



**EFFECTO DE PRETRATAMIENTOS EN LA EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS DE LA
MORA CASTILLA (*R. glaucus*) Y SILVESTRE (*R. adenotrichos*), PARA SU USO
COMO INDICADOR VISUAL DE pH.**

Presentado por:
**CRISTHIAN SANTIAGO CUESTA RIAÑO
MARÍA PAULA CASTRO GUASCA**

Trabajo de grado para optar por el título de:
Ingenieros de alimentos

Bajo la dirección de:
**MARTHA PATRICIA TARAZONA DÍAZ Ph.D. Ing.
Profesora Departamento de Ingeniería**

**Facultad de ciencias Naturales e Ingeniería
Departamento de Ingeniería
Programa de Ingeniería de alimentos
Bogotá D.C.
2018**

RESUMEN

La mora es una de las frutas más representativas en cuanto a cobertura geográfica sembrada en Colombia y contienen compuestos fenólicos entre ellos las antocianinas. El objetivo de esta investigación fue evaluar el uso de pretratamientos (microondas, ultrasonido y liofilización) para mejorar la extracción de antocianinas en dos variedades de mora Castilla (*R. glaucus*) y Silvestre (*R. adenotrichos*), para su posterior aplicación como indicador visual de pH. Para ello se realizó un diseño experimental factorial de dos niveles y 4 factores (2^4). El contenido de antocianinas se cuantificó por el método de pH diferencial, posteriormente se determinó la actividad antioxidante de los extractos mediante los ensayos de DPPH y FRAP. Además, se midió el color del extracto a diferentes pH para valorar su uso como indicador visual de pH en diferentes sustancias.

Se logró conceptualizar que la variedad de mora y los pretratamientos de liofilización y ultrasonido presentaron diferencias significativas mientras que el tratamiento de microondas no tuvo un efecto significativo en la extracción. Los mejores extractos se obtuvieron aplicando la combinación de los pretratamientos de liofilización y ultrasonido, la mora Castilla logró un contenido de antocianinas de $187,96 \pm 11,28$ mg de cianidina-3-glucósido/ 100 g de fruto y un poder antioxidante de $3,89 \pm 0,14$ μmol Trolox/g de muestra según el ensayo de DPPH y de $3,40 \pm 0,04$ μmol Trolox/g de muestra de acuerdo con el ensayo de FRAP. La mora Silvestre alcanzó un contenido de antocianinas de $394,53 \pm 24,11$ mg de cianidina-3-glucósido/ 100 g de fruto y un poder antioxidante de $4,33 \pm 0,04$ μmol Trolox/g de muestra según el ensayo de DPPH y de $3,51 \pm 0,01$ μmol Trolox/g de muestra de acuerdo con el ensayo de FRAP. Finalmente, el análisis de resultados demostró que los extractos pueden ser empleados como indicadores visuales de pH, resaltando mejores resultados al emplear la mora Silvestre.

Palabras clave: Antocianinas, mora Silvestre, Mora Castilla, Indicador visual de pH, pretratamientos de extracción.

ABSTRACT

The blackberry is one of the most representative fruits in terms of geographical coverage seeded in Colombia and contain phenolic compounds including anthocyanins. The main objective of this research was to evaluate and analyze the use of pretreatments (microwave, ultrasound and lyophilization) to improve the traditional extraction of anthocyanins in two varieties of Castilla blackberry (*R. glaucus*) and wild blackberry (*R. adenotrichos*), for later application as visual pH indicator. A factorial experimental design was developed: two levels and four factors (2^4). The anthocyanins content was quantified by differential pH method. Then, the antioxidant activity of DPPH and FRAP assays results was determined. In addition, the extract color was measured at different pH values to be used as a pH visual indicator.

It was possible to conceptualize that the blackberry variety and lyophilization and ultrasound pretreatments showed significant differences while the microwave treatment did not have a significant effect on extraction. The best extracts were obtained by applying the combination of lyophilization and ultrasound pretreatments. Castilla blackberry achieved an anthocyanin content of 187.96 ± 11.28 mg of cyanidin-3-glucoside / 100 g of fruit and an antioxidant power of $3,89 \pm 0.14$ μmol Trolox / g sample according to the DPPH test and 3.40 ± 0.04

$\mu\text{mol Trolox / g sample}$ according to the FRAP test. Wild blackberry reached an anthocyanin content of $394.53 \pm 24.11 \text{ mg of cyanidin-3-glucoside / 100 g of fruit}$ and an antioxidant power of $4.33 \pm 0.04 \mu\text{mol Trolox / g sample}$ according to the test of DPPH and $3.51 \pm 0.01 \mu\text{mol Trolox / g sample}$ according to the FRAP test. Finally, the analysis of results showed that extracts can be used as visual pH indicators, highlighting better results when using wild blackberries.

Keywords: Anthocyanins, wild blackberry, Castilla blackberry, visual pH indicator, extraction pretreatments.

1. INTRODUCCIÓN

El color es de gran importancia en la aceptabilidad de los alimentos, los consumidores normalmente juzgan primero la calidad de un alimento por su color, y en la industria alimentaria se utilizan colorantes para mejorar o restituir la apariencia original de los alimentos y así garantizar uniformidad en el color dando finalmente un indicador de calidad (Furia & Chemical Rubber Company, 1980). El color puede considerarse uno de los atributos más impresionantes y deliciosos de los productos alimenticios, lo que influye directamente en la preferencia, selección y deseos de adquisición por parte de los consumidores (Delgado-Vargas & Paredes-Lopez, 2003).

Uno de los aditivos de gran importancia son los pigmentos comestibles, estos permiten aumentar la aceptabilidad de los productos alimenticios, debido a que se ha debatido la seguridad de los pigmentos sintéticos, ocasionando la reducción del número de colorantes permitidos (Giusti & Wrolstad, 2003). Debido a ello se ha incrementado el interés por los colorantes naturales por su eco-amistad y baja toxicidad (Chethana et al., 2007).

Las antocianinas son pigmentos responsables de los colores naranja, rosa, rojo, violeta y azul de flores y frutos de algunas plantas (Pazmino-Duran et al., 2001) (Castañeda-Ovando, et al., 2009). Una propiedad importante es su actividad antioxidante, ya que ayuda a prevenir enfermedades como cáncer, diabetes, problemas cardiovasculares y neuronales (Konczak & Zhang, 2004).

El rango de color que poseen las antocianinas se debe a la estructura de la molécula, al aumentar la hidroxilación se originan desplazamientos hacia tonos azules y los incrementos en las metoxilaciones producen tonos rojos (Garzón, 2008). Estas reacciones ocurren por el cambio de pH. Los cambios de pH son una variable importante para comunicar el deterioro de varios productos alimenticios, lo que ha impulsado el estudio de extracción de antocianinas para su uso como indicador de pH.

La mora contiene compuestos fenólicos como los ácidos fenólicos, taninos, estilbenos, flavonoides y antocianinas, pero lo que ha generado mayor investigación son sus propiedades (Seeram, 2008). Existen varios estudios que indican que la ingesta de mora tiene un impacto positivo en la salud humana (de Souza et al., 2014). Se ha establecido que las antocianinas mayores y menores de la mora son la cianidina-3-glucósido y la cianidina-3-rutinósido, respectivamente (Fan-Chiang & Wrolstad, 2005).

La mora es una de las frutas más representativas en cuanto a cobertura geográfica sembrada en Colombia, se produce en 20 departamentos del país, Cundinamarca

representa el territorio con mayor producción; este departamento abarca cerca del 34% de la producción nacional (Escobar & Lizarralde, 2013) .

