

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS DEL
CENTRO DE LA REPÚBLICA (PROPAC)**

ESTUDIOS DE EXTRACCIÓN Y ESTABILIDAD DE LOS PIGMENTOS DE ZARZAMORA cv. 'TUPI'

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:

Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:

I.B.Q. LUCIA RAMÍREZ LEÓN

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Octubre, 2008
México



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA
PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS DEL CENTRO
DE LA REPÚBLICA (PROPAC)

Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

**ESTUDIOS DE EXTRACCIÓN Y ESTABILIDAD DE LOS
PIGMENTOS DE ZARZAMORA cv. 'TUPI'**

TESIS

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

Presenta:

I.B.Q. LUCIA RAMÍREZ LEÓN

Dirigida por:

Dr. Edmundo M. Mercado Silva

SINODALES

Dr. Edmundo M. Mercado Silva
Presidente

Firma

Dr. Eduardo Castaño Tostado
Secretario

Firma

Dr. S. Horacio Guzmán Maldonado
Vocal


Firma

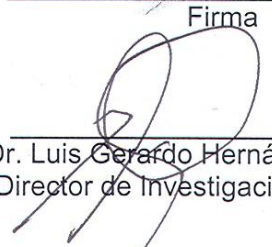
Dra. Sandra O. Mendoza Díaz
Suplente

Firma

Dr. José Antonio Torres
Suplente

Firma


Q.B. Magali E. Aguilar Ortiz
Director de la Facultad


Dr. Luis Gerardo Hernández Sandoval
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Octubre, 2008
México

RESUMEN

El cultivo de zarzamora creció 397% en los años 2002-2007, siendo Michoacán el principal productor (96%). El 70 a 80% de la producción, se destina al mercado de exportación en fresco, mientras que el 20-30% se dedica a usos industriales. Es necesario aumentar el valor agregado para mejorar la explotación. La zarzamora es rica en antocianinas, siendo una alternativa de uso aunque existen problemas de estabilidad de las mismas durante el procesamiento y ambientes de conservación. Los objetivos del trabajo fueron establecer las mejores condiciones de extracción de antocianinas, comparar procedimientos de estabilización de los extractos y observar sus cambios durante su almacenamiento a diferentes condiciones de temperatura, pH y luz. Lotes de zarzamora industrial, fueron macerados con etanol acidificado (0.01% HCl), durante 10, 20 y 30 min a 30, 45 y 60°C. La composición media de todos los extractos fue 815 ± 20 mg de antocianinas (ACN)/L y 2690 ± 96 mg de ácido gálico (EAG)/L de fenoles totales. Sobre el rendimiento, la temperatura de extracción, mostró un efecto significativo ($p=0.031$); a 60°C se obtuvo un 8% más de recuperación, respecto al obtenido a 30°C (791.67 ± 30.25 mg ACN/L). La densidad de color, color polimérico, % color polimérico, L^* , C^* y h° no fueron afectados por los factores evaluados: (49 ± 2.8 , 0.94 ± 0.17 , 1.88 ± 0.27 , 29 ± 0.2 , 22 ± 0.1 , 21.7 ± 0.4 , respectivamente). Diferentes extractos de antocianinas fueron estabilizados por pasteurización (63-65°C, 30 s) y altas presiones hidrostáticas (APH) (586 MPa, 1 y 3 min), analizados microbiológicamente, ajustado su pH (1.0, 2.5 y 4.0), almacenados 90 días a 4, 25 y 45 °C con y sin luz blanca. Periódicamente se determinó el % retención de antocianinas, índice de degradación, diferencia neta de color y con ellos se determinaron los parámetros cinéticos de degradación térmica. Los tratamientos de estabilización no mostraron efectos significativos en la retención de antocianinas. La degradación de antocianinas siguió una cinética de primer orden e incrementó con la temperatura de almacenamiento (89 y 6% de retención al día 40 a 4 y 45°C respectivamente). Bajos pH dieron más estabilidad (79% después de 90 días a 4°C y pH 1.0), y la luz afectó moderadamente la retención de pigmentos (85 y 75% sin y con luz a 4°C y pH 1.0). Los extractos con pH 1, sin luz y 4°C fueron los más estables ($t_{1/2} = 325$ días). Las energías de activación variaron de 6.15-13.13 Kcal/mol.

Palabras clave: Extractos de antocianinas, zarzamora, estabilidad, pasteurización, altas presiones hidrostáticas, cinética de degradación.

SUMMARY

The production of blackberries grew 397% during the 2002-2007 period, being Michoacán the main producer (96%) in México. About 70 to 80% of this production is destined to the fresh export market, while 20-30% has industrial uses. To improve its production profitability, it is necessary to increase the value added to this commodity. Since blackberries are rich in anthocyanins, this an alternative use option but these compounds have stability problems during processing and storage. The objectives of this study were to establish the best anthocyanins extraction conditions, to compare stabilization procedures of the extracts and to observe the extract changes during storage under different temperature, pH and illumination conditions. Blackberries were macerated with acidified ethanol (0.01% HCl), for 10, 20 and 30 minutes at 30, 45 and 60 °C. The average composition of all extracts was 815 ± 20 mg anthocyanins (ACN)/L and 2690 ± 96 mg gallic acid (EAG)/L of total phenolics. Temperature showed a significant effect ($p=0.031$) on anthocyanin recovery. At 60 °C, the recovery obtained was 8% higher than the one obtained at 30 °C (791.67 ± 30.25 ACN mg/L). The color density, polymeric color, % polymeric color, L^* , C^* and h° values were not affected by the factors evaluated: (49 ± 2.8 , 0.94 ± 0.17 , 1.88 ± 0.27 , 29 ± 0.2 , 22 ± 0.1 , and 21.7 ± 0.4 , respectively). Anthocyanins extracts were stabilized by thermal (63-65 °C, 30 s) and high hydrostatic pressure processing (HPP) (586 MPa, 1 and 3 min), analyzed microbiologically, and after adjusted its pH (1.0, 2.5 and 4.0) they were stored for 90 days at 4, 25 and 45 °C with and without white light. Periodically, the % anthocyanin retention, rate of degradation, net color difference and thermal degradation parameters were determined. Extract stabilization treatments did not show a significant effect. During storage, anthocyanin degradation followed a first-order kinetics increasing with temperature (89 and 6% retention on day 40 at 4 and 45 °C, respectively). Low pH increase stability (79% after 90 days at 4 °C, pH 1.0) while light exposure moderately affected the pigments retention (85 and 75% without and with light at 4 °C and pH 1.0). Extracts with pH 1.0 stored without light at 4 °C were the most stable ($t_{1/2} = 325$ days). The activation energy ranged from 6.15-13.13 kcal/mol.

Keywords: Anthocyanins extracts, blackberry, stability, pasteurization, high hydrostatic pressure, kinetic degradation.

DEDICATORIA

A mis padres Vicente Ramírez y Dolores León, por brindarme su apoyo incondicional y sacrificio a lo largo de mi formación. Este éxito académico es gracias a su amor y comprensión. A ellos toda mi admiración y respeto. Los Amo.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por enseñarme el camino correcto de la vida, guiándome y fortaleciéndome cada día con su bendición.

A mi familia, por creer y confiar siempre en mí, apoyándome en todas las decisiones que he tomado en la vida. A mis Hermanos y Hermanas por ser mi motivación para superarme cada día. A mis sobrinos, por todas las alegrías vividas. A Gaby, que me ha acompañado en todos los momentos de mi carrera profesional.

Al Dr. Edmundo Mercado, director de tesis, por su paciencia, esfuerzo y dedicación, por compartir sus amplios conocimientos y experiencia de manera generosa durante el desarrollo del presente trabajo.

A los miembros del Comité de esta tesis por sus valorables sugerencias que contribuyeron al mejoramiento y ordenamiento del presente trabajo.

A mis compañeros de maestría, que siempre he podido contar con ellos en todo momento y que juntos recorrimos este camino, esforzándonos para lograr nuestros objetivos. De manera especial a mis compañeros de laboratorio: Marycarmen, Lorenzo y Esthela, por su ayuda brindada y esa gran amistad que siempre me demostraron.

A la Universidad Autónoma de Querétaro que me brindó la oportunidad para realizar mis estudios de maestría y de la cual siempre he recibido apoyo.

A las diversas instituciones que formaron parte del desarrollo de esta tesis: a Fundación PRODUCE y a PROCAL, por su apoyo económico e iniciativa otorgada para el desarrollo del presente trabajo. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante esta maestría.

ÍNDICE GENERAL

	Página
Resumen	i
Summary	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Índice general	v
Índice de cuadros	viii
Índice de figuras	x
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	2
2.1 Generalidades de la zarzamora	2
2.1.1. Clasificación taxonómica	2
2.1.2. Descripción botánica del género <i>Rubus</i>	2
2.1.3. Índices de cosecha y calidad	4
2.1.4. Importancia nacional de la zarzamora	5
2.1.4.1. Importancia económica	5
2.1.4.2. Principales variedades cultivadas	7
2.1.5. Comercio internacional	9
2.1.5.1. Producción	9
2.1.5.2. Importación y exportación zarzamora en México	10
2.1.5.3. Estacionalidad	11
2.1.5.4. Regulaciones al comercio	12
2.1.6. Composición química del fruto	14
2.1.6.1. Usos de la zarzamora	14
2.1.7. Problemática del cultivo	15
2.1.7.1. Propuestas para el aprovechamiento de la zarzamora ..	16
2.2 Extracción de pigmentos	16
2.2.1. Importancia de pigmentos naturales	17
2.2.2. Generalidades de las antocianinas	19

2.2.3. Estructura química	20
2.2.4. Biosíntesis	20
2.2.5. Estabilidad de las antocianinas	21
2.2.5.1. pH	21
2.2.5.2. Temperatura	22
2.2.5.3. Luz	23
2.2.5.4. Oxígeno	24
2.2.5.5. Enzimas	24
2.2.5.6. Ácido ascórbico	24
2.2.5.7. Complejos con metales	25
2.2.5.8. Reacciones de copigmentación y condensación	25
2.2.5.9. Azúcares	26
2.2.6. Antocianinas como colorantes en alimentos	27
2.2.7. Extracción y preservación de antocianinas	28
2.2.7.1. Tecnología de la alta presión hidrostática (APH)	29
III. JUSTIFICACIÓN	33
IV. OBJETIVOS	34
4.1 Objetivo general	34
4.2 Objetivos específicos	34
V. MATERIALES Y MÉTODOS	35
5.1 Sitio experimental y material biológico	35
5.2 Extracción de pigmentos	36
5.3 Estudios de estabilidad de pigmentos	38
5.3.1. Estudio preliminar del tratamiento de APH	38
5.3.2. Estudios de estabilidad final de pigmentos durante el almacenamiento	40
5.4 Métodos utilizados	43
5.4.1. Antocianinas monoméricas totales	43
5.4.2. Fenoles totales	44
5.4.3 Parámetros de color	44

5.4.4	<i>Determinaciones colorimétricas</i>	45
5.4.5	<i>% Recuperación</i>	46
5.4.6	<i>Actividad enzimática de la polifenol oxidasa (PPO)</i>	46
5.4.7	<i>% Retención de antocianinas</i>	47
5.4.8	<i>Índice de degradación de antocianinas</i>	47
5.4.9	<i>Parámetros de degradación térmica</i>	48
5.4.10	<i>Conteo de hongos y levaduras</i>	49
5.5	<i>Diseño y análisis estadístico de los resultados</i>	49
5.5.1	<i>Extracción de pigmentos</i>	49
5.5.2	<i>Estudios de estabilidad de pigmentos</i>	49
VI.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51
6.1	<i>Extracción de pigmentos</i>	51
6.1.1	<i>Extracción de antocianinas y su % de recuperación</i>	51
6.1.2	<i>Extracción de fenoles totales</i>	54
6.1.3	<i>Calidad de color de los extractos</i>	55
6.2	<i>Estudios de estabilidad de pigmentos</i>	57
6.2.1	<i>Estudio preliminar del tratamiento de APH</i>	57
6.2.1.1	<i>Actividad enzimática de PPO</i>	58
6.2.1.2	<i>% Retención de antocianinas</i>	59
6.2.2	<i>Estudios de estabilidad final de pigmentos durante el almacenamiento</i>	60
6.2.2.1	<i>% Retención de antocianinas</i>	61
6.2.2.2	<i>Índice de degradación de antocianinas</i>	64
6.2.2.3	<i>Diferencia neta de color</i>	67
6.2.2.4	<i>Parámetros de degradación térmica</i>	72
6.2.3	<i>Análisis microbiológico de pigmentos</i>	77
VII.	CONCLUSIONES	78
VII.	BIBLIOGRAFÍA	79
ANEXO		86

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
2.1	Clasificación taxonómica de la zarzamora	2
2.2	Producción agrícola nacional de zarzamora, 2007	6
2.3	Anuario estadístico de la producción agrícola zarzamora en Michoacán 2002-2007	6
2.4	Principales productores mundiales de berries, 2004	9
2.5	Volúmenes de las importaciones de berries en diferentes países en el 2004	10
2.6	Volúmenes de las exportaciones de berries en diferentes países en el 2004	10
2.7	Estacionalidad de la oferta de zarzamora fresca	12
2.8	Composición nutricia de zarzamora en una porción de 100 g aprovechable	14
2.9	Colorantes permitidos en alimentos (exentos de certificación)	18
6.1	Contenido de antocianinas totales,, % de recuperación y fenoles totales obtenidos en extractos de pigmentos de zarzamora	51
6.2	Análisis de varianza en el contenido de antocianinas, % de Recuperación y Fenoles Totales para los factores temperatura y tiempo de extracción, así como su interacción entre ellos	52
6.3	Parámetros colorimétricos obtenidos en extractos de zarzamora	56
6.4	Determinaciones colorimétricas en los extractos de zarzamora	57
6.5	Nivel de significancia de los factores de estudio sobre % retención de antocianinas	61

6.6	Nivel de significancia de los factores de estudio sobre el índice de degradación de antocianinas (ID)	64
6.7	Nivel de significancia de los factores de estudio sobre diferencia neta de color (ΔE)	68
6.8	Análisis de correlación entre el % de retención de antocianinas, índice de degradación de antocianinas (ID) y diferencia neta de color (ΔE) durante el almacenaje	69
6.9	Efecto de la temperatura, pH y luz en los parámetros cinéticos de degradación térmica de antocianinas: k, E_a y $t_{1/2}$	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
2.1	Partes de una planta de zarzamora: a) caña o tallo, b) hojas, c) flor, d) fruto	3
2.2	Evolución de superficie (Ha)-producción (Ton) de zarzamora en México. Periodo 2002-2007	5
2.3	Zonas productoras de zarzamora en Michoacán, 2006.....	7
2.4	Evolución de las exportaciones en México: frambuesa y zarzamora 2000-2005	11
2.5	Estructura básica de antocianinas	20
2.6	Formas estructurales predominantes de antocianinas a diferentes niveles de pH	22
2.7	Cambios estructurales de antocianinas por altas temperaturas	23
2.8	Principio de Pascal en el proceso de alta presión hidrostática	31
5.1	Apariencia de los frutos utilizados para el desarrollo experimental	35
5.2	Diagrama general de extracción de pigmentos.....	36
5.3	Estudio preliminar de tratamientos de alta presión hidrostática (APH)	40
5.4	Diagrama general de estabilidad de pigmentos durante el almacenamiento	42
6.1	Efecto de la interacción entre los factores de temperatura y tiempo en la extracción de fenoles totales (FT)	54
6.2	Actividad enzimática de PPO en extractos de pigmentos antes y después de aplicación de APH	59

6.3	% Retención de antocianinas en extractos sometidos a APH después de 10 días a 25°C	60
6.4	% Retención de antocianinas en extractos de zarzamora durante el almacenamiento a 4, 25 y 45°C, con diferentes pH 1.0, 2.5 y 4.0 y bajo condiciones de luz y oscuridad.	62
6.5	Efecto de interacción entre el factor Luz (con y sin) y la Temperatura (4, 25 y 45°C) sobre el % de retención de antocianinas	63
6.6	Apariencia visual en extractos de zarzamora almacenados por 90 días a 4, 25 y 45°C, con diferentes pH 1.0, 2.5 y 4.0 y bajo condiciones de luz y oscuridad	65
6.7	Índice de degradación de antocianinas en extractos de zarzamora durante el almacenamiento a 4, 25 y 45°C, con diferentes pH 1.0, 2.5 y 4.0 y bajo condiciones de luz y oscuridad	66
6.8	Diferencia neta de color (ΔE) en extractos de zarzamora durante el almacenamiento a 4, 25 y 45°C, con diferentes pH 1.0, 2.5 y 4.0 y bajo condiciones de luz y oscuridad	71
6.9	Efecto de la temperatura sobre la degradación de antocianinas durante el almacenamiento a 4, 25 y 45°C, para los extractos con pH 1.0 y bajo oscuridad	72
6.10	Representación gráfica de ecuación de Arrhenius sobre la degradación de antocianinas en las condiciones evaluadas	73

I. INTRODUCCIÓN

El estado de Michoacán es el principal productor de zarzamora con una superficie sembrada dedicada a este cultivo que representa el 93% del total nacional (3,063.95 Ha) y donde se produce el 96% del total nacional de esta fruta (42,369.12 Ton). La dinámica de crecimiento en este Estado es impresionante si se considera que la producción se elevó 438% durante los años 2002 a 2007. La mayor parte de esta producción se destina al mercado de exportación en fresco donde se comercializa a precios que varían de 15 a 70 pesos/kg dependiendo de la saturación de los mercados de destino. Durante las operaciones de cosecha, se desvía un 20 a 30% de esa producción para usos industriales por no cumplir con las normas de calidad para un producto de consumo en fresco (buena firmeza y ausencia de defectos) la cual se canaliza a diferentes industrias regionales que la compran a un precio estándar de 7 a 8.5 pesos/kg. Por lo tanto es importante buscar alternativas de utilización para el producto de bajo valor comercial que le dé un valor agregado y mejorar así la rentabilidad de la explotación de este fruto.

Una de las alternativas de mejor utilización de la fruta que no cumple las normas del producto fresco, es utilizarla como fuente de pigmentos (antocianinas). El mercado de pigmentos naturales está creciendo dos veces más rápido que el de pigmentos sintéticos y la competencia entre ellos está aumentando dentro de los productos alimenticios y en particular en el sector de bebidas, y en el desarrollo de nuevos productos.

En base a lo anterior, el objetivo de este trabajo fue estudiar el proceso de extracción de pigmentos, para obtener las condiciones de tiempo y temperatura de extracción que proporcionen un buen rendimiento, así como comparar la eficiencia de la aplicación de la pasteurización y altas presiones hidrostáticas (APH) en la estabilidad de los pigmentos conservados a diferentes condiciones de pH, temperatura e iluminación.

II. ANTECEDENTES

2.1. Generalidades de la zarzamora

2.1.1. Clasificación taxonómica

La clasificación taxonómica de la zarzamora, de acuerdo a Reyes-Carmona (2005), es:

Cuadro 2.1. Clasificación taxonómica de la zarzamora.

Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Antofita</i>
Clase	<i>Angiospermae</i>
Subclase	<i>Dicotiledónea</i>
Orden	<i>Rosales</i>
Familia	<i>Rosácea</i>
Género	<i>Rubus</i>
Subgénero	<i>Eubatus</i>
Especie	<i>Fruticosus o ulmifolius</i>
Nombre científico	<i>Rubus fruticosus</i>
Nombre común	Zarzamora, mora

Comercialmente, la frambuesa y la zarzamora (blackberry en inglés) en conjunto con el arándano, la fresa y otros, pertenecen al grupo de los berries o frutillas.

2.1.2. Descripción botánica del género *Rubus*

Planta: Las especies de *Rubus* tienen distintos hábitos de crecimiento desde postradas hasta erectas, arbustos que producen brotes desde la raíz. Son perennes debido a que sus cañas bianuales se superponen en edad. Las raíces están dotadas de una densa red de pelos adventicios. Las cañas crecen vegetativamente por un año, inician la diferenciación en verano, fructifican en el verano siguiente y mueren (Figura 2.1). La corteza de los retoños en la mayoría de los casos se encuentra cubierta de espinas más o menos rígidas según el cultivar. No obstante, existen variedades de corteza sin espinas (Ariel, 2004).

Hojas: Las hojas son alternas, ovoides de 4-5 cm y poseen 3 folíolos, siendo el de en medio el más largo. El haz de las hojas es verde intenso, surcado por nervaduras que le dan un carácter arrugado y el envés gris plateado. Poseen costados aserrados o dentados (Ariel, 2004).

Flores: Estas son pequeñas (1-1,5 cm), blancas o rosadas y nacen en racimos de 10-20 flores por racimo. En algunas zarzamoras las inflorescencias son terminales y cerradas. La diferenciación se produce a fines de verano en tipos bianuales y a mediados de verano como caña primaria. Las flores poseen 5 pétalos poco vistosos y un cáliz grueso de color verdoso. El gineceo posee 60-80 ovarios, cada uno de los cuales desarrolla una drupa. Existen 60-90 estámenes (Ariel, 2004).

Frutos: El fruto es un aquenio, diminutas drupas unidas a un receptáculo. Su color varía de rojas a negro brillante conforme avanza su desarrollo, el peso del fruto va de 3.0 a 7.0 gramos, es de consistencia dura y sabor agridulce a dulce. Su pulpa es rojiza y allí se encuentran las semillas (de 100 a 120). El fruto es altamente perecedero por lo que debe hacerse la cosecha una vez que el fruto ha llegado a su madurez comercial, es decir, color púrpura oscuro y con firmeza adecuada (Ariel, 2004).



Figura 2.1. Partes de una planta de zarzamora: a) caña o tallo, b) hojas, c) flor, d) fruto.

2.1.3. Índices de cosecha y calidad

Generalmente, el índice de cosecha se basa en el color de la superficie de la fruta y en la facilidad de desprendimiento del receptáculo. También pueden tomarse en consideración los sólidos solubles y la acidez titulable. La fruta se debe cosechar casi madura ya que su calidad de consumo no mejora tras la cosecha (Kader y col., 2007).

En México no se cuenta con norma oficial de calidad para este producto. Sin embargo, el índice de calidad esta dado por la apariencia (color, tamaño, forma, ausencia de defectos), firmeza, sabor (sólidos solubles, acidez titulable y compuestos volátiles aromáticos), valor nutritivo (Vitaminas A y C), así como el grado o categorías utilizadas en el país de destino. Por ejemplo, la Corporación PROEXANT (Promoción de Exportaciones Agrícolas No Tradicionales, en Ecuador 2007) sugiere como normas generales para la clasificación de la zarzamora las siguientes:

Calidad extra

- *Tamaño:* 90% de la muestra debe tener las siguientes medidas: 1.5 cm de diámetro en la parte más ancha y 2.5 cm de longitud.
- *Color:* La muestra debe tener un mínimo de 60 % de la superficie de color morado oscuro.
- *Daño por hongos:* No se permiten.
- *Daño por insectos:* Máximo 2% permitido.
- *Presencia de materiales extraños:* No se permiten.

Calidad primera

- *Tamaño:* 90% de la muestra debe tener las siguientes medidas: 1.5 cm de diámetro en la parte más ancha y 2.0 cm de longitud.
- *Color:* No menos del 60% de la superficie con color morado oscuro.
- *Daño físico:* Máximo permitido de 10% por magullamiento, roce o cortaduras.
- *Daño por hongos:* Máximo permisible: 2%.
- *Daño por insectos:* Máximo 2% permisible.
- *Presencia de materiales extraños:* No se permite.

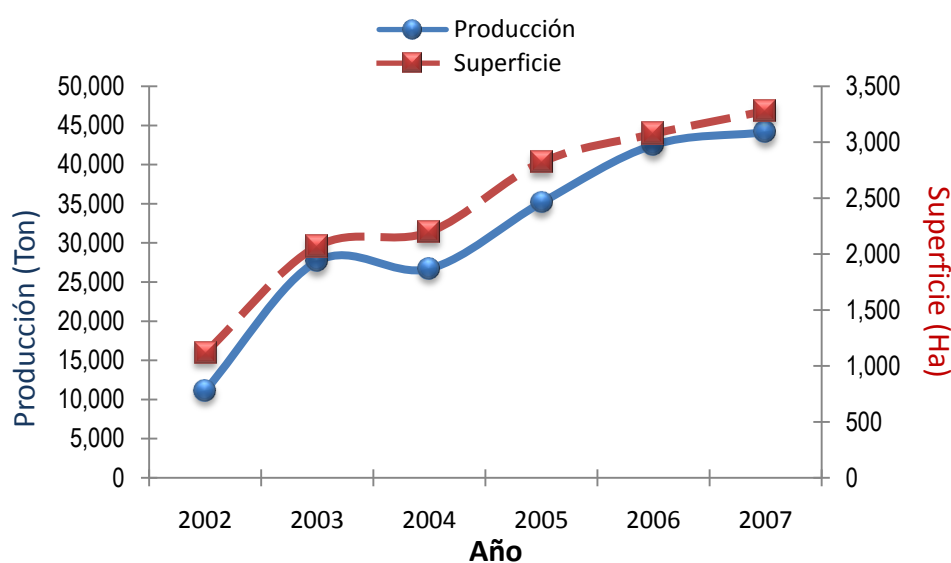
Calidad segunda

- *Tamaño*: El 10% o más de la muestra tiene medidas inferiores a 1 cm de diámetro en la parte más ancha y 2 cm de longitud.
- *Color*: Más del 20% de la muestra tiene una superficie con menos del 60% de color morado oscuro.
- *Daño físico*: Más del 10% en daño físico por magullamiento, roce o cortaduras.
- *Daño por hongos*: Más del 2% de daño visible.
- *Daño por insectos*: Máximo 2% visible.
- *Presencia de materiales extraños*: No se permite.

