



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“Análisis microestructural de la reversión de color en fruto de
zarzamora (*Rubus* sp.)”**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestra en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:

Bioing. Diana Soto Magaña

Dirigida por:

Dr. Edmundo Mateo Mercado Silva

Querétaro. Qro. Noviembre de 2019



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

“Análisis microestructural de la reversión de color en fruto de
zarzamora (*Rubus* sp.)”

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestra en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:

Bioing. Diana Soto Magaña

Dirigida por:

Dr. Edmundo M. Mercado Silva

Dr. Edmundo M. Mercado Silva

Presidente

Dr. Gerardo M. Nava Morales

Secretario

Dra. Dulce María Rivera Pastrana

Vocal

Dra. Nayeli Vélez Rivera

Suplente

Dr. Manuel de J. Fabela Gallegos

Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.

Noviembre 2019

México

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dr. Edmundo Mercado Silva, director de este trabajo por el tiempo y empeño que dedicó en la dirección de este trabajo y por darme la oportunidad de ser parte del Laboratorio de Fisiología y Bioquímica Poscosecha de Frutas y Hortalizas en la Universidad Autónoma de Querétaro y por expandir mi pasión por las frutas y hortalizas.

Además, agradezco a mi comité, Dr. Gerardo Nava, Dra. Dulce Rivera, Dra. Nayeli Vélez y Dr. José Fabela por su asistencia, orientación y asesoramiento durante estos dos años.

A CONACYT por la beca otorgada durante estos dos años y a la Universidad Autónoma de Querétaro por permitirme formar parte de este programa de maestría.

Un agradecimiento especial a mis colegas y grandes amigos Nayeli Vélez y Ramón Flores su ayuda continua hizo posible mi investigación, seguro que hacemos un gran "reversion team".

Además, gracias a la Dra. Mahinda Martínez, Dra. Olga Gómez y Alan Herrera del Laboratorio Nacional de Identificación y Caracterización Vegetal de la Facultad de Ciencias Naturales por darme la oportunidad de realizar mis experimentos y aprender sobre microscopía.

Gracias a mis mejores amigos Lupita Soria y Arturo Hernández por estar en cada una de las etapas de mi formación profesional.

DEDICATORIAS

A mis padres Gloria Magaña y Francisco Javier Soto por que su apoyo durante mis estudios de posgrado hizo que mis objetivos profesionales fueran más fáciles de perseguir, mi amor y admiración incondicional.

A mis hermanos Ana Laura y Paco por siempre apoyarme en las decisiones que he tomado.

A la memoria de mi abuelo Faustino Soto Márquez

INDICE GENERAL

RESUMEN	VII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 GENERALIDADES DE ZARZAMORA	3
2.1.1 <i>Taxonomía y morfología de la planta</i>	3
2.2 IMPORTANCIA ECONÓMICA DEL CULTIVO DE ZARZAMORA	6
2.2.1 <i>Producción mundial</i>	6
2.3 COMPOSICIÓN NUTRICIONAL DEL FRUTO DE ZARZAMORA.....	8
2.3.1 <i>Flavonoles</i>	10
2.3.2 <i>Ácidos fenólicos</i>	11
2.3.3 <i>Taninos</i>	12
2.3.4 <i>Antocianinas</i>	15
2.3.5 <i>Reversión de color</i>	19
2.4 POSIBLES MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LA REVERSIÓN DE COLOR	23
2.4.1 <i>Efecto de copigmentación</i>	23
2.4.2 <i>Inclusiones vacuolares de antocianinas</i>	27
2.5 ANÁLISIS DE IMÁGENES COMO HERRAMIENTA PARA ESTUDIAR LA REVERSIÓN DE COLOR	28
2.5.1 IMPORTANCIA DEL ANÁLISIS DE COLOR.....	29
2.5.2 ANÁLISIS DE PARÁMETROS MORFOMÉTRICOS EN FRUTOS.....	30
2.5.2.1 <i>Características morfológicas</i>	30
2.5.1 <i>Análisis textural de imágenes</i>	31
3. OBJETIVOS.....	32
3.1 OBJETIVO GENERAL	32
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
4. METODOLOGÍA.....	33
4.1 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	33
4.2 MATERIAL BIOLÓGICO	33
4.3 OBTENCIÓN DEL FRUTO.....	33
4.4 CONSERVACIÓN Y ALMACENAMIENTO PRELIMINAR	34
4.5 INDUCCIÓN DE LA REVERSIÓN POR VIBRACIÓN	34
4.5.1 <i>Mesa de vibraciones portátil</i>	34
4.6 EVALUACIÓN OBJETIVA DEL COLOR	37
4.7 ANÁLISIS DE COMPUESTOS FENÓLICOS	39
4.7.1 <i>Extracción de compuestos fenólicos</i>	39
4.7.2 <i>Extracción de compuestos fenólicos enlazados</i>	39
4.7.3 <i>Extracción de compuestos fenólicos solubles conjugados</i>	40
4.8 CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS MONOMÉRICAS TOTALES.....	40
4.9 ANÁLISIS DEL PERFIL DE COMPUESTOS FENÓLICOS POR HPLC-DAD	42
4.10 ESTUDIOS ANATÓMICOS MICROESTRUCTURALES	43
4.10.1 <i>Análisis histológicos</i>	43
4.10.2 <i>Fijación del tejido</i>	44
4.10.3 <i>Deshidratación del tejido</i>	44
4.10.4 <i>Tinción de cortes histológicos en safranina y verde rápido</i>	45
4.11 SISTEMA DE VISIÓN POR COMPUTADORA	47
4.11.1 <i>Segmentación</i>	47
4.12 OBSERVACIONES POR MICROSCOPIA	49

4.12.1	<i>Estéreomicroscopía</i>	49
4.12.2	<i>Microscopía óptica</i>	50
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
5.1	CAMBIOS COMPARATIVOS DEL COLOR	52
5.1.1	<i>Evaluación de modelos de inducción de reversión de color</i>	52
5.2	CAMBIOS EN EL CONTENIDO DE ANTOCIANINAS MONOMÉRICAS	56
5.3	COLOR POLIMÉRICO	59
5.4	ANTOCIANINA CIANIDINA 3-O-GLUCÓSIDO POR HPLC	60
5.5	CUANTIFICACIÓN DE FENOLES.....	62
5.6	ANÁLISIS DE IMÁGENES	66
5.6.1	<i>Morfología</i>	67
5.7	MICROSCOPIA ÓPTICA EN FRESCO	68
5.7.1	<i>Cultivar Tupy</i>	68
5.8	MICROSCOPIA ÓPTICA CON PROCESO DE FIJADO.....	70
5.8.1	<i>Cambios en estructura celular</i>	70
6.	CONCLUSIONES	75
7.	BIBLIOGRAFÍA	77
8.	ANEXOS	93

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. PLANTA DE ZARZAMORA EN FLORACIÓN.....	4
FIGURA 2. ESTRUCTURA ANATÓMICA DE LA FRUTA DE ZARZAMORA	5
FIGURA 3. VOLUMEN DE LA PRODUCCIÓN NACIONAL DE ZARZAMORA DE 2008 AL 2017.....	7
FIGURA 4. ESTRUCTURAS QUÍMICAS DE FLAVONOLES EN ZARZAMORA	11
FIGURA 5. ESTRUCTURAS DE ÁCIDO GÁLICO (A), ÁCIDO ELÁGICO (B), GLUCOSA DE GALOIL-BIS-HHDP (C), SANGUININA H-6/LAMBERTIANINA A (D) Y LAMBERTIANINA C (E)	14
FIGURA 6. PATRONES DE SUSTITUCIÓN PARA LA CONFORMACIÓN DE LAS DIFERENTES ESTRUCTURAS QUÍMICAS DE ANTOCIANINAS EN ZARZAMORA	15
FIGURA 7. PROCESO DE REVERSIÓN DE COLOR EN CULTIVAR ‘TUPY’	19
FIGURA 8. INTERACCIÓN DE ANTOCIANINAS. (A) AUTOASOCIACIÓN, (B) COPIGMENTACIÓN INTRAMOLECULAR, (C) COMPLEJACIÓN METÁLICA, (D) COPIGMENTACIÓN INTERMOLECULAR	24
FIGURA 9. EJEMPLO DE ESTABILIZACIÓN DE ANTOCIANINAS MEDIANTE LA FORMACIÓN DEL COMPLEJO POR TRANSFERENCIA DE CARGA (INTERACCIÓN ANTOCIANINA-COMPUESTO FENÓLICO)	26
FIGURA 10. VA EN CÁSCARA EPIDÉRMICA DEL PÉTALO EUSTOMA GRANDIFLORUM (IZQUIERDA), IVA EN UNA CÁSCARA EPIDÉRMICA DE DIANTHUS CARYOPHYLLUS (DERECHA).....	27
FIGURA 11. GENERADOR DE FUNCIONES	35
FIGURA 12. MÓDULO DE OSCILOSCOPIO	36
FIGURA 13. MESA GENERADORA DE VIBRACIONES	37
FIGURA 14. ESPACIO DE COLOR CIELAB	38
FIGURA 15. ZARZAMORA CONTROL (IZQUIERDA) Y VIBRADA 10 MINUTOS (DERECHA)..... ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED. 53	
FIGURA 16. CROMATOGRAMA DE CIANIDINA 3-O-GLUCÓSIDO.	62
FIGURA 17. DRUPEOLA NO REVERTIDA (IZQUIERDA) Y REVERTIDA (DERECHA).	67
FIGURA 18. MICROGRAFÍA DE PULPA REVERTIDA DEL CV. TUPY	70
FIGURA 19. MICROGRAFÍA DE PULPA NO REVERTIDA DEL CV. TUPY A 20X (IZQUIERDA) 40X (DERECHA).	70
FIGURA 20. UNIÓN DRUPEOLA-RECEPTÁCULO A 4X NO REVERTIDA (IZQUIERDA) Y REVERTIDA (DERECHA).	71
FIGURA 21. RECEPTÁCULO NO REVERTIDO TEÑIDO VISTO A 4X Y 10X.....	72
FIGURA 22. RECEPTÁCULO REVERTIDO TEÑIDO VISTO A 4X Y 10X	72
FIGURA 23. DRUPEOLAS OBSERVADAS A 10X NO REVERTIDA (IZQUIERDA) Y REVERTIDA (DERECHA).	73

INDICE DE CUADROS

CUADRO 1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LA ZARZAMORA	3
CUADRO 2. PRINCIPALES ENTIDADES PRODUCTORAS DE ZARZAMORA	8
CUADRO 3. COMPOSICIÓN NUTRICIONAL DEL FRUTO DE ZARZAMORA	9
CUADRO 4. GRADIENTE DE SEPARACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS POR HPLC.	42
CUADRO 5. MUESTRAS UTILIZADAS PARA ESTUDIOS MICROESTRUCTURALES.	43
CUADRO 6. SOLVENTES UTILIZADOS PARA SOLUCIÓN FIJADORA.	44
CUADRO 7. SOLUCIONES UTILIZADAS PARA DESHIDRATACIÓN DEL TEJIDO.	45
CUADRO 8. IMÁGENES OBTENIDAS PARA CARACTERIZACIÓN MORFOMÉTRICA Y TEXTURAL DEL FRUTO DE ZARZAMORA.	48
CUADRO 9. IMÁGENES OBTENIDAS PARA CARACTERIZACIÓN COLORIMÉTRICA Y TEXTURAL DE RECEPTÁCULOS EN EL FENÓMENO DE REVERSIÓN.	50
CUADRO 10. PARÁMETROS DE COLOR EN CV. TUPY.	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED. 54
CUADRO 11. PARÁMETROS DE COLOR EN CV. DASHA.	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED. 56
CUADRO 12. ANTOCIANINAS MONOMÉRICAS EN AMBOS CULTIVARES.	58
CUADRO 13. PORCENTAJE DE COLOR POLIMÉRICO EN CULTIVAR TUPY Y DASHA.	60
CUADRO 14. CONTENIDOS DE CIANIDINA 3-GLUCÓSIDO EN DRUPEOLAS Y RECEPTÁCULOS REVERTIDOS Y NO REVERTIDOS DE AMBOS CULTIVARES.	62
CUADRO 15. TIEMPO DE RETENCIÓN DE ESTÁNDARES DE ÁCIDOS FENÓLICOS SEPARADOS POR HPLC.	63
CUADRO 16. ÁCIDOS FENÓLICOS PRESENTES EN DRUPEOLAS CV. TUPY.	64
CUADRO 17. ÁCIDOS FENÓLICOS PRESENTES EN RECEPTÁCULOS CV. TUPY.	65
CUADRO 18. ÁCIDOS FENÓLICOS PRESENTES EN DRUPEOLAS CV. DASHA.	65
CUADRO 19. ÁCIDOS FENÓLICOS PRESENTES EN RECEPTÁCULOS CV. DASHA.	66
CUADRO 20. PARÁMETROS COLORIMÉTRICOS EN DRUPEOLAS Y RECEPTÁCULOS CV. DASHA.	66
CUADRO 21. PARÁMETROS MORFOMÉTRICOS EN DRUPEOLAS CV. DASHA.	67
CUADRO 22. RECEPTÁCULO	68
CUADRO 23. PARÁMETROS MORFOMÉTRICOS EN CÉLULAS DE DRUPEOLAS CV. DASHA.	73
CUADRO 24. PARÁMETROS MORFOMÉTRICOS EN CÉLULAS DE RECEPTÁCULOS CV. DASHA.	74

RESUMEN

México es el país con mayor producción y exportación de zarzamora a nivel mundial. Uno de los principales problemas que presenta el fruto de zarzamora es la reversión de color que es un proceso que se caracteriza por el cambio de color irreversible en la pigmentación de drupeolas individuales del negro a rojo, causando del 2-5% de rechazo del fruto dentro de la cadena de comercialización. Hasta el momento se desconoce la causa de este fenómeno; sin embargo, algunos estudios sugieren que la exposición al sol y las vibraciones generadas durante el transporte, están asociadas a la reversión de color en zarzamora (*Rubus* sp.). El objetivo del presente proyecto fue establecer un modelo de inducción de la reversión de color para evaluar los cambios en la microestructura y cambios químicos en drupeola y receptáculo del fruto. Para este fin, se utilizaron dos variedades de zarzamora; 'Tupy' y 'Dasha', susceptible a reversión por vibración y exposición al sol; respectivamente. En cada experimento, se separaron drupeolas y receptáculos para análisis de color, morfométricos, contenido de antocianinas y compuestos fenólicos. Los análisis revelaron que en los frutos revertidos (vibrados y expuestos al sol), se incrementó el color rojo (a^* , 10% y 7%; respectivamente) y la concentración (2.54 y 7.23 veces mayor; respectivamente) de antocianinas monoméricas y cianidina-3-glucósido en los receptáculos. Además, se observó que las drupeolas revertidas presentan menor circularidad, área y diámetro de Feret en comparación con las no revertidas. Los análisis morfométricos revelaron que las drupeolas no revertidas presentan aglomerados de antocianinas y que estos disminuyen en drupeolas revertidas; asimismo, se observó una pérdida de la estructura celular en las drupeolas revertidas. Interesantemente, se observó un cambio en la unión drupeola-receptáculo lo cual sugiere un daño en el sistema de transporte entre estas dos estructuras. En conjunto, estos resultados sugieren que la reversión de color puede estar asociada a daños microestructurales en la drupeola que inducen cambios bioquímicos y fisicoquímicos que provocan la copigmentación y pérdida de color rojo en el fruto de zarzamora.

Palabras clave: antocianinas, reversión de color, drupeolas, receptáculos.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

ABSTRACT

Mexico is the country with the highest production and exportation of blackberry worldwide. However, one of the main problems presented through the blackberry fruit is color reversion that is a process characterized through the irreversible color change in the pigmentation of individual drupelets from black to red, causing 2-5% rejection of the fruit within the marketing chain. The cause of this phenomenon is unknown so far; However, some studies suggest that sun exposure and vibrations generated during transport are associated with color reversion in blackberry (*Rubus* sp.). The objective of this project was to establish an induction model of color reversion to evaluate the effect of sun exposure and vibration on changes in microstructural and chemical changes in drupelet and receptacle fruit. For this purpose, two varieties of blackberry were used; 'Tupy' and 'Dasha', susceptible to reversion through vibration and sun exposure; respectively. In each experiment, drupelets and receptacles were separated for color and morphometric analysis, anthocyanin content and phenolic compounds. The analyzes exposed that in reverted fruits (vibrated and exposed to the sun), the red color (a^* , 10% and 7%; respectively) was increased and the concentration (2.54 and 7.23 times higher; respectively) of monomeric anthocyanins and cyanidin-3- glucoside were increased in receptacles. In addition, it was observed that reverted drupelets have less circularity, area and Feret diameter compared to non-reverted. Morphometric analyzes presented that non-reverted drupelets have anthocyanin agglomerates and these decrease in reverted drupelets; likewise, a loss of cell structure was observed in reverted drupelets. Interestingly, a change in drupelet-receptacle connection was observed which suggests damage to the transport system between these two structures. Together, these results suggest that color reversion may be associated with microstructural damage to drupelet that induces biochemical and physicochemical changes that cause copigmentation and loss of red color in the blackberry fruit.

Keywords: color reversion, anthocyanin, drupelets, receptacles, image analysis

1. INTRODUCCIÓN

La zarzamora (*Rubus* sp.) es un fruto agregado que contiene múltiples drupeolas unidas a un receptáculo (Hall & Funt, 2017). México es el líder mundial en producción con 270 mil toneladas anuales (SIAP, 2018) y la cercanía con el primer importador de este fruto (Estados Unidos de América), hace que México sea el primer exportador de este fruto. En particular, la zarzamora es un fruto no climatérico y debe cosecharse en plena madurez (Perkins-Veazie et al., 1996). Durante la maduración se presentan tres cambios de color: inicialmente verde, posteriormente rojo completo y finaliza en púrpura o negro. Sin embargo, una vez cosechado el fruto, por distintos factores poscosecha, puede cambiar su color, causando su rechazo en los puntos de inspección para su exportación.

La reversión de color es el retorno de color negro propio de un fruto maduro a rojo similar de frutos en etapa de desarrollo previa a la madurez comercial (Hall & Funt, 2017). El mecanismo de este fenómeno se desconoce, no obstante, se sugiere que las antocianinas, por ser los compuestos responsables del pigmento del fruto (Fan-Chiang & Wrolstad, 2010), se encuentran involucradas.

Estudios han revelado que el contenido de cianidina 3-glucósido, la antocianina mayoritaria, es menor en frutos revertidos comparado con frutos no revertidos (Edgley, Close, Measham, & Nichols, 2019; Pérez-Pérez et al., 2018). También se ha reportado que, aunado a la disminución en el contenido de antocianinas, existe pérdida de la estructura celular en drupeolas Edgley et al., (2019a). Se han reportado cambios microestructurales en las drupeolas de frutos revertidos, observando mayores espacios intercelulares así como ondulaciones en la superficie de la piel, ambos cambios asociados con la pérdida de firmeza de las drupeolas; asimismo Pérez-Pérez et al., (2018) observaron a través de TEM, menor integridad y orden celular en drupeolas de frutos revertidos.

Los factores que se han relacionado con el aumento del porcentaje de frutos revertidos son: temperatura de almacenamiento, momento de cosecha (Edgley et al., 2019), vibraciones durante el transporte (Pérez-Pérez et al., 2018) y altas

concentraciones de nitrógeno en nutrición en campo, (Edgley et al., 2019b, 2018). En el laboratorio de Fisiología y Bioquímica Poscosecha de Frutas y Hortalizas de la UAQ se han llevado a cabo estudios para identificar las condiciones que causan la reversión de color en zarzamora cv. 'Tupy'; identificándose que la vibración entre 8 y 10 Hz y una amplitud de 0.5 g's causan el desorden. Otro factor que influye fuertemente es la exposición solar, por lo que es importante evaluar estos dos métodos de inducción del cambio de color para entender lo que ocurre en cada uno de ellos y permita plantear soluciones al problema de reversión de color o proponer un método de estudio más específico que nos acerque a comprender totalmente el fenómeno.

Bajo este contexto el objetivo del presente trabajo de investigación fue evaluar los cambios microestructurales y químicos en drupeolas y receptáculos de zarzamora revertida a través de dos modelos de inducción

2. ANTECEDENTES

2.1 Generalidades de zarzamora

2.1.1 Taxonomía y morfología de la planta

El género *Rubus* (anteriormente *Eubatus*) es el más grande de la familia de las rosáceas, , la zarzamora se deriva de las secciones *Moriferi* y *Ursini* (Hall & Funt, 2017) y su clasificación taxonómica se describe en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de la zarzamora (Badenes & Byrne, 2012).

Rango	Nombre científico
Reino	Plantae
Subreino	Trachebionta
Superdivisión	Spermatophyta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Rosidae
Orden	Rosal
Familia	Rosaceae
Género	<i>Rubus</i>
Especie	<i>Rubus fruticosus</i>

Las plantas de zarzamora son perennes y tienen un ciclo de crecimiento bienal que inicia cuando un brote del suelo emerge convirtiéndose en una primocaña. Las cañas de primer año o primocañas, y después de un periodo de reposo se convierten en floricañas (Goldman, 2018). Las floricañas florecen, dan fruto y mueren mientras nuevas primocañas vegetativas se generan (Finn & Clark, 2011). En la primavera del segundo año, después de que se completa la acumulación de horas frío durante el invierno, las cañas vegetativas del crecimiento

del primer año se convierten en bastones fructíferos y los brotes axilares se convierten en fructíferos laterales (Jennings, 1988).



Figura 1. Planta de zarzamora en floración.

El receptáculo de la flor tiene múltiples ovarios, estilos y estigmas, rodeado de pétalos blancos o rosados (Figura. 1) (Hall & Funt, 2017). Por ello la fruta es un fruto agregado (Figura. 2), debido a que cada pistilo se desarrolla en una drupa o drupeola única que contiene un solo pireno, que contiene la semilla (Fernandez-Salvador et al., 2015).

El número de drupeolas por fruto puede variar de 50 a más de 100 con un rango de porcentaje establecido de 40 a casi 90% (Finn & Clark, 2011; B. C. Strik, 2008). La cohesión de estas drupeolas depende del enlace de los tricomas epidérmicos (estructuras lineales unicelulares que surgen de las células de la superficie). En zarzamora, estos tricomas son menos profusos y las drupeolas menos comprimidas en comparación con la frambuesa roja (B. C. Strik, 2016). El período de desarrollo desde la floración hasta la maduración generalmente varía de 40 a 60 días, dependiendo del cultivar (Fernandez-Salvador et al., 2015). Las frutas más grandes son producidas por la flor primaria en un racimo, y las flores secundarias generalmente producen fruta más pequeña (Hall & Funt, 2017). El tamaño de la zarzamora está determinado por una combinación de número y tamaño de drupeola, con cultivares modernos que producen una fruta en forma de

barril, redonda, cuadrada, irregular o cónica que pesa entre 8 y 15 g (Clark, 2008).

La zarzamora es un cultivo que se desarrolla en clima con temperaturas que oscilan entre los 16 y 25°C. Requiere entre 1,500 y 2,500 mm de precipitación anual, y humedad relativa entre 80-90%. Para su óptimo desarrollo se debe cultivar entre los 1,200- 2,000 msnm, pero puede tolerar un amplio rango de altitudes. Se desarrolla mejor en suelos franco-arcillosos, de modo que permite una adecuada reserva de agua y el exceso sea evacuado fácilmente, con alto contenido de materia orgánica y pH entre 5.2 y 6.7.(SIAP, 2018).