La mora es uno de los frutos más consumidos por los colombianos (FAO, 2013). De igual forma, del total de la producción de la mora, el 80% se destina a consumo nacional, de lo cual el 60% es procesado para la elaboración de jugos, mermeladas y salsas. El 20% restante de la producción total es destinado a la exportación, la cual se dirige principalmente a la comunidad latina de Estados Unidos y Europa (FAO, 2013). En el año 2013 las principales exportaciones se concentraron en EE.UU, España, Rusia, Reino Unido, Australia y Panamá. Por otro lado, las principales importaciones de mora en el año 2013 han sido de Chile con el 86% y EE.UU. con un 15% (Escobar Torres, 2015).

A nivel mundial no se tienen datos precisos de producción, áreas sembradas y rendimientos para la mora, sin embargo, en la producción de frutas tropicales en el año 2011 Colombia se ubicó en el puesto diez, con 462.762 toneladas de diferentes frutas aportando el 3% del total de la producción mundial (FAO, 2011).

Un método de extracción eficiente es aquel que logra obtener antocianinas con pocos solventes y sin ninguna alteración en su estructura en estado natural (Chandrasekhar, Madhusudhan, & Raghavarao, 2012), por esta razón se han realizado varios estudios para aumentar la eficiencia de la extracción de antocianinas; Garcia-Mendoza et al. (2017) evaluó diferentes tratamientos (soxhlet, lecho agitado y asistencia con ultrasonido) en la extracción de antocianinas de residuos de juçara. Flores (2017) evaluó el uso de enzimas, ultrasonido, microondas y maceración para mejorar la extracción de antioxidantes de las bayas de sauco.

El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto de diferentes pretratamientos (lío-filización, ultrasonido, microondas) en la extracción de antocianinas de dos variedades de mora: Castilla (*R. glaucus*) y Silvestre (*R. adenotrichos*); para determinar la variedad y el proceso de extracción con mayor eficiencia. El extracto con mayor eficiencia será utilizado como indicador visual de pH.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Productos químicos

Para este proyecto se emplearon los siguientes reactivos: etanol al 60% (V/V) acidificado al 1% con ácido cítrico, ácido clorhídrico 37%, ácido acético glacial, cloruro de potasio, acetato de sodio trihidratado, ácido ascórbico, aceite mineral, nitrito de sodio, acetato de sodio, hidróxido de sodio y cloruro férrico hexahidratado; (Merk S.A. Bogotá, Colombia). Para las pruebas de poder antioxidante se empleó TPTZ (2,4,6-Tripyridyl-s-Triazine), DPPH (2,2Diphenyl-picrylhydrazyl), y el trolox (6-hydroxy-2,5,7,8tetramethylchroman-2-carboxylic acid) (Auros químicos Ltda. Bogotá, Colombia).

Todos los reactivos empleados para el desarrollo experimental fueron suministrados por la universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano.

2.2 Material Vegetal

El material vegetal se conformó por dos variedades de mora, de cada una de ellas se adquirieron 10 Kg; fueron obtenidas en el mes de junio de 2017, la mora Castilla (*R. glaucus*) se adquirió congelada de la marca Freskifruta, la cual se encuentra lavada, desinfectada y lista para preparar; se adquirió congelada en una presentación de 1000g. La mora Silvestre (*R. adenotrichos*) fue comprada en el municipio Guasca-Cundinamarca en condiciones ambientales de temperatura de 13°C y una humedad relativa del 91%. En ambos casos la mora fue almacenada y transportada a bajas temperaturas 4-6 °C en neveras portátiles hasta la universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano.

La mora silvestre fue seleccionada descartando aquellas que presentaran daños físicos, se retiró el pedúnculo de la mora y posteriormente se lavó para eliminar cualquier suciedad procedente del campo.

Ambas variedades se mantuvieron a 4°C durante todo el proceso experimental; antes de utilizarse se descongeló la cantidad necesaria (10g) a temperatura ambiente (20 ± 2 °C) en un tiempo aproximado de 10 minutos hasta recibir el tratamiento adecuado.

2.3 Caracterización de la Mora

Se tomaron 30 g de cada variedad de mora, inicialmente con un pie de rey de acero de 200 mm se determinó el diámetro polar y ecuatorial (Calibre digital T304B.W-1220, Oregón, USA), los °Brix se midieron mediante un refractómetro (ATAGO pocket refractometer, Tokio, Japón), el pH se midió con un potenciómetro con una precisión de pH relativo de ± 0.01 (SevenEasy™ pH Meter S20, Switzerland, Suiza), y finalmente se obtuvo el porcentaje de humedad de la fruta mediante una balanza de humedad (Mettler Toledo HG43-s Halogen, Switzerland, Suiza).

2.4 Preparación del material vegetal

Para la preparación del material vegetal se tomaron 500 g de mora y se realizó un corte longitudinal a lo largo de su diámetro polar, posteriormente se realizaron aproximadamente 3 cortes longitudinales a lo largo del diámetro ecuatorial en secciones de 1 cm. Finalmente la mora se mantuvo a 4°C para su posterior uso. Este proceso se realizó para ambas variedades.

2.5 Diseño experimental

Se llevó a cabo un diseño experimental factorial de 4 variables y 2 niveles (2⁴), obteniendo un resultado de 16 experimentos los cuales se realizaron por triplicado. Se evaluaron las siguientes variables: variedad de mora (X1), pretratamiento de liofilización (X2), pretratamiento de microondas (X3) y pretratamiento de ultrasonido (X4). En la Tabla 1 se muestra la distribución de los niveles de cada una de las variables.

Tabla 1. Niveles de las variables para el diseño experimental (2⁴).

Variables	Niveles	
	1	-1
Variedad de mora (X1)	Castilla	Silvestre
Pretratamiento de liofilización (X2)	Presente	Ausente
Pretratamiento de microondas (X3)	Presente	Ausente
Pretratamiento de ultrasonido (X4)	Presente	Ausente

2.6 Extracción de antocianinas

2.6.1 Método convencional

El proceso de lixiviación se efectuó según de Vargas et al. (2017) modificado, realizando 3 extracciones de 10 minutos cada una, en los cuales se empleó etanol al 60% (V/V) acidificado al 1% con ácido cítrico; se tomaron 10 g de la fruta y en cada extracción se emplearon 30 ml de etanol (relación 1:3 muestra de fruta a solvente), utilizando 90 ml en total para cada muestra; cada lavado se realizó a temperatura ambiente ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) y con agitación constante a 120 ± 5 rpm en un Shaker (Elementos Químicos Ltda., Bogotá, Colombia). Durante la extracción la muestra se protegió de la luz.

2.6.2 Pretratamientos

2.6.2.1 Liofilización

Se tomaron 250 g de mora en trozos (numeral 2.4), esta se congeló a -34°C por 24 horas y posteriormente se liofilizó a 22°C , 4,3 mbar por 7 días hasta obtener una humedad entre 10 a 14 % (Liofilizador Drycol, Bogotá, Colombia). A continuación, la mora se molió y tamizó mediante un molino de palas con un tamiz de 0,75mm (Retsch sk100, Hann, Alemania); las muestras obtenidas de cada variedad de mora fueron empacadas al vacío (Multivac chamber machine c200, Bremen, Alemania) y almacenadas a temperatura ambiente ($20 \pm 2^\circ\text{C}$).