2.1.4. Importancia nacional de la zarzamora

2.1.4.1. Importancia económica

Aunque la zarzamora tiene una importancia marginal en la agricultura nacional, a partir de 1992 empezó a llamar poderosamente la atención de productores privados y de las dependencias gubernamentales a tal grado que la superficie dedicada a zarzamora se ha incrementado 293%, mientras que la producción a nivel nacional muestra un incremento del 397% durante el periodo 2002 a 2007 (Figura 2.2).



Fuente: SAGARPA, SIAP 2007

Figura 2.2. Evolución de superficie (Ha)-producción (Ton) de zarzamora en México. Periodo 2002-2007.

El estado de Michoacán es el principal productor de zarzamora, la superficie sembrada dedicada a este cultivo representa el 93% del total nacional (3,063.95 Ha) donde se produce el 96% del volumen de esta fruta (42,369.12 Ton) (Cuadro 2.2). Su dinámica de crecimiento es impresionante si se considera que la producción se elevó 438% en el estado durante los años 2002 a 2007 (Cuadro 2.3). En el estado de Michoacán, destaca el municipio de Los Reyes como principal productor con casi el 50% del total (Figura 2.3). La mayor parte de esta producción se destina al mercado de exportación en fresco.

Cuadro 2.2. Producción agrícola nacional de zarzamora, 2007.

Ubicación	Sup. Sembrada (Ha)	Sup. Cosechada (Ha)	Producción (Ton)	Rendimiento (Ton/Ha)	Precio Medio Rural (\$/Ton)	Valor Producción (Miles de Pesos)
BAJA CALIFORNIA	2.00	2.00	80.00	40.00	11,200.00	896.00
CHIHUAHUA	15.00	15.00	352.00	23.47	5,500.00	1,936.00
HIDALGO	11.00	11.00	42.50	3.86	11,505.88	489.00
JALISCO	50.00	26.00	141.60	5.45	7,652.54	1,083.60
MEXICO	32.00	32.00	254.00	7.94	16,523.62	4,197.00
MICHOACAN	3,063.95	3,045.95	42,369.12	13.91	20,138.71	853,259.30
MORELOS	30.00	30.00	15.00	0.50	25,000.00	375.00
NAYARIT	29.00	29.00	266.80	9.20	16,000.00	4,268.80
TOTAL	3,279.45	3,237.45	44,135.52	13.63	19,972.58	881,500.10

Fuente: SAGARPA, SIAP, 2007

Cuadro 2.3. Anuario estadístico de la producción agrícola zarzamora en Michoacán 2002-2007.

Año	Superficie Sembrada (Ha)	Superficie Cosechada (Ha)	Producción (Ton)	Rendimiento (Ton/Ha)	Precio Medio Rural (\$/Ton)	Valor Producción (Pesos)
2007	3,063.95	3,045.95	42,369.12	13.91	20,138.71	853,259.30
2006	2,872.30	2,848.95	40,841.13	14.34	17,000.95	694,337.90
2005	2,602.10	2,461.25	33,974.45	13.800	18,421.22	625,850,880.00
2004	2,033.30	2,003.30	25,568.85	12.763	23,750.01	607,260,374.41
2003	1,928.86	1,883.85	26,983.69	14.324	20,236.54	546,056,542.24
2002	936.95	877.95	9,651.60	10.993	14,700.55	141,883,790.26

Fuente: SAGARPA, SIACON 2007.

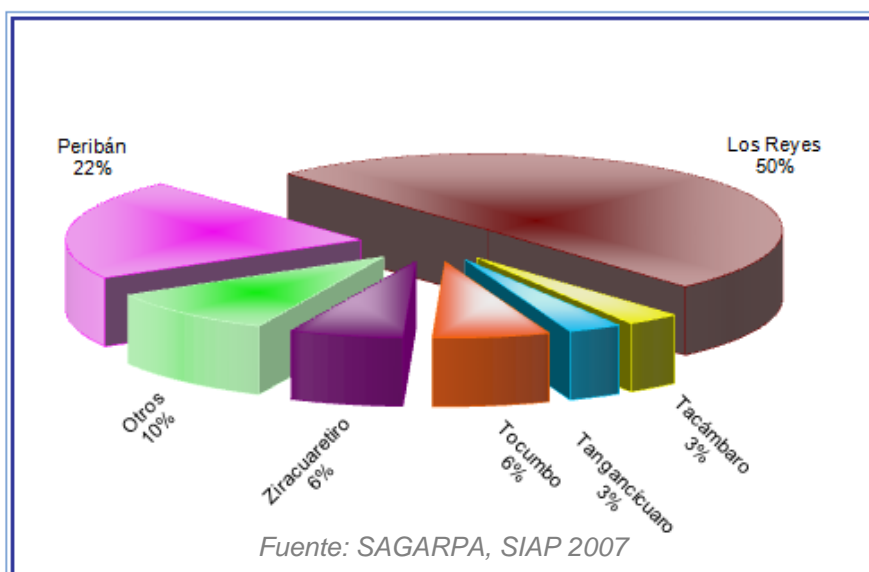


Figura 2.3. Zonas productoras de zarcamora en Michoacán, 2006.

La comercialización del producto está dada porque permite consumirla en fresco, así como congelada y utilizada en jugos, dulces, helados, néctares, mermeladas, pastelería y postres.

Entre las principales razones que explican el interés despertado en este cultivo, sobre todo en el ámbito de las dependencias gubernamentales, destacan cinco (Merchand, 2004):

- 1) Elevada rentabilidad.
- 2) Rápido retorno de la inversión; a partir del segundo año.
- 3) Uso intensivo de mano de obra (900 jornales por hectárea).
- 4) Versatilidad de los frutos para su consumo y
- 5) Grandes posibilidades de exportación.

2.1.4.2. Principales variedades cultivadas

Las variedades que actualmente encontramos se han originado de cruza genéticas entre varias especies que presentan características morfológicas heterogéneas, por lo que no es extraño que estas variedades difieran entre sí en cuanto a su hábito de crecimiento y al tipo de fruta.

Por esta razón, las moras se han clasificado según su hábito de crecimiento (erecto, semierecto o rastrero) y la presencia o ausencia de espinas (característica que puede ser otorgada por la hibridación). Entre las zarzamoras erectas se encuentran las variedades de boysenberries, loganberries, youngberries y, la más moderna de todas: tayberries. De estas la más cultivada es la boysenberries, de frutos grandes negros y redondos, y los loganberries, de frutos alargados, ligeramente opacos y rojizos. El grupo de zarzamoras postradas se caracteriza porque sus variedades tienden a desarrollarse arrastradas, son de hábito agresivo y poseen espinas numerosas y robustas, generalmente en forma de gancho (Muñoz y Juárez, 1995).

Hasta hace unos años, la variedad más cultivada en México era la 'Brazos', sin embargo, recientemente se introdujo la variedad 'Tupi' o '*Brasileña*' y que está desplazando a la variedad 'Brazos', estimándose que en 5 años la superficie sembrada de zarzamora corresponderá en un 100% a esta variedad.

La variedad '**Tupi**' es resistente a algunas enfermedades y, a diferencia de 'Brazos', tiene una sola floración en una época distinta a las demás, lo cual le permite incrementar la producción destinada a exportación. Sin embargo, es sensible al *Botritis cinerea* y a la pudrición de raíz, lo que dificulta su cultivo (Reyes-Carmona, 2005). Tiene mayor aceptación en el mercado por sus características organolépticas, es de menor tamaño que 'Brazos', pero con frutos más dulces y jugosos.

La variedad '**Brazos**' fue originada en Texas y liberada en 1959. Tiene un hábito de crecimiento semi-erecto, vigorosa y desparramada, lo que obliga a establecer menos plantas por hectáreas. La floración es temprana y prolongada, lo que conlleva a largos períodos de cosecha. Tarda 56 días de flor a fruto y este es grande (2.5 cm de diámetro y peso de 6.8 gramos). Produce racimos pequeños y semillas grandes. Prospera bien en suelos húmedos de montaña, dado su extenso sistema radicular (Muñoz y Juárez, 1995).

2.1.5. Comercio internacional

2.1.5.1. Producción

En lo que respecta a la producción reportada por la FAO, para el año 2004, el principal continente productor fue Asia, con un 71% de la producción mundial, seguida de Oceanía con el 16% y un 5.5% para Europa y Norteamérica respectivamente (Cuadro 2.4).

Cuadro 2.4. Principales productores mundiales de berries, 2004.

<i>Lugar mundial</i>	<i>País (es)</i>	<i>Producción (x 1000 Ton)</i>
1	Irán, Rep. Islámica de	175.00
2	Vietnam	123.00
3	Nueva Guinea	102.00
4	Afganistán	57.00
5	Turquía	55.00
6	China	31.50
7	Estados Unidos de América	23.76
8	México	11.00
9	Austria	10.00
10	Romania	5.20

Fuente: FAOSTAT. FAO 2008

Se estima que la producción mundial de berries en el 2004 fue alrededor de 649,964 toneladas, ocupando México el 8º lugar (Cuadro 2.4). De manera general la producción se destina en su mayor parte a producto congelado (75%).

Es importante destacar, que las cifras reportadas para México por la FAO, se encuentran muy por debajo de los valores reales esperados de acuerdo a los datos reportados por SAGARPA (Cuadro 2.2 y 2.3).

2.1.5.2. Importación y exportación zarzamora en México

En los cuadros 2.5 y 2.6, se muestran los 10 países más importantes en lo referente a importación y exportación de berries a nivel mundial para el año 2004:

Cuadro 2.5. Volúmenes de las importaciones de berries en diferentes países en el 2004.

<i>Lugar mundial</i>	<i>País</i>	<i>Importación (x 1000 Ton)</i>
1	Estados Unidos de América	8.569
2	Alemania	5.011
3	Japón	2.098
4	Reino Unido	2.072
5	Italia	1.975
6	Suecia	1.779
7	Austria	1.696
8	Francia	1.186
9	Finlandia	0.922
10	Países bajos	0.886
30	México	0.049

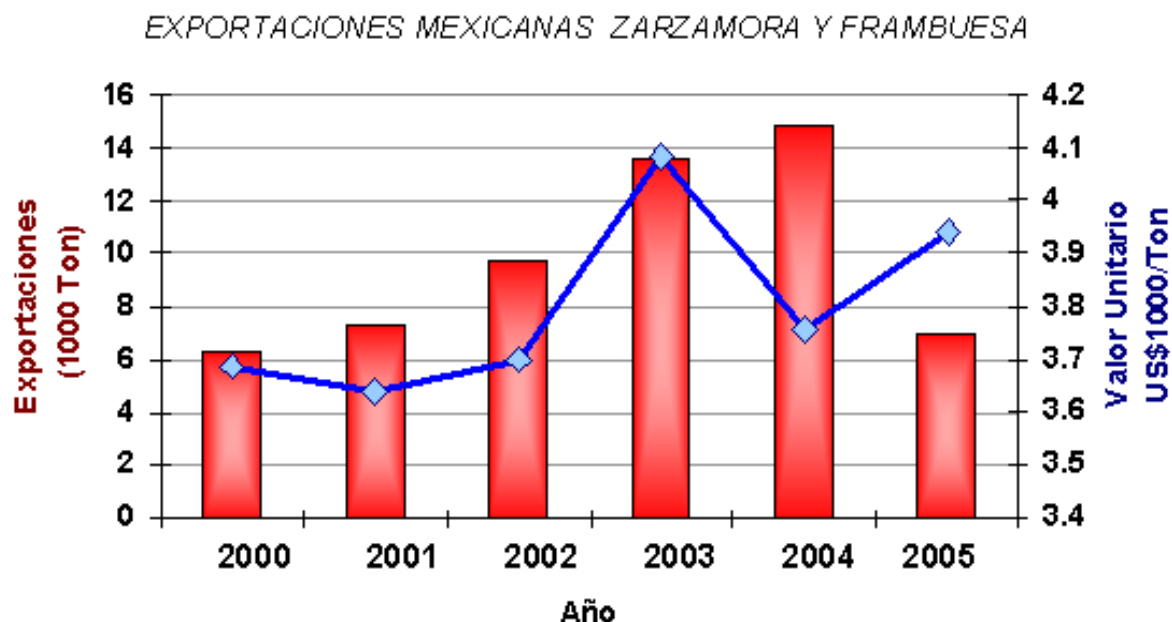
Fuente: FAOSTAT. FAO 2008

Cuadro 2.6. Volúmenes de las exportaciones de berries en diferentes países en el 2004.

<i>Lugar mundial</i>	<i>País</i>	<i>Exportación (x 1000 Ton)</i>
1	Estados Unidos de América	35.090
2	México	9.881
3	Hungría	7.265
4	Federación Rusa	4.147
5	Serbia y Montenegro	1.753
6	Argentina	1.558
7	España	1.491
8	Israel	1.456
9	Italia	1.342
10	Países bajos	0.979

Fuente: FAOSTAT. FAO 2008

México ocupa el 2º lugar en la exportación mundial de berries, aportando en el 2004 cerca del 10% en exportación global de frambuesas y zarzamoras (Cuadro 2.6, Figura 2.4), teniendo como principal mercado de destino a EE.UU. con el 96% (Morales-Troncoso y Alba-Aldave, 2005).



Fuente: Elaboración propia con datos de la FAOSTAT 2008

Figura 2.4. Evolución de las exportaciones en México: frambuesa y zarzamora 2000-2005.

A la par con el dinamismo que ha registrado el establecimiento de nuevas plantaciones, el comercio exterior también tiende a adquirir cada vez mayor importancia. Dentro de esto, los congelados son una presentación en crecimiento en los envíos al exterior; no obstante, es la exportación en fresco la que permite obtener los precios más atractivos, superiores hasta en 300% con respecto a los congelados.

2.1.5.3. Estacionalidad

El periodo en que se desarrolla la producción de zarzamora en Estados Unidos va de mayo hasta agosto, alcanzando su mayor nivel en el mes de junio.

La exportación de zarzamora de Nueva Zelanda se destina mayoritariamente a Estados Unidos fuera de temporada, entre los meses de diciembre a marzo y la producción de Chile, que también se destina a Estados Unidos en estado fresco, se ubica entre enero y abril, por lo que compite con Nueva Zelanda en ese periodo.

Debido a que en los meses de septiembre a diciembre se registra un desabasto, países como México, Guatemala y Colombia, en menor medida, tienen la oportunidad de producir zarzamora para cubrir esa ventana del mercado.

Cuadro 2.7. Estacionalidad de la oferta de zarzamora fresca.

Proveedor	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Estados Unidos												
California												
Washington												
Oregón												
Florida												
Colombia												
Chile												
Guatemala												
Nueva Zelanda												
México												

Muñoz-Juárez, 1995

Como se puede apreciar (Cuadro 2.7), el mercado de zarzamora en EE.UU. es disputado por cinco países que tienen las mismas posibilidades de concurrir en la misma época que México, lo que de entrada plantea la necesidad de implementar estrategias tendientes a diferenciar el producto mexicano (Muñoz y Juárez, 1995).

2.1.5.4. Regulaciones al comercio

Las regulaciones al comercio internacional de la frambuesa y zarzamora se pueden clasificar en dos grandes grupos: a) regulaciones arancelarias y, b) regulaciones no arancelarias (Muñoz y Juárez, 1995).

a. Regulaciones arancelarias

A partir de 1998, Estados Unidos, principal destino de las exportaciones de frambuesa y zarzamora, no aplica ninguna regulación arancelaria para el producto de México, de igual forma para la zarzamora de Canadá.

b. Regulaciones no arancelarias

Estas regulaciones pueden ser de dos tipos: cuantitativas y cualitativas. En frambuesa y zarzamora no existe ningún tipo de regulaciones de carácter cuantitativo (permisos previos, cuotas, precios oficiales, impuestos compensatorios y antidumping) que limiten el comercio entre países. Sin embargo, en lo que se refiere a las regulaciones de tipo cualitativo existen una serie de medidas que más que limitar el comercio, realmente lo regulan y le dan transparencia y seguridad a los consumidores. Entre las principales destacan las normas de calidad y las regulaciones sanitarias y fitosanitarias.

Regulaciones de calidad

La calidad de un producto hortofrutícola es una combinación de características, atributos y propiedades que le otorgan valor como alimento para el hombre, o características que determinan que un cierto producto sea del gusto de un consumidor medio o de un sector al cual se desea satisfacer con dicho producto. La exportación de zarzamora de calidad adecuada, homogénea y constante en el tiempo, constituye un factor decisivo al desarrollo y manutención del prestigio de los productos en el mercado de destino. Esto implica cumplir una serie de exigencias principalmente referentes a:

- Características de calidad propiamente, dispuestas por el comprador o establecidas de acuerdo a normas o estándares: calibre, color, tolerancia de defectos, madurez, etc.
- Fitosanidad.
- Tolerancia de residuos de pesticidas.
- Características de los envases y embalajes.

En México las exigencias relativas a calidad comercial son de responsabilidad exclusiva de la empresa privada, ya que no existe control de calidad obligatorio, ni tampoco existe una norma oficial de calidad (Muñoz y Juárez, 1995).

2.1.6. Composición química del fruto

El fruto contiene aproximadamente 80% de agua, entre 7 y 16% de azúcares, 3% de compuestos nitrogenados, así como diversos ácidos orgánicos, algunos formando sales (succinatos, oxalatos, malatos, citratos, lactatos y salicilatos), por lo que las zarzamoras son una excelente fuente de vitaminas, minerales, carbohidratos, fibra y agua (Reyes-Carmona, 2005). En el Cuadro 2.8 se muestra la composición nutricia de esta fruta, según el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA):

Cuadro 2.8. Composición nutricia de zarzamora en una porción de 100 g aprovechable.

Componente	Contenido	Componente	Contenido
Humedad (g)	82.21	Calcio (mg)	29.00
Energía (Kcal)	64.00	Hierro (mg)	2.2.00
Proteína (g)	1.18	Magnesio (mg)	22.00
Lípidos totales (g)	0.43	Fósforo (mg)	30.00
Carbohidratos por diferencia (g)	15.67	Potasio (mg)	140.00
Fibra total dietaría (g)	5.00	Ácido ascórbico (mg)	3.100
Ceniza (g)	0.51	Riboflavina (mg)	0.046
Azúcares totales (g)	10.67	Tiamina (mg)	0.029
		Niacina (mg)	1.207
		Ácido pantoténico (mg)	0.151
		Caroteno (mcg)	68.000

USDA, 2006

2.1.6.1. Usos de la zarzamora

Los frutos pueden ser consumidos en diferentes formas: frescos, como jugo, mermelada, budín, jarabe, helados, yogurt, vinos, licores, refrescos, etc. Los pétalos también son comestibles, generalmente se añaden a ensaladas para

lograr un efecto visual. Los retoños son comestibles, pero son muy astringentes, aunque pueden ser consumidos, hervidos o cocinados. Las hojas tienen usos medicinales, bactericidas, antidiarreicos y diuréticos, en infusión se emplean contra cistitis, disentería, hemorroides y desórdenes estomacales, dolor de garganta, boca y úlceras e inflamaciones intestinales y desórdenes metabólicos (Reyes-Carmona, 2005).

Algunos colorantes pueden ser obtenidos de varias partes de la planta: del fruto se obtiene tinte gris para algodón, azul para pizarras; de los brotes o retoños se obtiene el gris oscuro, además las zarzamoras son fuentes de néctar para abejas, y excelentes barreras biológicas contra animales (Reyes-Carmona, 2005).

2.1.7. Problemática del cultivo

Aunque la zarzamora es más productiva que las frambuesas, su comercialización en fresco se ve afectada por el grado de perecibilidad de sus frutos pues la conservación de la fruta en condiciones óptimas de calidad, tales como sanidad, apariencia, palatabilidad y valor nutritivo, son de las limitantes de mayor consideración (Piña y col., 2001).

Los principales problemas que se tienen en México relacionados con la fruta son los que se mencionan a continuación (Reyes-Carmona, 2005):

- ◆ Elevadas pérdidas en poscosecha, las cuales aumentan en la época de mayor producción en EE.UU. la que genera una disminución en la demanda de la fruta mexicana.
- ◆ El bajo consumo per cápita de zarzamora en México, que puede deberse a que el consumidor mexicano tiende a consumir frutos dulces, dejando de lado los ácidos, razón por la cual los productores se ven en la necesidad de buscar destinos de exportación de su cosecha.

- ◆ La zarzamora es un producto altamente perecedero, por lo que su comercialización y consumo deben efectuarse en menos de 10 días, evitando así que sus propiedades físicas, químicas y nutracéuticas sean alteradas, llevando a la pérdida total del producto.
- ◆ La zarzamora es afectada por plagas y enfermedades, siendo las más comunes la pudrición del fruto (*Botrytis cinerea*), la cenicilla polvorienta (*Oidium* sp.) y la araña roja (*Tetranychus* ssp.) que ocasionan enormes pérdidas económicas.
- ◆ El poco o nulo conocimiento por parte de la población mexicana de la riqueza nutricional de la zarzamora.

2.1.7.1. Propuestas para el aprovechamiento de la zarzamora

Entre las opciones para evitar pérdidas en poscosecha y lograr que el cultivo sea más rentable, están las siguientes (Reyes-Carmona, 2005):

- Industrialización del producto (jaleas, mermeladas, licores, fermentados, congelados, liofilizados)
- Obtención de subproductos (extractos, saborizantes, colorantes, otros).
- Promoción de su consumo a través de demostrar la bondad de sus compuestos con cualidades nutracéuticas importantes del fruto.

2.2. Extracción de pigmentos

Los pigmentos son compuestos químicos que absorben la luz en un rango de longitud de onda visible. Estos compuestos producen color a través de una estructura específica (cromóforo); la que captura la energía y la excitación del electrón del orbital externo. La energía no absorbida es reflejada y/o refractada para ser capturada por el ojo y ser interpretado como un color (Delgado-Vargas y col., 2000).

Los pigmentos pueden ser clasificados por su origen como naturales (orgánicos o inorgánicos) y sintéticos. Pigmentos naturales orgánicos, son los producidos por organismos vivientes como las plantas, animales, hongos y microorganismos, mientras que los inorgánicos son de origen mineral; los pigmentos sintéticos son obtenidos por la síntesis química en un laboratorio.

2.2.1. Importancia de los pigmentos naturales

El aspecto de un alimento es la primera clave de su identificación y con frecuencia predice el grado de satisfacción o placer que se obtendrá en comerlo. El color resulta uno de los factores más importantes responsables de la aceptación o rechazo de los alimentos: por un lado puede ser indicativo de frescura en el alimento, pero por otro lado, las variaciones en su intensidad pueden dar falsas ideas al consumidor de que el alimento estuvo sujeto a un proceso mal controlado.

A principios del siglo XX fueron sintetizados un gran número de colorantes para ser adicionados en alimentos. A mediados de ese siglo se comenzó a regular su uso, debido a que muchos de ellos representan riesgos para la salud. Ante los colorantes sintetizados vía química, los naturales tienen algunas desventajas, como son su estabilidad e intensidad de color. El calor, oxígeno, pH y luz son algunos de los factores que afectan la estabilidad de los pigmentos naturales, por lo que su uso en alimentos es aún limitado (Attoe y Von Elbe, 1981; Cohen y Saguy, 1983; Jackman y col., 1987).

Sin embargo, a finales del siglo XX, el mercado ha sufrido un cambio en donde se muestra una fuerte tendencia hacia el consumo de productos de origen natural.

Por considerar a los pigmentos como aditivos alimenticios, su clasificación por la FDA queda establecida en las siguientes categorías:

- *Colorantes FD&C*: certificados para uso en alimentos, drogas y cosméticos.

- *Colorantes D&C*: Utilizados en drogas y cosméticos o usados en contacto directo con las mucosas.
- *Colorantes Ext. D&C*: Colorantes que por su toxicidad oral no son certificados para uso en productos para consumo humano, pero que son considerados seguros para su uso en productos aplicados externamente.

En el Cuadro 2.9 se muestran algunos de los colorantes exentos de certificación, porque provienen de fuentes naturales y que están aprobados por la FDA (Sección 73, Capítulo I).

Cuadro 2.9. Colorantes permitidos en alimentos (exentos de certificación).

