



TECNOLÓGICO  
NACIONAL DE MÉXICO



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TEPIC

**“EFECTO DE LA TERMOSONICACIÓN SOBRE PARÁMETROS DE CALIDAD,  
ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y PROPIEDADES ANTIINFLAMATORIAS EN  
JUGO DE ARÁNDANO AZUL (*VACCINIUM CORYMBOSUM*)”**

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS EN ALIMENTOS

Por:

IBQ. José Armando Del Ángel Cruz

Director:

Dr. Rita María Velázquez Estrada

Co-Director:

Dra. Nelly del S. Cruz Cansino

Tepic, Nayarit, México

Diciembre 2020



## Tecnológico Nacional de México

### Instituto Tecnológico de Tepic

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

POSGRADO EN CIENCIAS EN ALIMENTOS

#### Carta de sesión de derechos

En la ciudad de Tepic, Nayarit., el día de diciembre del 2020, el que suscribe José Armando Del Ángel Cruz alumno del Programa de Posgrado en Ciencias en Alimentos con número de control G12401049, manifiesto que todos los resultados derivados de mis estudios de posgrado, realizados bajo la dirección de la Dra. Rita María Velázquez Estrada, pertenecen al Instituto Tecnológico de Tepic, por lo que cedo los derechos de los mismos a este instituto con fines académicos e investigación. Así mismo manifiesto, que es de mi conocimiento que si estos resultados se originan patentes o publicaciones, participaré como coautor y de los beneficios que se deriven.

Atentamente

José Armando Del Ángel Cruz

EL PRESENTE PROYECTO FUE FINANCIADO POR EL TECNOM, EL CUAL LLEVA POR NOMBRE **“EFECTO DE LA TERMOSONICACIÓN SOBRE PARÁMETROS DE CALIDAD, ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y PROPIEDADES ANTIINFLAMATORIAS EN JUGO DE ARÁNDANO AZUL (*VACCINIUM CORYMBOSUM*)”**

## DEDICATORIA

La realización de este proyecto de tesis fue un gran reto personal, en el cual logre descubrir habilidades de mí mismo que no conocía, tuve la fortuna de conocer increíbles personas, de conocer lugares nuevos y maravillosos, por lo cual en primera instancia quisiera dedicar esta tesis a mi familia, la cual siempre estuvo allí para apoyarme y no dejarme vencer en los momentos más complicados.

Un agradecimiento especial a la Dra. Rita Velázquez por haberme aceptado como su alumno, su paciencia y constante guía y apoyo fueron indispensables para mí durante estos 2 años en los cuales disfrute de trabajar bajo su tutela. De igual forma agradecer a la Mtra. Rebeca Montañó y a los productores de arándanos de la región de San Luis de Lozada por brindar sus conocimientos y recursos para la realización de este proyecto. A todos mis compañeros de maestría David, Cecilia, Carlos, Alejandra, Ariana, Edson, Jerusalén por siempre estar allí y orientarme de la mejor manera para poder realizar exitosamente cada aspecto de esta investigación. A mi novia Daiana por estar a mi lado día con día, dándome su apoyo incondicional, impulsándome en cada uno de mis sueños y mis metas, has sido mi principal pilar para poder culminar este proyecto de la mejor manera y por ello siempre te estaré agradecido, gracias mi amor.

A todos y cada uno de los doctores que fueron parte de mi formación, les estaré eternamente agradecido por sus enseñanzas, por cada uno de los consejos que me ofrecieron para que la realización de este trabajo fuera exitosa, por sus regaños que eran la guía necesaria para poder continuar adelante y sobre todo su invaluable amistad, porque más que mis profesores fueron mis guías a lo largo de estos años.

Finalmente, gracias a la vida que me permitió realizar este increíble trabajo de investigación, abriéndome un panorama inmenso sobre las cuestiones científicas y de la vida misma, que con toda certeza puedo decir el día de hoy me encuentro con las herramientas necesarias para afrontar cualquier desafío.

## **Reconocimientos**

En primera instancia a la Dra. Rita María Velázquez Estrada, porque sin su completo apoyo, dedicación y guía este proyecto no podría haberse realizado, muchas gracias por toda su paciencia, confianza y entrega para que al final todos los objetivos trazados fueran cumplidos

A mi co-directora la Dra. Nelly Cruz Cansino por permitirnos colaborar con su equipo de trabajo y desarrollar parte del experimento en su laboratorio ubicado en el Centro de Investigación Multidisciplinario Área Académica de Nutrición en la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, a mi comité tutorial la Dra. Sonia Guadalupe Sáyago Ayerdi y el Dr. Porfirio Gutiérrez Martínez por todo su apoyo para la realización de este proyecto.

A la Dra. Nuria Elizabeth Rocha Guzmán y la Dra. Martha Roció Moreno Jiménez del Instituto Tecnológico de Durango por su colaboración para este proyecto, así como haberme permitido realizar estancias en su centro de investigación, de igual forma a mis compañeros Claudia Lujan, Manuel Cruz y Sahian Velázquez por todo su apoyo durante mis estancias y por su gran amistad.

## Resumen

**Del Ángel Cruz José Armando. Maestría en ciencias en alimentos (MCA). Instituto Tecnológico de Tepic Nayarit, Diciembre del 2020. “EFECTO DE LA TERMOSONICACIÓN SOBRE PARÁMETROS DE CALIDAD, ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y PROPIEDADES ANTIINFLAMATORIAS EN JUGO DE ARÁNDANO AZUL (*VACCINIUM CORYMBOSUM*)” Director de tesis: Dra. Rita María Velázquez Estrada.**

El jugo de arándano azul es una bebida con múltiples cualidades sensoriales y nutritivas. Por lo cual, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la termosonicación sobre la actividad enzimática, microbiológica, compuestos bioactivos, actividad antioxidante y propiedades antiinflamatorias en jugo de arándano. El jugo de arándano se termosonicó aplicando un diseño central rotatorio, compuesto por dos variables independientes (amplitud y tiempo), cada una en cinco niveles, ordenados aleatoriamente utilizando la metodología de superficie de respuesta a una temperatura de salida de 50 °C. Se realizaron parámetros fisicoquímicos (pH, índice de turbidez, índice de oscurecimiento, sólidos solubles totales, acidez titulable); análisis microbiológicos (mesófilos aerobios totales, enterobacterias, hongos y levaduras); análisis enzimáticos de polifenoloxidasas y pectinmetilesterasa (PPO y PME), análisis de compuestos fenólicos totales, antocianinas, porcentaje de actividad quelante, actividad antioxidante por tres métodos (DPPH, ABTS y FRAP) y análisis de las propiedades antiinflamatorias en células HT-29. Los valores obtenidos de pH (3.17- 3.71) y sólidos solubles totales (11.75–12) del jugo de arándano azul termosonicado se encuentran dentro del rango reportado para jugo de arándano según lo establecido por la Norma CODEX STAN 247-2005. El índice de turbidez en los jugos termosonicados mostró un incremento comparados con el jugo control. En hongos y levaduras se logró una inactivación total en los 2 de los tratamientos, además de no detectar presencia de enterobacterias en los diversos tratamientos. La actividad residual de la PME y PPO fue <1% y <10%, respectivamente. Se obtuvo un incremento en el contenido de fenoles solubles de los tratamientos. Así mismo se observó un incremento en la actividad antioxidante por ABTS, DPPH y FRAP para todos los tratamientos comparados con la muestra control, En cuanto a la reproducibilidad, 5 de las variables analizadas en este estudio se ajustaron al modelo matemático, teniendo reproducibilidad las variables (índice de turbidez, fenoles solubles totales, actividad antioxidante por ABTS y FRAP). En cuanto al potencial antiinflamatorio, los resultados de la prueba de citotoxicidad por MTT muestran que no hay diferencias significativas entre las concentraciones de liofilizados de jugo administrados a las células, por lo cual se tomaron las concentraciones de 20 ng/ml. Los resultados obtenidos en el efecto de los liofilizados de jugo de arándano azul sobre los marcadores de inflamación, se observa una mayor influencia del tratamiento optimizado con respecto al tratamiento control.

Como conclusión la termosonicación redujo hasta de 3 Log UFC/ml para mesófilos aerobios y hongos y levaduras. Se redujo la actividad de la PME y PPO. Además, la actividad antioxidante no se vio comprometida con los tratamientos de termosonicación.

## Abstract

**Del Ángel Cruz José Armando. Master of Science in Food (MCA). Instituto Tecnológico de Tepic Nayarit, December 2020. "EFFECT OF THERMOSONICATION ON QUALITY PARAMETERS, ANTIOXIDANT ACTIVITY AND ANTI-INFLAMMATORY PROPERTIES IN BLUE BLUEBERRY JUICE (*VACCINIUM CORYMBOSUM*)" Thesis Director: Dra. Rita María Velázquez Estrada.**

Blueberry juice is a drink with multiple sensory and nutritional qualities. Therefore, the objective of the present study was to evaluate the effect of thermosonication on the enzymatic and microbiological activity, bioactive compounds, antioxidant activity and anti-inflammatory properties in cranberry juice. The cranberry juice was thermosonic applying a central rotary design, composed of two independent variables (amplitude and time), each one in five levels, randomly ordered using the response surface methodology at an outlet temperature of 50 °C. Physicochemical parameters were carried out (pH, turbidity index, darkening index, total soluble solids, titratable acidity); microbiological analysis (total aerobic mesophiles, enterobacteria, fungi and yeasts); Enzymatic analysis of polyphenoloxidase and pectinmethyl ester (PPO and PME), analysis of total phenolic compounds, anthocyanins, percentage of chelating activity, antioxidant activity by three methods (DPPH, ABTS and FRAP) and analysis of anti-inflammatory properties in HT-29 cells. The values obtained for pH (3.17- 3.71) and total soluble solids (11.75-12) of the thermosonicated blueberry juice are within the range reported for cranberry juice as established by the CODEX STAN 247-2005 Standard. The cloudiness index in the thermosonicated juices showed an increase compared to the juice control. In fungi and yeasts, a total inactivation was achieved in the 2 of the treatments, in addition to not detecting the presence of enterobacteria in the various treatments. The residual activity of PME and PPO was <1% and <10%, respectively. An increase in the content of soluble phenols of the treatments was increased. Likewise, an increase in antioxidant activity is increased by ABTS, DPPH and FRAP for all treatments compared with the control sample. Regarding reproducibility, 5 of the variables analyzed in this study were adjusted to the mathematical model, the variables having reproducibility (turbidity index, total soluble phenols, antioxidant activity by ABTS and FRAP). Regarding the anti-inflammatory potential, the results of the MTT cytotoxicity test show that there are no significant differences between the concentrations of juice lyophilisates administered to the cells, for which the concentrations of 20 ng / ml were taken. The results obtained in the effect of the blueberry juice lyophilisates on the inflammation markers, a greater influence of the optimized treatment with respect to the control treatment is observed.

In conclusion, the thermosonication reduced up to 3 Log CFU / ml for aerobic mesophiles and fungi and yeasts. PME and PPO activity was reduced. Furthermore, the antioxidant activity was not compromised with the thermosonication treatments.

<b>Índice</b>	<b>Página</b>
Resumen	V
Abstract	VI
Lista de cuadros	11
Lista de figuras	13
CAPITULO 1 INTRODUCCION	15
CAPITULO 2 ANTECEDENTES	18
2.1 Generalidades del arándano	19
2.2 Producción y exportación de arándano	20
2.2.1 Producción nacional de arándano	20
2.2.2 Exportación de arándano	21
2.3 Composición química y nutricional del arándano	22
2.4 Compuestos bioactivos en arándano	23
2.4.1 Compuestos fenólicos presentes en el arándano azul	24
2.5 Propiedades funcionales del arándano azul	26
2.6 Actividad antiinflamatoria de los compuestos bioactivos	27
2.7 Procesamiento de jugos	28
2.7.1 Parámetros de calidad en jugos	29
2.8 Uso de tecnologías emergentes en el procesamiento de alimentos	30
2.9 Ultrasonido	31
2.9.1 Termosonicación en el procesamiento de bebidas de frutas	32
2.9.2 Efecto de la termosonicación en enzimas y microorganismos	34
2.9.3 Efecto de la termosonicación en compuestos bioactivos	36
CAPÍTULO 3 JUSTIFICACIÓN	37
	VII

CAPÍTULO 4 OBJETIVOS	39
4.1 Objetivo general	40
4.2 Objetivos específicos	40
CAPÍTULO 5 MATERIALES Y MÉTODOS	41
5.1 Etapas del estudio	52
5.2 Obtención de los frutos y preparación del jugo de arándano	42
5.3 Procesamiento del jugo de arándano por termosonicación	43
5.4. Determinación de las propiedades fisicoquímicas	43
5.4.1 pH y sólidos solubles totales	43
5.4.2 Índice de turbidez	43
5.4.3 Índice de oscurecimiento	43
5.4.4 Acidez titulable	44
5.5. Análisis microbiológico	44
5.6 Determinación de la actividad enzimática	45
5.6.1 Pectinmetilesterasa (PME)	45
5.6.2 Polifenoloxidasas (PPO)	45
5.7 Contenido de compuestos fenólicos solubles totales	46
5.8 Contenido de antocianinas	46
5.9 Determinación de actividad antioxidante	47
5.9.1 Determinación de actividad antioxidante por el método del radical ácido 2,2' azinobis-(3-etilbenzotiazolona)-6-sulfónico (ABTS)	47
5.9.2 Determinación de actividad antioxidante por captación del radical 2,2- difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)	47
5.9.3 Determinación de actividad antioxidante por el método Poder Antioxidante por Reducción Férrica (FRAP)	48

5.10 Porcentaje de actividad quelante	48
5.11 Identificación de compuestos fenólicos por UPLC	49
5.12 Ensayo de propiedades antiinflamatorias	50
5.12.1 Determinación de citotoxicidad celular por MTT (bromuro de 3-(4 5 50 dimetiltiazol-2-il)-2 5-difeniltetrazolio)	
5.12.2 Evaluación de propiedades antiinflamatorias in vitro en células HT- 51 29	
5.12.3 Cuantificación de proteína total mediante espectrofotometría	52
5.13 Análisis sensorial	54
5.14 Diseño experimental	54
<b>CAPÍTULO 6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>57</b>
6.1 Efecto de la termosonicación en el pH, sólidos solubles (°Brix), turbidez, 52 oscurecimiento y acidez titulable en jugo de arándano azul	
6.2 Efecto de la termosonicación en los recuentos microbiológicos	62
6.3 Efecto de la termosonicación en la actividad enzimática	64
6.4 Efecto de la termosonicación en el contenido de compuestos fenólicos totales 66 y antocianinas	
6.5 Efecto de la termosonicación en la capacidad antioxidante	69
6.6 Condiciones óptimas de termosonicación	74
6.7 Reproducibilidad del estudio	75
6.8 Comparación del jugo tratado por termosonicación con el jugo pasteurizado 76 y el jugo fresco	
6.9 Perfil de compuestos fenólicos de muestras control, optimizada y 79 pasteurizada de jugo de arándano azul liofilizado	
6.10 Resultados de prueba de citotoxicidad	86

6.12 Determinación de marcadores de inflamación in vitro con células HT-29	91
6.13 Análisis sensorial	92
CAPÍTULO 7 CONCLUSIONES	94
CAPÍTULO 8 REFERENCIAS	97
ANEXOS	117

## Lista de cuadros

	Pág.	
Cuadro 2.1	Producción nacional de arándano azul	21
Cuadro 2.2	Información nutrimental del arándano	23
Cuadro 2.3	Parámetros microbiológicos para jugos	30
Cuadro 2.4	Efecto de la termosonicación en los atributos de jugos	33
Cuadro 5.1	Etapas de proceso experimental	42
Cuadro 5.2	Diseño experimental para tratamiento de termosonicación	51
Cuadro 5.3	Diseño experimental de prueba de citotoxicidad celular	55
Cuadro 6.1	Efecto de la amplitud y tiempo de termosonicación sobre el pH, sólidos solubles (°Brix), turbidez, oscurecimiento y acidez titulable del jugo de arándano azul	59
Cuadro 6.2	Coefficientes de regresión del modelo y significancia para las variables de respuesta índice de turbidez e índice de oscurecimiento del jugo de arándano termosonicado	60
Cuadro 6.3	Efecto de la amplitud y tiempo de termosonicación sobre el recuento de microorganismos del jugo de arándano azul	64
Cuadro 6.4	Efecto de la amplitud y tiempo de termosonicación sobre la actividad enzimática del jugo de arándano azul.	65
Cuadro 6.5	Efecto de la amplitud y tiempo de termosonicación sobre la actividad antioxidante del jugo de arándano azul.	68
Cuadro 6.6	Efecto de la amplitud y tiempo de termosonicación sobre compuestos fenólicos y antocianinas del jugo de arándano azul.	72

Cuadro 6.7	Coefficientes de regresión del modelo y significancia para las variables de respuesta de actividad antioxidante del jugo de arándano termosonicado	73
Cuadro 6.8	Comparación de valores predichos por el modelo matemático y el valor de prueba experimental	75
Cuadro 6.9	Comparación del jugo termosonicación con el jugo pasteurizado y jugo fresco	79
Cuadro 6.10	Concentración de ácidos fenólicos y flavonoides en jugo de arándano azul control, optimizado y pasteurizado	81
Cuadro 6.11	Resultados de porcentaje de viabilidad celular por prueba MTT	87
Cuadro 6.12	Resultados de análisis sensorial por muestras	93

## Lista de figuras

		Pág.
Figura 2.1	Planta de arándano	19
Figura 2.2	Estructura de las agliconas mayoritarias correspondientes a cada una de las familias de compuestos fenólicos presentes en los frutos de arándano	25
Figura 2.3	Interacción entre antioxidante y radicales libres	27
Figura 2.4	Fenómeno de cavitación	32
Figura 5.1	Equipo de UPLC (ultra performance liquid chromatography)	50
Figura 5.2	Metodología de extracción de proteína total en células	52
Figura 6.1	Efecto de la amplitud y tiempo de termosonicación sobre el índice de turbidez (a), índice de oscurecimiento (b) del jugo de arándano azul	61
Figura 6.2	Efecto del termosonicación sobre los compuestos fenólicos solubles totales (EAG/L de muestra) (A) y antocianinas (mg/L muestra) (B)	68
Figura 6.3	Diagrama de superposición de las variables de respuesta (índice de oscurecimiento, la índice turbidez, contenido de fenoles solubles totales) y actividad antioxidante por el método ABTS y FRAP para la obtención de las condiciones óptimas de termosonicación	73
Figura 6.4	Petunidina 3-o-glucósido	74
Figura 6.5	Peonidina 3-o-glucósido	86
Figura 6.6	Figura 6.6 Resultados del porcentaje de viabilidad celular en el modelo celular HT-29 para los diferentes tratamientos. Letras iguales indican que no existe una diferencia significativa estadísticamente (ANOVA $p < 0.05$ )	86

Figura 6.7	Efecto de la amplitud y tiempo de termosonicación sobre compuestos fenólicos y antocianinas del jugo de arándano azul.	88
Figura 6.8	Coefficientes de regresión del modelo y significancia para las variables de respuesta de actividad antioxidante del jugo de arándano termosonicado	89
Figura 6.9	Comparación de valores predichos por el modelo matemático y el valor de prueba experimental	89
Figura 6.10	Comparación del jugo termosonicación con el jugo pasteurizado y jugo fresco	90
Figura 6.11	Concentración de ácidos fenólicos y flavonoides en jugo de arándano azul control, optimizado y pasteurizado	90
Figura 6.13	Resultados de porcentaje de viabilidad celular por prueba MTT	91
Figura 6.13	Resultados de análisis sensorial por muestras	93



## Capítulo 1 Introducción

El arándano azul (*Vaccinium corymbosum*) es una baya esférica de color azul, con un alto nivel de durabilidad poscosecha en comparación con otras bayas (SAGARPA, 2017). En México la producción de arándanos se encuentra en el rango de las 300 toneladas, siendo el 2.7% de la producción nacional de bayas que se exportan a países como Canadá y Estados Unidos. El estado con mayor producción de arándano es el estado de Jalisco el cual contribuye con 20.3 % de la producción de este fruto a nivel nacional (FIRA, 2016).

Por otra parte, la transformación de las bayas de arándano a jugo, además de ser una opción para un mayor aprovechamiento del fruto; también proporciona los compuestos bioactivos presentes en el fruto y que promueven la salud debido a sus distintas propiedades biológicas (antioxidantes, antiinflamatorias y anticancerígenas) (Barba y cols., 2013), los diversos compuestos bioactivos que generan estas actividades han sido ampliamente estudiados debido a sus propiedades antiinflamatorias (Altobelli y cols., 2014). Datos reportados por la OMS (Organización Mundial de la Salud) indican que el cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo, siendo el cáncer de colon una de las neoplasias malignas más comunes en el mundo occidental, además de ser el primero en incidencia y el segundo en mortalidad en el mundo. (Snyder y cols., 2020)

A través de los años; se ha buscado la implementación de técnicas de procesamiento, las cuales puedan conservar e incluso potencializar compuestos bioactivos de tanto interés en la promoción de la salud. Las tecnologías emergentes (alta presión hidrostática, pulsos eléctricos, ultrasonido, pulsos lumínicos, entre otras) son una alternativa de conservación eficiente para la obtención de alimentos seguros, nutritivos y con calidad sensorial, avanzando en el desarrollo de una serie de innovaciones y tendencias.

En este sentido, el ultrasonido en combinación con temperaturas moderadas (denominada termosonicación) ha demostrado buenos resultados como método alternativo de procesamiento de alimentos, sustituyendo a las tecnologías convencionales como la pasteurización, y otras que involucran el uso de

## Capítulo 1 Introducción

temperaturas elevadas que pueden generar la pérdida de los compuestos bioactivos de interés presentes en el arándano (Saeeduddin y cols., 2015).

Con base a lo anterior, la aplicación de termosonicación en un jugo de arándanos, se presenta como una opción para aprovechar el fruto de arándano, para así obtener un jugo de características sensoriales óptimas y seguro microbiológicamente. Además, este estudio contempla evaluar los efectos de esta tecnología sobre los compuestos de interés en el arándano y sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias.



## Capítulo 2 Antecedentes

### 2.1 Generalidades del arándano

El arándano azul (*Vaccinium corymbosum*) es una baya (Berry, en inglés) de forma esférica la cual tiene un diámetro promedio de 3 cm, este fruto tiene una coloración azul intenso a suave; de allí la denominación como *blueberry* (Figura 2.1). Su epidermis se encuentra cubierta por una serosidad característica de este fruto, ya que, en conjunto con la consistencia propia del fruto, genera una durabilidad poscosecha mayor a la de otras berries, como la frambuesa. (SAGARPA, 2017).

Las plantaciones de este fruto generalmente son en líneas separadas de 2.5 a 3 m entre sí. La separación existente entre dichas plantas puede variar de 0.75 a 1.5 m, con lo cual se puede generar una densidad 2,200 a 4,400 plantas por Ha sembrada de arándano azul. De igual forma se puede realizar una multiplicación de las plantas por estacas o mediante micropropagación, es decir vegetativamente, a partir de una planta original de características idóneas. (Undurraga Diaz, 2017).



**Figura 2.1** Planta de arándano

La planta de arándano requiere de un período de frío acumulado durante el invierno, esto con la finalidad de que la planta se sobreponga al receso invernal, de esta forma se obtiene una floración pareja y abundante. En cuestión de temperatura, este tipo de planta requiere de temperaturas inferiores a los 7°C, y prefiere suelos ácidos con un pH entre 4 - 5, estos suelos también deben de ser livianos, arenosos con

## Capítulo 2 Antecedentes

abundante materia orgánica, bien drenados y con adecuado abastecimiento de agua durante la temporada de crecimiento para garantizar la mayor calidad en el fruto (Undurraga Diaz, 2017).

El arándano azul suele ser consumido en fresco, aunque de igual forma puede ser utilizado como insumo para una gran cantidad de productos, sus usos van desde la elaboración de mermeladas, purés, jugos, vinos e ingredientes para pastelería y cereales, otra de las formas más recurridas para la venta de este fruto es congelado, la mayor parte de la producción nacional de arándano se exporta a mercados del extranjero (SAGARPA, 2017).

### **2.2 Producción y exportación de arándano**

#### **2.2.1 Producción nacional de arándano**

En México la producción de bayas tiene gran importancia en materia de exportación, la producción de arándano en el país se da entre los meses de agosto hasta el mes de abril, siendo en diciembre y enero los meses de mayor producción de este fruto. En México se producen anualmente 36,699.7 Ton de arándano las cuales tienen un valor de producción en pesos de \$ 2,150,199.07, siendo el principal productor el estado de Jalisco (Cuadro 2.1) (SIAP, 2018). Por su parte el estado de Nayarit, al encontrarse en las etapas iniciales de la producción de arándano, aún no figura dentro de los estados productores de este fruto, sin embargo, se tienen datos obtenidos de los productores locales, los cuales reportan que en el municipio de San Luis de Lozada se tienen sembradas 4 Ha de arándano.

**Cuadro 2.1** Producción nacional de arándano azul

Entidad federativa	Superficie		Rendimiento (udm/ha)	Valor Producción (Millones de Pesos)
	Producción	Cosechada		
<b>Jalisco</b>	14,563	1577	15.4	856
<b>Michoacán</b>	8,861	682	13.7	524
<b>Sinaloa</b>	6,149	450	13	448
<b>Baja California</b>	3,380	235	11.3	154
<b>Colima</b>	2,638	220	9.7	145
<b>Puebla</b>	885	142	9.2	14
<b>México</b>	146	15	6.2	6
<b>Sonora</b>	72	12	6	4
<b>Guanajuato</b>	6	2	2.9	0
<b>Total</b>	36,700	3,335	87	2,151

Fuente: Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) udm (Unidades de medida. 2018)

### 2.2.2 Exportación de arándano

El principal productor de arándano a nivel mundial es Estados Unidos, seguido por Canadá. En Europa los principales productores de arándano son Polonia, Alemania y España. En el continente americano los productores más importantes son Chile, Argentina, Uruguay y México. En el resto del mundo otros productores de este fruto son China (la cual no cuenta con excedente exportable), Sudáfrica, Nueva Zelanda y Australia (Internacional, 2018).

El arándano azul es la frutilla con mayor relevancia en los mercados internacionales debido a sus características y propiedades. Entre los años 2003 y 2012, el volumen

## Capítulo 2 Antecedentes

de las exportaciones mundiales de arándanos presentó una tasa de crecimiento promedio anual de 10 %. Mientras tanto, durante el mismo periodo de tiempo, los arándanos rojos registraron un aumento en las exportaciones de 9.7 % y las fresas de 5.6 %, en promedio anual. Por otra parte, el volumen de las importaciones de arándanos creció en promedio 10.7 % anual; los arándanos rojos incrementaron sus exportaciones 10.3 por ciento anual y las fresas en 6.8 por ciento anual (FIRA, 2016)

Cabe mencionar que en México el valor comercial del arándano ha tenido un importante crecimiento a lo largo de los años, viéndose el mayor crecimiento de este a partir del año 2009 al 2014, entre los cuales el precio por kg pasó de \$9.00 pesos por kilogramo a más de \$50.00 pesos por kg (FIRA, 2016).

