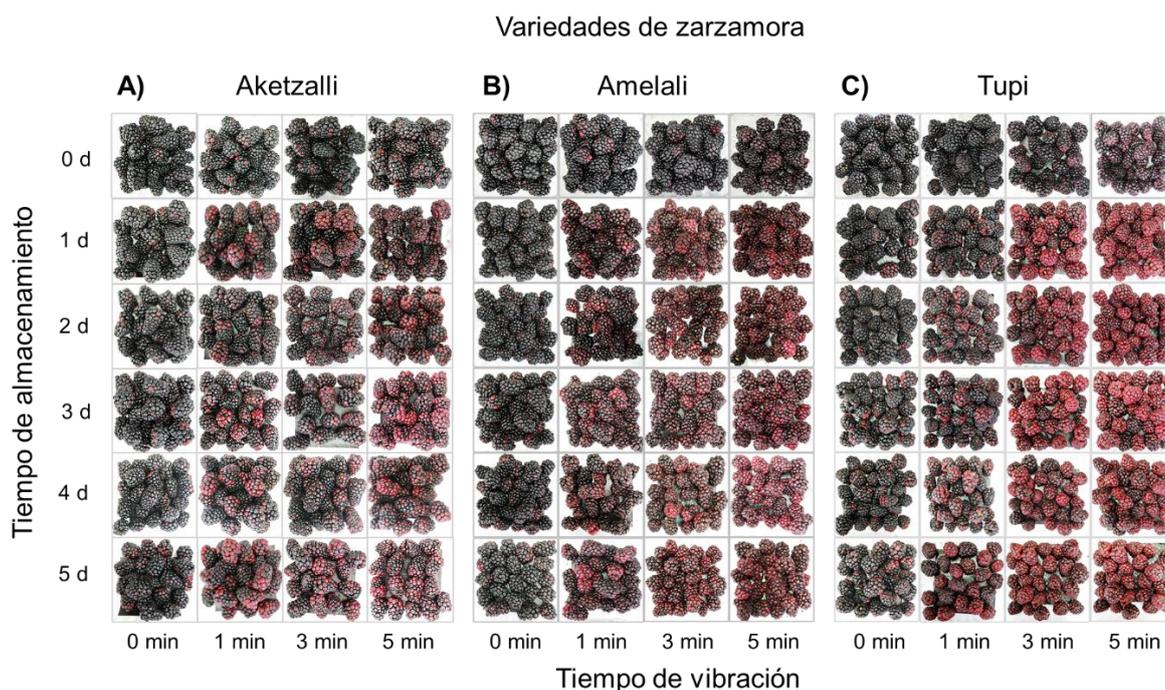


Figura 16. La vibración producida por el equipo vibratorio portátil induce la RC en diferentes variedades de zarzamora. **A)** 'Ak234', **B)** 'Am151', y **C)** 'Tupi'. sometidas a 10 Hz y 0.5 g por 0, 1, 3 y 5 min de vibración almacenadas 5 días a 1 °C.

Aunque se realizaron las evaluaciones después de 5 días de almacenamiento, estas podían realizarse después de un día de almacenamiento (**Figuras 16 y**

17A). También, es posible realizarlo después de un breve periodo de reposo de las muestras vibradas (probablemente 3-6 horas). Esto sugiere que el cambio de color está ocurriendo de forma dinámica a medida que las antocianinas son liberadas de sus compartimentos subcelulares, los cuales fueron alterados mecánicamente por la vibración.

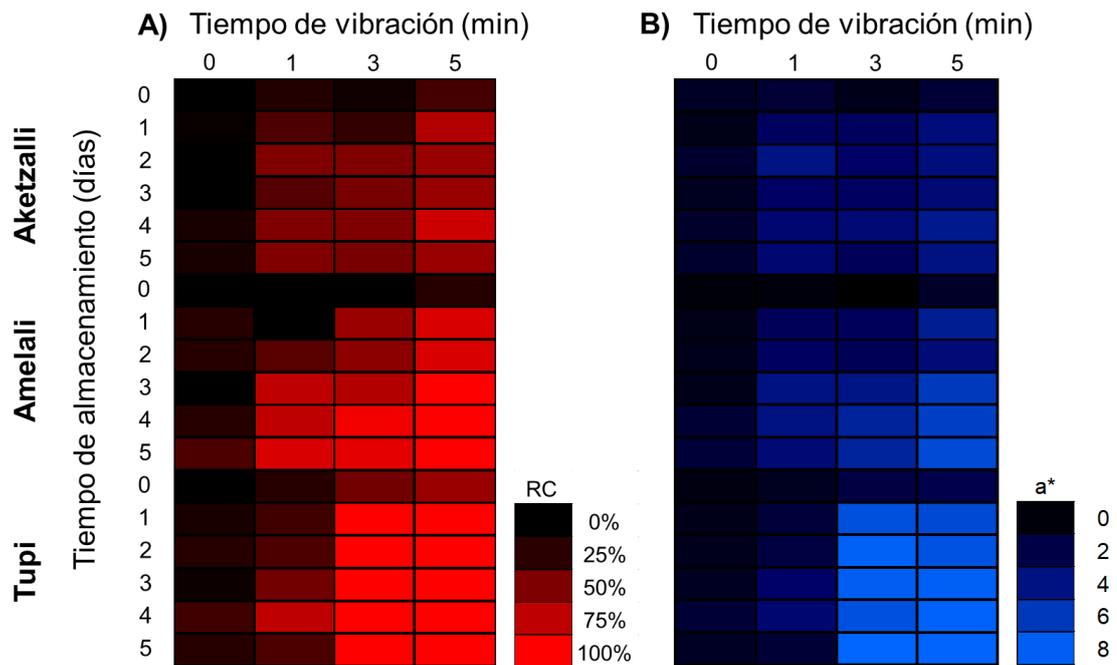


Figura 17. El equipo portátil de vibración permite evaluar la susceptibilidad a la RC de diferentes variedades. El mapa de calor indica: (A) % de incidencia de RC y (B) cambios en valor de color a^* de la escala CIELa*b* en las variedades 'Ak234', 'Am151' y 'Tupi' sometidas por 0, 1, 3 y 5 min de vibración (10 Hz y 0.5 $g\ s^{-2}$) y almacenadas de 0 - 5 días a 1 °C (n = 15).

El cambio de color negro ($a^* \leq 2.0$) a rojo ($a^* > 2.0$) se puede expresar de forma objetiva midiendo el parámetro a^* de la escala internacional de color CIELa*b* utilizando un espectrofotómetro. La variedad 'Ak234', almacenada de 0 a 5 días, cambió su valor de a^* de 0.90 a 1.08 en muestras no vibradas; de 1.38 a 3.34 en muestras vibradas por 1 min; de 0.53 a 2.56 en muestras vibradas por 3 min; y de 1.42 a 3.93 en muestras vibradas por 5 min (**Figura 17B**). La variedad 'Am151' almacenada de 0 a 5 días, cambió su valor de a^* color de 0.01 a 1.54 en frutos control; de 0.04 a 3.93 en muestras de 1 min de vibración; de -0.36 a 4.86 en muestras de 3 min; y de 0.97 a 6.34 en 5 min de vibración (**Figura 17B**). La variedad 'Tupi' mostró cambios más amplios en este parámetro en las

muestras sometidas por 3 y 5 minutos de vibración (de 0.22 a 0.87 para 0 min; de 0.74 a 1.44 en 1 min; de 1.87 a 8.37 en 3 min y de 2.15 a 8.31 en 5 min) (**Figura 17B**).

Estos datos sugieren que el cambio del parámetro a^* después del proceso de vibración, podría ser utilizado como un indicador de la susceptibilidad a la RC entre distintas variedades; por ello se puede decir que la variedad 'Tupi' fue la más susceptible a presentar RC en comparación con las variedades Ak234 y Am151.

Esta tendencia diferencial a la RC entre variedades coincide con lo observado en otros estudios (Edgley *et al.*, 2020; Salgado & Clark, 2016); donde se indica que las variedades BlackMagic, Natchez, Ouachita, APF-12, Triple Crown, Tupi, y Von, presentan mayor susceptibilidad. También esos estudios señalaron que las variedades con baja firmeza presentan mayor RC. Esta información sugiere que, si la firmeza es menor en las variedades susceptibles, esta podría estar ligada a una menor resistencia de las estructuras subcelulares que contienen a las antocianinas y por ello una mayor tendencia a la RC.

La evolución de los cambios del valor de a^* en los frutos vibrados de 0 a 5 min durante el almacenamiento a 1 °C dan una mejor evidencia de la susceptibilidad a la RC de las tres variedades (**Figura 18**). Los frutos de las tres variedades no vibrados (0 min) mantuvieron su color negro ($a^* \leq 2.0$) durante los 5 días de almacenamiento. Los frutos de las tres variedades vibrados por 1 min mostraron cambios en el valor de a^* de 2 a 4 durante el almacenamiento. Por otro lado, con el tratamiento de vibración por 3 min, los frutos de la variedad 'Ak234' mantuvieron su color a^* entre 2 y 4; la variedad 'Am151' mostró cambios de a^* entre 2 y 6 durante su almacenamiento; y la variedad 'Tupi' mostró los más amplios cambios del valor a^* (7 a 8) después de un día de almacenamiento a 1 °C.

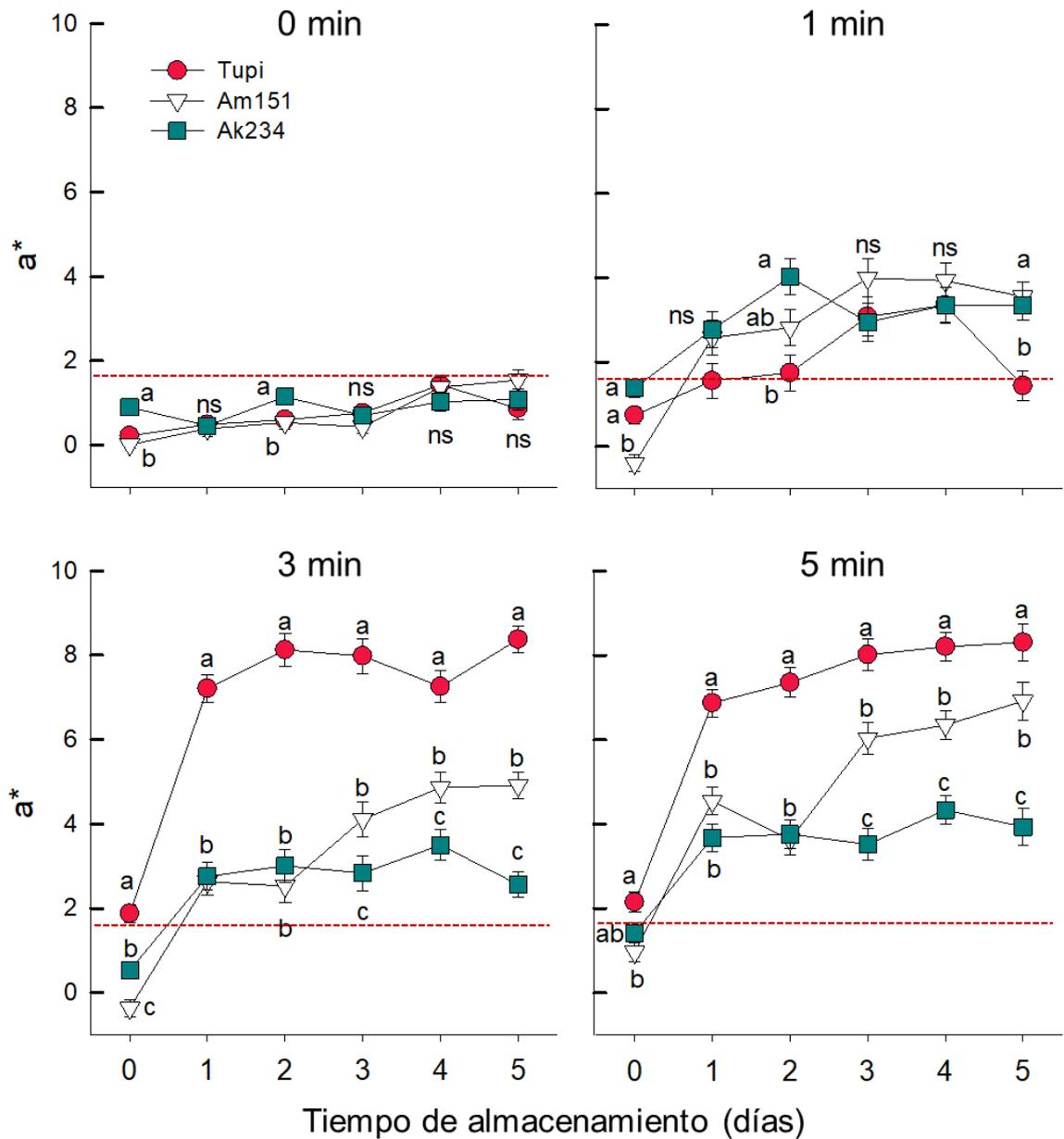


Figura 18. Las variedades de zarzamora presentan diferente susceptibilidad a la RC durante su almacenamiento a 1 °C. Símbolos en las gráficas representan el promedio del parámetro de color a^* y las barras representan el error estándar. La línea punteada roja señala el límite entre el color negro ($a^* \leq 2.0$) y rojo ($a^* > 2.0$). Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$) mediante las pruebas de ANOVA de una vía y Tukey.

Estudios previos han explorado la posibilidad de que el almacenamiento a temperatura de refrigeración (entre 1 y 5 °C) podría ser un factor clave en la inducción de la RC (Armour *et al.*, 2021; Lawrence & Melgar, 2018; McCoy *et al.*,

2016; Salgado & Clark, 2016; Segantini *et al.*, 2017). La evidencia aportada en el presente estudio sugiere que la vibración es la principal causa que desarrolla la RC, dado que los frutos no vibrados y almacenados a 1 °C por 5 días no mostraron cambios significativos de color (5 -30 %), en cambio la vibración indujo de manera considerable el fenómeno (10 -100 %).

Estos datos sugieren que el daño mecánico infringido a los frutos, previo al almacenamiento, es el factor que detona la reversión de color, siendo posible que los altos porcentajes de RC señalados en reportes previos se deban a daños mecánicos previos al almacenamiento, pero estos no fueron considerados o evaluados. Con base en estos resultados, es posible considerar que la alta prevalencia de RC (50% – 98%) reportada en esos estudios podría estar más relacionada con el daño mecánico y solo de manera marginal al efecto de la baja temperatura de almacenamiento, estableciéndose una diferencia clara entre las conclusiones dadas en este trabajo y las señaladas en la literatura (Lawrence & Melgar, 2018; McCoy *et al.*, 2016; Worthington *et al.*, 2017).

