



UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE LA MIXTECA

**“DETERMINACIÓN DE ANTOCIANINAS, FENOLES TOTALES Y  
ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN LICORES Y FRUTO DE MORA”**

**TESIS**

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
**INGENIERO EN ALIMENTOS**

PRESENTA:

**DIANA ELIZABETH LEYVA DANIEL**

DIRECTORES:

**M. en C. CARLOS GUILLERMO HERNÁNDEZ**  
**DRA. ROSA ISELA GUZMÁN GERÓNIMO**

HUAJUAPAN DE LEÓN, OAXACA, MÉXICO. SEPTIEMBRE DE 2009

El proyecto se realizó en los laboratorios de Investigaciones Químico Biológicas del Instituto de Agroindustrias de la Universidad Tecnológica de la Mixteca (UTM), en los laboratorios de docencia de la carrera de Ingeniería en Alimentos (Química y Taller de procesamiento de alimentos) de la UTM y en los laboratorios de Ciencias Básicas y Unidad S.A.R.A (Unidad de Servicios de apoyo en Resolución Analítica) de la Universidad Veracruzana.

## **DEDICATORIAS**

De forma muy especial a mis padres por su apoyo y confianza, a mis hermanas Itzel y Lis por creer en mí y a Ciro por su enorme comprensión, paciencia y cariño.

## AGRADECIMIENTOS

A mis padres por el esfuerzo que han hecho para que se realicen mis sueños, por ser siempre la fuente de confianza y formar realmente un núcleo en mi vida.

A mis hermanitas porque juntas lo hemos logrado, y a toda mi familia, que han sido parte del proceso.

A la Dra. Rosa Isela Guzmán Gerónimo por confiar en mí, apoyarme en todo momento, revisar este documento y ayudarme a darle sentido. Al M. en C. Carlos Guillermo, por el apoyo proporcionado e interés en el proyecto.

A mis compañeritos y amigos de generación, Ana Gabriel, Pavis, Lucy, Sahadi y Fi, por hacer que este camino tan largo fuese más divertido. A Irma, Mayra, Gina y Balbi por enorme apoyo y amistad. A mis grandes amigas Alma Vázquez y Feli.

Al Dr. Iñigo Verdalet Guzmán por su hospitalidad durante mi estancia en los laboratorios de la Universidad Veracruzana y al Dr. Erick Silva Hernández por su apoyo en la parte estadística de esta tesis, a la Unidad S.A.R.A y todo el personal que hicieron que mi estancia fuera muy agradable.

A la Dra. Nora Elia Aquino Bolaños por sus consejos y amistad brindados. A todos los amigos que hice en Xalapa, a Eva, Araceli, Laura, Tania, Nadia, Marco...

A mi Ciro, por ser la persona más paciente, tierna y amorosa, gracias por estar a mi lado y creer en mí, sabes que las cosas que hago llevan tu esencia.

Mil gracias a mi Universidad y a todas las personas que laboran en ella, porque durante este proceso de aprendizaje han sido los mejores.

Gracias a todos mis profesores de la carrera, por todos los conocimientos compartidos. En especial a la MC. Paula Guadarrama, MC. Jesús Godofredo López Luna, a la Dra. Norma F. Santos Sánchez, al Dr. Raúl Salas Coronado y al MC. Vania S. Robles porque fueron un verdadero ejemplo de entrega y dedicación a la investigación.

## RESUMEN

Los vinos son una fuente de fenoles, sustancias que ofrecen una acción protectora al organismo contra enfermedades crónico-degenerativas. Además de los vinos, existen bebidas alcohólicas elaboradas a partir de frutos que poseen una alta concentración de fenoles como es el licor de mora que es un producto típico elaborado en la región de Xico, Veracruz a partir del fruto maduro de zarzamora que crece de forma silvestre en dicha región. Sin embargo, no se tiene un estudio acerca de las propiedades fisicoquímicas y sus efectos benéficos para el consumidor. Por lo que el objetivo del presente trabajo fue evaluar en diferentes marcas de licores el contenido de antocianinas monoméricas y %color polimérico, fenoles totales y actividad antioxidante, así como sus propiedades fisicoquímicas. El intervalo de contenido de antocianinas monoméricas en los licores fluctúa de  $3.56 \pm 0.19$  a  $76.95 \pm 1.20$  mg de cianidina 3-glucósido/L; el contenido de fenoles totales se encuentra en un intervalo de  $477.12 \pm 0.04$  a  $884.98 \pm 0.03$  mg EAG/100 mL y la actividad antioxidante de  $110.51 \pm 0.88$  a  $304.47 \pm 2.65$  mM equivalentes de Trolox/mL de licor. Encontrándose mediante un análisis de MANOVA que con excepción de 2 muestras, sí existen diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre los licores evaluados, lo cual puede atribuirse a sus diferentes condiciones de procesamiento y almacenamiento. Mediante una correlación canónica se obtuvo que a menor pH y mayor porcentaje de azúcares reductores, existe un mayor contenido de antocianinas monoméricas, es decir bajo estas condiciones se favorece la presencia de estos compuestos bioactivos que ayudan a la prevención de enfermedades crónico-degenerativas.

## ÍNDICE GENERAL

	<b>Página</b>
Lista de Figuras	viii
Lista de tablas	x
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	
<b>2. ANÁLISIS DE FUNDAMENTOS</b>	
2.1 Estrés oxidativo en la salud humana	3
2.1.1 Especies oxidantes. Especies reactivas del oxígeno y radicales libres	4
2.2 Alimentos funcionales	4
2.3 Licor de mora	5
2.4 Las bayas como fuente de fenoles	6
2.4.1 Antocianinas	9
2.4.1.1 Estabilidad de las antocianinas	11
2.4.1.2 Polimerización de las antocianinas	13
2.4.2 Actividad antioxidante en los compuestos fenólicos	14
2.5 Métodos para evaluar la actividad antioxidante	16
2.5.1 Determinación de fenoles totales	18
2.6 Cuantificación de antocianinas	19
2.6.1 Extracción de antocianinas	19
2.6.2 Cuantificación de antocianinas monoméricas y color polimérico	20
<b>3. HIPÓTESIS</b>	

<b>4. OBJETIVOS</b>	
4.1 Objetivo General	22
4.2 Objetivos Específicos	22
<b>5. METODOLOGÍA</b>	
5.1 Procedimiento general de trabajo	23
5.2 Equipos y reactivos	24
5.3 Obtención de las muestras	26
5.4 Determinación de propiedades fisicoquímicas a los licores de mora	27
5.5 Establecimiento de los parámetros de color en los licores de mora	28
5.6 Determinación de antocianinas monoméricas	29
5.6.1 Preparación del extracto metanólico	29
5.6.2 Método de pH diferencial	29
5.7 Determinación de color polimérico en el licor de mora	30
5.8 Determinación de Fenoles totales (FT)	31
5.9 Actividad antioxidante en los licores y fruto de mora	32
5.9.1 Preparación de la curva de calibración	32
5.9.2 Preparación del radical DPPH•	33
5.9.3 Método de DPPH•	33
5.9.4 Cálculo de la actividad antioxidante	34
5.10 Análisis estadístico de los resultados	34
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	
6.1 Fruto de zarzamora	35
6.2 Propiedades fisicoquímicas en los licores	37
6.3 Cambios en los parámetros de color en los licores	38
6.4 Antocianinas monoméricas, %color polimérico y densidad de color en los licores de mora	41

6.5 Fenoles totales y actividad antioxidante	45
6.6 Análisis estadístico de las mediciones efectuadas a los licores de mora	47
6.6.1 Análisis Multivariado de la Varianza (MANOVA)	47
6.6.2 Correlación canónica	48
6.7 Determinaciones durante el tiempo de almacenamiento del licor control	52
6.7.1 Determinaciones fisicoquímicas al inicio del almacenamiento del licor control	52
6.7.2 Determinaciones colorimétricas durante el tiempo de almacenamiento del licor control	53
6.7.3 Variaciones en el contenido de antocianinas monoméricas, %color polimérico y actividad antioxidante durante el tiempo de almacenamiento	54
<b>7. CONCLUSIONES</b>	
<b>8. PERSPECTIVAS</b>	
REFERENCIAS	60
ANEXOS	64
APÉNDICE A	67
APÉNDICE B	68
APÉNDICE C	69
APÉNDICE D	69



## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
Figura 1. Estructura química del esqueleto básico de los flavonoides	7
Figura 2. Estructura química de algunos flavonoides	8
Figura 3. Estructura más común de la antocianina glucosilada	10
Figura 4. Estructura de antocianinas a diferentes pH's	12
Figura 5. Reacción de las antocianinas con bisulfito para formar antocianinas-sulfónicas incoloras	21
Figura 6. Esquema de trabajo para el fruto y el licor de mora	23
Figura 7. Variaciones en los tonos de color de los parámetros L*, a* y b*	28
Figura 8. Fruto maduro de zarzamora	35
Figura 9. Representación de los parámetros colorimétricos en el sistema CIEL* a* b*	39
Figura 10. Tonos de color del ángulo de matiz	40
Figura 11. Correlación de Pearson entre el %color polimérico (%CP) y el contenido de antocianinas monoméricas (AM)	42
Figura 12. Correlación de Pearson entre el %color polimérico (%CP) y el pH	43
Figura 13. Correlación de Pearson entre el pH y el parámetro L*	44
Figura 14. Correlación de Pearson entre el ángulo de matiz y (a) antocianinas monoméricas y (b) % Color polimérico	44
Figura 15. Contenido de fenoles totales en los licores de mora	45
Figura 16. Actividad antioxidante en los licores de mora	47
Figura 17. Raíz 1 obtenida de la correlación canónica	49

Figura 18. Raíz 2 obtenida de la correlación canónica	50
Figura 19. Raíz 1 de la Correlación canónica para la actividad antioxidante	51
Figura 20. Correlación de Pearson entre el %CP y el parámetro $a^*$	56
Figura 21. Correlación de Pearson entre las Antocianinas monoméricas (AM) y la Actividad antioxidante (AA)	56

## LISTA DE TABLAS

	<b>Página</b>
Tabla 1. Vinos y licores de bayas	9
Tabla 2. Contenido de antocianinas en diferentes especies de bayas (mg/100 g peso fresco)	11
Tabla 3. Cambios en la distribución de antocianinas y actividad antioxidante en vinos de mora negra (mulberry) durante el añejamiento	15
Tabla 4. Clasificación de los métodos para evaluar la actividad antioxidante de acuerdo a las reacciones involucradas	16
Tabla 5. Métodos de extracción de antocianinas	20
Tabla 6. Equipos y materiales empleados	24
Tabla 7. Reactivos empleados	25
Tabla 8. Marcas comerciales de los licores evaluados	27
Tabla 9. Curva de calibración de fenoles totales	32
Tabla 10. Curva estándar de trolox	33
Tabla 11. Contenido de antocianinas en diferentes bayas	36
Tabla 12. Propiedades fisicoquímicas de los licores	37
Tabla 13. Propiedades colorimétricas	39
Tabla 14. Contenido de antocianinas monoméricas y %color polimérico	41
Tabla 15. Contenido de fenoles en licores de bayas	46
Tabla 16. Valores de p de la prueba multivariada de Wilks para los licores de mora	48
Tabla 17. Parámetros determinados al inicio del almacenamiento	52
Tabla 18. Parámetros de color en el licor control durante el almacenamiento	53
Tabla 19. Antocianinas, %Color polimérico, Fenoles y actividad Antioxidante durante el almacenamiento	54

## 1. INTRODUCCIÓN

Las zarzamoras (*Rubus spp*) son un cultivo importante tanto en México como en Estados Unidos y son comercialmente producidos en una amplia gama de regiones (Reyes-Carmona *et al.*, 2005). En México se produce en Michoacán, Morelos, México, Puebla, Jalisco, Hidalgo y Veracruz.

En la región de Xico, Veracruz las zarzamoras (*Rubus spp*) se emplean para la elaboración de diversos productos tales como tortilla, atole y para la preparación de forma artesanal de un licor, conocido como licor de mora, a partir del fruto maduro que crece de forma silvestre en dicha región. Este licor se elabora mediante una fermentación a temperatura ambiente, seguida por una maceración, una clarificación para eliminar los residuos sólidos y posteriormente se deja reposar. Esta bebida posiblemente tenga potenciales benéficos para la salud humana, probablemente por la presencia de antocianinas las cuales se reportan con propiedades antiinflamatorias, antivirales, antimicrobianas y actividad antioxidante (Benzie y Strain, 1996; Cheng y Breen, 1991), aun cuando no se tienen reportes de la composición nutrimental ni del potencial antioxidante de dicha bebida.

La actividad antioxidante ha sido relacionada con el contenido de antocianinas y fenoles totales de moras de diversos genotipos de *Vaccinium L.*, *Rubus L.*, y *Ribes L.* (Halliwell *et al.*, 1987; Hakkinen *et al.*, 1999). Las zarzamoras, que pertenecen al género *Rubus spp*, son fuente significativa de fenoles en la dieta humana (Sellappan *et al.*, 2002; Zheng y Wang, 2003), las cuales tienen un gran potencial antioxidante.

Moure *et al.* (2001), reportan que el grado de polimerización de los compuestos fenólicos tiene un marcado efecto sobre la actividad antioxidante. Así, los compuestos poliméricos son más potentes como antioxidantes que los monoméricos.

Durante el añejamiento de los vinos ocurren numerosas reacciones de polimerización que tienen lugar entre las antocianinas y otros fenoles, principalmente flavonoles, estas reacciones favorecen la estabilidad del color del vino, causando una disminución de la absorbancia a 520 nm y un aumento a 420 nm. En vinos tintos jóvenes, casi la totalidad del color está dado por antocianinas monoméricas, pero después de un año, al menos el 50% del color percibido está dado por antocianinas poliméricas, estos pigmentos son menos afectados por el pH, la temperatura y el SO<sub>2</sub> por lo que dan estabilidad al color del vino (Casassa y Catania, 2006).

En un estudio realizado en vinos elaborados con moras (mulberries) se encontró que la actividad antioxidante se ve influenciada por el porcentaje de antocianinas poliméricas que se forman durante el añejamiento, teniendo al año un porcentaje de 30.44%, por el contrario el contenido de antocianinas monoméricas se ve disminuida con el tiempo de almacenamiento (Tsai *et al.*, 2004).

El objetivo de este estudio fue determinar el contenido de antocianinas monoméricas, poliméricas y su relación con la actividad antioxidante en licores de mora, así como evaluar parámetros fisicoquímicos en los licores y fruto de mora.

Al considerar que en México no existe una normatividad que regule este tipo de bebidas y dado el creciente interés de los consumidores por productos nutraceuticos y alimentos funcionales; si se cuantifica el contenido de estos compuestos bioactivos tanto en el fruto como en el licor de mora, se puede brindar información objetiva a la población, sobre los efectos positivos para la salud, que conlleva el consumo del licor de mora.

## 2. ANÁLISIS DE FUNDAMENTOS

En este capítulo se describen brevemente los principales grupos de compuestos fenólicos presentes en las frutas rojas y bayas. Se trata además, aspectos relevantes de las antocianinas como su estabilidad y actividad antioxidante, así como el empleo de las moras silvestres para la elaboración de un licor de forma artesanal con posibles beneficios potenciales para la salud humana.

### 2.1 Estrés oxidativo en la salud humana

El oxígeno es esencial para los organismos vivos. Sin embargo, la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) y radicales libres (RL) es inevitable en el metabolismo aeróbico. Estas especies oxidantes provocan daños acumulativos en moléculas fundamentales para el funcionamiento del organismo, tales como proteínas, lípidos y ADN.

Pese a esto, el organismo tiene sus propios mecanismos de defensa para hacer frente a la acción de las especies oxidantes. En determinadas situaciones las defensas antioxidantes pueden verse desbordadas por la excesiva generación de ROS. Este desequilibrio entre especies oxidantes y antioxidantes se conoce como estrés oxidativo, el cual está asociado a numerosas enfermedades y al proceso normal de envejecimiento (Lee *et al.*, 2004).

La dieta juega un papel importante en la prevención de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, fundamentalmente a través del aporte de compuestos bioactivos de origen

vegetal. Entre ellos, las vitaminas hidrosolubles y liposolubles, carotenoides y una gran variedad de compuestos fenólicos, cuya actividad antioxidante y potenciales efectos beneficiosos están siendo ampliamente investigados en los últimos años (Prior, 2003). Es así, como las industrias alimentarias están diseñando alimentos funcionales que proporcionen un aporte adicional de estos antioxidantes naturales.