NOMBRE OFICIAL DE LA FDA	USOS Y/O RESTRICCIONES
Anato (Extracto de achiote)	Sin restricción
β -apo-8'-carotenal	Máximo 15 mg/lb de alimento sólido o semisólido
Canthaxantina	30 mg/lb de alimento sólido o semisólido
Caramelo	Sin restricción
β -caroteno	Sin restricción
Carmín (extracto de cochinilla)	Sin restricción
Extracto de betabel (remolacha)	Sin restricción
Extracto de cáscara de uva	Bebidas no alcohólicas
Paprika	Sin restricción
Azafrán	
Extracto y harina de <i>Tagetes</i>	Aves solamente 1% (w/w)
Azul ultramarino	
Cúrcuma, oleoresina de cúrcuma	Sal colorante

Por otro lado, según la norma oficial mexicana NOM-119-SSA1-1994, los colorantes permitidos para uso alimentario, son los siguientes: aceite de zanahoria, achiote, azafrán, β -Apo-8'-Carotenal, betabel deshidratado, β -caroteno, cantaxantina, color caramelo, clorofila, cochinilla (carmín), cúrcuma (polvo y oleoresina), extracto de color de uva, extracto de tegumento de uva, harina de semilla de algodón, jugos de frutas, jugos de vegetales, pimentón en polvo, páprika, oleoresina de pimentón, riboflavina, riboflavina-5-fosfato, éster apocarotenoico y xantófilas.

El uso de colores naturales se considera como proceso ecológico sostenible y no-peligroso. Las condicionantes para estos son los costos y la regulación. En los últimos años se ha cuestionado la seguridad de colorantes sintéticos como el rojo No. 2, el rojo No. 4 y el rojo No. 44, entre otros, ya que algunos de ellos han mostrado toxicidad en bioensayos. Las restricciones al empleo de colorantes rojos certificados, las nuevas fuentes potenciales de colorantes, el desarrollo tecnológico de producción y la demanda del consumidor han estimulado el interés mundial en el desarrollo de colorantes naturales con funcionalidad mejorada. Las opciones de fuentes naturales de color rojo son las betalaínas, el ácido carmínico, ciertos carotenos y las antocianinas (Rodríguez-Saona y col., 2001; Lugo, 2003; Kakali y col., 2004).

2.2.2. Generalidades de las antocianinas

La palabra antocianina deriva del griego *anthos* (flor) y *kianos* (azul oscuro). Las antocianinas son un grupo de pigmentos solubles en agua, responsables del color azul, naranja, rojo, violeta y magenta. Después de la clorofila, es el pigmento visible al ojo humano más importante. Las antocianinas se han consumido por miles de años sin ningún efecto nocivo evidente sobre salud humana, por lo que se consideran inofensivas. Esto la convierte en una alternativa importante en la industria alimentaría como aditivo seguro y efectivo. Además se ha reportado que tiene un efecto terapéutico (Jackman y col., 1987; Rodríguez-Saona y col., 2001; Douglas, 2002; Yong Ju y Howard, 2003).

Las antocianinas pertenecen a los compuestos fenólicos llamados flavonoides con una estructura básica $C_6C_3C_6$, tienen un núcleo flaván, basado en dos anillos aromáticos unidos por una unidad de tres carbonos en los anillos aromáticos A y B (Figura 2.5), los grupos hidroxilo u otros grupos son sustituidos en ciertas posiciones determinadas por el origen biosintético de los dos anillos aromáticos. La función más importante de las antocianinas, en la naturaleza, es la percepción visible para la atracción de animales para propósitos de polinización y dispersión de las semillas (Fennema, 1993; Delgado-Vargas y col., 2000).

2.2.3. Estructura química

Todas las antocianinas son derivados del catión flavilio básico (Figura 2.5). Un pigmento antociánico está compuesto por un aglicón (una antocianidina) esterificada por uno o más azúcares, según su proporción relativa son: glucosa, ramnosa, galactosa, xilosa y arabinosa. La molécula de azúcar puede esterificarse con una o más moléculas de ácido ρ -cumárico, ferúlico, caféico o acético (Fennema, 1993).

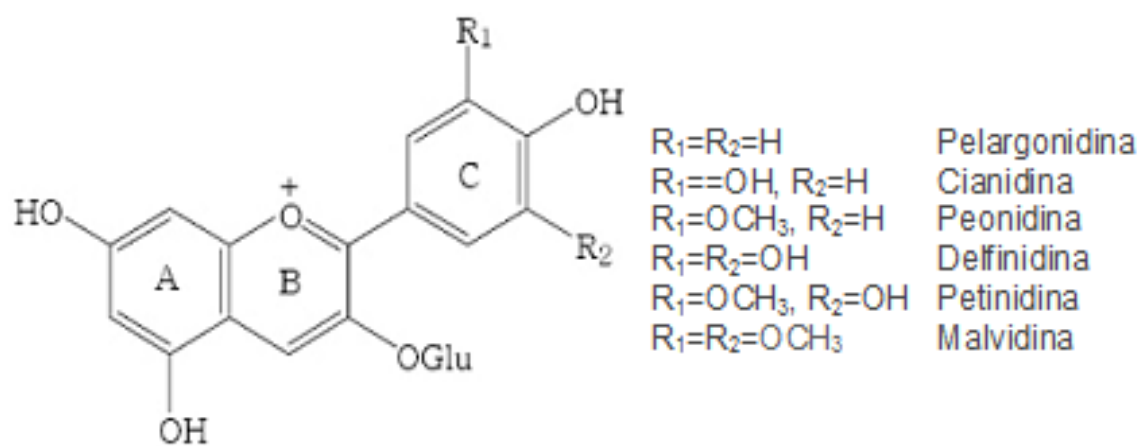


Figura 2.5. Estructura básica de antocianinas.

2.2.4. Biosíntesis

Los compuestos fenólicos son sintetizados por rutas diversas, entre las cuales, dos son básicas: la ruta del ácido shikímico y la ruta del malonato. En la ruta del ácido shikímico se convierten carbohidratos simples derivados de la glicólisis, de la ruta de las pentosas fosfato y del ciclo de Calvin en diversos ácidos orgánicos como el cinámico, ácido ρ -cumárico, ferúlico, caféico, clorogénico o fenilalanina, esta última es incorporada a la porción C_6-C_3 de la estructura básica de los flavonoides, que correspondería al anillo aromático B y a los carbonos correspondientes al anillo central de pirano (Figura 2.5). Por el otro lado, el anillo A y el oxígeno del anillo pirano son proporcionados por la Acetil-CoA (Delgado-Vargas y col., 2000).

2.2.5. Estabilidad de las antocianinas

El núcleo de flavilio de los pigmentos antociánicos es deficiente en electrones y por tanto, muy reactivo. Las antocianinas muestran gran estabilidad bajo condiciones ácidas, pero son generalmente inestables y degradadas por varios posibles mecanismos, cuyas reacciones implican, por lo general, la decoloración de los pigmentos. Algunos de los factores que influyen en la estabilidad incluyen el pH, temperatura, luz, oxígeno, enzimas, la presencia de ácido ascórbico, copigmentos, iones metálicos, y azúcares (Shrikhande, 1976; Jackman y col., 1987; Fennema 1993; Delgado-Vargas y col., 2000).

2.2.5.1. pH

El pH tiene una marcada influencia en las soluciones de color de antocianinas; las antocianinas se comportan como indicadores de pH como resultado de su carácter anfotérico. Por debajo de pH 3, las soluciones de antocianinas muestran una coloración roja intensa. Cuando el pH incrementa, su color rojo normal cambia hasta el punto en que aparece descolorido en el rango de pH de 4 a 5. Conforme incrementa el pH, se presentan cambios en el color a violeta o azul, y esas, bajo almacenaje o tratamientos térmicos, se han observado un cambio en su pigmentación de azul a amarillo (Wrolstad y col., 2004).

En solución acuosa, las antocianinas existen en 4 formas de equilibrio principales: base quinodal (A), catión flavilio (AH⁺), el carbinol o pseudobase (B) y la chalcona (C), (Figura 2.6). Por lo tanto, la pérdida de color en antocianinas es dependiente del pH por el equilibrio de las 4 formas, en la cual el catión flavilio es la más estable y colorida. Por lo anterior, una de las desventajas de las antocianinas como colorantes de alimentos es la ausencia de color en soluciones ligeramente ácidas o neutras (Shrikhande, 1976; Jackman y col., 1987; Delgado-Vargas y col., 2000; Laleh y col., 2006).

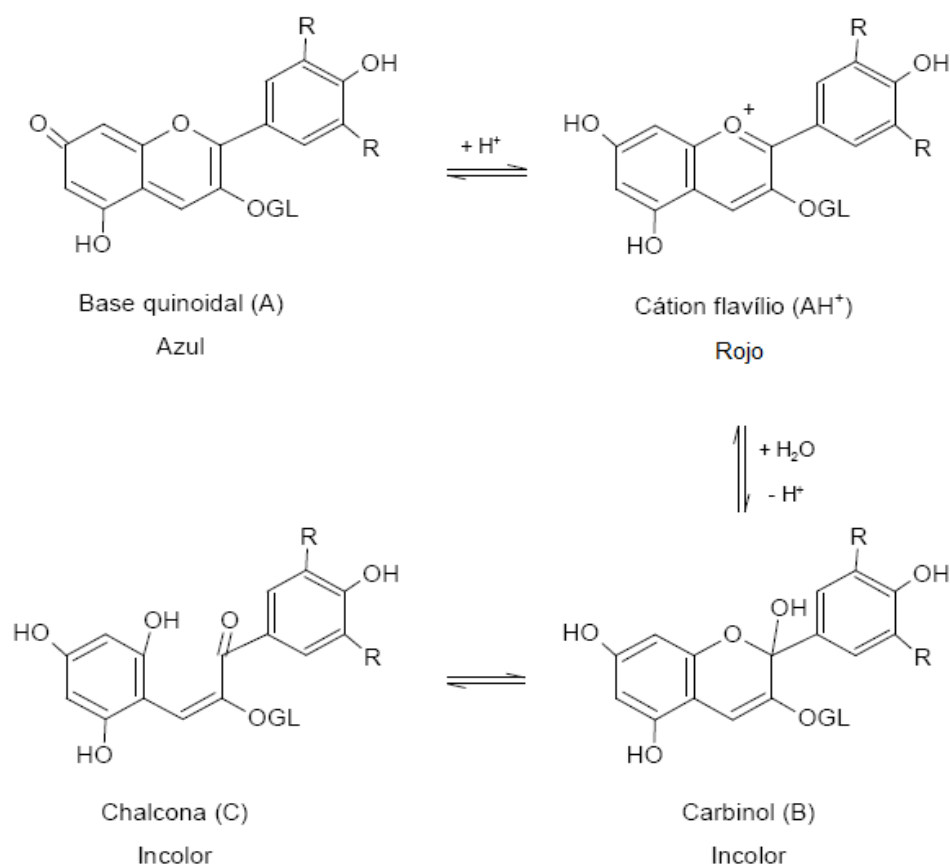


Figura 2.6. Formas estructurales predominantes de antocianinas a diferentes niveles de pH.

2.2.5.2. Temperatura

La tasa de degradación de antocianinas, en sistemas modelos o naturales, está influida notablemente por la temperatura. Altas temperaturas y pH entre 2-4 inducen la pérdida de los grupos glucosídicos de las antocianinas por hidrólisis de las uniones glucosídicas, dando como consecuencia una pérdida de color. Se ha postulado que la formación de chalconas es el primer paso en la degradación térmica, dando como resultado pigmentos pardos, estas son posteriormente reorganizadas a ciertos compuestos aun no identificados (Figura 2.7), (Shrikhande, 1976; Jackman y col., 1987; Delgado-Vargas y col., 2000; Rein, 2005; Laleh y col., 2006).

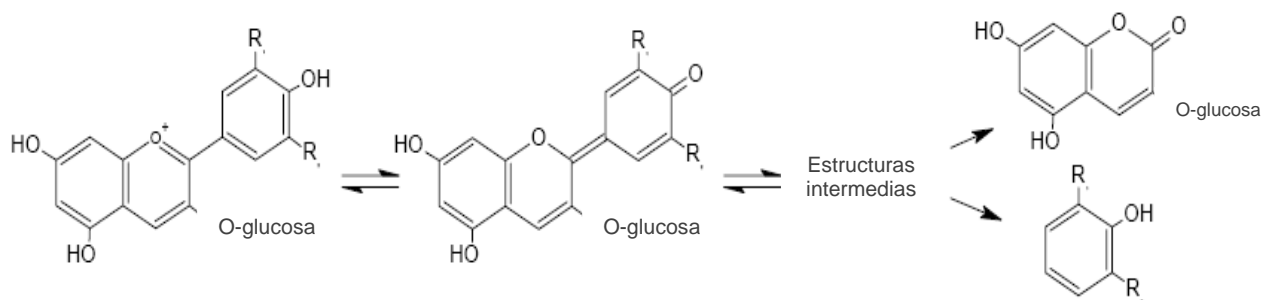


Figura 2.7. Cambios estructurales en antocianinas por altas temperaturas.

Las antocianinas resisten bien los procesos térmicos como los de alta temperatura y tiempo corto (HTST, por sus siglas en inglés). A temperaturas por arriba de 60°C se degradan según una cinética de primer orden (Timberlake, 1980). En general, las características estructurales que conducen a una mayor estabilidad al pH son las mismas que conducen a una mayor estabilidad térmica. Por lo tanto, las antocianinas altamente hidroxiladas son menos estables térmicamente que las metiladas, glicosiladas o acetiladas (Jackman y col., 1987; Fennema 1993). Es por ello que la estabilidad a este factor puede estar influida por el origen de las antocianinas.

2.2.5.3. Luz

La luz afecta a las antocianinas de dos diferentes formas: 1) es esencial para la biosíntesis de antocianinas, 2) también acelera su degradación, por lo que preservan mucho mejor su color cuando son mantenidas en la oscuridad (Laleh y col., 2006). Se ha propuesto que los productos finales de la degradación de antocianinas inducida por la luz pueden ser los mismos que en la degradación térmica (Figura 2.7). Sin embargo, la vía de esta cinética de degradación es diferente, ya que implica la excitación del catión flavilio (Figura 2.6) (Rein, 2005).

2.2.5.4. Oxígeno

El oxígeno y la temperatura son los agentes que más aceleran la destrucción de antocianinas en jugos de frutas de arándano, grosella, cereza, frambuesa, uva y fresa. El oxígeno puede causar efectos degradativos a través de mecanismos directos oxidativos y/o a través de oxidación indirecta por la cual oxidantes en el medio son capaces de reaccionar con las antocianinas y producir decoloración o pardeamiento de los pigmentos. El peróxido de hidrógeno también muestra efecto destructivo contra las antocianinas, produciendo una rotura de los productos y llevando a la formación de precipitados en jugos de frutas de residuos pardos (Jackman y col., 1987).

2.2.5.5. Enzimas

En poscosecha, la pérdida de antocianinas ha sido atribuida a sistemas activos de las enzimas glucosidasas y fenolasas, que hidrolizan los grupos 3-glicosídicos de las antocianinas, generando agliconas inestables. Además de estas enzimas, la polifenoloxidasas es responsable del pardeamiento enzimático de frutos y vegetales durante el manejo poscosecha y el procesado: compuestos fenólicos y polifenoloxidasas se encuentran en diferentes compartimientos, sin embargo, daños celulares o el contacto natural entre estos compuestos, resulta en la formación de pigmentos pardos que afectan el mercado, calidad sensorial y valor nutricional del fruto o pigmento en cuestión (Shrikhande, 1976; Jackman y col., 1987; Weemaes y col., 1998). La aplicación de dióxido de azufre o los tratamientos térmicos se han sugerido como métodos de inactivación de la polifenol oxidasas (Shrikhande, 1976).

2.2.5.6. Ácido ascórbico

El ácido ascórbico es un compuesto muy común en una amplia variedad de frutas. El contenido varía dependiendo del tipo de fruta, su estado de madurez, y la intensidad de luz durante su crecimiento. Se ha observado que en presencia de oxígeno, el ácido ascórbico destruye las antocianinas y forma

peróxido de hidrógeno durante la oxidación del mismo. Esta reacción se acelera en presencia de cobre y es inhibida en presencia de flavonoles como quercetina. El H_2O_2 actúa rompiendo el anillo de pirilio de la antocianina por un ataque nucleofílico en el C2 produciendo ésteres incoloros y derivados de la cumarina. Estos productos de la degradación son totalmente destruidos y polimerizados para formar precipitados cafés (Jackman y col., 1987).

2.2.5.7. Complejos con metales

La desestabilización de antocianinas también puede ser ocasionada por la formación de complejos con hierro, estaño, aluminio, cobre o varios otros iones metálicos. Esos complejos, normalmente, pueden causar efectos batocrómicos (desplazamiento a longitudes de onda mayores del máximo de absorbancia) de un color rojo a azul o colores violetas estables (Jackman y col., 1987). Se ha demostrado que el acomplejamiento con metales puede incrementar y estabilizar el color de las antocianinas en los alimentos, pero los mismos también pueden provocar pérdidas de color, ya que se ha considerado la capacidad de los metales como cobre y hierro para actuar como catalizadores redox generando un resultado neto negativo. También se ha sugerido que los complejos metálicos juegan solo un papel menor en el color de los productos de las plantas (Shrikhande, 1976; Delgado-Vargas y col., 2000).

2.2.5.8. Reacciones de copigmentación y condensación

La copigmentación actúa produciendo un efecto hiperocrómico en las antocianinas (incremento en la absorbancia a una longitud de onda visible, mayor color). Existe una amplia cantidad de compuestos que pueden llevar a cabo la tarea de copigmentación, como: flavonoides, polifenoles, alcaloides, aminoácidos y antocianinas, entre otros. Cuando la concentración de pigmentos es relativamente alta, las antocianinas mismas pueden actuar como copigmentos. La copigmentación es un mecanismo de interacción molecular que evita el ataque nucleofílico del agua evitando la decoloración del pigmento.

El mecanismo de asociación entre antocianinas y copigmentos involucra puentes de hidrógeno. La copigmentación intramolecular es más eficiente en la estabilización de antocianinas que la copigmentación intermolecular (Shrikhande, 1976; Jackman y col., 1987).

Las antocianinas aciladas generalmente muestran una respuesta menor a reacciones de copigmentación que los pigmentos no acilados. Los efectos de copigmentación pueden ocurrir en conjunción con complejos metálicos, a excepción en la copigmentación intramolecular, que es más frecuente bajo esta regla. La formación de copigmento produce un incremento en la absorbancia del mismo a una longitud de onda visible (efecto hiperocrómico) y un desplazamiento a longitudes de onda mayores del máximo de absorbancia (efecto batocrómico). Cuando las antocianinas se encuentran en medio acuoso, el efecto de la copigmentación depende del tipo y de la concentración de la misma, así como del copigmento, la temperatura, el pH y la composición del medio. Cabe mencionar que la copigmentación se lleva a cabo en un rango de pH ácido (Shrikhande, 1976; Jackman y col., 1987; Delgado-Vargas y col., 2000).

2.2.5.9. Azúcares

Los azúcares a altas concentraciones estabilizan a las antocianinas. Esto es debido a que a altas concentraciones de sacáridos se tiene una baja actividad de agua, que es uno de los factores de degradación de antocianinas, por el ataque nucleofílico al catión flavilio que ocurre en el C2 formando la base carbinol incolora. Por otro lado, cuando los azúcares están en baja concentración no tendrán efecto sobre la actividad del agua, provocando que sus productos de degradación, hidroximetilfurfural y furfural que pueden ser formados por reacciones de Maillard o por oxidación de ácido ascórbico, aceleren la degradación de las antocianinas. La fructosa, arabinosa, lactosa y sorbosa tienen mayores efectos degradativos en los pigmentos que glucosa, sucrosa o maltosa (Jackman y col., 1987; Delgado-Vargas y col., 2000).

2.2.6. Antocianinas como colorantes en alimentos

El mercado de los pigmentos naturales está creciendo dos veces más rápido que el de colores sintéticos. La competencia está aumentando dentro de la industria de los alimentos, particularmente en el sector de bebidas y esto genera una mayor presión para el desarrollo de nuevos productos. En éstos, se investigan con mucho interés nuevas opciones de ingredientes y colores naturales.

Además de las nuevas soluciones tecnológicas para la producción de colores naturales se están buscando nuevas fuentes de pigmentos (Douglas, 2002). El potencial de plantas alimenticias como fuentes comerciales de antocianinas es generalmente limitado por su disponibilidad como materia prima y por consideraciones económicas. Desde la perspectiva económica, el mejor potencial como fuentes comerciales de antocianinas son aquellas en las que el pigmento es un sub-producto de la manufactura o un valor agregado del producto. La disponibilidad de altos contenidos de pigmentos y bajos costos de cultivo en un producto hace viable su uso como fuente potencial de pigmentos comerciales (Giusti y col., 1998).

Wrolstad (2004), menciona que el uso de antocianinas como fuente natural de pigmentos está consolidado y algunos ejemplos de fuentes que se han evaluado como fuente natural de pigmentos se encuentran en los siguientes materiales:

- La piel o pulpa de la uva, la cual es procesada con solventes alcohólicos, generalmente con la adición de un ácido mineral, ácido tartárico o de dióxido del azufre (Timberlake, 1980; Jackman, 1987).
- La flor de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) tratados con agua caliente.
- Hojas y piel de cereza (*Prunus cerasifera*) sometidos a procesos de extracción en alcohol-ácido (Jackman, 1987).
- Pulpa de arándano rojo (*Vaccinium macrocarpon*) sometidas a procesos de extracción alcohólica-ácida y purificación usando resinas de intercambio iónico (Timberlake, 1980; Jackman, 1987).

- Col roja y arándanos sometidos a procesos de extracción con dióxido de azufre, y con extracción metanólica, así como proceso de intercambio iónico como purificación (Jackman, 1987).
- Arándano (*Vaccinium myrtillus*) usado para propósitos farmacéuticos.
- Fruta milagrosa (*Synsepalum dulciferum*) baya roja cuyo pigmento puede ser obtenido como un sub-producto de la producción de potencializadores de sabor, por extracción con etanol acidificado (Jackman, 1987).
- Otras fuentes: pomáceas, bayas del saúco, pétalos púrpuras de girasol (Gao y Mazza, 1996), rábanos rojos (Giusti y col., 1998; Rodríguez-Saona y col., 1999), grosellas negras (Cacace y Mazza, 2002).

Es importante resaltar a las bayas como fuentes principales de antocianinas, tales como zarzamoras, uvas, arándanos, fresas, etc., y algunos vegetales, como berenjena y aguacate, lo que las hace una fuente potencial de pigmentos (Delgado-Vargas y col., 2000). Además, Fan-Chiang y Wrolstad (2005), mencionan que los concentrados de jugo de zarzamora son usados en bebidas, formulaciones de jarabes, aplicaciones como colorante natural y para preparaciones nutraceuticas con un alto valor económico (US\$70/gal en el 2002).

2.2.7. Extracción y preservación de antocianinas

Tradicionalmente, las soluciones acidificadas de metanol, etanol, acetona, agua y/o sus mezclas se han usado para la extracción de antocianinas. Metivier y col. (1980) encontraron que la extracción con metanol fue 20% más efectiva que el etanol y 73% más efectiva que el agua en la recuperación de antocianinas de pulpa de uva (Yong Ju y Howard, 2003). Investigaciones en las propiedades físicas y químicas, estabilidad y componentes de pigmentos extraídos de algunas especies de frutas revelan que los pigmentos en *Rubus* pueden ser extraídos más fácilmente con alcohol que con agua (Wei-Lin y col., 2002).

Por otro lado, el tratamiento térmico es uno de los métodos más ampliamente utilizados para preservar y alargar la vida de anaquel de los alimentos. Condiciones de alta temperatura por un corto tiempo han sido exitosamente utilizadas para retardar la degradación de antocianinas en frutos (Yong Ju y Howard, 2003). Sin embargo, la temperatura es uno de los factores que más afecta la estabilidad de las antocianinas. El índice de degradación de antocianinas es dependiente de la combinación tiempo-temperatura (Wei-Dong y Shi-Ying, 2007).

En contraposición, los tratamientos de alta presión hidrostática (APH) son una tecnología nueva y promisoría que reduce cargas microbianas, actividades enzimáticas y no afecta la funcionalidad de productos. Esto provee una base potencial para desarrollar nuevos procesos en la conservación o modificación de alimentos (Cano y col., 1997; Weemaes y col., 1998; Torres y Velázquez, 2005; Velázquez y col., 2005a,b; Torres y Velázquez, 2007; Ulloa y col., 2008). La alta presión hidrostática (APH) es una de las nuevas alternativas emergentes a los tratamientos térmicos de pasteurización tradicionales, con efectos mínimos en los productos fitoquímicos termolábiles (Del Pozo-Insfran y col., 2007).

2.2.7.1. Tecnología de la alta presión hidrostática (APH)

En la actualidad, los consumidores prefieren productos mínimamente procesados, libres de aditivos químicos y con características de “frescura”. Lo anterior ha llevado al desarrollo de nuevas tecnologías de procesamiento, alternativos a los tratamientos térmicos y que logren cambios mínimos en la calidad de los productos (Torres y Velázquez, 2005; Velázquez y col., 2005a,b; Torres y Velázquez, 2007).