Con base en los resultados anteriormente expuestos, se puede decir que el equipo de vibración portátil permitió establecer un método que permite inducir rápidamente la RC en distintas variedades, lo cual podría ser de utilidad para las empresas que constantemente están desarrollando nuevos cultivares, ya que les permitiría seleccionar aquellos que presenten menor susceptibilidad a la RC.

6.2 Uso de altas presiones para inducir RC en frutos de zarzamora

En trabajos previos desarrollados en el Laboratorio de Fisiología y Bioquímica Poscosecha de Frutas y Hortalizas (Pérez-Pérez *et al.*, 2016), así como en experimentos realizados en este trabajo de tesis, se ha podido observar que el daño mecánico genera RC en los frutos de zarzamora. En este sentido, se ha documentado que las altas presiones hidrostáticas (HHP) generan cambios en la morfología celular, principalmente ruptura de la estructura interna (Gomez-

Maqueo *et al.*, 2020), por lo que se planteó que su aplicación, al igual que la vibración, podría generar RC en la zarzamora.

Para comprobar la hipótesis de que las HHP podrían inducir la RC, se realizó un estudio en el cual frutos de zarzamora fueron sometidos a distintas presiones (0, 200, 350 y 500 MPa) durante diferentes tiempos (0, CUT, 3, 5 y 10 min); CUT es el tiempo necesario para que el equipo de HHP alcance las condiciones de operación establecidas para cada presión de estudio. Después del tratamiento, las muestras se almacenaron por 5 días a 1 °C. A las 0, 24, 48, 72, 96 y 120 h de almacenamiento, se realizó una inspección visual. Inmediatamente después de que los frutos fueron sometidos a las HHP, se observó que los tratamientos a 200 MPa por CUT, 3, 5 y 10 min, y 350 MPa por CUT min no indujeron RC en las zarzamoras (**Figura 19**); por otro lado, los tratamientos a 350 MPa por 3, 5 y 10 min, y 500 MPa por CUT, 3 y 5 min provocaron RC en algunos de los frutos; mientras que el tratamiento de 500 MPa durante 10 min modificó el color de todos los frutos.

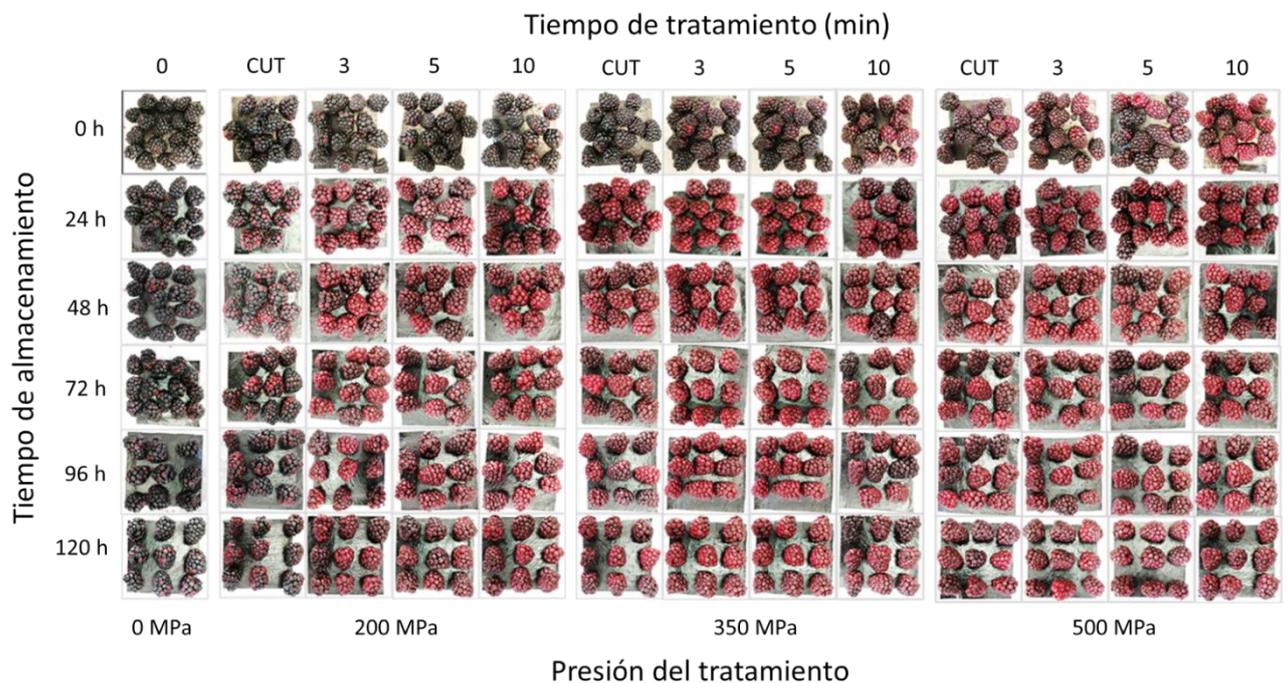


Figura 19. La RC es inducida por altas presiones hidrostáticas. Cambio de color en frutos de zarzamora inducido por diferentes presiones (0, 200, 350 y 500 MPa) durante distintos tiempos (0, CUT, 3, 5 y 10 min) en su almacenamiento poscosecha durante 120 h a 1 °C.

Con excepción de los frutos tratados a 200 MPa por el CUT, después de las 24 h de almacenamiento a 1 °C, se observó en todos los frutos sometidos a los tratamientos de altas presiones, que las drupas revirtieron su color de manera homogénea; esta tendencia se observó hasta las 120 h de almacenamiento, demostrando que HHP puede ser utilizado como método para inducir la RC (**Figura 19**).

Debido a que el tratamiento con 200 MPa es el que produce cambios visuales similares a lo observado con el tratamiento de vibración, se eligió este tratamiento por 0, CUT, 3, 5 y 10 min y se almacenaron los frutos por 2 días, ya que a partir del día 1 de almacenamiento, los cambios de color observados fueron mínimos. La inspección visual reveló que, en el día 0, las zarzamoras control no presentaron RC; por el contrario, las berries tratadas por CUT, 3, 5 y 10 min mostraron signos de RC (**Figura 20A**). En el día 1 y 2 de almacenamiento, se incrementaron los cambios de color observados en los frutos tratados.

Las observaciones realizadas se confirmaron mediante el análisis de color, ya que, en el día 0, los frutos tratados (CUT, 3, 5 y 10 min) presentaron ligero incremento en el parámetro a^* ($a^* = 2.1, 2.5, 3.1$ y 3.1 , respectivamente) en comparación con las zarzamoras control ($a^* = 0.5$); en el caso de la luminosidad, únicamente los frutos tratados durante 3 y 5 min ($L = 23.0$ y 21.3 , respectivamente) presentaron aumento significativo en comparación con el control ($L = 19.3$) (**Figura 20B**). En el día 1 y 2 de almacenamiento, los frutos tratados durante CUT, 3, 5 y 10 min presentaron notable aumento en a^* (en el día 1: $a^* = 5.3, 5.8, 5.6$ y 6.9 , respectivamente; en el día 2: $a^* = 6.4, 6.2, 7.1$ y 7.3 , respectivamente) y L^* (en el día 1: $L = 18.8, 20.1, 22.8$ y 22.1 , respectivamente; en el día 2: $L = 18.3, 21.3, 19.6$ y 22.3 , respectivamente) en comparación con el control (en el día 1: $a^* = 1.3, L = 14.9$; en el día 2: $a^* = 2.1, L = 14.9$). Estos resultados indican que el tratamiento de HHP con 200 MPa desde el día 0 induce la presencia de la coloración roja en los frutos de zarzamora, mientras que los vuelve más claros (mayor luminosidad) a partir del

día 1 de almacenamiento (McGuire, 1992), confirmando que las HHP son un método adecuado para inducir la RC en los frutos de zarzamora.

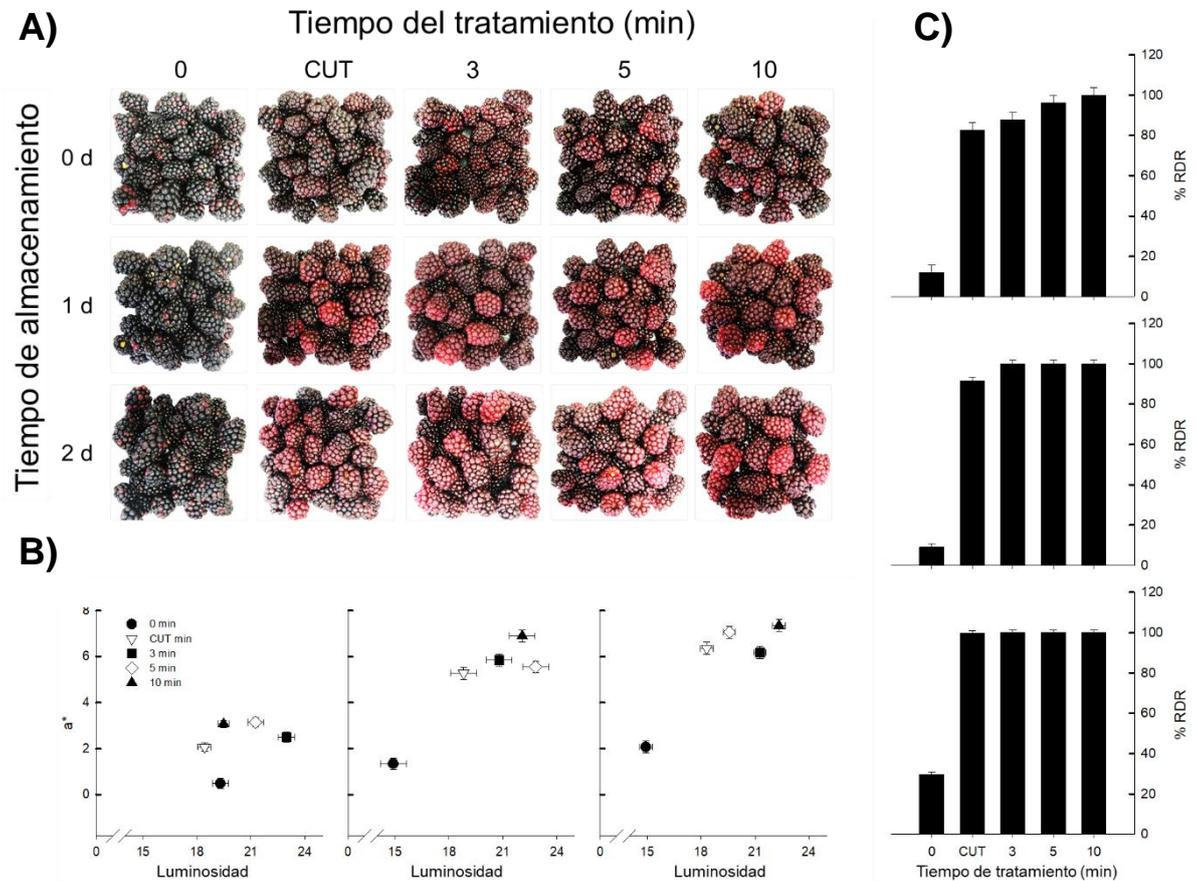


Figura 20. El tratamiento con altas presiones hidrostáticas es un método para inducir la RC de manera homogénea. **A)** Cambio de color visual, **B)** Parámetro de color a^* y luminosidad, y **C)** % de RC inducido por el tratamiento con altas presiones a 200 MPa a diferentes tiempos (0, CUT, 3, 5 y 10 min) durante 2 días de almacenamiento a 1°C.

Para evaluar si las HHP es un método homogéneo para inducir la RC, se analizó el porcentaje de drupas por fruto que cambiaron de color. En el día 0 de almacenamiento, los frutos control presentaron bajo porcentaje de drupas con RC (menor a 20%) en comparación con los frutos sometidos al tratamiento de altas presiones (mayor a 80%; **Figura 20C**). En el día 1 y 2 de almacenamiento, los frutos control mantuvieron estos bajos porcentajes de RC (entre 10 y 30%), mientras que todos los tratamientos con HHP, excepto el CUT por 1 día de

almacenamiento (91.5%), indujeron la RC en el 100% de las drupas. Esto confirma que las HHP, al producir una fuerza uniforme en todas direcciones (Mújica-Paz *et al.*, 2011), causan el mismo daño mecánico en todas las drupas del fruto, generando una RC homogénea.

Con base en los resultados anteriormente descritos, se puede concluir que las altas presiones son un método adecuado para inducir la RC en poco tiempo y de manera uniforme, lo que podría permitir estudiar el mecanismo que causa este fenómeno. Sin embargo, el método de vibración resulta menos costoso, reproduce el fenómeno de RC fácilmente en el laboratorio y, al igual que las altas presiones, requiere de poco tiempo (5 min) para inducir la RC.

6.3 Estudio de correlación entre la RC y los cambios en el contenido de antocianinas

Para evaluar la relación entre el cambio de color y el contenido de antocianinas, frutos revertidos (vibrados por 5 min) y no revertidos se almacenaron por 120 horas a 1 °C. La inspección visual mostró que las muestras revertidas y no revertidas mantuvieron estable su respectiva coloración durante todo el tiempo de evaluación (**Figura 21A**). Los parámetros h° y C^* revelaron que los frutos revertidos y no revertidos poseen diferentes coordenadas de color (**Figura 21B**). Durante todo el tiempo de almacenamiento (120 h), frutas revertidas presentaron valores de C^* entre 2.3 y 11.8, y valores de h° entre 8.2° y 53.6°. Por el contrario, la zarzamora no revertida mostró valores de C^* entre 0.5 y 4.2, y h° entre 290.4° y 352.3°.

Los valores de C^* y h° en frutos revertidos y no revertidos indicaron que las muestras se localizaron dentro del espacio de color naranja-rojo y azul-violeta, respectivamente (McGuire, 1992; Wrolstad *et al.*, 2005). Esto confirma que el daño mecánico es una causa de la RC, y que una vez que se presenta este cambio de color, se mantiene durante todo el almacenamiento (Edgley *et al.*, 2020; Pérez-Pérez *et al.*, 2016).