### **2.3 Composición química y nutricional del arándano**

El valor nutricional del arándano, según la estandarización de la Administración de Medicamentos y Alimentos de Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés), lo resume como un fruto libre de grasas y sodio, libre de colesterol y rico en fibra, refrescante, tónico, astringente, diurético y poseedor de vitamina C y vitamina K (Cuadro 2.2). El color de los arándanos es causado por un grupo de flavonoides llamados antocianinas, que tienen un poderoso poder antioxidante (IDEXCAM, 2017)

**Cuadro 2.2** Información nutrimental del arándano

<b>Nutrientes (Unidad)</b>	<b>Valor por 100 g de porción comestible</b>
Calorías	57
Sodio	0
Carbohidratos (g)	14
Fibra dietética (g)	2.4
Azúcar (g)	10
Proteína (g)	0.7
Vitamina A (mg)	54.00
Vitamina C (mg)	9.7
Vitamina E (mg)	0.57
Hierro (mg)	0.28
Calcio (mg)	6.00
Sodio (mg)	1

Fuente:(USDA-Ed Connection, 2018)

#### **2.4 Compuestos bioactivos en arándano**

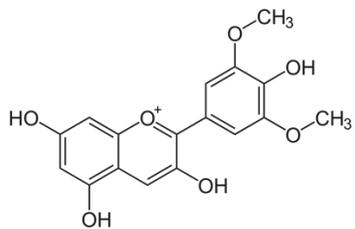
Diversos alimentos de origen vegetal como lo son las frutas, hortalizas, cereales y derivados son alimentos que además de aportar macronutrientes y micronutrientes (hidratos de carbono, minerales, ácidos grasos y vitaminas), contienen sustancias que pueden tener un impacto significativo en el curso de alguna enfermedad y ser indispensables a largo plazo para la salud (Mart y cols., 2018) .Los compuestos bioactivos más estudiados en la actualidad son los compuestos fenólicos, los cuales se encuentran presentes fundamentalmente en las frutas rojas o moradas como los arándanos, estos compuestos se pueden clasificar en flavonoides (antocianinas, flavonoles y flavonas), fenilpropanoides (derivados de ácidos hidroxicinámicos, como el cafeico, ferúlico sinápico y p-cumárico), estilbenoides (resveratrol y piceatanol) y derivados del ácido benzoico (ácidos gálico y elágico). De todas estas sustancias bioactivas, el grupo mayoritario es el de los flavonoides, del que se conocen más de 5.000 compuestos diferentes (Martínez y cols. 2008).

### 2.4.1 Compuestos fenólicos presentes en el arándano azul

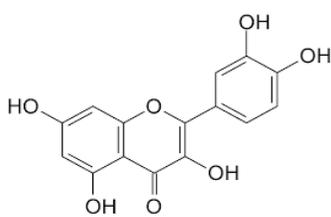
Los compuestos fenólicos están relacionados principalmente con la calidad sensorial de los alimentos de origen vegetal, fresco y procesado. Además de que estos compuestos pueden actuar como antioxidantes de forma natural en este tipo de alimentos, los cuales pueden proveer de un efecto protector en enfermedades cardiovasculares y cáncer (Porrás y cols. 2009).

Los compuestos fenólicos presentes en el arándano azul pueden englobarse dentro de cuatro familias distintas, incluyendo fenoles simples, como el ácido clorogénico y diversos grupos de polifenoles, como antocianos, flavonoles y proantocianidinas (Figura 2.2). En el caso de los antocianos, se han identificado glicósidos procedentes de 4 agliconas distintas: malvidina, delphinidina, cianidina, petunidina, y peonidina, siendo los derivados de malvidina los mayoritarios (46% del total de antocianos). El perfil de flavonoides consiste en tres grupos de glicósidos de flavonoles, derivados de las agliconas quercetina, miricetina y kaempferol, correspondiendo el mayor porcentaje a los glicósidos de quercetina (72% del total de flavonoides). En lo que a ácidos fenólicos se refiere, el único presente en cantidades significativas es el ácido clorogénico. Otros ácidos fenólicos pertenecientes a la familia de los ácidos cinámicos, como el ferúlico y p-cumárico también han sido detectados en algunas de las variedades estudiadas (Vázquez-Castilla y cols., 2005). De igual forma se destaca la presencia de ácido elágico, del cual se tienen reportes que tiene propiedades antioxidantes y antitumorales demostradas en numerosos estudios en animales, tanto "*in vitro*" como "*in vivo*". Las procianidinas presentes en el arándano son del tipo proantocianidinas (oligómeros de catequina) y constan de dímeros, trímeros, tetrámeros y oligómeros (5-11 unidades) de catequina, siendo los oligómeros de más de 4 unidades los mayoritarios (Almaguer y cols., 2009)

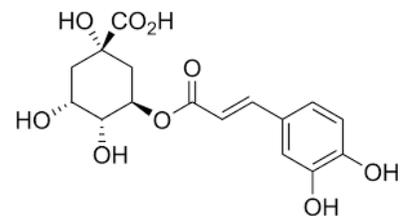
## Capítulo 2 Antecedentes



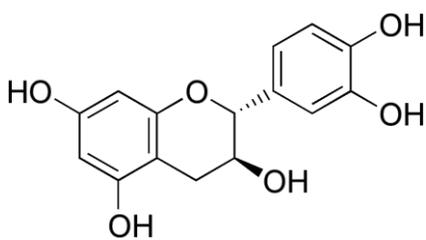
Malvidina



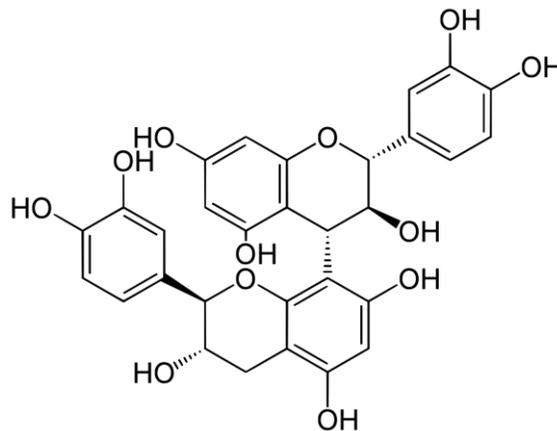
Quercetina



Ac. Clorogénico



Catequina



Proantocianidinas

**Figura 2.2** Estructura de las agliconas mayoritarias correspondientes a cada una de las familias de compuestos fenólicos presentes en los frutos de arándano. (Cervantes y cols., 2020)

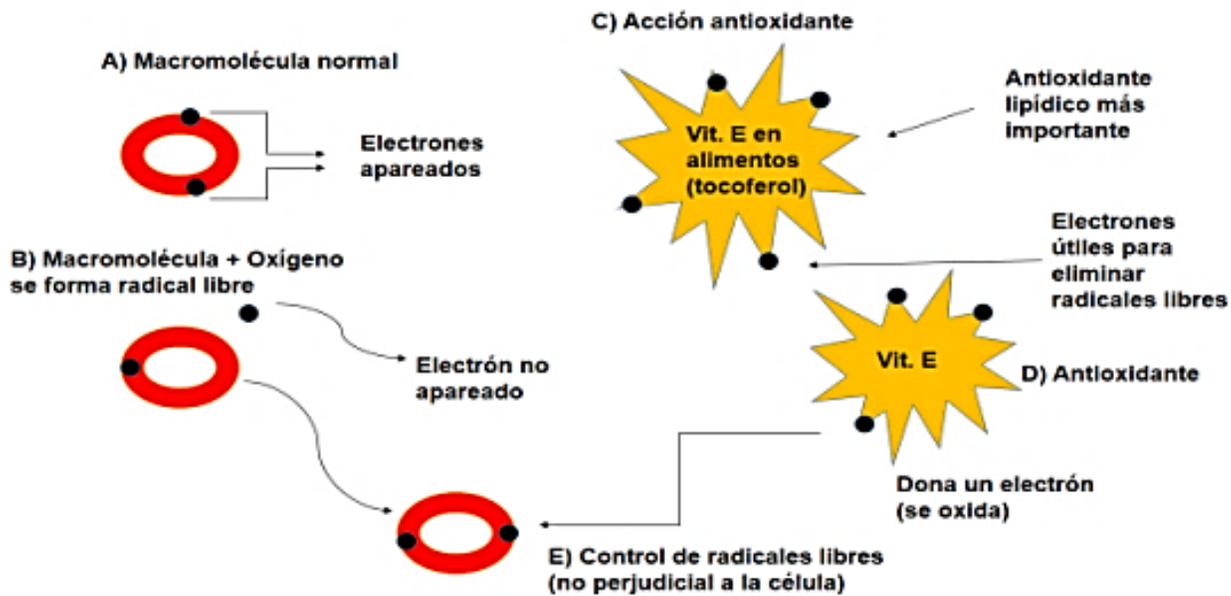
Sin embargo, diversos estudios han demostrado que el contenido de fenoles presentes en el arándano azul sufre modificación en su contenido con base a la etapa de madurez del fruto. Ribera y cols., (2006) reportaron que en la etapa de madurez inicial del fruto el contenido de fenoles totales es mayor que en su etapa de madurez óptima, contrastando con el contenido total de antocianinas el cual tiene su concentración más elevada en la etapa de madurez óptima del fruto.

### **2.5 Propiedades funcionales del arándano azul**

El efecto de los antioxidantes en los productos alimenticios, se ha reportado que proporciona diversos beneficios sobre la salud del consumidor, el mayor efecto de la actividad antioxidante se genera debido al contenido de flavonoides y otros compuestos fenólicos, los cuales van a tener un efecto sinérgico con otros compuestos con propiedades antioxidantes como algunas vitaminas (Patras y cols., 2009).

Sin embargo, no existen en la actualidad estándares de consumo de antioxidantes para el organismo, en especial para los sectores más vulnerables de la población (niños y ancianos), por ello se han realizado estimaciones de dietas equilibradas las cuales implicar ingerir durante el día 5 raciones de frutas, hortalizas y verduras en estado fresco. La Asociación de Ciencia y Tecnológica de los Alimentos de Euskadi (ACTAE) establece los siguientes 10 alimentos como los más ricos en antioxidantes; aguacates, bayas (moras, fresas, arándano, frambuesas, etc.), brócoli, repollo, zanahorias, cítricos, uvas, cebollas, espinacas, tomates. (Vilaplana, 2007)

Por su parte las células cancerosas poseen una alta inestabilidad, esto debido a las mutaciones generadas por los efectos secundarios de los radicales libres, como lo son el peróxido de hidrógeno y los peróxidos orgánicos (Laishram & Devi, 2015), de esta forma asociado a la función antioxidante se considera el proceso de óxido-reducción que remite a dos momentos básicos : 1) oxidación que implica pérdida de electrones de hidrógeno con la ganancia de oxígeno en la molécula, 2) reducción que significa ganancia de electrones de hidrógeno con la pérdida de oxígeno (Figura 2.3). Así el oxidante se reduce al reaccionar con aquella molécula que oxida. Este proceso se genera de manera cotidiana en el organismo humano y representa el conocido par óxido-reductor o balance redox (Coronado y cols., 2015)



**Figura 2.3** Interacción entre antioxidante y radicales libres. (Fuente: Coronado y cols., 2015)

## 2.6 Actividad antiinflamatoria de los compuestos bioactivos

La actividad antiinflamatoria de los diversos compuestos bioactivos, presentes en los frutos ha tomado gran relevancia entre los investigadores hoy en día, existen diversos compuestos bioactivos presentes en frutos, los cuales pueden llegar a ejercer propiedades antiinflamatorias como algunos alcaloides, ácidos fenólicos y flavonoides, los cuales se han aplicado en diversos ensayos clínicos para la prevención de cáncer (Liu y cols., 2020; Shivanagoudra y cols., 2019).

De igual forma, se han realizado diversos estudios *in vitro* utilizando estos compuestos bioactivos; los cuales fueron obtenidos de diversas fuentes vegetales con el objetivo de evaluar su posible efecto antiinflamatorio, así mismo se han utilizado diversas tecnologías para la extracción de estos compuestos para la realización de las pruebas en modelos *in vitro* (Bansaly cols., 2018). Quagliariello y cols., (2016) utilizaron campos eléctricos pulsados para la extracción de compuestos bioactivos de arroz negro, posteriormente evaluaron su efecto antiinflamatorio en la línea celular HT-29; las cuales son células que proceden de un adenocarcinoma de colon humano, demostrando así que los extractos de

## Capítulo 2 Antecedentes

compuestos bioactivos de arroz negro pueden inducir una cantidad sustancial inhibición de la expresión génica de interleucinas y secreción de MMP2 (Metaloproteínasa-2 de matriz) por lo cual puede explotarse como una alternativa y estrategia natural contra el cáncer de colon, además de generar un proceso antiinflamatorio y antimetastásico. Para el análisis de las propiedades antiinflamatorias en primera instancia se realiza una evaluación de citotoxicidad celular, esto permite obtener información acerca de la toxicidad de los compuestos a evaluar a nivel celular, posteriormente se realiza una extracción y una cuantificación de la proteína celular, que es obtenida de la incubación de las células con los tratamientos propuestos y finalmente se realiza la detección de proteínas específicas en una muestra mediante Western Blotting (Jasso de Rodríguez y cols., 2017).

### **2.7 Procesamiento de jugos**

El procesamiento de frutos es de suma importancia para poder proveer alimentos sanos y de buena calidad a la población, utilizar diferentes métodos de conservación para jugos y néctares permite aprovechar al máximo, las cosechas de frutas y hortalizas que, de no procesarse, alcanzarían niveles altos de pérdida para los productores (Nance y cols. 2006). El método de conservación más utilizado en la industria de jugos y bebidas es la pasteurización térmica; la cual es un proceso térmico que es realizado en líquidos (generalmente alimentos) con la intención de reducir la presencia de agentes patógenos (como por ejemplo ciertas bacterias, protozoos, mohos, levaduras, etc.) que puedan contener. Debido a las altas temperaturas (80-100 °C) la gran mayoría de los agentes bacterianos mueren. Sin embargo, el uso de temperaturas elevadas genera la degradación de diversos compuestos de interés en bebidas de frutas, ocasionando una pérdida del valor nutrimental de la misma. (Xiang y cols., 2020; Nanoglu y cols., 2021).

Aunado a lo anterior diversos reportes indican que la aplicación de tratamientos térmicos, tanto para el procesamiento como para la comercialización de múltiples productos, puede generar alteraciones y degradación de compuestos en los productos, como lo reportado por (Dewanto y cols., 2002) al aplicar tratamientos

## Capítulo 2 Antecedentes

térmicos de procesamiento en maíz dulce se generó un aumento en la actividad antioxidante del mismo, al igual que un incremento en el contenido fenólico y un aumento del 550% en ácido ferúlico, este aumento se obtuvo a pesar de una pérdida significativa en el contenido de vitamina C. Este tipo de efectos evidencia que si bien los tratamientos térmicos pueden generar una disminución de compuestos bioactivos, también propicia la liberación de otros compuestos benéficos a causa de los incrementos de temperatura.

### **2.7.1 Parámetros de calidad en jugos**

Con base en la Norma CODEX STAN 247-2005, se puede definir como jugo al líquido sin fermentación, el cual puede obtenerse de la parte comestible de frutas en estado óptimo de maduración (CODEX STAN 247-2005, 2005), este jugo podrá elaborarse mediante procedimientos que mantengan las características físicas, químicas, organolépticas (color, aroma, sabor y textura) y nutricionales esenciales de la fruta de procedencia.

Dentro de los aditivos permitidos en la elaboración de jugos podrán añadirse los azúcares sólidos cristalinos, según se definen en la Norma del Codex (CODEXSTAN 212-1999, Enm. 1-2001): sacarosa 3, dextrosa anhidra, glucosa 4 y fructosa a todos los productos definidos como jugos y néctares, sólo los jugos recién exprimidos (Economía & Comercio, 2005)

En la NORMA Oficial Mexicana NOM-218-SSA1-2011 se delimitan los parámetros microbiológicos para jugos y néctares, en los cuales se establece los límites máximos permisibles para microorganismos (Cuadro 2.3).

**Cuadro 2.3** Parámetros microbiológicos para jugos

<b>Microorganismos</b>	<b>Límite máximo</b>
Mesófilos aerobios	50 UFC/g o ml
Coliformes totales	10 NMP/ml o g
Coliformes fecales	n.a. NMP/ml o g
<i>Salmonella</i> spp	ausente * en 25 ml o g
<i>E. Coli</i>	n.a. NMP/g o ml
<i>V. cholerae</i> O1	ausente * en 50 g o ml
<i>Enterotoxina estafilocócica</i>	negativa*

En el caso de los arándanos azules su principal forma de consumo es en fresco, sin embargo, un porcentaje de la producción mundial es destinado principalmente a la elaboración de jugos, combinados normalmente con jugo de manzana y con altas concentraciones de azúcares, las cuales en conjunto con los métodos convencionales de procesamiento causan una reducción de las propiedades fisicoquímicas y sensoriales propias del fruto (Carmen y cols., 2013).

## **2.8 Uso de tecnologías emergentes en el procesamiento de alimentos**

Los consumidores en la actualidad tienen una mayor inclinación por los alimentos procesados con alto valor nutritivo y propiedades organolépticas propias del alimento, esta tendencia es a productos con la menor cantidad de procesos o bien, que posean un bajo contenido de aditivos. Por lo anterior, es que la industria de alimentos se ha enfocado en la implementación de nuevas tecnologías de procesamiento de alimentos. Dentro de los nuevos métodos de procesamiento de alimentos se encuentra el uso de tratamientos no térmicos. Algunos de estos

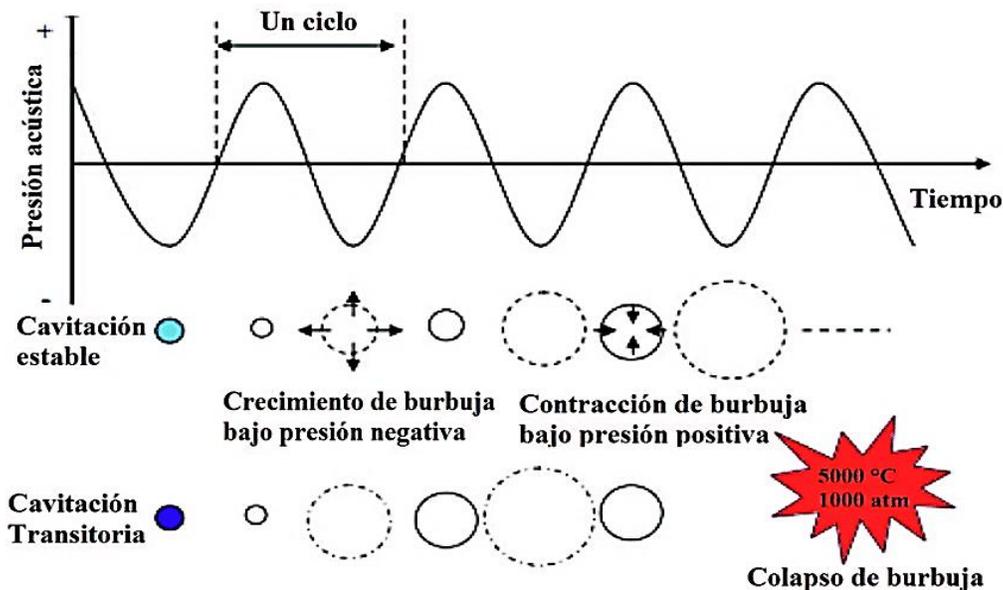
## Capítulo 2 Antecedentes

procesos no térmicos empleados a fin de extender la vida de anaquel son el uso de alta presión hidrostática, pulsos de alta intensidad de campo eléctrico, pulsos de alta intensidad de campo magnético, pulsos de luz, irradiación, termosonicación y ultrasonido (Calderón y cols., 1998). Gran variedad de estudios se han realizado utilizando diversas tecnologías emergentes, como la implementación de altas presiones hidrostáticas para la inactivación de microorganismos presentes en jugo de naranja (Bulut & Karatzas 2020), la utilización de termosonicación para la inactivación de enzimas como la polifenoloxidasas en smoothie de frutos (Amador-Espejo y cols., 2019) y a su vez se ha utilizado la sonicación para potencializar las propiedades antioxidantes en jugos de frutos. (Bhat & Ming 2017)

### **2.9 Ultrasonido**

El ultrasonido se ha implementado como una tecnología emergente, es decir, de reciente aplicación a nivel industrial en el procesamiento de alimentos, esta tecnología ha sido ampliamente utilizada para maximizar la calidad y garantizar la seguridad de productos alimentarios (Huang y cols., 2017). El ultrasonido puede definirse como ondas de sonido que tienen una frecuencia superior al umbral de audición humana ( $> 16$  kHz). En función del rango de frecuencia, la aplicación de ultrasonido se puede dividir en baja y alta energía. El ultrasonido de baja energía (baja potencia, baja intensidad) tiene frecuencias superiores a 100 kHz a intensidades por debajo de  $1 \text{ W} \cdot \text{cm}^2$ . El ultrasonido de baja potencia es una técnica no destructiva que proporciona información sobre las propiedades fisicoquímicas, como la composición, la estructura, el estado físico y la velocidad de flujo. El ultrasonido de alta energía (alta potencia, alta intensidad) utiliza intensidades superiores a  $1 \text{ W} \cdot \text{cm}^2$  en frecuencias entre 20 y 500 kHz. El ultrasonido de alta energía se utiliza para alterar e inducir efectos en las propiedades físicas, mecánicas o químicas/bioquímicas de los alimentos, por ejemplo, para generar emulsiones, lisar las células, promover reacciones químicas, inhibir las enzimas, ablandar la carne y modificar los procesos de cristalización (McClements D. J 1995; Awad y cols. 2012).

La tecnología ultrasónica ha tenido un alto interés en la industria de los alimentos debido a sus diversas aplicaciones, desde la extracción de compuesto bioactivos, hasta la inactivación de microorganismos patógenos presentes en los alimentos, este proceso de ultrasonido al requerir menor cantidad de energía que los métodos convencionales, se vuelve una alternativa más rentable económica y ambientalmente amigable para el procesamiento de frutos poscosecha (López-Malo y cols., 2005). La eficiencia del proceso de ultrasonido puede verse afectada por diversos factores como el nivel de potencia, el tiempo de tratamiento y la temperatura (Pinheiro y cols., 2015). La inactivación de los microorganismos patógenos y enzimas presentes en los frutos, utilizando ultrasonido se logra por el fenómeno de cavitación (Figura 2.4), el cual genera microburbujas de gas que implosionan a temperaturas cercanas a 5000 °k generando ondas de choque con distintos niveles de presión (Guerrero y cols., 2005).



**Figura 2.4** Fenómeno de cavitación. (Fuente: Salazar y cols., (2010)

### 2.9.1 Termosonicación en el procesamiento de bebidas de frutas

La aplicación del ultrasonido en conjunto con temperaturas moderadas (hasta 60°C), denominado termosonicación, ha resultado ser ampliamente efectivo ya que

## Capítulo 2 Antecedentes

se reduce la intensidad y el tiempo de procesamiento (Demirdöven & Baysal 2009). Estudios realizados utilizando la termosonicación sobre diferentes alimentos, demuestran la efectividad de este tipo de tecnologías contra los métodos de procesamiento convencionales (pasteurización) (Saeeduddin y cols., 2015), donde no solo se logró la inactivación de microorganismos patógenos sino que se logró una mayor retención de los compuestos bioactivos. Además de la inactivación microbiana se ha visto un notable efecto de los tratamientos con termosonicación sobre la acción de algunas enzimas como la polifenoloxidasa, pectinmetilesterasa y la peroxidasa, todas estas analizadas en jugo de manzana (Abid y cols., 2014). Además, se han atribuido diversos atributos a jugos tratados con esta tecnología como los que se presentan en el Cuadro 2.4.

**Cuadro 2.4** Efecto de la termosonicación en los atributos de jugos

Bebidas	Parámetros del proceso	Resultados	Referencia
<b>Guanábana</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Tiempo: 2-10 min</li> <li>Energía de densidad acústica 1.1, 1.2 y 1.4 W/ml</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Se conservó el 90% de ácido ascórbico y sólo hubo ligeros cambios en la calidad fisicoquímica del néctar termosonicado.</li> <li>La termosonicación fue efectiva para lograr la inactivación de PPO</li> <li>La sonicación a 20 y 490 kHz afectó significativamente la actividad antioxidante total (AOA), el contenido total de fenólicos (TPC) y el contenido total de antocianinas monoméricas (ACY) del puré de frambuesa roja</li> </ul>	(Anaya-Esparza y cols., 2017)
<b>Frambuesa</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Frecuencia de ultrasonido: 20, 490 y 986 kHz</li> <li>Tiempo: 0, 10, 20, 30 min</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>A 986 kHz no tuvo un efecto significativo en ACY y AOA</li> <li>La sonicación tuvo un efecto significativo y positivo en al menos uno de los parámetros medidos hasta 30 min.</li> <li>La sonicación a más de 10 minutos (y hasta 30 minutos) con 20 kHz no tuvo ningún cambio o disminuyó el contenido de AOA y ACY</li> <li>A 986 y 20 kHz, el TPC aumentó un 10% y un 9,5%, respectivamente, después de 30 min.</li> </ul>	(Golmohamadi y cols., 2013)
<b>Piña</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Amplitud: 40%-80%</li> <li>Tiempo: 2-6 min</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>El efecto de esta combinación también fue significativo dentro del almacenamiento y causó la inactivación de la levadura por debajo</li> </ul>	(Bevilacqua y cols., 2015)

## Capítulo 2 Antecedentes

<b>Pera</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pulso: 2-6 s</li> <li>• Temperatura: 25°C, 45°C y 65°C</li> <li>• Tiempo: 10 min</li> <li>• Frecuencia: 20 kHz</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• del límite de detección después de 4 días</li> <li>• No se observaron cambios significativos en sólidos solubles totales (°Brix), pH y acidez</li> <li>• Aumento significativo en el contenido de ácido ascórbico, fenoles totales y flavonoides</li> <li>• Se encontró una inactivación completa de los m.o en los tratamientos a 65 °C.</li> <li>• La muestra de 60 min registró la mayor reducción del recuento de microbios (26%) en comparación con otras muestras sometidas a ultrasonido por 30 min (17%) y 25 min (8%)</li> </ul>	(Saeeduddin y cols., 2015)
<b>Mango</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tiempo: 15, 30 y 60 min</li> <li>• Temperatura: 25°C</li> <li>• Frecuencia 40 kHz</li> <li>• Potencia 130 W</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Se observó un aumento significativo en la capacidad de extracción de carotenoides (4% -9%) y polifenoles (30% -35%) para jugo sometido a tratamiento ultrasónico durante 15 y 30 minutos.</li> </ul>	(Santhirasegaram, y cols., 2013)
<b>Moras</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Amplitud: 40% - 100%</li> <li>• Tiempo: 0-10 min</li> <li>• Frecuencia constante: 20 kHz</li> <li>• Duración del pulso: 5 s</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Se observó un cambio significativo solo en los valores de color y la retención de antocianinas.</li> <li>• Se observó una disminución del 5% en las condiciones máximas de tratamiento de 100% de amplitud durante 10 min.</li> </ul>	(Tiwari y cols., 2009)

### 2.9.2 Efecto de la termosonicación en enzimas y microorganismos

La utilización del ultrasonido como tecnología de procesamiento tiene su fundamento en su capacidad de retener compuestos de interés biológico, inactivar enzimas que alteren la calidad del producto final y microorganismos patógenos (Zinoviadou y cols., 2015). El pardeamiento de las frutas y algunos jugos procesados es causado por la enzima endógena polifenoloxidasas (PPO), dependiendo de la fruta, el pH óptimo de la PPO está entre 5 y 8 y la temperatura óptima de activación está entre 20 y 40°C (Anaya-Esparza y cols., 2017). Existen diversos estudios en los cuales se ha aplicado el ultrasonido como método de inactivación de microorganismos, por ejemplo, en jugo de melón durante 10 minutos para inactivar la PPO (14% inactivación a 19 kHz, 0,6 W / ml, T ≤ 23 °C) y en pulpa de piña (inactivación 16% a 19 kHz, 0,6 W / ml, T ≤ 23 °C) (Sulaiman y cols., 2015).