Existen varios principios básicos que gobiernan la influencia de las altas presiones en las biomoléculas (Barret y col., 2004; Torres y Velázquez, 2005; Velázquez y col., 2005a,b):

1. El volumen y la energía de activación de una reacción: Una reacción química solo puede ocurrir cuando un reactante alcanza un estado activado con un volumen molar parcial y un nivel de energía específicos. Esto ocurre cuando otras moléculas le transfieren por movimiento browniano energía en una cantidad equivalente al valor de la energía de activación (E_a) para esa reacción. El concepto de la energía de activación es la base para la ecuación de Arrhenius que describe el aumento con la temperatura de la constante cinética de una reacción. El volumen de activación está definido como la diferencia entre el volumen parcial del estado activado con respecto al del reactante. En el caso de reacciones a presión alta, la constante cinética aumentará con la presión para reacciones que involucren un volumen de activación negativo pues la presión facilitará llegar a estados activados con volumen inferior al del reactante. El cambio de conformación a estado activado se facilitará si el volumen de activación es negativo. Finalmente, aquellas reacciones con volumen de activación cero son independientes de la presión.
2. La ley de Pascal: A diferencia de los procesos térmicos y otras tecnologías de conservación, los efectos de la APH son uniformes y casi instantáneos a través del alimento y por lo tanto independientes de la geometría y del tamaño del producto y del equipo (Figura 2.8). Esto ha facilitado el escalado de los resultados obtenidos en laboratorio a la producción comercial.
3. Efecto en los enlaces químicos: La presión hidrostática no contribuye al rompimiento de los enlaces covalentes y sólo tiene efecto sobre los enlaces débiles tales como puentes de hidrógeno y las interacciones iónicas. Esto explica la alta calidad de los productos tratados por tecnología APH.

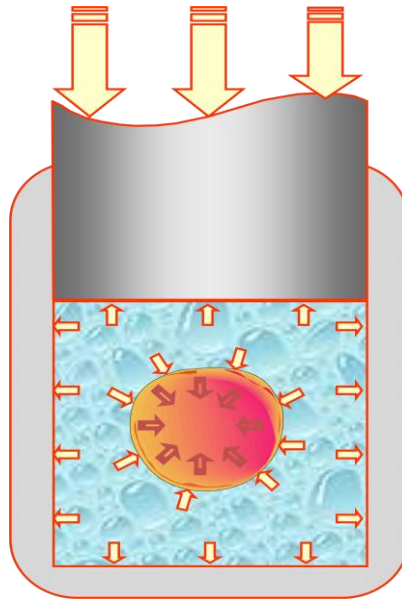


Figura 2.8. Principio de Pascal en el proceso de alta presión hidrostática.

La tecnología APH inactiva los microorganismos al interrumpir las funciones celulares responsables de la reproducción y supervivencia. APH altera las membranas celulares en las bacterias y de esta forma afecta a los procesos de transporte celulares relacionados con la obtención de nutrientes y la liberación de desechos celulares.

Por otro lado, los cambios estructurales en las proteínas producidos por los tratamientos de alta presión parecen ser diferentes a los causados por los tratamientos de temperatura alta. Cuando se aplica presión a las proteínas, ocurre un cambio en su volumen, que puede ocasionar una desnaturalización. Los cambios conformacionales en las proteínas causados por APH indican que las enzimas en los alimentos podrían sufrir una alteración en su actividad biológica después de ser sometidas a tratamientos de presión (Velázquez y col., 2005a).

Las enzimas sobre las que más se han estudiado los efectos de la presión son las polifenoloxidasas, sobre las que se han encontrado variabilidad de la actividad enzimática según el tipo de alimento y tratamiento aplicado. Esta diferencia de los sistemas enzimáticos en la estabilidad a la presión y

temperatura probablemente es debido a los diferentes efectos mecánicos sobre las distintas conformaciones enzimáticas así como la matriz alimentaria tratada (Cano y col., 1997; Weemaes y col., 1998; Torres y Velázquez, 2005; Velázquez y col., 2005a,b; Torres y Velázquez, 2007).

En el análisis del efecto sobre los alimentos de los tratamientos APH se deben tomar en cuenta dos fenómenos específicos: (1) El aumento y disminución instantánea de la temperatura del alimento durante su compresión y descompresión, respectivamente; y (2) El desplazamiento temporal del pH mientras el alimento está bajo presión hidrostática alta. El cambio temporal de pH es generalmente hacia pH ácido y puede maximizarse optimizando la formulación del alimento para lograr un mayor efecto de inactivación microbiana (Torres y Velázquez, 2005; Velázquez y col., 2005a,b).

En la actualidad, los productos sometidos a APH necesitan de refrigeración, actividad de agua reducida o bajos valores de pH para evitar la germinación de las esporas bacterianas, ya que su alta resistencia a los tratamientos físicos y químicos sugiere que es necesario aplicar procesos combinados para inactivar esporas bacterianas (Torres y Velázquez, 2005; Velázquez y col., 2005a,b).

III. JUSTIFICACIÓN

Dada la importancia económica del cultivo de zarzamora en el estado de Michoacán y a la calidad del producto fresco que demandan los mercados de exportación; existe un volumen de producción de esta fruta que no cumple con las especificaciones de calidad que exigen dichos mercados y que actualmente se destina para diferentes procesos industriales en los cuales la rentabilidad hacia el productor es mínima. Por lo que en este caso se propone la obtención de pigmentos (antocianinas) a partir de la zarzamora como una alternativa de utilización para el producto o sus subproductos y darles así un valor agregado que permita una mejor rentabilidad de este cultivo.

La baja estabilidad de las antocianinas como colorante natural, reduce su aplicación potencial en alimentos a escala comercial, siendo necesario realizar estudios y buscar tratamientos de estabilización de estos pigmentos que le permitan ser utilizados en la industria alimentaria.

IV. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Establecer un procedimiento de extracción adecuado y una técnica de estabilización para los pigmentos de zarzamora (*Rubus* sp.) variedad 'Tupi'.

4.2. Objetivos específicos

- Determinar el efecto de la temperatura y tiempo en la extracción de antocianinas del fruto de zarzamora utilizando etanol acidificado.
- Determinar el efecto de la pasteurización y altas presiones hidrostáticas en la estabilidad de los pigmentos extraídos del fruto de zarzamora, conservados a diferentes condiciones de temperatura, pH e iluminación.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Sitio experimental y material biológico

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Fisiología y Bioquímica Poscosecha de Frutas y Hortalizas del Departamento de Posgrado de Alimentos de la Universidad Autónoma de Querétaro y en los laboratorios del Grupo de Ingeniería de Procesos de Oregon State University.

Las muestras de zarzamora se obtuvieron de la región de Los Reyes Michoacán, colectadas durante la temporada octubre 2007-Febrero 2008. La muestra utilizada correspondió a aquellos frutos que no cumplieron con las normas para producto fresco y fueron rechazados en la línea de empaque. Esta fracción denominada “fruto proceso”, tiene las siguientes características principales: estado en madurez de consumo, con menor intensidad de brillo y firmeza respecto de los frutos de exportación, algunos con reversión de color (negro a rojo) y derrame de líquido (Figura 5.1). Los frutos se transportaron al laboratorio en contenedores con hielo y una vez en el laboratorio, fueron almacenados a -20°C en contenedores hasta su utilización.



Figura 5.1. Apariencia de los frutos utilizados para el desarrollo experimental.

5.2. Extracción de pigmentos

La Figura 5.2 muestra el esquema general del procedimiento de extracción que se realizó en el presente trabajo, en el que se utilizó etanol acidificado (0.01% de HCl) como disolvente (Wei-Lin y col., 2002).

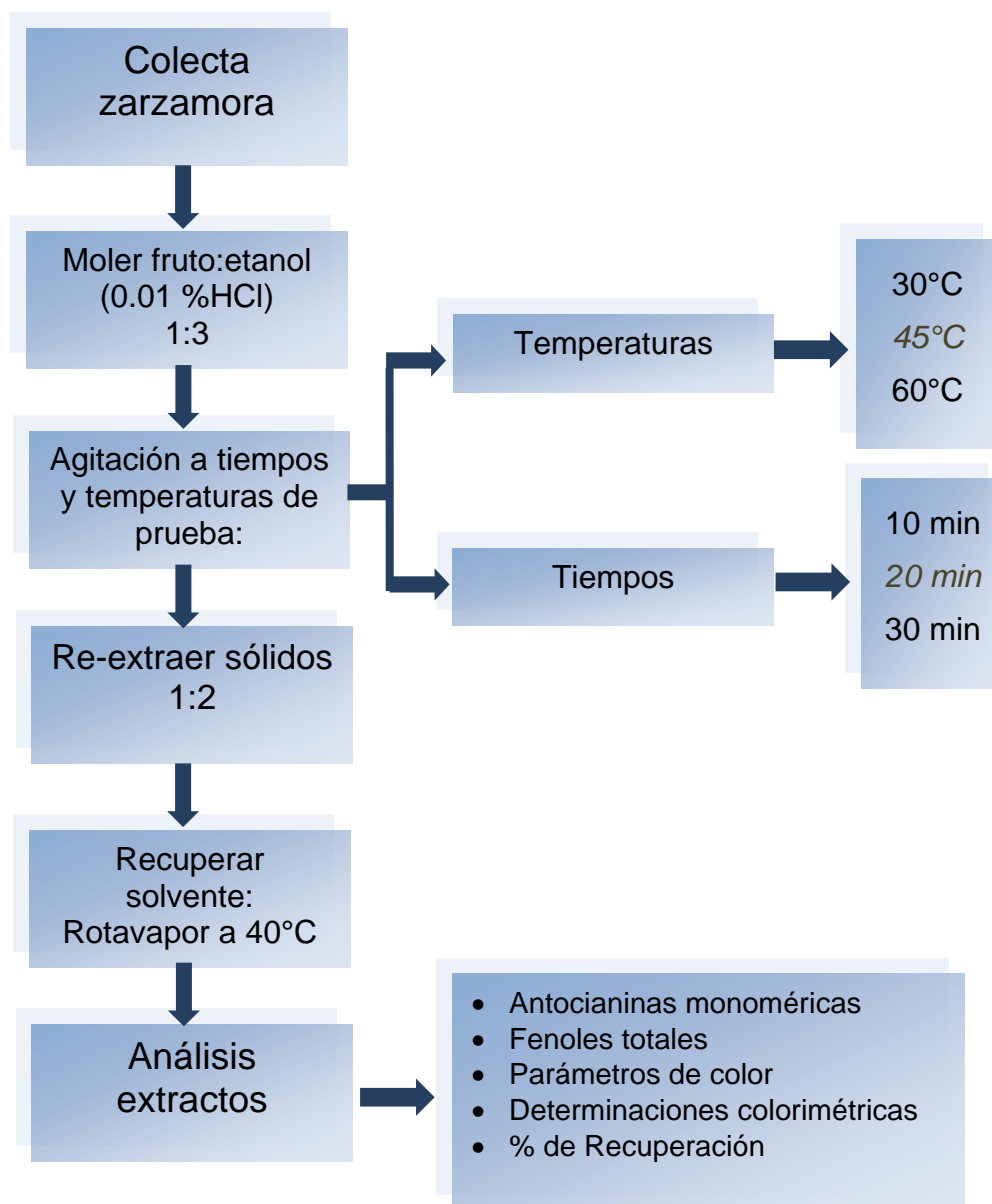


Figura 5.2. Diagrama general de extracción de pigmentos.

La relación total final de fruto disolvente fue de 1:5 aplicadas en dos etapas: en la primera extracción se aplicó una relación de 1:3 (en esta se extrajo el 85% del total de antocianinas recuperables). En la segunda etapa, la relación fue de 1:2 para lograr la recuperación total de las antocianinas.

El procedimiento de extracción de los pigmentos crudos se realizó con 100 g de muestra y 100 mL de etanol acidificado; la mezcla fue molida en una licuadora (Osterizer 852-10), posteriormente la muestra homogeneizada, se colocó en un matraz erlenmeyer y se añadieron 200 mL más de etanol acidificado; el conjunto se puso bajo agitación y temperatura de acuerdo al esquema experimental planteado utilizando un baño de agua (HAAKE SWB 20). Al término de cada tiempo y temperatura, la mezcla se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min (J2-MC Centrifuga, Beckman Coulter) y el sobrenadante se filtró con papel Whatman No. 4. Los residuos se volvieron a extraer añadiendo otros 200 mL de etanol acidificado. Finalmente los extractos obtenidos se concentraron en un rotavapor a 40°C (Büchi B-490) hasta un volumen final aproximado de 100 mL y una presentación líquida.

Al extracto obtenido en cada una de las diferentes condiciones se le realizaron determinaciones de antocianinas totales y se calculó su % de recuperación respecto del contenido inicial de antocianinas en la muestra. El contenido inicial total de antocianinas se determinó por el método descrito por Lees y Francis (1972), utilizando el sistema de etanol:HCl 0.1 N (85:15 v/v) como disolvente.

También se cuantificó el contenido de fenoles totales, como otro parámetro de referencia de compuestos extraídos. Se realizaron las determinaciones para obtener parámetros de color y determinaciones colorimétricas que permitieron especificar el color del extracto obtenido. La descripción de estos procedimientos se detalla en la sección 5.4.

5.3. Estudios de estabilidad de pigmentos

Debido a la facilidad práctica (por los volúmenes requeridos a trabajar y disponibilidad de equipo), los extractos de antocianinas utilizados en esta parte experimental, fueron obtenidos de la siguiente manera: 100 g de fruto fueron molidos en una licuadora (Osterizer 852-10) con 100 mL de etanol acidificado (0.01% HCl). A continuación se añadieron 400 mL de disolvente y se dejaron reposar durante 12 h a 4°C. Al término de este tiempo, se centrifugó el extracto a 10,000 rpm durante 10 min (J2-MC Centrifuga, Beckman Coulter) y el sobrenadante se filtró con papel Whatman No. 4. Por último, los extractos se concentraron en un rotavapor a 40°C (Büchi B-490) hasta un volumen final aproximado de 100 mL y una presentación líquida.

Debido a que esta parte experimental fue realizada fuera del país, 10 cajas de zarzamora (7.5 kg/caja) fueron colectadas durante Febrero 2008 en la zona productora de Los Reyes Michoacán México; estos fueron llevados por vía terrestre hasta el aeropuerto de la Cd. de México y de ahí transportados al aeropuerto de la Cd. Portland; de ahí fueron trasladados por vía terrestre a los laboratorios de la Universidad de Oregon State donde se almacenaron a 0 °C por dos días. El proceso de traslado y almacenamiento previo a la extracción de pigmentos llevó un total de cuatro días desde la cosecha. La calidad de los frutos fue de exportación pues no fue posible trabajar con frutos de calidad de proceso pues el traslado de estos no era posible dada los requisitos que señala la aduana para su introducción a los Estados Unidos. No obstante, los análisis de estos experimentos se corrieron como experimentos independientes.

5.3.1. Estudio preliminar del tratamiento de APH

A fin de establecer la mejor condición de presión que estabilizara al concentrado de antocianinas, se realizó un estudio preliminar (Figura 5.3) en el que se evaluaron tres niveles de presión: 400, 525 y 586 Mpa, aplicadas durante 0 (sólo compresión y descompresión de la muestra), 1, 3 y 5 min. Las muestras tratadas fueron almacenadas a 25°C durante 10 días bajo luz blanca

continua proporcionada por una lámpara incandescente de 30 watts y en oscuridad.

El equipo utilizado para hacer las aplicaciones de APH tenía las siguientes características:

1) Contenedor de 22 L (Engineered Pressure Systems, Haverhill, MA); con agua adicionada de 5% (v/v) de Hydrolubric 120-B (Houghton Intl. Inc., Valley Forge, PA. U.S.A.) como medio de transmisión de la presión.

2) Intensificador de presión consistente de una bomba de 40 HP (Model 7XS-6000, Avure Technologies, Kent, WA) con una presión máxima de operación de 620 MPa (~90 KPsi) para alcanzar las condiciones de operación en aproximadamente 80 s, mientras que el tiempo de descompresión fue inferior a 30 s.

Muestras de 50 mL de extracto de zarzamora, fueron colocadas en bolsas de polietileno (medida 5x5 pulgadas, calibre 0.003 pulgadas) doblemente selladas en bolsas del mismo material. La temperatura de las muestras antes y después de compresión fue de 18 y 20°C respectivamente.

Antes y después de cada tratamiento, y durante el almacenamiento, se realizaron determinaciones de actividad de la de polifenol oxidasa (PPO), una enzima endógena de los tejidos vegetales causante de la decoloración de antocianinas. Se realizaron también determinaciones de antocianinas monoméricas totales para obtener el % retención de antocianinas, de acuerdo a la Figura 5.3.

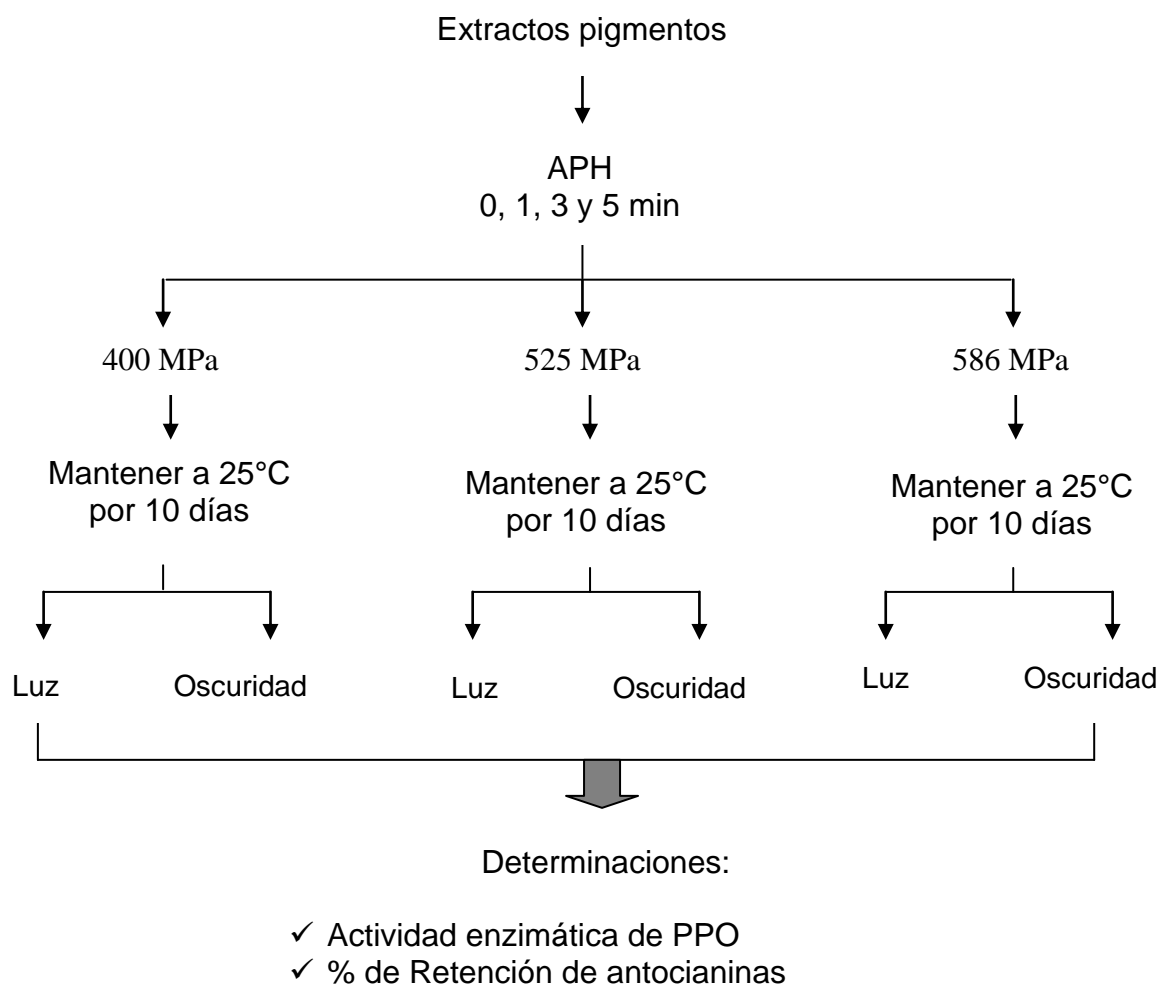


Figura 5.3. Estudio preliminar de tratamientos de alta presión hidrostática (APH).

5.3.2. Estudios de estabilidad final de pigmentos durante el almacenamiento

Los tratamientos de alta presión y tiempo que proporcionaron un mayor % de retención de antocianinas en los extractos fueron comparados con un proceso de pasteurización térmica. Se obtuvieron cinéticas de degradación de los extractos bajo condiciones normales o supuestas durante el procesamiento y/o almacenamiento incluyendo diferentes pH, temperaturas de almacenamiento y condiciones de iluminación de las muestras.

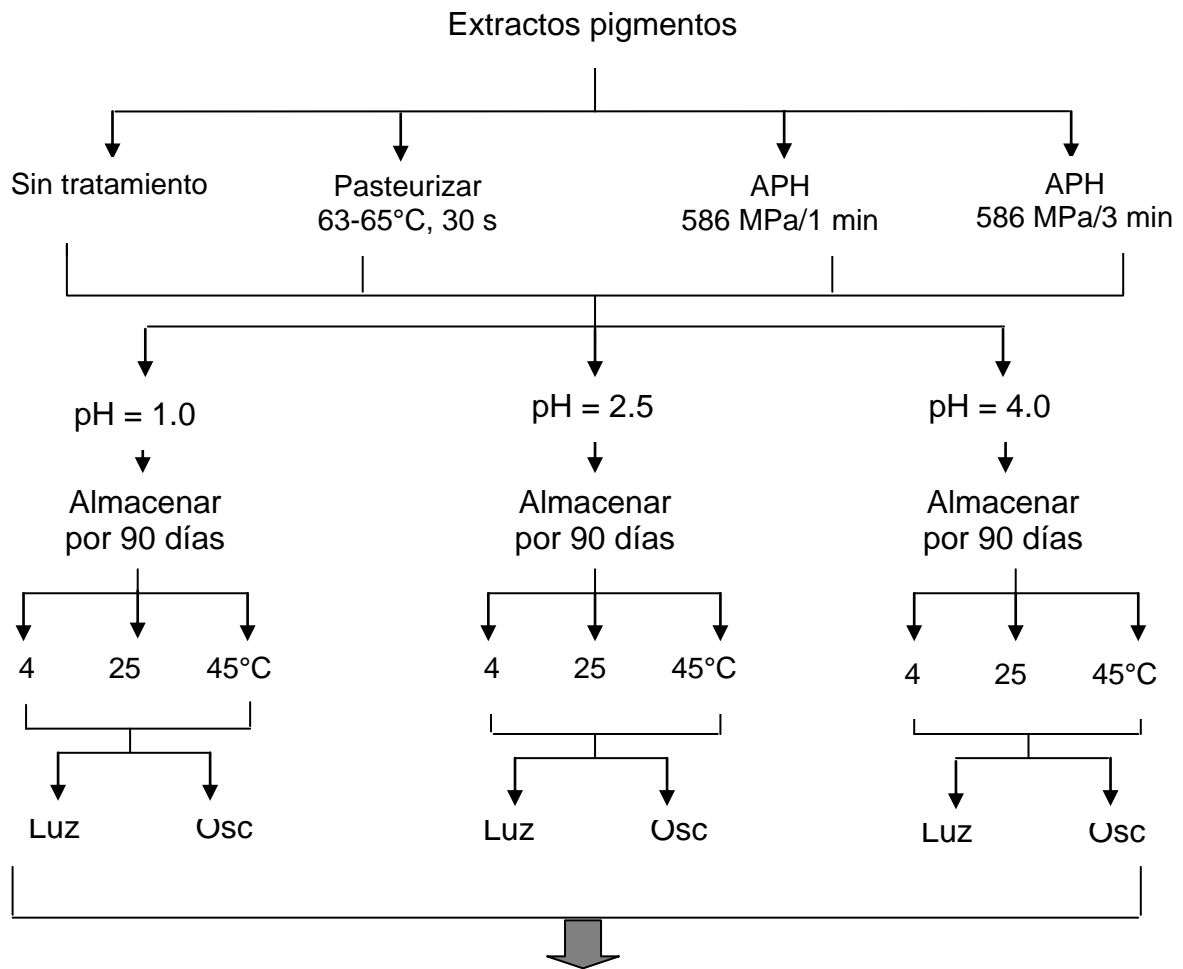
Los factores evaluados fueron el procedimiento de estabilización (cuatro tratamientos), el pH del extracto (tres niveles), la temperatura de almacenamiento (tres niveles) y la condición de iluminación (Figura 5.4).

Diferentes muestras de los extractos de pigmentos fueron colocadas en bolsas de polietileno (5x5 pulgadas, y calibre 0.003 pulgadas) y posteriormente sometidas a los diferentes tratamientos: para pasteurización (63-65°C por 30 s), en un baño de agua caliente (HAAKE SWB 20), y para los tratamientos de APH se utilizó el equipo previamente descrito.

Muestras tratadas de los extractos pasteurizados térmicamente o por alta presión fueron analizadas microbiológicamente mediante el recuento de hongos y levaduras.

Al resto de los lotes de extractos tratados y control se les ajustó el pH a 1.0, 2.5 y 4.0 utilizando HCl 5N y NaOH 1N. Alícuotas de 10 mL fueron vertidas a tubos de ensaye con tapón de rosca y se almacenaron durante 90 días a temperaturas de 4, 25 y 45°C en presencia de luz blanca continua proporcionada por lámparas LED de 1 watt, así como en oscuridad (tubos de ensaye envueltos con papel aluminio).