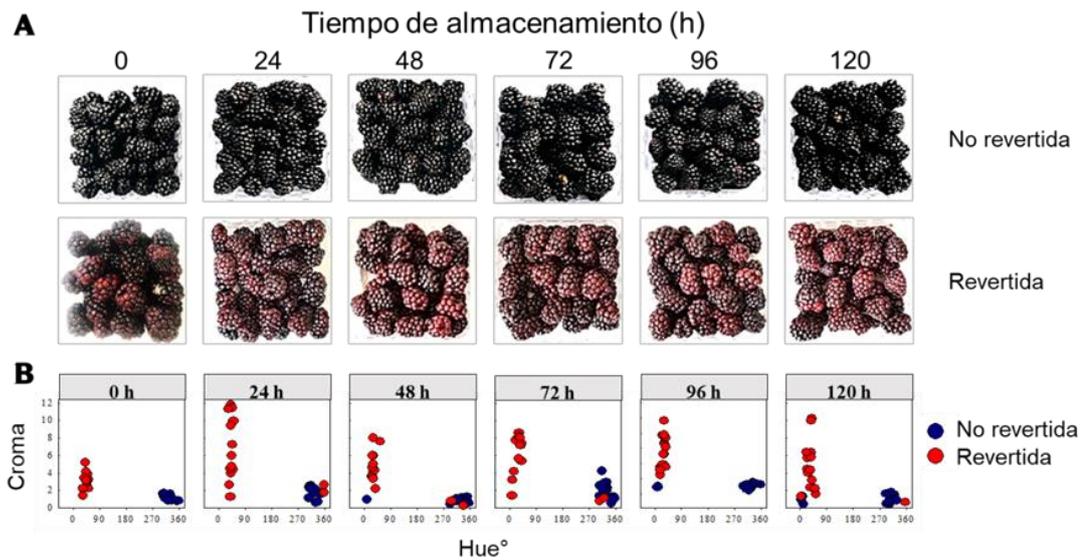


Figura 21. La reversión de color en la fruta de zarzamora es un defecto permanente. A) Cambio de color visual, B) cambios de hue° y cromas en fruta almacenada por 120 h a 1 °C (n=15). Los círculos indican mediciones de color individuales.

Para evaluar la contribución del contenido de antocianinas en el cambio de color observado en la RC, frutos revertidos y no revertidos fueron sometidos al análisis de antocianinas. Al inicio del almacenamiento (0 h), los frutos vibrados ya presentaban RC, no obstante, no se observó diferencia en el contenido de antocianinas monoméricas (obtenido por espectrofotometría) ni en el contenido de las antocianinas individuales (obtenido por HPLC) en comparación con los frutos no revertidos (**Figura 22A, C, D, E y F**). Esta igualdad en el contenido de antocianinas monoméricas de los frutos revertidos y no revertidos se mantuvo hasta las primeras 72 h de almacenamiento, pero a partir de las 96 h de almacenamiento, los frutos revertidos redujeron en 20% el contenido de antocianinas monoméricas respecto de los frutos no revertidos (**Figura 22A**).

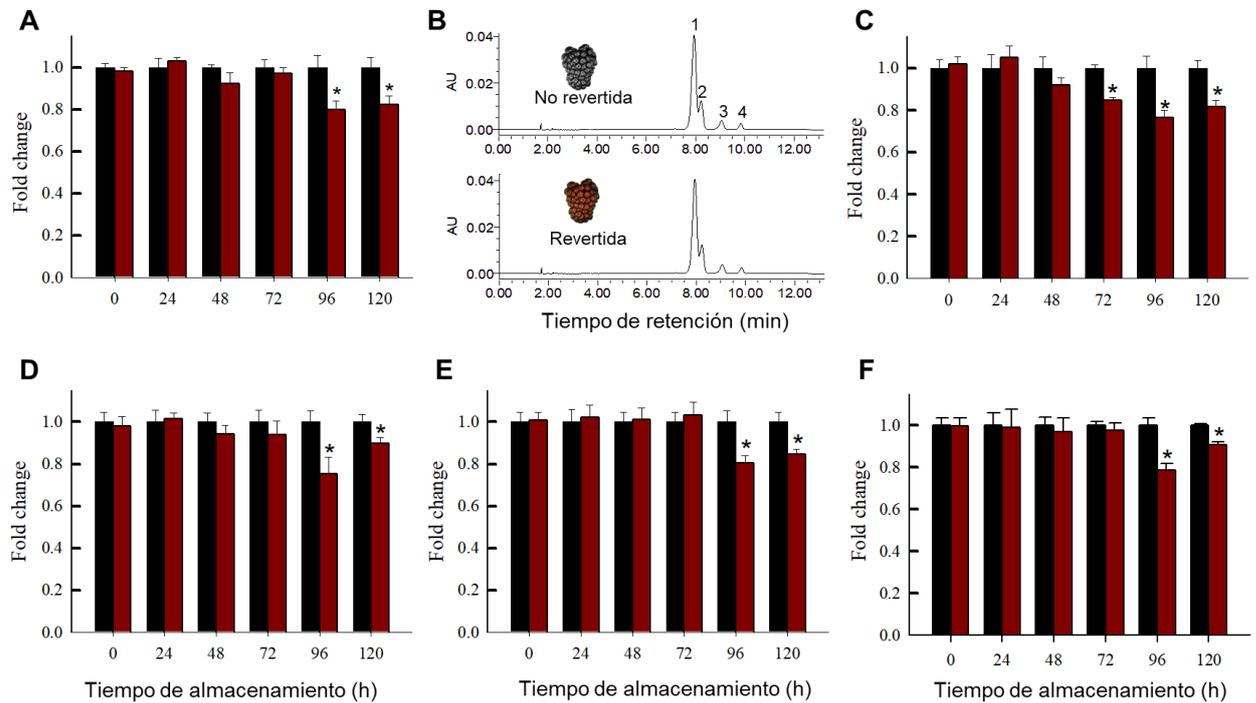


Figura 22. La Reversión de Color no está relacionada con la reducción del contenido de antocianinas. **A)** Antocianinas monoméricas, **B)** Perfil de antocianinas, 3-O-glucosil cianidina (pico 1) y tres antocianinas no identificadas (picos 2, 3 y 4), **C)** 3-O-glucosil cianidina, **D)** Antocianina no identificada 1, **E)** Antocianina no identificada 2, y **F)** Antocianina no identificada 3 en fruta revertida y no revertida almacenadas durante 120 h a 1 °C. Cada punto indica valor promedio \pm EE (n = 9). *P < 0.05 usando la prueba t de Student.

En cuanto al perfil de antocianinas, durante todo el almacenamiento, los frutos revertidos y no revertidos presentaron un perfil similar, observándose cuatro antocianinas en ambos tratamientos (**Figura 22B**). Previamente, ya se ha reportado que frutos de zarzamora revertidos tienen el mismo perfil de antocianinas que frutos no revertidos (Edgley et al., 2019b; Kim et al., 2019). Con el uso de un estándar, el pico 1 fue identificado como 3-O-glucosil cianidina. Durante las primeras 48 h de almacenamiento, los frutos revertidos y no revertidos presentaron contenido de 3-O-glucosil cianidina comparable, pero a partir de las 72 h, los frutos revertidos registraron 18% menor concentración de 3-O-glucosil cianidina que los frutos no revertidos (**Figura 22C**). Las tres antocianinas minoritarias mostraron una tendencia similar; en las primeras 72 h de almacenamiento no se observaron diferencias entre frutos revertidos y no

revertidos, pero a las 96 h de almacenamiento, en frutos revertidos, se observó una disminución entre el 20 y 25% en comparación con frutos no revertidos (**Figura 22D, E y F**).

Con los resultados obtenidos del análisis de color y del contenido de antocianinas, se demostró que la RC no está asociada con la disminución en el contenido de antocianinas, ya que desde la hora 0 de almacenamiento, los frutos presentaban coloración roja, y el contenido de antocianinas no cambió hasta después de 72 horas a 1 °C. Otros estudios han reportado disminución entre el 50 y el 60% de antocianinas en zarzamora revertida después de 24 h de almacenamiento (Edgley *et al.*, 2019b; Kim *et al.*, 2019; Park *et al.*, 2023), por lo que es posible que la reducción de antocianinas reportada en frutos revertidos sea debida a cambios que ocurren después de la RC.

Con este experimento, fue posible comprobar que los frutos revertidos y no revertidos tienen diferente coloración, pero el mismo contenido y tipo de antocianinas. Un fenómeno similar se ha observado en células de maíz (*Zea mays*) y en pétalos de rosas azules (*Rosa* sp. cv. 'Rhapsody'); en dichas muestras, el color azul oscuro fue asociado a la presencia de aglomerados de antocianinas (Gonnet, 2003; Irani & Grotewold, 2005). Debido a esto, para determinar si la estructura intracelular donde se encuentran las antocianinas está involucrada en la RC, se realizaron estudios de microscopía tanto en frutos revertidos como no revertidos.

6.4 Cambios de los aglomerados de antocianinas en la RC

Para comprobar que la vibración causó daño en la estructura celular, se realizaron observaciones de las membranas en las células de drupas de zarzamora no revertida y revertida. Para lograr esta observación, a la epidermis de zarzamora se añadió un fluoróforo (SynaptoRed C2) capaz de adherirse a los sistemas membranales de la célula, especialmente si se encuentran íntegros. En el fruto no revertido, se logró observar la fluorescencia del reactivo adherido a la

membrana celular y a múltiples sistemas membranales en el interior de la célula (**Figura 23A**); por el contrario, en la drupa revertida, no se observó la fluorescencia del fluoróforo (**Figura 23B**), lo cual sugiere que el daño mecánico producido por la vibración, probablemente, causó la ruptura de las membranas impidiendo su visualización. Esto coincide con lo reportado en distintos estudios, en los que se ha observado, por medio de técnicas que directa o indirectamente evalúan la integridad membranal, que el daño mecánico induce la ruptura de membrana celular (Hu *et al.*, 2020; Hussein *et al.*, 2019; Wei *et al.*, 2019). Asimismo, también se confirma lo planteado por otros autores, los cuales han sugerido una posible relación entre la ruptura de membranas y la RC en zarzamora (Edglay *et al.*, 2019b; Pérez-Pérez *et al.*, 2016). Se ha hipotetizado que la razón por la cual podría existir una relación entre la ruptura de membranas y la RC es porque la ruptura membranal posiblemente altera la estructura donde se almacenan las antocianinas, generando el cambio de color que proporcionan estos compuestos.

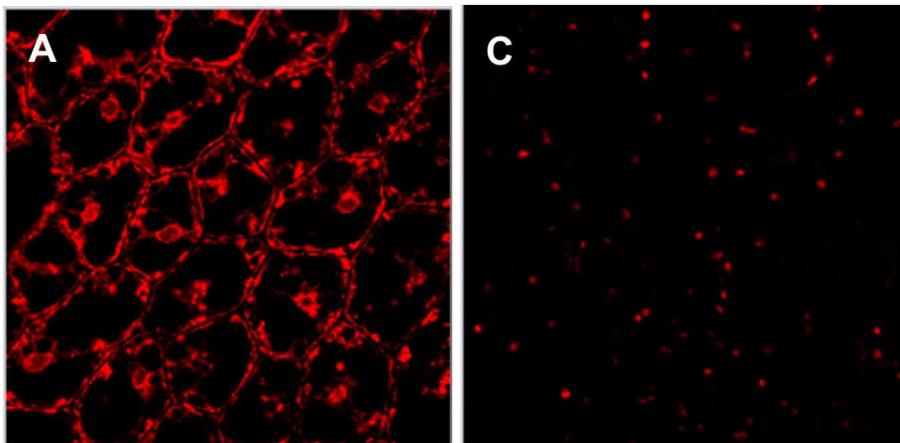


Figura 23. La vibración que genera la RC induce la pérdida de membranas en los frutos de zarzamora. **A)** Fruto no revertido y **B)** fruto revertido.

Debido a lo anterior, se empleó la microscopía multifotónica para medir la autofluorescencia de las antocianinas y con ello identificar si presentan cambios en la estructura donde se almacenan. Los análisis revelaron que las antocianinas en las muestras no revertidas se encuentran en forma de aglomerados esféricos (**Figura 24A**); de forma contrastante, en los frutos revertidos, las antocianinas se encuentran dispersas en el medio celular (**Figura 24B**). Esto sugiere que el daño

mecánico generado por la vibración afecta la estructura intracelular donde se almacenan las antocianinas, lo cual provoca su dispersión en el medio celular y esto podría ser la causa que desencadene el cambio de color observado en la RC.

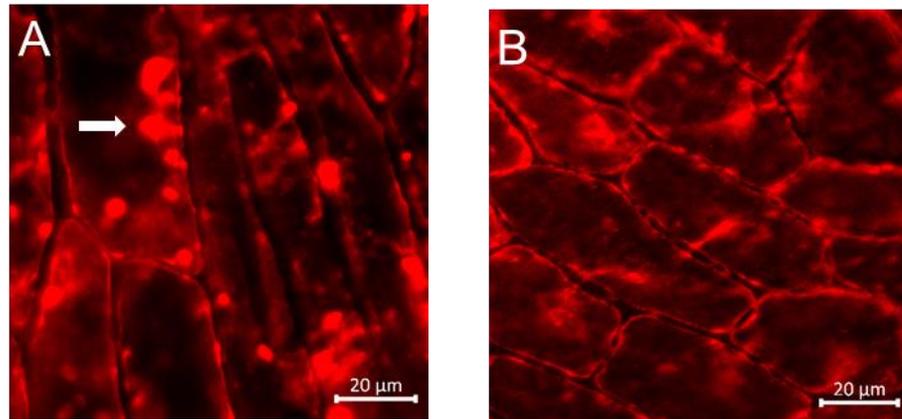


Figura 24. La RC se asocia con la pérdida de aglomerados de antocianinas. Autofluorescencia de antocianinas en epidermis de drupas de zarzamora **A)** no revertida y **B)** revertida. Para observar la fluorescencia multifotónica se usó un láser de excitación de $\lambda = 710$ nm.

Para comprobar que existe una relación directa entre la pérdida de aglomerados de antocianinas con la reversión de color, se realizó la extracción de protoplastos y se indujo su ruptura. La microscopía óptica permitió observar que en los protoplastos de las drupas no revertidas la mayor parte de los pigmentos se encuentran en forma de pequeños cuerpos esféricos de coloración morado oscuro (**Figura 25A**); mientras que en los protoplastos extraídos de drupas con reversión de color los pigmentos están dispersos en la célula y presentan coloración rojo-naranja (**Figura 25B**).

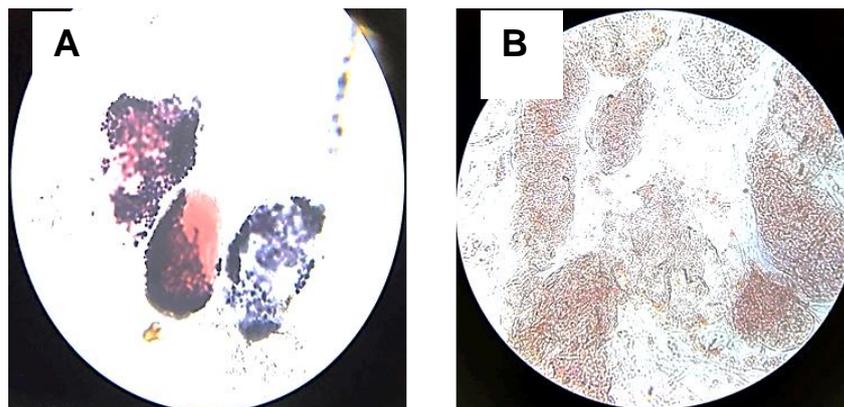


Figura 25. Cambios en los aglomerados intracelulares de antocianinas observados en protoplastos extraídos de frutos **A)** no revertidos y **B)** revertidos. Observaciones realizadas con microscopía visible con una ampliación de 40X.