### **2.1.1 Especies oxidantes. Especies reactivas del oxígeno y radicales libres**

Una especie oxidante es aquella capaz de aceptar electrones de modo que va a generar un desequilibrio electrónico en las moléculas vecinas. El término antioxidante hace referencia a cualquier sustancia que, estando presente a una concentración más baja comparada con la de un sustrato oxidable, es capaz de retrasar o prevenir la oxidación de dicho sustrato. Los radicales libres se definen como especies químicas que poseen uno o más electrones desapareados, lo cual las hace altamente inestables y reactivas. Para estabilizarse reaccionarán rápidamente con moléculas adyacentes mediante reacciones de óxido-reducción. El término especies reactivas del oxígeno es un término colectivo que incluye radicales libres y ciertas especies no radicales que son oxidantes y/o se convierten fácilmente en radicales libres, como por ejemplo HClO, HBrO, O<sub>3</sub>, ONOO<sup>-</sup>, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Halliwell y Whiteman, 2004).

## **2.2 Alimentos funcionales**

En los últimos años se ha incrementado el interés por parte de las industrias alimentarias y los consumidores por el concepto de “alimento funcional”. Así, como consumidores cada vez más interesados en alimentos más saludables y una industria alimentaria que ha comprendido la potencialidad del mercado de los alimentos funcionales, se ha iniciado a

nivel mundial una intensa actividad investigadora en el área de estos nuevos alimentos. El término alimento funcional hace referencia a alimentos o ingredientes que mejoran el estado general de salud y/o reducen el riesgo de enfermedad (Rafter, 2002).

Se trata además de productos alimenticios que deben consumirse dentro de la dieta habitual para conseguir efectos beneficiosos que van más allá de los requerimientos nutricionales tradicionales (Roberfroid, 2002).

### **2.3 Licor de mora**

En la región de Xico, Veracruz las moras (*Rubus spp*) crecen de forma silvestre con características similares a las zarzamoras que son frutos carnosos y formados por numerosos frutillos esféricos apiñados cada uno con huesillo, de color rojizo al principio, pero al final negro cuando maduran completamente (TecnoAgro, año 8, núm.36). Estos frutos se emplean para la elaboración de diversos productos, tales como tortillas, atole y un licor, conocido como licor de mora, para este último se emplea para su procesamiento el fruto silvestre en estado maduro y se manufactura de forma artesanal.

El proceso de elaboración del licor de mora comprende las siguientes etapas:

- Una fermentación a temperatura ambiente, con un tiempo aproximado de 3 días en garrafas de vidrio en un cuarto oscuro.
- Una maceración que permite terminar el proceso de fermentación.
- La clarificación que elimina los sólidos suspendidos en el licor.
- Reposo, se deja añejar el licor por un tiempo mínimo de un año para que tenga las características de cuerpo y sabor. Suárez (comunicación personal, 1 de marzo de 2008).



Si bien no existe una normatividad mexicana para estos licores, destinadas para el consumo humano y poseedoras de cualidades organolépticas particulares, la Comunidad Europea en su Reglamento (CEE) n° 1576/89, define a los licores como una bebida espirituosa, con un grado alcohólico mínimo de 15 % vol., producida por destilación de productos fermentados de modo natural y/o maceración y con un contenido mínimo de azúcar, expresado como azúcar invertido de:

- 70 gramos por litro en el caso de los licores de cereza cuyo alcohol etílico sea exclusivamente aguardiente de cerezas;
- 80 gramos por litro en el caso de los licores de genciana o similares elaborados con genciana o plantas similares como única sustancia aromatizante;
- 100 g por litro en todos los demás casos.

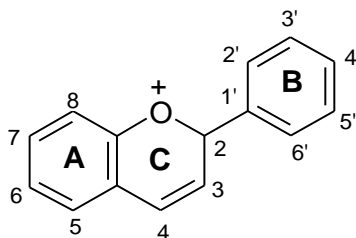
Cabe destacar que el uso de las moras silvestres para la elaboración del licor son muy apreciadas por los pobladores y esto se debe a las características de acidez, sabor y color que le confieren, además empíricamente han notado que estas propiedades diferencian a esta bebida de la elaborada a partir de moras cultivadas. Sin embargo, la información acerca de las características químicas y fisicoquímicas de licores es escasa.

#### **2.4 Las bayas como fuente de fenoles**

Químicamente, los fenoles pueden ser definidos como sustancias que poseen un anillo aromático teniendo uno o más sustituyentes hidroxilo, incluyendo sus derivados funcionales (Shahidi y Naczk, 1995).

Los flavonoides constituyen el grupo de compuestos polifenólicos más diversos y ampliamente distribuidos en las plantas. Su esqueleto básico de difenilpropano ( $C_6-C_3-C_6$ )

consta de dos grupos fenilo (A y B) unidos por un puente de tres carbonos que forma un anillo heterocíclico oxigenado (anillo C) (Figura 1).

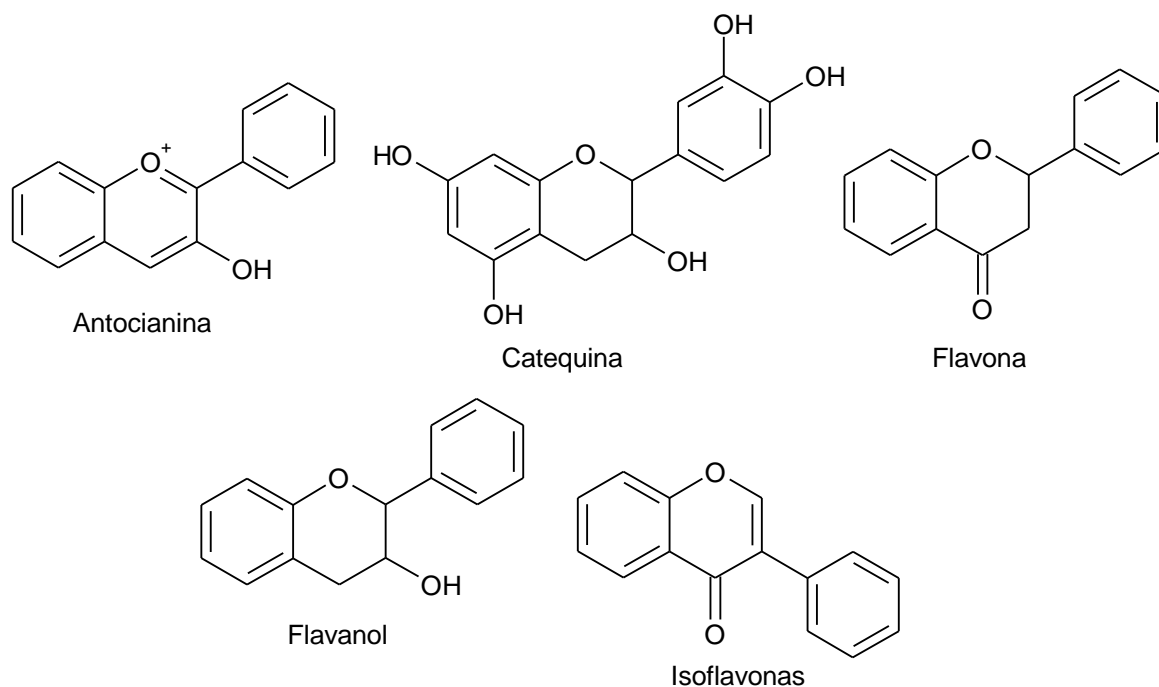


**Figura 1. Estructura química del esqueleto básico de los flavonoides (Shahidi y Naczk, 1995)**

La presencia o ausencia de un grupo hidroxilo unido a la posición 3 determina la subdivisión en las dos clases principales de flavonoides:

- a)** Los 3-hidroxi flavonoides (flavanoles, flavonoles, flavanonoles, flavan-3,4-dioles o leucoantocianidinas, antocianidinas, proantocianidinas o taninos condensados) y
- b)** Los flavonoides no hidroxilados en la posición 3 (flavonas, isoflavonas, flavanonas) (García, 2005).

A continuación se muestran los principales flavonoides presentes en los alimentos vegetales (Figura 2).



**Figura 2. Estructura química de algunos flavonoides (Shahidi y Naczk, 1995)**

Los fenoles presentes en los vinos protegen al organismo contra enfermedades cardiovasculares y enfermedades degenerativas (Hertog *et al.* 1993). Además estos compuestos contribuyen a las características sensoriales de los vinos tales como el color, sabor, astringencia, dureza del mismo y de la interacción con proteínas, polisacáridos y otros compuestos fenólicos (Shahidi y Naczk, 1995).

La mayoría de los compuestos fenólicos permanecen en los productos elaborados a base de moras y otros frutos (Heinonen *et al.*, 1998), como por ejemplo zumos, mermeladas, jaleas, gelatinas, licores, etc. (García, 2005). A continuación se muestra el contenido de azúcares, porcentaje de alcohol y fenoles totales en diversos vinos y licores elaborados a partir de algunas bayas (Tabla 1).

Tabla 1. Vinos y licores de bayas

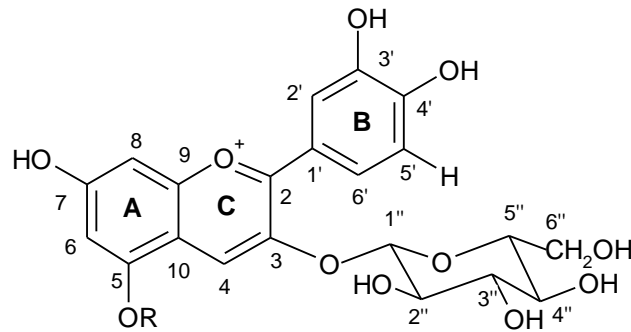
Fuente	Azúcar g/L	Alcohol Vol %	Fenoles totales mg EAG/L
<b>Vinos</b>			
1. Grosella negra	15	13	1270
2. Grosella roja	30-50	12	495
<b>Licores</b>			
1. Cerezas	180	21	1080
2. Fresa	130	15	525
3. Arándanos	300	21	500

Heinonen *et al.*, 1998

#### 2.4.1 Antocianinas

La palabra antocianina deriva del griego *anthos* (flor) y *kyanos* (azul oscuro). Las antocianinas son las responsables de los colores rojos, azulados o violetas de la mayoría de las frutas y flores. Es el pigmento más importante, después de la clorofila, que es visible al ojo humano.

Las antocianinas son derivados del catión 2-fenilbenzopirilio y debido a la poca solubilidad de éstas en agua, no se encuentran de manera libre en la naturaleza, sino en su forma glucosilada siendo una de las más abundantes la cianidina-3-glucósido (Walford, 1980) (Figura 3).



Cianidina 3-glucósido, R=H  
 Cianidina 3,5-diglucósido, R=glucosa

**Figura 3. Estructura más común de la antocianina glucosilada (Walford, 1980)**

La función más importante de las antocianinas es la percepción visible para la atracción de animales para propósitos de polinización y dispersión de semillas. Además se encargan de la filtración de la luz o pueden acumularse como resultado de estrés. Dentro de las vacuolas, las antocianinas, pueden estar localizadas en organelos esféricos conocidos como antocianoplastos, que se forman mientras la síntesis de pigmentos está en operación (Lewis y Walker, 1995).

Las especies del género *Rubus* se han descrito como fuentes naturales de antocianinas, como son la cianidina-3-glucósido y en algunos casos glucósidos de pelargonidina (Deighton *et al.*, 2000), diversos estudios reportan que su contenido va de 10 a 600 mg/100 g de peso fresco (Tabla 2).

**Tabla 2. Contenido de antocianinas en diferentes especies de bayas (mg/100 g peso fresco)**

Bayas	Género	Antocianinas
Zarzamora	<i>Rubus spp</i>	131-256 <sup>1</sup>
Grosella negra	<i>Ribes nigrum, L.</i>	80-810 <sup>2</sup>
Mora azul	<i>Vaccinium</i> (diferentes subgéneros)	60-480 <sup>2</sup>
Arándano	<i>Vaccinium oxycoccus, L.</i>	20-360 <sup>2</sup>
Arándano americano	<i>Vaccinium myrtilus, L.</i>	300-600 <sup>2</sup>
Arándano rojo	<i>Vaccinium vitisidaea, L</i>	35-170 <sup>2</sup>
Frambuesa	<i>Rubus idaeus, L.</i>	20-220 <sup>2</sup>
Fresa	<i>Fragaria ananassa</i>	10-80 <sup>2</sup>

<sup>1</sup>Siriwoharn *et al.*, 2004

<sup>2</sup>Rein, 2005

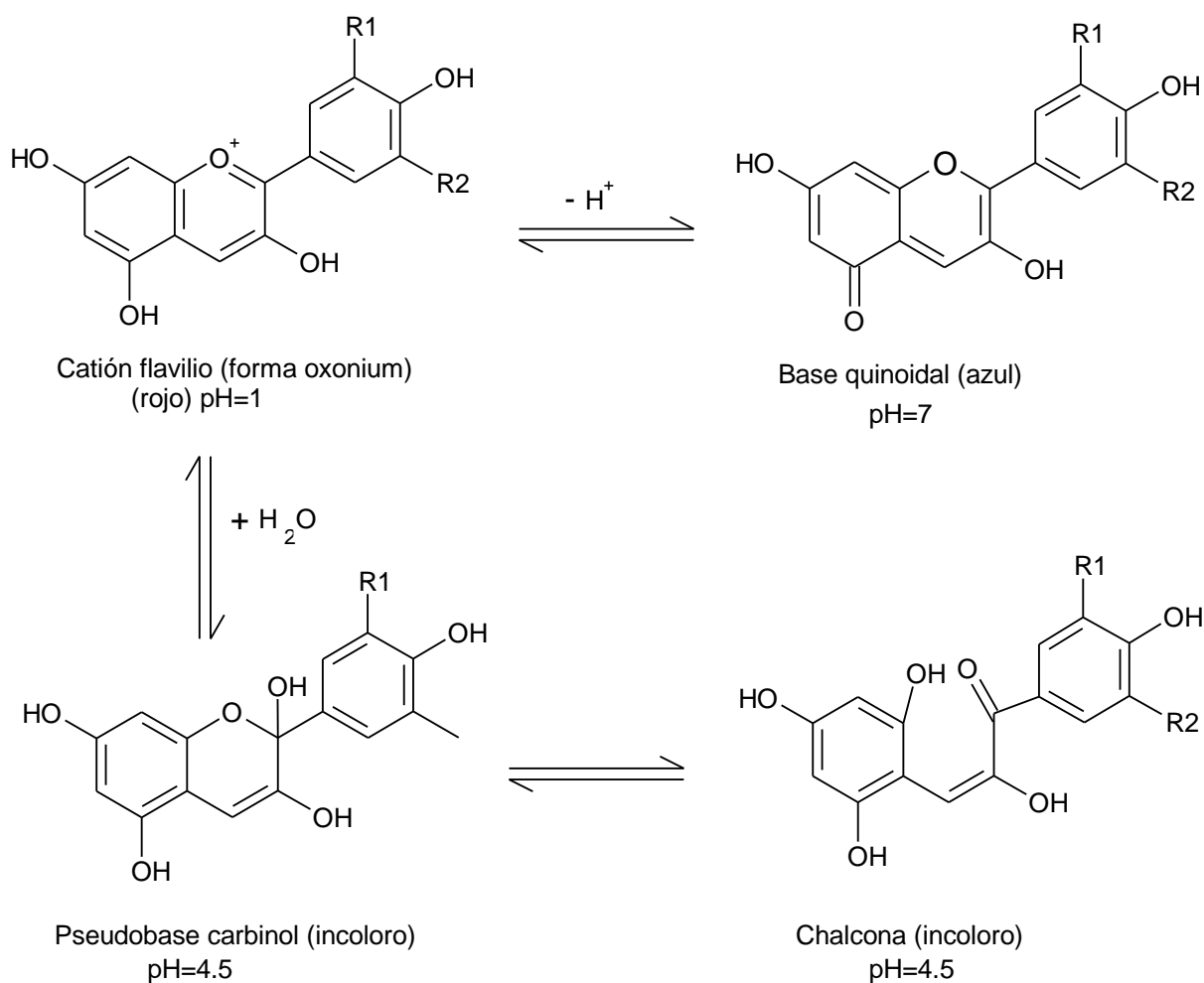
#### **2.4.1.1 Estabilidad de las antocianinas**

Las antocianinas son compuestos lábiles y su estabilidad es muy variable en función de su estructura y la composición de la matriz en la que se encuentran (Wrolstad, 2000, Delgado-Vargas y Paredes-López, 2003).