2.6.2.2 Microondas

Este pretratamiento se realizó mediante un microondas de marca Haceb de 2450 MHz, se tomaron 10 g de mora en trozos (numeral 2.4) en un crisol y se aplicó una exposición de 30 s (1 ciclo), posteriormente la muestra se enfrió a temperatura ambiente; este proceso se repitió con la misma muestra hasta completar 3 ciclos (Flores, 2017). Durante la extracción la muestra se protegió de la luz.

2.6.2.3 Ultrasonido

Se realizó mediante un ultrasonido (Elmasonic S 300, Singen, Germany) con las siguientes características: potencia 300 Watts, frecuencia 50/60 Hz, intensidad de pulso 1. Se tomaron 10 g de mora en trozos (numeral 2.4) en un tubo falcón agregando 30 ml de etanol, posteriormente se sumergieron en el agua por 10 minutos (1 ciclo) hasta completar 3 ciclos

para cada muestra. Durante cada ciclo se mantuvo en agitación constante de forma manual, a temperatura ambiente y protegido de la luz.

Las muestras que fueron sometidas a ultrasonido no requieren de una extracción convencional (numeral 2.6.1), debido a que en este pretratamiento se cumple con el número de extracciones y tiempo requerido.

Finalmente, todas las muestras se centrifugaron a 4000 rpm durante 15 minutos en una centrifuga (Hettich rotofix 32 zentrifugen, Schwerin, Alemania). El sobrenadante (extracto) se almacenó en un frasco ámbar a 4°C para su posterior cuantificación de antocianinas.

2.7 Cuantificación de antocianinas por el método de pH diferencial

La cuantificación de antocianinas se realizó mediante el método de pH diferencial descrito por Kuskoski et al. (2005). La absorbancia fue medida con un espectrofotómetro (Espectrofotómetros evolution 300 thermo scientific, Maltoc, Inglaterra). El resultado obtenido se expresó como mg cianidina-3-glucósido / 100 g de muestra.

2.8 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos de la cuantificación de antocianinas por el método pH diferencial se analizaron mediante un análisis de efectos principales, para identificar como afecta cada pretratamiento en la extracción de antocianinas de la mora, posteriormente, se realizó un análisis de interacción entre las variables y finalmente se efectuó el diagrama de Pareto para identificar que pretratamientos son estadísticamente significativos en el proceso de extracción. Todo el análisis se realizó con el software Minitab 18.

2.9 Actividad antioxidante del extracto

La determinación antioxidante de los extractos se realizó a las muestras que demostraron generar mayor eficiencia en su proceso de extracción y a las muestras que no se sometieron a ningún pretratamiento (mora en trozos con extracción por el método convencional).

2.9.1 Determinación de la capacidad reductora de Fe⁺² ensayo FRAP

Este método se realizó según Benzie & Strain (1996), y consiste en la reducción del complejo tripiridiltriazina férrica (Fe³⁺- TPTZ) al complejo ferroso (Fe²⁺-TPTZ) en medio ácido y pH bajo, se desarrolla un color azul en presencia de un agente reductor (antioxidante) el cual posee un máximo de absorbancia en 593 nm. Inicialmente se preparó el reactivo FRAP, éste se compone de buffer acetato de sodio pH 3,6 300 mM, cloruro férrico 20 mM y TPTZ 0,01M (10:1:1). Luego, se mezcló el extracto óptimo con etanol al 96% hasta que los valores obtenidos se encontraran dentro de la curva patrón, de esta dilución se tomaron 30 µL y se mezcló en un eppendorf con 30 µL de etanol-agua (80:20) y 940 µL del reactivo FRAP. A continuación, se incubó durante 1 hora a 37°C cubierto de la luz, para finalmente homogenizar las muestras y leer su absorbancia a 593 nm en el espectrofotómetro (Espectrofotómetros evolution 300 thermo scientific, Matlock, Inglaterra).

Los datos obtenidos de absorbancia se compararon con una curva patrón de Trolox con un R² =0,99 entre 0,10 – 1,34 mM Trolox.

2.9.2 Determinación de la capacidad reductora ensayo DPPH

Esté método se realizó según Brand-Williams et al. (1995) , ocurre que un átomo de la molécula captadora DPPH (antioxidante) acepta un hidrógeno ocasionando la reducción de DPPH a DPPH₂. Para ello se mezcló el extracto óptimo con etanol al 96% hasta que los valores obtenidos se encontraran dentro de la curva patrón, de esta dilución se tomaron 75 µL y 1425 µL del extracto DPPH (6,29x10⁻⁵ M en etanol al 96%). Esta disolución se incubó durante 1 hora a 37°C cubierto de la luz, para finalmente homogenizar las muestras y leer su absorbancia a 515 nm en el espectrofotómetro (Espectrofotómetros evolution 300 thermo scientific, Matlock, Inglaterra).

Los datos obtenidos de absorbancia se compararon con una curva patrón de Trolox con un R² =0,99 entre 0,03 – 0,6 mM Trolox.

2.10 Determinación de color

El color del extracto se determinó con un colorímetro (Konica Minolta, Chroma-Meter CR-410, Tokio, Japón), con el método en líquidos según Arrazola et al. (2014). Los parámetros L*, a*, b*, se midieron de cada extracto donde L* representa la luminosidad (100: blanco y 0: negro), los parámetros a* y b* expresan la cromacidad (+a* : rojo, -a* : verde)(+b* : amarillo, -b* : azul) (Gil & Sánchez, 2010). Finalmente, a partir de estos valores se determinó la saturación del color C* y el ángulo de tono °H (Arrazola et al., 2014).

2.11 Aplicación del extracto como indicador de pH

2.11.1 Preparación soluciones Buffer

La preparación de las soluciones buffer se realizó según Palomares et al. (2009) ; para ello, se empleó ácido fosfórico (H₃PO₄ 2M) e hidróxido de sodio (NaOH 2M) para abarcar el espectro de pH requerido.

2.11.2 Medición de color extracto a diferentes pH

El color del extracto se determinó con un colorímetro (Konica Minolta, Chroma-Meter CR-410, Tokio, Japón). Posteriormente se determinaron los parámetros L*, a*, b*, C* y °H (Arrazola et al., 2014).

2.11.3 Medición de pH de diferentes sustancias.

Para este proceso se agregaron 200µL del extracto de mora a 2 ml de las siguientes sustancias: (alcohol antiséptico, clorox, vinagre blanco, bicarbonato, almíbar de durazno, zumo de granadilla, zumo limón, zumo lima, zumo de melón y agua pura). Posteriormente los colores obtenidos se compararon con la escala de color del extracto para determinar el pH correspondiente. Finalmente se midió el pH de las sustancias con un potenciómetro con una precisión de pH relativo de ± 0.01 (SevenEasy™ pH Meter S20, Switzerland, Suiza) y con papel indicador universal (Macherey-Nagel 902 04, Düren, Alemania) para realizar su comparación.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Caracterización de la Mora

Los resultados de la caracterización de la mora Silvestre y Castilla se observan en la tabla 2 y 3, respectivamente.

Tabla 2. Caracterización de la mora Silvestre.