Los protoplastos de drupas no revertidas fueron sonicados para inducir su ruptura, observándose que después de este tratamiento, los pigmentos cambiaron de color morado a color rojo (**Figura 26**); el color rojo observado en los protoplastos sonicados es comparable con lo observado en protoplastos de drupas revertidas, lo cual indica que el cambio de color que se observa en la RC se induce por la ruptura de los aglomerados de antocianinas. Esta es la primera vez que se asocia la forma en cómo se encuentran las antocianinas almacenadas dentro de la célula con la presencia del fenómeno de RC; si estas se encuentran en forma de aglomerados, se mantiene el color morado o si se encuentran dispersas en el medio celular o vacuolar se presenta la RC. En estudios previos en otro tipo de células, como maíz y rosas, se ha observado que la distribución intracelular de las antocianinas influye en el color que aportan al tejido (Gonnet, 2003; Irani & Grotewold, 2005). Estas observaciones no se habían descrito en zarzamora.

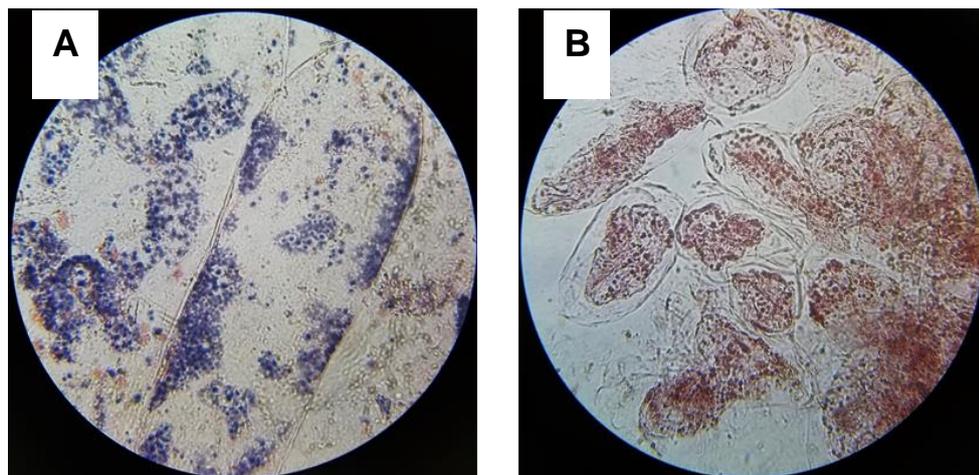


Figura 26. La ruptura de aglomerados intracelulares por sonicación genera cambio de color en las antocianinas. Observaciones con microscopía visible con una amplificación de 40X en protoplastos extraídos de frutos no revertidos sin sonicación **A)** y después de la sonicación **B)**.

Al romperse los aglomerados de antocianinas, podrían estar ocurriendo dos fenómenos, los cuales serían los responsables del cambio de color: modificación en las interacciones intermoleculares de las antocianinas y cambio de pH intracelular.

Con respecto a la primera hipótesis, en diferentes tejidos vegetales, se ha relacionado la pérdida de aglomerados de antocianinas con una modificación en la coloración, esto debido a que, dentro de los aglomerados, las antocianinas están en contacto con compuestos fenólicos, taninos y con otras antocianinas (Chanoca *et al.*, 2015; Conn *et al.*, 2010; Kallam *et al.*, 2017; Markham *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2006), esto puede favorecer las interacciones intermoleculares (copigmentación) y/o de auto-asociación (Trouillas *et al.*, 2016), las cuales causan un efecto hipercrómico y batocrómico en el espectro de absorción y en el de emisión de las antocianinas y, por tanto, modifican el color que imparten estos compuestos al tejido vegetal.

En cuanto a la segunda hipótesis, en la cual se propone el cambio de pH intracelular como el responsable de la RC, se piensa que las antocianinas están contenidas en antocianoplastos (vesículas esféricas que almacenan antocianinas y se ubican en la vacuola) (Nozzolillo & Ishikura, 1988; Pecket &

Small, 1980; Small & Pecket, 1982; Yasuda *et al.*, 1989), los cuales, por originarse en el citoplasma, podrían tener un pH cercano a la neutralidad (pH entre 6.5 y 7.0) (Chanoca *et al.*, 2015; Pourcel *et al.*, 2010). Estos antocianoplastos, al romperse por efecto de la vibración u otro daño mecánico, liberarían las antocianinas en la vacuola, la cual tiene un pH ácido (entre 2.8 y 3.2, que es el pH del extracto acuoso de la zarzamora) (Moskowitz & Hrazdina, 1981). Este cambio de pH del medio en el cual se encuentran las antocianinas podría ser el responsable de la RC, ya que ha sido ampliamente documentado que la antocianina en pH cercano a la neutralidad presenta una estructura quinoidal con coloración azul; mientras que a pH ácido, la antocianina tiene una estructura de catión flavilio, de color rojo (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2016; Tang *et al.*, 2019). Debido a que es factible que se presente cualquiera de las dos posibilidades antes mencionadas, ambas hipótesis fueron evaluadas.

6.5 Participación de la copigmentación en la RC

La microscopía multifotónica permitió hacer un análisis puntual de los espectros de emisión de fluorescencia de los aglomerados de antocianinas de la epidermis de frutos revertidos y no revertidos (**Figura 27A**). Se observó que las antocianinas de frutos no revertidos mantuvieron el mismo espectro que las antocianinas de frutos revertidos, pero con un pico de máxima intensidad mayor que el de muestras revertidas. Este mismo fenómeno también fue observado en los protoplastos extraídos (**Figura 27B**). La razón por lo cual podríamos observar estos cambios en intensidad de fluorescencia es debido a modificaciones en las interacciones intermoleculares que presentan las antocianinas, ya que es una de las causas que comúnmente se asocian con modificaciones en la intensidad de fluorescencia (Merlin *et al.*, 1985).

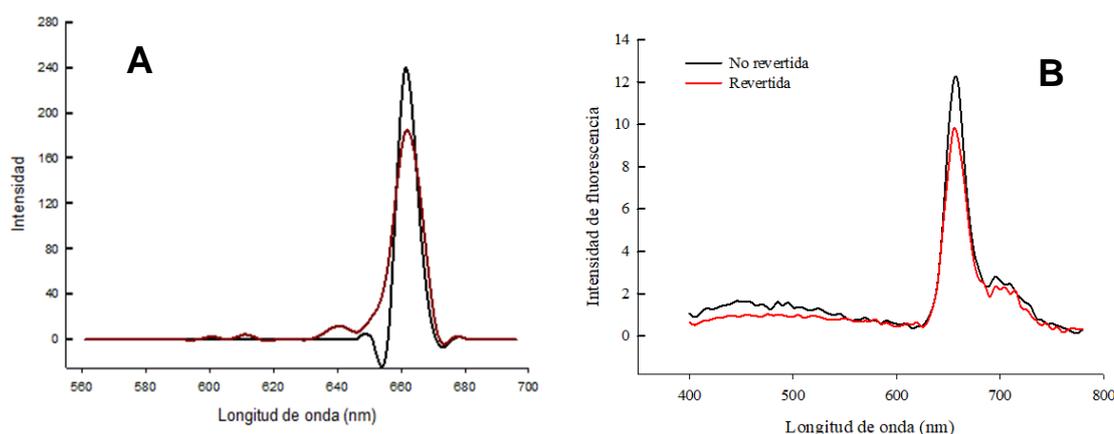


Figura 27. Las antocianinas de frutos de zarzamora no revertidas presentan mayor intensidad en emisión de fluorescencia que las antocianinas de frutos revertidos. **A)** Fluorescencia de antocianinas obtenida mediante microscopía multifotónica usando un láser de excitación de 710 nm. **B)** Fluorescencia de protoplastos de zarzamora obtenida mediante un espectrofluorómetro usando un láser de excitación de 350 nm.

Con base en lo anterior, se sugiere que en la reversión de color podrían estar involucrados cambios en interacciones intermoleculares de las antocianinas. Es posible que en los frutos no revertidos, las antocianinas que se encuentran en forma de aglomerados estén asociadas con otros compuestos llamados copigmentos, y, por el contrario, en los frutos revertidos, las antocianinas al dispersarse hayan perdido las interacciones que previamente presentaban.

Para comprobar el efecto de los copigmentos en el espectro de emisión de fluorescencia de las antocianinas, a antocianinas semipurificadas de zarzamora se añadieron los compuestos propuestos como copigmentos y se registró su espectro de emisión de fluorescencia. Debido a su abundancia en el fruto, los compuestos propuestos como copigmentos fueron flavonoides, como la catequina, ácidos orgánicos, como el ácido málico y cítrico, y ácidos fenólicos, como ferúlico y *p*-cumárico. Este estudio se realizó en dos diferentes pH (3.3 y 7.0) para simular las posibles condiciones en las que se podrían encontrar las antocianinas en vacuola y citoplasma.

La copigmentación con ácidos fenólicos en ambos pH se observó que modificó el espectro de emisión de fluorescencia de la antocianina de zarzamora (**Figuras**

28A y 28B). En el caso del ácido cumárico, se observó que a pH de 3.3, indujo un incremento en el espectro de emisión entre 340 y 480 nm, mientras que a pH de 7.0 modificó el espectro de emisión de la antocianina en la región de 380 a 480 nm. En el caso de ácido ferúlico, el cambio en el espectro de emisión de la antocianina fue mayor; a pH ácido (3.3), la copigmentación con el ácido ferúlico provocó un incremento del espectro de emisión 5 veces mayor en comparación con la antocianina sin ácido ferúlico.

Con respecto a los flavonoides, la copigmentación con catequina, en ambos pH (**Figuras 28C y D**), indujo en la antocianina incremento en el espectro de emisión (efecto hiperacrómico) en la región de 340-350 nm; en el caso de los ácidos orgánicos, no se observó con la adición de ácido málico o cítrico un notable cambio en el espectro de emisión de fluorescencia (**Figuras 28E y F**); únicamente el ácido cítrico, a pH de 3.3, provocó efecto hiperacrómico en el intervalo de longitud de onda entre 340 y 380 nm, así como a 400 nm.

Ha sido ampliamente documentado que modificaciones en el espectro de emisión de la antocianina pueden considerarse como evidencia de cambios en las interacciones intermoleculares de las antocianinas (Trouillas *et al.*, 2016). Por lo que con los resultados obtenidos, comprobamos que la antocianina de la zarzamora tiene la capacidad de interactuar con copigmentos, principalmente con fenoles (ácido cumárico, ferúlico y catequina).

No obstante, la copigmentación observada en este experimento no reproduce los espectros de emisión que en condiciones fisiológicas (en tejido y protoplastos) observamos en la antocianina de la zarzamora, por lo que la evidencia obtenida hasta este momento no permite asociar los cambios en las interacciones intermoleculares de las antocianinas con la RC de la zarzamora. Es posible que, a pesar de que está ampliamente reportado este método para evaluar interacciones intermoleculares, la reproducción *in vitro* no es adecuada para evaluar el efecto de la copigmentación en la RC.

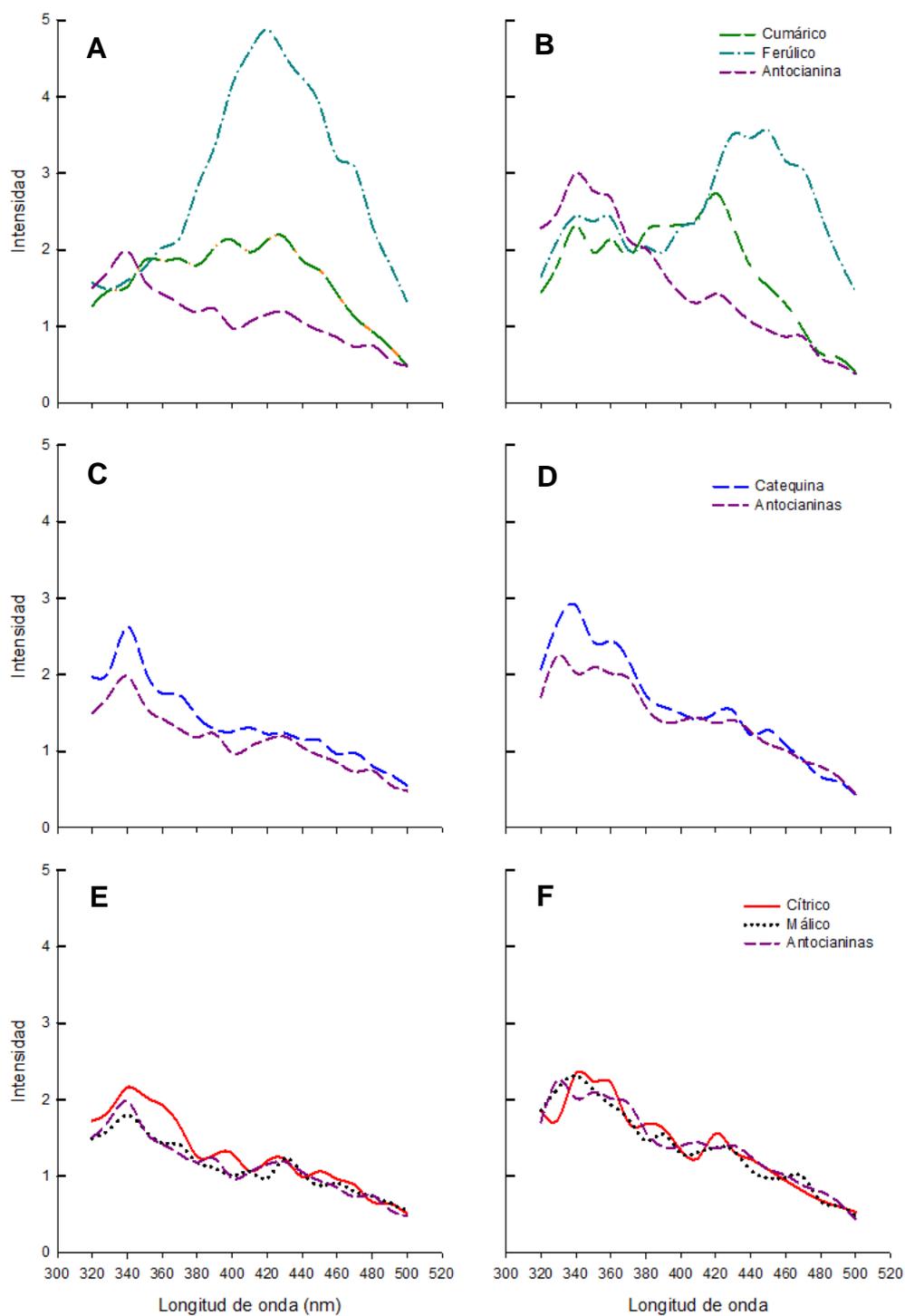


Figura 28. Efecto de la copigmentación y del pH en los espectros de emisión de fluorescencia de antocianinas de zarzamora utilizando un láser de excitación de 300 nm. Copigmentación de la antocianina de zarzamora con ácidos fenólicos a pH 3.3 (A) y pH 7.0 (B). Copigmentación de la antocianina de zarzamora con flavonoides a pH 3.3 (C) y pH 7.0 (D). Copigmentación de la antocianina de zarzamora con ácidos orgánicos a pH 3.3 (E) y pH 7.0 (F).