Su estabilidad se ve afectada por el pH, temperaturas de almacenamiento, presencia de enzimas, luz, oxígeno, estructura y concentración de las antocianinas, y la presencia de otros compuestos tales como otros flavonoides, proteínas y minerales.

Uno de los principales factores del medio que afecta la estabilidad del color de las antocianinas es el pH. Dependiendo del pH las antocianinas pueden existir en cuatro especies diferentes: base quinoidal, catión flavilio, pseudobase carbinol y chalcona. En soluciones muy ácidas (pH < 0.5) el catión flavilio rojo es la única estructura. Con incrementos de pH la concentración del catión decrece al mismo tiempo que la hidratación

da lugar a la base de carbinol incolora. Entre pH 4 y 5.5 habrá poco color, debido a que las dos formas coloreadas estarán en bajas concentraciones y el equilibrio se desplazará a las formas incoloras. Por lo tanto, la forma chalcona es la más susceptible a la degradación, y la forma iónica flavilio es la más estable (Chandra *et al.*, 1992; Wesche-Ebeling y Montgomery., 1990) (Figura 4).



**Figura 4. Estructura de antocianinas a diferentes pH's (Giustin y Wrolstad, 2001)**

#### 2.4.1.2 Polimerización de las antocianinas

Las antocianinas son pigmentos lábiles que experimentan reacciones de degradación. Su estabilidad, como ya se mencionó es altamente variable y depende de su estructura y de la composición de la matriz en la cual existe (Wrolstad, 2000; Delgado-Vargas y Paredes López, 2002). Al incrementar las sustituciones glucosídicas y en particular, acilaciones de azúcares residuales con ácido cinámico, incrementará la estabilidad del pigmento. La polifenoloxidasas, peroxidasa y las enzimas glicosiladas pueden tener un efecto devastador sobre las antocianinas. Estas enzimas puede ser nativas de los tejidos de las plantas o provenientes de la contaminación con mohos. Otra posible fuente es parte de las actividades comerciales de las enzimas utilizadas como auxiliares del procesamiento. Las enzimas glicosiladas actúan directamente sobre las antocianinas, pero la acción de las polifenoloxidasas y peroxidasa son indirectas. Las antocianinas condensarán con otros compuestos fenólicos para formar pigmentos de color polimérico. Esta reacción puede ser acelerada con la presencia de acetaldehído.

Los pigmentos de antocianinas poliméricas no mostrarán un cambio pronunciado reversible del color con los cambios de pH que es característico de las antocianinas monoméricas (Wrolstad *et al.*, 2005).

Durante el añejamiento de los vinos ocurren numerosas reacciones de polimerización que favorecen la estabilidad del color del vino, y tienen lugar entre las antocianinas y otros fenoles, principalmente flavonoles, causando una disminución de la absorbancia a 520 nm y un aumento a 420 nm. En vinos tintos jóvenes, casi la totalidad del color está dado por antocianinas monoméricas, pero después de un año, al menos el 50% del color percibido



está dado por antocianinas poliméricas, estos pigmentos son menos afectados por el pH, la temperatura y el SO<sub>2</sub> por que le dan estabilidad al color del vino (Casassa y Catania, 2006).

#### **2.4.2 Actividad antioxidante en los compuestos fenólicos**

Los antioxidantes naturales son principalmente compuestos fenólicos que pueden estar presentes en todas las partes de la planta (Shahidi y Naczk, 1995). Los compuestos fenólicos pueden actuar como antioxidantes mediante dos mecanismos principales:

- a) **Como captadores de radicales libres.** Los compuestos fenólicos pueden actuar como donantes de hidrógeno o electrones en reacciones de terminación que rompen el ciclo de generación de nuevos radicales libres, deteniendo las reacciones en cadena en las que están implicados los radicales libres. El radical fenoxilo generado es menos reactivo dado que se estabiliza por resonancia con los electrones “p” del anillo aromático.
  
- b) **Como quelantes de metales.** Esta acción requiere la presencia de grupos hidroxilos cercanos en el anillo aromático. De este modo, los o-dihidroxifenoles son secuestradores efectivos de iones metálicos e inhiben la generación de radicales libres por la reacción de Fenton (García, 2005).

Sin embargo, existen otros factores que afectan la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos. Así, el número y posición de grupos hidroxilo, la presencia de azúcares unidos y el grado de polimerización determinarán propiedades de los compuestos fenólicos tales como la solubilidad y la tendencia a ceder electrones o átomos de hidrógeno.

El grado de polimerización de los compuestos fenólicos tiene un marcado efecto sobre la actividad antioxidante. Así, los compuestos poliméricos son más potentes como antioxidantes que los monómeros (García, 2005).

En un estudio realizado en vinos elaborados con moras negras (mulberries) se encontró que la actividad antioxidante se ve influenciada por el porcentaje de antocianinas poliméricas que se forman durante el añejamiento, teniendo al año un porcentaje de 30.44%, por el contrario el contenido de antocianinas monoméricas se ve disminuida con el tiempo de almacenamiento (Tabla 3) (Tsai *et al.*, 2004).

**Tabla 3. Cambios en la distribución de antocianinas y actividad antioxidante en vinos de mora negra (mulberry) durante el añejamiento**

Parámetro	Tiempo de almacenamiento (meses)		
	1	3	12
% Antocianinas monoméricas	83.37	76.28	48.63
% Antocianinas poliméricas	16.63	23.49	30.44
Actividad antioxidante DPPH (%)	70.71	73.55	78.22

Tsai *et al.*, 2004

Debido a la gran diversidad de compuestos fenólicos dispersos en los tejidos vegetales, así como sus diferentes estructuras químicas, han traído consigo la necesidad de desarrollar un gran número de técnicas analíticas para su identificación y cuantificación (Martínez-Valverde *et al.*, 2000).

A continuación se presentan las metodologías empleadas para la extracción y cuantificación de antocianinas, índice de degradación de pigmentos, la estimación de fenoles totales y la actividad antioxidante.

## 2.5 Métodos para evaluar la actividad antioxidante

La actividad antioxidante de los frutos y bebidas puede evaluarse *in vitro* e *in vivo* por medio de experimentos sencillos. Con base a las reacciones químicas involucradas, pueden dividirse en dos categorías: ensayos basados en la transferencia de un átomo de hidrógeno y ensayos basados en la transferencia de electrones. Los métodos de transferencia de un átomo de hidrógeno están basados en reacciones donde el antioxidante y el sustrato compiten por el radical libre sintético, una molécula oxidable y un antioxidante. Los métodos basados en la transferencia de un electrón involucran una reacción de oxidación con el antioxidante que es un indicador del punto final de la misma (Tabla 4).

**Tabla 4. Clasificación de los métodos para evaluar la actividad antioxidante de acuerdo a las reacciones involucradas**

Mecanismo	Método
Transferencia de hidrógeno	a. TRAP (del inglés <i>total radical trapping antioxidant parameter</i> )
	b. ORAC (del inglés <i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i> )
	c. Inhibición de la oxidación de las LDL ( <i>Low-density lipoprotein</i> )
Transferencia de un electrón	a. TEAC (del inglés <i>Trolox equivalent antioxidant capacity</i> )
	b. ABTS (ácido 2,2'azinobis (6-sulfonato-3-etilbenzotiazolina))
	c. FRAP (del inglés <i>ferric-reducing antioxidant power</i> )
	d. DPPH ( <i>2,2-difenil-1-picrilhidracilo</i> )

Huang *et al.*, 2005

Las condiciones para el empleo de los métodos de transferencia de electrón como el ABTS y DPPH, pueden variar de alguna u otra forma, (por ejemplo, el pH los solventes y la longitud de onda a la que se mide), dando diferentes resultados. Sin embargo, son muy útiles para evaluar la actividad antioxidante de sustancias y alimentos que los contienen. Estos métodos pueden servir para evaluar si un proceso de elaboración de un alimento influye sobre la actividad antioxidante, además puede ser un indicativo del potencial antioxidante para su consumo (Villaño *et al.*, 2007).

El método que se empleó en este trabajo es el propuesto por Brand-Williams *et al.* (1995), método de DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidracilo), que nos permite evaluar la actividad de sustancias frente al radical libre estable 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH•) en una solución metanólica que tiene un color violeta intenso que se pierde progresivamente cuando se añade la muestra que contiene antioxidantes. La decoloración del radical se determina a 517 nm y la cuantificación se realiza por lo general empleando soluciones patrón de Trolox.

Este método es probablemente más eficiente que el método ABTS en reacción con donadores de átomos de hidrógeno. Sin embargo, el DPPH no reacciona con flavonoides que no contenga grupos –OH en el anillo B al igual que con los ácidos aromáticos que sólo contiene un grupo –OH (Roginsky y Lissi, 2005). Pese a sus limitaciones, es un método adecuado para medir la actividad antioxidante en alimentos y extractos vegetales, mientras que no es adecuado para la determinación de la capacidad antioxidante del plasma o suero, ya que las proteínas precipitan con el metanol del medio de reacción (Sánchez-Moreno, 2002).

### 2.5.1 Determinación de Fenoles Totales

Entre los métodos usados comúnmente para determinar fenoles en alimentos destacan:

- a) **Ensayo de la vainillina.** Empleado para la determinación de compuestos flavan-3-ol, dihidrochalconas y procianidinas que tienen una unión simple en la posición 2,3 y poseen grupos hidroxilos en la posición meta del anillo B (Martínez-Valverde *et al.*, 2000).
  
- b) **Ensayo de Folin- Ciocalteu (FC).** Ha llegado a ser unos de los métodos más empleados en alimentos que consiste en que los compuestos fenólicos de la muestra se oxidan por el reactivo Folin-Ciocalteu el cual está formado por mezcla de ácido fosfotúngstico ( $H_3HW_{12}O_{40}$ ) y ácido fosfomolibdico ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ) que se reduce, por acción de los fenoles, en una mezcla de óxidos azules de tungsteno ( $W_8O_{23}$ ) y de molibdeno ( $Mo_8O_{23}$ ). La oxidación de los fenoles presentes en la muestra causa la aparición de una coloración azul que presenta un máximo de absorción a 730 nm, y se cuantifica por espectrofotometría con base a una curva patrón de ácido gálico o catequinas.
  
- c) **Ensayos ultravioleta.** Se han realizado diversos estudios para llevar a cabo técnicas rápidas de cuantificación de compuestos fenólicos mediante ensayos ultravioleta. Debido a que cada grupo de compuestos fenólicos se caracteriza por tener una o varias absorbancias máximas a distintas longitudes de onda dentro del espectro ultravioleta. Así, los fenoles simples tienen una absorbancia máxima entre 220 y 280 nm, mientras que los compuestos fenólicos relacionados presentan una amplia

variación en la longitud de onda a la cual presentan una absorbancia máxima (Martínez-Valverde *et al.*, 2000).

En la literatura se encuentran diversos ejemplos de la aplicación del método de FC con respecto a productos alimenticios como es el caso del vino rojo y blanco, tés y jugos (Roginsky y Lissi, 2005), además que es un método simple, preciso y sensible, debido a lo anterior en el presente trabajo se empleó este método expresando los resultados como equivalentes de ácido gálico.

El número de fenoles naturales se ha estimado en casi más de un millón, porque aparecen generalmente como glicósidos, y las diferentes especies de azúcares y sus diferentes formas de enlaces generan una gran variedad.

## **2.6 Cuantificación de antocianinas**

### **2.6.1 Extracción de antocianinas**

Las antocianinas son moléculas polares y consecuentemente son más solubles en solventes polares que en no polares. A valores de pH donde las moléculas de antocianinas están no ionizadas, pueden ser solubles en éter y no son estables en soluciones neutras y alcalinas; por tanto, los métodos convencionales empleados para la extracción de antocianinas implica el uso de solventes ácidos (Tabla 5).

**Tabla 5. Métodos de extracción de antocianinas**

<b>Método</b>	<b>Características</b>
0.001 % HCl en metanol	Este es el método más efectivo, pero el HCl es corrosivo y el metanol tiene efectos tóxicos en la salud humana.
0.001 % HCl en etanol	80% tan efectivo como el metanol.
0.001 % HCl en agua	27 % tan efectivo como el metanol.
Metanol acidificado con ácido cítrico	Este es el más eficiente de los ácidos orgánicos.
Agua acidificada con ácido acético	En eficiencia es seguido por el ácido cítrico, tartárico y clorhídrico.
Agua con 1000 ppm de SO <sub>2</sub>	La extracción es mejor que la obtenida por el uso de la extracción tradicional los cuales implica sistemas de etanol: ácido acético: agua.

Delgado-Vargas *et al.*, 2000

Como se observa en la tabla 5 los métodos de extracción han ido en busca de mejores rendimientos pero se han comprometido en cuestiones de seguridad (Delgado-Vargas *et al.*, 2000).

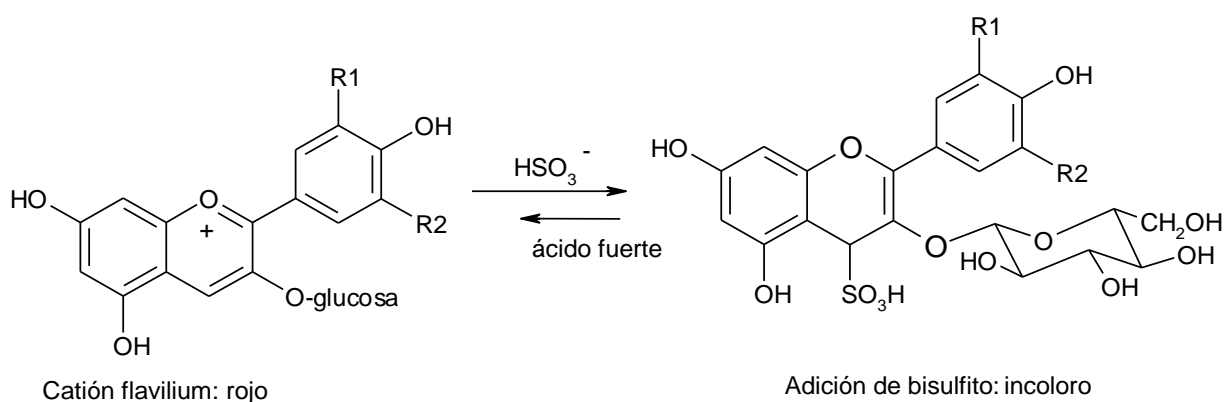
De acuerdo a lo anterior la extracción de las antocianinas del fruto para el presente trabajo se realizó con HCl al 1 % en metanol.

### **2.6.2 Cuantificación de antocianinas monoméricas y color polimérico**

Considerando al pH como uno de los principales factores del medio que afecta la estabilidad del color de las antocianinas, los espectros de UV-VIS a diferentes valores de pH también varían y nos ayudan a determinar si las antocianinas están o no polimerizadas (Giusti y

Wrolstad, 2001). La concentración de antocianinas entonces se determina con la absorbancia a un pH diferencial. Estas moléculas dan dos bandas de absorción en la región UV (260-280 nm) y la región visible (490-550 nm). Los resultados se expresan como pigmentos de antocianinas monoméricas, generalmente expresados como cianidina-3-glucósido.

El método de pH-diferencial propuesto por Giustin y Wrolstad (2001) permite la estimación alternativa del contenido de antocianinas totales, incluso en la presencia de pigmentos polimerizados y otras interferencias mediante el uso de sistemas tampón, el empleo de una agente blanqueador, bisulfito, y la medición por espectroscopia de UV-Visible. Este último consiste en el uso de un agente blanqueador que decolorará a las antocianinas sin afectar a los compuestos interferentes (Figura 5). Se obtiene una medida de la absorbancia máxima en la región visible, seguida por la decoloración. Los agentes blanqueadores más empleados son sulfito de sodio y peróxido de hidrógeno (Giustin y Wrolstad, 2001).



**Figura 5. Reacción de las antocianinas con bisulfito para formar antocianinas-sulfónicas incoloras (Wrolstad *et al.*, 2005)**



### **3. HIPÓTESIS**

La actividad antioxidante de los licores de mora está relacionada con el contenido de antocianinas.

### **4. OBJETIVOS**

#### **4.1 Objetivo general**

Determinar el contenido de antocianinas monoméricas, poliméricas y su relación con la actividad antioxidante en licores de mora y fruto de mora, así como evaluar parámetros fisicoquímicos en los licores.

#### **4.2 Objetivos específicos**

- Determinar el grado alcohólico, pH, acidez titulable y azúcares reductores en los licores de mora.
- Establecer el color en los licores mediante colorimetría.
- Cuantificar el contenido de antocianinas monoméricas en los licores y fruto de mora.
- Determinar el color polimérico en los licores de mora.
- Cuantificar el contenido de fenoles totales y actividad antioxidante presentes en los licores y el fruto de mora.
- Analizar estadísticamente mediante la variación y la correlación de los parámetros evaluados en los licores.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1 Procedimiento general de trabajo

En la Figura 6 se esquematiza el trabajo experimental de investigación que se realizó al fruto y licor de mora.