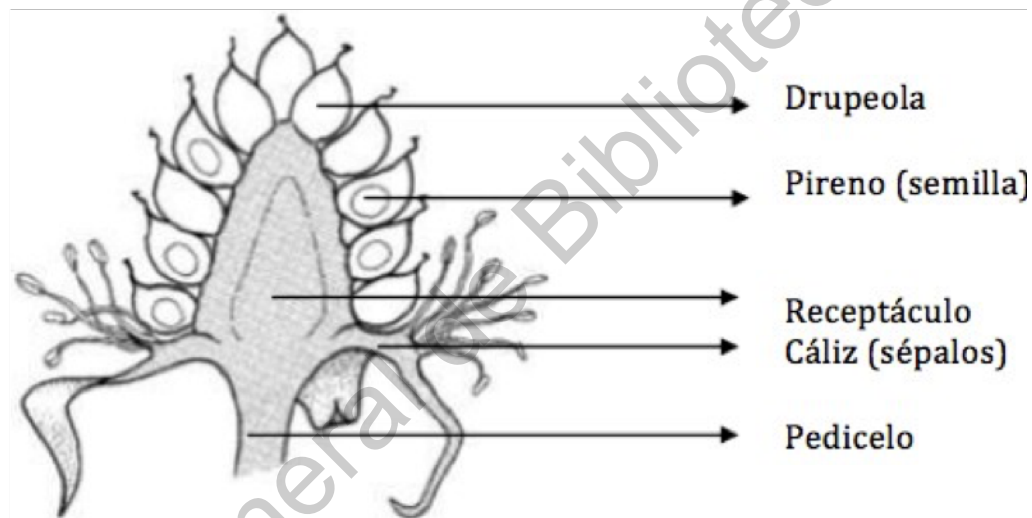


Figura 2. Estructura anatómica de la fruta de zarzamora (Hall & Funt, 2017).

Se han generado nuevas variedades con menor requerimiento de horas frío. Una de estas variedades originaria es la 'Tupy' generada de cruces entre una selección nativa llamada "Uruguay" y la variedad "Comanche", cuya característica es su bajo requerimiento de horas frío. Fue desarrollada por el programa de mejoramiento genético EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) en Brasil y ha estado activo desde fines de los años setenta (Hall & Funt, 2017).

El cultivar "Tupy", es de tipo espinoso y productora de frutos grandes. Debido a su amplia temporada de cosecha (de noviembre a mayo) y a que se encuentra de forma libre desde el año 2003 (Rutz, 2012), en México ha permitido el desarrollo del

mercado de exportación, principalmente hacia EUA, (do Nascimento Nunes et al., 2014). Aunque existen otras variedades que se cultivan a nivel nacional como: “Choctaw”, “Shawnee”, “Kiowa”, “Comanche”, “Cheyenne”, “Cherokee”, entre otras (Rivas, 2016), ninguna ha tenido el desarrollo observado por ‘Tupy’.

2.2 Importancia económica del cultivo de zarzamora

2.2.1 Producción mundial

La zarzamora en los últimos años ha mostrado notable incremento en su producción. En el año 2005 se sembraron 20,035 hectáreas de zarzamoras y se alcanzó una producción mundial de 140,292,000 kg (SIAP, 2018). Para el año 2016 Irán fue el primer productor mundial con 313,880 toneladas, que representó el 27.2% de la producción mundial, en segundo lugar, se encontró México con 238,832 toneladas (SIAP, 2018).

A partir del año 2016, el volumen de producción de este cultivo se ha incrementado de manera significativa en la república mexicana observándose un aumento de 102% respecto del año 2015 (SIAP, 2018), en los cual fue determinante la aplicación generalizada de la producción bajo túneles de plástico para mayor rendimiento (Figura 3).

Volumen de la producción nacional 2008-2017

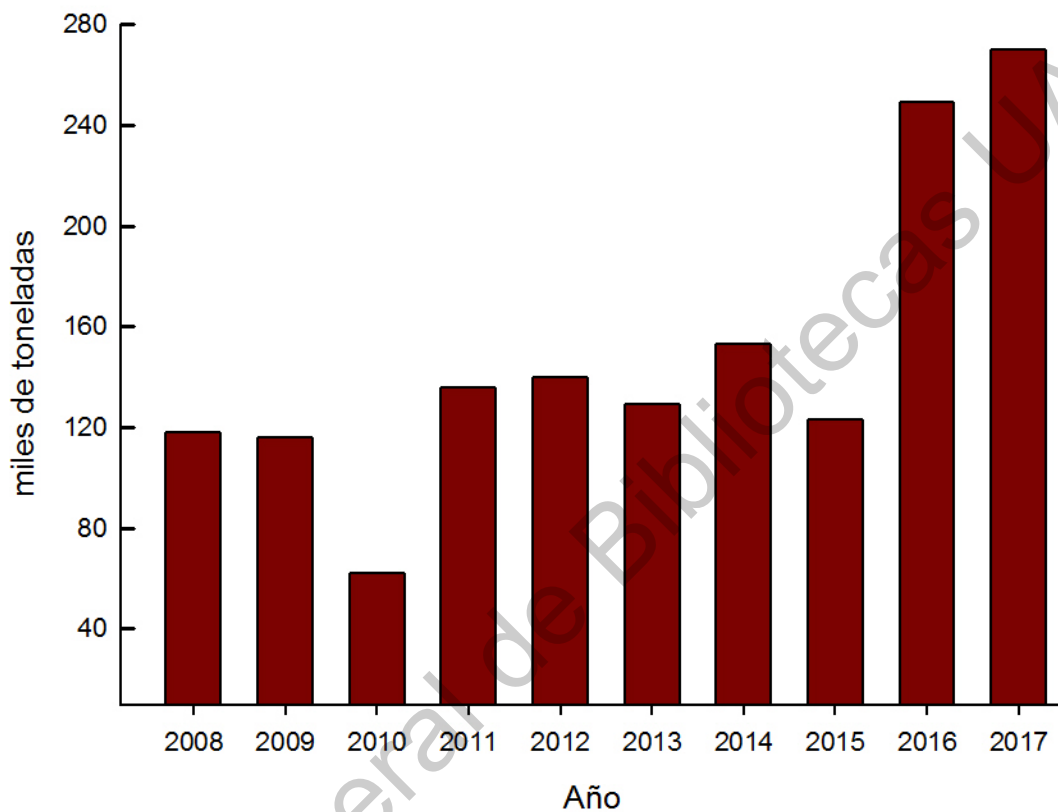


Figura 3. Volumen de la producción nacional de zarzamora de 2008 al 2017 (SIAP, 2018).

La producción por estados muestra que el estado de Michoacán es generador del 97.7% del valor de la producción (Cuadro 2), que en el año 2017 superó los 10 mil 310 millones de pesos. A este estado se le suman los estados de Jalisco y Baja California, pero solo contribuyeron con el 1.1 y 0.7 por ciento respectivamente (SIAP, 2018).

Cuadro 2. Principales entidades productoras de zarzamora (SIAP, 2018).

Lugar	Entidad federativa	Volumen (toneladas)	Variación (%) 2012-2017
	Total nacional	270,399	93.4
1	Michoacán	260,143	93.1
2	Jalisco	7566	94.9
3	Colima	1670	82.5
4	Baja California	722	NA
5	México	123	52.3
6	Guanajuato	59	NA
7	Morelos	36	56
8	Querétaro	33	-51.5
9	Veracruz	17	-54.2
10	Ciudad de México	16	-19.9
	Resto	16	-77.7

2.3 Composición nutricional del fruto de zarzamora

La composición química de la zarzamora cambia según la variedad, las condiciones de crecimiento, el estado de madurez y las condiciones de cosecha y almacenamiento (Finn & Clark, 2011). Las zarzamoras contienen carbohidratos, vitaminas y minerales importantes en la nutrición humana (Cuadro 3) (Kaume et al., 2012). Los azúcares principales de este fruto son glucosa, fructosa y sacarosa, aunque sus relaciones pueden diferir entre cultivares y los contenidos de glucosa y fructosa varían entre 3.24-2.88 y 0.81-1.17 g/100g de peso fresco (Kafkas et al., 2006). Se estima que el contenido de sacarosa es de 0.24 g/100 g de peso fresco (B. Strik & Bryla, 2015). Los niveles de glucosa, fructosa, azúcares totales y sólidos solubles totales aumentan notablemente a medida que la fruta madura desde el rojo claro hasta la coloración oscura (Rutz, 2012).

Estos frutos contienen ácido málico como ácido orgánico primario, aunque se han detectado otros ácidos, como el ácido ascórbico (Kafkas et al., 2006). No obstante Fan-Chiang & Wrolstad, (2010) informaron contenidos promedio mayores de ácidos orgánicos no volátiles en 52 muestras de zarzamora, como 280 mg/100 g de peso fresco para el ácido málico, 293 mg/100 g para el ácido lacto isocítrico, 599 mg/100 g de ácido isocítrico y 572 mg/ 100 g de ácido cítrico. Además, se identificaron trazas de ácidos shiquímico, fumárico y succínico. Estos ácidos orgánicos pudieran tener un papel para estabilizar las antocianinas y el ácido ascórbico, y extender la vida útil de las zarzamoras frescas y procesadas (Zhao, 2007). Un índice de calidad importante es la relación de sólidos solubles totales y acidez titulable. Esta proporción aumenta en la zarzamora a medida que la fruta madura, reflejando aumento en azúcares y disminución en ácidos orgánicos (B. C. Strik, 2008).

Cuadro 3. Composición nutricional del fruto de zarzamora (Kaume et al., 2012).

Próximos y carbohidratos	Contenido de vitaminas	Contenido de minerales
Agua (g)	88.2	Ácido ascórbico 21 Calcio (mg) 29
Energía (Kcal)	43	Tiamina (mg) 0.02 Hierro (mg) 0.62
Proteína (g)	1.39	Riboflavina (mg) 0.03 Magnesio (mg) 20
Lípidos totales (g)	0.49	Niacina (mg) 0.65 Fosforo (mg) 22
Ceniza (g)	0.37	Ácido pantoténico 0.28 Potasio (mg) 162
Carbohidrato (g)	9.61	Vitamina B6 (mg) 0.03 Sodio (mg) 1
Fibra total	5.3	Folato total(μg) 25 Zinc (mg) 0.53

Azúcar total (g)	4.88	Vitamina B12 (μg)	ND	Cobre (mg)	0.17
Sacarosa (g)	0.07	Vitamina A (IU)	214	Manganeso (mg)	0.65
Glucosa (g)	2.31	α-Tocoferol (mg)	1.17	Selenio (mg)	0.4
Fructosa (g)	2.4	β- Tocoferol (mg)	0.04		
Maltosa (g)	0.07	γ- Tocoferol (mg)	1.34		
Galactosa (g)	0.03	Δ-Tocoferol (mg)	0.90		
Almidón (g)	ND	Vitamina K (μg)	19.8		

En cuanto a los compuestos bioactivos, las zarzamoras son fuente de polifenoles que incluyen antocianinas, elagitaninos (ET), flavonoles, flavan-3-oles y procianidinas (Benvenuti et al., 2004). Las zarzamoras también contienen ácidos fenólicos y bajos niveles de lignanos. Se han encontrado fenoles totales en el fruto de zarzamora en un rango de 114 a 1056 mg/100 g de peso fresco (Kaume et al., 2012).

2.3.1 Flavonoles

La estructura de los flavonoles implica un doble enlace entre los carbonos C2 y C3, un grupo hidroxilo en C3 y un grupo cetona en C4 del anillo C del núcleo flavan (Figura 4) (Zhao, 2007). Quercetina, miricetina, y kaempferol son los flavonoles comúnmente identificados en frutillas; la diferencia es el número y posición de los grupos OH en C3 y C5. Los azúcares comúnmente unidos en la posición C3 son glucosa y galactosa, pero también se pueden encontrar arabinosa, ramnosa, rutinosa y xilosa (Fan-Chiang & Wrolstad, 2010).

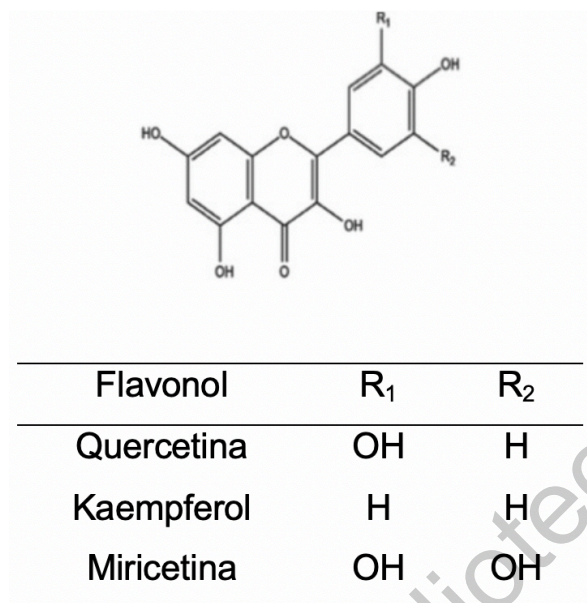


Figura 4. Estructuras químicas de flavonoles en zarzamora (Kaume et al., 2012).

Las zarzamoras presentan importantes cantidades de flavonoles en su forma glicosilada exclusivamente en la pulpa de la drupeola (Siriwoharn & Wrolstad, 2004). Este fruto tiene un perfil de flavonoles complejo debido a la presencia de nueve quercetinas y tres derivados de kaempferol, así como dos compuestos asilados derivados de quercetina (Kaume et al., 2012).

2.3.2 Ácidos fenólicos

El contenido de ácidos fenólicos en este fruto varía de 7 a 64 mg/100 g de peso fresco donde el ácido hidroxibenzoico y ácido hidroxicinámico son los más comunes. Estos ácidos se presentan en formas conjugadas de ésteres o glicósidos, y raramente como ácidos libres (Zhao, 2007). Los ésteres constituyen el 53.1% total de ácidos fenólicos, mientras que los glicósidos y ácidos libres representan el 43.6 y el 3.3%, respectivamente (Zadernowski, Naczki, & Nesterowicz, 2005). Los ácidos hidroxibenzoicos de zarzamora incluyen *p*-hidrobenzoico, protocatecuico, gálico,

vanílico, salicílico y el ácido gentísico. Las formas glicosídicas y éster del ácido salicílico son las más comunes (Zadernowski et al., 2005).

El ácido cafeico, *m*-cumárico, *p*-cumárico y ferúlico son ácidos hidroxicinámicos que se encuentran en las zarzamoras en formas libres, éster y glicosídicas (Kim et al., 2015), predominando las formas éster de los ácidos *m*-cumárico, 3,4-dimetoxicinámico e hidroxicafeico (Zadernowski et al., 2005). Los derivados de ácido hidroxibenzoico e hidroxicinámico de zarzamora han sido clasificados de la siguiente manera: ácido clorogénico, ácido neoclorogénico, ésteres de glucosa de cafeico, *p*-cumárico, ácido ferúlico, ácido gálico, así como ácidos protocatecúicos y los β -D-glucósidos de los ácidos *p*-cumárico y *p*-hidroxibenzoico (Acosta-Montoya et al., 2010).

El ácido elágico (AE) (Figura 5B), es un ácido hidroxibenzoico, pero la mayor parte del AE que se encuentra en las zarzamoras está en forma de elagitaninos, una clase de taninos hidrolizables formados de la unión del ácido gálico glicosilado (Hager et al., 2008). Derivados del AE disminuyen a medida que las zarzamoras maduran de rojo claro (30 mg/100 g de peso fresco) a violeta oscuro azulado (20 mg/100 g de peso fresco) (Acosta-Montoya et al., 2010).

2.3.3 Taninos

Los taninos son un grupo de compuestos polifenólicos que se encuentran en muchas frutillas, incluyendo componentes oligoméricos y poliméricos (Hager et al., 2008). Los taninos se clasifican en dos grupos de acuerdo con su estructura: taninos condensados, que son, proantocianidinas y taninos hidrolizables, es decir, elagitaninos y galotaninos (Shahidi & Naczki, 2003).

Las proantocianidinas son oligómeros y polímeros de flavonoides en particular flavan-3-oles, mientras que los taninos hidrolizables son derivados del ácido gálico glucosilado. Las frutillas contienen dos tipos principales de proantocianidinas: procianidinas y propelargonidinas. Las procianidinas y propelargonidinas están compuestas exclusivamente de unidades (epi) catequina y

(epi) afzelequina (Zielinski et al., 2015). Se ha encontrado que las procianidinas en las zarzadoras son predominantemente unidades de epicatequina unidas mediante un enlace C4-C8 (Kaume et al., 2012). Este fruto contiene un total de procianidina de 27.0 mg/100 g en peso fresco (Gu et al., 2004).

Los taninos hidrolizables, específicamente elagitaninos de varios pesos moleculares, se encuentran en este fruto en cantidades notables (Zhao, 2007). Los derivados de elagitaninos y ácido elágico se identifican utilizando espectrometría de masas de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-MS), y los resultados se reportan como "equivalentes de ácido elágico" debido a la diversidad de elagitaninos en frutillas y la carencia de estándares de elagitaninos (Hager et al., 2008).

La estructura básica de los elagitaninos consiste en un núcleo de glucosa esterificado con ácido hexahidroxidifénico (HHDP) (Figura 5A). Los elagitaninos encontrados en este fruto y en las hojas son en su mayoría formas polimerizadas de glucosa galoil-bis-HHDP (Figura 5C) (Hager et al., 2008). Las semillas de zarzadora contienen la mayor cantidad de elagitaninos y ácido elágico en comparación con otra parte de la fruta, es decir, la pulpa (Siriwoharn & Wrolstad, 2004). El 88% de los elagitaninos y ácido elágico se encuentran en las semillas en comparación con solo el 12% en la pulpa. Los derivados de ácido elágico en zarzadora varían de 1.2 a 3.0 mg/100 g, mientras que los elagitaninos varían de 51.1 a 68.2 mg/100 mg (Siriwoharn & Wrolstad, 2004). Notablemente el contenido de ácido elágico y elagitaninos en zarzadora es afectado por la maduración.

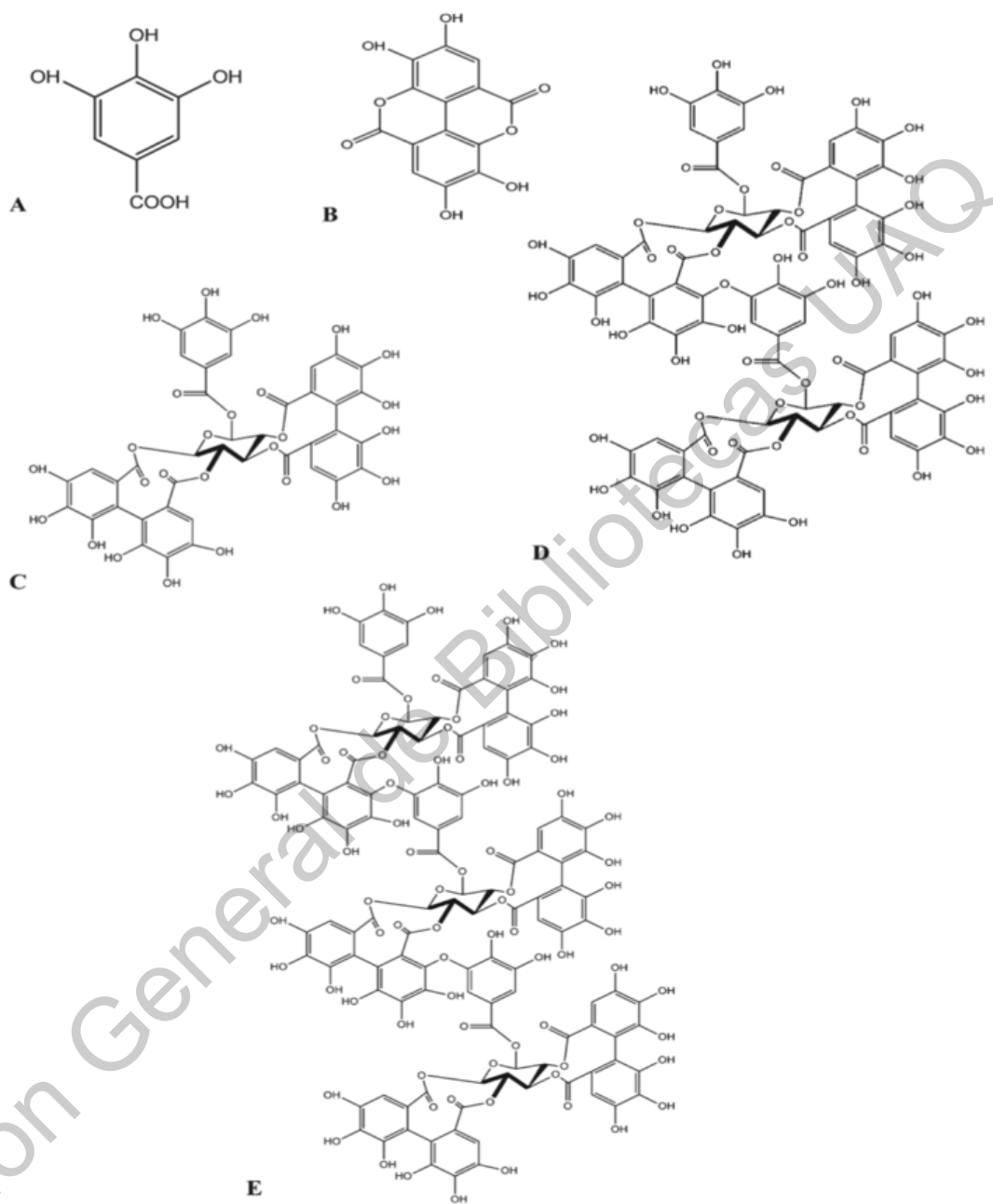
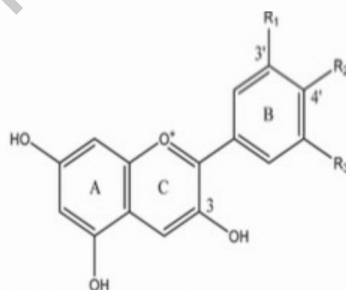


Figura 5. Estructuras de ácido gálico (A), ácido elágico (B), glucosa de galoil-bis-HHDP (C), sanguinina H-6/lambertianina A (D) y lambertianina C (E) (Kaume et al.,2012)

2.3.4 Antocianinas

Las antocianinas son los compuestos fenólicos responsables de los pigmentos rojos, azules y morados de frutas y verduras (Fan-Chiang & Wrolstad, 2010). La estructura básica de las antocianinas C₆C₃C₆ que incluye un anillo aromático [A] unido a un anillo heterocíclico [C] que contiene oxígeno pirano, que también está unido por un enlace carbono-carbono a un tercer anillo aromático [B] (Connor et al., 2005). A esta estructura básica puede estar sustituida con grupos –OH o grupos –OCH₃ (Figura. 6) generando las diferentes estructuras básicas de antocianidinas o aglicones. Cuando las antocianidinas se unen a un azúcar forman glicósidos conformando la antocianina correspondiente.

Las antocianinas más ampliamente distribuidas en frutillas se encuentran en forma de glucósidos (Cho et al., 2004). La glicosilación puede ser con una o más moléculas de azúcar en la posición C3 de la estructura del flavan (Zhao, 2007). Aproximadamente el 94% de las antocianinas de zarzamora se encuentran en forma no acilada, y el 90% de estas existen como monoglucósidos, mientras que el 10% restante se encuentran como diglicósidos (Benvenuti et al., 2004).



Antocianidina	R ₁	R ₂	R ₃
Cianidina	OH	OH	H
Pelargonidina	H	OH	H
Malvidina	OCH ₃	OH	OCH ₃

Figura 6. Patrones de sustitución para la conformación de las diferentes estructuras químicas de antocianinas en zarzamora (Kaume et al., 2012).

Se ha demostrado que el contenido de antocianinas de este fruto varía debido a las diferencias en la variedad, las condiciones ambientales, el sitio de cultivo y el grado de madurez (Connor et al., 2005). Durante el desarrollo del fruto las antocianinas totales aumentan notablemente a medida que la fruta madura desde las etapas rosa/rojo claro hasta llegar a púrpura azulado oscuro (Kaume et al., 2012).

2.3.4.1 Estabilidad de antocianinas

Las antocianinas aisladas son altamente inestables y susceptibles a la degradación (Giusti & Wrolstad, 2001). La estabilidad se ve afectada por diferentes factores como el pH, temperatura de almacenamiento, estructura química, concentración, luz, oxígeno, solventes, presencia de enzimas, flavonoides, proteínas y iones metálicos (Giusti & Wrolstad, 2001).

2.3.4.1.1 Estabilidad de antocianina afectada por temperatura

Las antocianinas predominantes presentes en frutas y hortalizas son cianidina-3-O-glucósido, delphinidina-3-O-glucósido, malvidina-3-O-glucósido, pelargonidin-3-O-glucósido y petunidina-3-O-glucósido (Patras et al., 2010).