## Capítulo 2 Antecedentes

Otro de los estudios aplicando la tecnología de termosonicación, es el presentado por Anaya-Esparza y cols., 2017 en el cual se logró una inactivación completa de la enzima polifenoloxidasas en néctar de guanábana, esto sin generar alteraciones de los parámetros sensoriales del néctar. Otra de las enzimas de importancia sobre la calidad de jugos y néctares es la pectinmetilesterasa (PME). Esta enzima ataca a la cadena de pectina dejando residuos de ácido galacturónico. Esto provoca la liberación de metanol, pectinas de bajo metoxilo y formación de ácido péctico que afectan el pH. A su vez mejora la actividad de otras enzimas hidrolíticas, como la poligalacturonasa y además da lugar a una disminución de la solubilidad de la pectina, siendo la principal consecuencia de la separación de fases o decoloración causando pérdida de turbidez, gelificación, formación de sabores desagradables, modificación de textura y reducción en la viscosidad o pérdida de consistencia (Marić y cols., 2018).

Diversos estudios se han realizado para la inactivación de la PME, por ejemplo, Raviyan y cols., (2005) evaluaron el efecto del ultrasonido para la inactivación de esta enzima en frutos de tomate, en el cual demostraron que el tratamiento con ultrasonido aumentó efectivamente la inactivación de PME de tomate en comparación con un tratamiento térmico a la misma temperatura (50 °C), manteniendo así las características fisicoquímicas y de firmeza del fruto. En estudios realizados por Amador-Espejo y cols., (2019) en un smoothie de frutas, demostraron que existe una reducción en la actividad enzimática de PFO y PME, esto debido a la influencia de diversos factores durante su procesamiento como la potencia de ultrasonido, el tiempo de aplicación del tratamiento y temperatura.

Por su parte en jugos y bebidas se ha evaluado la tecnología de ultrasonido como una alternativa para la inactivación de microorganismos, Ferrario y cols., (2014) realizaron un estudio en el cual evaluó el efecto del ultrasonido en la inactivación de *Alicyclobacillus acidoterrestris* ATCC 49025 esporas y *Saccharomyces cerevisiae* KE162 esto en jugo de manzana, así mismo lograron observar que la inactivación de estos microorganismos dependía del tratamiento, tiempo, temperatura y del

microorganismo mismo, logrando una reducción de hasta 6.4 y 5.8 Log, prolongando la vida de anaquel de jugo de manzana hasta 15 días más.

### **2.9.3 Efecto de la termosonicación en compuestos bioactivos**

Los compuestos bioactivos se definen como aquellos componentes de los alimentos que influyen en las actividades celulares y fisiológicas obteniendo, tras su ingesta, un efecto beneficioso para la salud. Estos compuestos bioactivos no son nutrientes y por tanto no son esenciales para la vida (Nadeem y cols., 2018). Generalmente, la mayoría de estos compuestos bioactivos se encuentran en cantidades muy pequeñas en los alimentos que consumimos y normalmente se encuentran en los vegetales y frutas. Desde el punto de vista químico estos compuestos son de origen diverso y actúan a través de mecanismos de acción diferentes. Así, existen carotenoides polifenoles, terpenos, lignanos, compuestos organosulfurados, glucosilatos, saponinas, etc. En general sus efectos saludables se centran en la prevención de las enfermedades no transmisibles. La tecnología de ultrasonido ayuda en la preservación de las propiedades fisicoquímicas y compuestos bioactivos presentes en los frutos (Rahaman y cols., 2019). Diversos estudios han demostrado; que la tecnología de ultrasonido resulta beneficiosa para la extracción y conservación de compuestos bioactivos (por ejemplo, contenido total de fenoles, vitamina c) y la actividad antioxidante de jugos y zumos de frutas después de un tratamiento de ultrasonido de 30 minutos, en jugo de grosella se logró obtener hasta un 15% más de contenido fenólico total en comparación con una muestra control (Wang y cols., 2019). Además, Nadeem y cols., (2018) informaron que la tecnología de ultrasonido puede mantener los atributos nutritivos de los jugos de frutas por hasta 90 días en comparación con aquellos a los cuales no se les aplicó ninguna tecnología para su conservación.



### Capítulo 3 Justificación

El mercado de bebidas a base de frutas se ha incrementado en los últimos años debido a la demanda de alimentos naturales y saludables. La industrialización del arándano fresco a jugo es una opción para el aprovechamiento de este fruto rico en propiedades funcionales. México cuenta con una producción cercana a las 37 mil toneladas, ubicándose como el cuarto país con mayor producción de arándano en América.

Por otra parte, convencionalmente la industria de alimentos aplica tratamientos térmicos para garantizar la estabilidad y seguridad de las bebidas a base de frutas. Aunque la pasteurización es un proceso eficaz, afecta drásticamente a los compuestos termolábiles (vitaminas, color, aroma, antioxidantes) presentes en las bebidas y que son apreciados por los consumidores.

El jugo de arándano por sus propiedades nutricionales y funcionales es un candidato, para el procesamiento por nuevas tecnologías de conservación las cuales minimizan las pérdidas de compuestos bioactivos, prolongan la vida útil y garantizan la seguridad del consumidor.

Dentro de estas tecnologías se encuentra la termosonicación, que ha demostrado ser eficaz inactivando microorganismos patógenos y de alteración, así como enzimas, manteniendo las características de calidad nutricional y sensorial propias del alimento. Adicionalmente se ha visto que los compuestos bioactivos son extraídos con esta tecnología encontrándose así concentraciones mayores de estos compuestos en los alimentos.

Por ello, en el presente estudio se buscó obtener las condiciones óptimas de procesamiento del jugo de arándano azul, para una menor pérdida de compuestos bioactivos y que a su vez permitieran obtener un producto inocuo y de alta calidad. En conjunto con la conservación de las propiedades del alimento, también se evaluaron las propiedades antiinflamatorias del jugo de arándano termosonicado.



## Capítulo 4 Objetivos

### 4.1 Objetivo general

Estudiar el efecto de la tecnología de termosonicación sobre parámetros de calidad, la actividad antioxidante y las propiedades antiinflamatorias en jugo de arándano azul optimizado.

### 4.2 Objetivos específicos

- Obtener el jugo de arándano tratado por termosonicación y determinar sus propiedades fisicoquímicas (pH, sólidos solubles totales, índice de oscurecimiento e índice de turbidez).
- Realizar el recuento de microorganismos (coliformes totales, mesófilos aerobios, hongos y levaduras) y determinar la actividad enzimática (pectinmetilesterasa y polifenoloxidasas) del jugo de arándano.
- Determinar el contenido de compuestos bioactivos (fenoles solubles totales y antocianinas) y evaluar la actividad antioxidante del jugo de arándano por los métodos de FRAP, ABTS y DPPH y actividad quelante.
- Obtener la condición del tratamiento óptimo por medio del diseño de superficie de respuesta.
- Comprobar la reproducibilidad del estudio mediante la comparación de los valores predichos por el modelo con los datos experimentales.
- Realizar una comparación entre el jugo tratado con las condiciones óptimas y un jugo pasteurizado.
- Identificar y cuantificar los componentes fenólicos presentes en el jugo de arándano termosonicado en la muestra control, pasteurizada y optimizada.
- Evaluar las propiedades antiinflamatorias *in vitro* en células HT-29 con las muestras de jugo de arándano termosonicado con las condiciones óptimas.



## Capítulo 5 Materiales y métodos

### 5.1 Etapas del estudio

En el cuadro 5.1 se describen las etapas experimentales basadas en los objetivos específicos de este proyecto.

**Cuadro 5.1** Etapas del proceso experimental

<b>Etapas del estudio</b>	<b>Etapas del estudio</b>	<b>Etapas del estudio</b>	<b>Etapas del estudio</b>
Obtención del jugo de arándano azul y determinación de sus propiedades fisicoquímicas, antioxidantes, enzimáticas y microbiológicas	Obtención las condiciones del tratamiento óptimo por medio del diseño de superficie de respuesta.	Comprobación de la reproducibilidad del estudio	Evaluación del efecto antiinflamatorio del jugo de arándano optimizado, perfil de fenoles y prueba sensorial

Cabe mencionar, que los análisis de Identificación de compuestos fenólicos por UPLC (ultra performance liquid chromatography) y la evaluación del efecto antiinflamatorio (Etapas 3 y 4) se llevaron a cabo solamente para el jugo control y el jugo optimizado según las condiciones obtenidas en la etapa 2 y a un jugo pasteurizado térmicamente (90°C por 15 seg.)

### 5.2 Obtención de los frutos y preparación del jugo de arándano

Para la elaboración del jugo, los arándanos se obtuvieron en el municipio de San Luis de Lozada, Nayarit, se trasladaron al Laboratorio de Biotecnología del Instituto Tecnológico de Tepic. Los arándanos se limpiaron, lavaron con agua potable para eliminar impurezas, posteriormente se desinfectaron sumergiéndolos en una solución de hipoclorito de sodio (200 ppm) por 10 min, y se enjuagaron con agua corriente para luego almacenarlos en congelación a -20°C hasta su uso. Posteriormente para la elaboración del jugo, los arándanos pasaron de -20°C a 10°C durante mínimo 8 horas antes de su procesamiento. Los arándanos fueron triturados

en una licuadora comercial (Oster 006859-126/013 000, México). La mezcla se filtró con un colador convencional con la finalidad de separar el jugo de la pulpa y piel. El jugo obtenido se filtró nuevamente mediante un embudo büchner con papel filtro whatman N°1 y un matraz kitasato de 1000 ml de capacidad, esto con la finalidad de eliminar la mayor cantidad posible de partículas del jugo. Se distribuyó el jugo en frascos de vidrio estériles con capacidad de 200 ml.

### **5.3 Procesamiento del jugo de arándano por termosonicación**

Los tratamientos de termosonicación se realizaron con un equipo de ultrasonido (Hielscher UP400S, USA), utilizando el sonotrodo H7 (Tip 7 Acoustic power density 300 W/cm<sup>2</sup>). Se utilizó un baño de agua (Kasalab, SKU: TE-0541/1, Colombia) con capacidad de 4 L para controlar la temperatura de salida de las muestras (50°C ± 5°C).

### **5.4. Determinación de las propiedades fisicoquímicas**

#### **5.4.1 pH y sólidos solubles totales**

Para la medición de pH se utilizó un potenciómetro (Hach sensION, LPV2000.98.0002, España) previamente calibrado con soluciones buffer de pH 4, 7 y 10. Las muestras de cada tratamiento (5 ml) fueron colocadas en tubos falcon de 15 ml y se insertó el electrodo. Los sólidos solubles totales se determinaron con la ayuda de un refractómetro (Hanna HI, 96801. México) a temperatura ambiente. El refractómetro fue limpiado antes de cada medición con agua destilada y algodón.

#### **5.4.2 Índice de turbidez**

Se centrifugarón 5 ml de muestra (Sigma 2-16KL, Alemania) a 3,400 rpm durante 10 minutos. Posteriormente se leyó la absorbancia del sobrenadante a 600 nm en un espectrofotómetro (Jenway, 6305.España), utilizando agua destilada como blanco.

#### **5.4.3 Índice de oscurecimiento**

El índice de oscurecimiento se determinó mediante la metodología descrita por (Meydav y cols., 1977), se centrifugaron (Sigma, 2-16KL, Alemania) 15 ml de

## Capítulo 5 Materiales y Métodos

muestra durante 10 minutos a 3,400 rpm. En un tubo, se adicionaron 5 ml del sobrenadante y 5 ml de etanol (95 %) y se volvió a centrifugar a las mismas condiciones. La absorbancia del sobrenadante fue medida a 420 nm en un espectrofotómetro (Jenway, 6305.España).

### 5.4.4 Acidez titulable

La acidez titulable se determinó mediante la metodología descrita (García Martínez, 2014) con modificaciones en la cual se llenó una bureta con una solución de hidróxido de sodio valorada al 0.1 N, posteriormente se tomaron 10 ml de la muestra y 10 ml de agua destilada, se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 200 ml y se adicionaron 5 gotas de fenolftaleína al 1% como indicador. Se adicionó gota por gota la solución de hidróxido de sodio, al tiempo que se homogenizó con la muestra. Al presentarse el color rosa se cerró la llave de la bureta y se siguió girando el matraz durante 15 segundos para ver si el color permanecía. Se expresó como el porcentaje del ácido predominante en la muestra, en este caso se utilizó ácido cítrico como ácido predominante. Para el cálculo de la acidez se utilizó la fórmula N°1:

$$\% \text{ Acidez} = (V \times N \times \text{Meq}) \times 100 \text{ g o ml de muestra} \quad [1]$$

V = Volumen de NaOH consumido

N = Normalidad del NaOH

Meq = peso miliequivalente del ácido predominante en la muestra

### 5.5. Análisis microbiológicos

Los análisis microbiológicos se efectuaron mediante la técnica de vaciado en placa, mediante diluciones seriadas ( $10^{-1}$  a  $10^{-3}$ ) en agua peptonada al 0.1% previamente esterilizada. El recuento total de mesófilos (MT) se realizó en el agar para métodos estándar (PCA) incubando a 30°C por 48 h (NOM-092-SSA1-1994); enterobacterias (EB) en agar bilis rojo violeta glucosado (VRBG) incubando a 37°C por 48 h (NOM-113-SSA1-1994); y levaduras y hongos (HL) en agar papa dextrosa (PDA) acidificado con ácido tartárico al 10 % incubando por 5 días a 25 °C (NOM-111-SSA1-1994). Los recuentos se expresaron en Log UFC/ml.

## 5.6 Determinación de la actividad enzimática

### 5.6.1 Pectinmetilesterasa (PME)

La determinación de la actividad residual de la enzima PME se realizó mediante la titulación del grupo carboxil, de acuerdo a Askar & Treptow, (1993). Se añadieron 20 ml de jugo a 40 ml de solución de pectina cítrica al 1%, en una solución de NaCl 2N. La mezcla se ajustó a pH 7.0 con NaOH 1N. Una vez alcanzado el pH de 7.0, se agregó 1 ml de NaOH 0.05 N y se midió el tiempo requerido para que la muestra regresara al pH 7.0. Una unidad de PME (UPME) fue definida como la liberación de 1  $\mu$ mol del grupo carboxil por minuto a pH 7.0 a 30°C para el cálculo de la actividad enzimática se utilizó la fórmula N°2:

$$\frac{UPME}{ml} = \frac{(ml\ de\ NaOH) * (normalidad\ del\ NaOH) * 1000}{(Minutos) * (ml\ de\ muestra)} \quad [2]$$

Los valores fueron convertidos a % de actividad residual con respecto a la muestra control, la cual representó el 100 % de la actividad de PME.

### 5.6.2 Polifenoloxidasasa (PPO)

La actividad de la PPO se midió por espectrometría a 420 nm en un espectrofotómetro (Jenway, 6305.España) de acuerdo a la metodología de Cano y cols., (1997). El extracto de la enzima se obtuvo mezclando 5 ml de muestra con 5 ml de buffer McIlvaine (pH 6.6). Esta mezcla fue centrifugada (Sigma, 2-16KL, Alemania) a 4°C, a 10000 rpm por 40 min y posteriormente se filtró con papel whatman N°1. Una vez obtenido el extracto, se tomaron 0.25 ml y se añadió 1 ml de buffer McIlvaine (pH 6.6) y 0.5 ml de catecol (0.175 M). La absorbancia se midió cada 15 seg por 3 min y la porción lineal de la curva se utilizó para calcular las unidades de actividad enzimática (UAE). Una UAE es definida como 0.001  $\Delta A_{420}$  /min/ml. Los valores fueron convertidos a % de actividad residual con respecto a la muestra control, la cual representa el 100% de actividad de PPO.

### 5.7 Contenido de compuestos fenólicos solubles totales

El contenido de compuestos fenólicos solubles totales se analizó según Stintzing, (2005), el cual utiliza el reactivo Folin Ciocalteu. Este reactivo es una mezcla de ácido fosfotúngstico y fosfomolibdico, la cual es reducida a óxidos azules de tungsteno y molibdeno durante la oxidación fenólica que ocurre en condiciones alcalinas. La coloración azul refleja la cantidad total de polifenoles. Se tomaron 100 µl de muestra (dilución 1:10) y se mezclaron con 500 µl de Folin-Ciocalteu diluido (1:10 en agua desionizada). Se agregaron 400 µl de carbonato de sodio al 7.5 % y se mantuvo en reposo durante 30 min a temperatura ambiente. La absorbancia fue medida a 765 nm utilizando un lector de microplacas (Power Wave XS UV-Biotek, software KC Junior, USA).

La concentración de compuestos fenólicos solubles totales se obtuvo a partir de una curva estándar de ácido gálico a las siguientes concentraciones: 0, 100, 200, 300 mg/L. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico por litro de jugo (mg EAG/L).

### 5.8 Contenido de antocianinas

Para la determinación de antocianinas totales se utilizó el método reportado por Giusti y cols., (2001), el cual es un método colorimétrico que se basa en el diferencial de color emitido por las antocianinas en distintos pH.

Se colocaron 0.5 ml de muestra y se diluyó usando 4.5 ml de buffer de cloruro de potasio al 0.025 M, ajustado a pH de 1.0. En otro vial, se diluyó la misma cantidad de muestra con 4.5 ml de solución de acetato de sodio 0.4 M y se ajustó a pH de 4.5 con HCl 0.1 M. Las muestras se dejaron reposar durante 15 min en la oscuridad, para posteriormente realizar la lectura a 510 y 700 nm, en un lector de microplacas (Power Wave XS UV-Biotek, software KC Junior, USA). El contenido de antocianinas fue calculado por la ecuación N°3:

$$\text{Contenido de antocianinas (mg Cy3gl/L)} = (A * PM * FD * 1000) / (E * Tc) \quad [3]$$

Dónde:

## Capítulo 5 Materiales y Métodos

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

PM = Peso molecular de cianidin-3-glucósido (449.2 g/mol)

FD = Factor de dilución

E = Absorción molar (26900 L/ mol \*cm)

### 5.9 Determinación de actividad antioxidante

#### 5.9.1 Determinación de actividad antioxidante por el método del radical ácido 2,2' azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico (ABTS)

La determinación de la actividad antioxidante por medio del atrapamiento del radical ABTS, se realizó de acuerdo a Kuskoski y cols., (2005). El ABTS es un radical con un nitrógeno central que presenta un color característico azul-verde, cuando este catión es reducido por un antioxidante a la forma no radical, presenta una pérdida de color.

Se preparó una solución de ABTS al 7 mM/L con persulfato de potasio al 2.45 mM/L, se incubó durante 16 h a temperatura ambiente en la oscuridad para dar lugar a la formación del radical libre ABTS, posteriormente se realizó una dilución 1:15 en agua desionizada para obtener una absorbancia de  $0.7 \pm 0.1$  a 754 nm. Se tomaron 980  $\mu$ l de dicha dilución y 20  $\mu$ l de muestra, se mezclaron y se dejó reposar durante 7 min. Posteriormente se realizó la lectura espectrofotométrica a 754 nm en el lector de microplacas (Power Wave XS UV-Biotek, software KC Junior, USA). Se utilizó una curva estándar de ácido ascórbico a las concentraciones: 0, 10, 20, 30, 40 y 50 mg/L. La capacidad antioxidante se expresó como mg equivalentes de ácido ascórbico por litro de jugo (mg EAA/L).

#### 5.9.2 Determinación de actividad antioxidante por captación del radical 2,2- difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)

La determinación antirradical por el método con DPPH se realizó según la metodología reportada por Morales y cols., (2001). El reactivo DPPH es un radical

libre estable, que en solución etanólica presenta una coloración violeta. Si se adiciona a este medio una sustancia susceptible de atrapar radicales libres, el electrón no apareado del DPPH se aparea e inmediatamente se presenta una decoloración de la solución que puede ir hasta amarillo en razón del número de electrones apareados.

Se preparó el radical DPPH en solución etanólica. A 100 µl de muestra se le agregaron 500 µl de solución de DPPH, se dejó reposar durante 1h a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugó a 3,000 rpm durante 10 min (C1200/DW41, Labnet, Korea). La absorbancia fue medida a 520 nm utilizando un lector de microplacas (Power Wave XS UV-Biotek, software KC Junior, USA).

Se realizó una curva de calibración, utilizando trolox como antioxidante de referencia, a concentraciones de 0, 50, 100, 200 y 300 µmol/L. La actividad antioxidante se expresó como µmol de equivalentes de trolox por litro de jugo (µmol ET/L).

### **5.9.3 Determinación de actividad antioxidante por el método Poder Antioxidante por Reducción Férrica (FRAP)**

Este método evalúa la capacidad antioxidante de una muestra de acuerdo a su capacidad para reducir el  $Fe^{+3}$  presente en un complejo con la 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) hasta la forma ferrosa ( $Fe^{+2}$ ), que presenta un máximo de absorbancia a una longitud de onda entre 590-595 nm. Para la realización de la técnica se siguió la metodología descrita por Mesa y cols. (2010) modificada en la cual se tomaron 30 µl de la muestra, 900 µl de la solución FRAP y 90 µl de agua destilada, se adicionaron dentro de un vial y se incubaron durante 10 min a 37°C. Posteriormente se leyó la absorbancia a 593 nm en el lector de microplacas (Power Wave XS UV-Biotek, software KC Junior, USA). La actividad antioxidante se expresó como Mmol  $Fe^{+2}$ /L muestra.

### **5.10 Porcentaje de actividad quelante**

La actividad quelante se determinó según Ilhami Gulcin, (2003) el cual se basa en la reacción de la molécula quelante de referencia con el ion ferroso ( $Fe^{+2}$ ),

## Capítulo 5 Materiales y Métodos

posteriormente el ion ferroso que no fue quelado reacciona con la ferrozina generando color. A 100 µl de muestra se le agregaron 50 µl de solución de cloruro férrico II tetrahidratado 2 mM. Se añadieron 450 µl de metanol y se mantuvo en reposo durante 5 min a temperatura ambiente. Se agregaron 400 µl de solución de ferrozina al 5 mM y se dejó reposar durante 10 min a temperatura ambiente. La absorbancia fue medida a 562 nm utilizando un lector de microplacas (Power Wave XS UV-Biotek, software KC Junior, USA). Como agente quelante de referencia se utilizó EDTA a 0.1 M y como muestras control se utilizó agua desionizada bajo las mismas condiciones.

Para el cálculo de la actividad quelante (% AQ) se aplicó la ecuación N°4:

$$\% \text{ AQ} = [(A_0 - A_1) / A_0] * 100 \quad [4]$$

Dónde:  $A_0$  = absorbancia de la muestra control.  $A_1$  = absorbancia de la muestra.

La curva patrón se realizó utilizando  $\text{FeSO}_4$  y agua a las siguientes concentraciones 0, 10, 20, 30, 40 y 50 µmol/L. Los resultados fueron expresados en (Mmol  $\text{Fe}^{+2}$ /L)

### 5.11 Identificación de compuestos fenólicos por UPLC

La identificación de compuestos fenólicos se llevó a cabo por principios cromatográficos utilizando un equipo UPLC (Waters Corporation, Milford, MA) acoplado a masas con detector de triple cuádruplo (Xevo TQ-S en tándem). Los ácidos fenólicos se determinaron con un Acquity UPLC BEH Columna C8 (100 mm × 2,1 mm x 1,7 µm; Waters) operada a 30 °C. El perfil de elución incluía dos disolventes, agua acidificada con ácido fórmico (A) 7,5 mM y acetonitrilo (B), para la identificación de algunos compuestos presentes se utilizaron los siguientes estándares: ácido sináptico, ácido cafeico, ácido gálico, ácido cumárico, ácido rosmarinico, ácido vanílico, ácido clorogénico, ácido ferúlico, ácido elágico, Galocatequina galato, epicatequina, rutina, Luteolina, histiridina, resveratrol, naringerina y quercetina. La identificación de picos se basó en una comparación de sus tiempos de retención y transiciones con los de los estándares puros. Las determinaciones cuantitativas de ácidos fenólicos se llevaron a cabo utilizando curvas de calibración estándar de los estándares disponibles. Se realizaron las

suspensiones de 20 mg/μl de liofilizados en una solución de metanol agua (1:1) acidificado con HCl, ajustado a un pH de 2. Posteriormente cada suspensión fue filtrada y colocada en viales para su congelación hasta utilizarse para el análisis de compuestos fenólicos en el equipo de UPLC, donde se inyectaron 2 μl de la muestra en el equipo (Figura 5.1).



**Figura 5.1** Equipo de UPLC (ultra performance liquid chromatography)

### 5.12 Ensayo de propiedades antiinflamatorias

#### 5.12.1 Determinación de citotoxicidad celular por MTT (bromuro de 3-(4 5-dimetiltiazol-2-il)-2 5-difeniltetrazolio)

Se emplearon células HT-29 en fase exponencial de crecimiento que se depositaron en placas de 96 pocillos en una densidad de  $9.6 \times 10^3$  células en 200 μl por pozos de medio, con un medio base (Roswell Park Memorial Institute Medium [RPMI-1640]), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), y una mezcla de antibióticos (penicilina [100 U/ml]/ estreptomycin [100 μg/ml]). Los cultivos fueron incubados a 37°C, en atmósfera humidificada con el 5% de CO<sub>2</sub> para posteriormente ser tratadas como se muestra en el Cuadro 5.2.

**Cuadro 5.2** Diseño experimental de prueba de citotoxicidad celular

Experimento	Tratamiento	Vehículo		Concentración (ng $\mu\text{L}^{-1}$ )
		A	B	
<b>Ctrl0-1</b>	----	+	----	0
<b>Ctrl0-2</b>	----	+	+	0
<b>Cn10</b>	Control 10	+	+	10
<b>Cn20</b>	Control 20	+	+	20
<b>Cn50</b>	Control 50	+	+	50
<b>Cn100</b>	Control 100	+	+	100
<b>Cn200</b>	Control 200	+	+	200
<b>Op10</b>	Optimizado 10	+	+	10
<b>Op20</b>	Optimizado 20	+	+	20
<b>Op50</b>	Optimizado 50	+	+	50
<b>Op100</b>	Optimizado 100	+	+	100
<b>Op200</b>	Optimizado 200	+	+	200
<b>Past10</b>	Pasteurizado 10	+	+	10
<b>Past20</b>	Pasteurizado 20	+	+	20
<b>Past50</b>	Pasteurizado 50	+	+	50
<b>Past100</b>	Pasteurizado 100	+	+	100
<b>Past200</b>	Pasteurizado 200	+	+	200

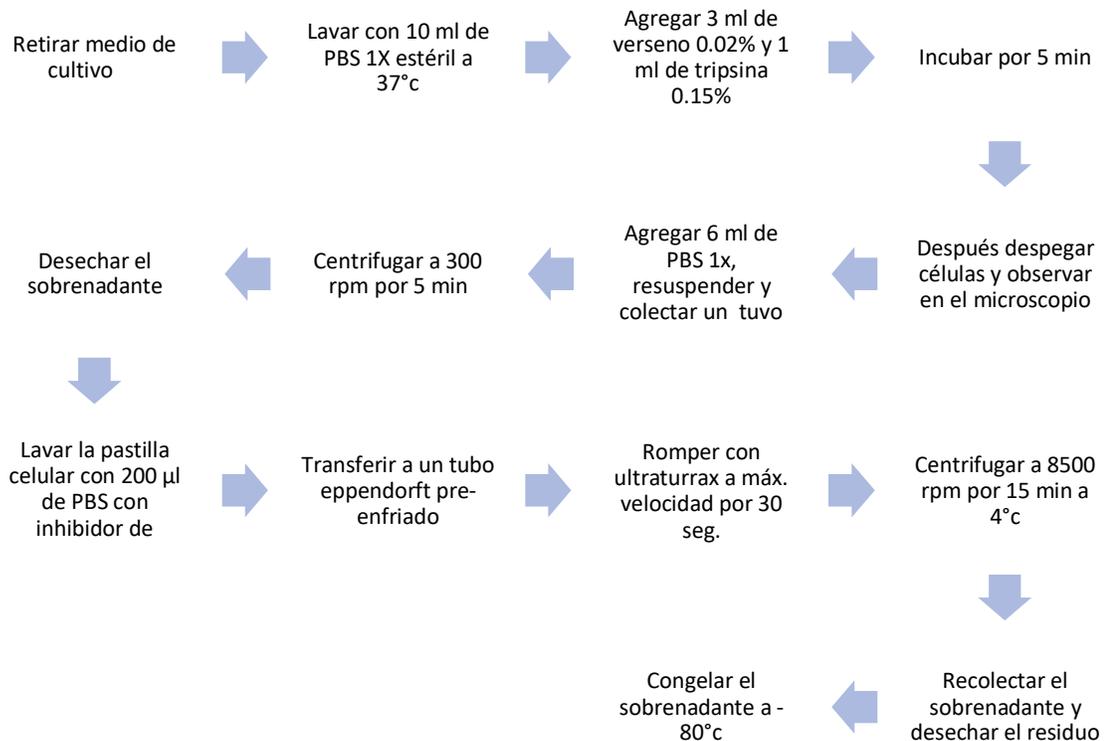
Siendo Ctrl0-1 y Ctrl0-2 los controles negativos, Cn la muestra control (10, 20, 50,100 y 200 ng/ml), OP la muestra optimizada (10, 20, 50,100 y 200 ng/ml) y Past la muestra pasteurizada (10, 20, 50,100 y 200 ng/ml).