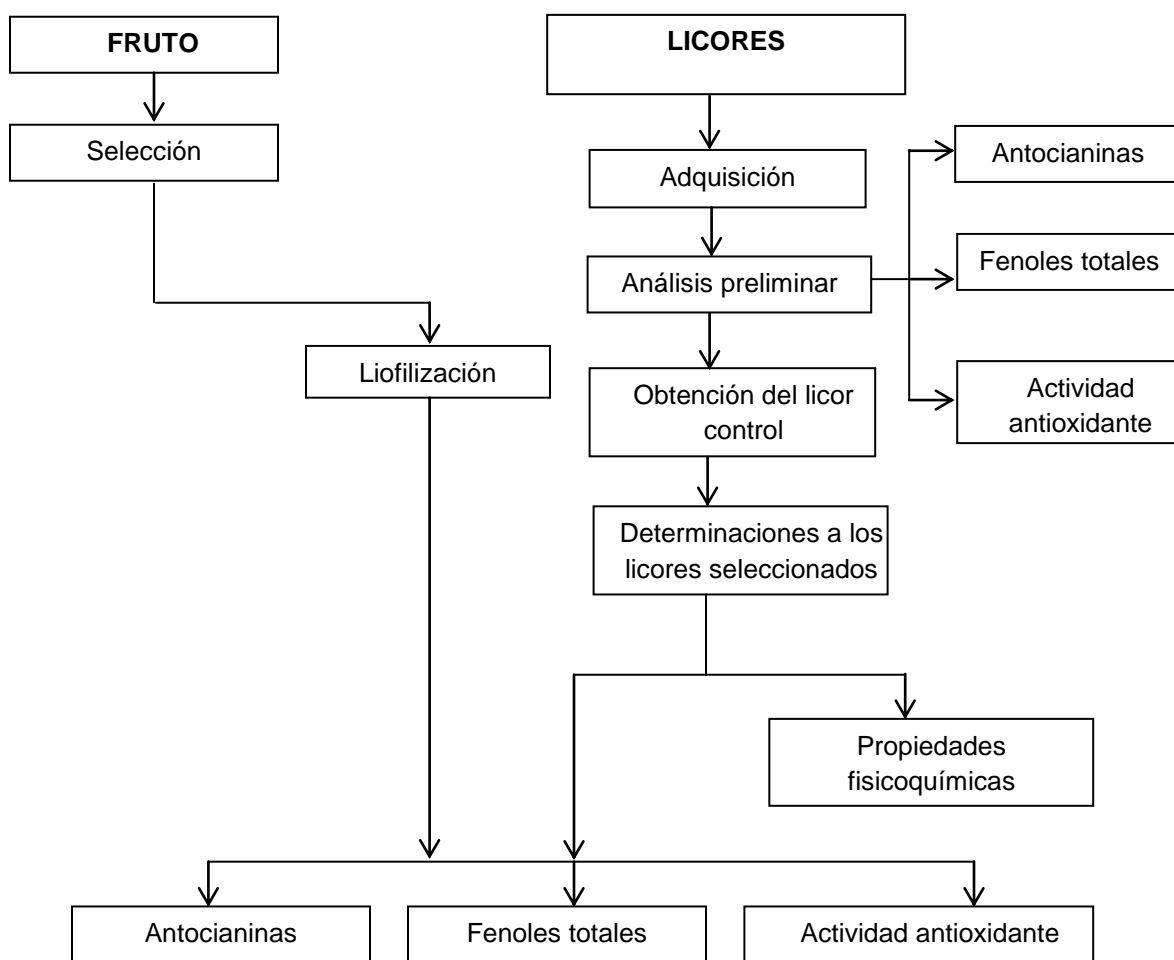


Figura 6. Esquema de trabajo para el fruto y licor de mora

## 5.2 Equipos y reactivos

En la tabla 6 y 7 se muestra la lista de equipos y reactivos empleados para la realización del trabajo de tesis.

**Tabla 6. Equipos y materiales empleados**

<b>Equipo y materiales</b>	<b>Modelo</b>	<b>Marca</b>
Balanza analítica	BL 210S	Sartorius
Celdas para UV	Macro plastibrand	
Espectrofotómetro UV/Vis	Lambda 35	Perkin Elmer
Estufa de convección de aire		Ribosa
Micropipetas 20-1000 $\mu$ L	2100	Eppendorf
Mufla	1415M	Thermolyne 1400 FB
Papel filtro	Whatman	No. 42
Papel filtro	Whatman	No. 1
Sonicador	8510	Branson
Liofilizador	FreeZone 4.5 L	Labconco
Colorímetro	IB900-MX	Rival

**Tabla 7. Reactivos empleados**

<b>Reactivos</b>	<b>Pureza (%)</b>	<b>Marca</b>
2,2-Difenil-1-picril-hidrazil (radical libre)	97	Aldrich®
Ácido- 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-croman-2- carboxílico (trolox)		Sigma®
Ácido clorhídrico		Sigma®
Acetato de sodio cristales A.C.S	99.8	Química Meyer®
Ácido Gálico		Sigma®
Carbonato de sodio anhidro A.C.S	99.87	Química Meyer®
Cloruro de potasio A.C.S	99.87	Química Meyer®
Folin-Ciocalteu 2N		Química Meyer®
Hidróxido de sodio	97.3	Fermont
Metabisulfito de potasio A.C.S	99	Química Meyer®
Metanol, grado reactivo	≥99.8	Sigma– Aldrich®
Reactivo de Fehling I para azúcares		Fluka
Reactivo de Fehling II para azúcares		Fluka

### 5.3 Obtención de las muestras

a) **Fruto.** Los frutos en estado maduro se obtuvieron del mercado local de Xico, en la temporada de mayo-junio 2008. Se obtuvieron dos lotes de aproximadamente 500 g cada uno de ellos, se transportaron en hieleras y se liofilizaron para su análisis.

b) **Licor de mora.** Se aplicó una encuesta a los productores de licor de mora de la región con la finalidad de tener conocimiento de quiénes empleaban moras silvestres (*Rubus spp*) para la elaboración de los licores, como resultado de la misma sólo 9 productores declararon emplear el fruto silvestre.

A estos 9 productores se les adquirió una muestra de licor de aproximadamente 1 L cada una de ellas, las cuáles se emplearon para realizar un estudio preliminar que permitiera conocer algunas de las características fisicoquímicas y propiedades de estos licores que se expenden a los consumidores, además que proporcionarán información de la relación entre las antocianinas y la actividad antioxidante. Las muestras fueron transportadas y almacenadas a temperatura ambiente hasta antes de su análisis, una vez abierta la botella se mantuvo en refrigeración, todas las determinaciones se efectuaron por triplicado.

c) **Licor control.** La muestra que se empleó como licor control fue proporcionada por la productora Lourdes Colorado, quien facilitó 1 L de licor recién preparado, el cual se repartió y almacenó en 4 frascos color ámbar perfectamente sellados que se mantuvieron a temperatura ambiente, y cada uno de ellos fue abierto cada mes para realizar los mismos análisis que se le efectuaron a los licores de mora seleccionados.

Las diferentes marcas de licores que se evaluaron así como algunos datos que los caracterizan se muestran a continuación, cabe mencionar que la información de añejamiento (años) que se muestra en la tabla se obtuvo mediante la comunicación directa con los productores (Tabla 8), por lo que no es un dato plenamente confiable, además que se desconocen las condiciones de almacenamiento y manejo del producto.

**Tabla 8. Marcas comerciales de los licores evaluados**

<b>Marca</b>	<b>Añejamiento (años)</b>	<b>Tipo de envase</b>	<b>Clave</b>
Tía Carmela	5	Plástico	<b>L1</b>
Licores Xico	5 a 6	Vidrio	<b>L2</b>
Toritos y licores la "Xiqueñada"	2	Plástico	<b>L3</b>
Las tres cascadas	1	Plástico	<b>L4</b>
Vinos y licores artesanales Qually	4	Vidrio	<b>L5</b>
Millueli, Licor de Morita	4	Vidrio	<b>L6</b>
Lourdes Colorado	2	Plástico	<b>L7</b>
Sin marca	1	Plástico	<b>L8</b>
Lourdes Colorado	3	Plástico	<b>L9</b>

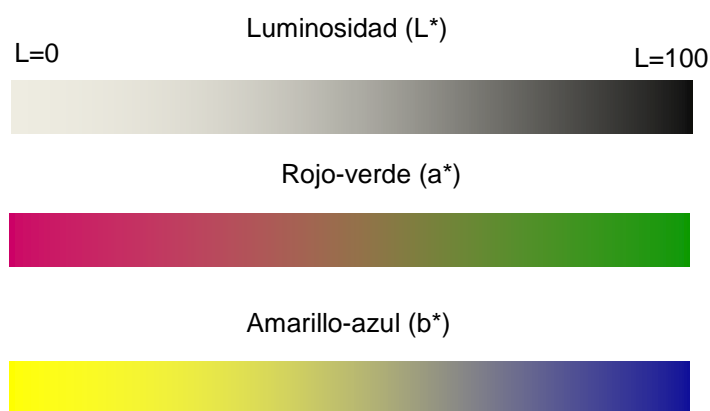
#### **5.4 Determinación de propiedades fisicoquímicas a los licores de mora**

A cada uno de los licores recolectados se les realizó por triplicado las siguientes determinaciones analíticas, cuyas técnicas se muestran en los Anexos de la A a la D:

- Grado alcohólico, mediante la NOM-142-SSA1-1995
- Acidez titulable, mediante la técnica descrita por la AOAC (método 962.12)
- pH, mediante la técnica de la AOAC (método 960.10)
- Azúcares reductores, mediante la NMX-V-006-1983

## 5.5 Establecimiento de los parámetros de color en los licores de mora

Se determinó los parámetros de color mediante el sistema CIEL\*a\*b\* (International Commission on Illumination, Viena) que ha sido empleado por las industrias de alimentos de los EUA para medir color en los productos alimenticios. Por lo que el color se determinó en término de los valores L\*, a\* y b\*, empleando un colorímetro triestímulo Hunter-Lab, el valor de iluminante empleado fue de D<sub>65</sub> y un ángulo de observación de 10°. En donde el parámetro colorimétrico L\* indica la brillantez o luminosidad y sus valores van del 0 al 100, valores positivos del parámetro a\* están en la dirección de los rojos y valores negativos en la dirección de los verdes; el parámetro colorimétrico b\* define el componente amarillo-azul, valores positivos son el vector de los amarillos y negativos de los azules (ver Figura 7).



**Figura 7. Variaciones en los tonos de color de los parámetros L\*, a\* y b\***

Estos valores sirven para obtener el tono o ángulo de matiz y pureza o croma del color (Calvo y Durán, 1997). El ángulo de matiz que se calcula como se muestra en la fórmula (1) y se deriva de las coordenadas de a\* y b\* que es representado en un plano cartesiano de 360°, donde 0°=rojos, 90°=amarillos, 180°=verdes y 270°=azules. El croma es una medida de la intensidad o saturación del color y se determina con la fórmula (2) que se muestra abajo.

$$\text{Tono (h)} = \text{Tan}^{-1} (a/b) \dots (1)$$

$$\text{Croma (C}^*) = (a^2 + b^2)^{1/2} \dots (2)$$

La determinación consistió en colocar 20 mL de licor de mora en un vaso de precipitado de 25 mL, dejándolo reposar 5 min para estabilizar la bebida y posteriormente se realizaron las mediciones.

## **5.6 Determinación de antocianinas monoméricas**

### **5.6.1 Preparación del extracto metanólico**

Se pesó 0.5 g de la muestra liofilizada al que se le adicionaron 30 mL de metanol acidificado con HCl al 1% para su extracción con ultrasonido por 10 minutos, posteriormente se centrifugó a 4000 rpm por 15 min a una temperatura de 0° C, se adicionó 10 mL de metanol acidificado y se le aplicó 10 minutos de ultrasonido, seguido de una centrifugación bajo las mismas condiciones. Finalmente se completó a un volumen total de 50 mL, las muestras se colocaron en recipientes de vidrio ámbar y se refrigeraron.

### **5.6.2 Método de pH diferencial**

A los extractos del fruto y a la muestra directa del licor de mora se les determinó el contenido de antocianinas monoméricas por el método de pH diferencial. Se prepararon dos diluciones diferentes de las muestras, una con el buffer de cloruro de potasio, pH 1.0, y otra con el buffer de acetato de sodio, pH 4.5, llevándolas a un volumen final de 3 mL, se esperó 15



minutos a que las diluciones se equilibraran y se realizó un barrido en el espectrofotómetro de 700 a 400 nm, esperando una absorbancia de las muestras entre 0.2 y 1.2.

Para calcular la concentración de pigmentos monoméricos se empleó la siguiente ecuación, la cual se expresó como cianidina-3-glucósido.

$$\text{Antocianinas monoméricos (mg/100 g)} = \frac{A \times PM \times FD \times 100}{(\epsilon \times l)}$$

Donde: **A**= Absorbancia, **PM**= peso molecular de la antocianina, **FD**= Factor de dilución,  $\epsilon$ = Absortividad molar.

El valor final de la absorbancia se obtuvo como sigue:

$$A = (A_{\lambda \text{ vis-max}} - A_{700 \text{ nm}})_{\text{pH } 1.0} - (A_{\lambda \text{ vis-max}} - A_{700 \text{ nm}})_{\text{pH } 4.5}$$

En donde  $A_{\lambda \text{ vis-max}}$  es la mayor absorbancia obtenida a pH 1 y pH 4.5, mientras que  $A_{700 \text{ nm}}$  es la lectura a 700 nm tanto para pH 1 como pH 4.5.

La concentración final de antocianinas (mg/100g) se calculó con base al volumen de extracto y peso de la muestra empleado (PM: 449.2 g/mol y  $\epsilon$ : 26900 g/mol cm ). Las determinaciones se realizaron por triplicado.

### 5.7 Determinación de color polimérico en el licor de mora

Se preparó una solución de bisulfito, diluyendo 1 g del reactivo en 5 mL de agua destilada a continuación se diluyó la muestra con un buffer de cloruro de potasio 0.025 M a un pH de 1.0 para obtener la adecuada dilución, teniendo ésta una absorbancia entre 0.2 y 1.2. Conociendo el factor de dilución a emplear, se diluyó la muestra con agua destilada y se

transfirió a dos celdas 2.8 mL de muestra diluida, y a la primera se le adicionó 0.2 mL de la solución de metabisulfito y a la segunda (muestra control) se le agregó 0.2 mL de agua destilada, se realizó un barrido en el espectrofotómetro de UV/VIS de 420 nm, a 700 nm contra un blanco de agua destilada.

La densidad de la muestra control (tratada con agua destilada) se obtuvo como sigue:

$$\text{Densidad del color} = [(A_{420\text{nm}} - A_{700\text{nm}}) + (A_{\lambda_{\text{vis-max}}} - A_{700\text{nm}})] \times \text{FD}$$

Para calcular el color polimérico de la muestra blanqueada con bisulfito se emplea la siguiente fórmula:

$$\text{Color polimérico} = [(A_{420\text{nm}} - A_{700\text{nm}}) + (A_{\lambda_{\text{vis-max}}} - A_{700\text{nm}})] \times \text{FD}$$

En ambos casos, FD es el factor de dilución empleado en las determinaciones.

Finalmente para calcular el porcentaje de color polimérico se emplea la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Color polimérico} = (\text{color polimérico} / \text{densidad color}) \times 100$$

### **5.8 Determinación de Fenoles Totales (FT)**

La técnica empleada fue la de Folin – Ciocalteu, y para la cual se construyó una curva de calibración de ácido gálico (Tabla 9), usando una solución patrón de 35 µg EAG/mL.

**Tabla 9. Curva de calibración de fenoles totales**

<b>Concentración</b>	<b>Solución patrón (mL)</b>	<b>Agua destilada (mL)</b>
35	3	0
30	2.571	0.429
25	2.143	0.857
20	1.714	1.286
15	1.286	1.714
10	0.857	2.143

A la dilución adecuada de estándar o muestra correspondiente (fruto o licor de mora), por triplicado, se le adicionó 1 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu 1N y se agitó vigorosamente, después de 5 minutos se le agregó 2 mL de solución de carbonato de sodio al 20 % se agitó y se dejó reposar por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se midió la absorbancia a 730 nm. La concentración de fenoles en las muestras se calcularon en base a la curva de calibración y se expresó como mg equivalentes de ácido gálico/ 100 g fruto fresco en el caso del fruto y mg equivalentes de ácido gálico/ 100 mL para el licor.