6.6 Cambios moleculares de las antocianinas durante la RC. Análisis por espectroscopía Raman.

Hasta el presente, el estudio de los cambios moleculares de las antocianinas durante la reversión de color solo se ha realizado mediante la extracción de estos compuestos y su análisis, utilizando técnicas espectrofotométricas, HPLC y HPLC-Masas; sin embargo, estas técnicas no permiten determinar, a nivel estructural, los cambios moleculares que expliquen el fenómeno de RC, debido a que el proceso de extracción cambia drásticamente la condición natural en que se encuentra la molécula de antocianina.

La espectroscopía Raman permite el estudio de la estructura de las antocianinas en tejidos vivos o *in situ* (Merlin *et al.*, 1985) y ha permitido establecer su forma molecular en pieles de uva y pétalos de flores, observándose que estas moléculas tienen valores de frecuencia característicos de su estructura y de la naturaleza de los enlaces químicos que las conforman, muy diferentes a las de otros compuestos que estuvieron presentes en la muestra. Adicionalmente, con esta técnica se puede incidir el láser en una región específica, por ejemplo, en los aglomerados de antocianinas, por lo que se obtendría el espectro únicamente de la región de interés, impidiendo el ruido generado por otros compuestos. Basados en esas consideraciones, el presente estudio hace uso de esa técnica y compara la forma molecular de la antocianina en protoplastos extraídos de frutos de zarzamora no revertidos y revertidos.

A drupas de frutos de zarzamora cv. Tupi no revertida y revertida por vibración (10 Hz y 0.5 g durante 5 minutos) se les separó la piel y se extrajeron los protoplastos como se estableció en la sección 5.4.2 de la metodología.

Para facilitar la comparación de las muestras, los espectros se ubicaron en un mismo gráfico para distinguir los conjuntos de bandas característicos en cada tipo de protoplasto, así como aquellas bandas presentes en ambos tipos de protoplastos (**Cuadro 6 y Figuras 29-32**).

Cuadro 6. Bandas específicas del espectro RAMAN en el rango de 700 a 1700 cm^{-1} de protoplastos de frutos de zarzamora no revertida y revertida.

Protoplastos no revertidos	Protoplastos revertidos	Protoplastos no revertidos y revertidos
710	948	725
806	960	742
970	1090	760
983	1108	843
1084	1219	880
1097	1442	888
1215	1463	1030
1250	1472	1134
1315	1497	1147
1347	1518	1171
1405	1528	1196
1469	1561	1230
1502	1615	1272
1514	1652	1326
1595		1336
1627		1379
1643		1390
1660		1427
1674		1543
		1575
		1583

Los espectros Raman obtenidos indicaron un total de 64 bandas específicas en los protoplastos analizados; 19 asociadas con los protoplastos no revertidos; 14 asociadas con protoplastos revertidos y 21 presentes en ambos protoplastos.

La presencia de las bandas en 1196, 1326, 1336 y 1627 cm^{-1} están asociadas con la presencia de la 3-O-glucosil cianidina (Zaffino *et al.*, 2015), la antocianina más importante de los frutos de zarzamora.

Con base en los fundamentos de esta técnica, se puede decir que los espectros determinados en los protoplastos no revertidos y revertidos sugieren que la estructura molecular de la 3-O-glucosil cianidina cambió y que dicho cambio puede ayudar a explicar a nivel molecular la reversión de color en los frutos de zarzamora, como se detalla a continuación.

Se sabe que las antocianinas muestran cambios de color (del azul al rojo) asociadas con los cambios de pH; cuando se disuelven en medios cercanos a la neutralidad o ligeramente alcalinos, adquieren tonos azules; mientras que cuando están disueltas en un medio ácido ($\text{pH} < 4$) muestran una coloración roja.

Las antocianinas predominan en la forma de catión flavilio cuando se encuentran en pH bajo proporcionando color rojo; cuando el pH se eleva, pueden ocurrir dos eventos: a) desprotonación de los grupos $-\text{OH}$ más ácidos, como el ligado al $\text{C4}'$ del anillo B, formando tautómeros de la base neutra quinoidal (**Figura 7**) o también el $-\text{OH}$ del C7 en el anillo A, esta forma de la antocianina toma un color púrpura que prevalece a valores de pH entre 6 y 7; si el pH es > 7 , hay una mayor desprotonación de la molécula, formándose las formas aniónicas quinoidal de color azul; b) un proceso de hidratación para formar hemiacetales sin color en equilibrio con el tautómero de la cis chalcona el cual, a su vez, está en equilibrio con la forma trans de esa misma chalcona, **Figura 7** (Bruni *et al.*, 2023). De acuerdo con estos conceptos, el análisis por espectroscopía Raman podría indicarnos si la molécula de la 3-O-glucosil cianidina se encuentra en forma quinoidal o de catión flavilio.

Para evaluar si el cambio de pH es el responsable de la RC, se analizó la estructura de la antocianina presente en los protoplastos revertidos y no revertidos por espectroscopía Raman, ya que la antocianina tiene una estructura dependiente del pH, por lo que se puede utilizar como un indicador del pH del medio en que se encuentra.

En el espectro ampliado en la región de 1400 a 1700 cm^{-1} para los protoplastos de frutos no revertidos (**Figura 29**), se observó una banda intensa a 1674 cm^{-1} , la cual se atribuye al grupo carbonilo $\text{C}=\text{O}$ de la forma quinoidal correspondiente a la forma en la cual probablemente se encuentra la estructura de la 3-O-glucosil cianidina a pH neutro. La posición de dicha banda explica el modo vibracional de estiramiento del grupo carbonilo conjugado, como se ha reportado en trabajos

que indicaron que el grupo carbonilo produce una banda a 1674 cm^{-1} (Lee, 1997; Robert, 2009; Visser & Van der Maas, 1978).

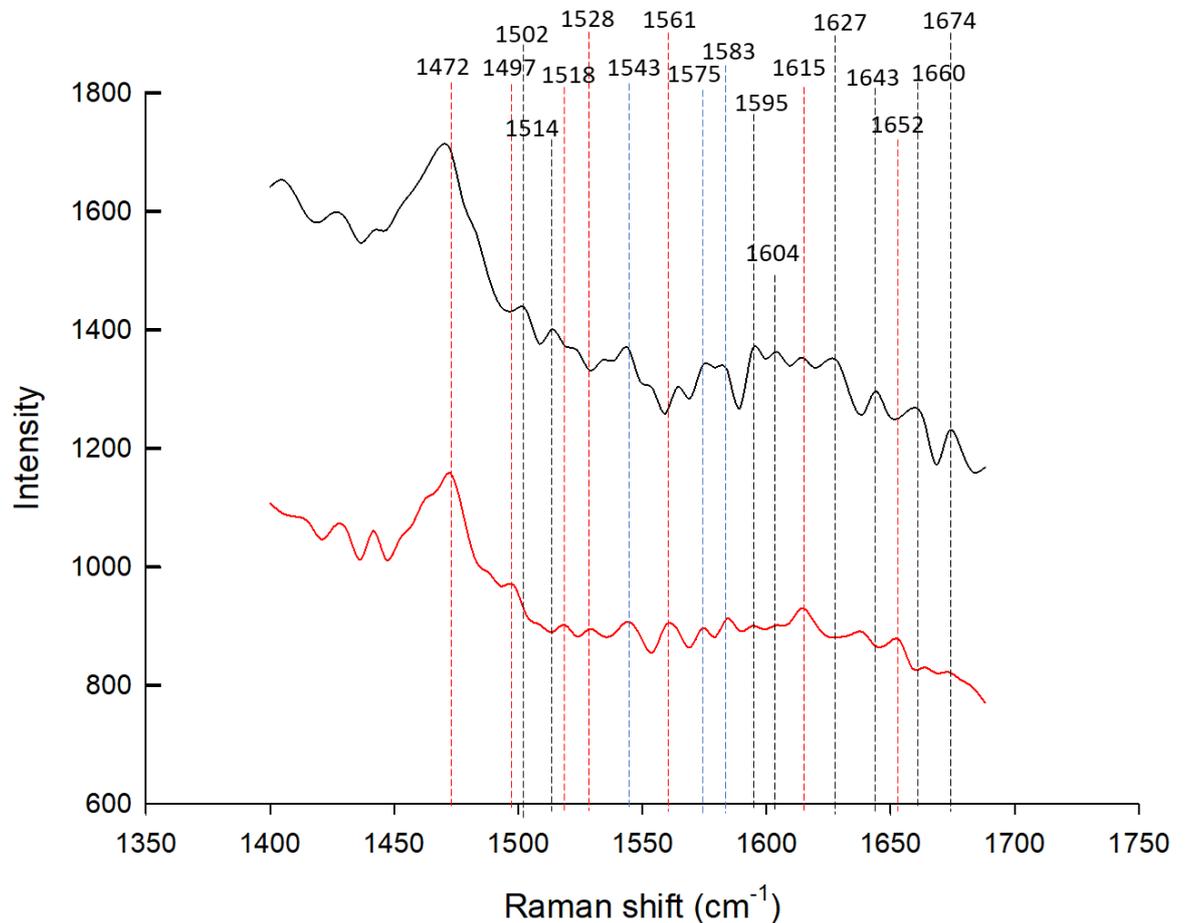


Figura 29. Espectro Raman de protoplastos de frutos no revertidos (línea sólida negra) y revertidos (línea sólida roja) en el intervalo de 1400 a 1700 cm^{-1} . Las líneas punteadas negras indican presencia de bandas de protoplastos de frutos no revertidos. Las líneas punteadas rojas indican presencia de bandas en el espectro Raman de protoplastos de frutos revertidos. Las líneas punteadas azules indican la presencia de bandas comunes en ambos espectros Raman.

Es importante señalar que, en esta región de 1400 a 1700 cm^{-1} , en el espectro de los protoplastos de drupas negras, se observó mayor número de señales en comparación con el espectro de los protoplastos de drupas revertidas (Cuadro 6). Esto puede deberse al hecho de que si la 3-O-glucosil cianidina se encuentra en su forma quinoide, entonces este compuesto carece del anillo aromático de pirilio (ausencia del catión flavilio en el anillo C). Lo anterior implica que en el

espectro aparezca mayor número de bandas correspondientes a vibraciones de dobles enlaces C=C aislados y no sobre un sistema de carácter aromático que tiene el catión flavilio. Cabe resaltar que los dobles enlaces carbono-carbono se ha reportado que aparecen en la región de 1550 a 1650 cm^{-1} (Nyquist, 2001). Asimismo, la vibración de los grupos vinil éter presentes en la forma quinoide suman al menos dos bandas en el espectro y también se ha documentado que aparecen entre 1660 y 1610 cm^{-1} (Cadioli et al., 1982), como aparecen en el presente estudio.

En este contexto, el espectro de los protoplastos del fruto no revertido muestra una banda en 1604 cm^{-1} , la cual puede atribuirse al enlace doble C=C del meturo de quinona del anillo A y B de la estructura de la antocianina (Merlin et al., 1985). Ni esta banda (1604 cm^{-1} , meturo de quinona) ni la presente en 1674 cm^{-1} (C=O) se encuentran en el espectro de los protoplastos del fruto revertido (**Figura 29**), lo que indica una diferencia estructural en la forma en cómo se encuentra la 3-O-glucosil cianidina al interior de los protoplastos en el fruto no revertido, en comparación con los protoplastos del fruto revertido. Estos análisis sugieren que la 3-O-glucosil cianidina en los protoplastos no revertidos se encuentra en su forma quinoidea; mientras que en los protoplastos revertidos, se encuentra en su forma de catión flavilio.

Como confirmación de lo anterior, en el espectro de los protoplastos de la drupa revertida se observan 3 bandas principales en 1615, 1638 y 1652 cm^{-1} (**Figura 29**). Estas bandas se atribuyen a los modos vibracionales de estiramiento de los anillos aromáticos presentes en la antocianina en su forma flavilio (Stanoiu *et al.*, 1972). Es importante destacar que en protoplastos de ambos tratamientos, aparece desfasada una de las bandas con mayor intensidad. En los protoplastos de los frutos no revertidos, aparece en 1472 cm^{-1} , mientras que en los protoplastos de fruto revertido aparece en 1469 cm^{-1} ; esto indica diferencias en la posición de las bandas para enlaces comunes en ambos compuestos, tales como vibración de estrechamiento de semi-círculo en anillo aromático (Stanoiu *et al.*, 1972).

Por otro lado, en la región de 1200 a 1500 cm^{-1} del espectro, se observó mayor número de bandas comunes para ambos tipos de protoplastos (**Figura 30**). En esa región aparecen principalmente vibraciones correspondientes a los enlaces simples C-O como los presentes en carbohidratos. En ambos espectros, se pueden observar las bandas en 1326 y 1336 cm^{-1} . Alrededor de 1350 cm^{-1} , se puede observar el patrón de sustitución de los azúcares unidos a la antocianidina como se ha indicado en la literatura (Merlin *et al.*, 1993). Estos datos parecen indicar que no hay diferencias en cuanto al patrón de sustitución de los azúcares presentes en las antocianinas de ambos tipos de protoplastos, por lo que probablemente, se trata del mismo compuesto glucosilado tanto en su forma quinoide (para el no revertido), como en la forma de flavilio (para el fruto revertido). Estos resultados permiten afirmar que los compuestos en ambos tratamientos presentan un patrón de glicosilación similar.

Puesto que el espectro Raman señala la presencia de la glucosilación en las antocianinas de protoplastos no revertidos y revertidos, se puede afirmar que aunque la estructura molecular de la antocianina presente en ambos tipos de protoplastos es distinta debido a un probable cambio en el pH, la acidez del fruto revertido no es tan grande como para provocar ruptura hidrolítica de la glucosa de la aglicona (cianidina libre) en el fruto revertido, manteniéndose la 3-O-glucosil cianidina, pero en la forma de catión flavilio.