### 5.12.2 Evaluación de propiedades antiinflamatorias *in vitro* en células HT-29

Una vez identificada la concentración adecuada con base a la evaluación de citotoxicidad, para llevar a cabo la extracción de la extracción de proteína total se utilizaron placas sembradas con células HT-29 a las cuales se les adicionó el tratamiento de 20  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de la prueba de citotoxicidad, para posteriormente incubar por 24 horas en atmósfera de  $\text{CO}_2$  al 5%.

## Capítulo 5 Materiales y Métodos

La cuantificación de proteína se llevó a cabo mediante el método espectrofotométrico (Biotek, Synergy™ HTXa, Reino Unido) una longitud de onda de 340 nm utilizando 1 µl de muestra, las concentraciones se expresan en µg/ml. El fin de llevar a cabo la cuantificación de proteínas es para saber la concentración de carga para llevar a cabo la técnica western Blotting (Turbo blot). En la Figura 5.2 se muestra la metodología para llevar a cabo la extracción de proteína total en células.



**Figura 5.2** Metodología de extracción de proteína total en células

### 5.12.3 Cuantificación de proteína total mediante espectrofotometría

Se implementó la técnica de Western Blotting, por lo que se detectaron proteínas específicas por electroforesis en gel (SDS-PAGE), una vez realizada la electroforesis se realizó una transferencia de proteínas a una membrana de nitrocelulosa para detectar la unión antígeno-anticuerpo en el cual se utilizaron dos anticuerpos: primario y secundario, el anticuerpo primario es el que se va a unir directamente a la proteína en específico y el secundario reconoce de forma

## Capítulo 5 Materiales y Métodos

específica la región del anticuerpo primario y estos son detectados a través de una señal ya sea colorimétrica o quimioluminiscente (Burnette, 1981).

Posteriormente, se efectuó la técnica descrita por Towbin y cols., (1979) con los anticuerpos primarios: Factor Nuclear Kappa B (NFkB, P65 (C-20)): sc-372, Ciclooxygenasa-1 (COX-1, C-20): SC-1752, Ciclooxygenasa-2 (COX-2, C-20): sc-1745, Interleucina (IL-8, H60): sc-7922, Factor de Necrosis Tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ): sc-52746 y se usó GAPDH (Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa) como control de carga y anticuerpos secundario: cabra-IgG-AP: sc-2355, conejo IgG-AP: sc-2358.

A partir de los resultados obtenidos se prepararon las muestras de proteína total a una concentración de 80  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , se elaboraron geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) de acuerdo al peso molecular, al 15.5% para NFkB, TNK- $\alpha$ , GAPDH, COX-1 y COX-2 y al 15% para IL-8; posteriormente se cargaron los geles para realizar la electroforesis con un buffer de corrida a 100-150 Volts.

La transferencia de proteínas se realizó del gel a la membrana de nitrocelulosa en buffer de transferencia mediante el método Trans-Blot Turbo Transfer System, el cual es un sistema de transferencia Western de alto rendimiento, diseñado para proporcionar transferencias rápidas con alta eficiencia. Posteriormente se retiró el gel de poliacrilamida y se colocó la membrana de nitrocelulosa en un recipiente, se cubrió la membrana con una solución de leche svelty con TBS sin tween, para llevar a cabo el bloqueo de las membranas de 2-3 horas, con el fin de sellar los poros de la membrana para prevenir inespecificidades de los anticuerpos. Se realizaron 3 lavados con una solución TBS sin tween, después se incubaron los anticuerpos en las membranas toda la noche en agitación a 4°C. Una vez transcurrido el tiempo se realizaron 3 lavados con TBS con tween, se agregó el 2do anticuerpo a las membranas y se dejó incubar por 3 horas en agitación a 4°C. Posteriormente se lavó 2 veces la membrana con TBS-tween, una vez realizado, se tiñó la membrana y se revelaron. Finalmente, las proteínas se cuantificaron a partir de un análisis densitómetro usando de referencia el control con DMSO como un 100% dependiendo de la intensidad de la banda.

### **5.13 Análisis sensorial**

Para conocer la tendencia preferencial por el jugo de arándano azul tratado por termosonicación y evaluar su aceptabilidad contra un producto con procesamiento convencional, se realizó una prueba sensorial afectiva (O'Sullivan, 2017) a 40 catadores no entrenados, a los cuales se les dio a degustar dos muestras la muestra pasteurizada y la muestra control, a los cuales se les entregó un cuestionario (Anexo 1) y contestaron con base a su preferencia en términos de color, olor, sabor y textura para cada una de las dos muestras, siendo JA01P la muestra tratada bajo condiciones de pasteurización (90°C/ 15 seg) y FR19O la muestra tratada bajo las condiciones de optimización de termosonicación.

### **5.14 Diseño experimental**

El diseño experimental que se empleó fue un diseño central rotatorio, compuesto por dos variables independientes (amplitud y tiempo), cada una en cinco niveles, ordenados aleatoriamente utilizando la metodología de superficie de respuesta (RSM, por sus siglas en inglés: Response Surface Methodology).

Las dos variables independientes fueron el porcentaje de amplitud de 70-90% (X1, %) y tiempo de 2-14 min (X2, min) que fueron seleccionados en base a los valores obtenidos en experimentos preliminares. Los valores codificados de las variables independientes fueron  $-\alpha$ , -1, 0, +1,  $+\alpha$ . Las variables fueron introducidas en el programa RSM y este arrojó 13 tratamientos (Cuadro 5.3), de los cuales 5 fueron puntos centrales, 4 puntos factoriales y 4 puntos axiales, a una distancia de 1.414 de cada diseño central.

**Cuadro 5.3** Diseño experimental para análisis de ultrasonido

<b>Tratamiento</b>	<b>Tiempo (min)</b>	<b>Amplitud</b>
1	2.34	80
2	14	80
3	4	70
4	12	70
5	8	80
6	8	94.1
7	8	80
8	8	65
9	12	90
10	8	80
11	8	80
12	4	90
13	8	80

El análisis de regresión se realizó sobre los datos de las variables dependientes obtenidos por triplicado como observaciones efectuadas por las condiciones de extracción y el valor medio de cada atributo se tomó como la respuesta (Y). Los datos experimentales se sometieron a análisis de regresión lineal múltiple utilizando JMP® 5.1 software estadístico (SAS Institute, Cary, NC, USA) y se ajustaron a un modelo polinomial de segundo orden, dado en la ecuación N°5:

## Capítulo 5 Materiales y Métodos

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 \quad [5]$$

Donde  $Y_i$  es la respuesta prevista,  $\beta_0$  es el coeficiente constante,  $\beta_1$  y  $\beta_2$  son los coeficientes de regresión en sus términos lineales,  $\beta_{11}$  y  $\beta_{22}$  son coeficientes de regresión cuadráticos y  $\beta_{12}$  es el coeficiente de interacción.

Las variables de respuesta son:

$Y_1$  = pH

$Y_2$  = Sólidos solubles totales

$Y_3$  = Índice de oscurecimiento

$Y_4$  = Índice de turbidez

$Y_5$  = Acidez titulable

$Y_6$  = Enterobacterias

$Y_7$  = Hongos y levaduras

$Y_8$  = Mesofilos aerobios

$Y_9$  = Pectinmetilesterasa

$Y_{10}$  = Polifenoloxidasas

$Y_{11}$  = Compuestos fenólicos totales

$Y_{12}$  = Contenido de Antocianinas

$Y_{13}$  = Actividad Quelante

$Y_{14}$  = Actividad antioxidante por ABTS

$Y_{15}$  = Actividad antioxidante por DPPH

$Y_{16}$  = Actividad antioxidante por FRAP

Las variables de respuesta (determinaciones) que se ajustaron al modelo matemático alcanzando  $R^2 \geq 0.90$  se interpretaron tras la elaboración de figuras tridimensionales y de contorno, estas últimas utilizadas para visualizarla condición óptima de proceso mediante un traslape, ambas figuras fueron realizadas a partir del programa SigmaPlot 12.3 (Systat Software Inc.).



## Capítulo 6 Resultados y discusión

### 6.1 Efecto de la termosonicación en el pH, sólidos solubles (°Brix), turbidez, oscurecimiento y acidez titulable en jugo de arándano azul

Los valores obtenidos de pH y sólidos solubles totales del jugo de arándano azul termosonicado se muestran en el Cuadro 6.1, donde se puede observar que el pH se encontró entre un rango de 3.17- 3.71 y los sólidos solubles totales entre 11.75 - 12 °Brix. Estos dos parámetros no se ajustaron al modelo matemático, ya que presentaron una  $R^2$  de 0.76 para pH y 0.65 para sólidos solubles totales (Anexo 2); sin embargo, cumplieron con los criterios de calidad establecidos para jugos y néctares de frutas, donde se indica que el pH no debe ser inferior a 2.5 y los sólidos solubles totales deberán de estar entre 9-11.1 °Brix (CODEX, 2005). Con respecto al efecto de la termosonicación sobre estos dos parámetros en jugos de frutas, se ha reportado anteriormente que esta tecnología no ejerce cambios significativos (Tiwari y cols., 2009b; Abid y cols., 2014; Amador-Espejo y cols., 2019)

Otro parámetro de calidad en los jugos y néctares de frutas es el índice de turbidez, el cual está relacionado con las proteínas, lípidos, celulosa, pectina y otros polisacáridos presentes en los jugos (Croak & Corredig, 2006). Los cambios en los índices de turbidez son atribuidos a la cavitación, ya que provoca dispersión de agregados o rompimiento de partículas susceptibles, como enzimas y microorganismos (Tiwari y cols., 2008a; Tiwari y cols., 2008b). En el Cuadro 6.1 se observa que los jugos tratados por termosonicación presentaron un mayor índice de turbidez al compararlos con el jugo control. Con respecto al coeficiente de regresión, la interacción de las variables tiempo y amplitud ( $a_{12}$ ),  $p < 0.001$  (Cuadro 6.2) mostró efecto significativo sobre la turbidez. Esto se ve reflejado en la Figura 6.1 A, donde a mayor tiempo y mayor amplitud, mayor es el índice de turbidez, tendencia similar observada por Oladunjoye y cols., (2021) en jugo de ciruela, por su parte Tiwari y cols., (2010); Mason y cols., (2016) reporta que la turbidez disminuye, conforme se aumenta la amplitud y el tiempo de ultrasonido en jugo de naranja, esto debido a que se tiene una dispersión de partículas menos homogénea debido a que la

## Capítulo 6 Resultados y Discusión

cavitación no logra romper las partículas. Sin embargo, los resultados de un estudio realizado por Abid y cols., (2015) demuestran un efecto contrario, ya que los valores de turbidez en el jugo de manzana tratado por ultrasonido, tienden a aumentar debido a la dispersión y rompimiento de macromoléculas, causados por el gradiente de alta presión durante la sonicación.

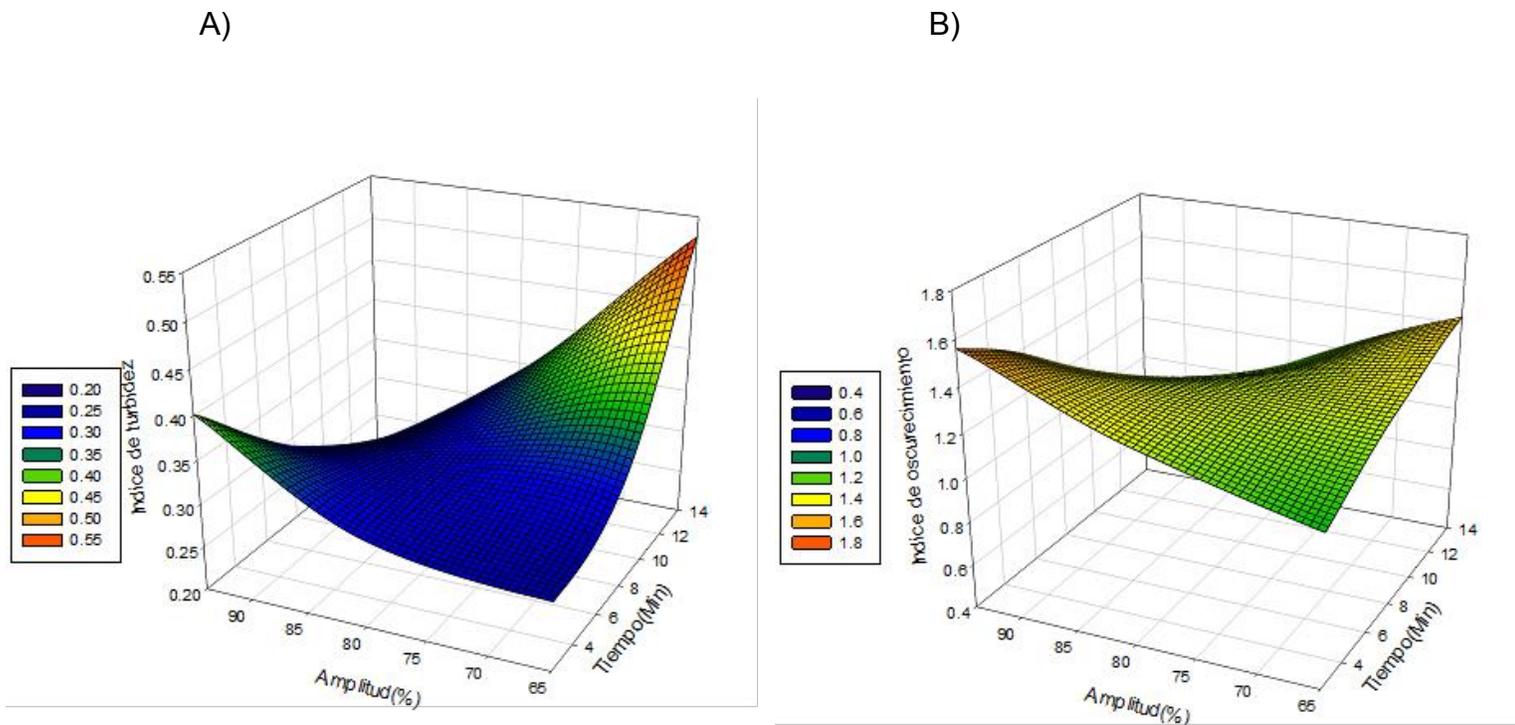
**Cuadro 6.1** Efecto de la amplitud y tiempo de termosonicación sobre el pH, sólidos solubles totales, turbidez, oscurecimiento y acidez titulable del jugo de arándano azul.

<b>Tratamiento</b>	<b>pH</b>	<b>Sólidos solubles totales</b>	<b>Índice de turbidez</b>	<b>Índice de oscurecimiento (a 420 nm)</b>	<b>Acidez titulable (g ac. cítrico/100 ml jugo)</b>
<b>Control</b>	3.38±0.03	11.75±0.05	0.31±0.03	1.15±0.07	1.23±0.04
<b>US 2.34 min/ 80 A</b>	3.71±0.01	12.00±0.00	0.30±0.02	1.28±0.08	1.06±0.03
<b>US 14 min/ 80 A</b>	3.70±0.00	11.75±0.05	0.34±0.03	1.09±0.06	1.17±0.02
<b>US 4 min/ 70 A</b>	3.68±0.02	11.85±0.07	0.29±0.01	1.19±0.09	1.23±0.02
<b>US 12 min / 70 A</b>	3.59±0.00	11.95±0.04	0.42±0.07	1.33±0.09	1.11±0.04
<b>US 8 min / 80 A</b>	3.56±0.00	11.92±0.04	0.29±0.02	1.28±0.02	1.18±0.02
<b>US 8 min / 94.1 A</b>	3.21±0.00	11.85±0.05	0.29±0.02	1.24±0.12	1.09±0.03
<b>US 8 min / 80 A</b>	3.17±0.00	11.82±0.04	0.32±0.02	1.21±0.03	1.50±0.32
<b>US 8 min / 65 A</b>	3.42±0.00	11.90±0.00	0.33±0.01	1.29±0.04	1.23±0.06
<b>US 12 min / 90 A</b>	3.41±0.01	11.92±0.04	0.26±0.03	0.92±0.13	1.07±0.02
<b>US 8 min / 80 A</b>	3.42±0.00	11.85±0.05	0.30±0.03	1.28±0.12	1.12±0.00
<b>US 8 min / 80 A</b>	3.44±0.00	11.92±0.04	0.31±0.04	1.26±0.03	1.13±0.07
<b>US 4 min / 90 A</b>	3.43±0.00	12.00±0.00	0.35±0.12	1.43±0.12	1.19±0.01
<b>US 8 min / 80 A</b>	3.41±0.00	12.00±0.00	0.29±0.01	1.35±0.15	1.09±0.03

**Cuadro 6.2.** Coeficientes de regresión del modelo y significancia para las variables de respuesta índice de turbidez e índice de oscurecimiento del jugo de arándano termosonicado

<b>Coefficiente</b>	<b>Índice de turbidez</b>	<b>Índice de oscurecimiento</b>
<b>a<sub>0</sub></b>	0.302	1.275
<b>a<sub>1</sub></b>	0.011	-0.076 <sup>c</sup>
<b>a<sub>2</sub></b>	-0.018 <sup>c</sup>	-0.029 <sup>c</sup>
<b>a<sub>12</sub></b>	-0.055 <sup>b</sup>	-0.162 <sup>b</sup>
<b>a<sub>11</sub></b>	0.011	-0.043 <sup>d</sup>
<b>a<sub>22</sub></b>	0.006	-0.008
<b>R<sup>2</sup> Adj</b>	<b>0.92</b>	<b>0.93</b>

Niveles de significancia: *a*,  $p < 0.0001$ ; *b*,  $p < 0.001$ ; *c*,  $p < 0.01$  y *d*,  $p < 0.05$ . En los coeficientes (a) el subíndice 1= Tiempo; 2= Amplitud



**Figura 6.1** Efecto de la amplitud y tiempo de termosonicación sobre el índice de turbidez (A) e índice de oscurecimiento (B) del jugo de arándano azul.

En cuanto al índice de oscurecimiento, se obtuvieron valores más elevados en los jugos sometidos a tratamientos de termosonicación con respecto a la muestra control. Como se puede analizar en el Cuadro 6.1, este valor fue influenciado por la interacción entre el tiempo y la amplitud ( $a_{12}$ ,  $p < 0.001$ ) Cuadro 6.2. El comportamiento gráfico se puede apreciar en la Figura 6.1 B, en donde se percibe un aumento del índice de oscurecimiento a tiempos de exposición cortos y amplitudes elevadas. Tendencia similar fue encontrada por Cordeiro y cols., (2014), donde al aplicar tratamientos con termosonicación con temperaturas  $\leq 50^{\circ}\text{C}$  y amplitudes superiores al 80 % se genera un efecto sobre los productos de la reacción de Maillard, obteniendo un aumento en el índice de oscurecimiento en jugos. A su vez Valdramidis y cols., (2010); Vaikousi y cols., (2008) en jugo de naranja y manzana, respectivamente, establecieron que el incremento en la temperatura generado por la cavitación es el parámetro principal que afecta la

## Capítulo 6 Resultados y Discusión

calidad de los alimentos procesados, y se da por caramelización, formación de productos de la reacción de Maillard o por degradación de los carotenoides y del ácido ascórbico.

Por su parte en la acidez titulable, se observa que a tiempos de exposición superiores a los 10 min se tiene una reducción en la acidez (Cuadro 6.1), Waheeda y cols., (2015) en un estudio aplicando ultrasonido continuo en jugo de arándano azul, establecieron que la aplicación de esta tecnología no genera alteraciones en los niveles de acidez titulable con respecto a la muestra control, efecto similar al obtenido en este trabajo donde podemos constatar en el Cuadro 6.1 que no existe variación en los niveles de acidez de los tratamientos con termosonicación en comparación con la muestra control. Esta variable no se ajustó al modelo matemático con una  $R^2$  de 0.16 (Anexo 2).

### **6.2 Efecto de la termosonicación en los recuentos microbiológicos**

Lograr una reducción de microorganismos en los alimentos, implica que será inocuo para su consumo y que tendrá una vida útil mayor en comparación a su contraparte fresca. El Cuadro 6.3 muestra los recuentos de los mesófilos totales y hongos y levaduras en el jugo de arándano control y los jugos termosonicados. En el caso de las enterobacterias, no se detectó su presencia en el jugo control ni en los jugos termosonicados. En cuanto al recuento total de mesófilos se presentó una carga microbiana inicial de 3.84 Log UFC/ml, mientras que el menor recuento se produjo en el jugo tratado a 80 % de amplitud por 8 min (0.49 Log UFC/ml). Estos resultados pueden corroborarse con lo reportado por Gabriel y cols., (2012) en donde se aplicó la tecnología de ultrasonido en jugo de manzana teniendo una reducción de hasta 3 log en la carga microbiana presente en el jugo. Es importante destacar que la NORMA Oficial Mexicana NOM-218-SSA1-2011 para bebidas y jugos procesados establece como límites permisibles 2 Log UFC/ml para mesófilos aerobios y no detectado para enterobacterias. Por lo cual se puede establecer que el tratamiento con termosonicación, nos permite obtener un jugo de arándano azul dentro de los límites permisibles por la normativa mexicana. En el recuento de hongos y

## Capítulo 6 Resultados y Discusión

levaduras, se registró una carga microbiana inicial de 3.65 Log UFC/ml, logrando obtener su reducción total con los tratamientos de 70 % amplitud por 12 min y 80 % amplitud por 14 min, lo cual nos indica que independientemente de la amplitud utilizada, a mayores tiempos de exposición del jugo al proceso de ultrasonido, se logra una mayor inactivación de hongos y levaduras, sin embargo estas variables no se ajustaron al modelo matemático con una  $R^2$  de 0.50 para mesófilos aerobios y 0.65 para hongos y levaduras (Anexo 3). En un estudio realizado por Wong y cols., (2010) en jugo de blackberry, se reportó que la concentración inicial de hongos, levaduras y bacterias ácido lácticas es de 3.2 log 10 UFC/ml. Mismos que fueron inactivados después de 15 minutos mediante osmosonificación, mientras que las bacterias ácido lácticas fueron más resistentes, logrando la reducción de sólo 2 log 10 UFC/ml

Se ha reportado la inactivación de microorganismos en diversos jugos de fruta como piña, uva y manzana por termosonificación, ya que se incrementa la sensibilidad de los microorganismos al calor y altas presiones provocadas por la cavitación que se genera con las ondas de ultrasonido, ocasionando cambios en la permeabilidad de la membrana celular, pérdida de homeostasis y muerte celular (Earnshaw y cols., 1995; Piyasena y cols., 2003; Bermúdez-Aguirre y cols., 2012; Anaya-Esparza y cols., 2017).

**Cuadro 6.3** Efecto de la amplitud y tiempo de termosonicación sobre el recuento de microorganismos del jugo de arándano azul

<b>Tratamiento</b>	<b>Mesófilos aerobios (Log UFC/ml)</b>	<b>Hongos y levaduras (Log UFC/ml)</b>
<b>Control</b>	3.84±0.06	3.65±0.05
<b>US 2.34 min/ 80 A</b>	1.54±0.06	1.00±0.00
<b>US 14 min/ 80 A</b>	0.88±0.78	ND
<b>US 4 min/ 70 A</b>	1.39±0.09	1.16±0.15
<b>US 12 min / 70 A</b>	1.70±0.00	ND
<b>US 8 min / 80 A</b>	1.69±0.09	0.77±0.68
<b>US 8 min / 94.1 A</b>	1.26±0.24	1.78±0.00
<b>US 8 min / 80 A</b>	1.97±0.07	1.44±0.40
<b>US 8 min / 65 A</b>	2.36±0.06	2.41±0.04
<b>US 12 min / 90 A</b>	2.13±0.02	2.45±0.09
<b>US 8 min / 80 A</b>	1.77±0.07	1.33±0.31
<b>US 8 min / 80 A</b>	1.69±0.09	1.89±0.37
<b>US 4 min / 90 A</b>	0.57±0.51	1.48±0.00
<b>US 8 min / 80 A</b>	0.49±0.15	1.69±0.09

### 6.3 Efecto de la termosonicación en la actividad enzimática

Para lograr un producto de calidad, enzimas como la polifenoloxidasa y la pectinmetilesterasa deben ser inactivadas en las bebidas de frutas. En el Cuadro 6.4 se muestran los porcentajes de actividad residual de las enzimas pectinmetilesterasa (PME) y polifenoloxidasa (PFO), estas variables no se ajustaron al modelo matemático con una  $R^2$  de 0.33 para PME y de 0.15 para PFO (Anexo 4). Se puede constatar en el cuadro 6.4 que los tratamientos de termosonicación fueron efectivos para reducir la actividad de la PME, logrando un mínimo de actividad residual (AR) de 0.49%. En estudios realizados por Amador-Espejo y cols., (2019) en un smoothie de frutas, demostraron que existe una reducción en la actividad enzimática de PFO y PME, esto debido a la influencia de diversos factores durante su procesamiento como la potencia de ultrasonido, el tiempo de aplicación del tratamiento y temperatura. Así mismo, Zhu y cols., (2017), demostraron que a mayor

incremento en la potencia de ultrasonido se tiene una menor actividad residual de PME, siendo la potencia de ultrasonido la variable con una mayor significancia para la obtención de una menor actividad residual de PME.

**Cuadro 6.4** Efecto de la amplitud y tiempo de termosonicación sobre el porcentaje de actividad residual enzimática del jugo de arándano azul.

<b>Tratamiento</b>	<b>%AR PME</b>	<b>%AR PFO</b>
<b>US 2.34 min/ 80 A</b>	100±0.0	100±0.0
<b>US 14 min/ 80 A</b>	0.49±0.00	15.68±4.98
<b>US 4 min/ 70 A</b>	0.49±0.00	8.39±0.46
<b>US 12 min / 70 A</b>	0.62±0.14	38.07±4.52
<b>US 8 min / 80 A</b>	0.49±0.00	32.06±2.06
<b>US 8 min / 94.1 A</b>	0.49±0.00	67.18±2.69
<b>US 8 min / 80 A</b>	0.60±0.11	14.11±9.13
<b>US 8 min / 65 A</b>	0.57±0.09	17.14±4.47
<b>US 12 min / 90 A</b>	0.55±0.06	17.67±2.47
<b>US 8 min / 80 A</b>	0.49±0.00	50.26±3.70
<b>US 8 min / 80 A</b>	0.70±0.06	31.66±6.66
<b>US 4 min / 90 A</b>	0.67±0.20	20.93±0.99
<b>US 8 min / 80 A</b>	0.49±0.00	24.67±1.86
<b>US 2.34 min/ 80 A</b>	0.49±0.00	25.02±1.54

Respecto a la actividad residual de la PFO, se presentó la menor actividad residual con un valor de 14.11% en el tratamiento a 80 % de amplitud por 8 min (Cuadro 6.4). La reducción de la actividad de PFO resulta de gran importancia, ya que esta enzima es la responsable de las coloraciones pardas oscuras en los alimentos, siendo un parámetro de calidad esencial para este tipo de productos. Cheng y cols., (2007) estableció que la temperatura ideal para la inactivación de PPO es de 70-90°C, temperaturas superiores a las empleadas en este estudio. Por otro lado, en estudios realizados en jugo de naranja y tomate, se ha demostrado que la temperatura aplicada en el tratamiento de termosonicación es la variable que más influye en la inactivación de enzimas, y que ésta es mucho más efectiva que el tratamiento térmico por sí solo (Raviyan y cols., 2005; Koshani y cols., 2014).