Mora silvestre (<i>R. adenotrichos</i>)	
Parámetro	Promedio
pH Pulpa	3,163 ± 0,09
° Brix Pulpa	5,667 ± 0,6
Diámetro ecuatorial (mm)	15,752 ± 1,05
Diámetro Polar (mm)	20,359 ± 1,49
Diámetro polar/ Diámetro ecuatorial	1,294 ± 0,07
Humedad (%)	85,253 ± 0,30
Acidez titulable (%Ácido Cítrico)	1,715 ± 0,02
Índice de madurez (°Brix/ Acidez titulable)	3,329 ± 0,03

Según lo descrito por Calvo-Castro et al. (2013), la mora silvestre posee un pH de 2,55, 10,2 °brix, 88,9 % humedad, acidez de 2,83 % ácido málico y un índice de madurez de 3,64. Cabe resaltar que esta variedad no es muy estudiada, lo que implica que son frutos que no cuentan con puntos de comparación. De igual forma se encontraron datos muy parecidos a los obtenidos experimentalmente. Cabe resaltar que la mora Silvestre no se consume con tanta frecuencia debido a que es un fruto pequeño y posee un sabor amargo, por lo cual se considera como maleza, provocando que su uso como materia prima para la extracción de antocianinas sea más económico a comparación con la mora castilla.

Tabla 3. Caracterización de la mora Castilla

Mora Castilla (<i>R. glaucus</i>)	
Parámetro	Promedio
pH Pulpa	3,077 ± 0,03
° Brix Pulpa	7,833 ± 0,06
Diámetro ecuatorial (mm)	20,909 ± 1,76
Diámetro Polar (mm)	30,086 ± 2,50
Diámetro polar/ Diámetro ecuatorial	1,449 ± 0,18
Humedad (%)	87,681 ± 0,45
Acidez titulable (%Ácido Cítrico)	1,888 ± 0,01
Índice de madurez (°Brix/ Acidez titulable)	4,163 ± 0,01

En el caso de la mora Castilla según estudios realizados por Ayala, Valenzuela, & Bohórquez (2013), se encontró que el diámetro polar ($27,05 \pm 3,68$ mm) y ecuatorial ($20,22 \pm 2,31$ mm) corresponde a un fruto de grado de madurez (GM) 6; el cual es similar al medido experimentalmente. Se obtuvo un pH mayor al reportado para un fruto GM 6 ($2,88 \pm 0,01$), los sólidos solubles dieron cercanos a un fruto de GM 5 ($7,93 \pm 0,12$). Además, el porcentaje de humedad obtenido se encontró entre los grados de madurez 5 y 6 ($86,42 \pm 1,27$ y $88,76 \pm 0,53$ respectivamente), la acidez obtenida fue menor a la determinada para un GM 6 ($2,25 \pm 0,15$), y finalmente el índice de madurez alcanzado es mayor al GM 6 ($3,57 \pm 0,25$). Con los datos anteriores se observa que la mora Castilla presentó características para los estados de madurez 5 y 6 correspondiente a un fruto con mitad de área roja y mitad morada y un fruto morado oscuro, respectivamente.

Finalmente, al comparar la variedad Silvestre con la variedad castilla (Tabla 2 y 3) se determinó que en los parámetros de pH, humedad y acidez titulable son similares, sin embargo, hay diferencia entre los parámetros físicos como diámetro polar y ecuatorial, siendo la silvestre más pequeña. Además, los parámetros de °Brix y acidez son menores en la variedad Silvestre, siendo esta mora más ácida.

3.2 Extracción antocianinas

El contenido de antocianinas se muestra en tabla 4.

Tabla 4. Resultados de cuantificación de antocianinas por pH diferencial de las diferentes muestras.

Muestras	Variables				Antocianina (mg/100g) *
	X1	X2	X3	X4	
1	1	-1	-1	-1	32,50±2,47
2	1	1	-1	-1	115,64±0,13
3	1	-1	1	-1	37,79±2,47
4	1	-1	-1	1	54,66±5,46
5	1	-1	1	1	66,05±0,05
6	1	1	1	-1	130,30±12,70
7	1	1	-1	1	187,96±11,28
8	1	1	1	1	205,99±21,87
9	-1	-1	-1	-1	38,55±2,03
10	-1	1	-1	-1	177,19±11,37
11	-1	-1	1	-1	41,19±1,30
12	-1	-1	-1	1	72,09±1,64
13	-1	-1	1	1	78,49±0,28
14	-1	1	1	-1	203,37±8,57
15	-1	1	-1	1	394,53±24,11
16	-1	1	1	1	429,16±2,44

* Antocianina expresada en mg de cianidina-3-glucosido/100 g de muestra

La cantidad de antocianinas de la mora Castilla y Silvestre varió de 32,50 a 205,99 y de 38,55 a 429,16 mg/100 g, respectivamente. Las muestras con menor cantidad de antocianinas fueron aquellas a las que no se les realizó ningún pretratamiento, igualmente, el rendimiento más alto en las dos variedades de mora se logró con la combinación de los tres pretratamientos. La variedad Silvestre obtuvo mayor cantidad de antocianinas en todos los tratamientos en comparación con la mora Castilla.

Estos resultados son similares a los reportados por Kuskoski et al. (2005), quien obtuvo $41,8 \pm 2,6$ mg/100 g de mora, obteniendo mayor cantidad de antocianinas a comparación con otros frutos como lo son el açaí $22,8 \pm 0,8$ mg/ 100 g, la uva $30,9 \pm 0,1$ mg/ 100 g y la fresa $23,7 \pm 2,3$ mg/ 100g. Así mismo, los datos obtenidos se encuentran dentro del rango conseguido por otros autores: uno de ellos al extraer antocianinas de bayas pertenecientes a los géneros Rubus, Ribes y Aronia donde obtuvieron antocianinas totales que variaron desde 22,0 a 460,5 mg/100 g de peso seco (Benvenuti et al., 2004), el segundo estudio extrajo antocianinas de la Mora (*Rubus occidentalis*) y obtuvo 170 a 430 mg/100g de fruta fresca (Tian et al., 2005).

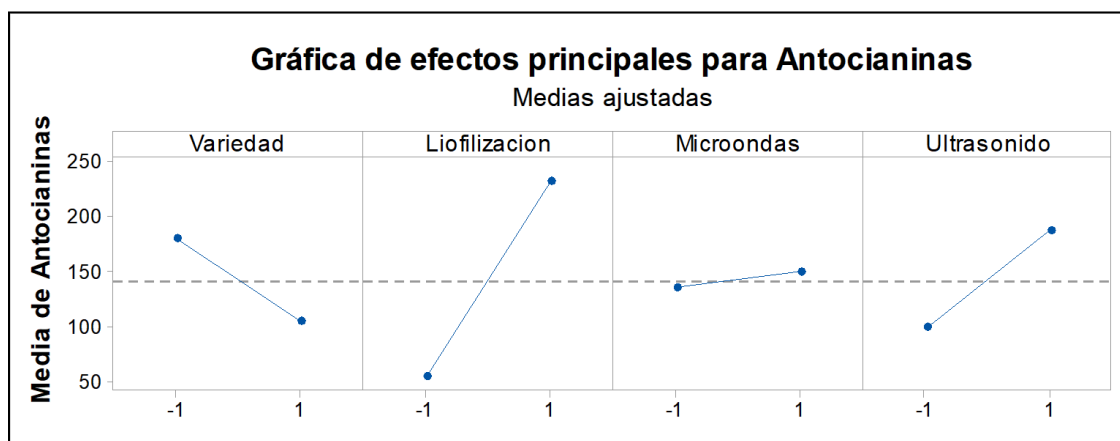


Figura 1. Efectos principales para la extracción de antocianinas

En la figura 1, se observa los efectos principales de cada variable en la extracción de antocianinas. El pretratamiento de microondas afectó de forma leve el contenido de antocianinas del extracto. Por otra parte, las variables de los pretratamientos de liofilización y ultrasonido afectaron positivamente la concentración de antocianinas de la mora, destacando el pretratamiento de liofilización. Finalmente, se observó que la variedad de mora Silvestre afectó favorablemente el contenido de antocianinas.