La magnitud y duración del calentamiento tiene fuerte influencia en la estabilidad de antocianinas. En un estudio, (Sadilova et al., 2006) observaron que los contenidos de antocianina eran muy sensibles al tratamiento térmico, después de 3 horas de calentamiento, solo el 50% de los pigmentos fueron retenidos a 95°C. En diversos estudios se ha informado un curso logarítmico de destrucción de antocianinas con aumento en la temperatura (Drdák et al., 1990; Havlíková et al., 1985; Rhim, 2002). Las altas temperaturas involucradas en el procesamiento de los arándanos para purés resultaron en pérdida del 43% en las antocianinas monoméricas totales, en comparación con los niveles encontrados en la fruta fresca (Brownmiller et al., 2008), mientras que los valores de color polimérico aumentaron

del 1% al 12%, sugiriendo que el calor puede generar reacciones de polimerización de las antocianinas.

Ochoa et al. (1999) informaron pérdidas similares en puré de frambuesa. García-Viguera et al. (1999) reportaron que en el proceso de elaboración de mermelada el contenido de antocianinas disminuyó entre el 10 y 80% en un tiempo de ebullición entre 10 y 15 minutos, observando que la temperatura de almacenamiento juega un papel crítico para la pérdida de antocianinas. Jackman & Smith, (1996) reportaron menor degradación a 20°C en comparación con 37°C. Por lo tanto, la estabilidad de las antocianinas está fuertemente influenciada por la temperatura.

2.3.4.1.2 Estabilidad de antocianinas afectadas por almacenamiento

Estudios han demostrado la degradación de las antocianinas durante los tratamientos de almacenamiento. Por ejemplo, Brownmiller et al., (2008) estudiaron el efecto del almacenamiento prolongado sobre antocianinas monoméricas totales en puré de arándano. Los autores reportaron que más del 50% de las antocianinas se perdieron después de 6 meses de almacenamiento. Las pérdidas de antocianinas monoméricas totales fueron acompañadas por valores de color polimérico incrementados. Se hipotetiza que las antocianinas se polimerizaron durante el almacenamiento (Ochoa et al., 1999). El aumento en el color polimérico y la pérdida correspondiente de antocianinas monoméricas pueden deberse a varios factores, que incluyen la actividad enzimática residual o las reacciones de condensación de las antocianinas con otros fenoles (Brownmiller et al., 2008). Del mismo modo, (Hager et al., 2008) observaron que las antocianinas monoméricas totales en los jugos de frambuesa negra no clarificados disminuyeron linealmente durante el almacenamiento con pérdidas superiores al 60% durante el almacenamiento por seis meses.

2.3.4.2 Degradación de antocianinas

Se sabe relativamente poco sobre los mecanismos de degradación de las antocianinas, pero la estructura química y la presencia de otros ácidos orgánicos tienen una fuerte influencia. Por ejemplo, la tasa de degradación de las antocianinas aumenta durante el procesamiento y el almacenamiento a medida que aumenta la temperatura (Palamidis & Markakis, 1975) sugirieron la apertura del anillo de pirilio y la formación de chalcona como un primer paso de degradación para las antocianinas. Adams, (1973) propuso la hidrólisis del resto de azúcar y la formación de aglicona como paso de degradación inicial posiblemente debido a la formación de aductos cíclicos. El autor también informó que la antocianina se descompone al calentarse en una estructura de chalcona, esta última se transforma en un derivado de glucógeno de cumarina con una pérdida del anillo B (Patras et al., 2010).

2.3.4.2.1 Degradación oxidativa

El oxígeno también juega un papel importante en los procesos de degradación de antocianinas. La presencia de oxígeno puede acelerar la degradación de antocianinas mediante un mecanismo oxidativo directo o mediante la acción de enzimas oxidantes (Jackman et al., 1987). En presencia de oxígeno, las enzimas como PPO catalizan la oxidación del ácido clorogénico (CG) en la *o*-quinona correspondiente (clorogenoquinona, CGQ). Esta quinona reacciona con las antocianinas para formar productos de condensación marrones (Kader et al., 1999) trabajaron con las soluciones modelo de sustratos purificados y propusieron que cianidina 3-glucósido se degrada por un mecanismo de oxidación acoplada que involucra la *o*-quinona generada enzimáticamente con regeneración parcial del co-sustrato *o*-difénolico (CG). Estas observaciones confirman que PPO se encuentra involucrada en la degradación de antocianinas.

2.3.5 Reversión de color

Esta ocurre en el producto cosechado y generalmente se observa cuando el fruto se encuentra en los mercados de destino. De manera natural, los cambios de color de los frutos se presentan a medida que maduran cambiando de un estado rojo que posteriormente cambia a parcialmente negro y finalmente a negro (Perkins-Veazie et al., 1996). El desarrollo del color negro completo puede ser muy rápido (menos de un día), si la temperatura del aire es cálida ($>30^{\circ}\text{C}$). No obstante, se ha observado que después de la cosecha, los frutos regresan a un estado rojo lo que se conoce como reversión de color (Figura 7). Este es un problema que provoca el rechazo en los puntos de inspección alcanzando entre 2-3% del producto exportado.

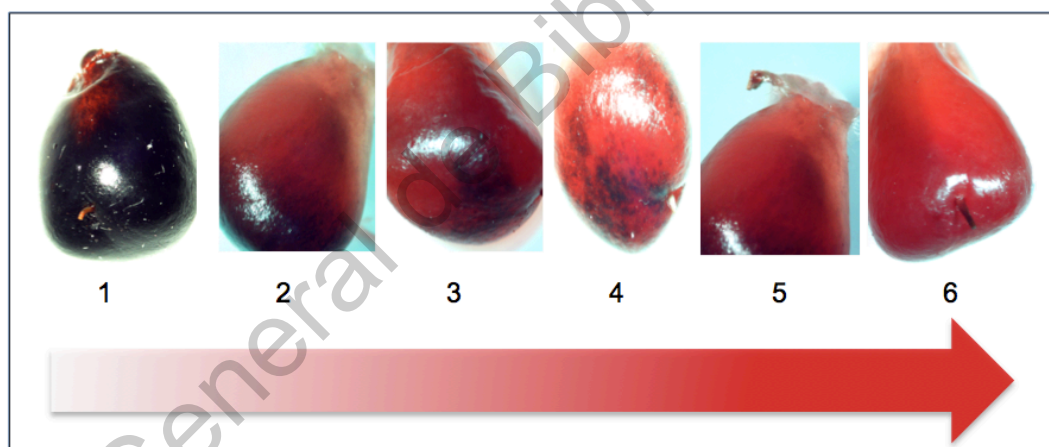


Figura 7. Proceso de reversión de color en cultivar 'Tupy' (elaboración propia).

2.3.5.1 Factores que intervienen en la reversión de color

2.3.5.1.1 Genotipo

Se han desarrollado diferentes cultivares de zarzamora para incrementar la producción, resistencia a enfermedades; así como para mejorar características del fruto como la firmeza y resistencia a la reversión del color (McCoy, Clarke, Salgado, & Jecmen, 2016; Segantini et al., 2017; Yin, 2017).

Segantini et al. (2017) determinaron que el genotipo influye en la reversión del color en frutos de zarzamora almacenados a 2°C. El cultivar A-2453 presentó el menor porcentaje de reversión y Ouachita mostró mayor. En este estudio se observaron una correlación negativa de la reversión de color con la firmeza que presentaron los diferentes cultivares de zarzamora. Esto señala que los genotipos con mayor resistencia al daño mecánico mantienen la estructura interna de la célula, lo cual provoca menor incidencia de drupeolas con reversión de color.

Asimismo, Kim et al. (2015) analizaron tres variedades de zarzamora: Natchez, Navaho y Ouachita y observaron que los frutos de la variedad Natchez presentaron mayor reversión de color en comparación con los otros genotipos.

Al igual que en el estudio anterior, la zarzamora Natchez presentó la menor firmeza. Salgado & Clark, (2016) evaluaron los genotipos A-2453, Natchez, Osage y APF-268 y reportaron que, en condiciones de congelación, la variedad A-2453 mostró bajo nivel de reversión de color, en comparación con los otros genotipos.

Yin. (2017) observó que existen diferencias en la reversión de color que presentan los frutos de zarzamora de distintos genotipos. Reportó que la variedad A-2453, PA-45, PA-T y Natchez presentaron los menores cambios, y por el contrario A-2450, APF-268, APF-77 y Ouachita mostraron la mayor reversión. McCoy et al.(2016) evaluaron la reversión de color en distintos genotipos de zarzamora. Con respecto a la variedad APF-77 fue la que mostró mayor porcentaje de drupeolas revertidas, aunque no presentó diferencias con las variedades A-2450, Ouachita y Prime-Ark® Traveler.

No se ha comprobado la relación que existe entre la firmeza y la reversión de color en el fruto, los estudios realizados muestran una correlación opuesta entre ambos parámetros, es decir, entre mayor firmeza menor reversión de color.

2.3.5.1.2 Temperatura de almacenamiento

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 drupeolas 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.

Segantini et al., (2017) evaluaron el porcentaje de drupeolas con reversión de color en frutos almacenados durante 7 días a 2°C y los cambios en la concentración de polifenoles, flavonoides, antocianinas y taninos, no obstante, no se observó incremento en la reversión del color.

2.3.5.1.3 Momento de 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 drupeolas rojas. Yin, (2017) analizó frutos de diferentes cultivares (A-2450, A-2453, APF-77, APF-268, 'Natchez', 'Osage', 'Ouachita', 'Prime-Ark 45' y Prime-Ark Traveler') cosechados en tres momentos del día: 7:00, 12:00 y 16:00 h y observó que la reversión de color 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 diferentes cultivares (A-2453T y A-2450T, Black Magic™/APF-77, Natchez, Ouachita, Osage, Prime-Ark® 45, and Prime-Ark® Traveler) cosechados 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 en el cultivar Ouachita.

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.

2.3.5.1.4 Fertilización con nitrógeno

Se ha reportado que un exceso en los aportes de nitrógeno aumenta la incidencia de reversión de color; Edgley et al., (2019b) 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.

2.3.5.1.5 Transporte

Durante el manejo comercial de los frutos se someten a diferentes operaciones y condiciones que pueden contribuir a la incidencia de la reversión de color, se ha demostrado que las condiciones de transporte pueden alterar su calidad, debido al daño mecánico producido por las vibraciones generadas durante el transporte. Pérez-Pérez et al. (2018) reportaron que el movimiento vibratorio con frecuencia de 10 Hz y amplitud de 0.5 g's indujo reversión de color.

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.

2.4 Posibles mecanismos involucrados en la reversión de color

2.4.1 Efecto de copigmentación

La copigmentación es un fenómeno en el cual los pigmentos y otros compuestos orgánicos incoloros, o iones metálicos, forman asociaciones moleculares o complejas, generando un cambio o un incremento en la intensidad del color (Boulton, 2001). En la ciencia de los alimentos, este fenómeno se considera una interacción muy importante porque el color es uno de los principales factores de calidad en la aceptación de un producto y se ha demostrado que es el mecanismo principal por el cual ciertos colores, particularmente azul, violeta y rojo, se estabilizan y se modulan en flores, hortalizas y frutas (en particular, berries), así como en productos alimenticios derivados de ellos (en particular, vino, pero también mermeladas, purés y jarabes)(Eiro & Heinonen, 2002).

Los copigmentos son sistemas ricos en π -electrones que pueden asociarse con iones de flavilio, que son bastante escasos en electrones. Esta asociación proporciona protección para el ataque nucleofílico del agua en la posición 2 del ion flavilio y por otras especies como peróxidos y dióxido de azufre en la posición 4 (García-Viguera et al., 1999).

Los copigmentos son generalmente incoloros, pero cuando se mezclan con una solución de antocianina, se lleva a cabo una interacción que produce un efecto hipercrómico y un desplazamiento batocrómico en los espectros de absorción (región UV-Vis). Los copigmentos pueden ser flavonoides, alcaloides, aminoácidos,

ácidos orgánicos, nucleótidos, polisacáridos, metales u otra antocianina (Castañeda-Ovando et al., 2009).

La interacción antocianina-copigmento se puede llevar a cabo de cinco maneras diferentes dependiendo de las especies que interactúan (Figura 8) (Trouillas et al., 2016). Si el copigmento es otra antocianina, se forma una auto-asociación o copigmentación intramolecular (Figura. 8A y B); cuando la interacción es con un metal, se lleva a cabo una complejación. (Figura. 8C); en el caso de copigmentos con pares de electrones libres, tiene lugar una copigmentación intermolecular (Trouillas et al., 2016) (Figura. 8D); finalmente, en el caso más complejo, la copigmentación puede ser llevada a cabo por aglicón, azúcar, copigmento y protones, todo al mismo tiempo.

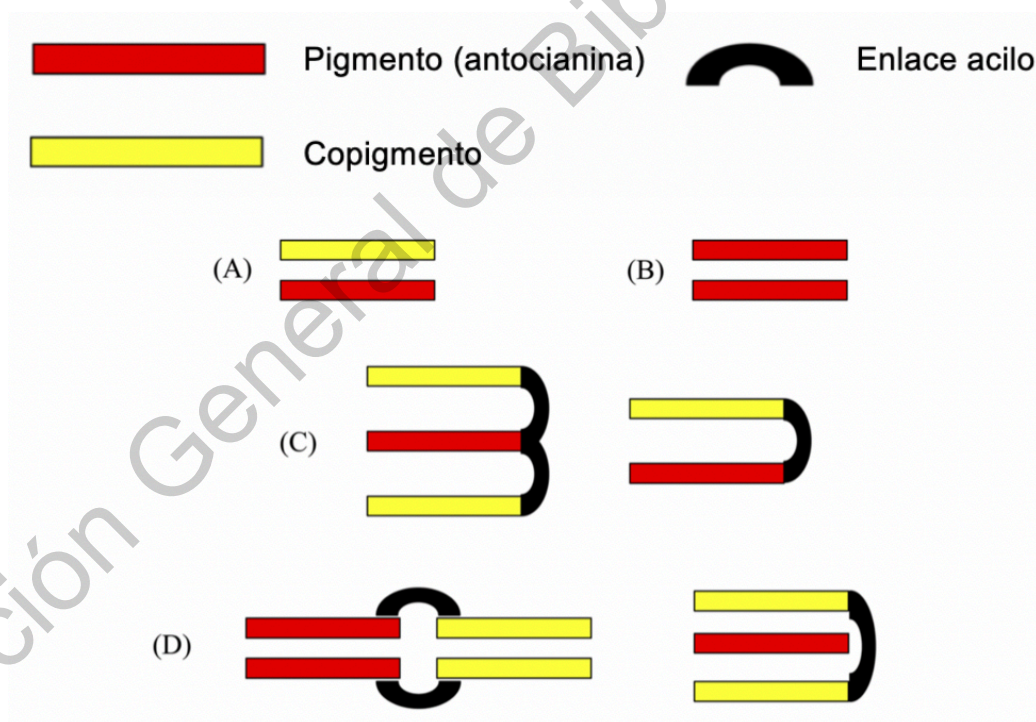


Figura 8. Interacción de antocianinas. (A) autoasociación, (B) copigmentación intramolecular, (C) complejación metálica, (D) copigmentación intermolecular (Trouillas et al., 2016).

Cuando el copigmento es otro compuesto fenólico, la interacción es transitoria debido a la falta de enlaces químicos. Este comportamiento es el resultado de los fenómenos químicos conocidos como formación de complejo de transferencia de carga o π - π interacciones (Trouillas et al., 2016); este fenómeno ocurre cuando los compuestos de carga opuesta interactúan. Por lo tanto, en los anillos unidos por un enlace débil, la densidad electrónica se transfiere del anillo rico al pobre; entonces, como el ion flavilio en la antocianina está cargado positivamente, es un candidato adecuado para la formación de complejos mediante transferencia de carga con sustratos electrónicos ricos (Lee, Durst, & Wrolstad, 2005a).

La copigmentación resultante total se basa en dos efectos (Dangles et al., 1993): Formación del complejo π - π que causa cambios en las propiedades espectrales de las moléculas en el ion flavilio, aumentando la intensidad de absorción (efecto hipercromico) y su cambio de absorción máxima de longitud de onda (cambio batocrómico).

Estabilización del ion flavilio por el complejo π que desplaza el equilibrio de tal manera que el color rojo aumenta (Figura 9). Por lo tanto, la magnitud del efecto de copigmentación depende del pH, porque a bajos valores de pH, todas las moléculas de antocianina están en forma de flavilio, y a valores altos de pH, la antocianina está en su forma pseudobase de carbinol, que es incolora (Trouillas et al., 2016).

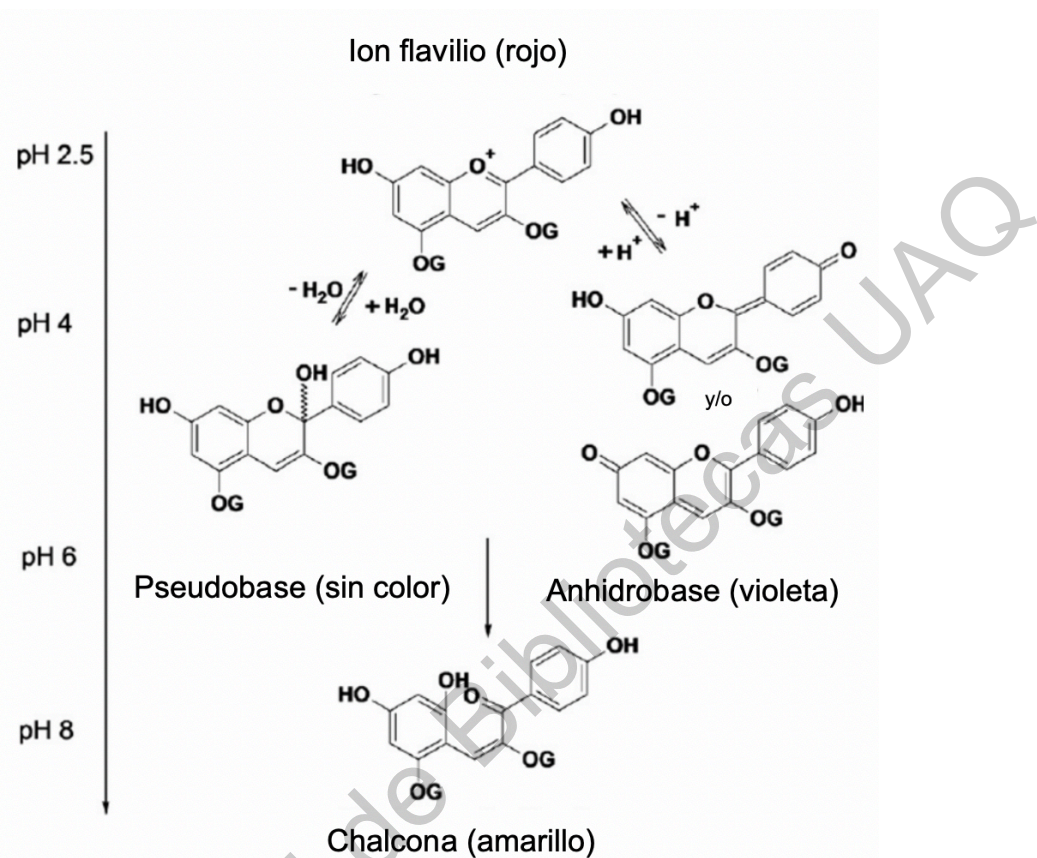


Figura 9. Ejemplo de estabilización de antocianinas mediante la formación del complejo por transferencia de carga (interacción antocianina-compuesto fenólico) (Castañeda et al., 2009).

El efecto de copigmentación es evidente bajo condiciones débilmente ácidas (pH 4-6) donde las antocianinas existen en sus formas incoloras. Recientemente, se ha propuesto que la formación del complejo π π induce las reacciones entre antocianinas y taninos en los vinos, produciendo enlaces covalentes que generan taninos pigmentados (Mirabel et al., 1999). El acoplamiento químico entre antocianinas y taninos no es bien conocido; sin embargo, algunos investigadores han sugerido que el mecanismo implica acetaldehído, taninos y antocianinas (Timberlake & Bridle, 1976); también se han observado reacciones similares entre taninos y flavan-3-oles.

2.4.2 Inclusiones vacuolares de antocianinas

Las antocianinas pueden encontrarse libres dentro de las vacuolas, o pueden estar formando aglomerados dentro de este organelo. En forma de aglomerado pueden ser inclusiones vacuolares de antocianinas (IVA) o antocianoplastos. Las IVA se definen como cuerpos de antocianinas que no se encuentran envueltos por una membrana, (Figura 10) (Kallam et al., 2017; Markham et al., 2000), mientras que los antocianoplastos son cuerpos vacuolares que presentan membrana, por lo que son estables para purificarse (Kallam et al., 2017).

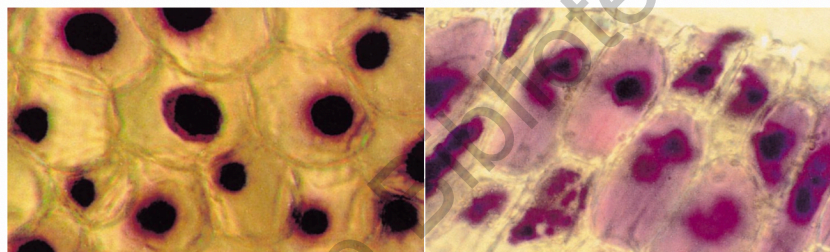


Figura 10. VA en cáscara epidérmica del pétalo *Eustoma grandiflorum* (izquierda), IVA en una cáscara epidérmica de *Dianthus caryophyllus* (derecha) (Markham et al., 2000).

Los aglomerados parecen funcionar como protectores de las antocianinas evitando su oxidación y la pérdida de color, posteriormente son transportadas a la vacuola donde se incorporan y almacenan en estas estructuras (Pourcel et al., 2010).

Cuando se han purificado las IVA, se ha demostrado que están compuestas de diferentes antocianinas seleccionadas, en asociación con proteínas o lípidos específicos. Kallam et al. (2017) y Markham et al. (2000) sugirieron que las antocianinas se secuestran en IVA principalmente para dar un color más intenso. Se ha propuesto que la formación de IVA depende de la acilación de antocianinas, particularmente la cumaroilación. En algunas otras especies, se ha informado que el reclutamiento de antocianinas en las IVA se ve fuertemente influenciado por el grado de glicosilación de las antocianinas, datos que se han relevado del análisis de composición de IVA purificadas (Kallam et al., 2017).

En la mayoría de los ejemplos, los altos niveles intracelulares de antocianinas también están estrechamente asociados con la formación de IVA (Kallam et al., 2017). Diferentes teorías sobre la formación de IVA han surgido de estudios en plantas, donde diversos factores podrían influir en la formación de las IVA. Estos datos pueden sugerir, que también el proceso de reversión de color de zarzamora pudiera estar ligado a alteraciones en la concentración o membrana de las IVA, debido a factores que lo inducen, como el daño mecánico y/o exposición solar.

2.5 Análisis de imágenes como herramienta para estudiar la reversión de color

Los factores que llegan afectar a las frutas y hortalizas pueden cuantificarse visualmente, pero puede resultar complicado, costoso y fácilmente afectado por factores físicos, incluida una evaluación inconsistente y resultados subjetivos. El análisis para criterios de aspecto es una tarea continua; los sistemas de visión artificial son los más adecuados para el análisis convencional y el aseguramiento de la calidad. En la agricultura, el sistema de visión por computadora y el procesamiento de imágenes están en crecimiento en el área de investigación, siendo una técnica de análisis importante para antes y después de la cosecha (Bhargava & Bansal, 2018).

El procesamiento de imágenes tiene diversas aplicaciones en el campo de la agricultura como la identificación de la tierra (Erdenee et al., 2010), reconocimiento de áreas infectadas por plagas, clasificación automática y detección de enfermedades de plantas por su forma, textura y color (Patil & Kumar, 2011). El reconocimiento de patrones basado en la visión por computadora y el procesamiento de imágenes son técnicas desarrolladas para el análisis de seguridad y calidad de diversas aplicaciones agrícolas. La tecnología de visión por computadora corresponde al efecto de la visión humana al inspeccionar la calidad de las frutas y hortalizas al percibir electrónicamente una imagen, interpretar y reconocer los caracteres y esto proporciona información para la clasificación y calidad.

2.5.1 Importancia del análisis de color

Los cinco atributos principales que se utilizan para evaluar la calidad en frutas y hortalizas son color, apariencia, sabor (gusto y aroma), textura y valor nutricional.