## **5.9 Actividad Antioxidante en los licores y fruto de mora**

### **5.9.1 Preparación de la curva de calibración**

Se realizaron las diluciones correspondientes. Se preparó una solución patrón, disolviendo 2 mg de trolox en 10 mL de metanol al 80 %. En la Tabla 10 se muestra las soluciones que se emplearon para la curva estándar.

**Tabla 10. Curva estándar de trolox**

<b>Concentración (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>Solución patrón (mL)</b>	<b>Metanol 80 % (mL)</b>
800	3	0
700	2.625	0.375
600	2.25	0.75
500	1.875	0.125
400	1.5	1.5
300	1.125	1.875
100	0.375	2.625

### **5.9.2 Preparación del radical DPPH•**

Se pesó 3.9 mg de DPPH• en un matraz aforado previamente tarado y se disolvió en 100 mL de metanol al 80 %. La solución se colocó en un sonicador para asegurar una buena disolución. El matraz se cubrió con papel aluminio como protección contra la luz.

### **5.9.3 Método de DPPH•**

Los extractos del fruto o el licor previamente diluidos, 0.1 mL, se les adicionó 2.9 mL de la solución de DPPH•, se agitó vigorosamente y se mantuvo en oscuridad por 2 horas a temperatura ambiente, se realizó una lectura a los 30 minutos en un espectrofotómetro de UV/VIS a 517 nm. El blanco contuvo metanol en lugar de la solución antioxidante.

#### 5.9.4 Cálculo de la actividad antioxidante

Se restaron las absorbancias del blanco y de la muestra (X) y se calcularon los mM equivalentes Trolox/mL muestra con la siguiente fórmula:

$$\text{mM Eq. Trolox/mL muestra} = \frac{X}{(m \times \text{mL muestra} \times 1000)}$$

donde:

m : pendiente de la ecuación de la curva de calibración

#### 5.10 Análisis estadístico de los resultados

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para establecer si existían diferencias significativas entre las medias de los valores resultantes de los análisis determinados a los diferentes licores, también se realizó una comparación de Tukey ambas con un intervalo de confianza del 95%. Se realizaron pruebas de correlación de Pearson, con un nivel de confianza de 0.05, entre todas las variables de este estudio, mediante el programa XLSTAT 2008.

Mediante un análisis de multivariante de la varianza (MANOVA) se evaluó la composición fisicoquímica y color en licores de mora, así como el contenido de antocianinas monoméricas, color polimérico y capacidad antioxidante, para determinar si existían diferencias globales entre los licores. Se empleó un análisis canónico para identificar las asociaciones de los parámetros fisicoquímicos y color con el contenido de fenoles, antocianinas monoméricas y color; empleando el paquete estadístico Statistica 8.0.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Fruto de zarzamora

El fruto silvestre que se empleó para el análisis está formado por diversos frutillos carnosos que van de tonos rojos a púrpura; y tal como se muestra en la Figura 8 son empleados por los productores para elaborar sus licores.



**Figura 8. Fruto maduro de zarzamora**

En cuanto al contenido de antocianinas monoméricas en el fruto de zarzamora se encontró, un valor de  $183.63 \pm 0.33$  mg cianidina 3-glucósido/100 g de peso fresco, este valor es superior a lo reportado para fresas por Rein (2005) y además se encuentra dentro de los intervalos de antocianinas reportados para arándanos, frambuesas y mora azul, como se puede observar en la Tabla 11.

**Tabla 11. Contenido de antocianinas en diferentes bayas**

<b>Baya</b>	<b>Antocianinas (mg/100 g)</b>
Mora azul <sup>1</sup>	60-480
Frambuesa <sup>1</sup>	20-220
Arándano <sup>1</sup>	20-360
Fresa <sup>1</sup>	10-80
<b>Zarzamora</b>	<b>183.63</b>

<sup>1</sup>Rein, 2005

El contenido de fenoles totales fue de  $477.12 \pm 6.91$  mg equivalentes de ácido gálico/100 g de peso fresco. Este valor es superior a las variedades de Chester y Hull Thornless de zarzamora en estado maduro reportado por Wang y Lin (2000), con valores de  $226 \pm 4.5$  y  $248 \pm 5.9$  mg ácido gálico/100 g de peso fresco, respectivamente. Los mismos autores reportan para el cultivo Bliss de otoño de frambuesa roja en estado maduro un contenido de fenoles totales de  $245 \pm 6.1$  y para el cultivo Norheaster de fresa un contenido de  $150 \pm 4.0$ , por lo que podemos considerar que el fruto silvestre de zarzamora evaluado aporta un contenido importante de fenoles, comparado con las bayas mencionadas.

Por otro lado, la actividad antioxidante que se determinó en el fruto fue de  $3.75 \pm 0.1$  mM equivalentes de Trolox/ g de peso fresco, este valor es superior al reportado por Kuskoski *et al.* (2005) en pulpa de mora el cuál fue de  $4.3 \pm 0.2$   $\mu$ M equivalentes de Trolox/ g de peso fresco. Los mismos autores reportan para la uva y para la acerola un contenido  $7.0 \pm 0.3$  y  $53.2 \pm 5.3$   $\mu$ M equivalentes de Trolox/ g de peso fresco, respectivamente. Siendo superior la aportación de actividad antioxidante del fruto silvestre de zarzamora.

## 6.2 Propiedades físicoquímicas en los licores

Debido a que existe escasa bibliografía respecto a determinaciones físicoquímicas en licores de frutas, se consideró conveniente realizar comparaciones con vinos, bebidas que de igual forma que los licores de mora tienen un contenido importante de antocianinas monoméricas. En la Tabla 12 se muestran los datos correspondientes a las propiedades físicoquímicas de los licores en cuanto al contenido de azúcares reductores totales, grado alcohólico, acidez titulable y pH, representado el promedio ( $\pm$  desviación estándar).

**Tabla 12. Propiedades físicoquímicas de los licores**

Muestra <sup>1</sup>	Azúcares reductores (g/L)	% Alc. Vol.	Acidez <sup>2</sup>	pH
L1	229.4 $\pm$ 0.00 <sup>f</sup>	20 $\pm$ 0.00	6.69 $\pm$ 0.06 <sup>g</sup>	3.40 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>
L2	172.4 $\pm$ 0.00 <sup>i</sup>	20 $\pm$ 0.00	12.31 $\pm$ 0.07 <sup>cd</sup>	3.16 $\pm$ 0.01 <sup>d</sup>
L3	335.6 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	10 $\pm$ 0.00	13.37 $\pm$ 0.06 <sup>c</sup>	2.84 $\pm$ 0.01 <sup>e</sup>
L4	337.8 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	10 $\pm$ 0.00	6.69 $\pm$ 0.06 <sup>g</sup>	2.46 $\pm$ 0.00 <sup>f</sup>
L5	233.6 $\pm$ 0.00 <sup>e</sup>	20 $\pm$ 0.00	8.61 $\pm$ 0.06 <sup>f</sup>	3.15 $\pm$ 0.01 <sup>d</sup>
L6	255.1 $\pm$ 0.00 <sup>c</sup>	20 $\pm$ 0.00	11.98 $\pm$ 0.06 <sup>d</sup>	3.19 $\pm$ 0.01 <sup>d</sup>
L7	221.2 $\pm$ 0.00 <sup>h</sup>	12 $\pm$ 0.00	14.83 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	3.18 $\pm$ 0.00 <sup>d</sup>
L8	242.7 $\pm$ 0.00 <sup>d</sup>	18 $\pm$ 0.00	9.14 $\pm$ 0.10 <sup>e</sup>	3.75 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>
L9	227.3 $\pm$ 0.00 <sup>g</sup>	20 $\pm$ 0.00	14.03 $\pm$ 0.21 <sup>b</sup>	3.47 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>
CE	$\geq 100$	$\geq 15$	-	-

<sup>1</sup>Letras diferentes en las columnas indican diferencia significativa (Tukey HSD,  $p < 0.05$ ) entre los licores

<sup>2</sup>Expresado como g de ác. Cítrico/100 mL

En cuanto al contenido de azúcares reductores totales expresado en g/L, se observa que los valores obtenidos se encuentran en el intervalo de 172.4 a 337.8 g/L; estos valores en los licores se encuentran dentro de lo establecido por la Comunidad Europea (CE) en la reglamentación para licores de frutas, que es de mínimo 100 g/L.

El grado alcohólico expresado como porcentaje de alcohol volumen de los licores de mora se encuentra dentro de un intervalo de 12 a 20% de alcohol Vol. (a 20° C), con excepción de los



licores L3, L4 y L7, con valores menores, por tanto la mayoría de ellos se encuentran dentro del 15% Alc. Vol. establecido por la reglamentación de la Comunidad Europea para el grado alcohólico.

En lo que respecta al pH, se encuentra en el intervalo de 2.46 a 3.75, la comunidad Europea no hace referencia a este parámetro y como dato comparativo se tiene que los licores de mora se encuentran dentro de los valores reportados para vinos tintos portugueses por Dallas y Laureano (1994) quienes encontraron un pH de 3.52 para sus vinos.

La acidez titulable de los licores se encuentra en el intervalo de  $6.69 \pm 0.06$  a  $14.83 \pm 0.06$  g ácido cítrico/100 mL, estos valores comparado con lo que reporta Wrolstad *et al.* (1990) de 1.03 g ácido cítrico/100 mL para vinos jóvenes de zarzamora es inferior al obtenido en el presente estudio, estas diferencias pueden deberse al estado de madurez de la zarzamora empleado, asimismo la acidez pueden tener un efecto en su la calidad organoléptica y en la regulación del pH de los licores. Además, el pH y la acidez no presentan una relación inversa, como comúnmente sucede, lo que puede deberse a que aparte del ácido cítrico (como se expresan los resultados), se encuentran otros ácidos que contribuyen en la regulación del pH en los licores como el ácido málico.

### **6.3 Cambios en los parámetros de color en los licores**

El color es un factor determinante y de los aspectos más apreciados en la calidad de los vinos tintos, además que tiene un marcado efecto en la aceptación de los consumidores quienes relacionan la calidad de los alimentos con la apariencia, por lo que fue importante determinar los parámetros que nos describen los cambios de color en los licores de mora.

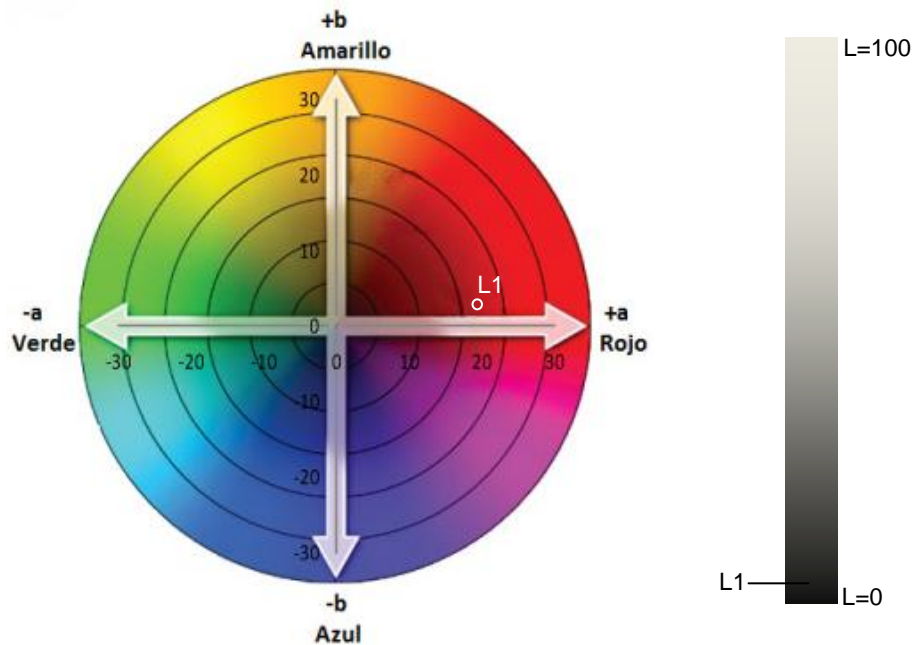
En la Tabla 13 se muestran los parámetros colorimétricos determinados en los 9 licores de mora.

**Tabla 13. Propiedades colorimétricas**

Muestra <sup>1</sup>	L*	a*	b*	C*	h
L1	1.78±0.07 <sup>ab</sup>	4.26±0.19 <sup>5a</sup>	1.40±0.11 <sup>a</sup>	4.49±0.12 <sup>a</sup>	18.26±1.76 <sup>cd</sup>
L2	0.69±0.07 <sup>cde</sup>	2.54±0.19 <sup>cd</sup>	0.71±0.05 <sup>cd</sup>	2.64±0.17 <sup>c</sup>	15.71±3.24 <sup>d</sup>
L3	0.56±0.06 <sup>de</sup>	1.49±0.04 <sup>f</sup>	0.28±0.02 <sup>e</sup>	1.52±0.04 <sup>e</sup>	10.49±0.34 <sup>f</sup>
L4	0.18±0.04 <sup>e</sup>	0.36±0.06 <sup>h</sup>	-0.28±0.04 <sup>f</sup>	0.46±0.07 <sup>f</sup>	51.73±0.84 <sup>a</sup>
L5	0.44±0.06 <sup>de</sup>	1.12±0.02 <sup>g</sup>	0.48±0.07 <sup>de</sup>	1.21±0.05 <sup>e</sup>	23.06±2.66 <sup>c</sup>
L6	0.87±0.04 <sup>cd</sup>	2.10±0.05 <sup>e</sup>	0.56±0.06 <sup>cd</sup>	2.18±0.06 <sup>d</sup>	14.89±1.08 <sup>ef</sup>
L7	1.26±0.05 <sup>bc</sup>	2.36±0.02 <sup>de</sup>	0.78±0.08 <sup>bc</sup>	2.47±0.05 <sup>cd</sup>	18.38±1.71 <sup>cd</sup>
L8	1.76±0.60 <sup>ab</sup>	2.81±0.08 <sup>bc</sup>	1.03±0.16 <sup>b</sup>	2.99±0.13 <sup>b</sup>	20.09±2.23 <sup>cd</sup>
L9	2.11±0.11 <sup>a</sup>	2.82±0.10 <sup>b</sup>	1.60±0.05 <sup>a</sup>	3.24±0.05 <sup>b</sup>	29.46±0.41 <sup>b</sup>

<sup>1</sup>Letras diferentes en las columnas indican diferencia significativa (Tukey HSD, p<0.05) entre los licores

En la Figura 9 a manera de ejemplo se ubican los parámetros colorimétricos L\*, a\* y b\* en el plano del sistema CIEL\* a\* b\* del licor L1.

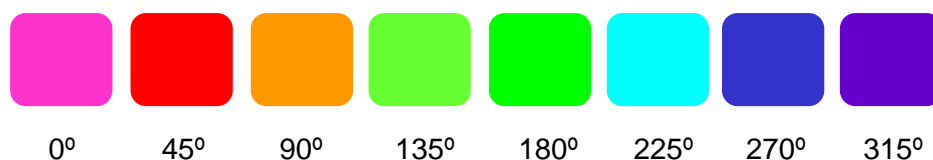


**Figura 9. Representación de los parámetros colorimétricos en el sistema CIEL\* a\* b\***

Referente al parámetro  $a^*$ , en los licores de mora, los valores se encuentran entre  $0.36 \pm 0.06$  y  $4.26 \pm 0.15$  los cuales tienden hacia los tonos rojos. Mediante el análisis estadístico de Tukey, se encontró que existe diferencia significativa entre los licores evaluados, además estos valores son bajos comparados a los reportados por Maletic *et al.* (2009) para vinos tintos croatas en donde el parámetro  $a^*$  se encuentran en el intervalo de 53.02 a 40.41. Lo anterior puede deberse a la variedad del fruto y al tipo de proceso y almacenamiento de los vinos croatas.

En el caso del parámetro colorimétrico  $b^*$ , los licores de mora se encuentran dentro del intervalo de  $-0.28 \pm 0.04$  y  $1.60 \pm 0.05$ . Al analizarse estadísticamente los resultados se encontró que el análisis de varianza indica diferencia significativa para  $p < 0.05$ .