## Capítulo 6 Resultados y Discusión

El efecto que ejerce el ultrasonido en las enzimas es debido a los procesos químicos y mecánicos inducidos por la cavitación, ya que éstos provocan daños en la integridad de las estructuras de las enzimas, disminuyendo su actividad (Seshadri y cols., 2003). Así, el gradiente de altas presiones ocasionado durante la cavitación causa fragmentación de las moléculas de proteína, mientras que la temperatura generada provoca inactivación por pirolisis es decir la descomposición química de materia orgánica y todo tipo de materiales, excepto metales y vidrios, causada por el calentamiento a altas temperaturas (Foong y cols., 2020) y desnaturalización proteica (Morel y cols., 2000). Aunado a esto, las ondas de ultrasonido rompen la estructura lineal de la pectina, reduciendo así su peso molecular y debilitando las redes que estas forman, haciendo que estas sean menos accesibles como sustrato para la PME (O'Donnell y cols., 2010; Fonteles y cols., 2012).

En cuanto a la resistencia de las enzimas a tratamientos de termosonicación, Abid y cols., (2014) observaron que la PFO mostró mayor inactivación, con respecto a la PME, en jugo de manzana termosonicado a 60 °C, logrando una inactivación de hasta 6.15 y 7.10 % respectivamente.

### **6.4 Efecto de la termosonicación en el contenido de compuestos fenólicos totales y antocianinas**

Los compuestos fenólicos han demostrado gran potencial antioxidante y beneficios a la salud humana (Lee y cols., 2012; Bhat y cols., 2011). En el arándano azul se han identificado diversos compuestos fenólicos como ácidos fenólicos, taninos, estilbenos, lignanos y flavonoides, incluidas antocianinas, flavonoles y flavanoles (Guiné, y cols., 2018).

En este estudio el mayor contenido de fenoles se encontró en el tratamiento a 80 % de amplitud por 4 min (Cuadro 6.5), siendo la variable de tiempo en su término lineal ( $a_1$ ) la cual presentó una influencia significativa  $p < 0.01$  en el contenido de fenoles Cuadro 6.7, este comportamiento se puede visualizar en la Figura 6.2 A en el cual se indica que al incrementar los tiempos de exposición, se obtiene una mayor extracción de estos compuestos. En estudios anteriores realizados por Lieu y cols., (2010) en muestras tratadas por sonicación, reportaron un aumento en la

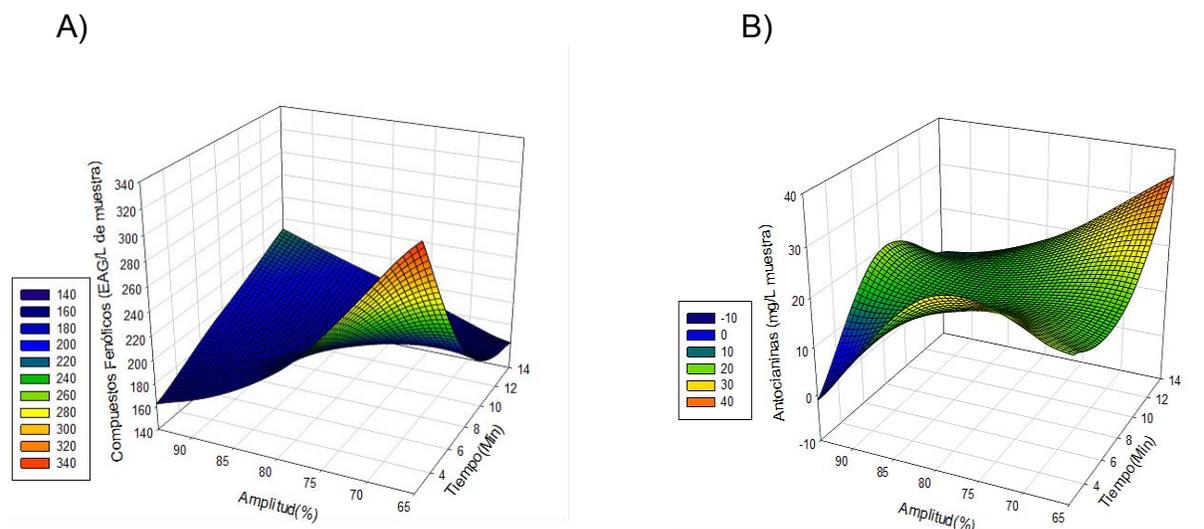
## Capítulo 6 Resultados y Discusión

concentración de fenoles solubles totales (hasta 93 %) con respecto a la muestra fresca. Este fenómeno está asociado a la alta liberación de los compuestos fenólicos durante el tratamiento de ultrasonido, ya que durante la cavitación hay una ruptura en los enlaces que forman los ácidos fenólicos con otros compuestos como polisacáridos (Soria & Villamiel, 2010). Otros estudios revelan un aumento de estos compuestos en jugo de tuna y de lima ultrasonificados con respecto al jugo fresco (Zafra-rojas y cols. 2013, Bhat y cols., 2011;)

En la determinación de antocianinas, su estabilidad está influenciada por su estructura y los factores de la matriz en que se encuentran (pH, temperatura, enzimas, luz, oxígeno y otros compuestos). El contenido de antocianinas, expresadas como cianidin-3-glucósido (Cy-3-Gl), se vio reducido hasta  $9.28 \pm 0.39$  mg/l muestra en el tratamiento a 90 % amplitud por 4 min comparado con la muestra control que tuvo 26.05 mg/l. De acuerdo al coeficiente de regresión (Cuadro 6.7), el tiempo ( $a_1$ ) fue la variable que influyó significativamente ( $p < 0.01$ ), y al contrastar con su gráfico (Figura 6.2 B) se puede observar que la mayor cuantificación de las antocianinas se obtiene a tiempos superiores de 12 min de exposición. La disminución de antocianinas en los jugos sometidos a los tratamientos de ultrasonido podría estar asociada al fenómeno de cavitación, generado por la sonicación, en el cual se producen radicales libres, induciendo así la oxidación de compuestos antioxidantes (Tiwari y cols., 2009; Dubrovic y cols., 2011; Rawson y cols., 2011). Se ha reportado que los radicales libres provocan la degradación de las antocianinas al modificar los anillos de la estructura convirtiéndolas en chalconas (Sadilova y cols., 2007) además de una hidrólisis en la fracción glucosídica (Adams & Ongley, 1973). Estudios similares reportaron una variación del 5 % en el contenido de antocianinas durante la sonicación del jugo de zarzamora y fresa, a 25 y 40°C respectivamente, influenciado tanto por el tiempo de sonicación como la energía aplicada (Tiwari y cols., 2010; Tiwari & Cullen 2008).

**Cuadro 6.5** Efecto de la amplitud y tiempo de termosonicación sobre compuestos fenólicos y antocianinas del jugo de arándano azul.

Tratamiento	Compuestos	Antocianinas (mg/L
	Fenólicos (EAG/L muestra)	muestra)
Control	169.676±61.150	26.05±0.78
US 2.34 min/ 80 A	211.590±19.664	25.11±1.59
US 14 min/ 80 A	197.778±12.447	17.00±0.41
US 4 min/ 70 A	265.000±20.232	19.27±0.28
US 12 min / 70 A	177.619±10.469	24.71±3.37
US 8 min / 80 A	198.000±2.146	21.70±0.43
US 8 min / 94.1 A	196.389±10.531	19.84±1.62
US 8 min / 80 A	193.069±7.865	17.84±1.23
US 8 min / 65 A	202.006±18.055	16.84±0.85
US 12 min / 90 A	210.509±16.928	13.37±0.99
US 8 min / 80 A	187.937±8.890	11.08±0.19
US 8 min / 80 A	185.556±6.807	11.46±0.03
US 4 min / 90 A	177.978±17.103	9.28±0.39
US 8 min / 80 A	187.662±11.585	12.24±0.93



**Figura 6.2** Efecto de la termosonicación sobre los compuestos fenólicos solubles totales (EAG/L de muestra) (A) y antocianinas (mg/L muestra) (B).

### 6.5 Efecto de la termosonicación en la capacidad antioxidante

La actividad antioxidante se determinó por los métodos de ABTS, DPPH, FRAP y actividad quelante y los resultados se muestran en el Cuadro 6.5. Los resultados expresados como equivalentes de trolox para DPPH ( $\mu\text{mol ET/L}$ ), muestran que el jugo tratado a 80 % de amplitud por 2.34 min, así como 70 % de amplitud por 4 min, presentaron la mayor actividad antioxidante comparado con las demás muestras sometidas a termosonicación y con el control. Estos resultados pueden contrastarse con los obtenidos por Khandpur y Gogate, (2015), los cuales evaluaron la actividad antioxidante de jugo de diferentes frutos y vegetales tratados por termosonicación observando un decremento en la actividad antioxidante por DPPH en jugos de naranja, espinaca y zanahoria. Esto se debe principalmente a que los radicales DPPH tienden a ser eliminados por la presencia de antioxidantes que se encuentran en diversos frutos, este efecto de eliminación de los radicales DPPH se atribuye principalmente a la presencia de diversos ácidos fenólicos (Klimczak y cols., 2007). Este comportamiento puede observarse en el Cuadro 6.6, donde en algunos de los tratamientos se tuvo una disminución de la capacidad antioxidante por DPPH, sin embargo existen tratamientos en los cuales se obtuvo un incremento de este valor, siendo los tratamientos con una porcentaje de amplitud de 90%, en los cuales se obtienen estos valores elevados, ante esto Wang y cols., (2019) establece que a niveles elevados de amplitud, se puede obtener una mayor extracción de compuestos antioxidantes. Se ha reportado que la técnica con DPPH es mejor que la de ABTS para medir la actividad antioxidante, ya que es un radical libre el cual puede obtenerse sin necesidad de realizar una preparación previa a pesar de que la técnica de DPPH no reacciona con los flavonoides que no tengan en su anillo B al menos un grupo -OH, como es el caso de las flavonas e isoflavonas (Kuskoski y cols., 2005). Sin embargo, la cianidina 3-glucósido y otras antocianinas tienen en su anillo B de 2 a más grupos -OH (Roginsky & Lissi, 2005).

Los resultados de la actividad antioxidante evaluada por el método ABTS presentó una  $R^2$  de 0.90, ajustándose al modelo matemático, siendo el término lineal de

## Capítulo 6 Resultados y Discusión

tiempo ( $a_1$ ) la que tuvo efecto significativo ( $p < 0.001$ ) en la actividad antioxidante (Cuadro 6.7), y esto se ve reflejado en la Figura 6.3 A; donde a menores tiempos de exposición se obtuvo una mayor respuesta antioxidante. Radziejewska-Kubzdela y cols., (2020) en un estudio realizado a jugo de *Berberis amurensis* Rupr. Señalan que una vez realizado el procesamiento con termosonicación se genera una disminución de la capacidad antioxidante, lo cual lo atribuyen a la generación de radicales libres por el fenómeno de cavitación, resultados que difieren con los presentados en este estudio, ya que una vez realizado el tratamiento de termosonicación se observó un incremento de la capacidad antioxidante por ABTS. Este incremento de la capacidad antioxidante puede deberse a la ruptura de las estructuras de la matriz alimenticia empleada por la cavitación, ya que produce la liberación y una mayor extracción de estos compuestos en un medios líquidos (Gomes y cols., 2017). El incremento de la capacidad antioxidante medida por el método con ABTS en los tratamientos, podría estar asociado al aumento que registran estas muestras en el contenido de fenoles, ya que existe una relación entre la actividad antioxidante medida por esta técnica y los compuestos fenólicos totales determinados con el reactivo Folin-Ciocalteu (Hasperué y cols., 2016; Roginsky & Lissi, 2005; Kuti, 2004)

En cuanto a los resultados obtenidos por método FRAP, se muestra que algunos de los tratamientos de termosonicación incrementaron la actividad antioxidante del jugo de arándano azul con respecto a la muestra control, el tratamiento a 80 % de amplitud por 2.34 minutos mostró la mayor actividad antioxidante (258.35 Mmol Fe +2/100 ml de muestra). Siendo el cuadrático del tiempo ( $a_{11}$ ) a una  $p < 0.001$  la variable que presentó una influencia significativa en la actividad antioxidante por este método (Cuadro 6.7). Gomes y cols., (2016) determinaron una tendencia similar al aplicar ultrasonido en jugo de arándano, en donde observaron que el tiempo es un factor importante en la determinación de antioxidantes y a su vez concluyeron que el incrementar la potencia de ultrasonido genera una reducción en la capacidad antioxidante. Este comportamiento podemos encontrarlo en la Figura 6.3 B. En estudios realizados por Silva y cols., (2020) en jugo de naranja observaron una disminución en los valores de FRAP en cuanto se incrementaba la potencia de

## Capítulo 6 Resultados y Discusión

ultrasonido, así mismo establecieron que la actividad antioxidante del jugo de fruta está asociada con el contenido de 13 compuestos fitoquímicos como el ácido ascórbico y compuestos fenólicos como el cumárico, ácido ferúlico y cafeico, por lo cual la intensificación del proceso reduce la capacidad antioxidante del jugo de naranja.

Con respecto al efecto del ultrasonido sobre la capacidad antioxidante, se ha demostrado que durante la sonicación, se generan radicales libres y la cantidad de estos aumenta conforme aumenta el tiempo de tratamiento y esto ocurre por la hidroxilación de los compuestos fenólicos (Ashokkumar y cols., 2008). Por otro lado, la hidroxilación generada durante el ultrasonido, también se ha utilizado en la industria para favorecer la capacidad antioxidante de los flavonoides, ya que la introducción de un grupo OH en la posición orto incrementa su actividad antioxidante, así, la 0-dihidroxilación en el anillo B de los flavonoides brinda mayor potencial antioxidante a las moléculas (Shahidi, 2011).

**Cuadro 6.6** Efecto de la amplitud y tiempo de termosonicación sobre la actividad antioxidante del jugo de arándano azul.

<b>Tratamiento</b>	<b>ABTS (mg ac. ascórbico/L muestra)</b>	<b>DPPH (<math>\mu\text{mol ET/L}</math> muestra)</b>	<b>FRAP (Mmol <math>\text{Fe}^{+2}/\text{L}</math> muestra)</b>	<b>Actividad Quelante (%)</b>
<b>Control</b>	54.58 $\pm$ 3.72	58.78 $\pm$ 2.82	194.11 $\pm$ 28.57	82.24 $\pm$ 1.75
<b>US 2.34 min/ 80 A</b>	76.94 $\pm$ 24.63	17.63 $\pm$ 5.43	258.35 $\pm$ 2.88	43.84 $\pm$ 2.85
<b>US 14 min/ 80 A</b>	59.10 $\pm$ 4.00	17.19 $\pm$ 4.82	209.12 $\pm$ 4.46	72.23 $\pm$ 3.12
<b>US 4 min/ 70 A</b>	71.90 $\pm$ 18.13	29.47 $\pm$ 6.24	219.16 $\pm$ 2.37	71.43 $\pm$ 3.29
<b>US 12 min / 70 A</b>	60.14 $\pm$ 2.36	16.32 $\pm$ 6.24	195.77 $\pm$ 14.82	67.78 $\pm$ 4.55
<b>US 8 min / 80 A</b>	52.60 $\pm$ 1.43	42.63 $\pm$ 2.34	196.79 $\pm$ 7.40	68.07 $\pm$ 1.29
<b>US 8 min / 94.1 A</b>	60.64 $\pm$ 20.54	13.68 $\pm$ 0.74	174.87 $\pm$ 15.31	69.71 $\pm$ 2.55
<b>US 8 min / 80 A</b>	56.69 $\pm$ 3.21	12.37 $\pm$ 0.74	190.88 $\pm$ 4.95	82.3 $\pm$ 2.34
<b>US 8 min / 65 A</b>	60.30 $\pm$ 4.59	5.79 $\pm$ 0.16	201.81 $\pm$ 22.27	82.07 $\pm$ 2.11
<b>US 12 min / 90 A</b>	56.61 $\pm$ 23.80	199.21 $\pm$ 34.75	199.38 $\pm$ 17.75	81.18 $\pm$ 2.45
<b>US 8 min / 80 A</b>	60.48 $\pm$ 16.61	63.68 $\pm$ 3.96	190.58 $\pm$ 8.87	83.47 $\pm$ 4.39
<b>US 8 min / 80 A</b>	56.52 $\pm$ 5.69	91.32 $\pm$ 9.60	197.35 $\pm$ 14.11	82.8 $\pm$ 1.70
<b>US 4 min / 90 A</b>	64.49 $\pm$ 2.64	154.47 $\pm$ 6.49	202.67 $\pm$ 7.74	78.16 $\pm$ 1.58
<b>US 8 min / 80 A</b>	56.98 $\pm$ 3.58	68.95 $\pm$ 3.97	195.25 $\pm$ 23.45	80.52 $\pm$ 3.39

El porcentaje de actividad quelante (% AQ) de los jugos termosonicados respecto al control se mantuvieron en valores cercanos (82.1-83.5 %) (Cuadro 6.6), lo cual indica que los tratamientos por termosonicación no afectan la actividad quelante del jugo de arándanos. La poca variabilidad del % AQ de las muestras termosonicadas, con respecto al jugo control, podría estar relacionada, por un lado con la estabilidad que presenta su pH, ya que este factor afecta negativamente la capacidad quelante (Thurnham, 2002), y por otro lado con su alto contenido en compuestos bioactivos, como antocianos y polifenoles, entre otros, los cuales presentan la capacidad de quelar metales como el hierro (Ebrahimzadeh y cols., 2008). Con respecto al efecto del ultrasonido sobre esta característica, Zafra-rojas y cols., (2013) reportó una

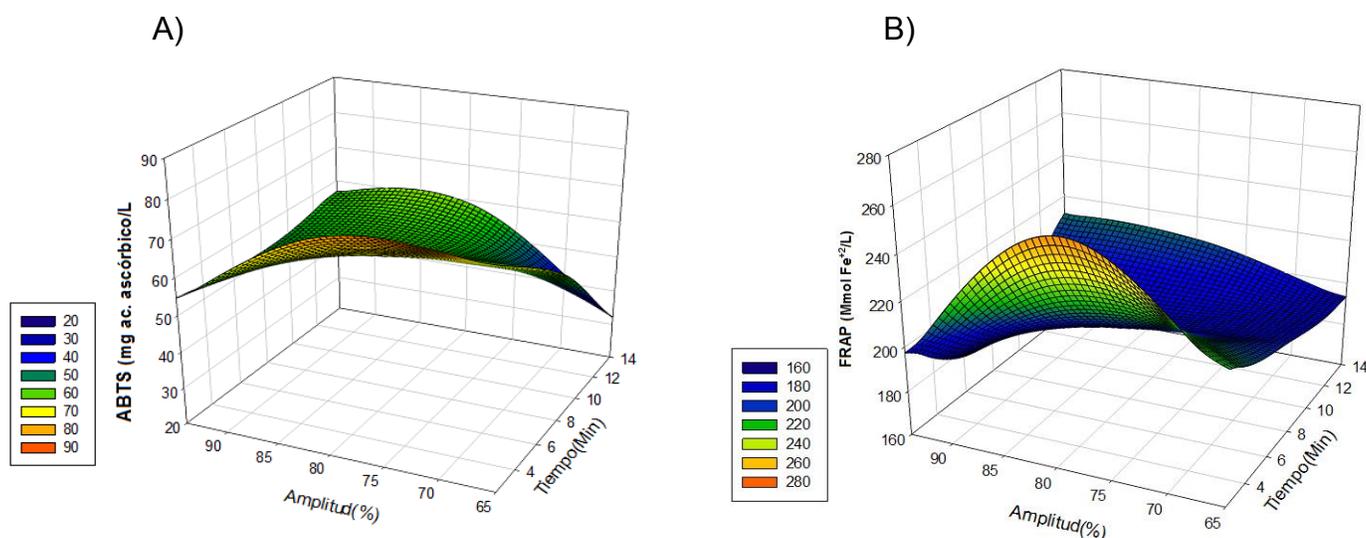
## Capítulo 6 Resultados y Discusión

disminución en jugo de tuna tratado por ultrasonido, sin embargo, a mayor amplitud (80 %) y mayor tiempo (25 min) no se observaron variaciones con respecto al jugo fresco.

**Cuadro 6.7** Coeficientes de regresión del modelo y significancia para las variables de respuesta de actividad antioxidante del jugo de arándano termosonicado

Coeficiente	Fenoles	Antocianinas	ABTS	FRAP
$a_0$	142.475	15.6120	68.721	149.110
$a_1$	45.841 <sup>c</sup>	0.6519 <sup>c</sup>	-5.760 <sup>b</sup>	-12.656 <sup>c</sup>
$a_2$	3.018	-0.2982	-1.200	-6.543
$a_{12}$	0.430	0.7775	0.97	5.025
$a_{11}$	3.996 <sup>d</sup>	3.2239	5.276 <sup>b</sup>	17.303 <sup>b</sup>
$a_{22}$	-0.0004	0.4742	1.560	-4.099
<b>R<sup>2</sup> Adj</b>	<b>0.90</b>	0.80	<b>0.90</b>	<b>0.90</b>

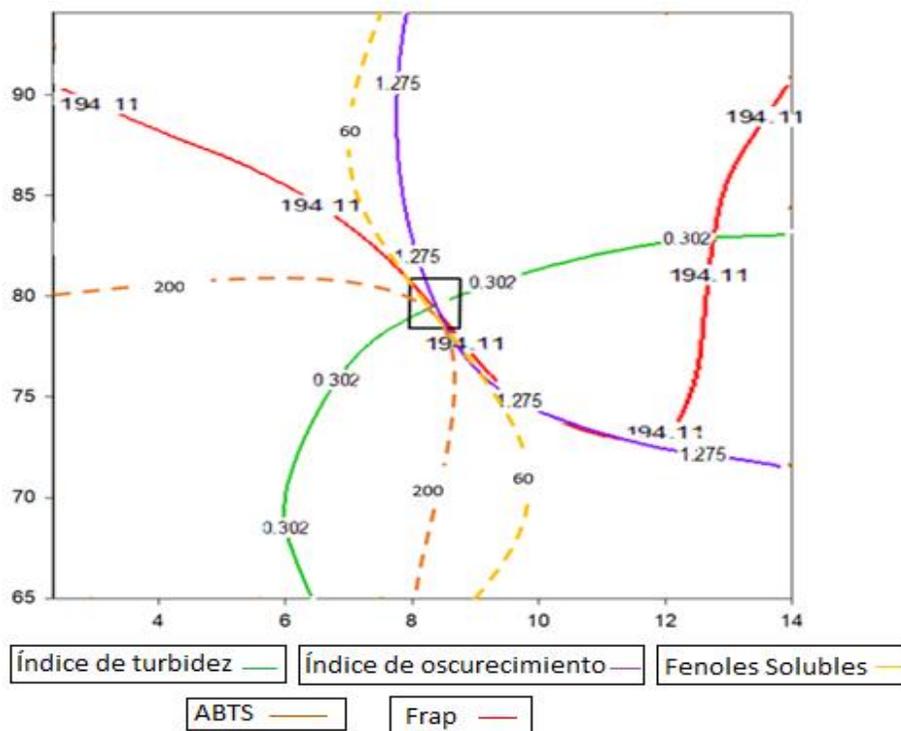
Niveles de significancia: *a*,  $p < 0.0001$ ; *b*,  $p < 0.001$ ; *c*,  $p < 0.01$  y *d*,  $p < 0.05$ . En los coeficientes (a) el subíndice 1= Tiempo; 2= Amplitud



**Figura 6.3** Efecto de la termosonicación sobre la actividad antioxidante por el método ABTS (mg ac. ascórbico/L) (A) y FRAP (Mmol Fe+2/L) (B).

### 6.6 Condiciones óptimas de termosonicación

La optimización fue obtenida por los valores predichos de acuerdo al modelo matemático y para apreciarlo se realizó la superposición de figuras de contorno. Las variables de respuesta que se ajustaron al modelo matemático fueron: el índice de oscurecimiento, el índice de turbidez, el contenido de fenoles solubles totales y actividad antioxidante por el método FRAP y ABTS ya que presentaron una  $R^2 \geq 0.90$ . Como se puede observar en la Figura 6.4, las condiciones óptimas de termosonicación para el jugo de arándano se encuentran a  $80 \pm 1$  % de amplitud y  $8 \pm 1$  min, teniendo como valores predichos por el modelo para cada una de las variables analizadas; 0.302 para el índice de turbidez, 1.275 para el índice de oscurecimiento, 142.475 (mg EAG/L de muestra) para compuestos fenólicos solubles totales, 56.721 (mg ac. ascórbico/L) para ABTS y 194.11 (Mmol Fe<sup>+2</sup>/L) para FRAP



**Figura 6.4** Diagrama de superposición de las variables de respuesta (índice de oscurecimiento, la índice turbidez, actividad antioxidante por el método FRAP y ABTS y el contenido de fenoles solubles totales) para la obtención de las condiciones óptimas de termosonicación

Una vez determinado el tratamiento óptimo se comprobó su reproducibilidad mediante pruebas experimentales y se comparó con los valores predichos, respecto a los análisis de índice de oscurecimiento, el índice turbidez, actividad antioxidante por el método FRAP y ABTS y el contenido de fenoles solubles totales. Además se incluyó una comparación con un jugo tratado por pasteurización térmica y un jugo fresco (control).

### 6.7 Reproducibilidad del estudio

En el Cuadro 6.8 se muestran los valores predichos por el modelo de Superficie de Respuesta (RSM) y los obtenidos mediante el análisis experimental, y se puede observar que los valores de índice de turbidez, contenido de fenoles solubles totales y actividad antioxidante por el método FRAP y ABTS no mostraron diferencias significativas con respecto a los valores predichos ( $p > 0.05$ ), por lo que la condición óptima de proceso de termosonicación es reproducible sobre estas determinaciones. En cuanto a los valores del índice de oscurecimiento se encontraron diferencias significativas entre el valor predicho y el valor experimental lo que infiere que el oscurecimiento en el jugo de arándano puede variar en cada ocasión que sea repetido el procedimiento.