El color depende de los pigmentos naturales presentes en ellas, estos incluyen clorofilas (verde), carotenoides (amarillo, naranja y rojo), antocianinas (rojo, azul), flavonoides (amarillo) y betalaínas (rojo). Además, las reacciones de oscurecimiento enzimáticas y no enzimáticas pueden dar como resultado el desarrollo de pigmentos de color marrón, gris y negro (Bhargava & Bansal, 2018).

La apariencia del producto se caracteriza por su forma, tamaño, uniformidad y presencia de defectos. El tamaño y la forma de las frutas y hortalizas están influenciados por la naturaleza del ambiente de cultivo, madurez y la nutrición durante la producción. El brillo es propiedad de los productos para reflejar la luz y se ve afectado por el contenido de humedad y la degradación de cera en la superficie (Mitcham, Cantwell, & Kader, 1996).

El color negro es una cualidad importante en el fruto de zarzamora, además, al procesar imágenes digitales de alimentos, el color es un índice que se utiliza para identificar defectos o para una clasificación cualitativa. Aunque los índices de color absolutos de un objeto solo se pueden obtener en condiciones estándar aplicando dispositivos colorimétricos, las imágenes digitales se pueden usar para la categorización y las comparaciones relativas en las mismas condiciones de iluminación.

Esto se ha utilizado ampliamente en diferentes estudios para separar productos en función de imperfecciones de la superficie (Blasco et al., 2003). La cantidad de color por píxel en la superficie debe medirse para determinar los detalles de las imágenes de los alimentos y evaluar con precisión su calidad (Dan, Azuma, & Kohyama, 2007). El uso de selección manual en la identificación del color requiere un tiempo prolongado y una capacitación constante. Por lo tanto, se deben utilizar algunas herramientas para identificar el color de los alimentos (Yam & Papadakis,

2004). Hoy en día, los espacios de color y los valores numéricos se utilizan para crear y mostrar colores en espacios de dos o tres dimensiones (Mery & Pedreschi, 2005).

El procesamiento digital de imágenes se puede utilizar para factores como forma, tamaño, reconocimiento del color y extracción de textura (Meruliya et al., 2015). Los sistemas de visión artificial pueden controlar la calidad de productos alimenticios debido a la precisión y uniformidad de los procesos de control (Khalife, 2012).

2.5.2 Análisis de parámetros morfométricos en frutos

2.5.2.1 Características morfológicas

Las características morfológicas (tamaño y forma) se utilizan con frecuencia para la clasificación de frutas y hortalizas. En la industria agrícola, el tamaño se relaciona con el precio, por lo tanto, en las etapas de procesamiento, se asignan diferentes grupos de tamaños para su clasificación (Bhargava & Bansal, 2018).

La cuantificación del tamaño se mide utilizando el área proyectada, perímetro, longitud, ancho, ejes mayor y menor. Estas características se utilizan ampliamente en la clasificación automática en industrias. El área calcula el número real de píxeles en la región. El área proyectada se adquiere por píxeles del área. El perímetro es la distancia entre los límites de la región, no importa qué forma u orientación, una vez que el objeto está segmentado, el área y el perímetro son estables y eficientes. Para cuantificar el tamaño se utilizan el largo y ancho. La línea más larga a través del objeto, obtenida por la distancia de cada dos píxeles límite es el eje mayor. La línea más larga dibujada a través del objeto perpendicular al eje mayor es el eje menor. La forma es una característica visual crítica para la descripción del contenido de la imagen que no se puede definir con precisión porque es difícil medir la similitud entre formas (Bhargava & Bansal, 2018).

2.5.1 Análisis textural de imágenes

El análisis de textura de imágenes ha surgido con el propósito de medir de manera cuantitativa los cambios microestructurales de alimentos a partir de imágenes (Quevedo et al., 2008). La textura es un atributo representando por el arreglo espacial en niveles de grises de los píxeles de un objeto o región de interés de una imagen, la cual cuantifica algunas características visuales dentro de la imagen como la rugosidad de objetos (Du & Sun, 2004; Haralick et al., 1973). Hasta el momento, no hay reportes que incluyan el análisis de imágenes de frutos de zarzamora con reversión de color y su comparación con frutos revertidos y estos podrían aportar información importante en el conocimiento de este fenómeno así como una herramienta útil para describir su evolución y posible detección temprana

Bajo los antecedentes señalados, este trabajo estuvo orientado a evaluar los cambios microestructurales asociados al fenómeno de reversión de color inducido por vibración y exposición al sol y correlacionarlos con los cambios en los contenidos de antocianinas y fenoles, así como con el cambio en las dimensiones que determinan la imagen.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Establecer la relación entre los cambios microestructurales de drupeolas y receptáculos con el contenido de antocianinas, fenoles y las propiedades de imagen en frutos de zarzamora revertidos y no revertidos.

3.2 Objetivos específicos

Establecer un modelo de inducción de la reversión de color en frutos de zarzamora (*Rubus* sp.) bajo condiciones controladas.

Identificar y cuantificar, mediante HPLC los cambios en antocianinas y fenoles en drupeolas y receptáculos de zarzamora revertida y no revertida.

Evaluar mediante técnicas de microscopía óptica, los cambios en la microestructura celular de las drupeolas y receptáculos de frutos de zarzamora revertidos y no revertidos.

Describir mediante el análisis de imágenes, los cambios morfológicos en drupeolas y receptáculos durante la reversión de color.

4. METODOLOGÍA

4.1 Estrategia experimental

El trabajo se dividió en dos estudios independientes: en el primero se estudió el fenómeno de reversión de color bajo un modelo de vibración para el cv. 'Tupy', y se evaluó el color, perfil fenólico y microscopia óptica en fresco. En el segundo se estudió el efecto de la exposición solar en la reversión de color en el cv. 'Dasha' (cultivar resistente), donde se evaluó color, perfil fenólico, microscopía óptica y análisis de imágenes.

4.2 Material biológico

El material utilizado fueron frutos de zarzamora (*Rubus sp.*) de la variedad 'Dasha' (patentada por la empresa Driscoll's) tolerante a la reversión de color y el cultivar 'Tupy' considerado como susceptible a la reversión de color. Ambos frutos fueron obtenidos de huertos comerciales ubicados en el municipio de Zamora, Michoacán durante el ciclo de cultivo 2018- 2019.

Los frutos fueron cosechados y colocados en clamshell de 12 oz (190 g) y llevados al laboratorio de Fisiología y Bioquímica poscosecha donde se pre enfriaron a 1°C durante 24 horas.

4.3 Manejo del fruto

Los frutos de zarzamora fueron obtenidos desde las huertas de producción de productores ubicados en el municipio de Zamora, Michoacán, trasladados al laboratorio de Fisiología y Bioquímica Poscosecha de Frutas y Hortalizas de la Universidad Autónoma de Querétaro, primeramente, se verificó la calidad e incidencia de frutos dañados y revertidos en cada empaque (clamshell), sustituyendo aquellos frutos que presentaron reversión o daño debido a que se utilizaron dos modelos de inducción a la reversión de forma controlada.

4.4 Conservación y almacenamiento preliminar

De acuerdo con su estilo típico de empaquetamiento para transporte, grupos de clamshells fueron colocados en cajas de cartón corrugado y posteriormente almacenados a temperatura de (1°C) durante 12 horas, posteriormente se separaron en dos grupos para la obtención del modelo de reversión, y se contó con un grupo control para evaluaciones de variables descritas a continuación.

4.5 Inducción de la reversión por vibración

4.5.1 Mesa de vibraciones portátil

Considerando la necesidad de reproducir escenarios de vibración sinusoidal controlada a masas menores de 0.5 kg con amplitud de aceleración de hasta 1.0 g 's y frecuencias menores a 30 Hz, para simular el patrón más frecuente de la vibración durante el transporte por carretera (Pérez-Pérez et al., 2018), se propuso construir una mesa vibratoria a nivel laboratorio con estas características. Como elementos principales se dispuso de una bocina de audio, un generador de funciones y un visualizador de la señal producida.

En términos generales, una vez acoplados los elementos y sus accesorios, la secuencia para la operación fue generar una señal eléctrica de tipo sinusoidal y amplificarla lo suficiente para producir el movimiento oscilatorio en la bocina, señal verificada visualmente en forma y magnitud.

Como elemento generador de la señal sinusoidal base de vibración, se utilizó un módulo generador de funciones de amplitud y frecuencia variable, como el mostrado en la (Figura 11). Este módulo tiene la capacidad de producir una señal en el intervalo de frecuencia de 1 Hz a 8 MHz, en forma sinusoidal, cuadrada, diente de sierra y triangular, entre las principales. Debido a la baja amplitud eléctrica de la señal producida, se requirió de un amplificador de audio monoaural.



Figura 11. Generador de funciones

Siendo el elemento básico para materializar el movimiento vibratorio, se utilizó una bocina de audio para mediana potencia (350 W), de tipo subwoofer, con el fin de que soportara la vibración producida y la transmitiera hacia el objeto de prueba. Como parámetro de entrada, se estimó que la bocina debía producir un desplazamiento de al menos 5 mm de amplitud, se consideró ser lo suficientemente robusta para soportar dicho desplazamiento.

Con el propósito de verificar la calidad, forma y magnitud de la señal transferida a la bocina, se utilizó un módulo de osciloscopio básico, como el mostrado en la (Figura 12), con un canal de entrada. Este osciloscopio posee un display donde se indican las características generales de la señal que monitorea, además de mostrar los valores característicos de la señal.



Figura 12. Módulo de osciloscopio

Todos los componentes fueron colocados en una caja de madera, estimado para que soportara la vibración que se pudiera aplicar a la prueba, que se colocaría sobre el cono de la bocina. Una vista general de la mesa resultante se presenta en la (Figura 13).

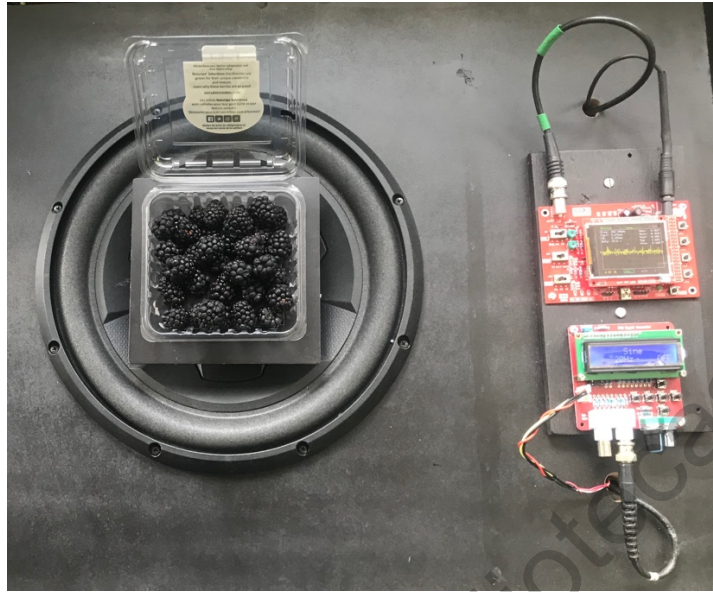


Figura 13. Mesa generadora de vibraciones

Sobre la caja se adaptaron espacios para colocar la fuente de energía y elementos necesarios para la alimentación y conexión eléctrica. Para garantizar el adecuado funcionamiento y evitar el calentamiento (ver anexo A1).

4.6 Evaluación objetiva del color

En frutos de zarzamora revertidos y no revertidos (control) se realizaron mediciones de color de cinco frutos por clamshell, tomando tres mediciones de forma ecuatorial, abarcando la mayor cantidad de área del fruto, se utilizó un equipo Minolta Osaka-Light source D65 CM 2002, previamente calibrado sobre una superficie blanca. Este equipo registra los valores de color L^* , a^* y b^* que representan las coordenadas de color en un espacio tridimensional el cual está representado por tres ejes perpendiculares entre sí (X,Y y Z) y donde L^* se ubica en el eje "Z" y representa luminosidad del color; los valores dentro del intervalo que varía desde el color negro=0 al blanco=100, el valor a^* se ubica en el eje "X" y representa los valores del color que varían desde el verde (a^* =negativos) hasta el rojo (a^* = positivos), mientras que el valor b^* se ubica en el eje "Y" y representa los

colores que varían desde el azul (b^* = negativo) hasta el amarillo (b^* =positivo). Con los valores de a^* y b^* se obtienen los valores para el ángulo Hue, los cuales están en el rango de 0 a 360°, donde 0° = rojo, 90°= amarillo, 180°= verde, y 270 ° = azul puros; además se obtiene el valor de croma intensidad del color (C^*), que representa la cantidad de color; valores altos de C^* representa un color más intenso (Cesa et al., 2017; Edgley., et al., 2019; Mazur et al., 2014) (Figura 14).

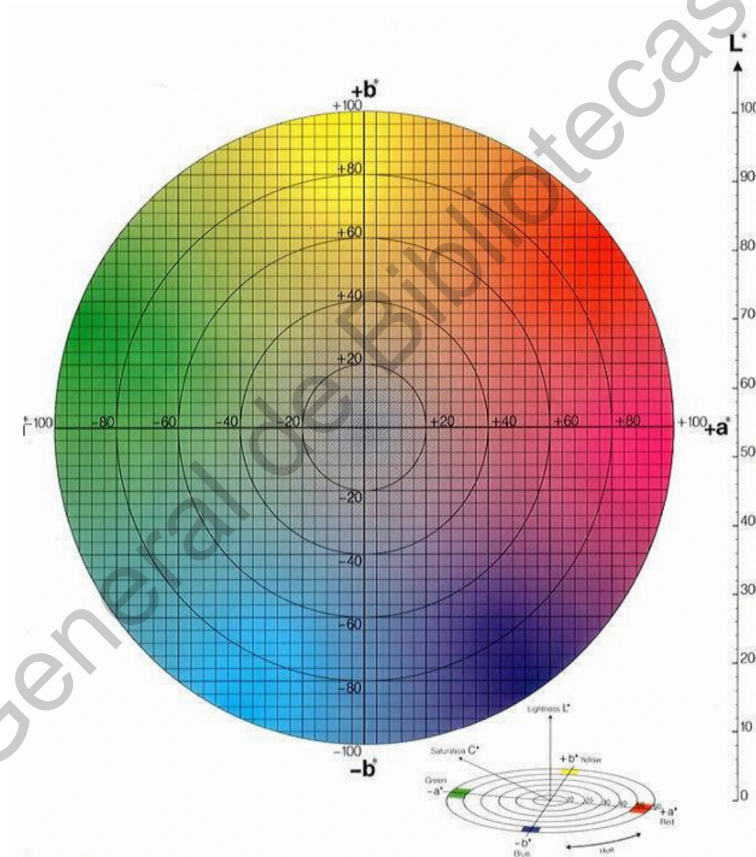


Figura 14. Espacio de color CIELAB.

La diferencia total de color (ΔE) para frutos revertidos y no revertidos se pudo determinar usando la siguiente ecuación:

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

Donde:

$$\Delta L^* = L^* - L^*_0$$

$$\Delta a^* = a^*_0$$

$$\Delta b^* = b^* - b^*_0$$

Siendo L^*_0 , a^*_0 , b^*_0 los valores de parámetros de color para frutos no revertidos

4.7 Análisis de compuestos fenólicos

4.7.1 Extracción de compuestos fenólicos

La extracción de los compuestos fenólicos de zarzamora se llevó a cabo siguiendo la metodología propuesta por (Moo Jung Kim et al., 2015) con ligeras modificaciones: cinco gramos de drupeolas y receptáculo congelado no revertido y revertido, se diluyeron con 25 ml de metanol acidificado (ácido fórmico: metanol: agua destilada, 0.1:80:19.9, v/v/v), la muestra se homogenizó por un minuto en Ultra Turrax (T-25) y se colocó en agitación por una hora a temperatura ambiente en una placa agitadora (Thermo Scientific), posteriormente el extracto se centrifugó en un equipo marca Hermle (Z326K) con las siguientes condiciones: 13,500 rpm/10 minutos/ 4°C.

El sobrenadante se filtró y al precipitado se le realizó una segunda extracción con 20 ml de metanol acidificado, una agitación posterior en vórtex (Daigger Genie 2) por 1 minuto y una centrifugación a las mismas condiciones mencionadas anteriormente, el sobrenadante se filtró y se combinó con el de la primera extracción para ser llevado a concentración hasta 3 ml en un rotavapor (Buchi R-205) a 40°C de temperatura. El extracto se almacenó a -20°C hasta el momento de su análisis.

4.7.2 Extracción de compuestos fenólicos enlazados

Los compuestos fenólicos enlazados en muestras de zarzamora se extrajeron de acuerdo con el método utilizado previamente por (Moo Jung Kim et al., 2015) y con ligeras modificaciones en nuestro laboratorio. Después de la extracción de compuestos fenólicos libres, el residuo se digirió con 10 ml de

hidróxido de sodio 2 M en un baño de agua a 95°C durante 30 minutos. Finalmente, la muestra se agitó durante 1 hora adicional a temperatura ambiente. La mezcla se acidificó (pH <2.0) con 2 ml de ácido clorhídrico y se extrajo con hexano para eliminar los lípidos. La solución final se extrajo cinco veces con 10 ml de acetato de etilo para cada extracción. La fracción de acetato de etilo se combinó y se evaporó a sequedad a vacío a 35°C. Los compuestos fenólicos unidos se reconstituyeron en 2 ml de metanol-agua (50:50, v/v) para mejorar la solubilidad de los compuestos y tener una solución clara y homogénea (Mora-Rochin et al., 2010).

4.7.3 Extracción de compuestos fenólicos solubles conjugados

Los compuestos fenólicos conjugados solubles en cada muestra de zarzamora se obtuvieron de extractos fenólicos libres de acuerdo con los métodos (Moo Jung Kim et al., 2015). Brevemente, el extracto de fenoles libres (0.5 ml) se digirió con 2 ml de hidróxido de sodio 2 M durante 1 hora a temperatura ambiente. La mezcla se acidificó (pH <2.0) con 2 ml de ácido clorhídrico 2 M y se extrajo con hexano para eliminar los lípidos. Finalmente, la solución se extrajo cinco veces con 2 ml de acetato de etilo para cada extracción. Las fracciones de acetato de etilo se agruparon y se evaporaron a sequedad a vacío a 35°C. Los compuestos fenólicos conjugados solubles se reconstituyeron en 2 ml de metanol- agua (50:50, v/v) para mejorar la solubilidad de los compuestos y tener una solución clara y homogénea (Mora-Rochin et al., 2010).

4.8 Cuantificación de antocianinas monoméricas totales

De acuerdo con el método oficial AOAC 2005.02. El contenido de pigmento de antocianina monomérica total de jugos de frutas, bebidas, naturales, colorantes y vino, se evalúa por el método de pH diferencial (aplicable a la determinación de antocianinas monoméricas en jugos de frutas, bebidas, colorantes naturales y vinos dentro del rango de 20-3000 mg/L como equivalentes de cianidina-3-glucósido)(Lee et al., 2005).

Principio

El principio del método se basa en que los pigmentos de antocianina monoméricos cambian de color reversiblemente con un cambio en el pH; la forma coloreada de oxonio existe a pH 1.0, y la forma hemiacetal incolora predomina a pH 4.5. La diferencia en la absorbancia de los pigmentos a 520 nm es proporcional a la concentración de pigmento. Los resultados se expresan sobre una base de cianidina-3-glucósido. Las antocianinas degradadas en forma polimérica son resistentes al cambio de color independientemente del pH y no se incluyen en las mediciones porque absorben a pH 4.5 además de pH 1.0. El medidor de pH será de la marca HANNA instruments y se calibrará con soluciones buffer estándar de pH 4.0 y 7.0.

La determinación de la absorbancia de porción de la prueba diluida con amortiguador de pH 1.0 y de pH 4.5, es a 520 y 700 nm. Las porciones de prueba diluidas se leen frente a una celda en blanco de agua destilada. Y se mide la absorbancia dentro de los 20-50 minutos de preparación. La concentración de pigmento antocianina, se expresa como equivalentes de cianidin-3-glucósido, usando la siguiente ecuación:

Pigmento de antocianina (equivalentes de cianidina-3-glucósido, mg / L) =

$$\frac{AxPMxFDx10^3}{e x l}$$

donde A = (A_{520nm} - A_{700nm}) pH 1.0 - (A_{520nm} - A_{700nm}) pH 4.5; PM (peso molecular) = 449.2 g/mol para cianidin-3-glucósido (cyd-3-glu); FD = factor de dilución establecido en D; l = longitud de trayectoria en cm; e=26900 coeficiente de extinción molar, en L x mol⁻¹ x cm⁻¹, para cyd-3-glu; y 10³ = factor para la conversión de g a mg.

4.9 Análisis del perfil de compuestos fenólicos por HPLC-DAD

El análisis del perfil de compuestos fenólicos se realizó según lo reportado por (Mazur et al., 2014) y con el método desarrollado en nuestro laboratorio. Los compuestos se separaron utilizando un sistema HPLC (Water Alliance 2695 con detector de arreglo de diodos Water 2998). Para la integración de picos se recurrió al software Empower 3 de la marca Waters. Se utilizó una columna Simmetry C18 fase reversa 9100 x 4.6 mm) con una fase móvil compuesta por: solvente A (agua HPLC acidificada con ácido fórmico al 0.1 %) y solvente B (acetoneitrilo y grado HPLC). La elución se llevó a cabo con las condiciones descritas en el (Cuadro 4). El flujo se mantuvo a 0.5 ml/min y se inyectaron 30 μ l del extracto fenólico concentrado previamente filtrado con un filtro de jeringa de 0.4 μ l de diámetro de poro. La temperatura de la columna se mantuvo a 35°C y la muestra a 8°C durante todo el análisis.

Las antocianinas se detectaron a 520nm y fueron identificadas mediante la comparación del tiempo de retención y los datos espectrales UV-VIS obtenidos por la inyección previa del estándar certificado de la antocianinas cianidina-3 glucósido de la marca SIGMA, el contenido es expresado como mg equivalentes de cianidina 3-glucósido sobre 100 gramos de peso fresco (mg eq cianidina 3-glu/100 g de PF), la curva estándar se construyó a partir de una solución stock (1 mg/ml) en metanol (Koponen et al., 2007).

Cuadro 4. Gradiente de separación de compuestos fenólicos por HPLC.

Tiempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0	98	2
40	80	20
50	0	100
55	98	2
60	98	2

4.10 Estudios anatómicos microestructurales

Se recolectaron muestras en fresco de drupeolas y receptáculos tanto revertidas como no revertidas de fruto de zarzamora cultivar Dasha (Cuadro 5). Con ayuda de una navaja de dos filos se cortaron manualmente las drupeolas y el receptáculo evitando romper o dañar la parte a analizar.

Cuadro 5. Muestras utilizadas para estudios microestructurales.

Tejido	No revertidas	Revertidas
Drupeolas	7	7
Receptáculos (pelados)	3	3
Receptáculos	2	2

4.10.1 Análisis histológicos

Primeramente, para la obtención de cortes histológicos fue necesario respetar la orientación de los tejidos, usando porciones pequeñas de 1 o 2 cm y asimismo se utilizaron navajas afiladas para evitar que quedaran bordes.

Para la evaluación de los cortes por microscopía óptica. Las muestras de siete drupeolas y receptáculos no revertidas y revertidas se fijaron con FAA (formaldehído, etanol 96 v/v, ácido acético glacial y agua destilada) durante 48 horas (Gómez-Nucamendi., 2016) y se deshidrataron usando ocho series de etanol y alcohol terbutílico. (TBA) a diferentes porcentajes durante 5 horas para cada serie. Luego, el tejido se embebió en parafina 48 h antes de seccionar (Gómez-Nucamendi et al., 2016). Se realizaron cortes histológicos de diez micras en un micrótomo giratorio y se tiñeron con safranina/ verde rápido y negro azul naftol (Soriano-Melgar et al., 2019).

4.10.2 Fijación del tejido

Los fijadores deben matar el tejido rápidamente para evitar el deterioro por metabolismo sub-vital y así mantener la estructura celular y evitar los cambios de posición o de relación. El fijador utilizado fue el FAA (Cuadro 6) que está formado por:

Cuadro 6. Solventes utilizados para solución fijadora.