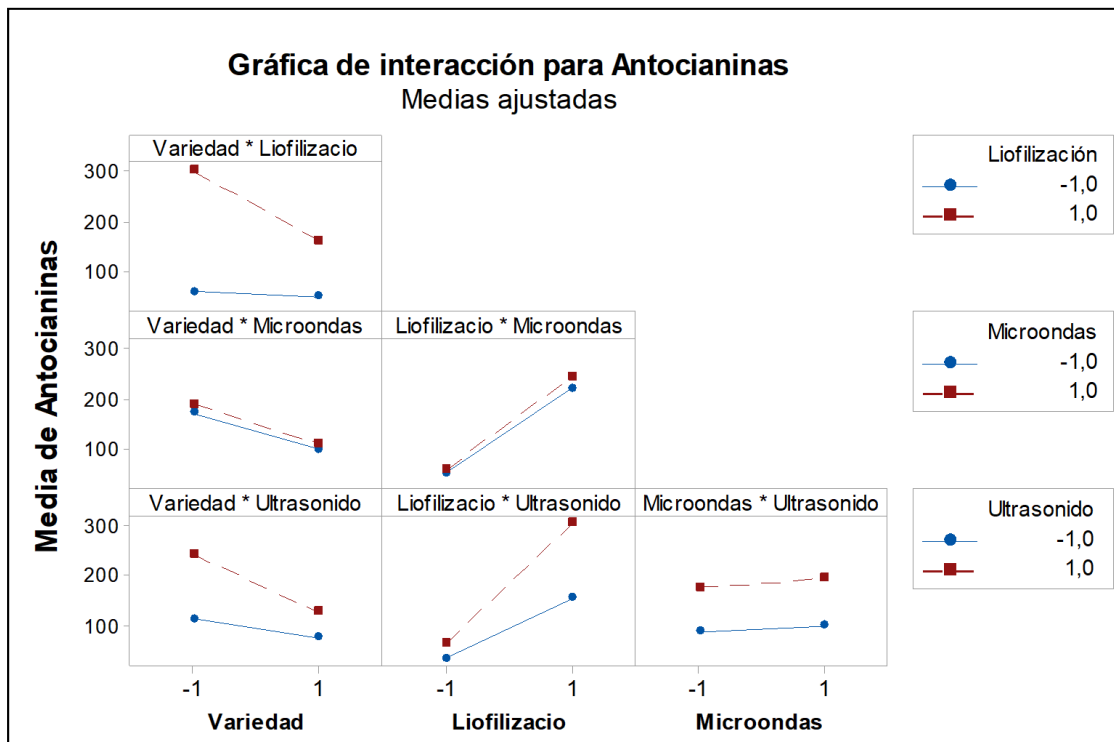


Figura 2. Interacción de las variables para la extracción de antocianinas de la mora.

La figura 2, muestra las posibles interacciones entre las variables para la extracción de antocianinas de la mora Castilla y Silvestre.

El pretratamiento de microondas presentó interacciones muy bajas casi nulas con las demás variables. Por el contrario, se observó que la mayor interacción se presenta entre la variedad de la mora y el pretratamiento de liofilización. Sin embargo, esta grafica no permite visualizar si estas interacciones son estadísticamente significativas, para esto se utilizó el diagrama de Pareto que se muestra en la figura 3.

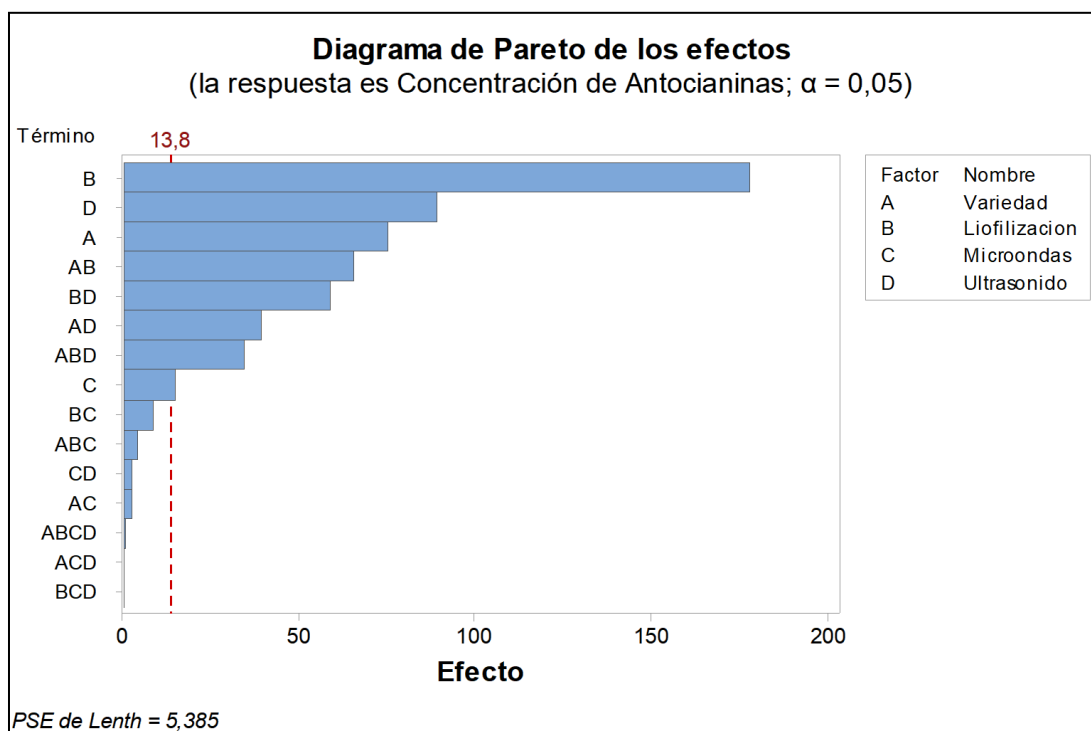


Figura 3. Diagrama de Pareto de los efectos en la extracción de antocianinas.

La figura 3, muestra que al utilizar el tratamiento de microwondas hay un efecto estadísticamente significativo en la extracción de antocianinas, no obstante la interacción de microwondas con la variedad y los demás pretratamientos no es estadísticamente significativo. Las demás interacciones son estadísticamente significativas en el proceso de extracción.

Además, los efectos que producen la variedad de mora y los pretratamientos de liofilización, ultrasonido son los más altos a comparación del pretratamiento de microwondas. Esto se debe a que el pretratamiento con microwondas genera energía electromagnética, creando vibraciones de las moléculas de agua favoreciendo la difusión de componentes antioxidantes en el solvente (Flores, 2017). Este pretratamiento tiene una desventaja, ya que en tiempos cortos se puede aumentar la temperatura hasta a 70 °C, lo que degrada a las antocianinas. Además, ya que su interacción es sobre las moléculas de agua este pretratamiento es insignificante con muestras secas, como lo son la mora liofilizada; por esta razón la interacción entre estos dos pretratamientos tiene un efecto casi nulo.

Por otro lado, el pretratamiento con ultrasonido produce cavitación, generando simultáneamente un proceso de hidratación y fragmentación, facilitando la difusión de solutos al solvente de extracción (Soria & Villamiel, 2010). Este pretratamiento es muy utilizado en la extracción de componentes sensibles al calor, debido a que sus condiciones de operación generalmente son a temperatura ambiente, logrando que las propiedades estructurales, moleculares y la funcionalidad de la mayoría de los extractos no muestren cambios significativos (Soria & Villamiel, 2010). Además, este pretratamiento se ve

favorecido por el tamaño de partícula, por lo tanto, su interacción con el pretratamiento de liofilización es alto.