**Cuadro 6.8** Comparación de valores predichos por el modelo matemático y el valor de prueba experimental

<b>Análisis</b>	<b>Valor predicho</b>	<b>Valor experimental</b>
<b>Índice de Turbidez</b>	0.302	0.457
<b>Índice de Oscurecimiento (a 420 nm)</b>	1.127	0.830 *
<b>Compuestos Fenólicos (mg EAG/L de muestra)</b>	142.475	138.39
<b>ABTS (mg ac. ascórbico/L)</b>	68.721	79.859
<b>FRAP (Mmol Fe+2/L)</b>	149.110	148.880

Muestras marcadas con \* indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre tratamientos de acuerdo a la prueba T de Student para una muestra

### **6.8 Comparación del jugo tratado por termosonicación con el jugo pasteurizado y el jugo fresco**

En el Cuadro 6.9 se encuentra la comparación de resultados entre el jugo de arándano azul termosonicado con las condiciones óptimas, el jugo pasteurizado y el jugo control. El mayor índice de turbidez lo obtuvo el jugo optimizado (0.625), esto se puede atribuir a que el ultrasonido fragmenta las partículas de pulpa a partículas más pequeñas haciendo en consecuencia más estable su suspensión en la matriz de jugo (Zinoviadou y cols., 2015). En estudios realizados por Atalar y cols., (2019), establecieron que a medida que se genera un aumento en el tiempo de tratamiento, la turbidez de los néctares comenzó a aumentar, debido a la ruptura de partículas presentes en los néctares de frutas, a su vez Bhat & Ming, (2017) evaluando la turbidez en jugo de fresa reportaron que la termosonicación genera un aumento en la turbidez en tiempos de exposición prolongados.

En cuanto al índice de oscurecimiento, no se encontraron diferencias significativas entre el jugo optimizado y el pasteurizado. La temperatura aplicada en los procesos de termosonicación y pasteurización podrían explicar la diferencia significativa que se observó con el índice de oscurecimiento del jugo control. Santhirasegaram y cols., (2013), aplicando ultrasonido a jugo de mango informaron que se genera un aumento en el oscurecimiento del jugo después de los tratamientos con ultrasonido, esto debido al estrés mecánico generado por el colapso cavitacional de las burbujas, lo cual conlleva a generar la ruptura de grandes macromoléculas y partículas en el jugo. Rivas y cols., (2006) informó resultados con el mismo comportamiento en jugo de manzana y zanahoria tratados por pasteurización térmica, teniendo niveles más elevados de oscurecimiento respecto a la muestra control.

En el contenido de fenoles solubles totales, los tres jugos tuvieron diferencias significativas entre las muestras, siendo el jugo pasteurizado el que presentó el mayor contenido de fenoles ( $p < 0.05$ ), esto puede deberse a diversos factores, como la temperatura, la cual ejerce un efecto significativo sobre este tipo de compuestos ayudando a su liberación en comparación con el jugo optimizado por ultrasonido, la cual se mantiene a temperaturas bajas cercanas a los  $50 \pm$

## Capítulo 6 Resultados y Discusión

5°C.(Rawson y cols., 2011) Anteriormente se ha reportado que el tratamiento de ultrasonido favorece el contenido de compuestos fenólicos al romper los enlaces que estos forman con algunos polisacáridos (Soria & Villamiel 2010; Bhat y cols., 2011; Zafra-rojas y cols., 2013). Aunado a esto, la producción de radicales libres como los grupos hidroxilo pueden favorecer el contenido de estos compuestos al incluir este grupo en el anillo C de las flavonas, y su conservación puede estar asociada al contenido de ácido ascórbico que actúa como protector de estos compuestos (Ashokkumar y cols., 2014). Sin embargo, los valores entre ambas muestras oscilan en valores cercanos 141.73 mg EAG/L en el jugo optimizado y 145.52 mg EAG/L para la muestra pasteurizada, esto resulta un indicativo de que el tratamiento de termosonicación es altamente competitivo con el proceso de pasteurización para la liberación de este tipo de compuestos.

En el cuadro 6.9 se muestra la actividad antioxidante por ABTS del jugo termosonicado, pasteurizado y jugo fresco. En este se puede observar que, con respecto al jugo fresco, el jugo tratado por termosonicación mostró mayor diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), al igual que la muestra pasteurizada, este incremento se debe principalmente al aumento de temperatura generado por la cavitación y el proceso de pasteurización (Paniagua-Martínez y cols., 2018). Efecto similar fue encontrado por Monteiro y cols., (2017), en un estudio realizado a una bebida a base de cacao, tratada con sonicación y contrastada con una bebida tratada bajo condiciones de pasteurización, visualizaron que se genera un aumento de la capacidad antioxidante en la bebida tratada con ambos métodos de procesamiento, este incremento lo atribuyen la cavitación acústica resultante del procesamiento sonicación y al incremento elevado de temperatura en el proceso de pasteurización, el cual tiene algún efecto en la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos (Bhat y cols., 2011). Respecto a la actividad antioxidante, se puede observar que existe una mayor actividad antioxidante por FRAP en la muestra optimizada, este método evalúa la actividad antioxidante de una muestra de acuerdo a su capacidad para reducir el hierro férrico ( $Fe^{+3}$ ) presente en un complejo con la 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) hasta la forma ferrosa ( $Fe^{+2}$ ), lo cual puede indicar una mayor presencia de hierro férrico en la muestra optimizada, este efecto

## Capítulo 6 Resultados y Discusión

puede deberse principalmente a la formación de radicales libres a causa de la cavitación ultrasónica. Para lo cual Patras y cols., (2009) en un estudio realizado en jugo de naranja, determinaron que la pasteurización genera una disminución significativa en la capacidad antioxidante.

**Cuadro 6.9** Comparación del jugo termosonicado con el jugo pasteurizado y jugo fresco

Análisis	Control	Optimizado	Pasteurizado
Índice de Turbidez	0.3591±0.04 <sup>c</sup>	0.6255±0.03 <sup>a</sup>	0.41988±0.04 <sup>b</sup>
Índice de Oscurecimiento (a 420 nm)	0.3286±0.13 <sup>b</sup>	0.49222±0.22 <sup>a</sup>	0.49855±0.08 <sup>a</sup>
Compuestos Fenólicos (mg EAG/L muestra)	148.5575±12.5 <sup>c</sup>	139.5368±7.58 <sup>b</sup>	165.6130±15.8 <sup>a</sup>
ABTS (mg ac. ascórbico/L muestra)	58.7246±3.78 <sup>b</sup>	75.46377±6.37 <sup>a</sup>	76.84058±4.18 <sup>a</sup>
FRAP (Mmol Fe+2/L muestra)	69.88406±2.87 <sup>b</sup>	101.3333±4.75 <sup>a</sup>	68.36232±2.63 <sup>b</sup>

Se efectuó una prueba de Tukey  $\alpha = 0.05$  entre los valores de las muestras control, optimizadas y pasteurizada donde letras diferentes indican que existen diferencias significativas entre las muestras.

### **6.9 Perfil de compuestos fenólicos de muestras control, optimizada y pasteurizada de jugo de arándano azul liofilizado**

Se identificaron 33 compuestos fenólicos, de los cuales, 16 son ácidos fenólicos y 17 flavonoides. En el Cuadró 6.10 se observan los compuestos cuantificados de diversos ácidos fenólicos tanto en la muestra control como en las muestras optimizadas y pasteurizadas, en cuanto a ácidos hidroxibenzoicos podemos observar que la muestra control y optimizada son las que contienen una mayor concentración de estos compuestos en comparación con la muestra pasteurizada, resaltando la presencia del ácido 4-hidroxibenzoico, del cual se tienen reportes de su potencial antimicrobiano y antifúngica, además de tener potencial antioxidante (Chandrasekari y cols., 2016). Grace y cols., (2018) destacó la presencia del ácido 4- hidroxibenzoico en diversos cultivares de arándano azul. Respecto a los ácidos hidroxicinámicos y taninos hidrolizables es importante recalcar la presencia del ácido quínico (9173.67 µg), el cual se obtiene a partir de la síntesis del ácido clorogénico(Jia y cols., 2020), éste se observó en la muestra pasteurizada, siendo que no hubo presencia de éste en las muestras control y optimizado, Wibowo y cols., (2019) sometió jugo de manzana a procesos de pasteurización, evidenciando una liberación del ácido quínico presente en el jugo a causa de los incrementos de temperatura a los cuales fue sometido. El ácido quínico está de igual forma implicado en la acidez percibida del café, además de ser un constituyente de los taninos de *Caesalpinia spinosa* (El-Askary y cols., 2020). Además se ha comprobado que el ácido quínico en combinación con quercetina ejerce un efecto inhibitorio en la degradación de tejido de hígado, riñón y páncreas en ratas con diabetes (Arya y cols., 2014). Otro de los ácidos hidroxicinámicos a destacar es el ácido clorogénico en la muestra optimizada, el cual es un tipo de polihidroxipolifenol (ácido cafeoilquínico) de la familia del ácido hidroxicinámico, que es omnipresente en los alimentos de origen vegetal (manzana, madreselva) y bebidas (café, té) (Algamdi, y cols., 2011), además de tener efecto protector contra diversos trastornos metabólicos, se ha probado que el ácido clorogénico alivia la isquemia hepática y la reperfusión (Kasai y cols., 2000; Chen y cols., 2019). Asimismo, Grace y cols., (2018) enfatizaron la presencia de este compuesto en el fruto de arándano azul

## Capítulo 6 Resultados y Discusión

como uno de los componentes principales. En la cuantificación de flavanoles destaca la presencia de rutina (Cuadro 6.10) con una concentración de 357.43  $\mu\text{g}$  en la muestra optimizada, la rutina, se tienen reportes que actúa regulando el sistema inmunitario, es capaz de reducir las alergias, así como también, ofrecer resistencia contra infecciones bacterianas y víricas (Luo y cols., 2020). Sus propiedades antioxidantes actúan inhibiendo la angiogénesis (VEGF, factor de crecimiento endotelial vascular), es decir, que impide que se formen nuevos vasos sanguíneos a partir de otros ya existentes, al tener la función antioxidante, en el organismo humano protege contra los radicales libres, retrasando el envejecimiento prematuro y las enfermedades asociadas como la demencia (Sharma y cols., 2020). Los beneficios de la rutina están relacionados con la trombosis. Al actuar como inhibidor de la agregación plaquetaria evita que la sangre se coagule, mejorando la circulación de la sangre y protegiendo contra accidentes vasculares. Es un gran aliado contra las patologías vasculares ya que, hace que la sangre sea menos espesa (Luo y cols., 2020; Paczkowska y cols., 2020). Cabe mencionar que Cervantes y cols., (2020) recalzó la presencia de rutina en frutos de arándano azul en comparación con fresa y frambuesa los cuales tuvieron una menor concentración de este compuesto. Por otro lado, en la cuantificación de flavonoles, en las muestras optimizada y pasteurizada se observa la presencia del kaempferol 3-O-glucósido, el cual Grace y cols., (2018) logró identificar en diversos cultivares de arándano azul. Sin embargo Cervantes y cols., (2020) determinó que el Kaempferol 3-O-Glc se encuentra en concentraciones muy bajas en el arándano, siendo así que Yang y cols., (2019) estableció que un aumento en la temperatura de procesamiento genera una mejor liberación de compuestos presentes en jugos.

**Cuadro 6.10** Concentración de ácidos fenólicos y flavonoides en jugo de arándano azul control, optimizado y pasteurizado

Compuesto	RT (Min)	Tiempo de Transición	Fórmula	Control	Optimizado	Pasteurizado
<b>Ácidos hidroxibenzoicos µg/g</b>						
Ácido 2,5 dihidroxibenzoico	5.1	153.15	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	ND	0.32±0.07 <sup>b</sup>	0.85±0.06 <sup>a</sup>
Ácido 4-Hidroxibenzoico	5.46	137.04	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	5.55±1.42 <sup>a</sup>	1.01±0.01 <sup>b</sup>	ND
Ácido 2 hidroxibenzoico	8.73	137.04	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	0.71±0.25 <sup>a</sup>	0.34±0.09 <sup>b</sup>	ND
Ácido Protocatequínico	4.3	153.15	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	ND	0.16±0.28 <sup>a</sup>	ND
2,4,6-trihidroxibenzaldehído	7.37	153.15	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	0.43±0.14 <sup>b</sup>	0.61±0.06 <sup>b</sup>	1.07±0.27 <sup>a</sup>
<b>Total</b>				<b>6.69 µg/g</b>	<b>2.45 µg/g</b>	<b>1.92 µg/g</b>
<b>Ácidos hidroxicinámicos y taninos hidrolizables µg/g</b>						
Ácido Cumárico	7.49	163.24	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	2.92±2.26 <sup>a</sup>	0.04±0.01 <sup>b</sup>	ND
Ácido Ferúlico	7.97	193.24	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	5.57±1.38 <sup>a</sup>	1.17±0.01 <sup>b</sup>	ND
Ácido cafeico	6.22	179.19	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	1.91±0.12 <sup>a</sup>	0.26±0.46 <sup>b</sup>	ND

Capítulo 6 Resultados y Discusión

Ácido Sinápico	7.91	223.24		4.55±1.98 <sup>a</sup>	0.20±0.03 <sup>b</sup>	ND
Ácido quínico	1.5	191.2	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	ND	ND	9173.67±0.00 <sup>a</sup>
Ácido gálico	3.06	169.15	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	0.03±0.06 <sup>a</sup>	ND	ND
Ácido clorogénico	5.42	353.34	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	ND	266.45±0.12 <sup>a</sup>	ND
Ácido Benzoico	8.81	121.1	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	6.29±0.78 <sup>b</sup>	ND	9.85±0.51 <sup>a</sup>
Ácido t-cinámico	10.86	147.17	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	1.00±0.36 <sup>a</sup>	0.07±0.0 <sup>b</sup>	0.89±0.17
Ácido siríngico	6.43	197.21	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	0.90±0.24 <sup>a</sup>	0.83±0.55 <sup>a</sup>	ND
Ácido valínico	6.11	167.18	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	2.32±1.26 <sup>a</sup>	0.63±0.37 <sup>b</sup>	ND
<b>Total</b>				<b>25.49 µg/g</b>	<b>269.65 µg/g</b>	<b>9184.40 µg/g</b>
<b>Total de ácidos fenólicos cuantificados</b>				<b>32.12 µg/g</b>	<b>272.1 µg/g</b>	<b>9185.92 µg/g</b>
<b>Flavanoles µg/g</b>						
Rutina	7.56	609.28	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	357.4±85.31 <sup>a</sup>	65.17±16.54 <sup>b</sup>	68.00±11.59 <sup>b</sup>
Catequina	5.55	289.164	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	2.67±0.95 <sup>a</sup>	2.67±0.95 <sup>a</sup>	2.67±0.95 <sup>a</sup>
(epi)-Catequina	6.49	289.164	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	45.74±11.15 <sup>a</sup>	0.42±0.03 <sup>b</sup>	0.51±0.06 <sup>b</sup>
<b>Total</b>				<b>405.83 µg/g</b>	<b>68.33 µg/g</b>	<b>71.12 µg/g</b>

Flavan 3- ols µg/g						
Procianidina B1	4.99	577.44	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	ND	3.89±1.58 <sup>b</sup>	7.13±2.22 <sup>a</sup>
Procianidina B2	6.06	577.44	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	39.18±7.91 <sup>a</sup>	ND	ND
Galocatequina	4.16	305.3	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	7.04±2.50 <sup>a</sup>	ND	ND
<b>Total</b>				<b>46.23 µg/g</b>	<b>3.89 µg/g</b>	<b>7.13 µg/g</b>
Flavonoles y Xantonas µg/g						
Quercetina glucuronido	7.80	477.26	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	ND	ND	ND
Kaempferol 3-O-Glc	8.41	447.3	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	3.90±0.89 <sup>b</sup>	32.05±8.08 <sup>a</sup>	34.83±5.23 <sup>a</sup>
Miricetina	9.29	317.21	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>8</sub>	27.21 <sup>a</sup> ±11.33	ND	ND
Quercetina	10.42	301.2	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	ND	0.37±0.20 <sup>b</sup>	1.35±1.09 <sup>a</sup>
Kaempferol	11.57	285.22	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	4.15±0.67	ND	ND
Mangiferina	6.16	421.171	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>11</sub>	0.04±0.00 <sup>a</sup>	0.01±0.00 <sup>a</sup>	ND
<b>Total</b>				<b>35.31 µg/g</b>	<b>32.43 µg/g</b>	<b>36.18 µg/g</b>
Flavonas µg/g						
Luteolina	10.30	285.21	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	1.30±0.78 <sup>a</sup>	ND	ND
Apigenina	11.34	269.27	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	5.90±2.67 <sup>a</sup>	ND	ND

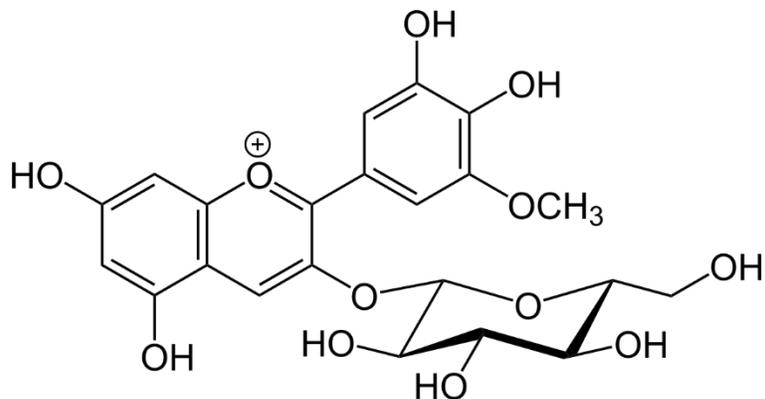
Capítulo 6 Resultados y Discusión

	<b>Total</b>			<b>7.20 µg/g</b>	<b>0.00 µg/g</b>	<b>0.00 µg/g</b>
<b>Flavanones µg/g</b>						
Naringenina	11.27	271.28	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	24.39±6.37	0.15 ±0.00 <sup>b</sup>	ND
Neohesperidina	8.72	609.4	C <sub>28</sub> H <sub>36</sub> O <sub>15</sub>	4.75±1.38 <sup>a</sup>	0.44±0.3 <sup>b</sup>	0.19±0.03 <sup>b</sup>
	<b>Total</b>			<b>29.14 µg/g</b>	<b>0.59 µg/g</b>	<b>0.19 µg/g</b>
<b>Flavanonol µg/g</b>						
Taxifolina	8.14	303.03	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	10.39±2.58 <sup>a</sup>	0.06±0.00 <sup>b</sup>	0.04±0.01 <sup>b</sup>
	<b>Total</b>			<b>10.39</b>	<b>0.06</b>	<b>0.04</b>
<b>Total de flavonoides cuantificados</b>				<b>534.1 µg/g</b>	<b>105.3 µg/g</b>	<b>114.66 µg/g</b>

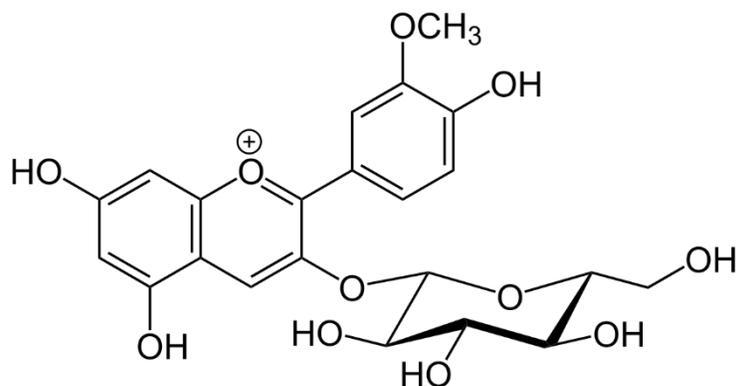
Se efectuó una prueba de Tukey  $\alpha = 0.05$  entre los valores de las muestras control, optimizadas y pasteurizada donde letras diferentes indican que existen diferencias significativas entre las muestras y ND para los compuestos no identificados.

## Capítulo 6 Resultados y Discusión

Finalmente se destaca la presencia de dos antocianinas de interés (Figura 6.4 y 6.5), mismas que no fueron cuantificadas debido a que no se contó con los estándares correspondientes. La Petunidina 3-o-glucosido de la que se tienen reportes como metabolito y antioxidante Es un catión antocianina, un beta-D-glucósido y un éter aromático. Se deriva de una petunidina, es una antocianina que se ha encontrado en uvas rojas y vinos tintos con propiedades antiproliferativas, reduce el crecimiento celular de glioblastoma de una manera dependiente del tiempo y la concentración al aumentar la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y los niveles de proteína Bax y reducir las actividades de Bcl-2 y caspasa-3 (Zimman, 2002; Wang y cols., 2009). La petunidina 3-O-glucósido también reduce la absorción de glucosa, la producción de ácido láctico. La Peonidina 3-o-glucosido tiene un papel como antioxidante y metabolito vegetal. Es un catión antocianina, un beta-D-glucósido y un derivado de monosacárido. Se deriva de una peonidina, además de ser la encargada de propiciar coloraciones rojas oscuras a violetas en diversos frutos como uvas, moras y algunas bayas. (Liao y cols., 2018; Ho y cols., 2010; Do & Cormier, 1991). Cervantes y cols., (2020), realizaron una comparación entre las antocianinas presentes en cultivares de fresa, frambuesa y arándano azul; resaltando la presencia de peonidina 3-O-glucosido y malvidina en las muestras de arándano azul. Estas antocianinas fueron identificadas por diversos autores en el fruto de arándano azul (Grace y cols., 2018; Sun y cols., 2020; Yuan y cols., 2020).



**Figura 6.5** Petunidina 3-O-Glucosido



**Figura 6.6** Peonidina 3-O-Glucosido

### 6.10 Resultados de prueba de citotoxicidad

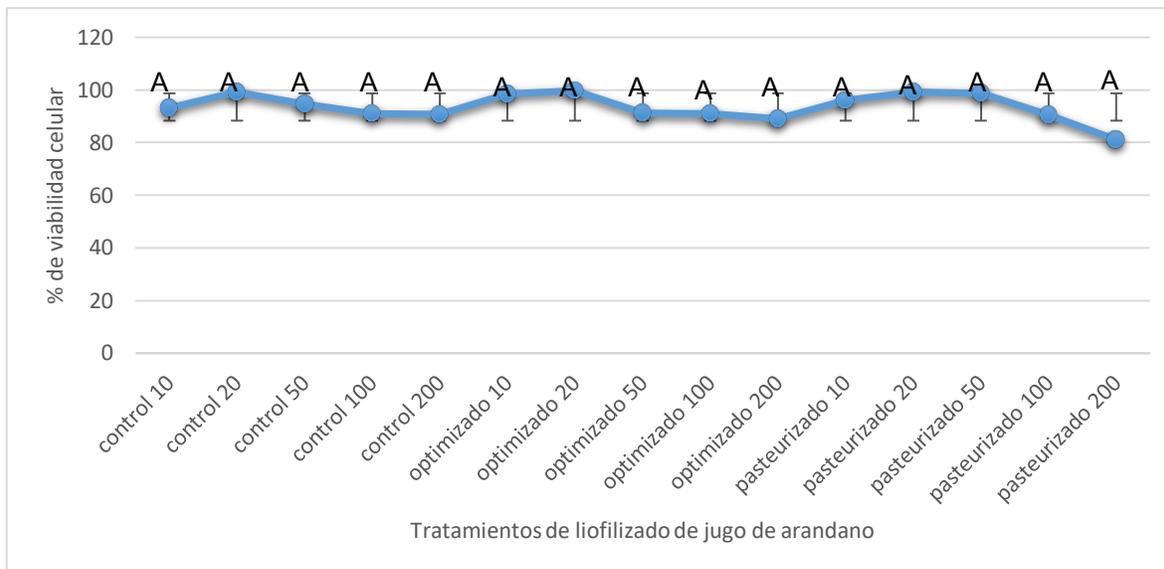
Los valores del porcentaje de viabilidad celular (Cuadro 6.11), demuestran que el ensayo a una concentración de 20 ng/ $\mu$ L tuvo la mayor viabilidad celular con un porcentaje de 99.05%.

**Cuadro 6.11** Resultados de porcentaje de viabilidad celular por prueba MTT

<b>Tratamiento</b>	<b>% de viabilidad</b>
<b>Control normal</b>	
<b>Control DNS</b>	
<b>Control 10</b>	93.020
<b>Control 20</b>	99.222
<b>Control 50</b>	94.648
<b>Control 100</b>	87.690
<b>Control 200</b>	97.390
<b>Optimizado 10</b>	98.400
<b>Optimizado 20</b>	98.771
<b>Optimizado 0</b>	83.974
<b>Optimizado 100</b>	83.698
<b>Optimizado 200</b>	93.347
<b>Pasteurizado 10</b>	95.921
<b>Pasteurizado 20</b>	99.157
<b>Pasteurizado 50</b>	98.648
<b>Pasteurizado 100</b>	90.482
<b>Pasteurizado 200</b>	80.964

Teniendo la muestra control a las distintas concentraciones (10, 20, 50, 100 y 200 ng/ml), la muestra optimizada a las distintas concentraciones (10, 20, 50, 100 y 200 ng/ml) y la muestra pasteurizada a las distintas concentraciones (10, 20, 50, 100 y 200 ng/ml).

## Capítulo 6 Resultados y Discusión



**Figura 6.7** Resultados del porcentaje de viabilidad celular en el modelo celular HT-29 para los diferentes tratamientos. Letras iguales indican que no existe diferencia significativa estadísticamente ( $p < 0.05$ ).

En la Figura 6.7 y la Cuadro 6.11, se observa que no existen diferencias entre los resultados del porcentaje de viabilidad celular en el modelo celular HT-29 para los diferentes tratamientos, por lo cual se seleccionó el tratamiento que presentó mayor viabilidad celular para las muestras Control, Optimizado y Pasteurizado, siendo los tratamiento de 20 ng/ $\mu$ L. En las figuras 6.8, 6.9, 6.10 y 6.11 de los tratamientos control, optimizado y pasteurizado respectivamente se puede observar que no hubo formación de precipitados, es decir, se tuvo una viabilidad celular óptima en cada uno de los tratamientos evaluados para su posterior extracción de proteína celular, para de esta forma evaluar el efecto antiinflamatorio.



Células sin tratamiento

Control normal

Control DMSO

**Figura 6.8** Cultivo después de 72 horas de incubación (A), antes de los tratamientos. Control normal (B), células en cultivo sin tratamiento durante el experimento. Control DMSO, células con DMSO 0.04% y sin tratamientos con liofilizados (C).