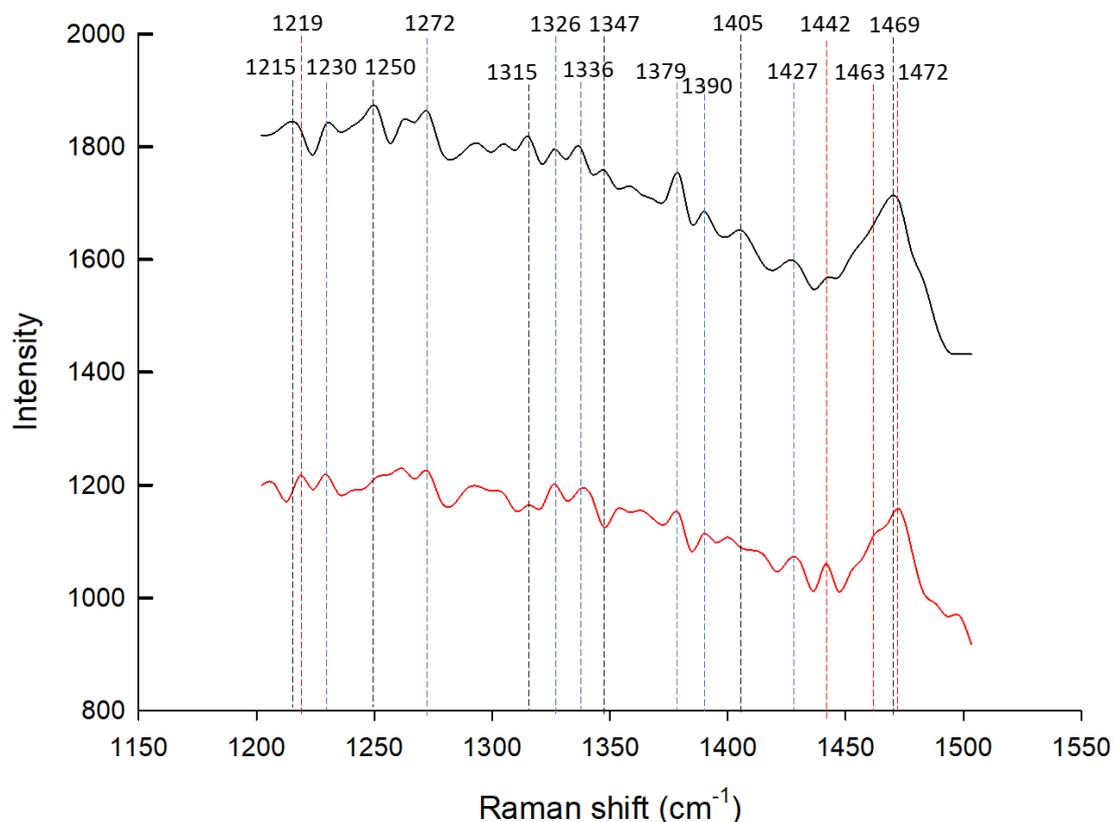


Figura 30. Espectro Raman de protoplastos de frutos no revertidos (línea sólida negra) y revertidos (línea sólida roja) en el intervalo de 1200 a 1500 cm^{-1} . Línea punteada negra indica presencia de bandas en el espectro Raman de protoplastos de frutos no revertidos. Línea punteada roja indica presencia de bandas en el espectro Raman de protoplastos de frutos revertidos. Línea punteada azul indica la presencia de bandas en ambos espectros Raman.

Respecto a la ampliación de la región de 1000 a 1300 cm^{-1} , en ambos espectros apareció una banda en 1230 cm^{-1} , la cual se puede atribuir al enlace C-O característico de la cianidina (quinoide y flavilio) glucosilada (**Figura 31**). Las bandas observadas entre 1100 y 1260 cm^{-1} se atribuyen a los estiramientos C-O de la glucosa unida a la posición 3 y de los estiramientos C-O de los fenoles (Ar-O) presentes en la antocianina; por ejemplo, las bandas presentes en ambos espectros en 1196, 1215 y 1230 cm^{-1} (Merlin *et al.*, 1993; Merlin *et al.*, 1994). También, se observó una banda intensa para el enlace C-C-O a 1030 cm^{-1} , común en ambas muestras.

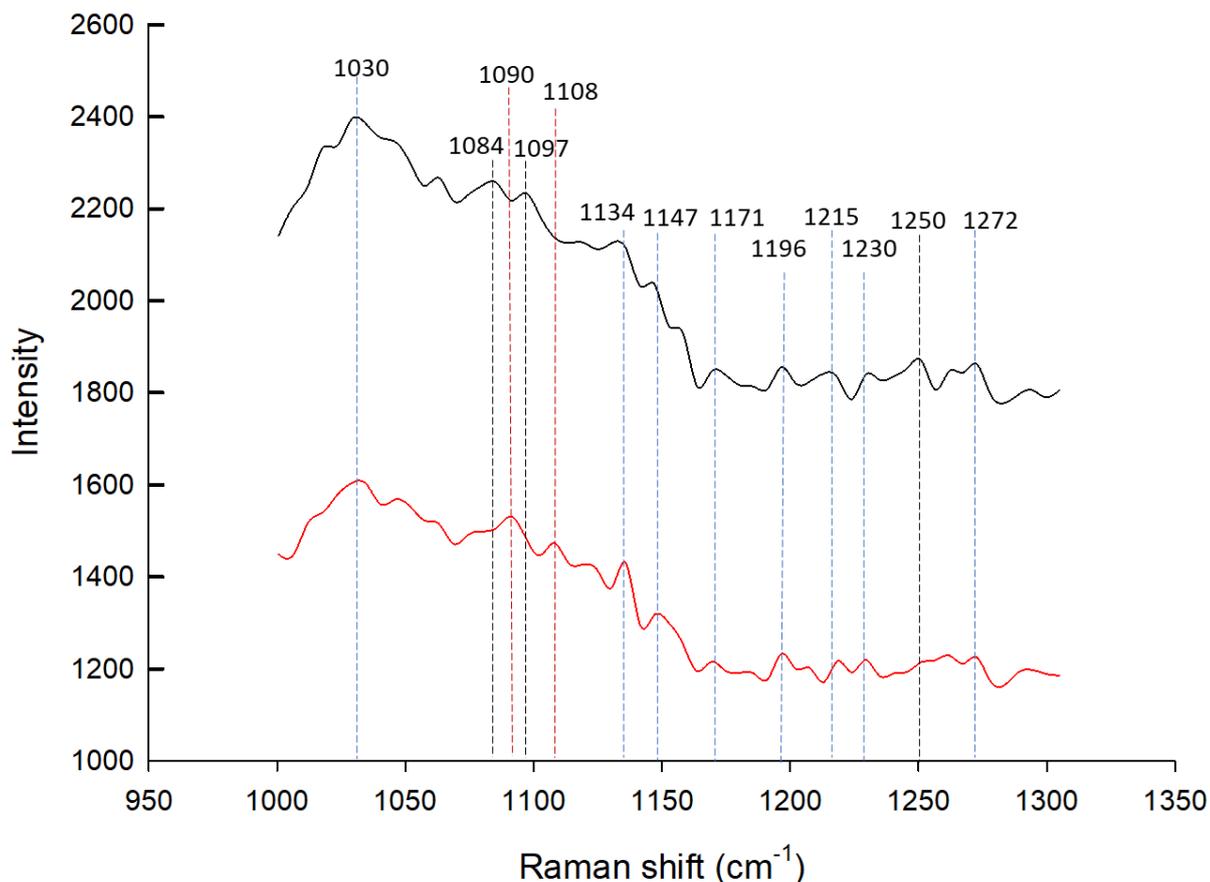


Figura 31. Espectro Raman de protoplastos de frutos no revertidos (línea sólida negra) y revertidos (línea sólida roja) en intervalo de 1000 a 1300 cm^{-1} . Línea punteada negra indica presencia de bandas en espectro Raman de protoplastos de frutos no revertidos. Línea punteada roja indica presencia de bandas en espectro Raman de protoplastos de frutos revertidos. Línea punteada azul indica la presencia de bandas en ambos espectros Raman.

En ambos espectros, en la región de 700 a 1000 cm^{-1} , se observaron las bandas más intensas en 880 y 888 cm^{-1} (**Figura 32**). Estas bandas se pueden atribuir a los enlaces C-O de los azúcares presentes o glucosa adherida a la aglicona cianidina para formar la antocianina. Dado que estas bandas se presentan tanto en las antocianinas de protoplastos no revertidos como revertidos, se sugiere que no hay evidencia de pérdida de grupos glucosídicos y que tanto las antocianinas de frutos revertidos y no revertidos mantienen su estructura glucosilada, es decir que el cambio de color no está asociado con la presencia o ausencia de los grupos glucósidos.

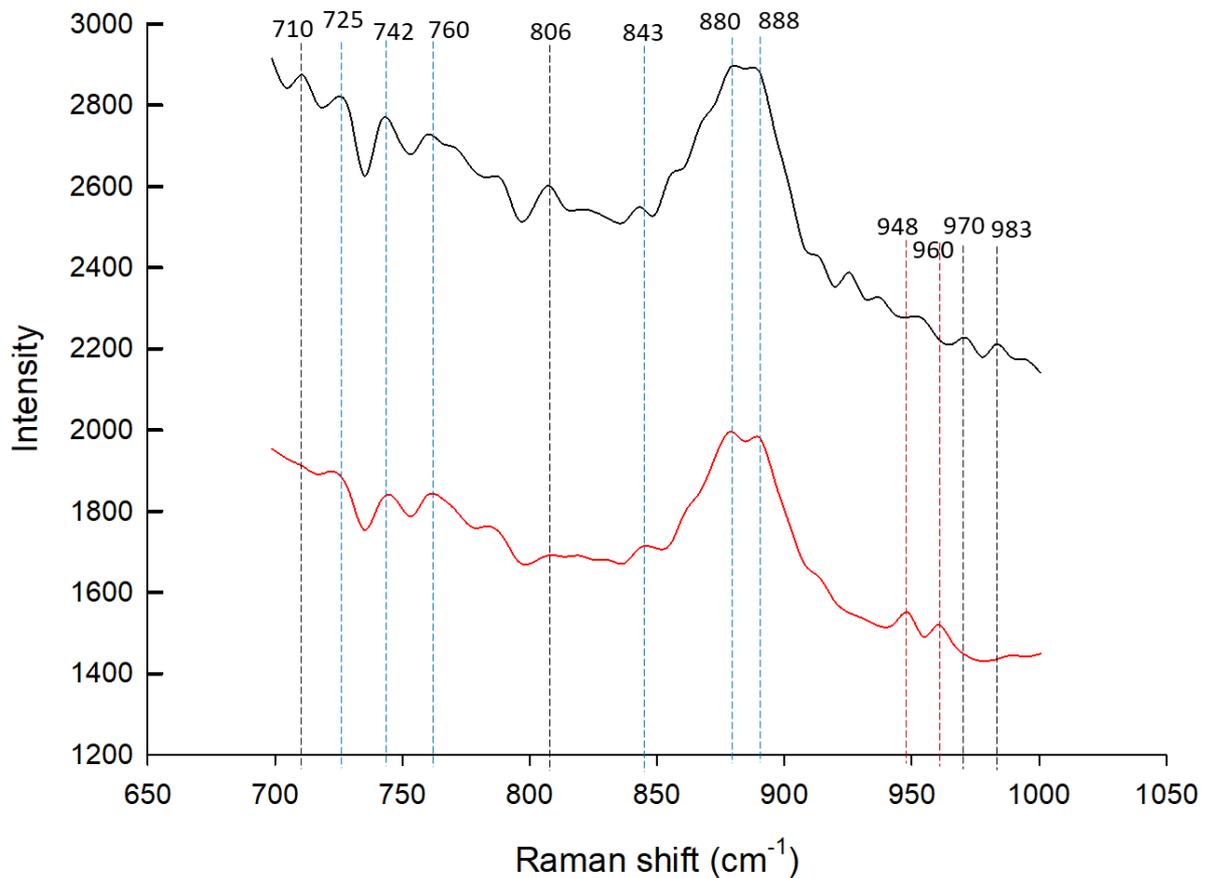


Figura 32. Espectro Raman en intervalo de 700 a 1000 cm⁻¹ de protoplastos de frutos no revertidos (línea sólida negra) y revertidos (línea sólida roja). Línea punteada negra indica presencia de bandas en el espectro Raman de protoplastos de frutos no revertidos. Línea punteada roja indica presencia de bandas en el espectro Raman de protoplastos de frutos revertidos. Línea punteada azul indica la presencia de bandas en el espectro Raman en ambos tipos de protoplastos.

Es bien sabido que la forma flavilio de las antocianinas proporciona una coloración roja, mientras que la forma quinoidal genera una coloración morada (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009; Cruz *et al.*, 2021; Tang *et al.*, 2019), por lo que la evidencia generada hasta el momento por la espectroscopía Raman señala que la 3-O-glucosil cianidina de los protoplastos no revertidos se encuentra en su forma quinoida, probablemente debido a que se encuentra en un medio neutro o ligeramente alcalino. Por lo tanto, se deduce que la RC es provocada por el daño mecánico de vibración que libera a las antocianinas al medio ácido vacuolar provocando su cambio a su forma de catión flavilio con su característico

color rojo. Dado que el daño mecánico provoca la liberación de la antocianina al medio ácido vacuolar, este cambio es permanente y por ello la reversión de color es irreversible.

Las conclusiones generadas por la espectroscopía Raman podrían ser confirmadas plenamente mediante un estudio de distribución de pH en el medio vacuolar. Mediante el uso de sondas indicadoras de pH neutro, se debería confirmar que las antocianinas se encuentran en los aglomerados de antocianinas no dañados mecánicamente y el uso de sondas de pH ácido debería señalar la presencia de la antocianina en el medio vacuolar en su forma de catión flavilio.

En general, el presente trabajo de investigación establece que el fenómeno de RC se debe a que el daño mecánico en la zarzamora genera la ruptura de los aglomerados de antocianinas. Esta ruptura propicia la liberación de las antocianinas al medio vacuolar, propiciando que las antocianinas pasen de un medio con pH neutro a uno con pH ácido. El cambio de pH del medio en el que se encuentran las antocianinas ocasiona modificaciones en su estructura molecular, pasando de una forma de base quinoidal, que da coloración violeta-azul, a una forma de catión flavilio, que da coloración roja, lo cual se manifiesta en el fruto como RC (**Figura 33**).