Durante noventa días de almacenamiento, y por periodos de 10 días, se realizaron determinaciones de % de retención de color (diferencia neta de antocianinas), índice de degradación y diferencia neta de color.



Determinaciones:

- ✓ % Retención de antocianinas
- ✓ Índice de degradación de antocianinas
- ✓ Diferencia neta de color
- ✓ Parámetros de degradación térmica
- ✓ Conteo de hongos y levaduras

Figura 5.4. Diagrama general de estabilidad de pigmentos durante el almacenamiento.

5.4. Métodos utilizados

5.4.1. Antocianinas monoméricas totales

Las antocianinas pueden estar presentes en diferentes estructuras reversibles y tener cambios en sus espectros de absorción cambiando el pH de la solución, por lo que la concentración de antocianinas se determinó por el método de pH diferencial. Este método permite una medición rápida y precisa de las antocianinas totales aún en presencia del pigmento degradado polimerizado o en presencia de cualquier otro compuesto interferente (Wrolstad y col., 2004). 50 µl del extracto obtenido fueron diluidos con 3 mL de buffer de cloruro de potasio 0.025 M a pH 1 ajustado con HCl. Se diluyeron también 50 µl del extracto con 3 mL de buffer de acetato de sodio 0.4 M a pH 4.5 ajustado con HCl. Las muestras diluidas fueron equilibradas en la oscuridad por 15 min. Usando un espectrofotómetro Lambda 40 UV-visible (PerkinElmer Instruments), se determinó la absorbancia de las muestras a 510 nm (absorbancia máxima) y a 700 nm (lectura del grado de degradación del compuesto y lectura de corrección debido a las sustancias interferentes), usando agua destilada como blanco. La determinación de antocianinas se hizo por triplicado para cada muestra. La concentración de antocianinas (mg ACN/L) se calculó usando el coeficiente de extinción molar, $\epsilon = 29,600$ unidades molecular de cianidin-3-glucósido de 445.2 (PM), de acuerdo a la Ecuación 5.1:

$$\left[\frac{Abs \times PM \times 1000 mg / g \times FD}{\epsilon \times L} \right] = mg \text{ ACN} / L \quad (5.1)$$

donde:

$$Abs = (A_{510} - A_{700})_{pH \ 1} - (A_{510} - A_{700})_{pH \ 4.5}$$

PM = Peso molecular de cianidin-3-glucósido ($g \text{ mol}^{-1}$)

FD = Factor de dilución (59)

$$\epsilon = 29,600 \text{ (L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}\text{)}$$

L = Ancho de la celda (1 cm)

5.4.2. Fenoles totales

Para la determinación de fenoles totales se empleo el método de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton y Rossi, (1965) (Anexo 1). Para este ensayo, el extracto crudo de antocianinas obtenido y correctamente diluido (muestra), se hizo reaccionar con el reactivo de Folin-Ciocalteu 1N y carbonato de sodio al 20%. Se mezclaron bien las muestras y se dejaron reposar en oscuridad por 1 h, posteriormente sus absorbancias fueron medidas a 725 nm en un espectrofotómetro Lambda 40 UV-visible (PerkinElmer Instruments).

Para obtener el contenido de fenoles totales en equivalentes de ácido gálico, se interpoló la absorbancia de las muestras a una curva de calibración de solución estándar de ácido gálico, realizada previamente. La determinación de fenoles se hizo por triplicado para cada muestra y los compuestos fenólicos totales del extracto fueron expresados como mg equivalentes de ácido gálico por litro de extracto (mg EAG/L).

5.4.3. Parámetros de color

Las antocianinas monoméricas al combinarse con el bisulfito forman un compuesto incoloro, ácido sulfónico; mientras que el color polimérico, formado por complejos de antocianinas y taninos, son resistentes a la decoloración por bisulfito. Con lo anterior, es posible determinar los parámetros de color desarrollados por Somers y Evans (1977), que incluyen:

- *Densidad de color*: expresa el color debido a antocianinas monoméricas o copolimerizadas presentes y las reacciones de oscurecimiento.
- *Color polimérico*: este parámetro expresa el color debido a antocianinas copolimerizadas y de reacciones de oscurecimiento. Color resistente al blanqueado con bisulfito de sodio.
- *Porcentaje de color polimérico o porcentaje de taninos*: Se define como la relación del color polimérico entre la densidad de color y expresa el porcentaje de color debido al material copolimerizado.

Para la obtención de los parámetros mencionados, se siguió el método descrito por Yong-Ju y Howard (2003): Los extractos obtenidos se diluyeron en un buffer de fosfato de potasio 0.025 M pH 1 hasta tener una absorbancia menor de 1 a 528 nm. 2.8 mL de la muestra diluida fue transferida a dos celdas, a una de ellas se agregó 0.2 mL de metabisulfito de sodio (0.90 M) y a la otra 0.20 mL de agua destilada. Después de 15 min, la absorbancia de ambas muestras fueron medidas a 420, 510 y 700 nm en un espectrofotómetro Lambda 40 UV-visible (PerkinElmer Instruments) y comparadas contra un blanco de agua destilada. Los cálculos para las determinaciones incluyen:

$$\text{Densidad de color} = [(A_{420nm} - A_{700nm}) + (A_{510nm} - A_{700nm})] \times FD \quad (5.2)$$

$$\text{Color polimérico} = [(A_{420nm} - A_{700nm})] + (A_{510nm} - A_{700nm}) \times FD \quad (5.3)$$

$$\% \text{ Color polimérico} = (\text{Color polimérico} / \text{Densidad de color}) \times 100 \quad (5.4)$$

donde FD = Factor de dilución (50)

Las determinaciones para cada muestra se realizaron por triplicado.

5.4.4. Determinaciones colorimétricas

Se utilizó un colorímetro Minolta CM 2002, con el iluminante C y el observador a 10°, colocando 2 mL de la muestra en contenedor de vidrio cilíndrico de 2 cm de diámetro y un centímetro de alto con paredes blancas. El equipo proporcionó los valores CIE L*, a* y b*, el ángulo de matiz o tono (valor hue) y la pureza o saturación (Chroma) o cromaticidad (valor C*). Para el cálculo de los diferentes valores de color, el software del equipo utiliza las siguientes ecuaciones (Rodríguez-Saona y col., 1999):

$$h^\circ = \text{Tono} = \tan^{-1} (b^* / a^*) \quad (5.5)$$

$$C^* = \text{Pureza} = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2} \quad (5.6)$$

$$\text{Diferencia neta de color} = (\Delta E) = [(L_f^* - L_i^*)^2 + (a_f^* - a_i^*)^2 + (b_f^* - b_i^*)^2]^{1/2} \quad (5.7)$$

Las determinaciones para cada muestra se hicieron por triplicado.

5.4.5. % Recuperación

El porcentaje de recuperación de antocianinas fue determinado por la Ecuación 5.8:

$$\% \text{ Recuperación} = (C_{ob} / C_{ref}) \times 100 \quad (5.8)$$

donde C_{ob} corresponde al contenido de antocianinas de los extractos obtenidos (Sección 5.2) y C_{ref} corresponde al contenido de antocianinas de la muestra de referencia. La muestra de referencia, correspondió al extracto obtenido por el método descrito por Lees y Francis (1972) con algunas modificaciones: 100 g de zarzamora fueron extraídos con 450 mL de etanol acidificado con HCl 0.01%, reposar 12 h a 4°C, centrifugar a 10,000 rpm durante 10 min a 4°C (J2-MC Centrifuga, Beckman Coulter) y posteriormente filtrar con papel filtro Whatman No 4, el filtrado se aforó a un volumen de 500 mL. A este extracto se le determinaron antocianinas totales de acuerdo a la Ecuación 5.1. Las determinaciones se realizaron por triplicado para cada muestra.

5.4.6. Actividad enzimática de la polifenol oxidasa (PPO)

Se utilizó el método descrito por Hsu y col. (1988), basado en la determinación espectrofotométrica del color que se genera a partir de la acción del extracto enzimático sobre un sustrato fenólico. 1 mL de pigmento fue homogeneizado con 0.6 g de PVPP y 20 mL de buffer de fosfato 50 mM a pH 6.5. Una vez homogenizada la mezcla se centrifugó a 10,000 rpm a 4°C por 15 min (J2-MC Centrifuga, Beckman Coulter). El sobrenadante obtenido correspondió al extracto enzimático. 100 µl de extracto enzimático fueron mezclados con 50 µl de catecol 60 mM (sustrato) y 2850 µl de buffer fosfatos 50 mM pH 6.5. La mezcla se leyó inmediatamente en un espectrofotómetro Lambda 40 UV-visible (PerkinElmer Instruments) a 420 nm durante 3 min a 25°C.

La actividad se reportó como unidades de actividad de PPO/g muestra.

1 unidad de actividad = cambio en 0.001 unidades de absorbancia en 1 min.

5.4.7. % Retención de antocianinas

Esta determinación fue realizada en las muestras sometidas a los tratamientos de estabilidad de pigmentos considerados en la sección 5.3. La retención de color se calculó de acuerdo a la Ecuación 5.9:

$$\% \text{ de Retención de antocianinas} = (C / C_0) \times 100 \quad (5.9)$$

donde C y C₀, correspondieron al contenido de antocianinas final (después de los tratamientos) e inicial (antes de tratamiento) respectivamente.

5.4.8. Índice de degradación de antocianinas

El índice de degradación (ID), también conocido como índice de oscurecimiento ha sido utilizado como un método indirecto para monitorear la degradación de antocianinas durante las diferentes etapas de su extracción, almacenamiento y/o procesamiento (Del Pozo-Insfran y col., 2007). Diversos autores sugieren utilizar la relación de la absorbancia medida a 420 nm entre la longitud de onda o la absorbancia máxima en el visible ($\lambda_{\text{visible-máxima}}$) para obtener el ID, ya que la acumulación de antocianinas degradadas incrementa la absorbancia en el rango de 400-440 nm (Wrolstad y col., 2004). En el presente estudio, se aprovechó la determinación de antocianinas a través del método diferencial de pH para obtener los datos para calcular el ID, (Ec. 5.10, sugerida por Fuleki y Francis, 1968).

El principio de esta medición es que las mediciones obtenidas a pH 1.0 incluye en la absorbancia antocianinas degradadas como no degradadas, mientras que la absorbancia a pH 4.5 corresponde a las antocianinas no degradadas. La diferencia de absorción entre las absorbancias a ambos pH es solo debida a las antocianinas no degradadas (Fuleki y Francis, 1968). Por lo tanto, el índice de degradación puede obtenerse mediante la Ecuación 5.10:

$$ID = (ACN_{pH=1} / ACN_{met\ diferencial\ pH}) \quad (5.10)$$

donde “ACN_{pH=1}” se obtiene mediante ecuación 5.1, con Abs=(A₅₁₀ – A₇₀₀)_{pH 1} y “ACN_{met diferencial pH}” se determina con la misma ecuación, pero con Abs=(A₅₁₀ – A₇₀₀)_{pH 1} - (A₅₁₀ – A₇₀₀)_{pH 4.5}.

5.4.9. Parámetros de degradación térmica

Las reacciones de primer orden son las que tienen lugar a una velocidad proporcional a la concentración de un reactante. Para la realización de cálculos cinéticos, la ecuación de primer orden es la siguiente:

$$\frac{C}{C_0} = \exp(kt) \quad (5.11)$$

donde C y C₀ corresponden al contenido de antocianinas al tiempo (t) e inicial respectivamente y k es la constante de velocidad.

La vida media (t_{1/2}), es el tiempo requerido para que se degrade el 50% de la concentración inicial del pigmento, y este viene dado por la siguiente expresión:

$$t_{1/2} = \frac{-0.693}{k} \quad (5.12)$$

La ecuación de Arrhenius cuantifica la dependencia de la constante de velocidad de una reacción con la temperatura a la que ella se lleva a cabo. Esta dependencia se expresa de acuerdo a la siguiente expresión:

$$k = k_0 e^{\frac{-E_a}{RT}} \quad (5.13)$$

donde E_a es la energía de activación o cantidad de energía necesaria para llevar 1 mol de sustancia a una temperatura determinada al estado de transición (Kcal/mol), k₀ es una constante denominada factor de frecuencia (por tiempo); R es la constante universal de los gases (1.987 Kcal/mol °K) y T es la temperatura absoluta (°K) (Lehninger, 1995).

Al construir la gráfica de $\ln k$ frente al inverso de la temperatura absoluta ($1/T$) y mediante una regresión, podemos conocer el valor del componente exponencial que de acuerdo a la ecuación 5.13 se refiere a E_a/R , de donde se calculó la energía de activación.

5.4.10. Conteo de hongos y levaduras

El análisis microbiológico de hongos y levaduras se realizó en extractos crudos de antocianinas utilizando la técnica de vaciado en placa. A 1 mL de extracto se adicionó 20 mL de agar papa dextrosa (PDA) y después de homogenizar la mezcla se la dejó solidificar. Las placas se incubaron a 22°C durante 3-5 días y finalmente se realizó el recuento en un contador de colonias tipo Quebec (Fernández, 1981). La determinación se realizó por duplicado y los resultados obtenidos se reportaron en unidades formadoras de colonias por mL de extracto (ufc/mL).

5.5. Diseño y análisis estadístico de los resultados

5.5.1. Extracción de pigmentos

El experimento realizado estuvo integrado por dos factores, dos niveles y un punto al centro, más una réplica por cada tratamiento: 2^2+1 punto al centro. Los resultados fueron expresados como la media \pm error estándar. El análisis de datos se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia de $\alpha=0.05$, seguida de la prueba de Tukey para obtener las diferencias estadísticas entre los tratamientos.

5.5.2. Estudios de estabilidad de pigmentos

En el estudio preliminar del tratamiento de altas presiones hidrostáticas se tuvo un diseño bifactorial 3x4.

Para el estudio de estabilidad final de pigmentos durante el almacenamiento, el experimento realizado fue un diseño multifactorial completo 4x3x3x2 con mediciones repetidas en el tiempo y una réplica para cada tratamiento.

En el caso de los parámetros de degradación térmica, se realizaron regresiones no lineales, haciendo el ajuste de la ecuación de cinética de primer orden con los valores experimentales obtenidos. Los resultados fueron expresados como la media \pm error estándar.

El análisis de datos se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia de $\alpha=0.05$, para obtener las diferencias estadísticas entre los tratamientos.

Todo el análisis estadístico se realizó utilizando el paquete JMP versión 5.0.1.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Extracción de pigmentos

6.1.1. Extracción de antocianinas y su % de recuperación

El Cuadro 6.1 muestra las cantidades de antocianinas totales extraídas, su porcentaje de recuperación respecto del contenido original del fruto (muestra de referencia) y las cantidades de fenoles totales extraídos. El contenido neto de antocianinas fue de 81.6 ± 1.9 mg/100 g de fruto, un resultado comparable en sus niveles más bajos, con los reportados por Torre y Barrit (1977), Moyer y col. (2002) y Fan-Chiang y Wrolstad (2005) quienes reportaron en distintas variedades de zarzamora contenidos de 83-326, 80-230 y 70-201 mg/100 g fruto, respectivamente.

Cuadro 6.1. Contenido de antocianinas totales, % de recuperación y fenoles totales obtenidos en extractos de pigmentos de zarzamora.

TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (min)	Antocianinas totales (mg ACN/L)	% Recuperación	Fenoles totales (mg EAG/L)
30	10	761.42 \pm 27.12 b	94.29 \pm 3.91 b	2670.77 \pm 217.14 a
30	30	821.92 \pm 20.98 ab	101.88 \pm 1.12 ab	2584.60 \pm 23.58 a
45	20	766.83 \pm 15.81 b	96.79 \pm 4.02 ab	2704.18 \pm 44.32 a
60	10	839.76 \pm 12.94 ab	104.03 \pm 1.07 ab	2487.35 \pm 20.37 a
60	30	887.76 \pm 20.09 a	107.79 \pm 1.16 a	2998.26 \pm 178.18 a
Referencia		807.47 \pm 11.09 b	100.00 \pm 0.00 ab	2619.03 \pm 26.71 a

Resultados expresados como la media de dos experimentos independientes con tres repeticiones \pm ES. Letras diferentes en misma columna indican diferencia estadística significativa, Tukey, $\alpha=0.05$.

El proceso de acidificación y altas temperaturas utilizado en este estudio alcanzó altos porcentajes de recuperación (Cuadro 6.1). Los procesos de alta temperatura-corto tiempo (e.g., 10 min a 60°C) permitieron una buena recuperación de pigmentos alcanzando concentraciones de 840 mg ACN/L

extracto. Rommel y col. (1992) extrajeron jugo de zarzamora cv. 'Evergreen' para obtener vinos producidos por tres diferentes procesos: por fermentación de la pulpa, medios enzimáticos y térmicamente, logrando cantidades de antocianinas monoméricas de 262, 396 y 638 mg ACN/L de extracto, respectivamente, confirmando la importancia de las altas temperaturas para mejorar la extracción de antocianinas.

El Cuadro 6.2 muestra el análisis de varianza para los factores temperatura y tiempo y las interacciones entre ellos sobre el contenido de antocianinas, % de recuperación y fenoles totales. Es posible observar que el factor temperatura tuvo un efecto más significativo en la cantidad de antocianinas extraídas y en consecuencia en el porcentaje de recuperación de las mismas ($p < 0.031$ y 0.022 , respectivamente); mientras que el factor tiempo tuvo un efecto menor, no significativo, sobre estas mismas variables ($p < 0.079$ y 0.068 , respectivamente).

Cuadro 6.2. Análisis de varianza en el contenido de antocianinas, % de Recuperación y Fenoles Totales para los factores temperatura y tiempo de extracción, así como su interacción entre ellos.

FACTOR	Prob > F		
	Contenido de antocianinas	% de Recuperación	Fenoles Totales
Temperatura	0.031	0.022	0.214
Tiempo	0.079	0.068	0.042
Temperatura*Tiempo	0.816	0.483	0.011

Los resultados anteriores coinciden con los datos encontrados por otros autores y para otras fuentes de pigmentos en donde se ha indicado que elevadas temperaturas mejoran la eficiencia en la extracción de pigmentos dado que una mayor temperatura aumenta la velocidad de difusión y solubilidad de los analitos en la matriz del solvente utilizado, reduciendo así el tiempo de equilibrio en el sistema y por tanto el tiempo de extracción (Cacace y Mazza, 2002; Yong-Ju y Howard, 2003).

Las condiciones de tiempo y temperatura reportadas en la literatura para la extracción de antocianinas de distintas fuentes son variables. Young-Ju y Howard (2003), en un estudio de extracción de antocianinas y fenoles totales en piel de uva a temperaturas entre 20 y 140°C y utilizando diferentes solventes, demostraron que la acidificación del medio y una temperatura de 60°C generan mayores rendimientos de monoglucósidos y antocianinas totales mientras que temperaturas mayores favorecen una mayor extracción de fenoles totales, estableciendo con ello un patrón de composición diferencial dependiente de las condiciones de extracción. En términos generales, Yong-Ju y Howard (2003) reportan que típicamente la extracción de antocianinas se lleva a cabo a temperaturas entre 20 y 50°C, ya que temperaturas mayores a 70°C causan una rápida degradación y pérdida de color. Cacace y Mazza (2002) encontraron que la extracción de antocianinas en pasas negras, se favorece cuando se añade SO₂ al medio y la temperatura se fija entre 30 y 35°C ya que si se utilizan temperaturas mayores se favorecería la degradación de pigmentos. Los resultados del presente trabajo coinciden con estos reportes respecto de la condición de acidificación del medio y el uso de temperaturas más altas ya que nuestros datos indican una mejor extracción a 60°C. Las diferencias de resultados pueden deberse a la diferencia de composición que puede tener la variedad en estudio.

Nüzhet y Ferruh (2006) también encontraron efectos positivos de las altas temperaturas en los rendimientos de extracción al señalar que el coeficiente de difusión de las antocianinas en el medio de extracción aumenta con la temperatura. También confirmaron que el pH es un factor sinérgico en el proceso de extracción pues a menor pH la difusión de los pigmentos se incrementó, lo cual confirma la necesidad de utilizar un medio de extracción acidificado. Por su parte, Zhonggao y col. (2005) determinaron que una relación sólido:solvente de 1:6 en un proceso de doble extracción por tiempos de 15 min cada una y temperaturas de 40-60°C son las condiciones óptimas para la extracción de pigmentos rojos en frutos de zarzamora. Estos datos son muy parecidos a los obtenidos en el presente trabajo.

El uso de etanol para la extracción de pigmentos se seleccionó por el uso potencial de estos extractos en la industria alimentaria en la que el etanol es un solvente orgánico permitido. Además, el uso de etanol permite obtener un índice de pureza mayor en los pigmentos extraídos respecto de los alcanzados con extracciones acuosas, pues estas solubilizan sustancias que no son de interés en las aplicaciones de los mismos (Pifferi y Vaccari, 1983; Cacace y Mazza, 2002). El uso del HCl como acidificante del etanol, tuvo como finalidad desnaturalizar las membranas de las células, disolver los pigmentos, y proporcionar un pH ácido que ayudara a estabilizar los pigmentos obtenidos. Se ha indicado que la acidificación reduce la hidrólisis de grupos acilo y residuos de azúcares esterificados a las moléculas de antocianinas y causante de la destrucción de los pigmentos (Wrolstad y col., 2004).

6.1.2. Extracción de fenoles totales

En el caso del contenido de fenoles totales (FT), el factor tiempo y la interacción temperatura*tiempo tuvieron un efecto significativo ($p < 0.042$ y 0.011 , respectivamente) y no así el factor temperatura ($p < 0.214$) (Cuadro 6.2).

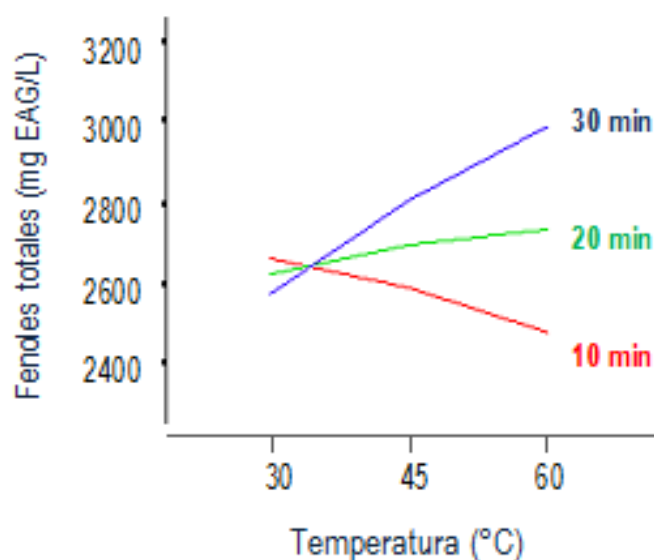


Figura 6.1. Efecto de la interacción entre los factores de temperatura y tiempo en la extracción de fenoles totales (FT).

Lo anterior implica que la extracción de fenoles a 30°C se ve menos influida por el tiempo de extracción, no así para temperaturas de 60°C donde los incrementos en el tiempo de extracción repercute en mayor contenido de fenoles totales (Figura 6.1).

Es importante considerar el comportamiento de esta variable como un posible indicativo de la pureza de los extractos obtenidos, considerando lo sugerido por Jing y Giusti (2007). Reextracciones consecutivas pueden generar un incremento en la recuperación de fenoles totales con un ligero incremento en la recuperación de antocianinas, dando como resultado un decremento de la pureza.

El contenido total de fenoles en los extractos de antocianinas fue de 268.90 ± 9.67 mg EAG/100 g fruto (2689 mg EAG/ L extracto) (Cuadro 6.1). De igual manera que en el contenido de antocianinas, este valor es comparable en sus niveles más bajos con los reportados por Moyer y col. (2002) de 275-678 mg EAG/100 g fruto para las distintas variedades de zarzamora evaluadas.

Por otro lado, el contenido de fenoles totales, puede estar relacionado también con la capacidad antioxidante en los extractos obtenidos, ya que se ha observado una elevada correlación positiva entre el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante en berries (Shiow y Hsin-Shan, 2000; Kähkönen y col., 2001; Pantelidis y col., 2007).

6.1.3. Calidad de color de los extractos

Para investigar la calidad del color en los extractos obtenidos fue necesario medir el color de manera objetiva. Las determinaciones colorimétricas denotan la apariencia visual del producto mientras que los parámetros colorimétricos señalan la composición química que imparte el color observado (Wrolstad y col., 2005). De ahí la importancia de ambas determinaciones. Los parámetros colorimétricos son una forma de evaluar la degradación de antocianinas

teniendo como criterio que el incremento en la densidad de color es resultado de la contribución del color polimérico. Éste a su vez está asociado con el deterioro de color en las antocianinas; mientras que el porcentaje de color polimérico, que es una medida de la resistencia de los pigmentos al blanqueo por bisulfito, refleja el grado de polimerización de las antocianinas (Rommel y col., 1992).

Los cambios en los parámetros colorimétricos registrados en los extractos obtenidos se muestran en el Cuadro 6.3. Los factores de tiempo y temperatura no tuvieron un efecto estadísticamente significativo sobre los parámetros colorimétricos (densidad de color, color polimérico y % de color polimérico) entre los diferentes tratamientos aplicados.