El pretratamiento con mayor eficiencia en la extracción fue la liofilización, esto se debe que al retirar el agua por sublimación no se afecta la estructura de los compuestos termosensibles y logra concentrar los solutos en la muestra.

Se observó que la combinación de los pretratamientos liofilización, ultrasonido y microondas producen un efecto estadísticamente insignificante. Por lo tanto, se considera que las mejores extracciones se obtuvieron mediante la aplicación combinada de los pretratamientos liofilización-ultrasonido en las dos variedades de mora.

3.3 Actividad antioxidante del extracto

Los resultados obtenidos mediante los ensayos DPPH y FRAP se recopilan en la tabla 5.

Tabla 5. Determinación de la actividad antioxidante de los extractos de mora aplicando los métodos DPPH y FRAP.

Muestra	Tratamiento	Actividad antioxidante*	
		DPPH	FRAP
1	Mora castilla en trozos	2,23±0,11	1,96±0,07
7	Mora castilla en trozos tratada con liofilización y ultrasonido	3,89±0,14	3,40±0,04
9	Mora silvestre en trozos	2,50±0,10	2,47±0,01
15	Mora silvestre en trozos tratada con liofilización y ultrasonido	4,33±0,04	3,51±0,01

* Actividad antioxidante expresada en equivalentes de $\mu\text{mol Trolox/g}$ de muestra

Se observó que la mora Silvestre con y sin tratamiento presentó mayor actividad antioxidante en ambos ensayos realizados; la alta capacidad antioxidante de la mora se atribuye a su contenido de ácidos fenólicos y antocianinas (Pellegrini et al., 2003), de igual forma se reporta que la actividad antioxidante posee alteraciones entre los frutos debido a sus características genéticas, factores ambientales, prácticas agronómicas, madurez y escenarios poscosecha los cuales afectan su estructura química y así mismo su contenido de antioxidantes (Liu & Boyer, 2002) (Tomás-Barberán & Espín, 2001).

De igual manera se observó que las muestras con tratamiento contienen mayor actividad antioxidante; debido a que la liofilización reduce la actividad del agua, concentrando los antioxidantes (Badui Dergal & Valdés Martínez, 2006).

Los datos obtenidos son similares a los reportados por Kuskoski et al. (2005) donde la actividad antioxidante de la mora fue de $5,9 \pm 0,3 \mu\text{mol Trolox/g}$ de muestra utilizando el método de DPPH, por otro lado los resultados obtenidos experimentalmente de la mora Castilla y Silvestre son similares a los reportados para el vino blanco reportadas por Stratil et al.(2008) con valores que oscilan entre $0,86 \pm 0,02$ a $2,14 \pm 0,01 \text{ mmol Trolox/l}$ de muestra con el método de FRAP y $0,61 \pm 0,08$ a $1,78 \pm 0,03 \text{ mmol Trolox/l}$ de muestra.

3.4 Determinación de color de los extractos

A continuación, se observan los resultados de la medición del color de los extractos obtenidos de las dos variedades de mora con un pH $3 \pm 0,5$.

Tabla 6. Determinación de color de los extractos de mora Castilla y Silvestre.

Extracto	L	a*	b*	C*	°Hue	Color
Mora Castilla	46,17	57,19	28,64	63,96	26,61	
Mora Silvestre	52,32	58,53	29,43	65,51	26,70	

Como se puede observar en la tabla 6, el valor de L* indica que la mora castilla es más clara que la mora silvestre indicando que dicho extracto estaría menos diluido. Los valores de a* y b* indican las coordenadas cromáticas en función de los colores rojo/verde amarillo/azul respectivamente, según los datos obtenidos se puede observar que el color varió y esto puede deberse a la concentración de antocianinas que tienen las muestras. El Cromo es el valor que indica la saturación o pureza, como se puede observar el extracto de mora silvestre obtuvo un Cromo mayor indicando que el extracto es más puro.

Al comparar los datos obtenidos con la literatura, se encontró que el vino tinto de origen de las islas de Tenerife (Tacoronte-Acentejo) con valores de L* = 69,9, a* = 30,32, b* = 6,98, C* = 31,18 y °H = 13,35 (Valido et al., 2000). Los valores obtenidos experimentalmente varían con la literatura, debido a que la concentración de antocianinas en el extracto y las condiciones de pH en que se encuentre generan cambios en su color.

3.5 Aplicación del extracto como indicador de pH

Se realizaron 13 buffers y se midió el cambio de color que presentó el extracto a diferentes pH, con sus coordenadas CIELAB y CIELCH para cada variedad de mora.

En la tabla 7 y 8 se observa que los colores obtenidos para cada extracto varían, indicando que el tipo de variedad de mora es una variable relevante para estandarizar el color de un indicador.

Tabla 7. Determinación de color de los extractos de la mora Castilla en diferentes pH.

pH	L	a*	b*	C*	°Hue
1,03	47,65	59,63	30,80	67,11	27,32
2,02	50,9	59,63	29,89	66,70	26,63
3,1	52,96	56,51	27,28	62,75	25,77
4,06	59,98	46,43	18,76	50,08	22
4,98	72,82	29,57	9,86	31,17	18,44
6,07	57,99	24,92	3,6	25,18	8,22
7,1	45,8	28,51	9,4	30,02	18,25
7,97	30,22	20,96	5,78	21,74	15,42
9,03	28,67	20,25	5,44	20,97	15,04
10,02	26,38	18,72	4,67	19,29	14,01
11,06	15,76	15,65	6,28	16,86	21,87
12,04	20,45	-23,45	24,78	34,12	133,42
12,94	30,34	-23,69	26,7	35,69	131,58

Tabla 8. Determinación de color de los extractos de la mora Silvestre en diferentes pH.

pH	L	a*	b*	C*	°Hue
1,03	46,17	57,19	28,64	63,96	26,61
2,02	48,00	59,70	30,07	66,84	26,74
3,1	50,90	59,63	29,89	66,70	26,63
4,06	66,21	38,00	13,81	40,43	19,98
4,98	74,84	22,20	25,79	34,03	49,28
6,07	66,76	19,36	2,28	19,49	6,72
7,1	54,21	27,89	3,87	28,16	7,90
7,97	38,11	30,73	13,12	33,41	23,12
9,03	31,43	26,41	11,63	28,86	23,77
10,02	28,02	24,23	10,57	26,44	23,57
11,06	15,76	15,65	6,28	16,86	21,87
12,04	22,60	-18,91	7,72	20,43	157,79
12,94	39,46	-38,58	32,78	50,63	139,65