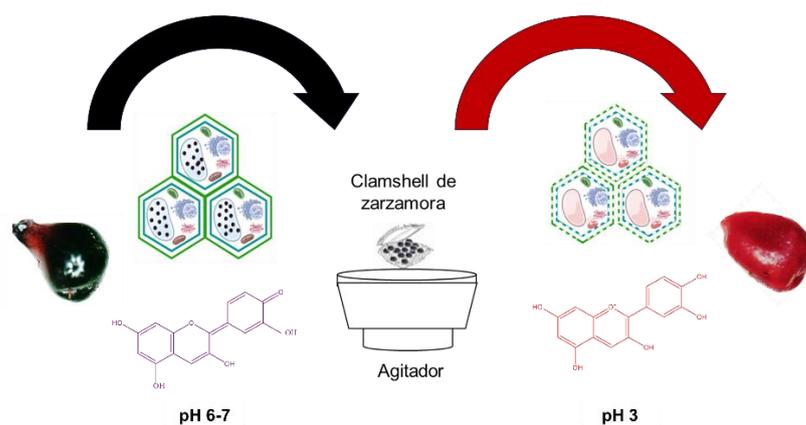


Figura 33. Mecanismo propuesto por el cual se genera la RC en la zarzamora.

7. CONCLUSIONES

En este trabajo se diseñó un equipo de vibración portátil capaz de generar el patrón de vibración con frecuencia y aceleración similar a la que se genera durante el transporte comercial de la zarzamora. Con este equipo, se logró inducir la RC en frutos de zarzamora a nivel de laboratorio, confirmando que el daño mecánico generado por la vibración induce la RC.

El uso de este equipo permitió evaluar la evolución de la RC en diferentes variedades de zarzamora durante su almacenamiento, estableciendo niveles de susceptibilidad a la RC entre las variedades, indicándose que la variedad 'Tupi' es la más susceptible a este defecto y que la variedad Ak234 presenta la menor susceptibilidad.

El presente estudio también demostró que las altas presiones hidrostáticas inducen la RC en poco tiempo y de manera uniforme, por lo que podrían ser un método, alternativo a la vibración, que permita el estudio de la RC.

Nuestros resultados confirmaron que la RC no está asociada con disminución en contenido de antocianinas ni con modificaciones en el perfil de este pigmento, sino que el cambio de color observado en la RC está relacionado con la pérdida de aglomerados de antocianinas.

El análisis *in vitro* de copigmentación no mostró evidencia de que las interacciones intermoleculares podrían ser las responsables del cambio de color que presentan las antocianinas.

La espectroscopía Raman, con láser de emisión de 1064 nm, permitió establecer que la reversión de color de los frutos de zarzamora se debe a cambios en la organización molecular de la 3-O-glucosil cianidina.

Este análisis demostró que las antocianinas de los frutos no revertidos presentan una estructura de base quinoidal neutra, mientras que las antocianinas de los frutos revertidos tienen estructura de catión flavilio, lo cual sugiere que el cambio de color observado en la RC se debe al cambio de pH en el medio intracelular en el que se encuentran las antocianinas.

Estos resultados sugieren que las antocianinas de frutos no revertidos se encuentran confinadas en antocianoplastos en su forma quinoidea neutra a un pH cercano a la neutralidad, y que estas, al ser sometidas a la vibración o daño mecánico, son liberadas al medio intra vacuolar, de menor pH, cambiando su color debido al pH ácido de ese medio, pasando a su forma de catión flavilio.

Este mismo análisis señaló que el patrón de glucosilación de la cianidina se mantiene tanto en su forma quinoidea como en su forma de catión flavilio indicando que no hay ruptura del enlace entre la antocianidina y la glucosa durante la reversión de color.

8. REFERENCIAS

- Achenbach, H., Bhattacharyya, P., Chakraborty, D., Goto, T., Merlini, L., Nasini, G., Weiss, U., & Goto, T. (1987). Structure, stability and color variation of natural anthocyanins. *Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe/Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, 113-158.
- Armour, M. E., Worthington, M., Clark, J. R., Threlfall, R. T., & Howard, L. (2021). Effect of Harvest Time and Fruit Firmness on Red Drupelet Reversion in Blackberry. *HortScience*, 1(aop), 1-8.
- Asen, S., Stewart, R., & Norris, K. (1972). Co-pigmentation of anthocyanins in plant tissues and its effect on color. *Phytochemistry*, 11(3), 1139-1144.
- Bae, R.-N., Kim, K.-W., Kim, T.-C., & Lee, S.-K. (2006). Anatomical observations of anthocyanin rich cells in apple skins. *HortScience*, 41(3), 733-736.
- Baranac, J. M., Petranović, N. A., & Dimitrić-Marković, J. M. (1996). Spectrophotometric study of anthocyan copigmentation reactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(5), 1333-1336.
- Bargmann, B. O., Laxalt, A. M., Riet, B. T., Testerink, C., Merquiol, E., Mosblech, A., Leon-Reyes, A., Pieterse, C. M., Haring, M. A., & Heilmann, I. (2009). Reassessing the role of phospholipase D in the Arabidopsis wounding response. *Plant, cell & environment*, 32(7), 837-850.
- Bimpilas, A., Tsimogiannis, D., Balta-Brouma, K., Lymperopoulou, T., & Oreopoulou, V. (2015). Evolution of phenolic compounds and metal content of wine during alcoholic fermentation and storage. *Food Chemistry*, 178, 164-171.
- Boulton, R. (2001). The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: A critical review. *American journal of enology and viticulture*, 52(2), 67-87.
- Bruni, S., Longoni, M., Minzoni, C., Basili, M., Zocca, I., Pieraccini, S., & Sironi, M. (2023). Resonance Raman and Visible Micro-Spectroscopy for the In-Vivo and In-Vitro Characterization of Anthocyanin-Based Pigments in Blue

- and Violet Flowers: A Comparison with HPLC-ESI-MS Analysis of the Extracts. *Molecules*, 28(4), 1709.
- Cadioli, B., Gallinella, E., & Pincelli, U. (1982). Molecular structures of the rotational isomers of methyl vinyl ether from infrared and raman spectra and non-empirical calculations. *Journal of Molecular Structure*, 78(3-4), 215-228.
- 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.
- Chanoca, A., Kovinich, N., Burkel, B., Stecha, S., Bohorquez-Restrepo, A., Ueda, T., Eliceiri, K. W., Grotewold, E., & Otegui, M. S. (2015). Anthocyanin Vacuolar Inclusions Form by a Microautophagy Mechanism. *The Plant Cell*, 27(9), 2545-2559.
- Clark, J. R., Stafne, E. T., Hall, H. K., & Finn, C. E. (2007). Blackberry breeding and genetics. *Plant breeding reviews*, 29, 19.
- Conn, S., Franco, C., & Zhang, W. (2010). Characterization of anthocyanic vacuolar inclusions in *Vitis vinifera* L. cell suspension cultures. *Planta*, 231, 1343-1360.
- Cosgrove, D. J. (2005). Growth of the plant cell wall. *Nature reviews molecular cell biology*, 6(11), 850-861.
- Cruz, L., Basílio, N., Mateus, N., De Freitas, V., & Pina, F. (2021). Natural and synthetic flavylum-based dyes: The chemistry behind the color. *Chemical reviews*, 122(1), 1416-1481.
- Dangles, O., Saito, N., & Brouillard, R. (1993). Kinetic and thermodynamic control of flavylum hydration in the pelargonidin-cinnamic acid complexation. Origin of the extraordinary flower color diversity of *Pharbitis nil*. *Journal of the American Chemical Society*, 115(8), 3125-3132.
- de Souza, V. R., Pereira, P. A. P., da Silva, T. L. T., de Oliveira Lima, L. C., Pio, R., & Queiroz, F. (2014). Determination of the bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Brazilian blackberry, red raspberry, strawberry, blueberry and sweet cherry fruits. *Food Chemistry*, 156, 362-368.

- Delgado-Vargas, F., & Paredes-López, O. (2003). Anthocyanins and betalains. *Natural colorants for food and nutraceutical uses*, 167-219.
- Dunteman, A. (2019). Identifying Consumer Perceptions of Fresh-market Blackberries. Honors Theses. Arkansas University, USA, 2019.
- Edgley, M., Close, D. C., & Measham, P. F. (2019a). Effects of climatic conditions during harvest and handling on the postharvest expression of red drupelet reversion in blackberries. *Scientia Horticulturae*, 253, 399-404.
- Edgley, M., Close, D. C., Measham, P. F., & Nichols, D. S. (2019b). Physiochemistry of blackberries (*Rubus* L. subgenus *Rubus* Watson) affected by red drupelet reversion. *Postharvest Biology and Technology*, 153, 183-190.
- Edgley, M., Close, D. C., & Measham, P. F. (2019c). Nitrogen application rate and harvest date affect red drupelet reversion and postharvest quality in 'Ouachita' blackberries. *Scientia Horticulturae*, 256, 108543.
- Edgley, M., Close, D. C., & Measham, P. F. (2020). Red drupelet reversion in blackberries: A complex of genetic and environmental factors. *Scientia Horticulturae*, 272, 109555.
- Fernando, I., Fei, J., & Stanley, R. (2019). Measurement and analysis of vibration and mechanical damage to bananas during long-distance interstate transport by multi-trailer road trains. *Postharvest Biology and Technology*, 158, 110977.
- Finn, C. E., & Clark, J. R. (2011). Emergence of blackberry as a world crop. *Chronica Horticulturae*, 51(3), 13-18.
- Garcia-Viguera, C., Zafrilla, P., & Tomás-Barberán, F. A. (1997). Determination of authenticity of fruit jams by HPLC analysis of anthocyanins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 73(2), 207-213.
- Giusti, M. M., & Wrolstad, R. E. (2001). Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. *Current protocols in food analytical chemistry*(1), F1. 2.1-F1. 2.13.
- Gomez-Maqueo, A., Welti-Chanes, J., & Cano, M. P. (2020). Release mechanisms of bioactive compounds in fruits submitted to high hydrostatic

- pressure: A dynamic microstructural analysis based on prickly pear cells. *Food Res Int*, 130, 108909.
- Gomez, C., Conejero, G., Torregrosa, L., Cheynier, V., Terrier, N., & Ageorges, A. (2011). In vivo grapevine anthocyanin transport involves vesicle-mediated trafficking and the contribution of anthoMATE transporters and GST. *The Plant Journal*, 67(6), 960-970.
- Gonnet, J.-F. (2003). Origin of the color of Cv. rhapsody in blue rose and some other so-called "blue" roses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(17), 4990-4994.
- González-Manzano, S., Santos-Buelga, C., Dueñas, M., Rivas-Gonzalo, J. C., & Escribano-Bailón, T. (2008). Colour implications of self-association processes of wine anthocyanins. *European Food Research and Technology*, 226, 483-490.
- Gu, L., Kelm, M. A., Hammerstone, J. F., Beecher, G., Holden, J., Haytowitz, D., Gebhardt, S., & Prior, R. L. (2004). Concentrations of proanthocyanidins in common foods and estimations of normal consumption. *The Journal of nutrition*, 134(3), 613-617.
- Gwanpua, S. G., Mellidou, I., Boeckx, J., Kyomugasho, C., Bessemans, N., Verlinden, B. E., Hertog, M. L., Hendrickx, M., Nicolai, B. M., & Geeraerd, A. H. (2016). Expression analysis of candidate cell wall-related genes associated with changes in pectin biochemistry during postharvest apple softening. *Postharvest Biology and Technology*, 112, 176-185.
- Hager, T. J., Howard, L. R., & Prior, R. L. (2008). Processing and storage effects on monomeric anthocyanins, percent polymeric color, and antioxidant capacity of processed blackberry products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(3), 689-695.
- Haminiuk, C. W., Maciel, G. M., Plata-Oviedo, M. S., & Peralta, R. M. (2012). Phenolic compounds in fruits—an overview. *International Journal of Food Science & Technology*, 47(10), 2023-2044.
- Heras-Roger, J., Pomposo-Medina, M., Díaz-Romero, C., & Darias-Martín, J. (2014). Copigmentation, colour and antioxidant activity of single-cultivar red wines. *European Food Research and Technology*, 239, 13-19.

- Horvitz, S., Chanaguano, D., & Arozarena, I. (2017). Andean blackberries (*Rubus glaucus* Benth) quality as affected by harvest maturity and storage conditions. *Scientia Horticulturae*, 226, 293-301.
- Hu, X., Ma, T., Ao, L., Kang, H., Hu, X., Song, Y., & Liao, X. (2020). Effect of high hydrostatic pressure processing on textural properties and microstructural characterization of fresh-cut pumpkin (*Cucurbita pepo*). *Journal of Food Process Engineering*, 43(4), e13379.
- Hussein, Z., Fawole, O. A., & Opara, U. L. (2019). Determination of physical, biochemical and microstructural changes in impact-bruise damaged pomegranate fruit. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 13, 2177-2189.
- Irani, N. G., & Grotewold, E. (2005). Light-induced morphological alteration in anthocyanin-accumulating vacuoles of maize cells. *BMC Plant Biology*, 5(1), 1-15.
- Jackman, R., & Smith, J. (1996). Anthocyanins and betalains. *Natural food colorants*, 244-309.
- Jennings, D. L. (1988). *Raspberries and blackberries: their breeding, diseases and growth*. Academic press.
- Kallam, K., Appelhagen, I., Luo, J., Albert, N., Zhang, H., Deroles, S., Hill, L., Findlay, K., Andersen, Ø. M., & Davies, K. (2017). Aromatic decoration determines the formation of anthocyanic vacuolar inclusions. *Current Biology*, 27(7), 945-957.
- Kim, M. J., Lee, M. Y., Shon, J. C., Kwon, Y. S., Liu, K.-H., Lee, C. H., & Ku, K.-M. (2019). Untargeted and targeted metabolomics analyses of blackberries—Understanding postharvest red drupelet disorder. *Food Chemistry*, 300, 125169.
- Kim, M. J., Perkins-Veazie, P., Ma, G., & Fernandez, G. (2015). Shelf life and changes in phenolic compounds of organically grown blackberries during refrigerated storage. *Postharvest Biology and Technology*, 110, 257-263.
- Kolniak-Ostek, J., Kucharska, A. Z., Sokół-Łętowska, A., & Fecka, I. (2015). Characterization of phenolic compounds of thorny and thornless

- blackberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(11), 3012-3021.
- Kostecka-Gugała, A., Ledwożyw-Smoleń, I., Augustynowicz, J., Wyżgolik, G., Kruczek, M., & Kaszycki, P. (2015). Antioxidant properties of fruits of raspberry and blackberry grown in central Europe. *Open Chemistry*, 13(1).
- Lawrence, B., & Melgar, J. C. (2018). Harvest, handling, and storage recommendations for improving postharvest quality of blackberry cultivars. *HortTechnology*, 28(5), 578-583.
- Lee, Y. T. (1997). Hydrogen bond effect on the Raman shift of the carbonyl stretching mode of various amide solutions. *Journal of Raman spectroscopy*, 28(1), 45-51.
- Leydet, Y., Gavara, R., Petrov, V., Diniz, A. M., Parola, A. J., Lima, J. C., & Pina, F. (2012). The effect of self-aggregation on the determination of the kinetic and thermodynamic constants of the network of chemical reactions in 3-glucoside anthocyanins. *Phytochemistry*, 83, 125-135.
- Li, L., He, X., Sun, J., Li, C., Ling, D., Sheng, J., Zheng, F., Liu, G., Li, J., & Tang, Y. (2017). Responses of phospholipase D and antioxidant system to mechanical wounding in postharvest banana fruits. *Journal of Food Quality*, 2017.
- Madrid, M., & Beaudry, R. (2020). Small fruits: Raspberries, blackberries, blueberries. In *Controlled and Modified Atmospheres for Fresh and Fresh-Cut Produce* (pp. 335-346).
- Markham, K. R., Gould, K. S., Winefield, C. S., Mitchell, K. A., Bloor, S. J., & Boase, M. R. (2000). Anthocyanic vacuolar inclusions—their nature and significance in flower colouration. *Phytochemistry*, 55(4), 327-336.
- McCoy, J. E., Clarke, J. R., Salgado, A. A., & Jecmen, A. (2016). Evaluation of harvest time/temperature and storage temperature on postharvest incidence of red drupelet reversion development and firmness of blackberry (*Rubus L. subgenus Rubus Watson*). *Discovery The Student Journal of Dale Bumpers College of Agricultural, Food and Life Sciences*, 17(1), 59-65.