Solvente	Cantidad
Formol comercial	10 cc
Agua destilada	35 cc
Ácido acético glacial	5 cc
Alcohol	50 cc

4.10.3 Deshidratación del tejido

Una vez fijado el material fue necesario retirar el agua de cada uno de los tejidos y reemplazar ésta con un líquido en el que la parafina fuera soluble. La deshidratación se llevó a cabo por medio de una serie de alcoholes (etílico, EtOH), y el líquido en el que se solubilizó la parafina fue alcohol terbutílico (TBA), aunque también se pueden utilizar xileno, formol o algún aceite esencial. Estos cambios se realizaron de forma gradual, por lo que se hizo una serie con diferentes concentraciones (Cuadro 7). A la última solución se le añadió safranina-O para teñir el material (Kaur et al., 2019) y este a su vez poder acomodarlo en la parafina. Las soluciones necesarias se prepararon con las siguientes cantidades (mL).

Cuadro 7. Soluciones utilizadas para deshidratación del tejido.

Concentración	Agua	ETOH95%	TBA	EtOH 100%
50	50	40	10	0
70	30	50	20	0
85	15	50	35	0
95	0	45	55	0
100	0	0	75	25

Primeramente, se colocó en el material a deshidratar durante dos horas para cada cambio, y se dejó. a una concentración de 70% dos horas durante 12 horas, después del cambio de 100% se realizaron tres cambios de TBA puro de dos horas cada uno, y finalmente el ultimo cambio se llevó al frasco de parafina y se dejó en el horno para que el TBA restante se evaporara, así permaneció 12 horas y pasado este tiempo se reemplazó con parafina pura (Paraplast, SIGMA)(Kaur et al., 2019).

Una vez reemplazado en parafina pura se hizo uso del equipo dispensador de parafina (Leica EG1150 H), aquí se colocó cada muestra en un cassette de inclusión con su respectiva tapa para posteriormente ser llenado de parafina y automáticamente puesto en la placa fría manteniéndola a temperatura constante de -5°C con el equipo (Leica EG1150 C). Se dejó enfriar por una hora y se retiró del cassette para obtener un cubo. Ese cubo ya se encontraba listo para ser cortado con el micrótopo manual de rotación (Leica RM2235), las drupeolas y receptáculos no revertidos y revertidos respectivamente, fueron cortados a 10µm cada uno, y cada corte fue puesto en un baño de tejidos - (lighted tissue flotation bath model 145700) y después fue colocado en el portaobjetos para realizar la tinción del corte.

4.10.4 Tinción de cortes histológicos en safranina y verde rápido

Para llevar a cabo la tinción de cortes histológicos en safranina y verde rápido se removió la parafina con diferentes porcentajes de alcohol y para esto

primeramente se llevó a alcohol 50%, y posteriormente, 10 minutos en cada una, empezando por sustituto de xileno; sustituto de xileno; alcohol absoluto; alcohol 95%; alcohol 70%; alcohol 50%. Posteriormente la tinción en safranina-O por 15 minutos en microondas a potencia lenta en baño maría. Y se sumergió y retiró rápidamente de 10-12 veces en agua de la llave; reposo por 2-5 minutos en ácido crómico; enjuague con agua de la llave (Gómez-Nucamendi et al., 2016).

Posteriormente, se sumergió y retiró un total de seis veces en alcohol 70%; alcohol 90%; alcohol absoluto; se puso tres segundos en verde rápido, se dejó escurrir 5 segundos; alcohol absoluto; solución aclaradora por 10 minutos; dejó por 2 minutos en sustituto de xileno y 10% en alcohol absoluto; posteriormente en xileno por 15 minutos; y en una nueva solución de xileno por 15 minutos; finalmente se montó.

Finalmente, para montar se utilizaron portaobjetos de (25 x 75 mm) y crubeobjetos de (20 x 40 mm), se utilizó sustituto de xileno para pegar y secar los cortes histológicos, los cuales se dejaron una semana en una estufa a una temperatura de 60°C, transcurrido ese tiempo se retiraron de la estufa y se lijaron para quitar los restos de xileno y finalmente, se realizaron las observaciones al microscopio de cada parte del fruto de zarzamora (drupeolas y receptáculos).

Las micrografías se observaron bajo el microscopio Olympus Bx43, Olympus U-TV1x-2, T7 Tokyo, Japan con el software Q-Capture/PRO-7, Q imaging. Las medidas de los tejidos de las drupeolas y receptáculos se tomaron en diferentes lugares en cada sección transversal y se determinaron los siguientes parámetros:

- Circularidad
- Diámetro de Feret
- Área
- Segundo momento angular
- Contraste
- Diferencia del momento inverso
- Entropía

- Dimensión fractal
- Correlación

La safranina tiñe de rojo las paredes lignificadas, el verde rápido tiñe la pared primaria de verde claro.

4.11 Sistema de Visión por Computadora

Para la evaluación de los cambios estructurales se capturaron 2 imágenes (1 cada 180°) de cada zarzamora mediante un sistema de visión por computadora, que cuenta con un sistema de iluminación rectangular de lámparas fluorescentes de (TL-E 32 W/54 RS Cool daylight, Philips, México), con difusores para proveer una iluminación homogénea, similar a lo descrito por (Blasco et al., 2009; Blasco et al., 2007; ElMasry et al, 2007; Vélez-Rivera et al., 2014). Los ajustes de la cámara Rebel T7i Canon Inc, Japan) fueron; modo manual, sin zoom ni flash, exposición 0.0. Un total de 100 imágenes fueron capturadas en el espacio de color RGB de 24 bits en el formato JPEG y fueron almacenadas en formato TIFF con un tamaño 6000 x 3368 píxeles.

4.11.1 Segmentación

De las imágenes obtenidas con las diversas técnicas de captura fueron utilizadas para obtener parámetros de forma, tamaño y textura mediante la metodología de análisis de imágenes, utilizando el software ImageJ 1.46r (National Institutes Health, Bethesda, MD, USA) (Aguilera, 2005; Arzate-Vázquez et al., 2011; Cubero et al., 2010; Mery et al., 2010; Vélez-Rivera et al., 2014).

4.11.2 Análisis de imágenes

A partir de las imágenes de cada perfil de los frutos se realizó una segmentación cambiando a formato binario de 8 bits seleccionando un nivel de

grises (de 55 ± a 255) que permitió la segmentación de la zarzamora y la extracción del fondo utilizando la herramienta “wand tracing” para la extracción de parámetros morfométricos.

Para la extracción de los parámetros texturales se siguió la metodología propuesta por (Arzate-Vázquez et al., 2011). A partir de las imágenes binarias de 8 bits se seleccionó una región de interés (ROI) en el centro de la zarzamora con un tamaño de **FALTA**. Finalmente fueron almacenadas en formato TIFF. El Cuadro 8 muestra el número de imágenes obtenidas para la caracterización morfométrica del grupo control y del grupo problema durante el experimento de reversión. El pre procesamiento de estas imágenes se realizó según lo descrito anteriormente.

Cuadro 8. Imágenes obtenidas para caracterización morfométrica y textural del fruto de zarzamora.

Estudio para la caracterización del fruto de zarzamora revertida y no revertida	Número de muestra
Frutos no revertidos	25
Número de captura por fruto	2
Imágenes RGB obtenidas para el procesamiento	50
ROI's obtenidas para caracterización textural	50
Frutos revertidos	25
Número de captura por fruto	2
Imágenes RGB obtenidas para procesamiento	50
ROI's obtenidas para caracterización textural	50
Total de imágenes para caracterización morfométrica y textural	200

4.12 Observaciones microscópicas

4.12.1 Estéreo microscopía

Las zarzadoras fueron cortadas por la mitad con una navaja de manera longitudinal. 10 receptáculos revertidos y no revertidos fueron observados por el estereomicroscopio (Celestron InfiniView™ LCD Digital Microscope, EE. UU.). Las adquisiciones de las imágenes se realizaron a través del software Celestron Portable Capture Pro-acoplado a una computadora personal Macbook Pro-13 inch, Mid (2012), EE. UU mediante una interfaz de conexión (cable USB2.0). La resolución de las imágenes fue de 640 X 4800 pixeles en RGB y almacenadas en formato TIFF.

De las imágenes en RGB obtenidas por estereomicroscopio de la vista superior de los receptáculos se seleccionó en la parte central una ROI de (pixeles) para la determinación del color en los espacios HSB y CIELAB con el plugin “color space converter” tal como lo menciona Vélez-Rivera et al.,(2014).

Posteriormente se realizó una segmentación manual del receptáculo completo extrayéndolo del resto de la imagen usando la herramienta “angle tool” y fueron guardadas en formato TIFF. Se convirtieron a formato de escala de grises seleccionando un nivel de grises (de 55 ± 1 a 255), lo que permitió la extracción de parámetros texturales.

El Cuadro 9 recopila la cantidad de imágenes que se obtuvieron para la caracterización colorimétrica y textural de los receptáculos en el fenómeno de reversión.

Cuadro 9. Imágenes obtenidas para caracterización colorimétrica y textural de receptáculos en el fenómeno de reversión.

Estudio para la caracterización de receptáculo revertido y no revertido	Número de imágenes
Receptáculos no revertidos	10
Captura por receptáculo	1
Imágenes RGB obtenidas para procesamiento	10
ROI's obtenidas para caracterización colorimétrica	10
Receptáculos revertidos	10
Captura por receptáculo	1
Imágenes RGB obtenidas para procesamiento	10
ROI's obtenidas para caracterización colorimétrica	10
Total de imágenes para caracterización colorimétrica y textural	40

4.12.2 Microscopía óptica

Las imágenes adquiridas a 10X de las muestras teñidas con verde rápido fueron utilizadas para medir parámetros de forma y tamaño de las células del receptáculo y la pulpa de las drupeolas de la zarzamora. De las imágenes se realizó una segmentación manual que permitió separar las células del fondo de la imagen. Finalmente, los parámetros se determinaron por la herramienta “*Analyze particles*” del Software Image J 1.46r. 80 campos fueron analizados con un total de 715 células para drupeolas y receptáculos no revertidas y revertidas.

Las imágenes binarias también fueron utilizadas para la estimación de parámetros de textura con el algoritmo de matriz de coocurrencia en escala de grises. Energía, contraste, correlación, homogeneidad y entropía fueron los parámetros calculados con el plug-in GLCM Texture con una distancia de separación entre píxeles $d = 1$ y una dirección $\theta = 0^\circ$. Se estimó la dimensión fractal con el plug-in SDBC a las

imágenes en escala de grises. Tal como lo menciona (Arzate-Vázquez et al., 2011; Pérez-Nieto et al., 2010; Quevedo et al., 2008). Una explicación acerca de la estimación de la dimensión fractal y los parámetros de textura fueron detallados anteriormente.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Cambios comparativos del color

5.1.1 Evaluación de modelos de inducción de reversión de color

El contar con un modelo experimental que induzca la reversión de color es importante porque facilitará el estudio del fenómeno. Los reportes publicados sobre la reversión de color analizaron frutos revertidos de manera natural, donde no se indica el factor que propició el cambio de color ni en qué momento ocurrió. Esto implica que probablemente algunos de los cambios en la composición pueden ocurrir después de la reversión de color. Se sabe que algunos factores inducen pre y poscosecha inducen la reversión de color, entre ellos los niveles de aplicación de nitrógeno, los daños mecánicos como la vibración durante el transporte o la exposición al sol de los frutos después de la cosecha son algunos de los principales factores que lo inducen. A este respecto, la vibración y la exposición al sol, son factibles reproducir en el laboratorio y por lo tanto de monitorear los cambios después de su inducción y compararlos con frutos no inducidos o procedentes de variedades tolerantes a este fenómeno.

Como se mencionó en la metodología, este trabajo evaluó la inducción de la reversión de color a través de la vibración y de la exposición al sol en dos variedades de zarzamora con diferente tolerancia a la reversión de color; la variedad 'Tupy' (susceptible) y la variedad 'Dasha' (tolerante).

Los frutos de zarzamora 'Tupy' fueron sometidos a vibración a 10 Hz y 0.5g durante 5 y 10 min y estos se compararon con frutos control no vibrados. Después del tratamiento, se midieron los valores de color CIELAB. La Figura 15 muestra la diferencia visual entre frutos de zarzamora cv 'Tupy' sin vibrar y vibrados a 10 Hz y 0.5 g durante 10 minutos; los frutos sometidos a dicho tratamiento muestran una clara evidencia de la reversión de color. Los experimentos de vibración aplicados a la variedad 'Dasha' no son reportados debido a que esta variedad sometida a las

condiciones de vibración señaladas destruía el fruto. Aunque es interesante señalar que el fruto no se revertía aún después de haberse inducido el daño mecánico.

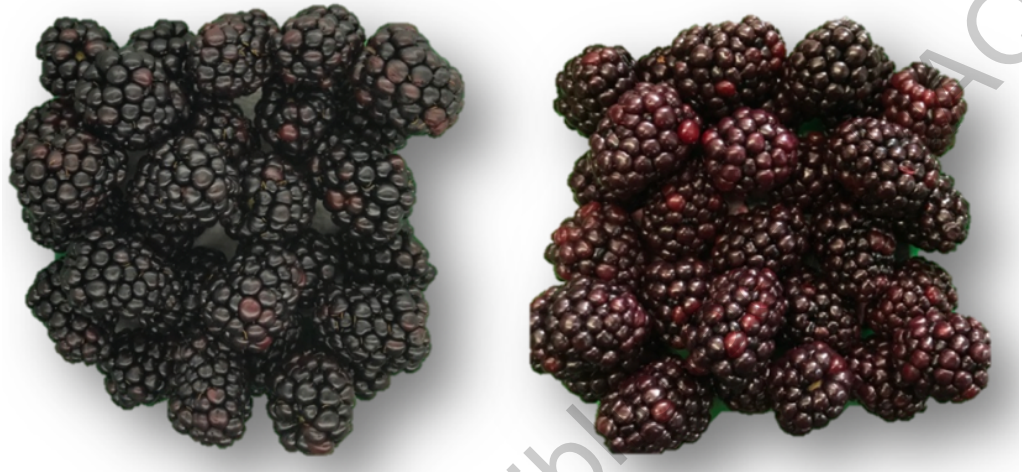


Figura 15. Frutos de zarzamora 'Tupy', control (izquierda) y sometida a vibración a 10 Hz y 0.5g durante 10 minutos (derecha).

Las diferentes réplicas de ese experimento de vibración con frutos de la variedad 'Tupy' fueron llevados a cabo y se midió los valores de color L^* , a^* , b^* , hue y C^* de cada una de las muestras. Los datos se compararon estadísticamente con el control; el Cuadro 10 muestra la comparación de medias de los datos obtenidos, todos los valores de color de los frutos control fueron estadísticamente menores en los frutos control respecto de los frutos revertidos por vibración. Así mismo se observó que los frutos sometidos por 10 minutos de vibración mostraron los valores de color más altos; un valor más alto de L^* señala que las muestras son más claras o de mayor luminosidad. El valor de a^* , que señala los cambios en el color del verde (a^* =negativos) al rojo (a^* = positivos), también mostró valores más altos en los frutos vibrados por 10 min indicando un color rojo. Los valores de b^* , hue y cromaticidad, también fueron mayores en los frutos vibrados, señalando un color más amarillo, un matiz ubicado en primer cuadrante del diagrama de color a^*b^* y un croma o tono de color mayor que ubica a las muestras en regiones de color más alejadas respecto del tono mostrado por las muestras control.

De manera lógica el análisis de diferencia de color (ΔE^*), un parámetro que señala que tan diferente es una muestra respecto de las muestras control, indicó valores más altos para los frutos vibrados por 10 minutos, mientras que los frutos vibrados por 5 minutos mostraron valores menores.

Cuadro 10. Comparación de medias de los valores de color en frutos de zarzamora Tupy sometidos a vibración a 10 Hz y 0.5g por 5 y 10min.

Parámetros	Control	5 minutos	10 minutos
L*	18.01±1.10 ^c	20.57±1.35 ^b	23.03±1.35 ^a
a*	0.91±0.21 ^c	8.29±2.58 ^b	10.58±3.02 ^a
b*	-0.27±0.2 ^c	2.12±0.84 ^b	2.83±1 ^a
h	-0.30±0.19 ^b	0.24±2.6 ^a	0.25±3.17 ^a
C	0.97±0.22 ^c	8.56±0.04 ^b	10.95±0.03 ^a
Delta E		8.25±2.76 ^b	11.34±3.38 ^a

Filas con la misma letra señala diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$).

En la literatura no existen reportes que muestren el uso de los valores de color como herramientas para evaluar los niveles de este fenómeno en estos frutos. Los resultados descritos en este trabajo parecen señalar un potencial uso de esta herramienta para describir los niveles de reversión. Pérez-Pérez et al., (2018), evaluó tiempos de vibración de 10 y 30 minutos observando un cambio de color directamente proporcional al tiempo de exposición, aunque no midió el cambio de color de forma objetiva.

Los datos recabados en este estudio permitieron señalar que la mesa de vibración diseñada para reproducir el perfil de movimiento vibratorio de un transporte de zarzamora (Anexo A1) fue un instrumento útil para reproducir la reversión de color inducida por vibración a nivel de laboratorio.

Los datos de color permitieron establecer que la reversión de color, inducida por vibración, puede ser evaluada diferencialmente mediante la medición de los valores de color.

La variedad 'Dasha', resistente a la reversión de color por vibración, pero sensible a la luz directa del sol, cuando se expuso por 2 horas al sol no presentó reversión de color ni mostró diferencias en los valores de color; no obstante, en los frutos expuestos por 5 horas, se observó desarrollo de reversión de color y por ello también mostró diferencias en todos los parámetros, excepto el valor de L^* (Cuadro 11). Durante ese tiempo, se incrementó el valor de a^* (de 0.65 a 3.70) indicando un cambio del color negro de los frutos hacia los tonos rojos. En esta misma condición de estudio, el valor de b^* , cambió de valores ubicados en el azul hasta valores ligeramente amarillos; los valores de hue muestran el cambio en el espacio de color desde el cuarto cuadrante (colores azules), en la fruta sin reversión, hacia el primer cuadrante (colores rojos) en los frutos revertidos; también el valor de cromaticidad o C^* muestra la ubicación del tono de color más alejado respecto del mostrado por los frutos control que estuvieron ubicados cerca del centro del espacio de color.

Los valores de diferencia de color, ΔE , respecto de los frutos no revertidos fueron estadísticamente diferentes y registraron valores de 1.72 y 3.94, para los frutos expuestos por 2 y 5 horas a la luz directa del sol respectivamente. Estos datos también señalan que la reversión de color inducida por irradiación solar también puede ser evaluado cuantitativamente por la evaluación objetiva del color.

La observación de los datos de color para ambas variedades y factores de inducción de la reversión de color (Cuadros 10 y 11), parecen indicar que la vibración promueve mayores cambios en el color de los frutos en comparación con la reversión inducida por la exposición directa a la luz del sol.

Cuadro 11. Comparación de medias de los valores de color en frutos de zarzamora cv. Dasha expuestos a luz directa del sol por 2 y 5 horas

Parámetros	Control	2 horas	5 horas
------------	---------	---------	---------

L*	18.75±0.87 ^a	18.76±1.3 ^a	19.62±1.94 ^a
a*	0.65±0.2 ^b	1.46±1.4 ^b	3.70±3.2 ^a
b*	-0.12±0.25 ^b	0.10±0.37 ^b	0.65±0.98 ^a
h	-0.19±0.4 ^c	-0.01±0.26 ^{bc}	12±0.14 ^{ab}
C	0.71±0.2 ^b	1.50±1.4 ^b	3.79±3.4 ^a
Delta E		1.72±1.42 ^b	3.94±3.5 ^a

Filas con la misma letra señala diferencias estadísticas significativas (p <0.05).

Los anteriores resultados indicaron que la reversión de color inducida por vibración y la exposición directa al sol, en las condiciones evaluadas, puede ser evaluada cuantitativamente mediante la medición de los valores de color y que estas mediciones también pueden dar una idea de la magnitud de la reversión de color asociada al nivel de intensidad del factor de inducción. No obstante, la evaluación objetiva del color no da información del mecanismo por el cual ocurre el fenómeno. Probablemente, el mayor grado de reversión de color en la zarzamora 'Tupy' indique que el cambio de color inducido por vibración desencadene reacciones en el fruto que produzcan en corto periodo de tiempo la reversión de color, o bien, que la composición de esta variedad facilite las condiciones para que dichas reacciones se lleven a cabo.

La utilidad de la evaluación objetiva de la reversión de color mediante los valores de color, en ambas variedades y factores de inducción, deberá ser soportado con datos de los cambios de composición en el contenido de fenoles antocianinas y de la microestructura de los tejidos. Por ello se decidió tomar como materiales de estudio para realizar estas determinaciones los frutos de zarzamora 'Tupy' vibrados por 10 minutos a 10 Hz y 0.5g y los frutos de la variedad 'Dasha' expuesta por 5 horas a la luz directa del sol.

5.2 Cambios en el contenido de antocianinas monoméricas

En los trabajos anteriores desarrollados en el laboratorio, se analizaban los frutos en su conjunto (receptáculo y drupeolas); en este trabajo se observó que el receptáculo de frutos revertidos muestra una coloración roja diferente a la coloración mostrada por los receptáculos de los frutos no revertidos (Figura 16). Esta observación es importante, pues señala que, en el proceso de reversión de color, el receptáculo contribuye en el proceso, pero su participación no se ha evaluado.



Figura 16. Corte longitudinal de frutos de zarzamora cv 'Tupy' no revertida (a) y revertida. Mostrando los cambios que sufre el tejido del receptáculo durante la reversión de color.

Para estudiar con mayor detalle los cambios que ocurre en la composición del fruto de zarzamora posterior a la reversión de color, se analizó por separado la drupeola y el receptáculo, componentes principales del fruto.

El (Cuadro 12) muestra el contenido de antocianinas monoméricas de drupeolas y receptáculos revertidos y no revertidos en ambos cultivares de zarzamora. Tanto en Tupy (revertida por vibración) como en Dasha (revertida por exposición al sol) no se encontraron diferencias entre drupeolas revertidas y no revertidas, esto indica que la causa que provoca la reversión de color no es una disminución en el contenido de antocianinas, como lo reportan (Edgley, Close, Measham, et al., 2019; Moo Jung Kim et al., 2015; Pérez-Pérez et al., 2018), sino que podría deberse a un cambio en

la estructura de las antocianinas o de las condiciones del medio en el que se encuentran a nivel fisiológico. Se ha documentado que modificaciones en las interacciones intermoleculares como copigmentación o auto-asociación (Trouillas et al., 2016) que presentan las antocianinas provocan el cambio en el color que proporcionan al tejido, así como a diferente pH, por lo que es probable que ocurran algunas de estas modificaciones.

No obstante, estos resultados difieren de los resultados reportados por (Pérez-Pérez et al., 2018) donde determinaron que el contenido de antocianinas monoméricas de las drupeolas vibradas disminuyó en (55.5%) posterior a la reversión. Esto podría deberse al método de extracción del pigmento y días de almacenamiento del fruto para realizar el análisis.

En el caso del receptáculo (Cuadro 12) con ambos métodos de inducción de la reversión de color se observó incremento en contenido de antocianinas monoméricas. En el cultivar Tupy aumentó de 0.06 a 1.13, mientras que para Dasha de 0.01 a 0.27. El receptáculo normalmente presenta bajo contenido de antocianinas, por lo que el aumento observado podría deberse a que las condiciones que inducen la reversión de color provocan la liberación del contenido de las drupeolas (fracción rica en antocianinas) hacia el receptáculo, transportándose las antocianinas hasta esta fracción del fruto.

Cuadro 12. Comparación de medias de los contenidos de antocianinas monoméricas en drupeolas y receptáculos de dos variedades de zarzamora con reversión de color inducido por vibración (variedad 'Tupy') y por exposición al sol (variedad 'Dasha')

Variedad	Tejido	Antocianinas
		monoméricas(mg/g)
Tupy	DNR	0.73 ± 0.006 ^a
	DR	0.74 ± 0.006 ^a
	RNR	0.06 ± 0.004 ^b
	RR	0.13 ± 0.004 ^a

Dasha	DNR	0.57 ± 0.62^a
	DR	0.61 ± 0.65^a
	RNR	0.01 ± 0.06^b
	RR	0.27 ± 0.05^a

La comparación estadística se realizó entre drupeolas y receptáculo por separado y por cada variedad. Letras iguales en cada drupeola u órgano de cada variedad señalan diferencias significativas Tukey ($p < 0.05$). DNR: drupa no revertida, DR: drupa revertida, RNR: receptáculo no revertido, RR: receptáculo revertido.