CN10 10 ng/μL

CN20 20 ng/μL

CN50 50 ng/μL

CN100 100 ng/μL

CN200 200 ng/μL

**Figura 6.9** Tratamientos de muestras control a distintas concentraciones de liofilizados



OP10 10 ng/μL

OP20 10 ng/μL

OP50 50 ng/μL

OP100 100 ng/μL

OP200 200 ng/μL

**Figura 6.10** Tratamientos de muestras optimizadas a distintas concentraciones de liofilizados

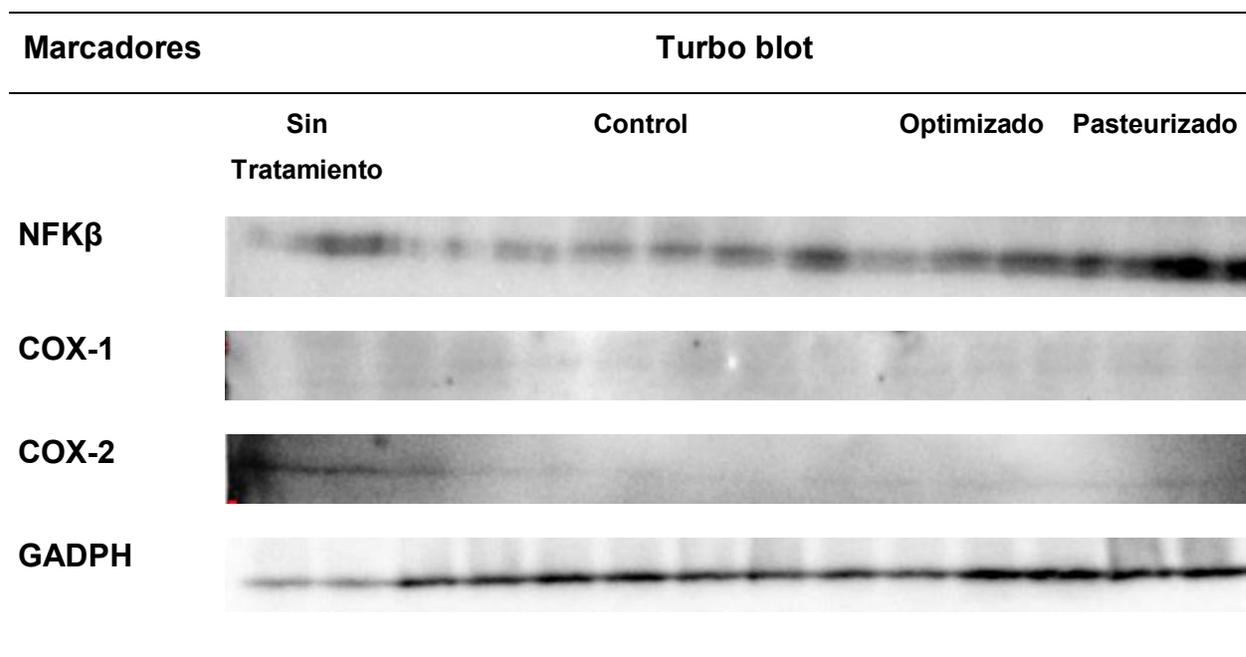


PAS10 10 ng/μL PAS20 20 ng/μL PAS50 50 ng/μL PAS100 100 ng/μL PAS200 200 ng/μL

**Figura 6.11** Tratamientos de muestras pasteurizadas a distintas concentraciones de liofilizados

El proceso de inflamación se encuentra inmerso en muchas enfermedades crónicas, al igual que en diversos tipos de cánceres (Celik y cols., 2019). De acuerdo a los resultados obtenidos en el efecto de los liofilizados de jugo de arándano azul sobre los marcadores de inflamación (Figura 6.12), se puede observar una mayor influencia del tratamiento optimizado con respecto al tratamiento control, siendo éste el que logró reprimir en su mayoría la expresión de los marcadores de inflamación. Este efecto antiinflamatorio se atribuye principalmente a los compuestos bioactivos (flavonoides y compuestos fenólicos) presentes en el jugo optimizado, ya que estos compuestos actúan como antioxidantes, a causa de una alta producción de radicales libres puede generar que se activen diferentes factores de transcripción como el factor nuclear  $\kappa\beta$  (NF- $\kappa\beta$ ), el cual se encarga de desencadenar cascadas de señalización que provocan la liberación de citosinas e inflamación (García-Bailo y cols., 2011; Guoy cols. 2014). Diversos autores han reportado que los compuestos fenólicos son capaces de inhibir la expresión de dichos marcadores moleculares (Ballesteros-vivas y cols., 2019; Rodríguez y cols., 2017)

### 6.12 Determinación de marcadores de inflamación *in vitro* con células HT-29



**Figura 6.12** Análisis densitómetro de los marcadores de inflamación obtenidos a partir de la inducción de las células HT-29 con los diferentes tratamientos utilizando el jugo de arándano azul optimizado, pasteurizado y control en comparación con el 100% al control con DMSO

El mecanismo mediante el cual estos compuestos bioactivos pueden generar una inhibición o una disminución en la expresión de los marcadores moleculares es debido a diversos factores, principalmente interfieren en la cascada de señalización inflamatoria intracelular en cualquiera de las 3 etapas de cáncer (Iniciación, propagación y metástasis) (PAN y cols., 2009). Otro de los mecanismos, es la inducción de los sistemas de defensa celular incluyendo diversas vías de señales antiinflamatorias (Incalci y cols., 2014; Mani y cols., 2020).

Por su parte, mientras que COX-1 se expresa constitutivamente en muchos tejidos, y permanece constante en la mayoría de las condiciones fisiológicas o patológicas, COX-2 no se detecta en la mayoría de los tejidos normales pero es altamente inducible en respuesta a las citosinas pro inflamatorias, hormonas y promotores tumorales (Limami y cols., 2011). Ante esto, la expresión de COX-1 en las muestras optimizadas ofrece un panorama más amplio sobre el efecto de los compuestos

## Capítulo 6 Resultados y Discusión

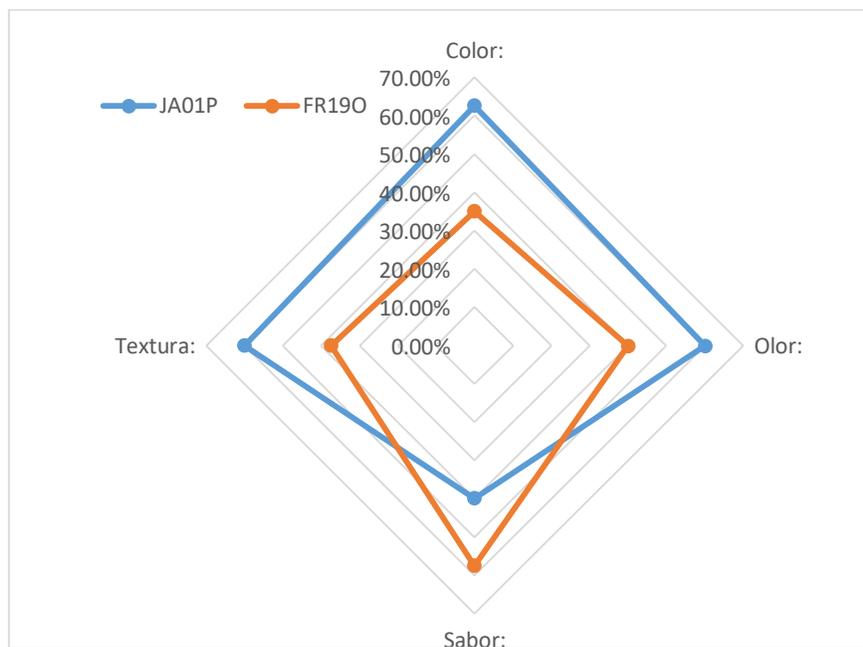
bioactivos presentes en el mismo, ya que COX-1 tiene como función principal la regulación de la proliferación de células normales o neoclásicamente formadas, esto puede funcionar como un indicador de inflamación a nivel celular (Dubrin, 1998). Gracey cols., (2019) en bioensayos celulares *in vitro* para evaluar las actividades antioxidantes y antiinflamatorias, indicaron que el grupo de las antocianinas son los principales responsables de la bioactividad. Los ensayos de antioxidantes basados en células *in vitro*, indicaron que el arándano a una concentración de 50 µg/ml, fue capaz de reducir la producción de ROS y NO e inhibir la transcripción de las citosinas inflamatorias IL-6β, COX2, iNOS e IL-6, resultados que se pueden contrastar con los obtenidos en este estudio donde se puede observar una inhibición de COX-2 en las muestras optimizadas utilizando una concentración de 20 ng/ml.

### 6.13 Análisis sensorial

Realizar una prueba de aceptación de un producto es de importancia cuando se está evaluando una nueva tecnología. En el cuadro 6.12 se muestran los resultados del análisis sensorial realizado a 40 catadores no entrenados. Donde se puede observar que en cuestión de color, olor y textura existe una tendencia marcada por la muestra de jugo de arándano tratado por pasteurización, sin embargo, más de 50% de los encuestados coincide en que la muestra optimizada tratada con termosonicación fue la que tuvo un mejor sabor, cabe mencionar que a ninguna de las dos muestras se les añadieron conservantes ni edulcorantes, esto nos ofrece un parámetro de aceptación aceptable para el jugo de arándano tratado con termosonicación, ya que si bien en aspectos generales la muestra pasteurizada tiene una coloración más agradable a la vista y una mejor sensación en paladar, fue la muestra optimizada la que tuvo una mejor sensación de sabor en boca. Esta tendencia de los catadores puede observarse de una mejor manera en la figura 6.13 donde la preferencia en percepción de sabor tiende a favor de la muestra optimizada con el 57.50% de preferencia de los catadores evaluados, teniendo de igual forma una buena aceptación en cuestión de olor con el 40%, color con un 35% y textura 37.50%.

**Cuadro 6.12** Resultados del análisis sensorial del jugo de arándano pasteurizado y termosonicado

Parámetro	Pasteurizado	Pasteurizado %	Optimizado	Optimizado %
<b>Color:</b>	25	62.50%	14	35%
<b>Olor:</b>	24	60%	16	40%
<b>Sabor:</b>	16	40%	23	57.50%
<b>Textura:</b>	24	60%	15	37.50%



**Figura 6.13** Gráfico radial de preferencias sensoriales de jugo de arándano azul JA01P (muestra Pasteurizada) y FR19O (muestra termosonicada)



### Capítulo 7 Conclusiones

El tratamiento de ultrasonido con la aplicación de temperaturas bajas (<50 °C), demostró ser una tecnología adecuada para el procesamiento del jugo de arándano, logrando recuentos microbianos a niveles aceptables establecidos por la norma mexicana para jugos de frutas.

Además, el uso de esta tecnología disminuyó la actividad residual de la pectinmetilesterasa (0.49 %) y de la polifenoloxidasasa (8.39 %), ambas enzimas que asociadas al deterioro de la calidad de jugos de frutas, lo cual supone el mejoramiento de la calidad en términos de sabor, color y aspecto, parámetros que influyen en la aceptación del producto por parte del consumidor.

Por otro lado, la metodología de superficie de respuesta fue un método adecuado para definir las condiciones óptimas de termosonicación para procesar el jugo de arándano, brindando un producto de calidad e inocuo.

La evaluación de las concentraciones de ácidos fenólicos y flavonoides tanto en la muestra control como en la muestra optimizada y pasteurizada. La mayor presencia de diversos flavonoides en la muestra control, establece que estos compuestos no son termorresistentes, es decir, que al incrementar el umbral de temperatura puede ocurrir una degradación de estos compuestos. En el jugo optimizado se destacó la presencia de las antocianinas petunidina 3-o-glucosido y peonidina 3-o-glucosido las cuales ejercen efecto antioxidante además de propiciar la coloración rojo-violeta característica de jugos de este fruto.

En cuanto al potencial antiinflamatorio del jugo termosonicado los resultados de la prueba de citotoxicidad por MTT muestran que no hubo diferencias significativas entre las distintas concentraciones de liofilizados de jugo de arándano administrados a las células de HT-29, por lo cual se tomaron las concentraciones en las que se tuvo la mayor viabilidad celular, siendo 20 ng/ml. Así mismo los resultados obtenidos en el efecto de los liofilizados de jugo de arándano azul sobre los marcadores de inflamación, se demostró que el jugo optimizado es aquel que

## Capítulo 7 Conclusiones

tiene mayor actividad antiinflamatoria, logrando reprimir en mayor proporción los genes proinflamatorios analizados.

Finalmente, en el análisis sensorial, el jugo de arándano pasteurizado en cuestión de color, olor y textura obtuvo una mejor aceptación, sin embargo, más de 50% de los encuestados coincide en que la muestra optimizada tratada con termosonicación es la que tiene un mejor sabor.



**Capítulo 8 Referencias**

- A.P. Porras-Loaiza, A. L.-M. (2009). *Importancia de los grupos fenólicos en los alimentos*. Cholula, Puebla.
- Abid, M., Jabbar, S., Hu, B., Muhammad, M., Wu, T., Lei, S., ... Zeng, X. (2014). Ultrasonics Sonochemistry Thermosonication as a potential quality enhancement technique of apple juice. *Ultrasonics - Sonochemistry*, 21(3), 984–990. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2013.12.003>
- Algamdi, N., Mullen, W., & Crozier, A. (2011). Tea prepared from *Anastatica hierochuntica* seeds contains a diversity of antioxidant flavonoids, chlorogenic acids and phenolic compounds. *Phytochemistry*, 72(2–3), 248–254. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.11.017>
- Almaguer-Vargas, Y. S.-M. G., & Ríos-Sánchez, G. P.-V. R. (2009). *Ácido Elágico y Perfil de ANTOCIANINAS En Frutos de Frambuesa ( Rubus idaeus L .) con Diferente Grado de maduración*. 15(1), 97–101.
- Altobelli, E., Lattanzi, A., Paduano, R., Varassi, G., & di Orio, F. (2014). Colorectal cancer prevention in Europe: Burden of disease and status of screening programs. *Preventive Medicine*, 62, 132–141. <https://doi.org/10.1016/j.ypmed.2014.02.010>
- Amador-Espejo, G. G., Chávez-Ocegueda, J., Cruz-Cansino, N., Suárez-Jacobo, A., Gutiérrez-Martínez, P., Valencia-Flores, D., & Velázquez Estrada, R. (2019). Thermosonication parameter effects on physicochemical changes, microbial and enzymatic inactivation of fruit smoothie. *Journal of Food Science and Technology*. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-04201-x>
- Anaya-Esparza, L. M., Velázquez-Estrada, R. M., Roig, A. X., García-Galindo, H. S., Sayago-Ayerdi, S. G., & Montalvo-González, E. (2017). Thermosonication: An alternative processing for fruit and vegetable juices. *Trends in Food Science and Technology*, 61, 26–37. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.11.020>
- Anaya-Esparza, L. M., Velázquez-Estrada, R. M., Sayago-Ayerdi, S. G., Sánchez-

## Capítulo 8 Referencias

- Burgos, J. A., Ramírez-Mares, M. V., García-Magaña, M. de L., & Montalvo-González, E. (2017). Effect of thermosonication on polyphenol oxidase inactivation and quality parameters of soursop nectar. *LWT - Food Science and Technology*, 75, 545–551. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.10.002>
- Arya, A., Jamil Al-Obaidi, M. M., Shahid, N., Bin Noordin, M. I., Looi, C. Y., Wong, W. F., ... Mustafa, M. R. (2014). Synergistic effect of quercetin and quinic acid by alleviating structural degeneration in the liver, kidney and pancreas tissues of STZ-induced diabetic rats: A mechanistic study. *Food and Chemical Toxicology*, 71(June), 183–196. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.06.010>
- Ashokkumar, M., Sunartio, D., Kentish, S., Mawson, R., Simons, L., Vilku, K., & Versteeg, C. (Kees). (2008). Modification of food ingredients by ultrasound to improve functionality: A preliminary study on a model system. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9(2), 155–160. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2007.05.005>
- Askar, A., & Treptow, H. (1993). Quality Assurance in Tropical Fruit Processing. In *Quality Assurance in Tropical Fruit Processing*. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-77687-8>
- Ashokkumar, Muthupandian. 2014. "Ultrasonics Sonochemistry Applications of Ultrasound in Food and Bioprocessing." *ULTRASONICS SONOCHEMISTRY* 1–7.
- Atalar, Ilyas, Furkan T. Saricaoglu, Halil I. Odabas, Volkan A. Yilmaz, and Osman Gul. 2019. "LWT - Food Science and Technology Effect of Ultrasonication Treatment on Structural , Physicochemical and Bioactive Properties of Pasteurized Rosehip ( Rosa Canina L .) Nectar." *LWT - Food Science and Technology* (November):108850.
- Ballesteros-vivas, Diego, Gerardo Alvarez-rivera, Carlos León, Sandra Johanna, Elena Ibáñez, Fabián Parada-alfonso, Alejandro Cifuentes, and Alberto Valdés. 2019. "Anti-Proliferative Bioactivity against HT-29 Colon Cancer Cells of a Withanolides-Rich Extract from Golden Berry ( Physalis Peruviana L .) Calyx

## Capítulo 8 Referencias

- Investigated by Foodomics.” *Journal of Functional Foods* 63(September):103567.
- Bansal, V., Prasad, P., Mehta, D., & Siddiqui, M. W. (2018). Ultrasound Techniques in Postharvest Disinfection of Fruits and Vegetables. In *Postharvest Disinfection of Fruits and Vegetables*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812698-1.00008-X>
- Barba, F. J., Esteve, M. J., & Frigola, A. (2013). Physicochemical and nutritional characteristics of blueberry juice after high pressure processing. *FRIN*, 50(2), 545–549. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.02.038>
- Bermúdez-Aguirre, D., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2012). Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* in pineapple, grape and cranberry juices under pulsed and continuous thermo-sonication treatments. *Journal of Food Engineering*, 108(3), 383–392. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.06.038>
- Bevilacqua, A., Campaniello, D., Sinigaglia, M., & Corbo, M. R. (2015). LWT - Food Science and Technology Combination of ultrasound and antimicrobial compounds towards *Pichia* spp . and *Wickerhamomyces anomalus* in pineapple juice. *LWT - Food Science and Technology*, 64(2), 616–622. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.06.038>
- Bhat, R., Shuaidda, N., Che, B., Min-tze, L., & Karim, A. A. (2011). Ultrasonics Sonochemistry Sonication improves kasturi lime ( *Citrus microcarpa* ) juice quality. *Ultrasonics - Sonochemistry*, 18(6), 1295–1300. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2011.04.002>
- Bhat, Rajeev, and Kok Ming. 2017. “Sonication Treatment Convalesce the Overall Quality of Hand-Pressed Strawberry Juice.” *Food Chemistry* 215:470–76.
- Bhat, Rajeev, Nor Shuaidda, Bt Che, Liong Min-tze, and A. A. Karim. 2011. “Ultrasonics Sonochemistry Sonication Improves Kasturi Lime ( *Citrus Microcarpa* ) Juice Quality.” *Ultrasonics - Sonochemistry* 18(6):1295–1300.
- Burnette, W. N. (1981). *Electrophoretic Transfer of Proteins from “ Western Blotting ”: Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gels to Unmodified Nitrocellulose*

## Capítulo 8 Referencias

*and Radiographic Detection with Antibody and Radioiodinated Protein A.* 203, 195–203.

Calderón-miranda, M. L., Fernanda, M., Martín, S., Barbosa-cánovas, G. V, & Swanson, B. G. (1998). *MÉTODOS NO TÉRMICOS PARA PROCESAMIENTO DE ALIMENTOS: VARIABLES E INACTIVACIÓN MICROBIANA*. 1, 3–11.

Cano, M. P., Hernandez, A., & Ancos, B. D. E. (1997). *High Pressure and Temperature Effects on Enzyme Inactivation in Strawberry and Orange Products.* 62(1), 85–88.

Celik, E., Celik, M. S., Kaplan, H. M., & Singirik, E. (2019). St. John's Worth Extract Induces Apoptosis and Inhibits Cancer-Related Inflammation in Basal Cell Carcinoma Cell Lines. *Biophysical Journal*, 116(3), 272a-273a. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.11.1472>

Cervantes, L., Martínez-Ferri, E., Soria, C., & Ariza, M. T. (2020). Bioavailability of phenolic compounds in strawberry, raspberry and blueberry: Insights for breeding programs. *Food Bioscience*, 37, 100680. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100680>

Cervantes, Lucía, Elsa Martínez-ferri, Carmen Soria, and María Teresa Ariza. 2020. "Bioavailability of Phenolic Compounds in Strawberry, Raspberry and Blueberry: Insights for Breeding Programs." *Food Bioscience* 100680.

Chandrasekar, V., Belur, P. D., & Regupathi, I. (2016). Effect of hydroxybenzoic acids antioxidants on the oxidative stability of sardine oil. *Resource-Efficient Technologies*, 2, S114–S118. <https://doi.org/10.1016/j.reffit.2016.11.008>

Chen, Z., Yang, Y., Mi, S., Fan, Q., Sun, X., Deng, B., ... Ruan, Z. (2019). Hepatoprotective effect of chlorogenic acid against chronic liver injury in inflammatory rats. *Journal of Functional Foods*, 62(August). <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103540>

Cheng, C. xiang, Jia, M., Gui, Y., & Ma, Y. (2020). Comparison of the effects of novel processing technologies and conventional thermal pasteurisation on the

## Capítulo 8 Referencias

- nutritional quality and aroma of Mandarin (Citrus unshiu) juice. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 64, 102425. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102425>
- Cheng, L. H., Soh, C. Y., Liew, S. C., & Teh, F. F. (2007). *Food Chemistry Effects of sonication and carbonation on guava juice quality*. 104, 1396–1401. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.02.001>
- Cho, Mi Jin, Luke R. Howard, Ronald L. Prior, and John R. Clark. 2005. “Flavonol Glycosides and Antioxidant Capacity of Various Blackberry and Blueberry Genotypes Determined by High-Performance Liquid Chromatography / Mass Spectrometry.” 2158(June):2149–58.
- Cordeiro, Rocha, Zilmar Meireles, Pimenta Barros, Carlos Brian, Oliveira De Carvalho, Fernanda Araújo, Nonete Barbosa, and Patrícia Moreira. 2014. “LWT - Food Science and Technology Effect of Sonication on Soursop Juice Quality.” *LWT - Food Science and Technology*.
- Coronado, Marta, Salvador Vega y León, Rey Gutiérrez T., Marcela Vázquez F., and Claudia Radilla V. 2015. “Antioxidantes : Perspectiva Actual Para La Salud Humana Antioxidants : Present Perspective for the Human Health.” 42(7).
- Do, C. B., & Cormier, F. (1991). Accumulation of peonidin 3-glucoside enhanced by osmotic stress in grape (*Vitis vinifera* L.) cell suspension. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 24(1), 49–54. <https://doi.org/10.1007/BF00044265>
- Dubrin, A. J. (1998). *La caída inducida por el fármaco no esteroideo (AINE) en la viabilidad celular HT - 29 se correlaciona con la potencia para inhibir la ciclooxigenasa ( COX ) 1 : uso de inhibidores selectivos de COX -2*. (October), 1998.
- Earnshaw, R. G., Appleyard, J., & Hurst, R. M. (1995). Understanding physical inactivation processes: combined preservation opportunities using heat, ultrasound and pressure. *International Journal of Food Microbiology*, 28(2), 197–219. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(95\)00057-7](https://doi.org/10.1016/0168-1605(95)00057-7)

## Capítulo 8 Referencias

- Ebrahimzadeh, & S, H. (2008). Antioxidant and Free Radical Scavenging Activity of Feijoa Sellowiana Fruits Peel and Leaves. *Pharmacologyonline*, 1, 7–14.
- Economía, E. L. M. D. E., & Comercio, I. Y. (2005). *Reglamento Técnico Jugos y Néctares de Frutas*.
- El-Askary, H. I., Mohamed, S. S., El-Gohari, H. M. A., Ezzat, S. M., & Meselhy, M. R. (2020). Quinic acid derivatives from *Artemisia annua* L. leaves; biological activities and seasonal variation. *South African Journal of Botany*, 128, 200–208. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.11.008>
- El-Bassossy, H., Badawy, D., Neamatallah, T., & Fahmy, A. (2016). Ferulic acid, a natural polyphenol, alleviates insulin resistance and hypertension in fructose fed rats: Effect on endothelial-dependent relaxation. In *Chemico-Biological Interactions* (Vol. 254). <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.06.013>
- Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura (FIRA). (2016). *Panorama Agroalimentario. Berries 2016*. 2016, 41. <https://doi.org/10.1386/pop.2.1.97>
- Fonteles, T. V., Costa, M. G. M., de Jesus, A. L. T., de Miranda, M. R. A., Fernandes, F. A. N., & Rodrigues, S. (2012). Power ultrasound processing of cantaloupe melon juice: Effects on quality parameters. *Food Research International*, 48(1), 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.02.013>
- Foong, Shin Ying, Yi Heng Chan, Wai Yan Cheah, and Noor Haziqah. 2020. “Progress in Waste Valorization Using Advanced Pyrolysis Techniques for Hydrogen and Gaseous Fuel Production.” *Bioresource Technology* 124299.
- Gabriel, A. A. (2012). Microbial inactivation in cloudy apple juice by multi-frequency Dynashock power ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, 19(2), 346–351. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2011.06.003>
- Garcia-Bailo, B., El-Sohemy, A., Haddad, P. S., Arora, P., Benzaiied, F., Karmali, M., & Badawi, A. (2011). Vitamins D, C, and E in the prevention of type 2 diabetes mellitus: Modulation of inflammation and oxidative stress. *Biologics: Targets and Therapy*, 5, 7–19. <https://doi.org/10.2147/BTT.S14417>

## Capítulo 8 Referencias

- García Martínez. (2014). *Determinación del enranciamiento hidrolítico de un aceite de oliva mediante el Grado de Acidez*. 8. <https://doi.org/10.1016/j.jafrearsci.2005.04.004>
- Gapski, Andreia, Trilicia M. Gomes, Maiara A. Bredun, and Nayla E. Ferreira-lima. 2019. "Digestion Behavior and Antidepressant-like Effect Promoted by Acute Administration of Blueberry Extract on Mice." *Food Research International* 125(March):108618.
- Gavrilova, Verka, Marina Kajd, Viktor Gjamovski, and Marina Stefova. 2011. "Separation, Characterization and Quantification of Phenolic Compounds in Blueberries and Red and Black Currants By." 4009–18.
- Giusti, M. M., & Wrolstad, R. E. (2001). *Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy*. 1–13.
- Golmohamadi, A., Möller, G., Powers, J., & Nindo, C. (2013). Ultrasonics Sonochemistry Effect of ultrasound frequency on antioxidant activity, total phenolic and anthocyanin content of red raspberry puree. *Ultrasonics - Sonochemistry*, 20(5), 1316–1323. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2013.01.020>
- Gomes, W. F., Tiwari, B. K., Rodriguez, Ó., de Brito, E. S., Fernandes, F. A. N., & Rodrigues, S. (2017). Effect of ultrasound followed by high pressure processing on prebiotic cranberry juice. *Food Chemistry*, 218, 261–268. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.132>
- Grace, M. H., Xiong, J., Esposito, D., Ehlensfeldt, M., & Lila, M. A. (2019). Simultaneous LC-MS quantification of anthocyanins and non-anthocyanin phenolics from blueberries with widely divergent profiles and biological activities. *Food Chemistry*, 277, 336–346. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.101>
- Guerrero, S., Tognon, M., & Alzamora, S. M. (2005). Response of *Saccharomyces cerevisiae* to the combined action of ultrasound and low weight chitosan. *Food Control*, 16(2), 131–139. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2004.01.003>

## Capítulo 8 Referencias

- Guiné, R. P. F., Matos, S., Gonçalves, F. J., Costa, D., & Mendes, M. (2018). Evaluation of phenolic compounds and antioxidant activity of blueberries and modelization by artificial neural networks. *International Journal of Fruit Science*, 18(2), 199–214. <https://doi.org/10.1080/15538362.2018.1425653>
- Guo, Y., Zhang, T., Jiang, B., Miao, M., & Mu, W. (2014). The effects of an antioxidative pentapeptide derived from chickpea protein hydrolysates on oxidative stress in Caco-2 and HT-29 cell lines. *Journal of Functional Foods*, 7(1), 719–726. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.12.013>
- Hasperué, J. H., Rodoni, L. M., Guardianelli, L. M., Chaves, A. R., & Martínez, G. A. (2016). Use of LED light for Brussels sprouts postharvest conservation. *Scientia Horticulturae*, 213(1974), 281–286. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.11.004>
- Ho, M. L., Chen, P. N., Chu, S. C., Kuo, D. Y., Kuo, W. H., Chen, J. Y., & Hsieh, Y. S. (2010). Peonidin 3-glucoside inhibits lung cancer metastasis by downregulation of proteinases activities and MAPK pathway. *Nutrition and Cancer*, 62(4), 505–516. <https://doi.org/10.1080/01635580903441261>
- Huang, G., Chen, S., Dai, C., Sun, L., Sun, W., Tang, Y., ... Ma, H. (2017). Ultrasonics Sonochemistry Effects of ultrasound on microbial growth and enzyme activity. *Ultrasonics - Sonochemistry*, 37, 144–149. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.12.018>
- Ilhami Gulcin, M. E. B. and O. I. K. (2003). *Metal chelating and hydrogen peroxide scavenging effects of melatonin*. 278–281.
- Incalci, M. D., N. Badri, C. M. Galmarini, and P. Allavena. 2014. “Trabectedin , a Drug Acting on Both Cancer Cells and the Tumour Microenvironment.” (December 2013):1–5.
- Inanoglu, S., Barbosa-Cánovas, G. V., Patel, J., Zhu, M. J., Sablani, S. S., Liu, F., ... Tang, J. (2021). Impact of high-pressure and microwave-assisted thermal pasteurization on inactivation of *Listeria innocua* and quality attributes of green beans. *Journal of Food Engineering*, 288, 110162.