Cuadro 6.3. Parámetros colorimétricos obtenidos en extractos de zarzamora.

TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (min)	DENSIDAD DE COLOR	COLOR POLIMÉRICO	% COLOR POLIMÉRICO
30	10	45.06 ± 4.34 a	0.958 ± 0.42 a	2.091 ± 0.73 a
30	30	50.01 ± 0.005 a	0.867 ± 0.02 a	1.734 ± 0.04 a
45	20	46.60 ± 3.56 a	0.665 ± 0.03 a	1.428 ± 0.05 a
60	10	50.32 ± 1.28 a	1.074 ± 0.17 a	2.131 ± 0.28 a
60	30	54.65 ± 4.69 a	1.125 ± 0.26 a	2.045 ± 0.25 a

Resultados expresados como la media de dos experimentos independientes con tres repeticiones ± ES. Letras diferentes en misma columna indican diferencia estadística significativa, Tukey, $\alpha=0.05$.

Los valores de los parámetros colorimétricos obtenidos (Cuadro 6.3) tienen cierta comparación con los obtenidos por Rodríguez-Saona y col. (2001) para jugo de rábano con una concentración de antocianinas cuatro veces mayor (398 mg /100 mL) que la concentración de extractos en este estudio; registrando por ello una densidad de color de 149 y 3.7% de color polimérico.

Al igual que en el caso de los parámetros colorimétricos, las determinaciones colorimétricas de luminosidad (L^*), pureza o cromaticidad (C^*) y tono o ángulo de matiz (h°) tampoco mostraron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos de extracción de pigmentos (Cuadro 6.4).

Cuadro 6.4. Determinaciones colorimétricas en los extractos de zarzamora.

TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (min)	L*	C*	h°
30	10	29.50 ± 0.38 ab	22.98 ± 1.44 a	21.94 ± 0.68 a
30	30	28.75 ± 0.24 b	20.11 ± 0.94 a	20.98 ± 0.22 a
45	20	29.94 ± 0.13 a	23.86 ± 0.71 a	22.53 ± 0.13 a
60	10	29.13 ± 0.14 ab	21.32 ± 0.88 a	21.49 ± 0.49 a
60	30	29.39 ± 0.21 ab	21.94 ± 1.32 a	21.79 ± 0.55 a

Resultados expresados como la media de dos experimentos independientes con tres repeticiones ± ES. Letras diferentes en misma columna indican diferencia estadística significativa, Tukey, $\alpha=0.05$.

Los valores de L* y C* fueron bajos (29 y 22 respectivamente), lo que indica que la coloración fue oscura, debido a que en su determinación no se realizó una dilución de los extractos. El valor de pureza o cromaticidad nos indica el valor del vector en el espacio de color; a medida que éste es más pequeño nos indica que la muestra se encuentra en una región oscura de ese espacio en una posición determinada por el valor del ángulo de matiz o tono (h°). Éste se ubicó en el primer cuadrante del espacio de color y relativamente cerca del eje del valor a* que corresponde a coloraciones rojas (21°). Estos valores son consistentes con las coloraciones ofrecidas por las antocianinas a pH por debajo de 4.0.

6.2. Estudios de estabilidad de pigmentos

6.2.1. Estudio preliminar del tratamiento de APH

A pesar de que los extractos de antocianinas utilizados en esta parte experimental fueron obtenidos de frutos de mejor calidad visual (los destinados al mercado fresco de los EUA, sección 5.3) no hubo diferencia en la concentración de antocianinas respecto de los frutos denominados proceso, alcanzando una concentración de 807.5 ± 11.1 mg ACN/L (Cuadro 6.1).

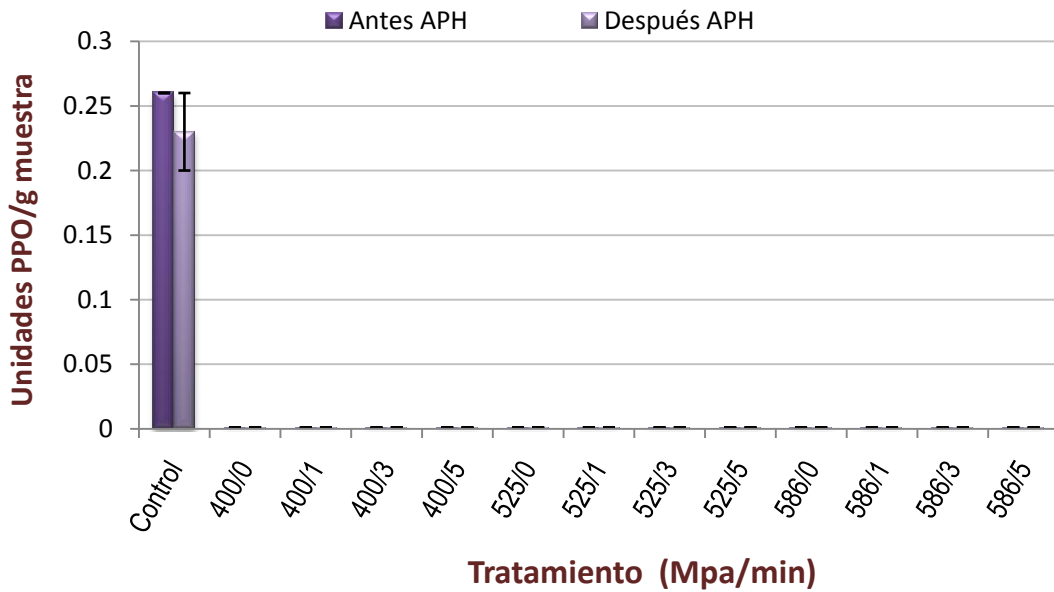
Dado que la tecnología de APH es relativamente reciente, no se han reportado estudios de su efecto en la degradación de antocianinas en extractos de zarzamora. Por ello, se decidió evaluar el efecto presiones de 400, 525 y 586 MPa aplicadas durante 0 (compresión-descompresión), 1, 3 y 5 min. El rango de presiones evaluadas, correspondió a condiciones a las que normalmente trabajan los equipos comerciales. De igual manera, los tiempos de aplicación mayores a 5 min, no tienen sustento para aplicaciones prácticas en la industria, esto es debido a que tiempos mayores elevan los costos de operación de esta tecnología, haciéndola incosteable a nivel práctico (Tonello, 2008).

6.2.1.1. Actividad enzimática de PPO

La polifenol oxidasa (PPO), es una de las principales enzimas responsables del oscurecimiento en frutas y vegetales durante su manejo poscosecha y procesamiento. La resistencia de PPO a APH es dependiente de la fuente de enzima (Weemaes y col., 1998).

La evaluación de actividad enzimática (Figura 6.2) confirmó que los extractos obtenidos con etanol acidificado no muestran actividad residual de PPO. Ello señala que la extracción etanólica destruye la actividad enzimática, por precipitación-desnaturalización de proteínas. En cambio, la evaluación de actividad enzimática en fruto entero (control), que permitió validar la metodología utilizada para ésta determinación, exhibió una actividad enzimática de 0.26 ± 0.0 y 0.23 ± 0.03 unidades PPO/g muestra para los extractos de zarzamora sin y con tratamiento APH, respectivamente. La ausencia de actividad de PPO en los extractos debido a la extracción con etanol acidificado constituye una base fundamental para la conservación de los extractos. Si se utilizara una extracción acuosa es posible que se extraiga la enzima en forma activa y esta acelere los procesos de degradación de las antocianinas a través de los mecanismos de oxidación acoplada con otros fenoles o por adición nucleofílica entre las mismas antocianinas o con otras quinonas de los fenoles como lo demostró Sarni y col. (1995) en soluciones modelo tipo mosto de uva.

Actividad PPO



1 Unidad = cambio en 0.001 unidades de absorbancia en un minuto

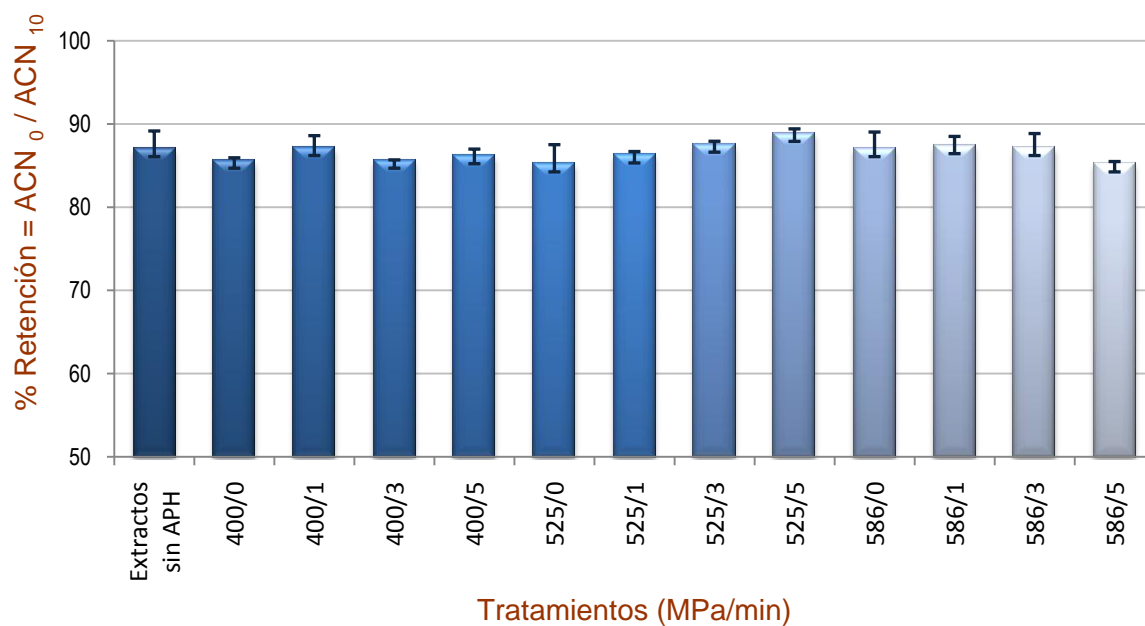
Resultados expresados como la media de un experimento con tres replicas \pm ES.

Figura 6.2. Actividad enzimática de PPO en extractos de pigmentos antes y después de aplicación de APH.

6.2.1.2. % Retención de antocianinas

La Figura 6.3 muestra el porcentaje de retención de antocianinas en los diferentes tratamientos estudiados y después de 10 días de almacenamiento a 25°C. No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos aplicados de APH ni en presencia de luz u oscuridad. Estos resultados coinciden con los reportados por Zabetakis y col. (2000) y Suthanthangjai y col. (2005) quienes tampoco observaron un efecto significativo de las APH en el deterioro de las antocianinas de fresa y frambuesa, respectivamente. Al no observarse un efecto del tratamiento APH, se decidió utilizar en los estudios de almacenamiento y comparación con el tratamiento térmico convencional, la condición de APH a 586 MPa con tiempos de 1 y 3 min, seleccionada por razones de costo.

% Retención antocianinas al día 10



Resultados expresados como la media de un experimento con tres replicas \pm ES.

Figura 6.3. % Retención de antocianinas en extractos sometidos a APH después de 10 días a 25°C.

6.2.2. Estudios de estabilidad final de pigmentos durante el almacenamiento

Los parámetros de estabilidad a través del tiempo evaluados fueron: % de retención de antocianinas, índice de degradación de antocianinas y la diferencia neta de color, mientras que los factores de estudio fueron: (1) pasteurización térmica o por tratamiento APH, (2) temperatura de almacenamiento, (3) pH del extracto, y (4) presencia o ausencia de luz durante el almacenamiento.

6.2.2.1. % Retención de antocianinas

No se observó un efecto significativo de los tratamientos de pasteurización y APH sobre esta variable ($p > 0.005$, Cuadro 6.5), lo cual sugiere que su acción es únicamente inhibir actividad enzimática, misma que fue suprimida al realizar las extracciones con etanol, y no minimizar o retardar la polimerización como lo sugieren Shrikhande (1976), Rommel y col. (1992) y Cemeroglu y col. (1994).

A diferencia del factor tratamiento, los factores de temperatura de almacenamiento, pH y luz sí mostraron un efecto notorio y evidente en el % de retención de antocianinas, como se puede observar en la prueba de efectos de estos factores sobre la variable respuesta ($p < 0.001$, Cuadro 6.5), así como las interacciones simples entre los mismos (Cuadro 6.5).

Cuadro 6.5. Nivel de significancia de los factores de estudio sobre % retención de antocianinas.

	Prob>F
TRATAMIENTO	0.9861
TEMPERATURA	<.0001
pH	<.0001
LUZ	<.0001
TRAT*TEMP	0.9957
TRAT*pH	0.9535
TEMP*pH	<.0001
TRAT*LUZ	0.9207
TEMP*LUZ	<.0001
pH*LUZ	0.0250

En la Figura. 6.4, se observa que el porcentaje de retención de antocianinas disminuyó conforme transcurrió el periodo de almacenamiento y que esta retención fue menor a medida que la temperatura de almacenamiento se incrementó. A los 40 días de almacenamiento a 45°C, se observó una degradación del 93% (7% de retención de color), mientras que después de 90 días de almacenamiento a 4 y 25°C hubo una degradación de 15 y 65%, respectivamente en los extractos con pH de 1.0 y mantenidos en la oscuridad. También en esta misma figura se observa que para cada temperatura, los pH bajos y condiciones de oscuridad mostraron mayor retención de antocianinas en comparación con las muestras almacenadas en condiciones de luz.

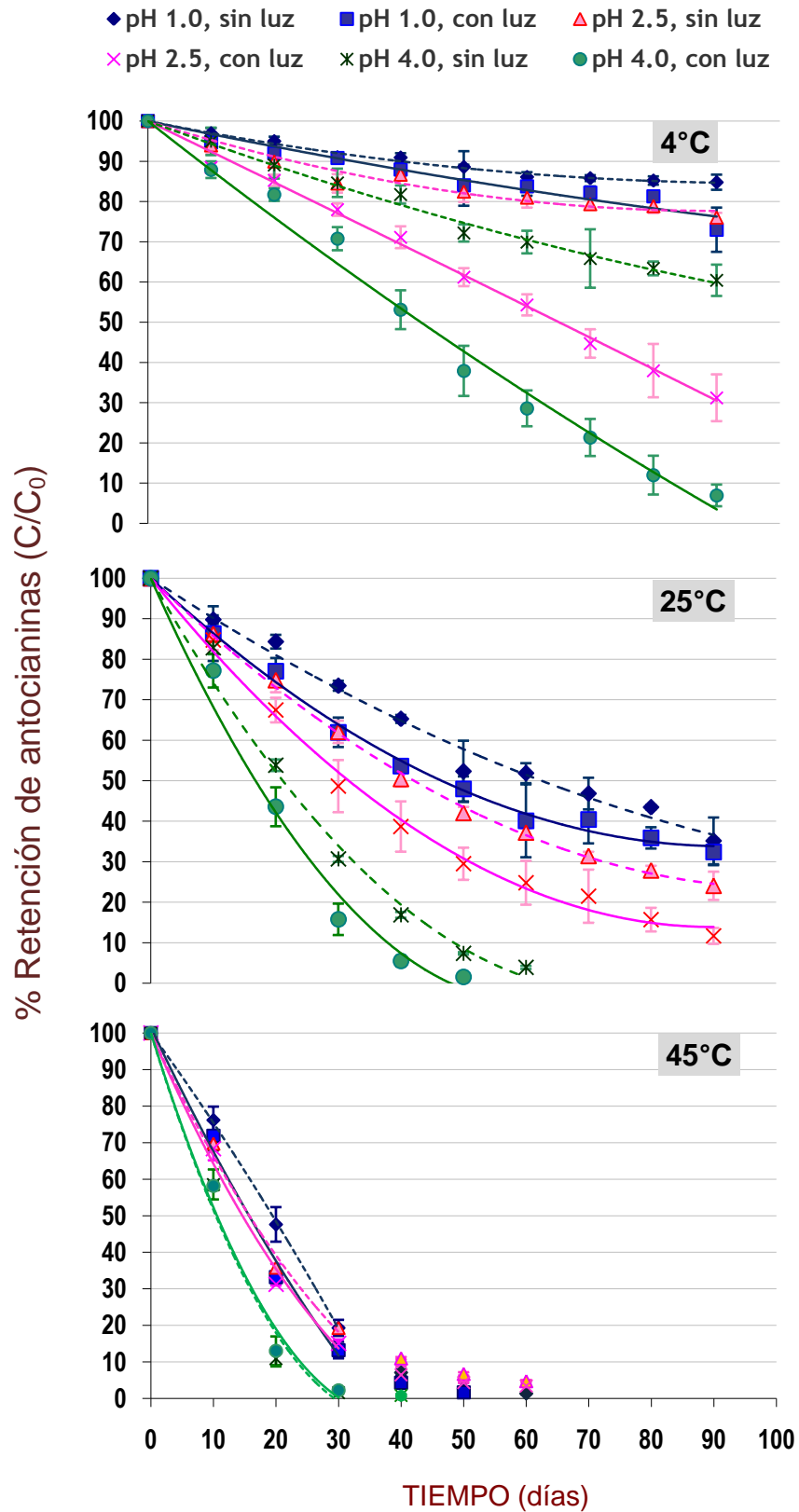


Figura 6.4. % Retención de antocianinas en extractos de zarzamora durante el almacenamiento a 4, 25 y 45 °C, con diferentes pH 1.0, 2.5 y 4.0 y bajo condiciones de luz y oscuridad.

Otro aspecto que muestra la Figura 6.4, es que el porcentaje de retención de antocianinas (también interpretado como pérdida de las mismas) se ajusto a un modelo no lineal, como lo indicaron las líneas de ajuste señaladas para cada condición usando el paquete estadístico JMP 5.0.1.

El efecto negativo del almacenamiento a alta temperatura coincide con lo afirmado por diversos autores (Timberlake, 1980; Jackman y col., 1987; Wei-Dong y Shi-Ying, 2007). De igual forma, como ya se ha indicado, a pH bajo, hubo una mejor retención de pigmentos; sin embargo, este efecto fue más difícil de observar a temperaturas elevadas (45°C). Es posible que a esas temperaturas y en condiciones ácidas pueda ocurrir una hidrólisis de grupos glucosídicos de las antocianinas generando las agliconas o antocianidinas correspondientes, las cuales, al ser más reactivas, posiblemente faciliten su condensación y por tanto generen la polimerización de las mismas, según lo sugerido por Rodríguez-Saona y col. (2001) y Krifi y col. (2000). El efecto de la luz sobre la retención de antocianinas (Figuras 6.4 y 6.5) disminuyó a medida que incrementó la temperatura de almacenamiento es decir, el efecto potenciador de la degradación por la luz fue más evidente a bajas temperaturas. Este aspecto coincide con lo reportado por Attoe y Von Elbe, (1981).

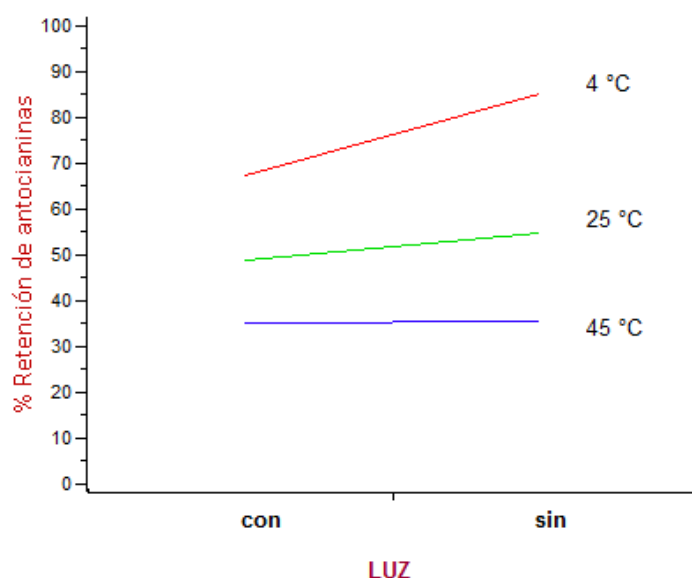


Figura. 6.5. Efecto de interacción entre el factor Luz (con y sin) y la Temperatura (4, 25 y 45°C) sobre el % de retención de antocianinas.

Aunque en secciones posteriores se hará mayor discusión al respecto del mecanismo de degradación de estos pigmentos, cabe destacar que en el extracto estudiado no hay actividad de la polifenol oxidasa por lo que el mecanismo de degradación debe ser de naturaleza química como la copigmentación señalada por Liao y col. (1992).

6.2.2.2. Índice de degradación de antocianinas

Al igual que en el porcentaje de retención de antocianinas, no se observó un efecto significativo de los tratamientos de altas presiones y pasteurización en el índice de degradación (ID) ($p > 0.005$, Cuadro 6.6).

Cuadro 6.6. Nivel de significancia de los factores de estudio sobre el índice de degradación de antocianinas (ID).

	Prob>F
TRATAMIENTO	0.1992
TEMPERATURA	<.0001
pH	<.0001
LUZ	0.1250
TRAT*TEMP	0.0944
TRAT*pH	0.0157
TEMP*pH	<.0001
TRAT*LUZ	0.8787
TEMP*LUZ	0.3314
pH*LUZ	0.5426

Los factores temperatura y pH, fueron los que mayor efecto mostraron en el incremento del ID a través del tiempo ($p < 0.001$, Cuadro 6.6), siendo particularmente notable los altos valores de ID para extractos almacenados a 45 y 25°C y pH de 4.0 y 1.0 (Figura 6.7). Esto nuevamente indicó que la degradación de las antocianinas es mayor a temperaturas altas y en esta condición el pH y la presencia o no de luz tienen un efecto menor. Sin embargo, a 25 y 4°C, el factor luz y pH fueron importantes en la degradación de los extractos. A 25°C, el ID máximo registrado fue de 3.5 en el día 50, para los extractos con pH de 4.0 expuestos a la luz, un valor considerablemente menor al observado a 45°C (ID de 10 en el día 40). Finalmente, a 4°C el incremento

en ID fue mínimo respecto de las otras temperaturas, presentando un valor promedio de 1.10 con un máximo de 1.40 registrado en el día 90 para el extracto a pH 4.0 en la presencia de luz (Figura 6.7). Lo anterior confirmó que el almacenamiento de los pigmentos debe hacerse a temperatura de refrigeración (4°C).

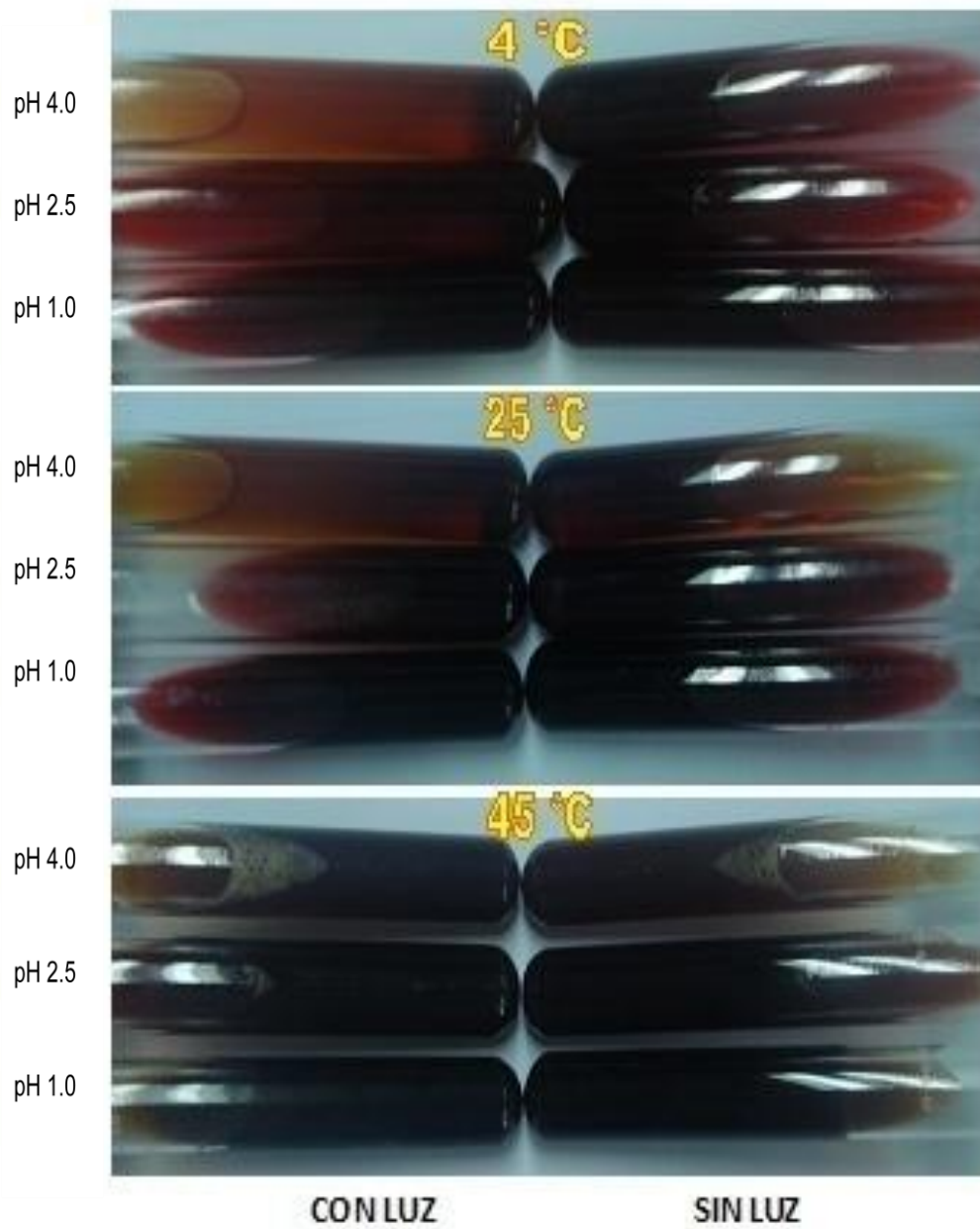


Figura. 6.6. Apariencia visual en extractos de zarzamora almacenados por 90 días a 4, 25 y 45 °C , con diferentes pH 1.0, 2.5 y 4.0 y bajo condiciones de luz y oscuridad.