5.3 Color polimérico

El color polimérico expresa el color de las antocianinas que forman complejos con taninos y está estrechamente relacionado con la degradación de las antocianinas monoméricas que conlleva a la formación de compuestos que dan coloración café. Para su determinación, se utiliza la capacidad del bisulfito para combinarse con las antocianinas y formar compuestos de ácido sulfónico incoloros. Las antocianinas polimerizadas son resistentes al blanqueamiento, por lo que el color que se mantiene posterior a la adición del bisulfito es el proporcionado por la polimerización (Brownmiller et al., 2008).

En zarzamora Tupy se encontraron diferencias en las drupeolas y receptáculos. Drupeolas no revertidas y revertidas presentaron porcentajes de color polimérico de 21.50% y 27.86%, respectivamente. Mientras que en los receptáculos fue de 46.43% y 69.81% para no revertidos y revertidos (Cuadro 13). De manera similar, (Pérez-Pérez et al., 2018), evaluaron el color polimérico en drupeolas encontrando menor porcentaje en no revertidas (23%) en comparación con las revertidas (37%). Esto podría indicar que el color café o rojo que presentan las antocianinas poliméricas contribuye al color que muestra el fruto revertido y no precisamente el total de antocianinas (Kim et al., 2019).

Contrario a lo observado en la variedad Tupy, en la zarzamora Dasha se encontró diferencia significativa en los receptáculos, pero el mayor porcentaje de color polimérico se encontró en el receptáculo no revertido. Y en el caso de las drupeolas no se observaron diferencias significativas (Cuadro 13). Se ha

documentado que el color polimérico es un indicador de la degradación de las antocianinas durante el procesamiento y almacenamiento, y que principalmente ocurre cuando las antocianinas se someten a temperaturas mayores a 65°C que producen la formación de chalconas, un compuesto intermediario de la degradación de antocianinas, que puede ser rápidamente degradado a compuestos que dan color café y que resulta en incremento del color polimérico (Brownmiller et al., 2008; Drdák et al., 1990; Giusti & Wrolstad, 2001; Ochoa et al., 1999; Patras et al., 2010; Sadilova et al., 2006). No obstante, en el presente trabajo no se observó esto a pesar de que la temperatura interna alcanzada en el fruto expuesto al sol fue de 56°C lo cual implica que probablemente la polimerización de las antocianinas no es la causa que induce la reversión de color, por lo menos para este método de reversión.

Cuadro 13. Porcentaje de color polimérico en cultivar Tupy y Dasha.

Variedad	Tejido	Antocianinas poliméricas
Tupy	DNR	21.50 ± 0.34 ^b
	DR	27.86 ± 0.34 ^a
	RNR	46.43 ± 1.73 ^b
	RR	69.81 ± 1.73 ^a
Dasha	DNR	19.10 ± 2.34 ^a
	DR	24.76 ± 3.23 ^a
	RNR	70.71 ± 28.97 ^a
	RR	52.24 ± 10.23 ^b

Los datos que se muestran en la misma columna son estadísticamente diferentes entre sí ($p < 0.05$).

DNR: drupa no revertida, DR: drupa revertida, RNR: receptáculo no revertido, RR: receptáculo revertido.

5.4 Antocianina cianidina 3-o-glucósido por HPLC

Con base en el tiempo de retención y espectros de absorción, el análisis por HPLC permitió identificar que la cianidina 3 glucósido fue la antocianina mayoritaria

en drupeolas y receptáculos de zarzamora (Figura 17). Se ha reportado (Rutz, 2012) que esta antocianina representa entre el 70 y 90% del total de las antocianinas de la zarzamora. Esta técnica también permitió observar que después de someter los frutos a las condiciones de reversión ninguna de las fracciones (drupeola y receptáculo) modifica su perfil de antocianinas, lo cual indica que las estructuras de las antocianinas se mantienen posterior a la reversión (Cuadro 15).

En cuanto al contenido de cianidina 3 glucósido, en las drupeolas de ambas variedades no se encontró diferencia significativa. Esto comprueba lo observado en antocianinas monoméricas totales. Asimismo, permite deducir que la reversión de color de la zarzamora no es consecuencia de la degradación de la antocianina mayoritaria como se ha reportado en la literatura. (Edgley et al., 2019b) determinaron que las drupeolas revertidas de zarzamora cultivar 'Ouachita' disminuyeron su contenido de cianidina 3 glucósido en 70% en comparación con las drupeolas no revertidas, concluyendo que la reversión de color es consecuencia de la degradación de este pigmento. De igual manera (Kim et al., 2019) evaluaron las antocianinas en los frutos variedad 'Apache', 'Ouachita' y 'Triple Crown'; encontrando que las drupeolas revertidas presentaron menor contenido en comparación con las drupeolas no revertidas. No obstante, en estos reportes no se controlaron las condiciones que indujeron la reversión de color, por lo que los frutos pudieron mantenerse en condiciones que posterior a la reversión provocaran la degradación.

En los receptáculos de ambas variedades se encontró diferencia significativa, observándose mayor cantidad en los receptáculos revertidos. Esto coincide a lo reportado para antocianinas monoméricas en esta fracción del fruto. No existe información acerca de lo que pasa en los receptáculos después de la reversión de color, ya que los estudios se centran únicamente en las drupeolas. La información encontrada permite entender que probablemente lo que ocurra es un transporte de las antocianinas de las drupeolas hacia el receptáculo y no una degradación.

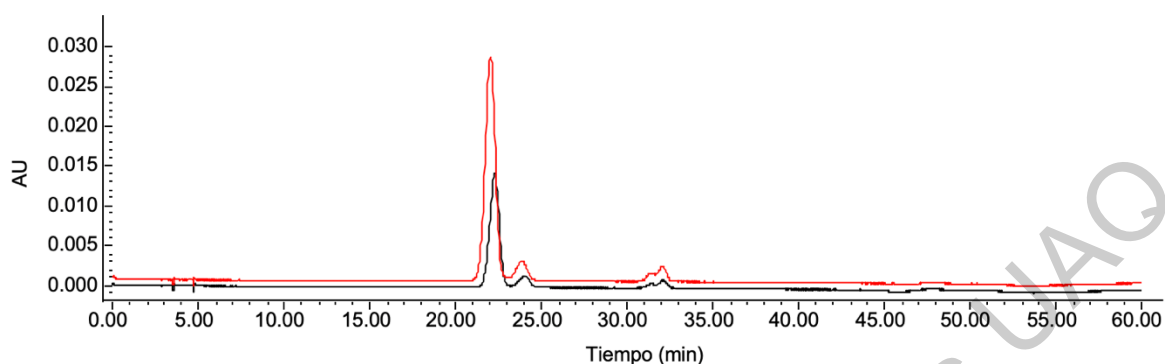


Figura 17. Cromatograma de cianidina 3-o-glucósido.

Cuadro 14. Contenidos de cianidina 3-glucósido en drupeolas y receptáculos revertidos y no revertidos de ambos cultivares.

Cultivar	Tejido	cianidina 3-o glucósido
Tupy	DNR	1.40 ± 0.19 ^a
	DR	1.32 ± 0.19 ^a
	RNR	0.44 ± 0.052 ^b
	RR	1.12 ± 0.14 ^a
Dasha	DNR	1.13 ± 0.34 ^a
	DR	1.20 ± 0.25 ^a
	RNR	0.13 ± 0.06 ^b
	RR	0.94 ± 0.04 ^a

Los datos que se muestran en letras pequeñas diferentes en la misma columna son estadísticamente diferentes entre sí ($p < 0.05$).

DNR: drupa no revertida, DR: drupa revertida, RNR: receptáculo no revertido, RR: receptáculo revertido.

5.5 Cuantificación de fenoles

A la molécula de antocianina se le atribuye el pigmento que presenta la zarzamora. No obstante, su interacción con fenoles puede modificar la coloración que aporta al tejido. Es por esta razón que es importante el análisis de estos compuestos, ya que podrían intervenir en la reversión de color de fruto de zarzamora.

Para la identificación de los compuestos fenólicos se inyectaron estándares de los fenoles que comúnmente se encuentran en los frutos de zarzamora. En el (Cuadro 15) se muestran los tiempos de retención de cada uno de ellos. Con base en tiempo de retención y espectro de absorción se encontraron catequina, epicatequina, elágico, p-cumárico y gálico en drupeolas y receptáculos del fruto, esto en los distintos extractos (libres, enlazados y conjugados).

Cuadro 15. Tiempo de retención de estándares de ácidos fenólicos separados por HPLC.

Ácido fenólico	Tiempo de retención
Catequina	9.032
Cafeico	10.123
Epicatequina	10.38
Ferúlico	12.952
Elágico	12.381
Quercetina	17.223
P-cumárico	11.955
Hidroxibenzoico	9.03
Elágico	3.651

En la literatura se ha reportado ácido gálico, catequina, epicatequina y ácido elágico en etapas madura y esto coincide con lo encontrado en este estudio, así como también ácido hidroxibenzoico, ácido ferúlico y quercetina, aunque estos no fueron encontrados en estos cultivares. La ausencia de los compuestos fenólicos en las zarzamoras analizadas puede deberse a la nutrición, condiciones climáticas, así como al cultivar del que se trate.

Los fenoles libres que se identificaron en drupeolas Tupy fueron catequina y epicatequina (Cuadro 16). El análisis estadístico mostró diferencias significativas en ambos fenoles después de la reversión de color, observándose disminución del 50 y 80% en catequina y epicatequina, respectivamente.

Cuadro 16. Ácidos fenólicos presentes en drupeolas cv. Tupy.

Cultivar	Fenoles	Ácido fenólico	RNR	RR
Tupy	Libres	Catequina	0.04 ^a	0.04 ^a
		Epicatequina	0.28 ^a	0.21 ^a
		Elágico	0.03 ^a	0.03 ^a
	Conjugados	Gálico	0.04 ^a	0.04 ^a

Los datos que se muestran en la misma fila son estadísticamente diferentes entre sí ($p < 0.05$).

RNR: receptáculo no revertido, RR: receptáculo revertido.

Los fenoles libres se encuentran solo en tejidos muertos. Por lo tanto, es de importancia metabólica que los flavanoles se distribuyan ampliamente en los tejidos vegetales de la planta en formas no conjugadas, mientras que la mayoría de los otros grupos de flavonoides se producen como glucósidos. Por lo que son fácilmente extraíbles, pero la extracción de estos fenoles se dificulta al enlazarse o conjugarse con otros compuestos por lo que tienen que someterse a hidrólisis ácidas o alcalinas para cuantificarse.

Debido a esto, se pensó que la reducción en contenido de catequina y epicatequina en las drupeolas revertidas pudiera deberse a que copigmentan a las antocianinas. Sin embargo, posterior al proceso de hidrólisis del extracto de fenoles libres, no se identificó ninguno de estos fenoles. En este extracto únicamente se identificó el ácido gálico y *p*-cumárico, pero no presentaron diferencias después de la reversión de color. En el caso del receptáculo de esta misma variedad, se encontraron fenoles en el extracto libre y conjugado (Cuadro 17), pero no se logró identificar ningún fenol enlazado a los componentes de pared celular. En los cuatro fenoles identificados no se observó diferencia entre los RNR y RR.

Cuadro 17. Ácidos fenólicos presentes en receptáculos cv. Tupy.

Cultivar	Fenoles	Ácido fenólico/ flavonoides	DNR	DR
Tupy	Libres	Catequina	0.06 ^a	0.03 ^b
		Epicatequina	0.15 ^a	0.03 ^b
	Enlazados	p-cumárico	0.06 ^a	0.08 ^a
		Conjugados	Gálico	0.02 ^a

Los datos que se muestran en la misma fila son estadísticamente diferentes entre sí ($p < 0.05$).

DNR: drupa no revertida, DR: drupa revertida, RNR: receptáculo no revertido, RR: receptáculo revertido.

De igual forma en la zarzamora 'Dasha' tanto en drupeola como en receptáculo no se encontró diferencia en ninguno de los fenoles identificados (Cuadro 18,19). Esto indica que estos compuestos probablemente no intervienen en la inducción de la reversión de color o que el método empleado no fue el adecuado para encontrar las posibles diferencias, ya que durante la extracción se pudieran modificar las interacciones presentes entre antocianinas y fenoles, por lo que se sugiere analizar estos compuestos por medio de técnicas analíticas que permitan observar las interacciones entre antocianinas y fenoles sin alterar las condiciones en que se encuentran, como dicroísmo circular y maldi TOF/TOF, para verificar si los fenoles están involucrados en la reversión de color, además realizar un perfil de fenoles más amplio utilizando UPLC-masas.

Cuadro 18. Ácidos fenólicos presentes en drupeolas cv. Dasha.

Cultivar	Fenoles	Ácido fenólico/flavonoides	DNR	DR
Dasha	Libres	Catequina	0.08 ^a	0.07 ^a
		Epicatequina	0.06 ^a	0.06 ^a
		Elágico	0.01 ^a	0.01 ^a
	Enlazados	p-cumárico	0.03 ^a	0.04 ^a

Conjugados	Gálico	0.02 ^a	0.02 ^a
------------	--------	-------------------	-------------------

Los datos que se muestran en la misma fila son estadísticamente diferentes entre sí (p <0.05).

DNR: drupa no revertida, DR: drupa revertida.

Cuadro 19. Ácidos fenólicos presentes en receptáculos cv. Dasha.

Cultivar	Fenoles	Ácidos fenólicos/ flavonoides	RNR	RR
Dasha	Libres	Epicatequina	0.12 ^a	0.07 ^a
	Conjugados	Elágico	0.13 ^a	0.08 ^b
		Gálico	0.01 ^a	0.01 ^a

Los datos que se muestran en la misma fila son estadísticamente diferentes entre sí (p <0.05).

RNR: receptáculo no revertido, RR: receptáculo revertido.

5.6 Análisis de imágenes

El primer parámetro medido mediante análisis de imágenes fue color, donde se seleccionaron 55 drupeolas no revertidas y el mismo número para revertidas, se tomó una fotografía por drupeola, tanto revertidas (Figura 18) como control (Figura 17) presentaron diferencias en todos los parámetros de color evaluados (L*, a*, b*, h y C, S, B) (Cuadro 20). Los cambios más relevantes se presentaron en L* a* y Chroma, esto coincide con lo observado en las mediciones con colorímetro.

Cuadro 20. Parámetros colorimétricos en drupeolas y receptáculos cv. Dasha.

	L*	a*	b*	ΔE	Hue	S	B	Chroma
DNR	7.67 ^b	3.57 ^b	3.86 ^b		0.30 ^b	0.84 ^a	0.12 ^b	6.04 ^b
DR	19.79 ^a	27.41 ^a	14.04 ^a	35.63	0.57 ^a	0.75 ^b	0.34 ^a	30.9 ^a
RNR	64.76 ^a	11.51 ^a	3.02 ^a		0.57 ^a	0.22 ^a	0.70 ^a	12.41 ^a
RR	52.38 ^a	5.13 ^b	3.19 ^a	19.23	0.38 ^b	0.21 ^a	0.54 ^b	6.44 ^b

Los datos que se muestran en la misma columna son estadísticamente diferentes entre sí (p <0.05).

DNR: drupa no revertida, DR: drupa revertida, RNR: receptáculo no revertido, RR: receptáculo revertido.



Figura 18. Drupeola no revertida (izquierda) y revertida (derecha).

En el caso de receptáculo se midió color de la parte interna, los revertidos presentaron diferencias en a^* , h y C y B en comparación con los no revertidos. El cambio en estos parámetros muestra que posterior a la reversión, esta fracción del fruto también modifica su coloración tornándose roja.

Adicionalmente, con el conjunto de datos obtenidos en CIELAB se pudo calcular la diferencia total de color (ΔE^*). El valor para este parámetro fue de 19.23 mostrando que el cambio total de color que presentaron los receptáculos fue elevado, aunque menor a lo ocurrido en drupeolas.

5.6.1 Morfología

Se midió la circularidad, diámetro de feret y área para evaluar si las drupeolas presentaron cambios en su morfología después de inducir la reversión de color (Cuadro 21). En cuanto a la circularidad, este parámetro puede presentar valores entre 1 y 0, donde 1.0 indica un círculo perfecto. Y a medida que el valor se aproxima a 0.0 este va a indicar una forma cada vez más alargada. En este parámetro encontramos diferencias significativas teniendo una mayor circularidad en drupeolas no revertidas (0.66) y en revertidas de (0.61).

Cuadro 21. Parámetros morfométricos en drupeolas cv. Dasha.

Drupeola	Circularidad	Diámetro de feret(mm)	Área (cm ²)
----------	--------------	-----------------------	-------------------------

No revertida	0.66 ^a	0.78 ^a	0.31 ^a
Revertida	0.61 ^b	0.72 ^b	0.27 ^b

Los datos que se muestran en la misma columna son estadísticamente diferentes entre sí ($p < 0.05$).

Cuadro 22. Parámetros morfométricos en receptáculos cv. Dasha

Receptáculos	Contraste	Correlación	Diferencia del momento inverso	Dimensión fractal
No revertido	253.05 ^b	3.67E-4 ^a	0.47 ^a	1.66 ^b
Revertido	534.45 ^a	1.52E-4 ^b	0.38 ^b	1.75 ^a

Los datos que se muestran en la misma columna son estadísticamente diferentes entre sí ($p < 0.05$).

El diámetro de feret es la distancia entre dos puntos a lo largo, la drupeola revertida mostró menor diámetro, de 0.72 mm, con respecto a la no revertida, de 0.78 mm. Asimismo, también se observó reducción en el área de la drupeola revertida, ya que disminuyó de 0.32 a 0.27 mm.

La reducción en los parámetros morfológicos evaluados estaría en función de los cambios que a nivel celular se presente en la drupa. Ya se ha reportado que a nivel celular se presenta disrupción por lo que esto contribuiría a la pérdida de la estructura de la drupa que se manifiesta en una reducción del tamaño y forma. Aunque es posible que cada mecanismo de inducción provoque diferentes cambios internos en el fruto, por lo que es necesario evaluar la estructura celular del fruto revertido por este método.

5.7 Microscopía óptica en fresco

5.7.1 Cultivar Tupy

Las imágenes capturadas con microscopio óptico permitieron observar la distribución del pigmento en la drupa del fruto. En las drupeolas no revertidas se observó que las antocianinas se presentan en forma de aglomerados. A partir de un aumento de 20X es posible apreciar cuerpos esféricos de coloración negra (Figura

20). En la literatura se ha reportado que las antocianinas en pétalos de distintas flores como *Delphinium* y *lisianthus* (Kallam et al., 2017) y plantas de *Arabidopsis thaliana* pueden aglomerarse al interior de la vacuola celular (Chanoca et al., 2015), además en frutos como manzana y uva (Bae et al., 2006; Conn et al., 2010) también se han logrado observar.

La acumulación de antocianinas en forma de aglomerado depende de distintas condiciones siendo el tipo de antocianina y la concentración en la que se encuentran las principales. En el caso del tipo de antocianinas se ha reportado que las antocianinas aciladas con ácidos fenólicos forman con mayor facilidad aglomerados en comparación con aquellas que se encuentran aciladas con ácidos orgánicos o en forma libre (Pourcel et al., 2010). En caso de la concentración, un aumento en el contenido de antocianinas se promueven interacciones intermoleculares entre antocianinas provocando su asociación, lo cual genera que precipiten en el medio que se encuentran formando aglomerados.

Los aglomerados que se forman a partir de antocianinas aciladas, generalmente presentan una membrana y se les denominada antocianoplastos, mientras que las formaciones de antocianinas que se generan por la elevada concentración carecen de membrana y se les llaman inclusiones vacuolares de antocianinas (Kallam et al., 2017). En el caso de la drupeola de zarzamora, la técnica utilizada no permite distinguir si los cuerpos esféricos de antocianinas presentan membrana, no obstante, el tipo de antocianina identificada por HPLC indica que es probable que no presenten membrana, sin embargo, el uso de microscopía confocal y electrónica de transmisión permitiría confirmar la ausencia o presencia de membrana en los aglomerados.

En el caso de la drupeola revertida, se apreció un reducido número de aglomerados de antocianinas y en algunos de los aumentos no se lograron observar (Figura 19). Esto indica que el cambio de color de la drupeola posterior a la vibración sea consecuencia de la dilución de los aglomerados. Es posible que el color de las drupeolas no revertidas se deba a la asociación entre antocianinas y que en la reversión las interacciones intermoleculares que forman los aglomerados se pierdan

y provoque la disminución y cambio de color. No obstante, es necesario evaluar dichas interacciones para comprobar si esto ocurre.

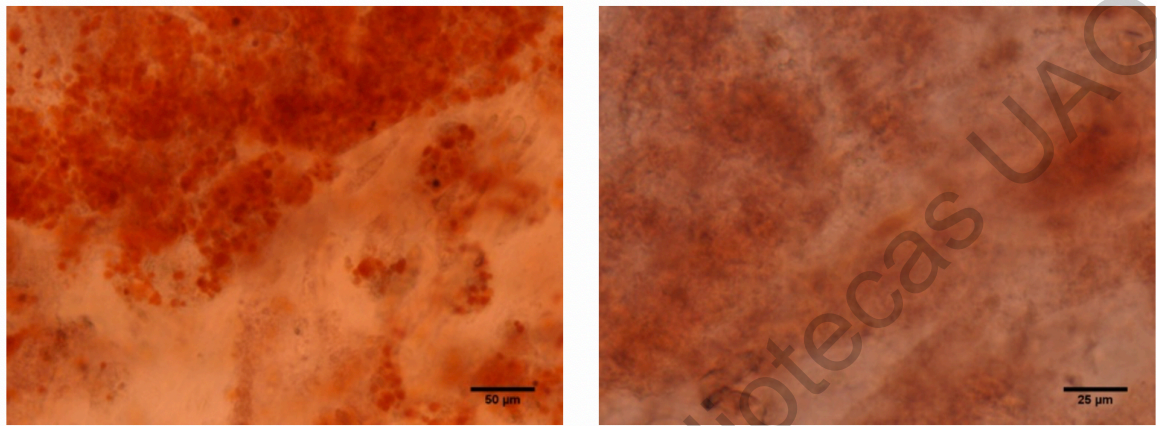


Figura 19. Micrografía de pulpa revertida del cv. Tupy a 20x (izquierda) 40x (derecha).

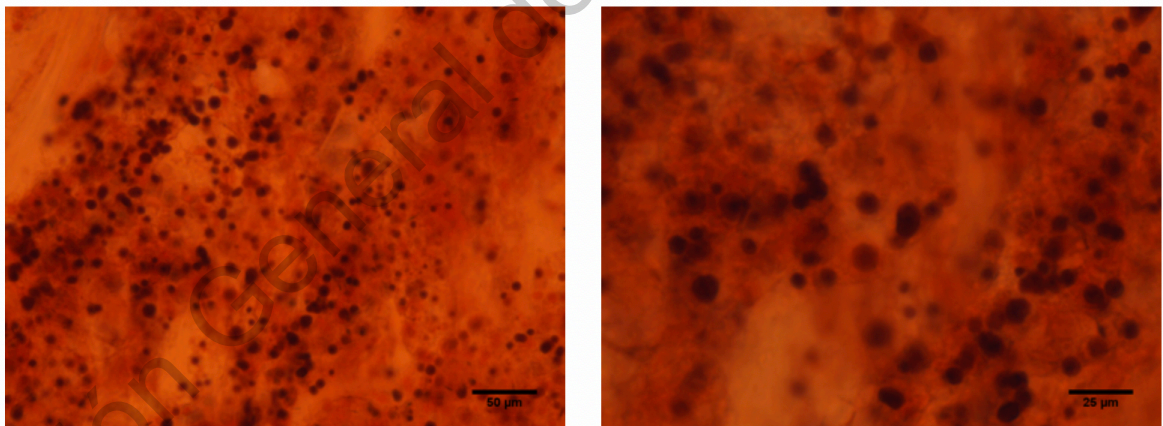


Figura 20. Micrografía de pulpa no revertida del cv. Tupy a 20x (izquierda) 40x (derecha).

5.8 Microscopía óptica con proceso de fijado

5.8.1 Cambios en estructura celular

Para observar los cambios en estructura celular de las drupeolas y receptáculos, las muestras se fijaron y deshidrataron. En este caso la variedad seleccionada para este estudio fue la Dasha. En la figura 21 se puede observar la estructura celular de la drupeola, receptáculo y de la estructura que mantiene unida a ambas fracciones.