En lo que respecta al ángulo de matiz (h) los valores se encontraron en un intervalo de  $10.50 \pm 0.34$  y  $29.49 \pm 0.41$ , como el incremento del ángulo va de 0 a  $60^\circ$ , los tonos se encuentran entre los púrpuras y rojizos, como se puede observar en la Figura 10, a esta tonalidad posiblemente contribuyeron las antocianinas y los pigmentos polimerizados, como reporta Rommel *et al.* (1992) en su estudio realizado a vinos y jugos de zarzamora.



**Figura 10. Tonos de color del ángulo de matiz**

#### 6.4 Antocianinas monoméricas, %color polimérico y densidad de color en los licores de mora

Los datos correspondientes al contenido de antocianinas monoméricas, densidad de color y color polimérico se muestran en la Tabla 14, observándose que existe diferencia significativa en los tres parámetros evaluados a los 9 licores. El contenido de antocianinas monoméricas totales expresado como mg de cianidina 3-glucósido/L de licor, en los diferentes licores se encuentra dentro de un intervalo de  $3.56 \pm 0.19$  a  $76.95 \pm 1.20$  mg cianidina 3-glucósido /L; esta amplitud de antocianinas puede deberse, en gran parte, al proceso de elaboración, el estado de madurez del fruto y al tiempo de almacenamiento.

**Tabla 14. Contenido de antocianinas monoméricas y %color polimérico**

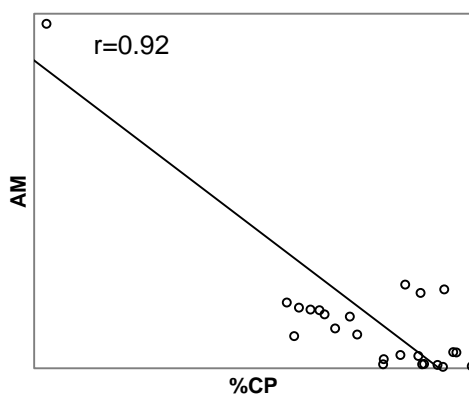
Muestra <sup>1</sup>	Antocianinas monoméricas (mg/L)	% color polimérico	Densidad de color
L1	$10.50 \pm 0.87^d$	$75.49 \pm 0.03^c$	$6.46 \pm 0.20^a$
L2	$14.66 \pm 0.94^c$	$75.79 \pm 0.02^c$	$5.84 \pm 0.09^b$
L3	$16.21 \pm 1.00^c$	$72.30 \pm 0.01^c$	$5.74 \pm 0.08^b$
L4	$76.95 \pm 1.20^a$	$44.16 \pm 0.01^d$	$5.66 \pm 0.14^b$
L5	$5.44 \pm 0.65^e$	$83.22 \pm 0.02^b$	$3.69 \pm 0.09^e$
L6	$3.56 \pm 0.19^f$	$88.56 \pm 0.02^{ab}$	$4.99 \pm 0.11^c$
L7	$3.95 \pm 0.04^{ef}$	$84.19 \pm 0.02^b$	$4.36 \pm 0.05^d$
L8	$19.84 \pm 0.51^b$	$85.65 \pm 0.02^{ab}$	$3.91 \pm 0.13^e$
L9	$6.10 \pm 0.51^e$	$90.18 \pm 0.02^a$	$4.57 \pm 0.13^d$

<sup>1</sup>Letras diferentes en las columnas indican diferencia significativa (Tukey HSD,  $p < 0.05$ ) entre los licores

De forma similar en un estudio realizado por Avalos *et al.* (2003) observaron la misma amplitud en el contenido de antocianinas en diversos vinos tintos reportando un contenido de antocianinas monoméricas en el intervalo de  $27.4 \pm 3.0$  a  $116.8 \pm 1.7$  mg cianidina 3-glucósido/L.

Referente a la densidad de color (suma de las absorbancias a 508 nm y 420 nm) los valores obtenidos se encuentran en un intervalo de  $3.91 \pm 0.13$  y  $6.46 \pm 0.20$ , el análisis de Tukey indicó los licores L2, L3 y L4 no presentan diferencia significativa con respecto a este parámetro.

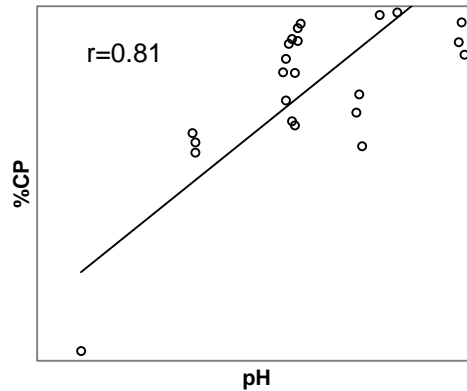
En el caso del porcentaje de color polimérico, indicativo del grado de polimerización de las antocianinas, se encuentra en un amplio intervalo de  $44.16 \pm 0.01$  a  $90.18 \pm 0.02\%$ . El contenido de antocianinas y el %color polimérico presentaron una asociación negativa, como indica la correlación de Pearson realizada, con valor de 0.92, como puede apreciarse en la Figura 11, lo que indica que al disminuir el contenido de antocianinas monoméricas incrementa el %color polimérico.



**Figura 11. Correlación de Pearson entre el %color polimérico (%CP) y el contenido de antocianinas monoméricas (AM)**

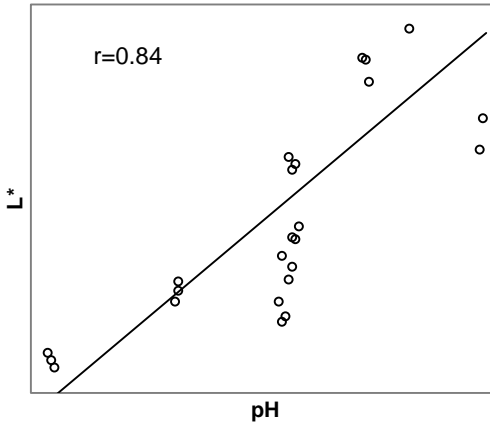
Asimismo se obtuvo una asociación entre el %color polimérico y el pH de los licores de mora de 0.81, como se observa en la Figura 12, esto puede deberse a que a valores de pH altos (mayores a 4) la forma estable de las antocianinas (forma oxonium) se ve desfavorecida. Un comportamiento parecido en vinos fue reportado por Sims y Morris (1984) quienes

obtuvieron una correlación de 0.87 para la relación de cambios de pH y oscurecimiento que está relacionado con la formación de compuestos poliméricos.



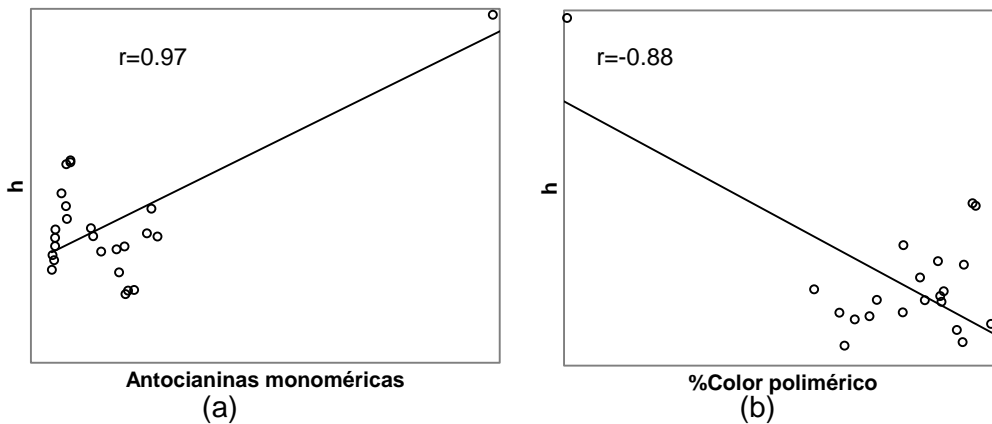
**Figura 12. Correlación de Pearson entre el %color polimérico (%CP) y el pH**

Aunado a lo anterior, se observó que existe una relación significativa entre el pH y la luminosidad ( $L^*$ ) de 0.84, como puede apreciarse en la Figura 13, y como el pH está asociado con el %color polimérico y este a su vez con el contenido de antocianinas, se puede suponer que un incremento o decremento en el contenido de antocianinas y %color polimérico tiene influencia en la luminosidad. Lo anterior tiene una implicación en el control de calidad de los licores, dado que el pH y la luminosidad pueden ser parámetros que ayuden a controlar la calidad de los licores durante su proceso de elaboración.



**Figura 13. Correlación de Pearson entre pH y el parámetro L\***

De igual forma en la Figura 14 (a) se observa que existe una asociación significativa de 0.97 entre el ángulo de matiz y el contenido de antocianinas monoméricas, mientras que existe una correlación negativa de 0.88 entre el ángulo de matiz y el porcentaje de color polimérico como se observa en la Figura 14(b).



**Figura 14. Correlación de Pearson entre el ángulo de matiz y (a) antocianinas monoméricas y (b) % Color polimérico**

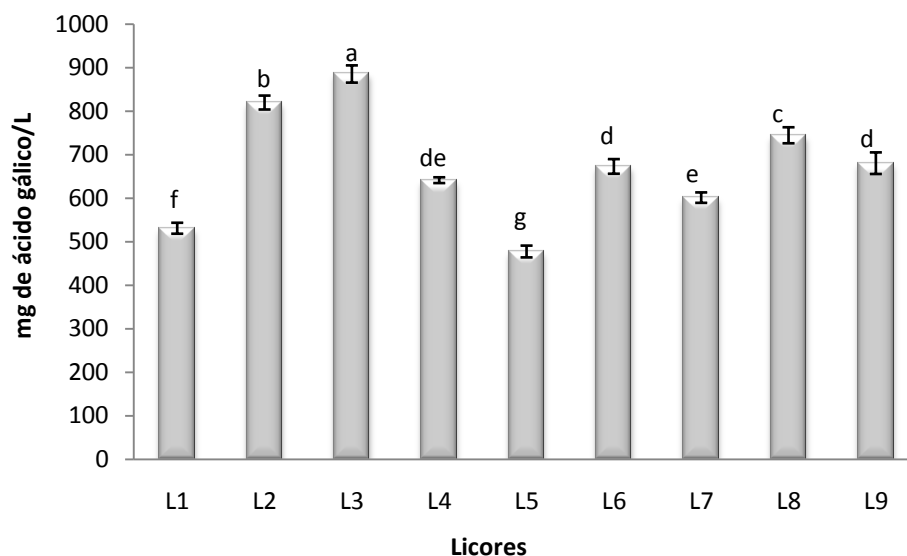
Las asociaciones anteriores coinciden con lo reportado por Hong y Wrolstad (1990) para jugo de frutas. Lo anterior tiene una importancia práctica porque el ángulo de matiz es un

parámetro que se puede emplear para medir de forma indirecta el contenido de antocianinas y de %color polimérico.

En el Anexo A se muestran el resto de las relaciones lineales determinadas mediante la correlación de Pearson existente entre diferentes parámetros determinados a los 9 licores de mora.

### 6.5 Fenoles totales y actividad antioxidante

Como se aprecia en el gráfico de la Figura 15, el contenido de fenoles totales expresados como equivalentes de ácido gálico (EAG) por cada litro de licor, se encuentra en un intervalo de  $477.12 \pm 5.52$  a  $884.98 \pm 16.11$  mg EAG/L.



Letras diferentes en las barras indican diferencia significativa (Tukey HSD,  $p < 0.05$ ) entre los licores

**Figura 15. Contenido de fenoles totales en los licores de mora**



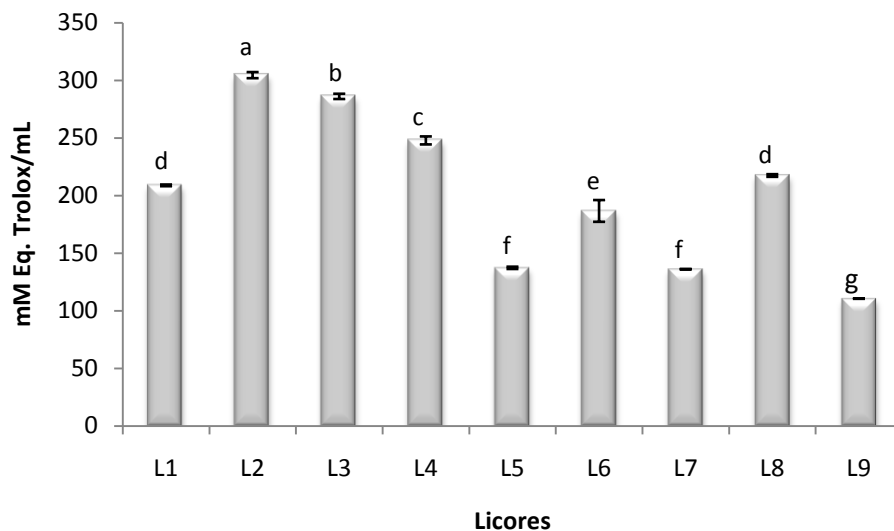
Los licores con mayor contenido de fenoles fueron L3 y L2, además el análisis de Tukey indicó que no existe diferencia significativa entre los licores L4, L6, L7 y L9. Cabe destacar que el contenido de fenoles de los licores de mora son superiores a los reportados por Heinonen *et al.* (1998) para licores de fresas y arándanos que se observa en la Tabla 15. Con estos datos se aprecia que el licor de mora da un aporte importante de fenoles si se compara con los licores de bayas reportados.

**Tabla 15. Contenido de fenoles en licores de bayas**

<b>Licores</b>	<b>Fenoles (mg EAG/L)</b>
Fresas <sup>1</sup>	525
Arándanos <sup>1</sup>	500
Cerezas <sup>1</sup>	1080
<b>Mora<sup>2</sup></b>	<b>447-885</b>

<sup>1</sup> Heinonen *et al.*, 1998

La actividad antioxidante expresada como mM equivalentes de trolox por cada mL de licor se muestra en la Figura 16, observándose que los rangos oscilan entre valores de  $110.51 \pm 0.18$  y  $304.47 \pm 2.65$  mM equivalentes de trolox/mL. Destacándose que el licor L2 tiene la mayor actividad antioxidante, seguido por el licor L3, además ambos licores tienen el mayor contenido de fenoles. Sin embargo el licor con el mayor contenido de fenoles no tiene la mayor capacidad antioxidante, lo cual sugiere que existen otros metabolitos que están aportando actividad antioxidante en los licores, como la vitamina C.



Letras diferentes en las barras indican diferencia significativa (Tukey HSD,  $p < 0.05$ ) entre los licores

**Figura 16. Actividad antioxidante en los licores de mora**

## 6.6 Análisis estadístico de las mediciones efectuadas a los licores de mora

A continuación se presentan el Análisis Multivariable de la Varianza (MANOVA) empleando una prueba multivariada de Wilks y la Correlación canónica que ayudaran a explicar estadísticamente las asociaciones existentes entre las variables determinadas en los licores de mora.

### 6.6.1 Análisis Multivariado de la Varianza (MANOVA)

La importancia del empleo de este análisis multivariado radica en que ayuda a comparar las variables globales determinadas en este estudio, proporcionando la existencia o no de diferencia significativa entre los licores de mora de los distintos productores, incluyendo de esta forma todas las variables de análisis.

Como se observa en la Tabla 16, mediante esta prueba se obtuvo, , los valores de significancia para el análisis, encontrando que existe diferencia significativa entre ellos, es

decir las características de los licores cambian dependiendo del productor, sin embargo el licor L4 no muestra diferencia significativa con respecto a la muestra L8.

**Tabla 16. Valores de p de la prueba multivariada de Wilks para los licores de mora**

<b>Muestra</b>	<b>L1</b>	<b>L2</b>	<b>L3</b>	<b>L4</b>	<b>L5</b>	<b>L6</b>	<b>L7</b>	<b>L8</b>	<b>L9</b>
L1									
L2	0.0025								
L3	0.0018	0.0010							
L4	0.0001	0.0006	0.0070						
L5	0.0198	0.0002	0.0017	0.0010					
L6	0.0025	0.0011	0.0011	0.0012	0.0083				
L7	0.0230	0.0027	0.0015	0.0004	0.0008	0.0067			
L8	0.0098	0.0029	0.0023	<b>0.1326</b>	0.0370	0.0076	0.0030		
L9	0.0383	0.0015	0.0016	0.0014	0.0028	0.0056	0.0252	0.0097	

Los valores en negrita son significativamente diferentes de 0 con un nivel de significación alfa=0.05

Las diferencias significativas obtenidas al evaluar los datos encontrados para los licores, mediante la prueba multivariada de Wilks se pueden atribuir a que el proceso de elaboración de los licores es de forma artesanal, por lo que difícilmente se controla la materia prima empleada, las variables del proceso y las condiciones de almacenamiento.