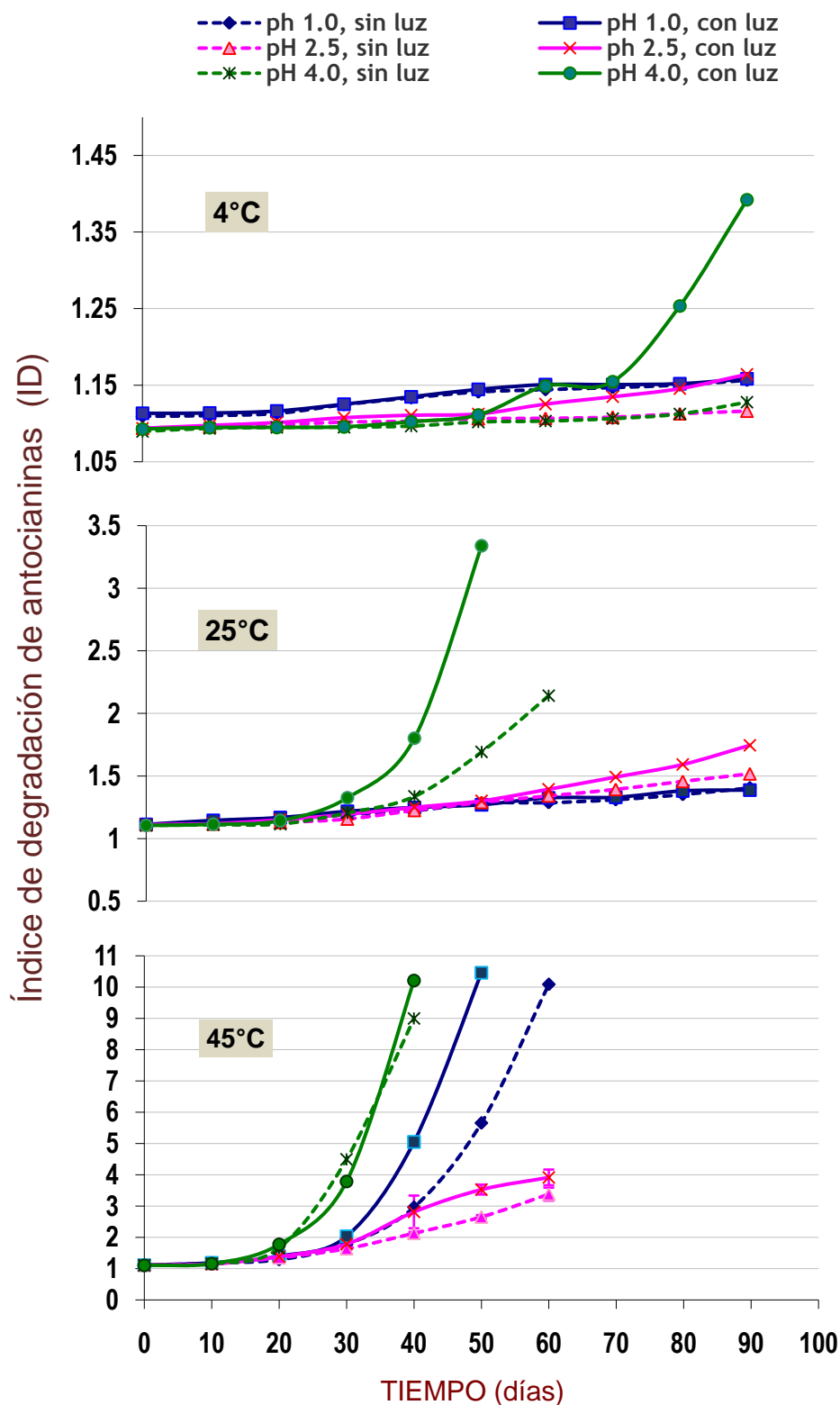


Figura. 6.7. Índice de degradación de antocianinas en extractos de zarzamora durante el almacenamiento a 4, 25 y 45 °C, con diferentes pH 1.0, 2.5 y 4.0 y bajo condiciones de luz y oscuridad.

Estas condiciones diferentes en las que se lleva a cabo la degradación de estos pigmentos podrían señalar el mecanismo por el cual ocurren los procesos de degradación.

Es importante señalar que la apariencia visual de los extractos al final de los 90 días de almacenamiento (Figura 6.6) mostró aspectos importantes que destacar: a 45 °C se formaron coloraciones muy oscuras con depósitos negros en las paredes de los tubos lo cual no ocurrió a 25 y 4 °C donde solo se formaron coloraciones marrones en el seno del extracto. En la misma figura se observa el efecto de la luz en la apariencia de los extractos aún a alta temperatura. Lo anterior puede ser atribuido a un efecto sinérgico entre la temperatura y la luz en los cambios de color de los extractos que posiblemente pueda involucrar otros procesos como la degradación de los azúcares contenidos en los extractos y de los liberados por las altas temperaturas mediante hidrólisis de los grupos glucosídicos de las antocianinas, mismos que podrían dar como resultado compuestos del tipo furfural vía reacciones de Maillard, y por tanto, incrementos en el oscurecimiento de los pigmentos por reacciones de condensación de estos productos según lo sugerido por Shrikhande (1976), Jackman y col. (1987) y Rein (2005).

6.2.2.3. Diferencia neta de color

El efecto de los factores de estudio sobre las ΔE encontradas en este trabajo fueron variables, nuevamente el efecto del tratamiento no fue significativo, en tanto que el factor temperatura, y las interacciones temperatura*pH y pH*luz mostraron efectos significativos ($p < 0.05$) (Cuadro 6.7).

Cuadro 6.7. Nivel de significancia de los factores de estudio sobre la diferencia neta de color (ΔE).

	Prob>F
TRATAMIENTO	0.0831
TEMPERATURA	<.0001
pH	0.3509
LUZ	0.4305
TRAT*TEMP	0.0702
TRAT*pH	0.1833
TEMP*pH	0.0052
TRAT*LUZ	0.4994
TEMP*LUZ	0.5962
pH*LUZ	0.0241

A 4°C, los extractos a pH de 4.0 y 2.5 expuestos a la luz, presentaron una mayor diferencia de color respecto de las muestras almacenadas en condiciones de oscuridad mientras que a pH de 1 los cambios de color fueron muy similares tanto en condiciones de oscuridad como de luz, lo cual concuerda con los resultados de los anteriores parámetros. Aunque se esperaba un registro alto del cambio de color en las condiciones de alta temperatura, pH 4 y presencia de luz; el comportamiento fue inverso, registrándose mayores valores en los extractos almacenados a pH 1.0 sin observarse una clara diferencia entre los extractos expuestos a la luz y los protegidos de la misma (Figura 6.8). En las condiciones de pH 1, presencia de luz y 25 y 45 °C, la diferencia de color rápidamente se aproximó a un valor máximo (entre 2.2 y 2.5) que se alcanzó entre los 20 y 30 días de almacenamiento.

Comparando el % de retención de antocianinas (Figura 6.4) con la ΔE durante el almacenamiento (Figura 6.8), es posible observar que la velocidad de cambio de color fue mucho más baja que el cambio en el porcentaje de retención de antocianinas, en concordancia con otros estudios como los de Martí y col. (2001) para el caso de jugo de granada.

Los anteriores datos señalan que los valores de color L^* C^* y h° no fueron capaces de explicar de manera correcta los cambios en el porcentaje de retención de color o el índice de degradación de las antocianinas observados

durante el almacenamiento. Este aspecto se demostró al realizar un análisis de correlación entre las variables consideradas. El coeficiente de correlación entre la diferencia neta de color, el % retención de antocianinas y el índice de degradación (Cuadro 6.8) fueron bajos (-0.4824 y 0.2206, respectivamente) que señalan lo afirmado anteriormente en el sentido de que los cambios de color no están completamente explicados por los cambios en las antocianinas. La falta de correlación entre estas variables pudo ser debida a que la metodología establecida para la medición del color en las muestras requiera de ajustes pues aunque visualmente se observaron cambios, la medida de color no lo reflejó.

Cuadro 6.8. Análisis de correlación entre el % de retención de antocianinas, Índice de degradación de antocianinas (ID) y diferencia neta de color (ΔE) durante el almacenamiento.

	% Retención	ID	ΔE
% Retención		-0.5139	-0.4824
ID			0.2206
ΔE			

n = 72

En la literatura se ha documentado que la degradación de antocianinas causa formación de sedimentos y subsecuentemente pigmentos pardos insolubles en jugos de cereza y jugo y concentrado de zarzamora (Cemeroglu, y col., 1994; Wei-Dong y Shi-Ying, 2007) aunque ninguno de los dos los correlacionó con los valores de color. Estos cambios visuales coinciden con lo observado en el presente trabajo. Los productos de la degradación de antocianinas generan cambios de color que pueden ser también una medida indirecta de la degradación de estos pigmentos. En la literatura se encuentran relaciones lineales que describen la variación del color total visual ($L^* \times a^* \times b^*$) con el contenido de antocianinas durante su degradación térmica. Por ejemplo, Ahmed y col. (2004) describen que la degradación térmica de las antocianinas de puré de ciruela se asoció a una disminución de los valores de L^* , a^* y b^* que a su vez se relacionó con un aumento en la diferencia neta de color (ΔE). Es posible que la consistencia del puré permitió una medición más adecuada del

color en tanto que en nuestro material de estudio, una parte de la luz que incidió en la muestra fue transmitida al interior de la muestra lo cual generó datos diferentes de color.

El conjunto de datos analizados en los párrafos previos, sugieren que las mejores condiciones para almacenar los pigmentos de zarzamora es almacenarlos a bajas temperaturas (4°C) y bajo pH (1.0) y protegidos de la luz. No obstante, aun en las mejores condiciones, se observó una ligera degradación de los pigmentos. Esta degradación no fue debida a un proceso enzimático puesto que se demostró la ausencia de actividad de PPO en los extractos. Debicki-Pospisil y col. (1983) demostraron que las antocianinas pueden reaccionar con el furfural o hidroximetil furfural para formar una ceto-pseudobase en el Carbono 4 de la molécula de antocianina. También pueden presentarse otras reacciones con los grupos OH del anillo bencénico no condensado, o bien que dos moléculas de la antocianina parcialmente ionizada reaccionen con una molécula de furfural la cual se puede generar durante la conservación de los extractos a alta temperatura.

García-Viguera y col. (1998) señalaron que la estabilidad y la degradación de las antocianinas están marcadamente influidas por la temperatura y que la formación de chalconas se favorece con las altas temperaturas de almacenamiento así mismo también señalaron que la concentración de pigmentos poliméricos se incrementa con la temperatura y tiempo de almacenamiento lo cual parece explicar los cambios encontrados en el presente trabajo. De igual forma, Bakker y Bridle (1992) señalaron un proceso de polimerización de las antocianinas en jugo de fresa a temperaturas superiores a 20°C que no ocurrió a temperaturas de -20°C lo cual también explica los resultados encontrados.

También es posible que se presenten otras interacciones de las antocianinas con otros fenoles como los flavan 3-ol y se formen compuestos de copigmentación como lo describió Liao y col. (1992) y que éstos contribuyan a los cambios de color observados.

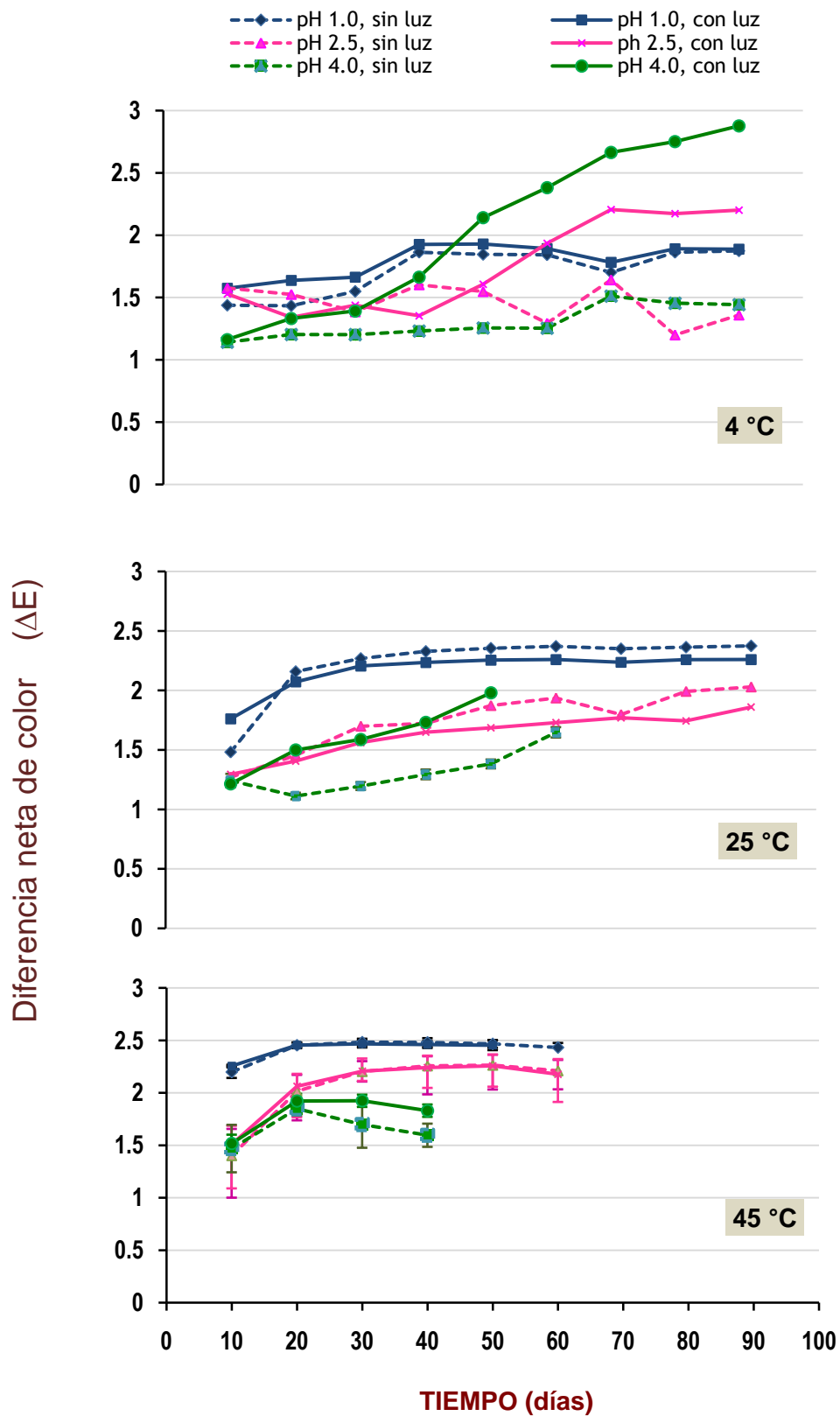


Figura. 6.8. Diferencia neta de color (ΔE) en extractos de zarzamora durante el almacenamiento a 4, 25 y 45 °C, con diferentes pH 1.0, 2.5 y 4.0 y en condiciones de luz y oscuridad.

6.2.2.4. Parámetros de degradación térmica

Los resultados descritos anteriormente establecen que la temperatura alta, pH alto y presencia de luz promueven la degradación de los extractos de antocianinas. Al comparar los valores experimentales de retención de antocianinas, mediante un modelamiento no lineal en el paquete estadístico JMP 5.0.1, con la ecuación de primer orden (Ec. 5.11) se tuvieron coeficientes de regresión altos ($R^2 > 0.94$) en todas las condiciones evaluadas (Figura 6.9). Estos resultados indican que la degradación de antocianinas sigue una cinética de primer orden y por tanto pueden ser descritas por la Ec. 5.11, en acorde con otros estudios (Jackman y col., 1987; Cemeroglu y col., 1994; Wei-Dong y Shi-Ying, 2007).

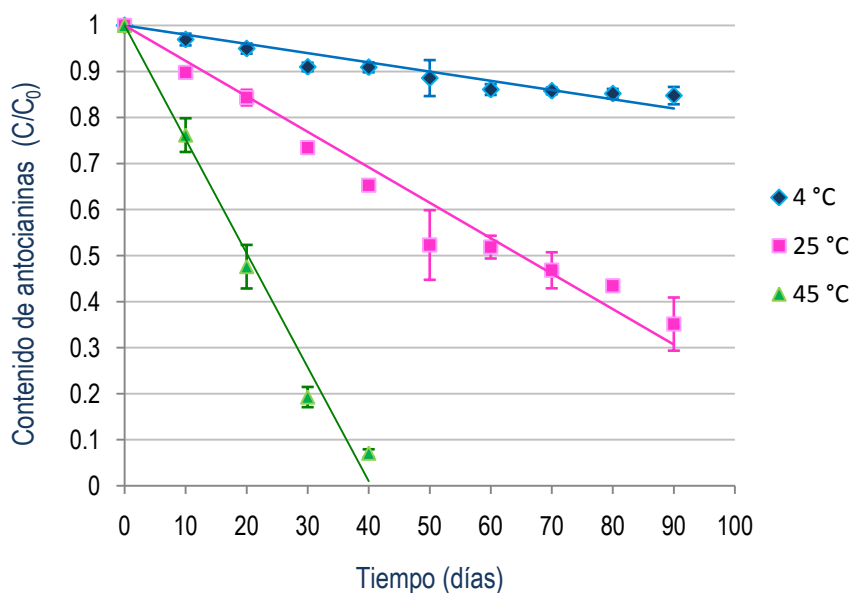


Figura. 6.9. Efecto de la temperatura sobre la degradación de antocianinas durante el almacenamiento a 4, 25 y 45 °C, en extractos con pH 1.0 y bajo oscuridad.

Así mismo, con el uso de la ecuación de Arrhenius (Ec. 5.13) y con ayuda gráfica (Figura 6.10) podemos determinar el efecto de la temperatura sobre los parámetros evaluados.

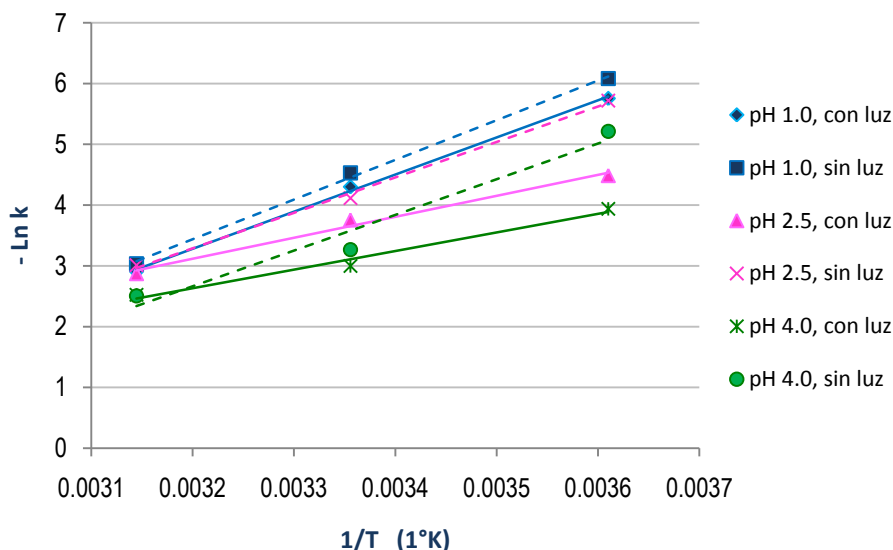


Figura. 6.10. Representación gráfica de ecuación de Arrhenius sobre la degradación de antocianinas en las condiciones evaluadas.

En el Cuadro 6.9 se concentran los datos de la constante de velocidad (k) obtenida por la regresión no lineal de la ecuación de la cinética de primer orden, la energía de activación (E_a) obtenida a través de la ecuación de Arrhenius y el tiempo de vida media de los extractos de antocianinas calculado de la cinética de primer orden. Para una misma temperatura y valor de pH, la constante de velocidad (k) se incrementó en la presencia de luz lo cual confirma que la luz aceleró la degradación de las antocianinas. Para una misma condición de temperatura y luz, el valor de esta constante de velocidad se incrementó a medida que lo hizo el pH. Estas tendencias en los valores de la constante de velocidad están de acuerdo con lo reportado por Attoe y Von Elbe (1981) para antocianinas de arándanos a pH 2.5 y almacenados a 40 y 55°C tanto en condiciones de luz y oscuridad. Los valores de k encontrados en el presente trabajo, para el caso de las muestras expuestas a la luz y almacenadas a 45°C, fueron hasta 6 veces menores que los indicados por aquellos autores para las muestras almacenadas a 40°C ($k = 0.0138$ y 0.0124 h^{-1} para cianidin-3-arabinósido y cianidin-3-galactósido, respectivamente), lo cual sugiere que la degradación de la antocianina (cianidin-3-glucósido) es más lenta que las antocianinas evaluadas por los autores antes citados. Lo anterior indica que la susceptibilidad a la degradación térmica de las antocianinas al

calor parece estar influida por el tipo de azúcar de sustitución en la molécula (Wrolstad y col., 2005; Wei-Dong y Shi-Ying, 2007).

Para los extractos almacenados a pH 1, la condición de exposición o no a la luz no afectó marcadamente los valores de la energía de activación (12.1 y 13.1 Kcal/mol en luz y oscuridad, respectivamente) y estos fueron similares a la E_a para el pH de 4 sin la presencia de luz. Para los pH de 2.5 y 4 la energía de activación fue menor en un 50% (6.96 y 6.15 Kcal/mol) bajo la presencia de luz confirmando con esto que el proceso de degradación de las antocianinas se ve facilitado por la presencia de la luz. En términos generales, los valores de E_a encontrados en el presente estudio fueron menores que los reportadas por Attoe y Von Elbe (1981), (26.7 Kcal/mol a pH 2.5), indicando con ello que la activación del proceso de degradación de las antocianinas de los extractos de zarzamora se ve facilitado. No obstante, los valores de E_a de los extractos a pH 1.0 sin exposición a la luz, son comparables a los obtenidos por Wei-Dong y Shi-Ying (2007) quienes reportaron valores de $E_a=18.0$ Kcal/mol para la degradación de jugo de zarzamora de 8.9 °Bx y almacenado a 5, 25 y 37°C, con tiempos de vida media de 330, 32 y 11 días respectivamente. En este estudio, la E_a fue ligeramente menor (13.1 Kcal/mol), y con vida media ligeramente mayor a temperaturas de 25 y 45°C (63 y 14 días respectivamente) Lo anterior permitió corroborar lo citado por Cemeroglu y col. (1994) y Wei-Dong y Shi-Ying, (2007) en el sentido que, altas energías de activación requieren sólo pequeños cambios en la temperatura para degradar un componente específico más rápidamente.

Otros resultados comparables a los aquí presentados son los de Cemeroglu y col. (1994), que reportaron valores de E_a de 15.58 Kcal/mol para la degradación de antocianinas en jugo de cereza de 45°Bx almacenado a 5, 20 y 37°C con tiempo de vida media ($t_{1/2}$) de 310, 45 y 14.4 respectivamente, mientras que para jugos con 71°Bx, los valores reportados fueron de $E_a=18.02$ y $t_{1/2}$ de 356, 38 y 11 días a 5, 20 y 37°C respectivamente.

Comparando la estabilidad de las antocianinas de cereza con las de zarzamora, la de la zarzamora fue ligeramente más susceptible a las altas temperaturas. Se sabe que la antocianina mayoritaria en zarzamora es la cianidin-3-glucósido mientras que en cereza es la cianidin-3-glucosilrutinosido por lo que la cianidin-3-glucósido tiene una mayor susceptibilidad a la degradación.

Los mayores tiempos de retención se obtuvieron a 4°C y pH 1.0 con ausencia de luz (325 días), seguido de aquellos mantenidos a la misma temperatura con pH de 1.0 en presencia de luz y pH de 2.5 en ausencia de luz (214 y 205 días, respectivamente).