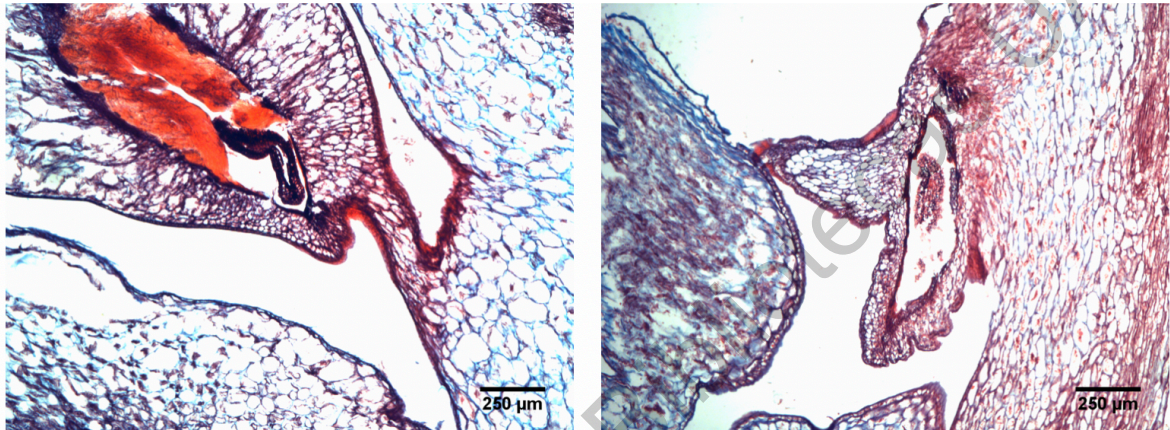


Figura 21. Unión drupeola-receptáculo a 4x no revertida (izquierda) y revertida (derecha).

Se muestra que la unión drupa-receptáculo se rompe en el fruto revertido, lo cual permite la salida del contenido de la drupeola, rico en antocianinas, hacia el receptáculo. Esto comprueba la razón por la cual la morfología cambia posterior a la reversión. Además, también explica el motivo por el cual el receptáculo revertido presenta mayor coloración roja y contenido de antocianinas en comparación con el no revertido.

En el caso del receptáculo, revertido y no revertido, se aprecia una estructura celular similar (Figura 22,23), por lo que los cambios en composición y color que se presentan en esta fracción del fruto no se deben a daños a nivel celular en esta zona, sino a modificaciones de la drupeola, por lo que el receptáculo no participa, al menos de manera directa, en la reversión de color.

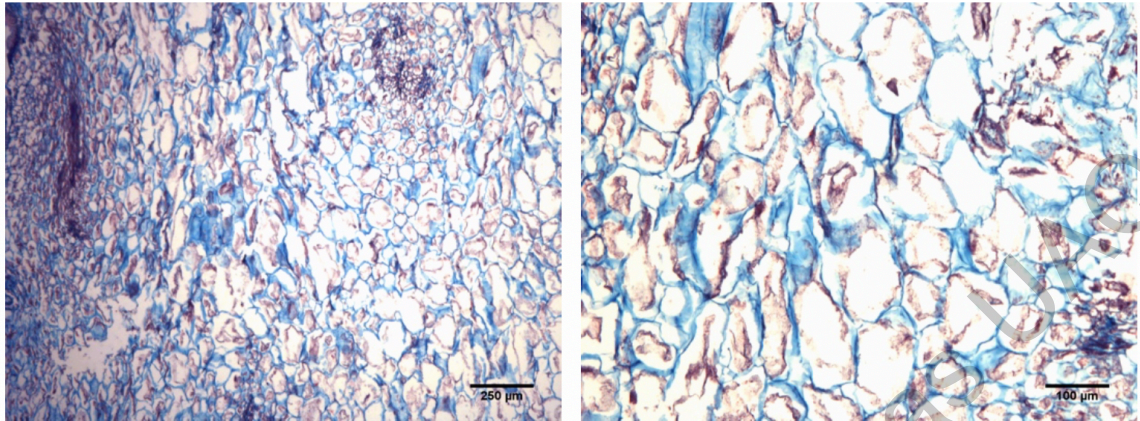


Figura 22. Receptáculo no revertido teñido visto a 4x y 10x.

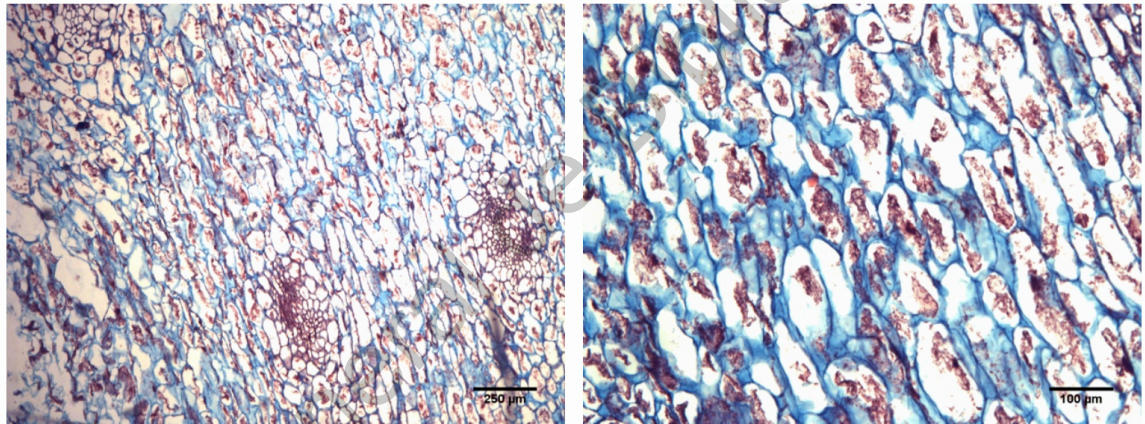


Figura 23. Receptáculo revertido teñido visto a 4x y 10x

En drupeolas revertidas se observa pérdida total de la estructura celular en comparación con las no revertidas (Figura 24). Esto coincide a lo reportado por (Edgley et al., 2019) Esto demuestra que la drupeola es la fracción que está involucrada en la reversión de color, y que este fenómeno probablemente se deba a que el estrés al que se sometió el fruto para inducir el cambio de color también provocó rupturas, al igual que en pared y membrana celular, en el tonoplasto, por lo cual, las antocianinas contenidas en la vacuola se liberaron. Es posible que esto, haya causado la dilución de los aglomerados (sección anterior), ya que, al liberarse las antocianinas de la vacuola, el medio en el que se encuentran es mayor, por

tanto, su concentración a nivel celular disminuye y la capacidad para interactuar con otras antocianinas también, lo cual explicaría el cambio de color de las antocianinas sin que se hubieran degradado.

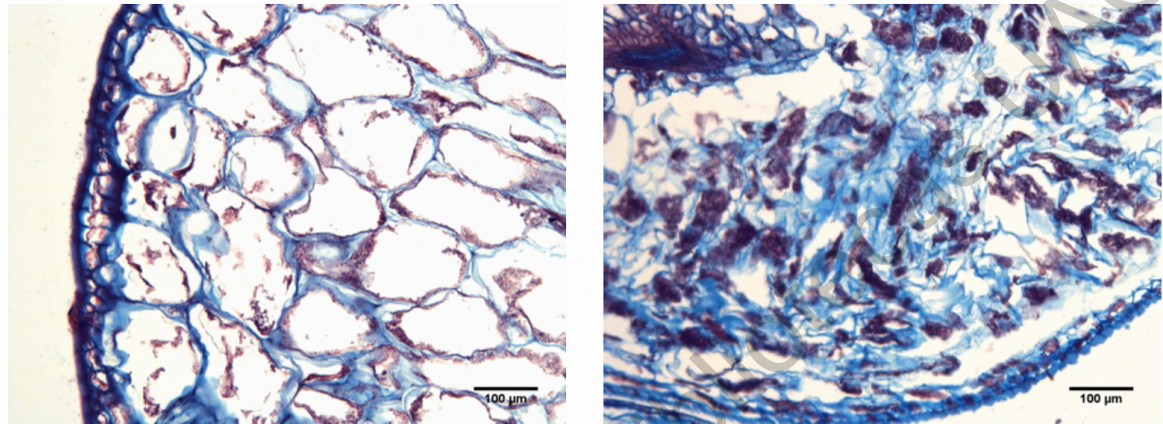


Figura 24. Drupeolas observadas a 10x no revertida (izquierda) y revertida (derecha).

Cuadro 23. Parámetros morfométricos en células de drupeolas cv. Dasha.

Parámetros	No revertida	Revertida
Área	3739.14 ^a	2071.03 ^b
Perímetro	257.66 ^a	179.86 ^b
Circularidad	0.627 ^b	0.645 ^a
Feret	97.81 ^a	67.07 ^b
Min Feret	48.69 ^a	35.94 ^b
AR	2.14 ^a	1.99 ^b
Round	0.5 ^b	0.56 ^a
Solidez	0.06 ^a	0.9 ^a

a, b: los datos que se muestran en letras pequeñas diferentes en la misma fila son estadísticamente diferentes entre sí ($p < 0.05$).

Cuadro 24. Parámetros morfométricos en células de receptáculos cv. Dasha.

Parámetros	No revertida	Revertida
Área	1429.43 ^b	1718.8 ^a
Perímetro	147.75 ^b	178.14 ^a
Circularidad	0.123 ^b	0.6 ^a
Feret	69.18 ^a	68.29 ^b
Min Feret	36.75 ^a	33.84 ^b
AR	0.63 ^b	2.13 ^a
Round	0.16 ^b	0.5 ^a
Solidez	0.05 ^b	0.9 ^a

a, b: los datos que se muestran en letras pequeñas diferentes en la misma fila son estadísticamente diferentes entre sí ($p < 0.05$).

Dirección General de Bibliotecas UAQ

6. CONCLUSIONES

Los análisis de color pueden ser utilizados como herramienta para medir objetivamente la reversión de color y sus niveles de inducción.

La aplicación de vibraciones de 10 Hz y 0.5 g por 5 y 10 min, así como exposición al sol por 5 horas, inducen la reversión de color en los frutos de zarzamora, y el nivel de reversión puede ser cuantificado a través de los valores de color.

El receptáculo de los frutos de zarzamora mostró cambios en su color y composición y por tanto debe tener un papel importante en el mecanismo de reversión de color de los frutos.

El contenido de antocianinas monoméricas y de cianidina 3-O glucósido no cambia en las drupeolas de zarzamora posterior a la reversión de color, esto señala que el cambio de coloración no se debe a la degradación de antocianinas; mientras que el receptáculo revertido presenta mayor contenido en ambos parámetros en comparación con el del fruto no revertido, pero esto se debe a la ruptura entre drupeola y receptáculo que provoca la transferencia del contenido de la drupeola hacia el receptáculo.

El porcentaje de color polimérico aumenta en la drupa y receptáculo del fruto Tupy revertido, pero en 'Dasha' posterior a la reversión se mantiene y disminuye en drupeola y receptáculo, respectivamente. Este resultado muestra que la polimerización de las antocianinas no necesariamente está involucrada en el proceso de reversión y es posible que otro tipo de interacciones intermoleculares sean las responsables del cambio de coloración.

En contenido de fenoles sólo se observa diferencia en catequina y epicatequina en la extracción de fenoles libres de la drupeola de la variedad 'Tupy', pero en 'Dasha'

no se muestra ningún cambio, tanto en drupeola como en receptáculo. El perfil de fenoles no parece estar relacionado con la reversión de color, no obstante, es necesario una caracterización más detallada para descartar esta posibilidad.

Con el análisis de imágenes de las fotos capturadas en el estereoscopio se determinó que la morfología de las drupeolas revertidas en los frutos expuestos al sol cambia respecto a los no revertidos, presentando menor circularidad, área y diámetro de feret, lo cual indica que las drupeolas revertidas se encogen como consecuencia de la ruptura entre la unión de la drupeola-receptáculo.

Las imágenes del tejido fresco de la drupeola en microscopio óptico permitieron observar que la reversión de color probablemente sea consecuencia de la pérdida de aglomerados de antocianinas que dan la coloración negra. La disminución en la concentración podría ser la causa que altere las interacciones intermoleculares entre antocianinas que provoquen la desintegración del aglomerado.

Las observaciones de las muestras fijadas y teñidas indican que la pérdida de la estructura celular de la drupeola está relacionada con la reversión de color, ya que esto podría facilitar las condiciones para que ocurran cambios químicos o bioquímicos que modifiquen las interacciones moleculares de las antocianinas produciendo el cambio de color. En el caso del receptáculo no se observó pérdida de la estructura celular, por lo que esta fracción del fruto no está relacionado con la presencia del fenómeno.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Acosta-Montoya, Ó., Vaillant, F., Cozzano, S., Mertz, C., Pérez, A. M., & Castro, M. V. (2010). Phenolic content and antioxidant capacity of tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichus* Schlttdl.) during three edible maturity stages. *Food Chemistry*, 119(4), 1497–1501. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.032>
- Adams, J. B. (1973). Thermal degradation of anthocyanins with particular reference to the 3-glycosides of cyanidin. I. In acidified aqueous solution at 100 °C. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 24(7), 747–762. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740240702>
- Aguilera, J. M. (2005). Why food microstructure? *Journal of Food Engineering*, 67(1), 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.05.050>
- Arzate-Vázquez, I., Chanona-Pérez, J. J., Perea-Flores, M. de J., Calderón-Domínguez, G., Moreno-Armendáriz, M. A., Calvo, H., ... Gutiérrez-López, G. (2011). Image Processing Applied to Classification of Avocado Variety Hass (*Persea americana* Mill.) During the Ripening Process. *Food and Bioprocess Technology*, 4(7), 1307–1313. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0595-6>
- Bae, R.-N., Kim, K., & Lee, S.-K. (2006). Anatomical Observations of Anthocyanin Rich Cells in Apple Skins. *HortScience*, 41. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.41.3.733>
- Benvenuti, S., Pellati, F., Melegari, M., & Bertelli, D. (2004). Polyphenols, Anthocyanins, Ascorbic Acid, and Radical Scavenging Activity of *Rubus*,

Ribes, and Aronia. *Journal of Food Science*, 69(3), FCT164–FCT169.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb13352.x>

Bhargava, A., & Bansal, A. (2018). Fruits and vegetables quality evaluation using computer vision: A review. *Journal of King Saud University - Computer and Information Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.jksuci.2018.06.002>

Blasco, J., Aleixos, N., Gómez-Sanchís, J., & Moltó, E. (2009). Recognition and classification of external skin damage in citrus fruits using multispectral data and morphological features. *Biosystems Engineering*, 103(2), 137–145.
<https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2009.03.009>

Blasco, J., Aleixos, N., & Moltó, E. (2003). Machine Vision System for Automatic Quality Grading of Fruit. *Biosystems Engineering*, 85(4), 415–423.
[https://doi.org/10.1016/S1537-5110\(03\)00088-6](https://doi.org/10.1016/S1537-5110(03)00088-6)

Blasco, J., Aleixos, N., & Moltó, E. (2007). Computer vision detection of peel defects in citrus by means of a region oriented segmentation algorithm. *Journal of Food Engineering*, 81(3), 535–543.
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.12.007>

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.

Brownmiller, C., Howard, L. R., & Prior, R. L. (2008). Processing and storage effects on monomeric anthocyanins, percent polymeric color, and antioxidant capacity of processed blueberry products. *Journal of Food Science*, 73(5), H72-79. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00761.x>

- Castañeda, A., Pacheco Hernandez, L., Páez, E., Rodriguez, J., & Galán-Vidal, C. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 113, 859–871. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.001>
- Cesa, S., Carradori, S., Bellagamba, G., Locatelli, M., Casadei, M. A., Masci, A., & Paolicelli, P. (2017). Evaluation of processing effects on anthocyanin content and colour modifications of blueberry (*Vaccinium* spp.) extracts: Comparison between HPLC-DAD and CIELAB analyses. *Food Chemistry*, 232, 114–123. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.153>
- Chanoca, A., Kovinich, N., Burkel, B., Stecha, S., Bohorquez-Restrepo, A., Ueda, T., ... Otegui, M. S. (2015). Anthocyanin Vacuolar Inclusions Form by a Microautophagy Mechanism. *The Plant Cell*, 27(9), 2545–2559. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00589>
- Cho, M. J., Howard, L. R., Prior, R. L., & Clark, J. R. (2004). Flavonoid glycosides and antioxidant capacity of various blackberry, blueberry and red grape genotypes determined by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(13), 1771–1782. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1885>
- Clark, J. R. (2008). Primocane-fruiting Blackberry Breeding. *HortScience*, 43(6), 1637–1639. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.43.6.1637>
- Conn, S., Franco, C., & Zhang, W. (2010). Characterization of anthocyanic vacuolar inclusions in *Vitis vinifera* L. cell suspension cultures. *Planta*, 231(6), 1343–1360. <https://doi.org/10.1007/s00425-010-1139-4>

- Connor, A., Finn, C., Mcghe, T., & Alspach, P. (2005). Genetic and Environmental Variation in Anthocyanins and their Relationship to Antioxidant Activity in Blackberry and Hybridberry Cultivars. *J Am Soc Hort Sci*, 130. <https://doi.org/10.21273/JASHS.130.5.680>
- Cubero S., Moltó E., Gutiérrez A., Aleixos N., García-Navarrete O. L., Juste F., & Blasco J. (2010). Real-time Inspection of Fruit by Computer Vision on a Mobile Harvesting Platform under Field Conditions. *Progress in Agricultural Engineering Sciences*, 6, 1–16.
- Dan, H., Azuma, T., & Kohyama, K. (2007). Characterization of spatiotemporal stress distribution during food fracture by image texture analysis methods. *Journal of Food Engineering*, 81(2), 429–436. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.11.021>
- 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. <https://doi.org/10.1021/ja00061a011>
- do Nascimento Nunes, M. C., Nicometo, M., Emond, J. P., Melis, R. B., & Uysal, I. (2014). Improvement in fresh fruit and vegetable logistics quality: Berry logistics field studies. *Philosophical Transactions. Series A, Mathematical, Physical, and Engineering Sciences*, 372(2017), 20130307. <https://doi.org/10.1098/rsta.2013.0307>
- Drdák, M., & Dau\vcík, P. (1990). *Changes of elderberry (Sambucus nigra) pigments during the production of pigment concentrates.*

- Du, C.-J., & Sun, D.-W. (2004). Recent developments in the applications of image processing techniques for food quality evaluation. *Trends in Food Science & Technology*, 15(5), 230–249. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.10.006>
- Edgley, M., Close, D. C., & Measham, P. F. (2018). The effects of N fertiliser application rates on red drupelet disorder (reversion) in ‘Ouachita’ thornless blackberries grown under tunnels. *Acta Horticulturae*, 1205, 885–890. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2018.1205.113>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.04.052>
- Edgley, M., Close, D. C., & Measham, P. F. (2019b). Nitrogen application rate and harvest date affect red drupelet reversion and postharvest quality in ‘Ouachita’ blackberries. *Scientia Horticulturae*, 256. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108543>
- Edgley, M., Close, D. C., Measham, P. F., & Nichols, D. S. (2019). Physiochemistry of blackberries (*Rubus* L. subgenus *Rubus* Watson) affected by red drupelet reversion. *Postharvest Biology and Technology*, 153, 183–190. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2019.04.012>
- Eiro, M. J., & Heinonen, M. (2002). Anthocyanin Color Behavior and Stability during Storage: Effect of Intermolecular Copigmentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(25), 7461–7466. <https://doi.org/10.1021/jf0258306>

- ElMasry, G., Wang, N., ElSayed, A., & Ngadi, M. (2007). Hyperspectral imaging for nondestructive determination of some quality attributes for strawberry. *Journal of Food Engineering*, 81(1), 98–107. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.10.016>
- Erdenee, B., Tateishi, R., & Tana, G. (2010). Particular agricultural land cover classification case study of Tsagaannuur, Mongolia. *2010 IEEE International Geoscience and Remote Sensing Symposium*, 3194–3197. <https://doi.org/10.1109/IGARSS.2010.5649664>
- Fan-Chiang, H.-J., & Wrolstad, R. E. (2010). Sugar and nonvolatile acid composition of blackberries. *Journal of AOAC International*, 93(3), 956–965.
- Fernandez-Salvador, J., Strik, B. C., Zhao, Y., & Finn, C. E. (2015). Trailing Blackberry Genotypes Differ in Yield and Postharvest Fruit Quality during Establishment in an Organic Production System. *HortScience*, 50(2), 240–246. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.50.2.240>
- Finn, C. E., & Clark, J. R. (2011). Emergence of blackberry as a world crop. *Chronica Horticulturae*, 51(3), 13–18.
- García-Viguera, C., Zafrilla, P., Romero, F., Abellán, P., Artés, F., & Tomás-Barberán, F. A. (1999). Color Stability of Strawberry Jam as Affected by Cultivar and Storage Temperature. *Journal of Food Science*, 64(2), 243–247. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1999.tb15874.x>
- Giusti, M. M., & Wrolstad, R. E. (2001). Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. *Current Protocols in Food*

Analytical Chemistry, 00(1), F1.2.1-F1.2.13.

<https://doi.org/10.1002/0471142913.faf0102s00>

Goldman, I. (2018). *Plant Breeding Reviews*. John Wiley & Sons.

Gómez-Nucamendi, O., Hernandez-Sandoval, L., Figueroa, M., & Martínez, M. (2016). Leaf anatomy of four species and one variety of *Datura* (Solanoidea, Solanaceae). *Journal of Plant Biology Research*, 5, 34–47.

Gu, L., Kelm, M. A., Hammerstone, J. F., Beecher, G., Holden, J., Haytowitz, D., ... Prior, R. L. (2004). Concentrations of proanthocyanidins in common foods and estimations of normal consumption. *The Journal of Nutrition*, 134(3), 613–617. <https://doi.org/10.1093/jn/134.3.613>

Hager, A., Howard, L. R., Prior, R. L., & Brownmiller, C. (2008). Processing and storage effects on monomeric anthocyanins, percent polymeric color, and antioxidant capacity of processed black raspberry products. *Journal of Food Science*, 73(6), H134-140.

Hager, T. J., Howard, L. R., Liyanage, R., Lay, J. O., & Prior, R. L. (2008). Ellagitannin composition of blackberry as determined by HPLC-ESI-MS and MALDI-TOF-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(3), 661–669. <https://doi.org/10.1021/jf071990b>

Hall, H. K., & Funt, R. C. (2017). *Blackberries and their Hybrids. Crop Production Science in Horticulture*. CABI.

Haralick, R. M., Shanmugam, K., & Dinstein, I. (1973). Textural Features for Image Classification. *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics*, SMC-3(6), 610–621. <https://doi.org/10.1109/TSMC.1973.4309314>

- Havlíková, L., & Míková, K. (1985). Heat Stability of Anthocyanins. *Zeitschrift Für Lebensmittel-Untersuchung Und Forschung*, 181(5), 427–432.
<https://doi.org/10.1007/BF01027412>
- Jackman, R. L., & Smith, J. L. (1996). Anthocyanins and betalains. In G. A. F. Hendry & J. D. Houghton (Eds.), *Natural Food Colorants* (pp. 244–309).
https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2155-6_8
- Jackman, Robert L., Yada, R. Y., & Tung, M. A. (1987). A Review: Separation and Chemical Properties of Anthocyanins Used for Their Qualitative and Quantitative Analysis. *Journal of Food Biochemistry*, 11(4), 279–308.
<https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.1987.tb00128.x>
- Jennings, D. L. (1988). *Raspberries and Blackberries: Their Breeding, Diseases and Growth*. Academic Press.
- Kader, F., Irmouli, M., Zitouni, N., Nicolas, J.-P., & Metche, M. (1999). Degradation of Cyanidin 3-Glucoside by Caffeic Acid o-Quinone. Determination of the Stoichiometry and Characterization of the Degradation Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(11), 4625–4630.
<https://doi.org/10.1021/jf981400x>
- Kafkas, E., Koşar, M., Türemiş, N., & Başer, K. H. C. (2006). Analysis of sugars, organic acids and vitamin C contents of blackberry genotypes from Turkey. *Food Chemistry*, 97(4), 732–736.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.09.023>
- Kallam, K., Appelhagen, I., Luo, J., Albert, N., Zhang, H., Deroles, S., ... Martin, C. (2017). Aromatic Decoration Determines the Formation of Anthocyanic

Vacuolar Inclusions. *Current Biology: CB*, 27(7), 945–957.