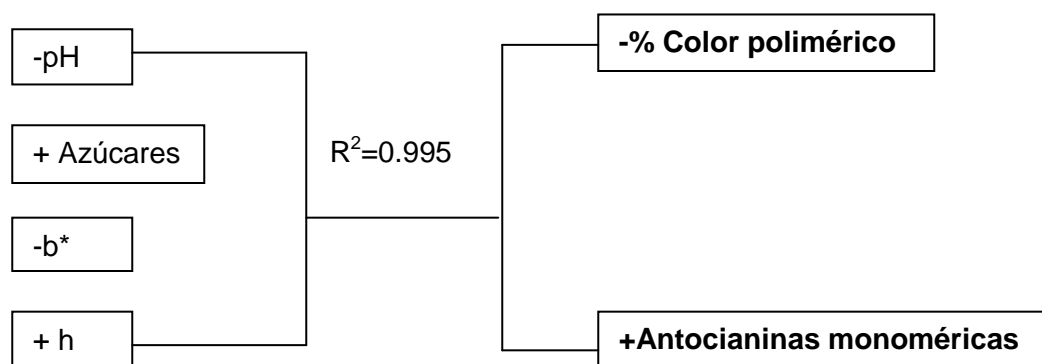
Los resultados de esta prueba no permiten declarar las variables de mayor influencia sobre el contenido de antocianinas monoméricas, %color polimérico y actividad antioxidante, por lo que fue necesario realizar un análisis estadístico que permitiera encontrar la asociación entre las variables globales.

### **6.6.2 Correlación canónica**

La correlación canónica es un método de análisis estadístico que permite encontrar la asociación entre dos grupos de variables.

Para este análisis se estableció como primer bloque de variables al pH, azúcares totales, acidez, grado alcohólico y color (determinaciones fisicoquímicas), y como segundo bloque al contenido de fenoles, antocianinas monoméricas, color polimérico, densidad de color y capacidad antioxidante.

Con el empleo de este análisis multivariado, se obtuvieron dos raíces principales con significancia de  $p < 0.05$ , el signo que aparece de lado izquierdo de cada parámetro indica la forma en que se relaciona con los otros parámetros, es así que el signo negativo (-) indica decremento en el valor y el signo positivo (+) un incremento en el valor; a continuación se muestra la raíz 1, y las variables fisicoquímicas que influyen sobre el contenido de antocianinas monoméricas y %color polimérico (Figura 17).



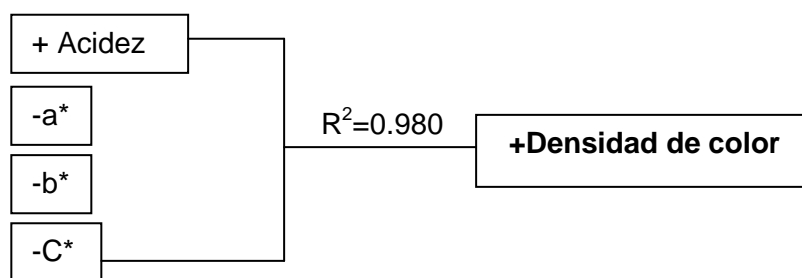
**Figura 17. Raíz 1 obtenida de la correlación canónica**

En la primera raíz se observa que existe una alta correlación ( $R^2 = 0.99$ ) entre algunos parámetros fisicoquímicos, colorimétricos y el contenido antocianinas monoméricas, y %color polimérico. Así, la correlación canónica también indicó que al disminuir el valor del pH existe un mayor contenido de antocianinas monoméricas, lo cual puede deberse a que se favorece la forma estable de las antocianinas, la forma oxonium, la cual además da las coloraciones características de las antocianinas monoméricas (Giustin y Wrolstad, 2001).

En cuanto al contenido de azúcares, el %color polimérico disminuye al incrementar el contenido de éstos, lo anterior concuerda con el estudio realizado por Wrolstad *et al.*, (1990) en fresas congeladas donde se encontró que el oscurecimiento y el desarrollo de color polimérico se reduce significativamente por la adición de azúcar, evitando la degradación de las antocianinas monoméricas a intermediarios inestables de ácidos fenólicos y compuestos aldehídicos (Fleschhut *et al.*, 2006).

Asimismo en la Figura 18 se aprecia una relación directa entre las antocianinas monoméricas y al ángulo de matiz (h), este hecho puede ser de utilidad práctica debido a que la medición del ángulo de matiz podría emplearse como un indicador de la presencia de antocianinas monoméricas en los licores.

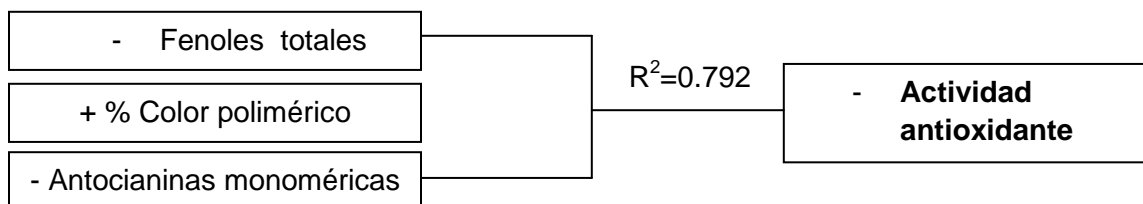
Como puede apreciarse en la Figura 18, que muestra la raíz 2 de la correlación canónica, los factores que influyen sobre la densidad de color son la acidez y los parámetros colorimétricos  $a^*$ ,  $b^*$  y  $C$ . Lo anterior sugiere que al incrementar la presencia de ácidos orgánicos principalmente cítrico y málico, los cuales se encuentran en una mayor proporción en las zarzamoras, tiene una repercusión no sólo desde el punto de vista sensorial (Hulme, 1971), sino además pueden llegar a regular el pH y afectar la coloración final del licor, dado que la densidad de color es la suma de las absorbancias a 420 y 508 nm, que son las longitudes de onda a las que absorben las antocianinas monoméricas y poliméricas.



**Figura 18. Raíz 2 obtenida de la correlación canónica**

Los resultados de ambas raíces, se tienen elementos para pensar que con el conocimiento de estos datos, se pueden establecer los parámetros a evaluar en los licores de mora para preservar aquellas características importantes, no sólo desde el punto de vista funcional sino de calidad sensorial para el consumidor. Por ejemplo para en el caso específico del pH y azúcares reductores pueden ser variables controlables en el proceso de elaboración del licor, permitiendo encontrar las mejores condiciones que favorezcan el mayor contenido de antocianinas monoméricas.

Con la finalidad de establecer los parámetros que tienen relación con la actividad antioxidante, se realizó otra correlación canónica, en este caso entre el contenido de fenoles, %color polimérico y antocianinas monoméricas (primer bloque) y la actividad antioxidante (segundo bloque), teniendo como única raíz la que se muestra en la Figura 19, resultando que a menor contenido de fenoles y mayor contenido de color polimérico la actividad antioxidante se ve disminuida ( $p < 0.05$ ). Esta asociación indica que la actividad antioxidante en los licores de mora analizados, está directamente relacionada con el contenido antocianinas monoméricas y de fenoles, lo que sugiere que deberían buscarse las condiciones de procesamiento y almacenamiento que ayuden a preservar estos compuestos en los licores.



**Figura 19. Raíz 1 de la Correlación canónica para la actividad antioxidante**

## 6.7 Determinaciones durante el tiempo de almacenamiento del licor control

A continuación se muestran los resultados obtenidos en el licor control durante los 4 meses de almacenamiento, así como el análisis estadístico realizado a los mismos, que consistió en realizar comparaciones de Tukey y correlaciones de Pearson.

### 6.7.1 Determinaciones fisicoquímicas al inicio del almacenamiento del licor control

Los valores de pH, porcentaje de alcohol y acidez determinados al licor control al inicio del almacenamiento, se muestran en la Tabla 17, donde se puede observar que el porcentaje de alcohol del licor control se encuentra por arriba del 15% estipulado por la Comunidad Europea, sin embargo en el contenido de azúcares reductores es menor a lo reglamentado (mínimo de 100 g/L) para licores de frutas por el mismo organismo.

**Tabla 17. Parámetros determinados al inicio del almacenamiento**

<b>Parámetro</b>	<b>Valor</b>
Azúcares reductores (g/L)	83.80±0.40
Acidez (g ác. Cítrico/100 mL)	15.09±0.20
Alcohol volumen (%)	18.00±0.00
pH	3.55±0.05

Cabe hacer mención que este licor fue proporcionado por el mismo productor de los licores L7 y L9, y los datos encontrados en cuanto a azúcares reductores y alcohol volumen (%) son considerablemente diferentes con respecto al que nos proporcionaron como licor control. La diferencia en estos datos remarca la variación que se puede obtener entre lote y lote de estos licores por tratarse de un proceso artesanal.

### 6.7.2 Determinaciones colorimétricas durante el tiempo de almacenamiento del licor control

Como se pueden observar en la Tabla 18, los parámetros de color que incrementan significativamente durante el tiempo de almacenamiento son L\*, a\* y C\*, estos parámetros describen la brillantez, la coloración hacia los tonos rojos y la saturación de este color en el licor control, respectivamente.

El parámetro colorimétrico a\* muestra un incremento significativo con el transcurso del tiempo, es decir se desplaza hacia los tonos rojos, lo cual pueda deberse de igual forma a la polimerización de las antocianinas, que están ayudando a estabilizar el color.

**Tabla 18. Parámetros de color en el licor control durante el almacenamiento**

Parámetro <sup>1</sup>	Tiempo de almacenamiento (meses)			
	1	2	3	4
<b>L*</b>	0.46±0.04 <sup>d</sup>	1.46±0.09 <sup>c</sup>	5.67±0.20 <sup>b</sup>	6.15±0.11 <sup>a</sup>
<b>A*</b>	1.85±0.03 <sup>d</sup>	7.04±0.14 <sup>c</sup>	10.58±0.15 <sup>b</sup>	16.09±0.12 <sup>a</sup>
<b>B*</b>	0.42±0.08 <sup>b</sup>	-11.54±0.23 <sup>d</sup>	5.10±0.17 <sup>a</sup>	-2.91±0.06 <sup>c</sup>
<b>C*</b>	1.90±0.03 <sup>d</sup>	13.52±0.26 <sup>b</sup>	11.74±0.09 <sup>c</sup>	16.35±0.12 <sup>a</sup>
<b>H</b>	12.94±0.7 <sup>d</sup>	58.63±0.10 <sup>b</sup>	25.76±1.01 <sup>c</sup>	10.25±0.22 <sup>a</sup>
<b>Dc</b>	5.57±0.07 <sup>b</sup>	5.56±0.06 <sup>b</sup>	5.81±0.07 <sup>a</sup>	5.39±0.11 <sup>b</sup>

<sup>1</sup>Letras diferentes en las columnas indican diferencia significativa (Tukey HSD, p<0.05) entre los licores



### 6.7.3 Variaciones en el contenido de antocianinas monoméricas, %color polimérico y actividad antioxidante durante el tiempo de almacenamiento

En la Tabla 19 se muestran los resultados obtenidos en el licor control durante el almacenamiento con respecto al contenido de antocianinas monoméricas, %color polimérico y la actividad antioxidante.

Con respecto al contenido de antocianinas monoméricas se observa de forma general una disminución significativa de  $20.55 \pm 0.35$  a  $14.03 \pm 0.14$  mg cianidina 3-glucósido/L licor, esta pérdida puede atribuirse al procesamiento del licor de mora y además a las condiciones de almacenamiento de la misma; la anterior disminución en el contenido de antocianinas monoméricas concuerda con el estudio realizado en vinos de mora negra por Tsai *et al.* (2004), quienes de igual forma experimentan una disminución de este parámetro.

**Tabla 19. Antocianinas, %color polimérico, Fenoles y Actividad antioxidante durante el almacenamiento**

Parámetro <sup>1</sup>	Tiempo de almacenamiento (meses)			
	1	2	3	4
Antocianinas monoméricas (mg/L)	$20.55 \pm 0.35^a$	$15.78 \pm 0.51^b$	$11.41 \pm 0.55^d$	$14.03 \pm 0.14^c$
Color polimérico (%)	$56.9 \pm 0.01^c$	$62.6 \pm 0.02^b$	$63.8 \pm 0.02^b$	$72.0 \pm 0.02^a$
Fenoles totales (mg EAG/L)	$1422.32 \pm 14.4^c$	$1315.21 \pm 14.3^d$	$1518.91 \pm 25.7^b$	$1733.26 \pm 27.4^a$
Actividad Antioxidante <sup>2*</sup>	$94.19 \pm 3.43^a$	$62.70 \pm 1.11^b$	$50.00 \pm 0.20^c$	$63.15 \pm 1.15^b$

<sup>1</sup>Letras diferentes en las filas indican diferencia significativa (Tukey HSD,  $p < 0.05$ ) entre los licores

<sup>2</sup>Expresado como mM Eq. Trolox/mL Licor

En cuanto el porcentaje de color polimérico el valor aumentó significativamente de  $56.9 \pm 0.01$  a  $72.0 \pm 0.02\%$ , lo que sugiere que durante el almacenamiento se dieron reacciones de polimerización de las antocianinas, de ahí que se haya tenido una disminución de las antocianinas monoméricas.

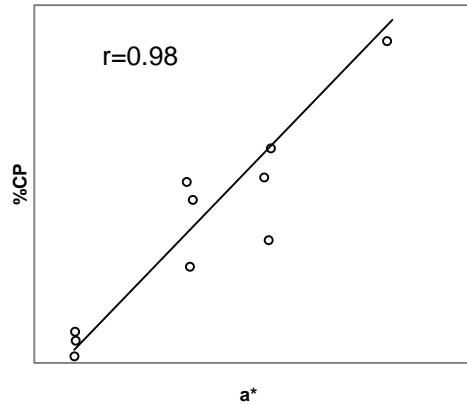
El contenido de fenoles totales experimentó una disminución del primer al segundo mes de  $1422.32 \pm 14.4$  a  $1315.21 \pm 14.3$  mg EAG/L licor, sin embargo en el tercer y cuarto mes hubo un incremento significativo de  $1518.91 \pm 25.7$  a  $1733.26 \pm 27.4$  mg EAG/L licor respectivamente. El incremento en el contenido de fenoles en los meses 3 y 4 posiblemente se debe a que durante el almacenamiento del licor control hubo liberación de otros fenoles que se encontraban impedidos.

La actividad antioxidante en los primeros tres meses fue disminuyendo de  $94.19 \pm 3.43$  hasta  $50.00 \pm 0.20$  mM Equivalentes Trolox/mL licor, sin embargo en el cuarto mes hubo un incremento significativo teniendo una actividad antioxidante final de  $63.15 \pm 1.15$  mM Equivalentes Trolox/mL licor el cual no presenta diferencia significativa con el mes 2, lo que sugiere que la actividad antioxidante empieza a estabilizarse.

En el Apéndice B se muestran las correlaciones de Pearson, donde de forma general se observa que los factores que se ven afectados con el tiempo de almacenamiento de forma significativa, en el licor control son el porcentaje de color polimérico y el valor del parámetro  $a^*$ , las asociaciones se describen a continuación.

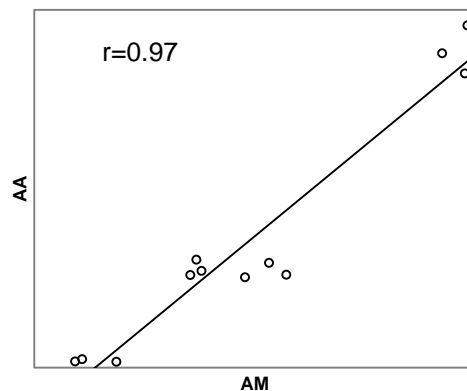
Como puede observarse en la Figura 20, dentro de las correlaciones más relevantes tenemos, que en las determinaciones fisicoquímicas existe una asociación positiva significativa de 0.98 entre el parámetro  $a^*$  y el porcentaje de color polimérico, lo que indica que al incrementar el valor de  $a^*$ , tomando valores hacia los púrpuras, incrementa el

porcentaje de color polimérico, sugiriendo que el color de los licores en gran medida está dado por la aportación del color polimérico.



**Figura 20. Correlación de Pearson entre el %CP y el parámetro  $a^*$**

En la Figura 21 se aprecia la correlación positiva de 0.97 entre la actividad antioxidante y el contenido de antocianinas monoméricas, lo anterior sugiere que las antocianinas monoméricas juegan un papel importante en la actividad antioxidante de los licores, por lo que se debe procurar su preservación durante el procesamiento y almacenamiento de los licores.