Cuadro 6.9. Efecto de la temperatura, pH y luz en los parámetros cinéticos de degradación térmica de antocianinas: k, E_a y t_{1/2}.

pH	Exposición a luz	Temperatura (°C)	k x 10 ⁻³ (días ⁻¹)	E _a Kcal/mol	t _{1/2} (días)	
1.0	Sin	4	2.13 ± 0.001	13.138 ± 0.236	325.7 ± 31.6	
		25	10.85 ± 0.001		63.8 ± 0.5	
		45	46.48 ± 0.002		14.3 ± 0.7	
	Con	4	3.23 ± 0.001		12.064 ± 0.108	214.3 ± 6.5
		25	13.90 ± 0.001		49.9 ± 1.7	
		45	54.90 ± 0.001		12.6 ± 0.5	
2.5	Sin	4	3.36 ± 0.001	11.499 ± 0.125	205.9 ± 6.8	
		25	16.31 ± 0.002		42.4 ± 0.1	
		45	49.42 ± 0.002		14.0 ± 0.1	
	Con	4	10.72 ± 0.002		6.963 ± 0.153	64.7 ± 4.5
		25	22.85 ± 0.001		30.3 ± 1.0	
		45	55.24 ± 0.001		12.5 ± 0.4	
4.0	Sin	4	5.68 ± 0.003	11.434 ± 0.334	122.1 ± 7.0	
		25	37.71 ± 0.002		18.3 ± 0.2	
		45	80.42 ± 0.003		8.6 ± 0.1	
	Con	4	18.82 ± 0.001		6.158 ± 0.111	36.8 ± 1.8
		25	22.85 ± 0.001		14.3 ± 0.6	
		45	78.82 ± 0.001		8.7 ± 0.2	

Resultados expresados como la media ± ES.

k = Constante de velocidad

E_a = Energía de activación

t_{1/2} = Vida media

También se observó un efecto sinérgico importante del pH en conjunto con la temperatura y la luz. Al incrementar el pH, el tiempo de vida media disminuyó drásticamente; por ejemplo, a pH 4.0, 4°C y en presencia de luz, la vida media fue de 36 días; es decir una disminución de 6 veces la vida de media del extracto en condiciones similares, pero con pH de 1.

Además de los factores aquí estudiados, también intervienen otros como la estructura misma de las moléculas de antocianinas. A este respecto Jackman y col. (1987), indicaron que las agliconas de cada una de las antocianinas (antocianidinas) son más inestables que sus derivados acilados con residuos de moléculas de azúcares y añadieron que el tipo de azúcares tienen poco efecto en la reactividad de la molécula resultante pero que la posición en la que dicho azúcar se encuentre unido a la molécula, sí tiene un efecto significativo en la degradación de la misma habiéndose determinado que la pérdida de una molécula de azúcar unida al carbono C3 de la antocianina llevó a una rápida pérdida de color.

Respecto de la estructura molecular de la antocianina, los anteriores autores señalaron, que el catión flavilio es relativamente estable en condiciones ácidas y que conforme se incrementa el pH la concentración de esta especie química disminuye y la pigmentación decrece. Esto desde luego explica parte de los resultados observados en el presente trabajo.

No obstante, también se ha notado que los cambios de color en productos de plantas no son solo debidos a los cambios de pH sino también a mecanismos de copigmentación y quelación de metales. Estas antocianinas forman complejos con otros flavonoides (quercetina y rutina por ejemplo) y aunque muchas de estas reacciones llevan a un incremento en la pigmentación, también se ha demostrado que otras llevan a la degradación del color como la condensación de las sales de flavilio con aminoácidos, catequina para dar flavan-2-enol los cuales son muy reactivos y pueden hacer perder el color de las antocianinas.

La condensación del ácido ascórbico con las antocianinas es un ejemplo de una reacción de decoloración (Freedman y Francis, 1984).

Las magnitudes notablemente más altas de las constantes de reacción encontradas para estos extractos seguramente puede deberse al tipo de antocianinas que contengan éstos pues se ha encontrado que aquellos sistemas que contienen cianidin-3-glucósido son más reactivos que aquellos que contienen pelargonidin-3-glucósido.

De acuerdo con esta información, se puede decir que la degradación del color de los extractos de zarzamora, muy probablemente sigue rutas diferentes y que éstas seguramente no obedecen a un sistema simple de degradación y sí a sistemas más complejos que aún falta por estudiar.

6.2.3. Análisis microbiológico de pigmentos

Los análisis microbiológicos practicados a todas las muestras obtenidas de los diferentes tratamientos estudiados, a los tiempos de almacenamiento de 10 y 90 días, no indicaron presencia de hongos o levaduras, lo cual se explica por la alta concentración de etanol aplicado para realizar las extracciones. Esto también constituye una ventaja para los posibles usos que se pretendan hacer de estos productos pues podrían aplicarse a alimentos que no fueran procesados térmicamente y que la adición del pigmento no contribuiría a aumentar su carga microbiana.

VII. CONCLUSIONES

- El contenido de antocianinas en fruto de zarzamora cv. 'Tupi' fue bajo (81.5 mg/100g), comparado con otras variedades de zarzamora, sin embargo se encuentra dentro de los niveles obtenidos en otras fuentes naturales de uso potencial como fuentes de colorantes naturales.
- La temperatura de extracción mostró un mayor efecto sobre el % de recuperación de pigmentos, en comparación con el factor tiempo. Procesos de extracción con altas temperaturas y corto tiempo, ofrecen un buen rendimiento en la extracción de pigmentos y sin afectar de manera negativa los parámetros colorimétricos en los extractos obtenidos.
- No se encontraron efectos significativos de los tratamientos de pasteurización y APH, sobre la retención de pigmentos en los extractos obtenidos, a través del tiempo.
- La degradación de antocianinas en los extractos durante el almacenamiento, puede ser modelada por cinéticas de primer orden.
- Las mejores condiciones de conservación de los extractos fueron: almacenar los pigmentos a 4°C a un pH de 1.0 y bajo oscuridad.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Ahmed J.**, U.S. Shivare, and G.S. Raghavan. **2004**. Thermal degradation kinetics of anthocyanin and visual colour of plum puree. *Eur. Food Res. Technol.* 218, 525-528.
- Ariel R. Vicente.** **2004**. Efecto de tratamientos térmicos de alta temperatura sobre calidad y fisiología postcosecha de frutillas (*Fragaria x ananassa* Duch.). Trabajo de tesis doctoral Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA). Facultad de Ciencias Exactas. UNLP-CONICET, Buenos Aires, Argentina, pp. 168-175.
- Attoe E. L.** and J. H. **Von Elbe.** **1981**. Photochemical degradation of betanine and select anthocyanins. *J. Food Sci.* 46, 1934-1937.
- Bakker J.**, and P. **Bridle.** **1998**. Strawberry juice colour. The effect of sulphur dioxide and EDTA on stability of anthocyanins. *J. Sci. Food Agric.* 60(4): 477-481.
- Barret D. M.**, L. Somogyi and H. Ramaswamy. **2004**. *Processing Fruits 2nd Edition Science and Technology.* Ed. CRC Press.
- Cacace J.E.** and G. **Mazza.** **2002**. Extraction of anthocyanins and other phenolics from black currants with sulfured water. *J. Agric. Food Chem.* 50, 5939-5946.
- Cano M.P.**, A. Hernández and B. De Ancos. **1997**. High pressure and temperature effects on enzyme inactivation in strawberry and orange products. *J. Food Sci.* 62(1), 85-88.
- Cemeroglu B.**, S. Velioglu and S. Isik. **1994**. Degradation kinetics of anthocyanins in sour cherry juice and concentrate. *J. Food Sci.* 59(6), 1216-1218.
- Cohen E.** and I. **Saguy.** **1983**. Effect of water activity and moisture content on the stability of beet powder pigments. *J. Food Sci.* 48, 703-707.
- Debicki-Pospisil J.**, T. Lovric, N. Trinajstic, and A. Sabljic. **1983**. Anthocyanin degradation in the presence of furfural and hydroxymethylfurfural. *J. Food Sci.* 48(2): 411-416.
- Del Pozo-Insfran D.**, A. Del Follo-Martinez, S.T. Talcote and C.H. Brenes. **2007**. Stability of copigmented anthocyanins and ascorbic acid in muscadine grape juice processed by high hydrostatic pressure. *J. Food Sci.* 72(4), S247-S253.

- Delgado-Vargas** F., A.R. Jiménez y O. Paredes-López. **2000**. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins and betalains –Characteristics, biosynthesis, processing and stability-. Crit. Rev. Food Sci. and Nutr., 40 (3), 173-289.
- Douglas** B. MacDougall. **2002**. Colour in food: Improving quality. Ed. Cambridge, England. Pp 311-315, 336-349.
- Fan-Chiang** Ho-Ju and R.E. **Wrolstad**. **2005**. Anthocyanin pigment composition of blackberries. J. Food Sci. 70(3), C198-C202.
- FAOSTAT**. FAO Dirección de Estadística **2008**
URL: <http://www.fao.org/statistics>
- FDA**. Publicaciones en Español de la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos. Aditivos en los alimentos. Aditivo de color.
URL: <http://www.fda.gov/oc/spanish/>
- Fernández** E. **1981**. Microbiología sanitaria agua y alimentos. Ed. EDUG, Guadalajara Jal., México: 174-175, 227,232,476-479.
- Fennema**, O.R. **1993**. Química de los alimentos. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza (España). Cap. 8. Pp. 615-659.
- Freedman** L. and F.J. **Francis**. **1984**. Effect of ascorbic acid on color of jellies. J. Food Sci. 49 (4) 1212-1213.
- Fuleki** Tibor and F.J. **Francis**. **1968**. Quantitative methods for anthocyanins. 2. Determination of total anthocyanin and degradation index for cranberry juice. J. Food Sci. 33, 78-83.
- Gao** L. and G. **Mazza**. **1996**. Extraction of anthocyanins pigments from purple sunflower hulls. J. Food Sci. 61(3), 600-603.
- García-Viguera** C., P. Zafrilla, F. Artes, F. Romero, P. Abellan, and F.A. Tomas-Barberan. **1998**. Colour and anthocyanins stability of red raspberry jam. J. Sci. Food Agric. 78(4): 575-573.
- Giusti** M. M., E. L. Rodríguez-Saona, R. J. Baggett, L. G. Reed, W. R. Durst and R.E. Wrolstad. **1998**. Anthocyanin pigment composition of red radish cultivars as potential food colorants. J. Food Sci. 63 (2), 219-224.
- Hsu** A.F., C.E. Thomas and D. Brauer. **1988**. Evaluation of several methods for estimation of the total activity of potato polyphenol oxidase. J. Food Sci. 53(6):1743-1745.
- Jackman** L. R., Y.R. Yada, A.M. Tung and R.E. Speers. **1987**. Anthocyanins as food colorants - a Review. J. Food Biochem. 11, 201-247.

- Jing P.** and **M. Giusti.** **2007.** Effects of extraction conditions on improving the yield and quality of an anthocyanin-rich purple corn (*Zea mays* L.) color extract. *J. Food Sci.* 72(7), C363-C368.
- Kader A.A., E. J. Mitcham and C.H. Crisosto** **2007.** Recomendaciones para mantener la calidad postcosecha. Department of Pomology, University of California, Davis, CA 95616. Consulta mayo 2007:
URL: <http://postharvest.ucdavis.edu/Produce/ProduceFacts/Espanol/Bayas.shtml>
- Kähkönen M.P., I.A. Hopia and M. Heinonen.** **2001.** Berry phenolics and their antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* 49, 4076-4082.
- Kakali Roy, S. Gullapalli, U. R. Chaudhuri and R. Chakraborty.** **2004.** Short communication the use of a natural colorant based on betalain in the manufacture of sweet products in India. *Int. J. Food Sci. and Technol.* 39, 1087–1091.
- Krifi B.,F. Chouteau, J. Boudrant and M. Metche.** **2000.** Degradation of anthocyanins from blood orange juices. *Int. J. Food Sci. and Technol.* 35, 275–283.
- Laleh G.H., H. Frydoonfar, R. Heidary, R. Jameei and S. Zare.** **2006.** The effect of light, temperature, pH and species on stability of anthocyanin Pigments in four *Berberis* species. *Pakistan J. Nutr.* 5(1), 90-92.
- Lees D.H. and F.J. Francis.** **1972** Standardization of pigment analyses in cranberries. *HortScience* 7(1), 83-84.
- Lehninger Albert L.** **1995.** Bioquímica. Segunda Edición, Ed., Omega, S.A. (Barcelona), pp. 194.
- Liao H., Y. Cai, and E. Haslam.** **1992.** Polyphenol interactions. Anthocyanins co-pigmentation and colour changes in red wines. *J. Sci. Food Agric.* 59(3): 299-305.
- Lugo C., Eugenia del Carmen.** **2003.** Colorantes naturales, usos y perspectivas. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ). Serie Énfasis, Alimentación, 9(2): 66-69.
- Martí N., A. Pérez-Vicente and C. García-Viguera.** **2001.** Influence of storage temperatura and ascorbic acid addition on pomegranate juice. *J. Sci. Food Agric.* 82, 217-221.
- Merchand R., Marco Antonio.** **2004.** Estudio exploratorio que analiza las razones de por qué las transnacionales deciden invertir para producir el fruto de la zarzamora en la región de Los Reyes, Michoacán: México.
- Metivier R.P., F.J. Francis and F.M. Clydesdale.** **1980.** Solvent extraction of anthocyanins from wine pomace. *J. Food Sci.* 45(4), 1099-1100.

- Morales-Troncoso C. y M.C. Alba-Aldave. 2005.** Desarrollo exportador y competitividad: el caso del aguacate mexicano. Universidad Autónoma de México. Consulta mayo 2007:
URL: http://www.alafec.unam.mx/asam_cuba/ponencias/negint/negint01.doc
- Moyer A.R., E.K. Hummer, E.C. Finn B. Frei and R.E. Wrolstad. 2002.** Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity in diverse small fruits: Vaccinium, Rubus and Ribes. *J. Agric. Food Chem.* 50, 519-525.
- Muñoz R. M. y M. R. Juárez. 1995.** El mercado mundial de la frambuesa y zarzamora. Universidad Autónoma de Chapingo, Texcoco, México. Pp. 8-27.
- Nüzhet T. and E. Ferruh. 2006.** Effects of pH and temperature of extraction medium on effective diffusion coefficient of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucus carota* var. L.). *J. Food Eng.* 76, 579–583.
- NOM-119-SSA1-1994.** Norma Oficial Mexicana. Bienes y servicios, materias primas para alimentos, productos de perfumería y belleza. Colorantes orgánicos naturales. Especificaciones naturales.
URL: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/119ssa14.html>
- Pantelidis G.E., M. Vasilakakis, G.A. Manganaris and G. Diamantidis. 2007.** Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and Cornelian cherries. *Food Chem.* 102, 777–783.
- Pifferi P.G. and A. Vaccari. 1983.** The anthocyanins of sunflower, II.- A study of the extraction process. *J. Food Technol.* 18, 629-638.
- Piña Dumoulin, V. C. Saucedo, V. Ayala E. y A. Muratalla L. 2001.** Atmósferas controladas para combatir daños postcosecha en Zarzamora (*Rubus sp.*). *Rev. Fac. Agron.* , 18, 87-105.
- PROEXANT.** Producción de Exportaciones Agrícolas No Tradicionales. Ecuador. Moras. Consulta mayo 2007:
URL: http://www.proexant.org.ec/HT_mora.html
- Rein, M. J. 2005.** Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins (dissertation). EKT series 1331. University of Helsinki, Department of Applied Chemistry and Microbiology. pp. 10-34.
- Reyes-Carmona J. 2005.** Capacidad antioxidante de extractos acuosos de frutos de zarzamora (*Rubus ssp*) cultivada en diferentes regiones climáticas. Querétaro, México. Universidad Autónoma de Querétaro. Tesis profesional para obtener el título de Maestría. Pp.3-25.
- Rodríguez-Saona L.E., M.M. Giusti and R.E. Wrolstad. 1999.** Color and pigment stability of red radish and red-fleshed potato anthocyanins in juice model systems. *J. Food Sci.* 64(3), 451-456.

- Rodríguez-Saona** L.E., M. M. Giusti, R. W. Durst and R.E. Wrolstad. **2001**. Development and process optimization of red radish concentrate extract as potential natural red colorant. *J. Food Proc. Preservation* 25, 165-182.
- Rommel**, A., R.E. Wrolstad, and D.A. Heatherbell. **1992**. Blackberry juice and wine: Processing and storage effects on anthocyanins composition, color and appearance. *J. Food Sci.* 57(2): 385-391.
- SAGARPA, SIAP**. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Sistema de Información Agrícola y Pecuaria. Consulta mayo 2007:
URL: http://www.siap.gob.mx/aagricola_siap/icultivo/index.jsp?
- SAGARPA, SIACON**. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación d Michoacán. Sistema de Información Agropecuaria de Consulta. Consulta mayo 2007:
URL:
<http://www.sedagro.michoacan.gob.mx/seidrus/publicaciones/revistas/Revista8%20orgn.pdf>
- Sarni** P., H. Fulcrand, V. Souillol, J.M. Bouquet, and V. Cheynier. **1995**. Mechanisms of anthocyanin degradation in grape must-like model solutions. *J. Sci. Food Agric.* 69(3): 385-391.
- Shiow** W. Y. and L. **Hsin-Shan**. **2000**. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *J. Agric. Food Chem.* 48, 140-146.
- Shrikhande** A.J. **1976**. Anthocyanins in foods. *Crit. Rev. in Food Sci. and Nutr.* 6, 193-218.
- Singleton** V.L. and J.A. **Rossi**. **1965**. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16, 144-158.
- Somers** C. T. and M.E. **Evans**. **1977**. Spectral evaluation of young red wines: Anthocyanin equilibria, total phenolics, free and molecular SO₂, "chemical age". *J. Sci. Food Agric.* 28(3), 279-287
- Suthanthangjai** W., P. Kajda and I. Zabetakis. **2005**. The effect of high hydrostatic pressure on the anthocyanins of raspberry (*Rubus idaeus*). *Food Chem.* 90, 193-197.
- Timberlake** C. F. **1980**. Anthocyanins-occurrence, extraction and chemistry. *Food Chem.* 5, 69-80.
- Tonello** Samson C. **2008**. Industrial supplier's perspective on commercialization of high pressure. In the 2008 Nonthermal Workshop Session, Oregon Convention Center, Portland, Oregon.

- Torre L.C.** and B.H. **Barrit.** **1977.** Quantitative evaluation of Rubus fruit anthocyanin pigments. J. Food Sci. 42(2), 488-490.
- Torres JA** and G. **Velázquez.** **2005.** Commercial opportunities and research challenges in the high pressure processing of foods. J. Food Eng. 67, 95-112.
- Torres JA** and G. **Velazquez.** **2007.** Hydrostatic pressure processing of foods. In Food Processing Operations and Modeling, 2nd edition, J. Irudayaraj, S. Jin (editors), CRC Press Inc.
- Ulloa F.P.,** M.J. Galotto and JA. Torres. **2008.** Procesos térmicos asistidos por presión (PTAP), el futuro de una nueva tecnología ya instalada en México. En revisión.
- USDA** National Nutrient Database for Standard Reference, **2006.** Consulta Septiembre 2007:
URL: http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/cgi-bin/list_nut_edit.pl
- Velázquez G.,** P. Vázquez, M. Vázquez and JA. Torres. **2005a.** Advances in the food processing by high pressure. Ciencia y Tecnología Alimentaria (Food Sci. & Tech., Spain) 4(5), 353-367.
- Velázquez G.,** P. Vázquez, M. Vázquez and JA. Torres. **2005b.** High pressure food processing applications. Ciencia y Tecnología Alimentaria (Food Sci. & Tech., Spain) 4(5), 343-352.
- Weemaes C.,** L. Ludikhuyze, I. Van Den Broeck and M. Hendrickx. **1998.** High pressure inactivation of polyphenoloxidases. J. Food Sci. 63(5), 1-5.
- Wei-Dong W.** and X. **Shi-Ying.** **2007.** Degradation kinetics of anthocyanins in blackberry juice and concentrate. J. Food Eng. 82, 271-275.
- Wei-Lin L.,** W. Wen-Long and Z. Zhi-Dong. **2002.** The utilization, value and potential of chinese bramble (*Rubus* L.). Int. Soc. Hort. Sci. Acta Hort. (ISHS) 585:133-138.
- Wrolstad R.E.** **2004.** Anthocyanin pigments –Bioactivity and coloring properties. J. Food Sci. 69(5), C419-C421.
- Wrolstad R.E.,** T.E Acree, E.A. Decker, M.H. Penner, D.S. Reid, S.J. Schwartz, C.F Shoemaker, D.M Smith and P. Sporns (Eds). **2004.** Handbook of food analytical chemistry. Vol. 2, Cap 1. Ed. Wiley, pp. 19-29.
- Wrolstad R.E.,** R.W. Durst and J. Leeb. **2005.** Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. Trends in Food Sci. and Technol. 16, 423-428.
- Yong-Ju Z.** and R.L. **Howard.** **2003.** Effects of solvent and temperature on pressurized liquid extraction of anthocyanins and total phenolics from dried red grape skin. J. Agric. Food Chem. 51(18), 5207-5213.

Zabetakis I., D. Leclerc and P. Kajda. **2000**. The effect of high hydrostatic pressure on the strawberry anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.* 48, 2749-2754.

Zhonggao, J., L. Jiechao, W. Sixin and Z. Heng. **2005**. Preliminary studies on the extraction and stability of blackberry red pigment. *Food Sci. (Beijing, China)*, 26(3), 154-157.

ANEXO

ANEXO 1

DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES MÉTODO FOLIN-CIOCALTEU

REACTIVOS

- Folin-Ciocalteu 1N
- Carbonato de sodio al 20%
- Solución estándar de ácido gálico (0.1 mg/mL)

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

- *Folin-Ciocalteu 1N*

El reactivo comercialmente se encuentra como 2N, por lo que se procede a diluir.

$V_1C_1 = V_2C_2$ v.g.r. 5 mL de agua destilada 5 mL de reactivo Folin-Ciocalteu.

El procedimiento debe realizarse en campana de extracción y conservar en frasco ámbar con tapón de aluminio y en refrigeración (4°C).

Verifique que el color del reactivo sea de color dorado, no utilizarse si tiene un color verde olivo.

- *Carbonato de sodio al 20%*

Pesar 5 g de carbonato de sodio y disolver en 20 mL de agua destilada y sonicar hasta dilución completa, posteriormente aforar a 25 mL.

- *Solución estándar de ácido gálico (0.1 mg/mL)*

Pesar 10 mg de ácido gálico y aforar en agua destilada a 10 mL (1 mg/mL). Tomar 1 mL de esta solución y aforar a 10 mL con agua destilada (0.1 mg/mL).

- *Lectura:*

Para lectura de los extractos de antocianinas obtenidos según apartado 5.2, el procedimiento es el mismo, tomando 100 µL de extracto como muestra.

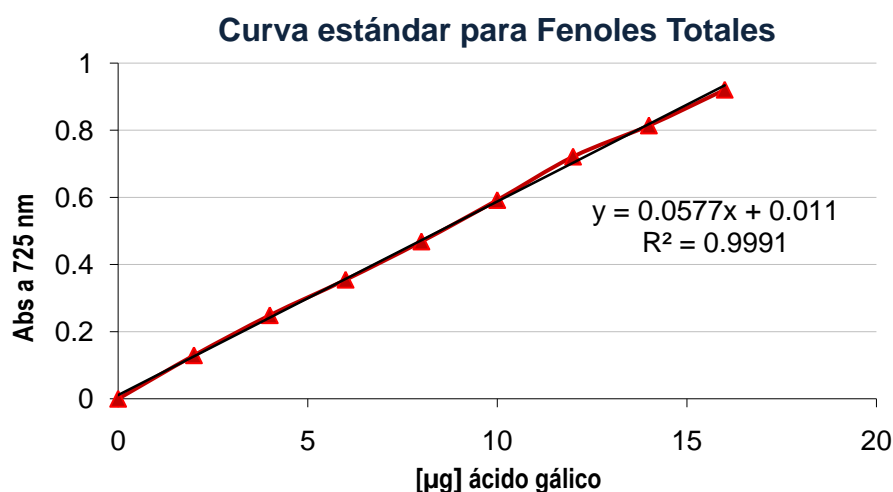
Después de preparadas las muestras, reposar 1 h a temperatura ambiente y en oscuridad.

Leer a 725 nm

Importante: Usar siempre soluciones recién preparadas y adicionar reactivos en el orden de la siguiente tabla:

No. Tubo	Solución Ác. Gálico (µL)	Agua destilada (µL)	Reactivo de Folin (µL)	Sol. Na ₂ CO ₃ (µL)
Blanco	0	500	250	1250
1	20	480	250	1250
2	40	460	250	1250
3	60	440	250	1250
4	80	420	250	1250
5	100	400	250	1250
6	120	380	250	1250
7	140	360	250	1250

- Curva estándar obtenida



Para obtener la concentración final de cada uno de los tratamientos, se utilizó la siguiente ecuación:

$$\frac{(C - b) \times FD}{m \times V} = \text{mg EAG} / L$$

donde:

C = Lectura de la muestra

b y m = variables de la ecuación lineal de la recta

FD = Factor de dilución (100)

V = Volumen inicial de extracto utilizado para la prueba (L)