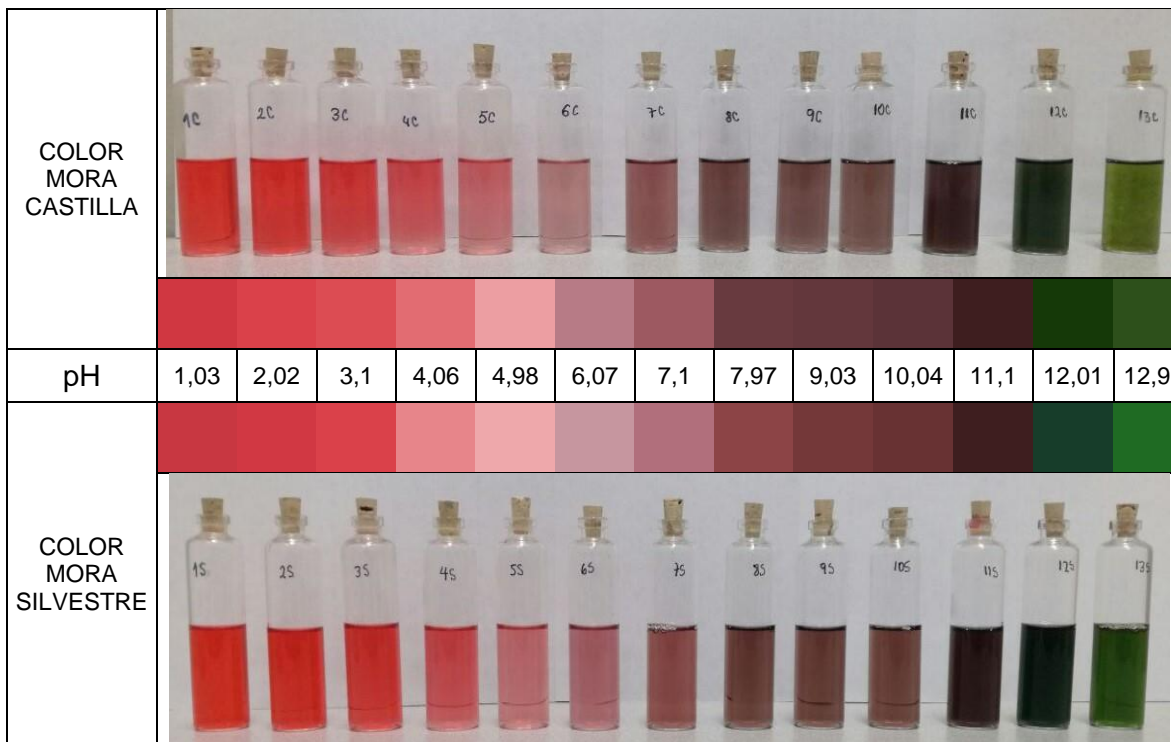
































Figura 4. Color de extracto de mora Castilla y Silvestre en diferentes pH.

Como se aprecia en la figura 4, cada extracto varió en sus tonalidades, pero en ambos se destaca que a pH ácido el extracto presenta un tono rojo, en pH neutro tiene un tono morado tenue y a pH alcalino se torna verde. En la siguiente tabla se observa la medición de color de cada uno de las soluciones. Así mismo, se observa que a pH mayores a 7, las antocianinas se degradan rápidamente, dificultando distinguir el pH luego de un tiempo determinado.

Al comparar los resultados conseguidos de pH en diferentes sustancias como se muestra en la tabla 9, permite establecer que los indicadores 1 y 2 presentan rangos de variación que les aprueba ser utilizados como indicadores visuales de pH; logrando mejores resultados con el indicador 2, de igual forma este indicador permite distinguir más fácilmente la diferencia de color en las sustancias sin importar su carácter básico o ácido.

Tabla 9. Resultados indicadores visuales de pH en sustancias caseras.

Sustancia	pH experimental (Potenciómetro)	Papel indicador Universal	Indicador 1*		Indicador 2*		
Zumo de lima	2,52	2		2,02		2,02	
Vinagre blanco	2,84	3		3,1		3,1	
Zumo de limón	2,69	3		3,1		3,1	
Almíbar de durazno	3,56	3		4,06		4,06	
Zumo de granadilla	4,16	5		4,98		4,06	
Zumo de melón	5,81	6		6,07		6,07	
Agua Pura	6,97	7		7,1		7,1	
Alcohol Antiséptico	7,38	7		7,97		7,1	
Bicarbonato de Sodio	8,43	8		7,97		9,03	
Clorox	10,55	10		10,04		11,1	

*El indicador 1 y 2 son los extractos obtenidos de mora Castilla y Silvestre, respectivamente.

4. CONCLUSIONES

En la extracción de antocianinas de la mora Castilla y Silvestre se observó que las mejores condiciones de extracción fueron con la aplicación combinada de los pretratamientos de liofilización y ultrasonido, logrando en la mora Castilla y Silvestre un contenido de antocianinas de $187,96 \pm 11,28$ y de $394,53 \pm 24,11$ mg de cianidina-3-glucósido/ 100 g de fruto, respectivamente.

La variedad de mora y los pretratamientos de liofilización y ultrasonido poseen efectos estadísticamente significativos en la extracción de antocianinas, siendo la liofilización la de mayor efecto. Sin embargo, el pretratamiento de microondas posee un efecto estadísticamente no significativo.

La variedad de mora Silvestre presentó mayor cantidad de antocianinas y antioxidantes en todos los extractos obtenidos, además, al ser considerada un desecho (maleza) es más rentable su utilización como materia prima en la extracción de antocianinas.

Fue posible el uso de los extractos obtenidos de mora Silvestre y Castilla como indicador visual de pH, indicando que podrían implementarse para comunicar el deterioro de productos alimenticios reemplazando los colorantes sintéticos.

5. AGRADECIMIENTOS

Inicialmente queremos agradecer a Dios y la Virgen, nuestras familias, por darnos la oportunidad de cursar esta carrera. Gracias a la profesora Martha Patricia Tarazona, directora de tesis, por su conocimiento y guía a lo largo de este proyecto.

Agradecemos a la Universidad Jorge Tadeo Lozano por brindarnos el apoyo necesario para la ejecución de este proyecto. Gracias a Juan Felipe Mendoza, Carol Delgado, Andrea Álvarez, Daniela Guevara y Nixon Meneses por su compañía y apoyo incondicional durante este proceso.

Gracias a William Riaño quien facilitó la adquisición de la mora Silvestre en el municipio de Guasca-Cundinamarca.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arazola, G., Herazo, I., & Alvis, A. (2014). Obtención y Evaluación de la Estabilidad de Antocianinas de Berenjena (*Solanum melongena* L.) en Bebidas. *Información Tecnológica*, 25(3), 43–52. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642014000300007>
- Ayala, L. C. ., Valenzuela, C. P. ., & Bohórquez, Y. (2013). CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE MORA DE CASTILLA (*Rubus glaucus* Benth) EN SEIS ESTADOS DE MADUREZ. *Biotecnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 11(2), 10–18. Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v11n2/v11n2a02.pdf>
- Badui Dergal, S., & Valdés Martínez, S. E. (2006). *Química de los alimentos* (4a ed.). México: Pearson Education. <https://doi.org/https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Benvenuti, S., Pellati, F., Melegari, M., & Bertelli, D. (2004). Polyphenols, anthocyanins, ascorbic acid, and radical scavenging activity of Rubus, Ribes, and Aronia. *Food Science*, 69(3), 164–169. Retrieved from <https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-1942506037&origin=inward&txGid=ea69dba09061db5660399464798a7249>
- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70–76. <https://doi.org/10.1006/ABIO.1996.0292>
- Brand-Williams, W. ., Cuvelier, M. E. ., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Calvo-Castro, L., Syed, D. N., Chamcheu, J. C., Vilela, F. M. P., Pérez, A. M., Vaillant, F., ... Mukhtar, H. (2013). Protective effect of tropical highland blackberry juice (*Rubus adenotrichos* Schltld.) against UVB-mediated damage in human epidermal keratinocytes and in a reconstituted skin equivalent model. *Photochemistry and Photobiology*, 89(5), 1199–207. <https://doi.org/10.1111/php.12104>
- Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M. de L., Páez-Hernández, M. E., Rodríguez,