- McGuire, R. G. (1992). Reporting of objective color measurements. *HortScience*, 27(12), 1254-1255.
- Mellado-Mojica, E., González de la Vara, L. E., & López, M. G. (2017). Fructan active enzymes (FAZY) activities and biosynthesis of fructooligosaccharides in the vacuoles of *Agave tequilana* Weber Blue variety plants of different age. *Planta*, 245, 265-281.
- Mendoza, J., Basilio, N., Pina, F., Kondo, T., & Yoshida, K. (2018). Rationalizing the color in heavenly blue anthocyanin: A complete kinetic and thermodynamic study. *The Journal of Physical Chemistry B*, 122(19), 4982-4992.
- Merlin, J.-C., Statoua, A., & Brouillard, R. (1985). Investigation of the in vivo organization of anthocyanins using resonance Raman microspectrometry. *Phytochemistry*, 24(7), 1575-1581.
- Merlin, J.-C., Statoua, A., Cornard, J.-P., Saidi-Idrissi, M., & Brouillard, R. (1993). Resonance Raman spectroscopic studies of anthocyanins and anthocyanidins in aqueous solutions. *Phytochemistry*, 35(1), 227-232.
- Merlin, J., Cornard, J., Stastoua, A., Saidi-Idrissi, M., Lautie, M., & Brouillard, R. (1994). Vibrational analysis of hydroxyflavylium derivatives by IR, Fourier transform Raman and resonance Raman spectroscopies. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy*, 50(4), 703-712.
- Mikulic-Petkovsek, M., Slatnar, A., Stampar, F., & Veberic, R. (2012). HPLC–MSn identification and quantification of flavonol glycosides in 28 wild and cultivated berry species. *Food Chemistry*, 135(4), 2138-2146.
- Moskowitz, A. H., & Hrazdina, G. (1981). Vacuolar contents of fruit subepidermal cells from *Vitis* species. *Plant physiology*, 68(3), 686-692.
- Mújica-Paz, H., Valdez-Fragoso, A., Samson, C. T., Welti-Chanes, J., & Torres, J. A. (2011). High-Pressure Processing Technologies for the Pasteurization and Sterilization of Foods. *Food and Bioprocess Technology*, 4(6), 969-985.
- Muratalla-Lúa, A. (2013). La producción de frambuesa y zarzamora en México. *Agro Productividad*, 6(5).

- Noda, N., Yoshioka, S., Kishimoto, S., Nakayama, M., Douzono, M., Tanaka, Y., & Aida, R. (2017). Generation of blue chrysanthemums by anthocyanin B-ring hydroxylation and glucosylation and its coloration mechanism. *Science advances*, 3(7), e1602785.
- Nozue, M., Yamada, K., Nakamura, T., Kubo, H., Kondo, M., & Nishimura, M. (1997). Expression of a vacuolar protein (VP24) in anthocyanin-producing cells of sweet potato in suspension culture. *Plant physiology*, 115(3), 1065-1072.
- Nozzolillo, C., & Ishikura, N. (1988). An investigation of the intracellular site of anthocyanoplasts using isolated protoplasts and vacuoles. *Plant cell reports*, 7, 389-392.
- Nyquist, R. A. (2001). *Interpreting infrared, Raman, and nuclear magnetic resonance spectra* (Vol. 2). Academic Press.
- Osawa, Y. (1982). Copigmentation of anthocyanins. *Anthocyanins as food colors*, 41-68.
- Park, D., Park, S.-Y., Liu, K.-H., & Ku, K.-M. (2023). Optimal allyl isothiocyanate concentration on *Botrytis cinerea* during the postharvest storage of blackberries and mechanism of blackberry color changes at high concentration of allyl isothiocyanate. *Postharvest Biology and Technology*, 199, 112292.
- Pecket, R. C., & Small, C. J. (1980). Occurrence, location and development of anthocyanoplasts. *Phytochemistry*, 19(12), 2571-2576.
- Peretto, G., Nicoletto, C., & Sambo, P. (2012). Changes in qualitative traits of blueberry and blackberry in relation to storage temperature and film type. *X International Symposium on Vaccinium and Other Superfruits 1017*, (pp. 433-440).
- Pérez-Pérez, G., Fabela-Gallegos, M., Vázquez-Barrios, M., Rivera-Pastrana, D., Palma-Tirado, L., Mercado-Silva, E., & Escalona, V. (2016). Effect of the transport vibration on the generation of the color reversion in blackberry fruit. *VIII International Postharvest Symposium: Enhancing Supply Chain and Consumer Benefits-Ethical and Technological Issues 1194*, (pp. 1329-1336).

- Pourcel, L., Irani, N. G., Lu, Y., Riedl, K., Schwartz, S., & Grotewold, E. (2010). The formation of anthocyanic vacuolar inclusions in *Arabidopsis thaliana* and implications for the sequestration of anthocyanin pigments. *Molecular plant*, 3(1), 78-90.
- Quiñones, M., Miguel, M., & Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición hospitalaria*, 27(1), 76-89.
- Rein, M. (2005). Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins. Ph.D. Dissertation, University of Helsinki, Helsinki, Finland.
- Robert, B. (2009). Resonance raman spectroscopy. *Photosynthesis research*, 101, 147-155.
- Saito, N., Nakamura, M., Shinoda, K., Murata, N., Kanazawa, T., Kato, K., Toki, K., Kasai, H., Honda, T., & Tatsuzawa, F. (2012). Covalent anthocyanin-flavonol complexes from the violet-blue flowers of *Allium* 'Blue Perfume'. *Phytochemistry*, 80, 99-108.
- Salazar Iribe, A., & Gamboa de Buen, A. (2013). Importancia de las pectinas en la dinámica de la pared celular durante el desarrollo vegetal. *REB. Revista de educación bioquímica*, 32(2), 67-75.
- Salgado, A. A., & Clark, J. R. (2016). "Crispy" blackberry genotypes: A breeding innovation of the University of Arkansas blackberry breeding program. *HortScience*, 51(5), 468-471.
- Sánchez-Velázquez, A. O., Montes-Ávila, J., Milán-Carrillo, J., Reyes-Moreno, C., Mora-Rochin, S., & Cuevas-Rodríguez, E.-O. (2019). Characterization of tannins from two wild blackberries (*Rubus* spp) by LC-ESI-MS/MS, NMR and antioxidant capacity. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 13, 2265-2274.
- Segantini, D. M., Threlfall, R., Clark, J. R., Brownmiller, C. R., Howard, L. R., & Lawless, L. J. (2017). Changes in fresh-market and sensory attributes of blackberry genotypes after postharvest storage. *Journal of Berry Research*, 7(2), 129-145.
- Sigurdson, G. T., Robbins, R. J., Collins, T. M., & Giusti, M. M. (2018). Impact of location, type, and number of glycosidic substitutions on the color

- expression of o-dihydroxylated anthocyanidins. *Food Chemistry*, 268, 416-423.
- Silva, V. O., Freitas, A. A., Maçanita, A. L., & Quina, F. H. (2016). Chemistry and photochemistry of natural plant pigments: the anthocyanins. *Journal of Physical Organic Chemistry*, 29(11), 594-599.
- Siriwoharn, T., Wrolstad, R. E., Finn, C. E., & Pereira, C. B. (2004). Influence of cultivar, maturity, and sampling on blackberry (*Rubus* L. Hybrids) anthocyanins, polyphenolics, and antioxidant properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 8021-8030.
- Small, C. J., & Pecket, R. C. (1982). The ultrastructure of anthocyanoplasts in red-cabbage. *Planta*, 154, 97-99.
- Soto-Magaña, D. (2020). Análisis microestructural de la reversión de color en fruto de zarzamora (*Rubus* sp.). Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Querétaro, Qro., México.
- Stanoiu, I., Paraschiv, M., Romas, E., & Balaban, A. (1972). Vibrational spectra of pyrylium, pyrylium-2-d, pyrylium-3-d, and pyrylium-d5 cations. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy*, 28(5), 1001-1005.
- Stewart, D., Iannetta, P. P., & Davies, H. V. (2001). Ripening-related changes in raspberry cell wall composition and structure. *Phytochemistry*, 56(5), 423-428.
- Strik, B. C., Clark, J. R., Finn, C. E., & Bañados, M. P. (2007). Worldwide blackberry production. *HortTechnology*, 17(2), 205-213.
- Strik, B. C., & Vance, A. J. (2017). Seasonal variation in mineral nutrient concentration of primocane and florican leaves in trailing, erect, and semierect blackberry cultivars. *HortScience*, 52(6), 836-843.
- Talcott, S. T. (2007). Chemical components of berry fruits. *FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY-NEW YORK-MARCEL DEKKER-*, 168, 51.
- Tang, B., He, Y., Liu, J., Zhang, J., Li, J., Zhou, J., Ye, Y., Wang, J., & Wang, X. (2019). Kinetic investigation into pH-dependent color of anthocyanin and its sensing performance. *Dyes and Pigments*, 170, 107643.
- Trouillas, P., Sancho-García, J. C., De Freitas, V., Gierschner, J., Otyepka, M., & Dangles, O. (2016). Stabilizing and modulating color by copigmentation:

- Insights from theory and experiment. *Chemical reviews*, 116(9), 4937-4982.
- Visser, T., & Van der Maas, J. (1978). Systematic interpretation of Raman spectra of organic compounds. III—carbonyl compounds. *Journal of Raman spectroscopy*, 7(3), 125-129.
- Weber, F., Boch, K., & Schieber, A. (2017). Influence of copigmentation on the stability of spray dried anthocyanins from blackberry. *LWT*, 75, 72-77.
- Wei, X., Xie, D., Mao, L., Xu, C., Luo, Z., Xia, M., Zhao, X., Han, X., & Lu, W. (2019). Excess water loss induced by simulated transport vibration in postharvest kiwifruit. *Scientia Horticulturae*, 250, 113-120.
- Williamson, G. (2004). Common features in the pathways of absorption and metabolism of flavonoids. *Phytochemicals: mechanisms of action*, 21-33.
- Wilska-Jeszka, J., & Korzuchowska, A. (1996). Anthocyanins and chlorogenic acid copigmentation-influence on the colour of strawberry and chokeberry juices. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 203, 38-42.
- Worthington, M., Clark, J., Threlfall, R., & Sebesta, B. (2017). Evaluation of Red Drupelet Reversion in Blackberries using High-Throughput Digital Image Analysis. *Smallfruits.org*.
- Wrolstad, R. E., Durst, R. W., & Lee, J. (2005). Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. *Trends in Food Science & Technology*, 16(9), 423-428.
- Yang, J., Ou, X., Zhang, X., Zhou, Z., & Ma, L. (2017). Effect of different solvents on the measurement of phenolics and the antioxidant activity of mulberry (*Morus atropurpurea* Roxb.) with accelerated solvent extraction. *Journal of Food Science*, 82(3), 605-612.
- Yasuda, H., Mitsui, T., & Onishi, M. (1989). Studies on the Spherical Bodies Containing Anthocyanins in Plant Cells III Observations on the developments of anthocyanoplasts in the radish hypocotyls. *Cytologia*, 54(4), 673-678.
- Yin, M. H. (2017). *Studies in blackberry: Development and implementation of a phenotyping protocol for blackberry seedling populations and impact of*

time of day of harvest on red drupelet reversion for University of Arkansas blackberry genotypes. University of Arkansas. USA.

- Zaffino, C., Russo, B., & Bruni, S. (2015). Surface-enhanced Raman scattering (SERS) study of anthocyanidins. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 149, 41-47.
- Zhang, C., Xiong, Z., Yang, H., & Wu, W. (2019). Changes in pericarp morphology, physiology and cell wall composition account for flesh firmness during the ripening of blackberry (*Rubus* spp.) fruit. *Scientia Horticulturae*, 250, 59-68.
- Zhang, H., Jordheim, M., Lewis, D. H., Arathoon, S., Andersen, Ø. M., & Davies, K. M. (2014). Anthocyanins and their differential accumulation in the floral and vegetative tissues of a shrub species (*Rhabdothamnus solandri* A. Cunn). *Scientia Horticulturae*, 165, 29-35.
- Zhang, H., Wang, L., Deroles, S., Bennett, R., & Davies, K. (2006). New insight into the structures and formation of anthocyanic vacuolar inclusions in flower petals. *BMC Plant Biology*, 6(1), 1-14.
- Zhao, C.-L., Yu, Y.-Q., Chen, Z.-J., Wen, G.-S., Wei, F.-G., Zheng, Q., Wang, C.-D., & Xiao, X.-L. (2017). Stability-increasing effects of anthocyanin glycosyl acylation. *Food Chemistry*, 214, 119-128.
- Zhao, C. L., Chen, Z. J., Bai, X. S., Ding, C., Long, T. J., Wei, F. G., & Miao, K. R. (2014). Structure–activity relationships of anthocyanidin glycosylation. *Molecular diversity*, 18, 687-700.
- Zhao, Y.-y., Qian, C.-l., Chen, J.-c., Peng, Y., & Mao, L.-c. (2010). Responses of phospholipase D and lipoxygenase to mechanical wounding in postharvest cucumber fruits. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 11, 443-450.