<https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.02.027>

Kaume, L., Howard, L. R., & Devareddy, L. (2012). The blackberry fruit: A review on its composition and chemistry, metabolism and bioavailability, and health benefits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(23), 5716–5727.

<https://doi.org/10.1021/jf203318p>

Kaur, R., Kaur, N., & Singh, H. (2019). Pericarp and pedicel anatomy in relation to fruit cracking in lemon (*Citrus limon* L. Burm.). *Scientia Horticulturae*, 246, 462–468.

<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.11.040>

Khalife, E. (2012). An intelligent approach based on adaptive neuro-fuzzy inference systems (ANFIS) for walnut sorting. *Australian Journal of Crop Science*, 6, 183–187.

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.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125169>

Kim, Moo Jung, 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.

<https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.08.020>

Koponen, J. M., Happonen, A. M., Mattila, P. H., & Törrönen, A. R. (2007). Contents of Anthocyanins and Ellagitannins in Selected Foods Consumed in Finland.

Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55(4), 1612–1619.

<https://doi.org/10.1021/jf062897a>

Lee, J., Durst, R., & Wrolstad, R. (2005a). *Determination of Total Monomeric Anthocyanin Pigment Content of Fruit Juices, Beverages, Natural Colorants, and Wines by the pH Differential Method: Collaborative Study*. 10.

Lee, J., Durst, R., & Wrolstad, R. (2005b). Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative Study. *Journal of AOAC International*, 88, 1269–1278.

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.
[https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(00\)00246-6](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(00)00246-6)

Mazur, S. P., Nes, A., Wold, A.-B., Remberg, S. F., & Aaby, K. (2014). Quality and chemical composition of ten red raspberry (*Rubus idaeus* L.) genotypes during three harvest seasons. *Food Chemistry*, 160, 233–240.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.174>

McCoy, J., Clarke, J., Salgado, 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.

- Meruliya, T., Dhameliya, P., Patel, J., Panchal, D., Kadam, P., & Naik, S. (2015). Image Processing for Fruit Shape and Texture Feature Extraction—Review. *International Journal of Computer Applications*, 129, 30–33. <https://doi.org/10.5120/ijca2015907000>
- Mery, D., Chanona-Pérez, J. J., Soto, A., Aguilera, J. M., Cipriano, A., Veléz-Rivera, N., ... Gutiérrez-López, G. F. (2010). Quality classification of corn tortillas using computer vision. *Journal of Food Engineering*, 101(4), 357–364. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.07.018>
- Mery, D., & Pedreschi, F. (2005). Segmentation of colour food images using a robust algorithm. *Journal of Food Engineering*, 66(3), 353–360. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.04.001>
- Mitcham, B., Cantwell, M., & Kader, A. (1996). *Methods for Determining Quality of Fresh Commodities*. (85), 5.
- Mora-Rochin, S., Gutiérrez-Urbe, J. A., Serna-Saldivar, S. O., Sánchez-Peña, P., Reyes-Moreno, C., & Milán-Carrillo, J. (2010). Phenolic content and antioxidant activity of tortillas produced from pigmented maize processed by conventional nixtamalization or extrusion cooking. *Journal of Cereal Science*, 52(3), 502–508. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2010.08.010>
- Ochoa, M. R., Kessler, A. G., Vullioud, M. B., & Lozano, J. E. (1999). Physical and Chemical Characteristics of Raspberry Pulp: Storage Effect on Composition and Color. *LWT - Food Science and Technology*, 32(3), 149–153. <https://doi.org/10.1006/fstl.1998.0518>

- Palamidis, N., & Markakis, P. (1975). Stability of Grape Anthocyanin in a Carbonated Beverage. *Journal of Food Science*, 40(5), 1047–1049. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1975.tb02264.x>
- Patil, J. K., & Kumar, R. (2011). Advances in image processing for detection of plant diseases. *Journal of Advanced Bioinformatics Applications and Research*, 2(2), 135–141. Retrieved from Scopus.
- Patras, A., Brunton, Nigel. P., O'Donnell, C., & Tiwari, B. K. (2010). Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. *Trends in Food Science & Technology*, 21(1), 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.07.004>
- Pérez-Nieto, A., Chanona-Pérez, J. J., Farrera-Rebollo, R. R., Gutiérrez-López, G. F., Alamilla-Beltrán, L., & Calderón-Domínguez, G. (2010). Image analysis of structural changes in dough during baking. *LWT - Food Science and Technology*, 43(3), 535–543. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.09.023>
- Pérez-Pérez, G. A., Fabela-Gallegos, M. J., Vázquez-Barrios, M. E., Rivera-Pastrana, D. M., Palma-Tirado, L., Mercado-Silva, E., & Escalona, V. (2018). Effect of the transport vibration on the generation of the color reversion in blackberry fruit. *Acta Horticulturae*, 1194, 1329–1336. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2018.1194.187>
- Perkins-Veazie, P. (usda, Collins, J. K., & Clark, J. R. (1996). Cultivar and maturity affect postharvest quality of fruit from erect blackberries. *HortScience: A Publication of the American Society for Horticultural Science (USA)*.

Retrieved from <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US9732285>

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. <https://doi.org/10.1093/mp/ssp071>

Quevedo, R., Mendoza, F., Aguilera, J. M., Chanona, J., & Gutiérrez-López, G. (2008). Determination of senescent spotting in banana (*Musa cavendish*) using fractal texture Fourier image. *Journal of Food Engineering*, 84(4), 509–515. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.06.013>

Rhim, J.-W. (2002). Kinetics of thermal degradation of anthocyanin pigment solutions driven from red flower cabbage. *Food Sci. Biotechnol.*, 11, 361–364.

Rivas. (2016). Manejo y Producción Forzada del Cultivo de Zarcamora | Intagri S.C. Retrieved October 16, 2019, from <https://www.intagri.com/articulos/frutillas/manejo-y-produccion-forzada-del-cultivo-de-zarcamora>

Rutz, J. (2012). Influence of the Degree of Maturation on the Bioactive Compounds in Blackberry (*Rubus* spp.) cv. Tupy. *Food and Nutrition Sciences*, 03, 1453–1460. <https://doi.org/10.4236/fns.2012.310189>

Sadilova, E., Stintzing, F. C., & Carle, R. (2006). Thermal Degradation of Acylated and Nonacylated Anthocyanins. *Journal of Food Science*, 71(8), C504–C512. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00148.x>

- Salgado, A., & Clark, J. R. (2016). Evaluation of a new type of firm and reduced reversion blackberry: Crispy genotypes. *Acta Horticulturae*, 1133, 405–410. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2016.1133.63>
- Segantini, D. M., Threlfall, R., Clark, J. R., Brownmiller, C. R., Howard, L. R., & Lawless, L. J. R. (2017). Changes in fresh-market and sensory attributes of blackberry genotypes after postharvest storage. *Journal of Berry Research*, 7(2), 129–145. <https://doi.org/10.3233/JBR-170153>
- Shahidi, F., & Naczki, M. (2003). *Phenolics in Food and Nutraceuticals*. CRC Press.
- SIAP. (2018). Retrieved from https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2018/Atlas-Agroalimentario-2018
- Siriwoharn, T., & Wrolstad, R. E. (2004). Polyphenolic Composition of Marion and Evergreen Blackberries. *Journal of Food Science*, 69(4), FCT233–FCT240. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb06322.x>
- Soriano-Melgar, L. de A. A., Raddatz-Mota, D., Díaz de León-Sánchez, F., Rodríguez-Verástegui, L. L., & Rivera-Cabrera, F. (2019). Effects of underwater cutting treatments on oleocellosis development, quality and shelf-life of minimally processed Persian lime fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 156, 110953. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2019.110953>
- Strik, B., & Bryla, D. (2015). Uptake and Partitioning of Nutrients in Blackberry and Raspberry and Evaluating Plant Nutrient Status for Accurate Assessment of Fertilizer Requirements. *HortTechnology*, 452–459. <https://doi.org/10.21273/HORTTECH.25.4.452>

- Strik, B. C. (2008). Review of nitrogen nutrition of Rubus. *Acta Horticulturae*. Retrieved from <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201301538815>
- Strik, B. C. (2016). A review of optimal systems for organic production of blueberry and blackberry for fresh and processed markets in the northwestern United States. *Scientia Horticulturae*, 208, 92–103. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.11.044>
- 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. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00507>
- Vélez-Rivera, N., Blasco, J., Chanona-Pérez, J., Calderón-Domínguez, G., de Jesús Perea-Flores, M., Arzate-Vázquez, I., ... Farrera-Rebollo, R. (2014). *Computer Vision System Applied to Classification of “Manila” Mangoes During Ripening Process*. Retrieved from <https://pubag.nal.usda.gov/catalog/623997>
- Yam, K. L., & Papadakis, S. E. (2004). A simple digital imaging method for measuring and analyzing color of food surfaces. *Journal of Food Engineering*, 61(1), 137–142. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(03\)00195-X](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(03)00195-X)
- Yin, M. (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. *Theses and Dissertations*. Retrieved from <https://scholarworks.uark.edu/etd/2417>

Zadernowski, R., Naczek, M., & Nesterowicz, J. (2005). Phenolic Acid Profiles in Some Small Berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 2118–2124. <https://doi.org/10.1021/jf040411p>

Zhao, Y. (2007). *Berry Fruit: Value-Added Products for Health Promotion*. CRC Press.

Zielinski, A., Goltz, C., Yamato, M., Ávila, S., Hirooka, E., Wosiacki, G., ... Demiate, I. (2015). Blackberry (*Rubus* spp.): Influence of ripening and processing on levels of phenolic compounds and antioxidant activity of the 'Brazos' and 'Tupy' varieties grown in Brazil. *Ciência Rural*, 45, 744–749. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20120715>

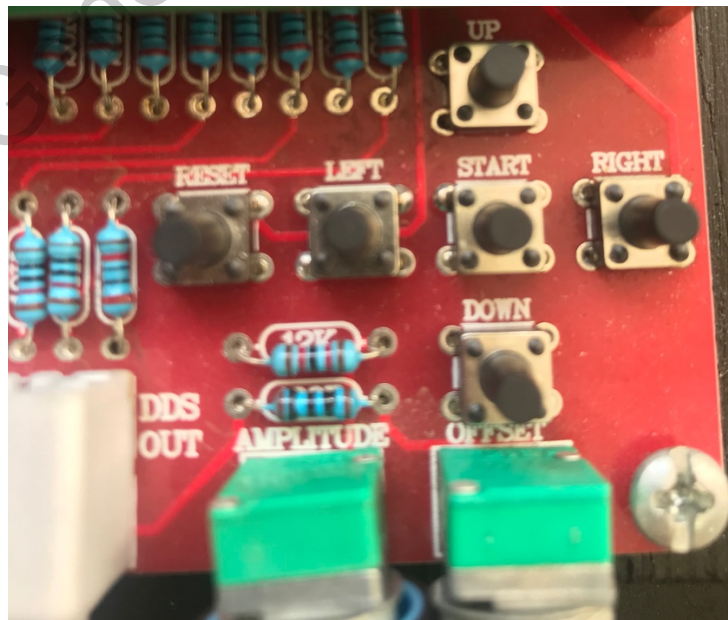
8. ANEXOS

A1. Guía de inicio rápido mesa vibratoria

- 1- Conectar el cable que se encuentra en la parte trasera de la caja a 120 volts de corriente alterna (ver figura 1).



- 2- Encender el equipo por medio del interruptor de la parte trasera (ver figura 1).
- 3- Buscar la opción 'Freq Step' con los botones **UP** y **DOWN** (ver figura 2) del generador de funciones para ajustar los incrementos de la frecuencia.



Botones de navegación

- a) **UP** y **DOWN**: Permiten navegar por las diferentes opciones (Freq step, High speed, noise, sine, etc) que ofrece el generador de funciones.
 - b) **START**: Funciona como **ON/OFF**, activa o desactiva la forma de onda deseada, una vez activada la forma de onda '**ON**', no se pueden hacer más modificaciones hasta que nuevamente se presione '**START**' y regrese al estado de '**OFF**'.
 - c) **LEFT** y **RIGHT**: disminuye o aumenta la frecuencia dependiendo de los incrementos configurados en la pantalla de 'Freq step', donde se usan los mismos botones para incrementar o disminuir los pasos de frecuencia.
 - d) **RESET**: reinicia la tarjeta en caso de que suceda algún error.
- 4- Buscar el generador de funciones la forma de onda deseada y ajustar la frecuencia de operación con los botones **LEFT** y **RIGHT**.

Freq step: en esta opción se eligen los incrementos o pasos de frecuencia, como default son 100 Hz, pero se puede modificar este valor con los botones '**LEFT**' para disminuir y '**RIGHT**' para incrementar, no se configura la frecuencia de la señal que se usará.

Ejemplo: si se deja a 100 Hz y después se busca la opción 'sine' y se tiene una frecuencia de 30 Hz y se requiere incrementar a 31 Hz, al presionar el botón '**RIGHT**' se cambiará a 130 Hz y no a 31 Hz, debido a que el 'Freq step' se encontraba en 100 Hz, para ellos se debe cambiar a 1 Hz y posteriormente realizar incrementos de 1 en 1.

Sine: en esta opción se genera una señal sinusoidal, antes de presionar el botón de '**START**' se ajusta la frecuencia que se desea generar, esto con ayuda de los botones '**LEFT**' y '**RIGHT**', los incrementos dependerán de los previamente configurados en la opción 'Freq step'. Para las demás opciones se configuran de formar similar, lo único que cambia es la forma de la onda generada.

- 5- Presionar el botón de '**START**' para iniciar la prueba y también para detenerla.

A2. Determinación de propiedades morfométricas y definiciones

Los siguientes parámetros de forma y tamaño fueron determinados a partir de las imágenes binarias, utilizando los plugins “measure” y “analyze particles” del programa image J:

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Propiedades y definiciones morfológicas

- Área** : Número total de píxeles que caen dentro del contorno del elemento analizado, multiplicado por el área de un píxel. Se realizó el cambio de píxeles a cm^2 y μm^2 en el caso de las imágenes de microscopía óptica.
- Perímetro** : La longitud total de los límites de un cuerpo. Calculado a partir de sus proyecciones horizontales y verticales
- Diámetro mayor o Diámetro de Feret (DM)** : Es determinado por la distancia de dos píxeles con las coordenadas más largas a orientaciones diferentes. Este parámetro puede utilizarse para describir el encogimiento global de un objeto
- Circularidad** : Es definido como 4π multiplicado por el área y dividido entre el perímetro al cuadrado. Un círculo perfecto tiene un valor de factor de forma de 1.0 y una línea tiene un valor de 0.

$$\text{Circularidad} = 4\pi \frac{\text{área}}{\text{perímetro}^2}$$

- Razón de aspecto (AR)** : Es la relación entre el diámetro máximo y mínimo. Valores de 1.0 es para objetos equidimensionales y cuando tiende a infinito es para objetos extendidos.

$$AR = \frac{\text{Diámetro máximo}}{\text{Diámetro menor}}$$

- Redondez (R)** : Es la relación de cuatro veces el área sobre la raíz cuadrada del diámetro mayor. R determina la redondez de los objetos, un objeto perfectamente redondo tendrá una redondez de 1.0, mientras que los objetos rectos y alargados tenderán a cero.

$$R = \frac{4 \times \text{área}}{\pi (\text{Diámetro máximo})^{1/2}}$$

A3. Configuración de control manual de la cámara utilizada para la adquisición de imágenes.

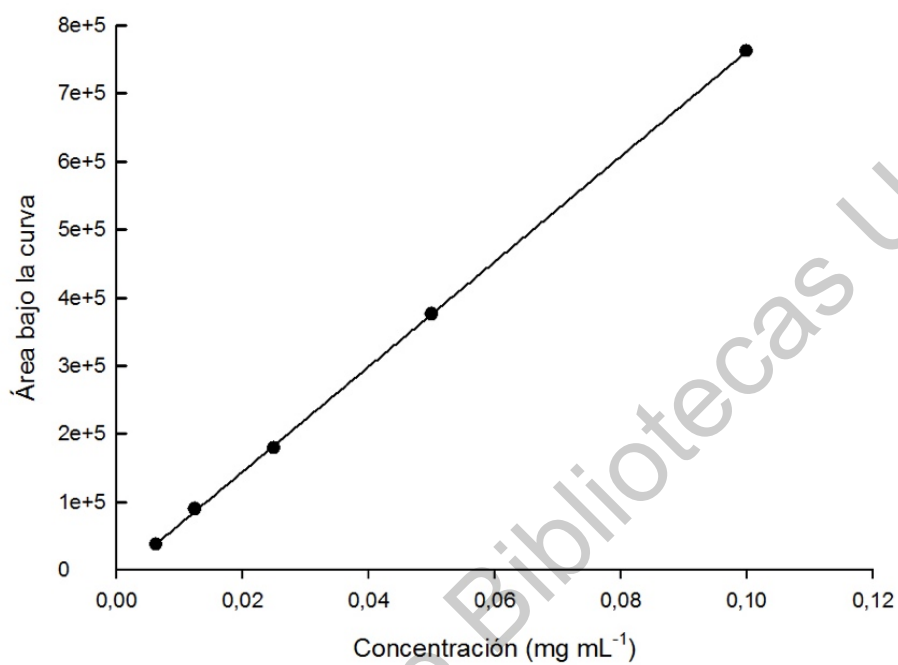
Ajuste de la cámara	
Modo de exposición	: Manual
Prioridad de apertura	: 22
Prioridad de obturador	: 1/40
Longitud de enfoque	: 55 mm
ISO sensibilidad	: ISO-3200
Balance de blancos	: Manual
Tamaño de imagen	: 1572x1872 px

A4. Propiedades determinadas de color

Propiedades de color y definiciones	
RGB	: rojo, verde, azul
HSB	: hue, saturación, brillo
L*a*b*	: luminosidad, rojo-verde, amarillo-azul

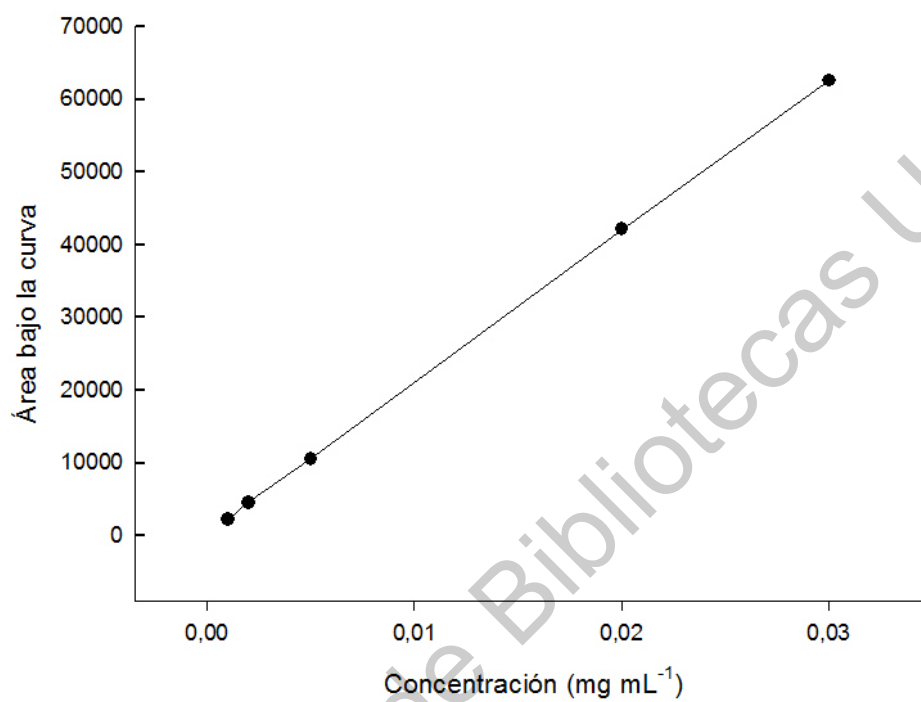
A5. Curva estándar de Cianidina 3-o-glucósido

Cianidina 3-O glucósido



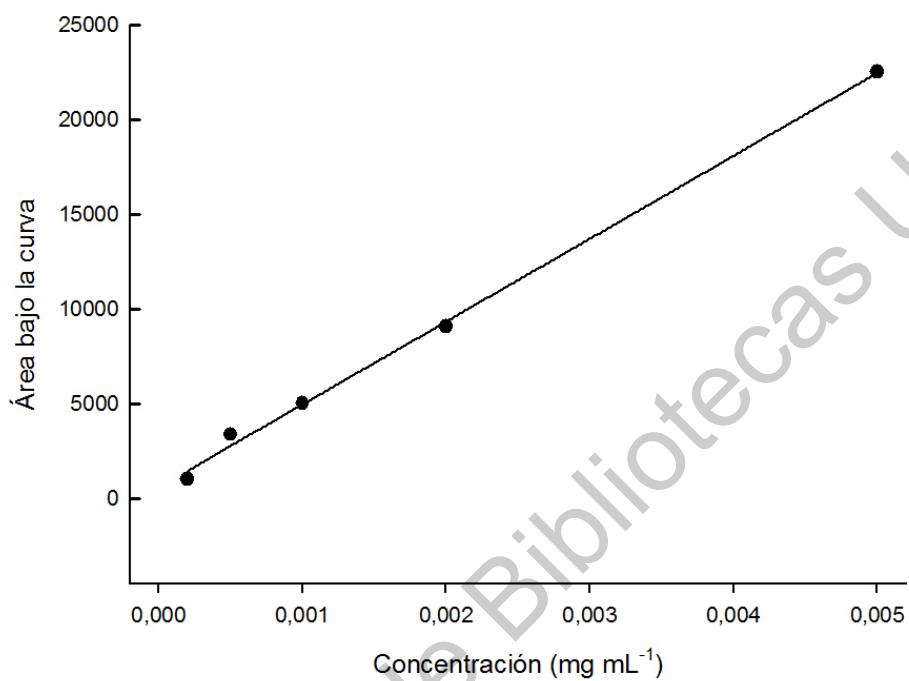
A6. Curva estándar de epicatequina

Epicatequina



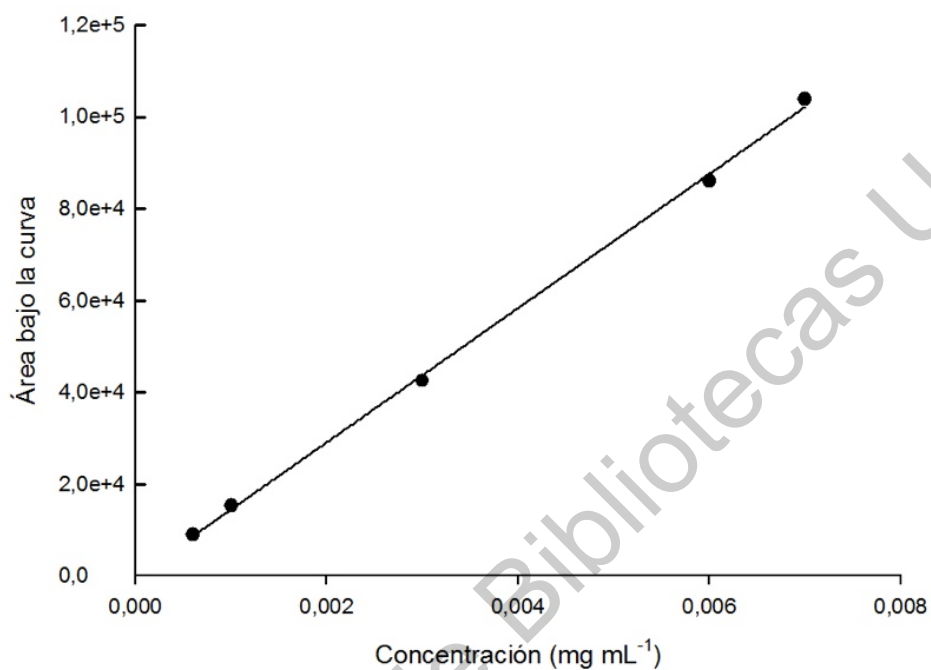
A7. Curva estándar de ácido elágico

Ácido Elágico



A8. Curva estándar de ácido *p*-cumárico

Ácido p-cumárico



A9. Curva estándar de ácido gálico

Ácido gálico