## Capítulo 8 Referencias

<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.110162>

INEGI Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2017). *Anuario Estadístico de la Producción Agrícola*. México.

Instituto de Investigación y Desarrollo de Comercio Exterior IDEXCAM Lima, C. de comercio de. (2017). *Arándanos*.

Internacional, M. (2018). *CADENA de ARANDANOS - RESUMEN*. 1–7.

Jasso de Rodríguez, D., Carrillo-Lomelí, D. A., Rocha-Guzmán, N. E., Moreno-Jiménez, M. R., Rodríguez-García, R., Díaz-Jiménez, M. L. V., ... Villarreal-Quintanilla, J. A. (2017). Antioxidant, anti-inflammatory and apoptotic effects of *Flourensia microphylla* on HT-29 colon cancer cells. *Industrial Crops and Products*, *107*, 472–481. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.03.034>

Kanski, J., Aksenova, M., Stoyanova, A., & Butterfield, D. A. (2002). Ferulic acid antioxidant protection against hydroxyl and peroxy radical oxidation in synaptosomal and neuronal cell culture systems in vitro: Structure-activity studies. *Journal of Nutritional Biochemistry*, *13*(5), 273–281. [https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(01\)00215-7](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(01)00215-7)

Kasai, H., Fukada, S., Yamaizumi, Z., Sugie, S., & Mori, H. (2000). Action of chlorogenic acid in vegetables and fruits as an inhibitor of 8-hydroxydeoxyguanosine formation in vitro and in a rat carcinogenesis model. *Food and Chemical Toxicology*, *38*(5), 467–471. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(00\)00014-4](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(00)00014-4)

Khandpur, P., & Gogate, P. R. (2015). *Ultrasonics Sonochemistry Effect of novel ultrasound based processing on the nutrition quality of different fruit and vegetable juices*. *27*, 125–136. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2015.05.008>

Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., Mancini-filho, J., Fett, R., Diversos, A. D. E., ... Considerado, D. E. F. (2005). *Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos 1*. *25*(4), 726–732.

## Capítulo 8 Referencias

- Kuti, J. O. (2004). Antioxidant compounds from four *Opuntia cactus* pear fruit varieties. *Food Chemistry*, 85(4), 527–533. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00184-5](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00184-5)
- Laishram, H. P. D. P. B. M., & Devi, P. (2015). Antioxidant and Antimutagenic activity of *Curcuma caesia* Roxb. rhizome extracts. *Toxicology Reports*, 423–428. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2014.12.018>
- Liao, X., Li, J., Suo, Y., Chen, S., Ye, X., Liu, D., & Ding, T. (2018). Multiple action sites of ultrasound on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Food Science and Human Wellness*, 7(1), 102–109. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2018.01.002>
- Limami, Y., Pinon, A., Leger, D. Y., Mousseau, Y., Cook-Moreau, J., Beneytout, J. L., ... Simon, A. (2011). HT-29 colorectal cancer cells undergoing apoptosis overexpress COX-2 to delay ursolic acid-induced cell death. *Biochimie*, 93(4), 749–757. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2011.01.003>
- Liu, L., Cui, Z. X., Yang, X. W., Xu, W., Zhang, Y. B., Li, F. J., ... Zhang, P. (2020). Simultaneous characterisation of multiple *Mahonia fortunei* bioactive compounds in rat plasma by UPLC–MS/MS for application in pharmacokinetic studies and anti-inflammatory activity in vitro. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 179(xxxx), 113013. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.113013>
- López-Malo, A., Palou, E., Jiménez-Fernández, M., Alzamora, S. M., & Guerrero, S. (2005). Multifactorial fungal inactivation combining thermosonication and antimicrobials. *Journal of Food Engineering*, 67(1–2), 87–93. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.05.072>
- Luo, M., Sui, Y., Tian, R., & Lu, N. (2020). Formation of a bovine serum albumin diligand complex with rutin for the suppression of heme toxicity. *Biophysical Chemistry*, 258(January), 106327. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2020.106327>
- Mani, Suganya, Balamuralikrishnan Balasubramanian, and Ravindran Balasubramani. 2020. “Journal of Photochemistry & Photobiology , B : Biology

## Capítulo 8 Referencias

- Synthesis and Characterization of Proanthocyanidin-Chitosan Nanoparticles : An Assessment on Human Colorectal Carcinoma HT-29 Cells.” *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology* 210(January):111966.
- Martín-gómez, Juan, M. Ángeles Varo, Julieta Mérida, and María P. Serratosa. 2020. “Influence of Drying Processes on Anthocyanin Profiles, Total Phenolic Compounds and Antioxidant Activities of Blueberry (*Vaccinium Corymbosum*).” *LWT - Food Science and Technology* 108931.
- Martínez-navarrete, N., Mar, M., Vidal, C., José, J., & Lahuerta, M. (2008). Actividad Dietética Los compuestos bioactivos de las frutas y sus efectos en la salud. *Actividad Dietetica*, 12(2), 64–68. [https://doi.org/10.1016/S1138-0322\(08\)75623-2](https://doi.org/10.1016/S1138-0322(08)75623-2)
- McClements D. J. (1995). Advances in the application of ultrasound in food analysis and processing. *Trends in Food Science and Technology*, 6(September), 293–299.
- Mesa-vanegas, A. M., li, C. A. G., lii, F. C., & Sáez-, J. A. (2010). *Actividad antioxidante y contenido de fenoles totales de algunas especies del género Calophyllum Antioxidant activity and total phenols content from some species of Calophyllum genus*. 15(2), 13–15.
- Meydav, S., Saguy, I., & Kopelman, I. J. (1977). *I Browning Determination in Citrus Products*. 9–11.
- MIN-HSIUNG PAN, CHING-SHU LAI, SLAVIK DUSHENKOV, and CHI-TANG HO. 2009. “Modulation of Inflammatory Genes by Natural Dietary Bioactive Compounds.” 4467–77.
- Monteiro, Sara H. M. C., Eric Keven Silva, Verônica O. Alvarenga, Mônica Q. Freitas, Márcia C. Silva, Renata S. L. Raices, S. Anderson, Sant Ana, M. Angela A. Meireles, and Adriano G. Cruz. 2017. “Effects of Ultrasound Energy Density on the Non-Thermal Pasteurization of Chocolate Milk Beverage.” *Ultrasonics - Sonochemistry*.

## Capítulo 8 Referencias

- Morales, C. (n.d.). *Manual de manejo agronómico del arándano*.
- Morales, F. J., & Jime, S. (2001). *Free radical scavenging capacity of Maillard reaction products as related to colour and fluorescence*. 72, 119–125.
- Morel, M. H., Dehlon, P., Autran, J. C., Leygue, J. P., & Bar-L'Helgouac'H, C. (2000). Effects of temperature, sonication time, and power settings on size distribution and extractability of total wheat flour proteins as determined by size-exclusion high-performance liquid chromatography. *Cereal Chemistry*, 77(5), 685–691. <https://doi.org/10.1094/CCHEM.2000.77.5.685>
- Nadeem, M., Ubaid, N., Qureshi, T. M., Munir, M., & Mehmood, A. (2018). Effect of ultrasound and chemical treatment on total phenol, flavonoids and antioxidant properties on carrot-grape juice blend during storage. *Ultrasonics Sonochemistry*, 45, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.02.034>
- Nance, D. E., Silvia, I., & Chacon, A. (2006). *Procesamiento de Frutas : Procesos Húmedos y*.
- NORMA GENERAL DEL CODEX PARA ZUMOS (JUGOS) Y NÉCTARES DE FRUTAS*. (2005).
- O'Donnell, C. P., Tiwari, B. K., Bourke, P., & Cullen, P. J. (2010a). Effect of ultrasonic processing on food enzymes of industrial importance. *Trends in Food Science and Technology*, 21(7), 358–367. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.04.007>
- O'Donnell, C. P., Tiwari, B. K., Bourke, P., & Cullen, P. J. (2010b). Effect of ultrasonic processing on food enzymes of industrial importance. *Trends in Food Science and Technology*, 21(7), 358–367. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.04.007>
- Ojha, K. S., Mason, T. J., Donnell, C. P. O., Kerry, J. P., & Tiwari, K. (2016). Ultrasound technology for food fermentation applications. *Ultrasonics - Sonochemistry*, (June). <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.001>
- Oladunjoye, Adebola O., Folasade O. Adeboyejo, Titilola A. Okekunbi, and Olaide R. Aderibigbe. 2021. "Ultrasonics - Sonochemistry Effect of Thermosonication on Quality Attributes of Hog Plum ( Spondias Mombin L .) Juice." *Ultrasonics -*

## Capítulo 8 Referencias

*Sonochemistry* 70(July 2020):105316.

- Paniagua-martínez, I., A. Mulet, M. A. García-alvarado, and J. Benedito. 2018. "Orange Juice Processing Using a Continuous Flow Ultrasound-Assisted Supercritical CO<sub>2</sub> System: Microbiota Inactivation and Product Quality." *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 47(April):362–70.
- Paczkowska, M., McDonagh, A. F., Bialek, K., Tajber, L., & Cielecka-Piontek, J. (2020). Mechanochemical activation with cyclodextrins followed by compaction as an effective approach to improving dissolution of rutin. *International Journal of Pharmaceutics*, 581(January), 119294. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119294>
- Patras, A., Brunton, N. P., Da, S., & Butler, F. (2009). Impact of high pressure processing on total antioxidant activity , phenolic , ascorbic acid , anthocyanin content and colour of strawberry and blackberry purées ☆. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10(3), 308–313. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2008.12.004>
- Pinheiro, J., Alegria, C., Abreu, M., Gonçalves, E. M., & Silva, C. L. M. (2015). Ultrasonics Sonochemistry Influence of postharvest ultrasounds treatments on tomato ( *Solanum lycopersicum* , cv . Zinac ) quality and microbial load during storage. *ULTRASONICS SONOCHEMISTRY*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2015.04.009>
- Piyasena, P., Mohareb, E., & McKellar, R. C. (2003). Inactivation of microbes using ultrasound: A review. *International Journal of Food Microbiology*, 87(3), 207–216. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00075-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00075-8)
- Quagliariello, V., Iaffaioli, R. V., Falcone, M., Ferrari, G., Pataro, G., & Donsì, F. (2016). Effect of pulsed electric fields – assisted extraction on anti-inflammatory and cytotoxic activity of brown rice bioactive compounds. *Food Research International*, 87, 115–124. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.07.005>
- Radziejewska-Kubzdela, E., Szwengiel, A., Ratajkiewicz, H., & Nowak, K. (2020).

## Capítulo 8 Referencias

- Effect of ultrasound, heating and enzymatic pre-treatment on bioactive compounds in juice from *Berberis amurensis* Rupr. *Ultrasonics Sonochemistry*, 63(January). <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.104971>
- Rahaman, A., Zeng, X. A., Kumari, A., Rafiq, M., Siddeeg, A., Manzoor, M. F., ... Ahmed, Z. (2019). Influence of ultrasound-assisted osmotic dehydration on texture, bioactive compounds and metabolites analysis of plum. *Ultrasonics Sonochemistry*, 58(June). <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104643>
- Raviyan, P., Zhang, Z., & Feng, H. (2005). Ultrasonication for tomato pectinmethylesterase inactivation: Effect of cavitation intensity and temperature on inactivation. *Journal of Food Engineering*, 70(2), 189–196. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.09.028>
- Ribera, A. E., Alberdi, M., Zuñiga, G. E., & Mora, M. L. (2006). *ANTIOXIDANT COMPOUNDS IN SKIN AND PULP OF FRUITS CHANGE AMONG GENOTYPES AND MATURITY STAGES IN HIGHBUSH BLUEBERRY ( Vaccinium corymbosum L .) GROWN IN SOUTHERN CHILE.* (1998).
- Rivas, A., D. Rodrigo, A. Martí'neza, G. V. Barbosa-Ca'novasb, and M. Rodrigoa. 2006. "Effect of PEF and Heat Pasteurization on the Physical – Chemical Characteristics of Blended Orange and Carrot Juice." 39:1163–70.
- Rodríguez, D. Jasso De. 2017. "Antioxidant, Anti-Inflammatory and Apoptotic Effects of Flourensia Microphylla on HT-29 Colon Cancer Cells." *Industrial Crops & Products*.
- Roginsky, V., & Lissi, E. A. (2005). Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, 92(2), 235–254. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.08.004>
- Saeeduddin, M., Abid, M., Jabbar, S., Wu, T., Muhammad, M., Nureldin, F., ... Zeng, X. (2015). LWT - Food Science and Technology Quality assessment of pear juice under ultrasound and commercial pasteurization processing conditions. *LWT - Food Science and Technology*, 64(1), 452–458. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.05.005>

## Capítulo 8 Referencias

- Saeeduddin, M., Abid, M., Jabbar, S., Wu, T., & Zeng, X. (2015). *LWT - Food Science and Technology Quality assessment of pear juice under ultrasound and commercial pasteurization processing conditions*. 64, 452–458.
- SAGARPA. (2017). *agrícola nacional FRUTAS DEL BOSQUE ZARZAMORA*.
- Santhirasegaram, V., Razali, Z., & Somasundram, C. (2013). Ultrasoni cs Sonochemistry Effects of thermal treatment and sonication on quality attributes of Chokanan mango ( *Mangifera indica* L .) juice. *Ultrasonics - Sonochemistry*, 20(5), 1276–1282. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2013.02.005>
- Seshadri, R., Weiss, J., Hulbert, G. J., & Mount, J. (2003). Ultrasonic processing influences rheological and optical properties of high-methoxyl pectin dispersions. *Food Hydrocolloids*, 17(2), 191–197. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(02\)00051-6](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(02)00051-6)
- Shahidi, U. N. W. & F. (2011). Antioxidant and pro-oxidant activity of green tea extracts in marine oils. *Archaeologiai Ertesito*, 136(1), 115–134. <https://doi.org/10.1556/ArchErt.136.2011.5>
- Sharma, S., Rabbani, S. A., Narang, J. K., Hyder Pottoo, F., Ali, J., Kumar, S., & Baboota, S. (2020). Role of Rutin Nanoemulsion in Ameliorating Oxidative Stress: Pharmacokinetic and Pharmacodynamics Studies. *Chemistry and Physics of Lipids*, 228, 104890. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2020.104890>
- Shivanagoudra, S. R., Perera, W. H., Perez, J. L., Athrey, G., Sun, Y., Wu, C. S., ... Patil, B. S. (2019). In vitro and in silico elucidation of antidiabetic and anti-inflammatory activities of bioactive compounds from *Momordica charantia* L. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 27(14), 3097–3109. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.05.035>
- Silva, E. K., Arruda, H. S., Pastore, G. M., Meireles, M. A. A., & Saldaña, M. D. A. (2020). Xylooligosaccharides chemical stability after high-intensity ultrasound processing of prebiotic orange juice. *Ultrasonics Sonochemistry*, 63, 104942. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104942>

## Capítulo 8 Referencias

- Snyder, R. A., Hao, S., Irish, W., Zervos, E. E., Tuttle-Newhall, J. E., & Parikh, A. A. (2020). Thirty-Day Morbidity after Simultaneous Resection of Colorectal Cancer and Colorectal Liver Metastasis: American College of Surgeons NSQIP Analysis. *Journal of the American College of Surgeons*, 230(4), 617-627.e9. <https://doi.org/10.1016/j.jamcollsurg.2019.12.018>
- Soares, S., Santos Silva, M., García-Estévez, I., Brandão, E., Fonseca, F., Ferreira-da-Silva, F., ... de Freitas, V. (2019). Effect of malvidin-3-glucoside and epicatechin interaction on their ability to interact with salivary proline-rich proteins. *Food Chemistry*, 276(August 2018), 33–42. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.167>
- Soria, Ana Cristina, and Mar Villamiel. 2010. "Effect of Ultrasound on the Technological Properties and Bioactivity of Food: A Review." *Trends in Food Science and Technology* 21(7):323–31.
- Stintzing FC, et al. (2005). *Color , Betalain Pattern , and Antioxidant Properties of Cactus Pear ( Opuntia spp .) Clones*. 442–451.
- Sulaiman, A., Soo, M. J., Farid, M., & Silva, F. V. M. (2015). Thermosonication for polyphenoloxidase inactivation in fruits : Modeling the ultrasound and thermal kinetics in pear , apple and strawberry purees at different temperatures. *JOURNAL OF FOOD ENGINEERING*, 165, 133–140. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.06.020>
- Sun, Xiyun, Zihan Xu, Yuehua Wang, and Ning Liu. 2020. "Food Science and Human Wellness Protective Effects of Blueberry Anthocyanin Extracts on Hippocampal Neuron Damage Induced by Extremely Low-Frequency Electromagnetic Field." *Food Science and Human Wellness* 9(3):264–71.
- Suzuki, A., Kagawa, D., Fujii, A., Ochiai, R., Tokimitsu, I., & Saito, I. (2002). Ferulic Acid on Blood Pressure in. *Change*, 7061(01), 351–357.
- Swamy, G. J., Muthukumarappan, K., & Asokapandian, S. (2018). Chapter 23. Ultrasound for Fruit Juice Preservation. In *Fruit Juices*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802230-6.00023-0>

## Capítulo 8 Referencias

- Thurnham, D. I. (2002). *Antioxidants in Food: Practical Applications*. Jan Pokorny, Nedyalka Yanishlieva and Michael Gordon (editors). 2001. Cambridge: CRC Press, Woodhead Publishing Ltd. £115 ISBN 1 85573 463 X. CRC Press. \$180 ISBN 0-8493-1221-1. *British Journal of Nutrition*, 87(4), 391–391. <https://doi.org/10.1079/bjn2001510>
- Tiwari, B. K., Donnell, C. P. O., Muthukumarappan, K., & Cullen, P. J. (2009). LWT - Food Science and Technology Ascorbic acid degradation kinetics of sonicated orange juice during storage and comparison with thermally pasteurised juice. *LWT - Food Science and Technology*, 42(3), 700–704. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2008.10.009>
- Tiwari, B. K., Patras, A., Brunton, N., Cullen, P. J., & Donnell, C. P. O. (2010). Ultrasonics Sonochemistry Effect of ultrasound processing on anthocyanins and color of red grape juice. *Ultrasonics - Sonochemistry*, 17(3), 598–604. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2009.10.009>
- Towbin, H., Staehelint, T., & Gordon, J. (1979). *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications*. 76(9), 4350–4354.
- Undurraga Diaz, S. V. S. (2017). *Manual de manejo agronómico del arándano* (Boletín IN; I. de I. A. INIA, Ed.). Santiago de Chile: Agosto 2013.
- USDA-Ed Connection. (n.d.). *Blueberries*.
- Vaikousi, H., Biliaderis, C. G., & Koutsoumanis, K. P. (2008). Development of a microbial time/temperature indicator prototype for monitoring the microbiological quality of chilled foods. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(10), 3242–3250. <https://doi.org/10.1128/AEM.02717-07>
- Valdramidis, V. P., Cullen, P. J., Tiwari, B. K., & O'Donnell, C. P. (2010). Quantitative modelling approaches for ascorbic acid degradation and non-enzymatic browning of orange juice during ultrasound processing. *Journal of Food Engineering*, 96(3), 449–454. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.08.025>

## Capítulo 8 Referencias

- Vázquez-Castilla S., Guillén-Bejarano R., Jaramillo-Carmona S., J.-A. A. y, & R.\*,  
R.-A. (2005). *FUNCIONALIDAD DE DISTINTAS VARIEDADES DE ARANDANOS*.
- Vilaplana, M. (2007). *Antioxidantes presentes en los alimentos*. 26.
- Waheeda, F., Mis, K., Li, J., Zhang, J., Chouljenko, A., Chotiko, A., ... Sathivel, S. (2015). LWT - Food Science and Technology Effect of continuous ultrasonication on microbial counts and physico-chemical properties of blueberry ( *Vaccinium corymbosum* ) juice. *LWT - Food Science and Technology*, 60(1), 563–570. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.07.047>
- Wang, C. Y., Chen, C. T., & Wang, S. Y. (2009). Changes of flavonoid content and antioxidant capacity in blueberries after illumination with UV-C. *Food Chemistry*, 117(3), 426–431. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.04.037>
- Wang, J., Wang, J., Ye, J., Vanga, S. K., & Raghavan, V. (2019). Influence of high-intensity ultrasound on bioactive compounds of strawberry juice: Profiles of ascorbic acid, phenolics, antioxidant activity and microstructure. *Food Control*, 96(July 2018), 128–136. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.09.007>
- Wibowo, Scheling, Esther Aba, Sofie De Man, Nathalie Bernaert, Bart Van Droogenbroeck, Tara Grauwet, Ann Van Loey, and Marc Hendrickx. 2019. “Comparing the Impact of High Pressure , Pulsed Electric Field and Thermal Pasteurization on Quality Attributes of Cloudy Apple Juice Using Targeted and Untargeted Analyses.” *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 54(March):64–77.
- Wong, E., Vaillant, F., & Pérez, A. (2010). Osmosonication of blackberry juice: Impact on selected pathogens, spoilage microorganisms, and main quality parameters. *Journal of Food Science*, 75(7), 468–474. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01730.x>
- Wu, X., Zhang, G., Hu, X., Pan, J., Liao, Y., & Ding, H. (2019). Inhibitory effect of epicatechin gallate on protein glycation. *Food Research International*, 122(January), 230–240. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.04.023>

## Capítulo 8 Referencias

- Yang, Junfeng, Wenjun Shi, Binbin Li, Yongchao Bai, and Zhixia Hou. 2019. "Preharvest and Postharvest UV Radiation Affects Flavonoid Metabolism and Antioxidant Capacity Differently in Developing Blueberries ( *Vaccinium corymbosum* L.)." *Food Chemistry* 301(July):125248.
- Yuan, Jun, Hailun Li, Weili Tao, Qian Han, Huiqing Dong, Jin Zhang, and Yi Jing. 2020. "Ultrasonics - Sonochemistry An Effective Method for Extracting Anthocyanins from Blueberry Based on Freeze-Ultrasonic Thawing Technology." *Ultrasonics - Sonochemistry* 68(January):105192.
- Zafra-rojas, Q. Y., Cruz-cansino, N., Ramírez-moreno, E., Delgado-olivares, L., Sánchez, J. V.-, & Alanís-garcía, E. (2013). Ultrasonics Sonochemistry Effects of ultrasound treatment in purple cactus pear ( *Opuntia ficus-indica* ) juice. *Ultrasonics - Sonochemistry*, 20(5), 1283–1288. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2013.01.021>
- Zhu, J., Wang, Y., Li, X., Li, B., Liu, S., Chang, N., ... Meng, X. (2017). Combined effect of ultrasound, heat, and pressure on *Escherichia coli* O157:H7, polyphenol oxidase activity, and anthocyanins in blueberry (*Vaccinium corymbosum*) juice. *Ultrasonics Sonochemistry*, 37, 251–259. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.01.017>
- ZIMMAN, A. (2002). *Enzymatic Synthesis of [ 3'-O-Methyl - 3-H ] malvidin-3-glucoside from Petunidin-3-glucoside AND*. 2429–2431.
- Zinoviadou, Kyriaki G., Charis M. Galanakis, Mladen Brn, Nabil Grimi, Nadia Boussetta, Maria J. Mota, Jorge A. Saraiva, Ankit Patras, Brijesh Tiwari, and Francisco J. Barba. 2015. "Fruit Juice Sonication : Implications on Food Safety and Physicochemical and Nutritional Properties." 77:743–52

## Anexos

### Anexos

#### **Anexo 1.** Cuestionario de evaluación sensorial para el jugo de arándano tratado por termosonicación

Nombre: \_\_\_\_\_ Edad: \_\_\_\_\_

Instrucciones. Marque con una X la opción que sea de su preferencia entre ambas muestras de estudio.

Color:

JA01P

FR190

Olor:

JA01P

FR190

Sabor:

JA01P

FR190

Textura:

JA01P

FR190

Comentarios:

---

---

---

## Anexos

**Anexo 2** Coeficientes de regresión del modelo y significancia para las variables de respuesta pH, °Brix, turbidez, oscurecimiento y acidez titulable del jugo de arándano termosonicado

<b>Coeficiente</b>	<b>pH</b>	<b>Sólidos solubles totales</b>	<b>Índice de turbidez</b>	<b>Índice de oscurecimiento</b>	<b>Acidez titulable</b>
<b>a<sub>0</sub></b>	3.400	11.90	0.302	1.275	1.20
<b>a<sub>1</sub></b>	-0.021	0.072 <sup>d</sup>	0.011	-0.076 <sup>c</sup>	-0.008
<b>a<sub>2</sub></b>	-0.090 <sup>d</sup>	0.044	-0.018 <sup>c</sup>	-0.029 <sup>c</sup>	-0.035
<b>a<sub>12</sub></b>	0.175	-0.031	-0.055 <sup>b</sup>	-0.162 <sup>b</sup>	5.988e <sup>-17</sup>
<b>a<sub>11</sub></b>	0.149 <sup>c</sup>	-0.038	0.011	-0.043 <sup>d</sup>	-0.037
<b>a<sub>22</sub></b>	-0.037	-0.013	0.006	-0.008	-0.018
<b>R<sup>2</sup> Adj</b>	0.76	0.65	<b>0.92</b>	<b>0.93</b>	0.14

Niveles de significancia: *a*,  $p < 0.0001$ ; *b*,  $p < 0.001$ ; *c*,  $p < 0.01$  y *d*,  $p < 0.05$ . En los coeficientes (a) el subíndice 1= Tiempo; 2= Amplitud

## Anexos

**Anexo 3** Coeficientes de regresión del modelo y significancia para las variables de respuesta mesófilos aerobios, hongos y levaduras del jugo de arándano termosonicado

Coeficiente	Mesófilos aerobios	Hongos y levaduras
	(Log UFC/ml)	(Log UFC/ml)
<b>a<sub>0</sub></b>	1.66 <sup>a</sup>	1.41 <sup>b</sup>
<b>a<sub>1</sub></b>	0.12	-0.179
<b>a<sub>2</sub></b>	-0.23	0.240
<b>a<sub>12</sub></b>	0.312	0.532
<b>a<sub>11</sub></b>	-0.24	-0.442
<b>a<sub>22</sub></b>	0.057	0.332
<b>R<sup>2</sup> Adj</b>	0.50	0.65

Niveles de significancia: *a*,  $p < 0.0001$ ; *b*,  $p < 0.001$ ; *c*,  $p < 0.01$  y *d*,  $p < 0.05$ . En los coeficientes (a) el subíndice 1= Tiempo; 2= Amplitud

**Anexo 4** Coeficientes de regresión del modelo y significancia para las variables de respuesta de %AR PPO y %AR PME del jugo de arándano termosonicado

Coeficientes	%AR PME	%AR PPO
<b>a<sub>0</sub></b>	0.583 <sup>a</sup>	32.967 <sup>b</sup>
<b>a<sub>1</sub></b>	-0.013	1.198
<b>a<sub>2</sub></b>	-0.007 <sup>c</sup>	-0.066
<b>a<sub>12</sub></b>	0.032	7.9 <sup>d</sup>
<b>a<sub>11</sub></b>	-0.048	-5.008
<b>a<sub>22</sub></b>	-0.008	-2.975
<b>R<sup>2</sup> Adj</b>	0.33	0.15

Niveles de significancia: *a*,  $p < 0.0001$ ; *b*,  $p < 0.001$ ; *c*,  $p < 0.01$  y *d*,  $p < 0.05$ . En los coeficientes (a) el subíndice 1= Tiempo; 2= Amplitud