- J. A., & Galán-Vidal, C. A. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 113(4), 859–871. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.001>
- Chandrasekhar, J. ., Madhusudhan, M. C. ., & Raghavarao, K. S. M. S. (2012). Extraction of anthocyanins from red cabbage and purification using adsorption. *Food and Bioproducts Processing*, 90(4), 615–623. <https://doi.org/10.1016/J.FBP.2012.07.004>
- Chethana, S. ., Nayak, C. A. ., & Raghavarao, K. S. M. S. (2007). Aqueous two phase extraction for purification and concentration of betalains. *Journal of Food Engineering*, 81(4), 679–687. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2006.12.021>
- de Souza, V. R., Pereira, P. A. P., da Silva, T. L. T., de Oliveira Lima, L. C., Pio, R., & Queiroz, F. (2014). Determination of the bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Brazilian blackberry, red raspberry, strawberry, blueberry and sweet cherry fruits. *Food Chemistry*, 156, 362–368. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2014.01.125>
- de Vargas, E. F., Jablonski, A., Flôres, S. H., & Rios, A. de O. (2017). Obtention of Natural Dyes from Industrial Blackberry Pulp Residues (*Rubus* sp). *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(1), e12777. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12777>
- Delgado-Vargas, F. ., & Paredes-Lopez, O. (2003). Natural colorants for food and nutraceutical use. *Trends Food Sci. Technol.*, 14, 438. Retrieved from <https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-34547455105&origin=inward&txGid=e8b889f55bada6bd3c84f42d63a2e95b>
- Escobar, C. H. ., & Lizarralde, R. D. (2013). Cadenas Productiva Nacional de la Mora. Retrieved April 15, 2018, from <https://sioc.minagricultura.gov.co/Mora/Documentos/002 - Cifras Sectoriales/Cifras Sectoriales – 2013 Diciembre.pdf>
- Escobar Torres, C. H. (2015). CADENA PRODUCTIVA NACIONAL DE LA MORA-INDICADORES DE APOYO, 51. Retrieved from <https://sioc.minagricultura.gov.co/Mora/Documentos/002 - Cifras Sectoriales/Cifras Sectoriales – 2015 Marzo.pdf>
- Fan-Chiang, H.-J., & Wrolstad, R. E. (2005). Anthocyanin pigment composition of blackberries. *Journal of Food Science*, 70(3), C198–C202.
- FAO. (2011). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Retrieved May 1, 2017, from <http://www.fao.org/home/en/>
- FAO. (2013). Agronoticias: Agriculture News from Latin America and the Caribbean | Food and Agriculture Organization of the United Nations. Retrieved May 1, 2018, from <http://www.fao.org/agronoticias/agro-noticias/detail/en/c/181198/>
- Flores, E. (2017). Extracción de Antioxidantes de las Bayas del Sauco (*Sambucus nigra* L. subsp. peruviana) con Ultrasonido, Microondas, Enzimas y Maceración para la obtención de Zumos Funcionales. *Información Tecnológica*, 28(1), 121–132. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642017000100012>
- Furia, T. E., & Chemical Rubber Company, C. (1980). *CRC handbook of food additives*. CRC Press.

- García-Mendoza, M. del P., Espinosa-Pardo, F. A., Baseggio, A. M., Barbero, G. F., Maróstica Junior, M. R., Rostagno, M. A., & Martínez, J. (2017). Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from juçara (*Euterpe edulis* Mart.) residues using pressurized liquids and supercritical fluids. *The Journal of Supercritical Fluids*, 119, 9–16. <https://doi.org/10.1016/J.SUPFLU.2016.08.014>
- Garzón, G. (2008). *Acta biológica colombiana. Acta Biológica Colombiana* (Vol. 13). Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología. Retrieved from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-548X2008000300002&lng=en&nrm=iso&tlng=en
- Gil Hernández, A., & Sánchez de Medina Contreras, F. (2010). *Tratado de nutrición. Médica-Panamericana*. Retrieved from <http://eds.a.ebscohost.com.ezproxy.utadeo.edu.co:2048/eds/detail/detail?vid=2&sid=17fc95e2-6db4-43d2-bb5f-e9423a54130b%40sessionmgr4009&bdata=Jmxhbm9ZXMmc2l0ZT1lZHMtbGl2ZSszY29wZT1zaXRI#AN=ujtl.324846&db=cat00809a>
- Giusti, M. M., & Wrolstad, R. E. (2003). Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. *Biochemical Engineering Journal*, 14(3), 217–225. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00221-8](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00221-8)
- Konczak, I., & Zhang, W. (2004). Anthocyanins—More Than Nature's Colours. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2004(5), 239–240. <https://doi.org/10.1155/S1110724304407013>
- Kuskoski, E. M., Asuero, A. G. , Troncoso, A. M. , Mancini-Filho, J., & Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 25(4), 726–732. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612005000400016>
- Liu, R., & Boyer, J. (2002). Apple phytochemicals and their health benefits. *Nutrition Journal*, 3(1), 5. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-3-5>
- Palomares, A. N., Noy, J. M., Castillo, H. J., Casas, J. A., & Rodríguez, R. L. (2009). ELABORACIÓN DE PAPEL INDICADOR A BASE DE EXTRACTOS NATURALES: UNA ALTERNATIVA FUNDAMENTADA EN EXPERIENCIAS DE LABORATORIO PARA EL APRENDIZAJE DEL CONCEPTO DE pH. *Revista Eureka Sobre Enseñanza y Divulgación de Las Ciencias*, 6(2), 302–314. Retrieved from <http://www.redalyc.org/html/920/920129780009/>
- Pazmino-Duran, E. , Giusti, M. , Wrolstad, R. , & Gloria, M. (2001). Anthocyanins from oxalis triangularis as potential food colorants. *Food. Chem.*, 75, 211. Retrieved from <https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-85013626825&origin=inward&txGid=825ee0cf464156e790ebf4de04cda0fd>
- Pellegrini, N., Serafini, M., Colombi, B., Del Rio, D., Salvatore, S., Bianchi, M., & Brighenti, F. (2003). Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *The Journal of Nutrition*, 133(9), 2812.
- Seeram, N. P. (2008). Berry Fruits: Compositional Elements, Biochemical Activities, and the Impact of Their Intake on Human Health, Performance, and Disease. *Journal of*

- Agricultural and Food Chemistry*, 56(3), 627–629. <https://doi.org/10.1021/jf071988k>
- Soria, A. C., & Villamiel, M. (2010). Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 21(7), 323–331. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2010.04.003>
- Stratil, P., Kubáň, V., & Fojtová, J. (2008). Comparison of the Phenolic Content and Total Antioxidant Activity in Wines as Determined by Spectrophotometric Methods. *Czech J. Food Sci*, 26(4), 242–253. Retrieved from <https://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/01961.pdf>
- Tian, Q., Aziz, R. M., Stoner, G. D., & Schwartz, T. J. (2005). Anthocyanin Determination in Black Raspberry (*Rubus occidentalis*) and Biological Specimens Using Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Food Science*, 70(1), C43–C47. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb09018.x>
- Tomás-Barberán, F. A., & Espín, J. C. (2001). Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(9), 853–876. <https://doi.org/10.1002/jsfa.885>
- Valido, C., Olivero, P., Delgado, R., Conde González, M. A. ;, & Trujillo, P. (2000). DETERMINACIÓN DE LAS COORDENADAS CIELab Y OTROS PARÁMETROS INFLUYENTES EN EL COLOR EN VINOS TINTOS DE LAS ISLAS CANARIAS. Retrieved May 12, 2018, from http://www.tenerife.es/Casa-vino/jornadas/pdf/PDF_JORNADAS_IV/18.pdf