**Figura 21. Correlación de Pearson entre las Antocianinas monoméricas (AM) y la Actividad antioxidante (AA)**

## 7. CONCLUSIONES

1. El fruto maduro de zarzamora (*Rubus spp*) de la región de Xico Veracruz tiene un contenido de antocianinas monoméricas de  $183.63 \pm 0.33$  mg de cianidina 3-glucósido/100 g de fruto fresco, un contenido fenoles totales de  $477.12 \pm 6.91$  mg equivalentes de ácido gálico/100 g de peso fresco y su actividad antioxidante expresada como mM equivalentes de trolox/g peso fresco fue de  $3.75 \pm 0.1$ .
2. El contenido de azúcares reductores en los licores se encontró en un intervalo de 172.4 a 337.8 g/L, el contenido de alcohol se encontró en un rango de 12 a 20% Alc. Vol., en lo que respecta a la acidez el intervalo fue de 6.69 a 14.83 g ácido cítrico/100 mL y el intervalo del pH se encontró entre 2.46 y 3.75.
3. En lo que respecta al color de los licores el parámetro  $L^*$  se encontró en el intervalo de  $0.18 \pm 0.04$  a  $2.11 \pm 0.11$ , el parámetro  $a^*$  entre  $0.36 \pm 0.06$  y  $4.26 \pm 0.14$ , el parámetro  $b^*$  fue de  $-0.28 \pm 0.04$  y  $1.60 \pm 0.05$ , la saturación,  $C^*$ , se encontró entre  $0.46 \pm 0.07$  y  $4.19 \pm 0.12$  y el ángulo de matiz entre  $10.49 \pm 0.34$  y  $51.73 \pm 0.84$ .
4. El intervalo de antocianinas monoméricas de los licores de mora se encuentra entre  $3.56 \pm 0.19$  y  $76.95 \pm 1.20$  mg de cianidina 3-glucósido/L.

5. El contenido de fenoles totales en los 9 licores se encuentra en un intervalo de  $477.12 \pm 0.04$  y  $884.98 \pm 0.03$  mg EAG/100 mL y la actividad antioxidante de  $110.51 \pm 0.88$  a  $304.47 \pm 2.65$  mM equivalentes de Trolox/mL de licor. Un mayor contenido de fenoles totales y antocianinas monoméricas incrementa la actividad antioxidante en los licores de mora.
  
6. Los parámetros fisicoquímicos de mayor influencia en el contenido de antocianinas monoméricas y el porcentaje de color polimérico son el pH, los azúcares reductores y la acidez, además de los parámetros colorimétricos  $b^*$  y ángulo de matiz (h), como indicó la correlación canónica.
  
7. El análisis de MANOVA indicó que los 9 licores de mora evaluados fueron diferentes en tanto a las características fisicoquímicas, antocianinas monoméricas, %color polimérico, densidad de color, fenoles totales y actividad antioxidante determinadas en cada una de ellas, sin embargo los licores 4 y 8 no presentan diferencia significativa entre estas variables.
  
8. Durante el almacenamiento del licor control de mora por cuatro meses, se observó un incremento significativo en el %color polimérico así como un decremento en el contenido de antocianinas monoméricas, quienes juegan un papel importante en la actividad antioxidante del licor control.

## **8. PERSPECTIVAS**

Encontrar los valores de azúcares reductores y pH, en el proceso de elaboración del licor de mora, que favorezca la estabilidad de las antocianinas monoméricas y por tanto de la actividad antioxidante.

Identificar las antocianinas monoméricas y poliméricas presentes en el licor de mora y evaluar la actividad biológica de estas fracciones.

## REFERENCIAS

- AOAC. Official Method of Analysis Association of Official Analytical Chemists. (1997). 15<sup>th</sup>. William Horwits, Washington, D. C. EUA.
- Avalos K., Sgroppo S. y Avanza J. (2003) Actividad Antioxidante y Contenido en Fenoles Totales en Vinos de Origen Nacional. *Facena*, 19: 11-19.
- Benzie, I. F.F y Strain, J.J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*. 239: 70-76.
- Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E., y Berset, C. (1995). Use of Free a Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensmittel – Wissenschaft und – Technologie/Food Science and Technology*, 28: 25-30.
- Calvo, C. y Durán, L. (1997). Óptica y color. *Temas en Tecnología de Alimentos*. Vol. 1. Editor J. M. Aguilera. Instituto Politécnico Nacional. México, D. F.
- Casassa, F. y Catania, C. (2006). Pirantocianos, nuevos pigmentos en los vinos tintos: aspectos científicos e implicancias tecnológicas. *Revista de Enología* Vol.3.
- Chandra, A.; Nair, M., y Lezzoni, A. (1992). Evaluation and Characterization of Anthocyanin Pigments in Tart Cherries (*Prunus cerasus* L.). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 40: 867-898.
- Cheng, G. W. y Breen, P. J. (1991). Activity of Phenylalanine Ammonialyase (PAL) and Concentrations of Anthocyanins and Phenolics in Developing Strawberry Fruit. *Journal of American Society for Horticulture Science*. 116: 865-869.
- Dallas C. y Laureano O. (1994). Effects of pH, Sulphur Dioxide, Alcohol Content, Temperature and Storage Time on Colour Composition of Young Portuguese red Table Wine. *Journal Science of Food Chemistry*, 65: 477-485.
- Delgado-Vargas, F. y Paredes-López, O. (2003). *Natural Colorants for Food and Nutraceutical Uses*. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Delgado-Vargas, F.; Jiménez R. y Paredes-López, O. (2000). Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins and Betalains- Characteristics, Processing and Stability. *Critical Reviews and Nutrition*, 40: 173-289.
- Deighton N.; Brennan R. y Davies H. (2000). Antioxidant Properties of Domesticated and Wild *Rubus* species. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 80: 1307-1313.
- Fleischhut J., Kratzer F., Rechkemmer G., Kulling S. (2006). Stability and Biotransformation of Various Dietary Anthocyanins *in vitro*. *European Journal of Nutrition*, 45:7-18.
- Folin, C., y Ciocalteau, V. (1927). Tyrosine and Tryptophan Determination in Proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 73: 627-650.

- García A. (2005). Evaluación *in vitro* e *in vivo* de la funcionalidad de un producto rico en antioxidantes. Tesis doctoral Europea. Facultad de Veterinaria y Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Murcia, España
- Giusti, M.M. y Wrolstad, R. E. Unit. F1.2.1-13. Anthocyanins. (2001). Characterization and Measurement With UV-Visible Spectroscopy. In: Current Protocols in Food Analytic Chemistry, Wrolstad, R. E., John Wiley y Sons: New York.
- Hakkinen, S., Heinonen, M., Karenlampi, S., Mykkanen, H., Ruuskanen, J., & Torronen, R. (1999). Screening of selected flavonoids and phenolic acid in 19 berries. Food Research International. 32: 345-353.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M., & Aruoma, O.I. (1987). The deoxyribose method: a simple "test tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. Analytical Biochemistry. 165: 215-219.
- Halliwell B. y Whiteman M. (2004). Measuring Reactive Species and Oxidative Damage in vivo and in Cell Culture: How Should you do it and What do the Results Mean? British Journal of Pharmacology. 142:231-255
- Heinonen M. I.; Lehtonen J. P., y Hopia A. I. (1998). Antioxidant Activity of Berry and Fruit Wines and Liquors. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 46: 25-31.
- Hertog, M. G. L.; Feskens, E. J. M.; Hollman, P. C. H.; Katan, M. B., y Kromhout, D. (1993). Dietary Antioxidant Flavonoids and Risk of Coronary Heart Disease: the Zutphen Elderly Study. Lancet, 342: 1007-1011.
- Hong, V. y Wrolstad, R.E. (1990). Characterization of Anthocyanin-Containing Colorants and Fruit Juices by HPLC/photodiode Array Detection. Journal of Agriculture of Food Chemistry, 38(3): 698-708.
- Huang, D., Ou B. y Prior R. L. (2005). The Chemistry Behind Capacity Assays. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 53: 1841-1856.
- Hulme, A.C., (1971). The Biochemistry of Fruits and Their Products, vol II, Academic press, New York.
- Kuskoski E.M., Asuero A.G., Troncoso A. M., Macini\_Filho J. (2005). Aplicación de Diversos Métodos Químicos para Determinar Actividad Antioxidante en Pulpa de Frutos. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Champinas, 25(4): 726-732.
- Lee J; Koo N; Min DB. (2004). Reactive Oxygen Species, Aging, and, Antioxidative Nutraceuticals. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 3:21-33.
- Lewis, C., y Walker, J. (1995). Effect of Polysaccharides on the Colour of Anthocyanins. Food Chemistry, 54: 325-319.
- Maletic E., Kontic J. K., Preiner D. P., Jeromel A., Pat C-D y Dietrich H. (2009). Anthocyanin Profile and Antioxidant Capacity of some Autochthonous Croatian Red Wines. Journal of Food, Agriculture and Environment 1(7): 48-51.



- Martínez-Valverde I., Periago M.J., Ros G. (2000). Significado Nutricional de los Compuestos Fenólicos de la Dieta. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 50: 5-18.
- Moure, A., Cruz J., Franco D., Domínguez J., Sineiro J., Domínguez H., Nuñez M., Parajó C. (2001). Review. Natural Antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 72: 145-171.
- Norma oficial Mexicana, NOM-142-SSA1-1995, Bienes y servicios. Bebidas Alcohólicas. Especificaciones Sanitarias. Etiquetado sanitario y comercial.
- Norma Mexicana, NMX-V-006-1983. Bebidas Alcohólicas-Azúcares Reductores Directos y Totales-Método de prueba.
- Prior RL. (2003). Fruits and Vegetables in the Prevention of Cellular Oxidative Damage. *American Journal Clinical Nutrition*. 78:570S-578S.
- Rafter JJ. (2002). Scientific Basis of Biomarkers and Benefits of Functional Foods for Reduction of Disease Risk: Cancer. *British Journal of Nutrition*, 88:219S-224S.
- Rein M. Copigmentation Reactions and Color Stability of Berry Anthocyanins. (2005). University of Helsinki. Department of Applied Chemistry and Microbiology. Food Chemistry Division. Tesis.
- Reyes-Carmona J.; Youseff G.G.; Martínez-Peniche R.A., y Lila A. M. (2005). Antioxidant Capacity of Fruits Extracts of Blackberry (*Rubus* sp.) Produced in Different Climatic Regions. *Journal of Food Science*, 70: 497-503.
- Reglamento (CEE) nº 1576/89 del Parlamento Europeo del Consejo de 29 de mayo de 1989.
- Roberfroid MB. (2002). Global View on Functional Foods: European Perspectives. *British Journal of Nutrition* 88:133S- 138S.
- Roginsky V. y Lissi A. E. (2005). Review of Methods to Determine Chain-Breaking Antioxidant Activity in Food. *Food chemistry*, 92: 235-254.
- Rommel A., Wrolstad R.E. y Heatherbell D.A. (1992). Blackberry Juice and Wine: Effect of Processing and Storage Effects on Anthocyanin Composition, Color and Appearance. *Journal of Food Science*, 57: 385-391.
- Sánchez-Moreno C. (2002). Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. *Food Science and Technology*, 8:121-137.
- Sellappan S., Akoh CC., Krewer G. (2002). Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Georgia-grown Blueberries and Blackberries. *Journal of Agriculture of Food Chemistry*, 50: 2432-2438.
- Siriwoharn T., Wrolstad RE., Finn CE., Pereira CB. (2004). Influence of Cultivar, Maturity, and Sampling on Blackberry (*Rubus* L. Hybrids) Anthocyanins, Polyphenolics, and Antioxidant Properties. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 52:8021-8030.

- Shahidi F., y Naczki M. (1995). *Food Phenolics: Sources, Chemistry, Effects and Applications*. Technomic Publishing., Inc. P. 247-260.
- Sims C., Morris J. (1984). Effects of pH, Sulfuric Dioxide, Storage Time, and Temperature on the Color and Stability of the Red Muscadine Grape Wine. *American Journal of Enology and Viticulture*. 35-39.
- Suárez, C. (Comunicación personal). Xico, Veracruz. 1 de marzo de 2008.
- TecnoAgro. *Avances Tecnológicos y Agrícolas*. Año 8, Núm. 36.
- Tsai J.; Huang, H. y Huang, T. (2004). Relationship Between Anthocyanin Patterns and Antioxidant Capacity in Mulberry Wine During Storage. *Journal of Food Quality*. 27: 497-505.
- Villaño D., Fernández-Pachón M.S., Moyá M.L., Troncoso A.M., García-Parrilla M.C. (2007). Radical Scavenging Ability of Polyphenolic Compounds Towards DPPH Free Radical. *Science Direct. Talanta*, 71: 230-235
- Walford J. (1980). *Developments in Food Colors*. Applied Science Publishers (Ed). London. 116-142.
- Wang S. y Lin H. (2000). Antioxidant Activity in Fruits and Leaves of Blackberry, Raspberry, and Strawberry Varies with Cultivar and Developmental Stage. *Journal of Agriculture of Food Chemistry*, 48: 140-146.
- Wesche-Ebeling P. y Montgomery M.W. (1990). Strawberry Polyphenol Oxidase: its Role in Anthocyanin Degradation. *Journal of Food Science*, 55: 731-734, 745.
- Wrolstad R.E., Skrede G., Lea P. y Enersen G. (1990). Influence of Sugar on Anthocyanin Pigment Stability in Frozen Strawberries. *Journal of Food Science*, 4 (55): 1064-1072.
- Wrolstad, R. E. (2000). Anthocyanins. In F. J. Francis, & G. J. Lauro (Eds.), *Natural Food Colorants* (pp. 237–252). New York: Marcel Dekker. Cap.11.
- Wrolstad R. E, Durst, R.W. y Lee J. (2005). Tracking Color and Pigment Changes in Anthocyanin Products. *Trends in Food Science and Technology*, 16: 423-428.
- Zheng W, Wang SY. (2003). Oxygen Radical Absorbing Capacity of Phenolics in Blueberries, Chankeberries and Lingoberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51:502-509.

## **ANEXO A**

### **DETERMINACIÓN DEL % ALCOHOL EN VOLUMEN**

**(NOM-142-SSA1-1995)**

Verter y medir en un matraz volumétrico 250 mL de la muestra a  $20 \pm 0.5^\circ \text{C}$ , transferirlos cuantitativamente con 100 mL de agua destilada al matraz de destilación que contiene barras de agitación y adicionarle 2.5 mL NaOH 5 N. Calentar el matraz de destilación y recibir el destilado en el mismo matraz donde se midió la muestra, el matraz de recepción contiene 20 mL de agua destilada. Cuando la cantidad de destilado contenida en el matraz de recepción se acerque a la marca (unos 0.5 cm abajo del aforo), suspender la destilación y retirar el matraz de recepción, y llevar el destilado a  $20^\circ \text{C}$ , aforar con agua destilada, homogeneizar y transferir el destilado a la probeta. En una probeta de 250 mL se verte el destilado hasta unos 10 cm abajo del nivel total. Introducir el alcoholímetro cuidadosamente. El alcoholímetro debe flotar libremente, reportar como %Alc. Vol. a  $20^\circ \text{C}$ .

## **ANEXO B**

### **DETERMINACIÓN DE pH EN EL LICOR**

**(Método 960.10)**

Dejar que el electrodo del potenciómetro se atempere antes de usar de acuerdo a las instrucciones de manufactura. Comprobar con soluciones recién preparadas, saturadas, solución acuosa de K bitartrato. Ajustar el potenciómetro para leer a 3.55 a  $20^\circ$ , 3.665 a  $25^\circ$  o 3.55 a  $30^\circ$ .

Dejar libre limpio al electrodo enjuagando con agua e introducirlo a la muestra. Colocar el electrodo en la muestra fresca, determinar la temperatura, y leer el pH a un valor cercano al 0.01 unidades.

## **ANEXO C**

### **DETERMINACIÓN DE ACIDEZ TITULABLE EN EL LICOR**

#### **(Método 962.12)**

Adicionar 1 mL de fenolftaleína (solución indicador) a 200 mL agua caliente, hervir agua en un matraz Erlenmeyer de 500 mL. Neutralizar para distinguir el cambio a rosa. Adicionar 5.0 mL de muestra y titular con 0.1 N de NaOH estandarizado hasta el punto final, usar una buena iluminación y un fondo blanco.

$$\text{g ácido cítrico/100 mL licor} = \text{mL NaOH} \times \text{N} \times 0.993 \times 100/5$$

## **ANEXO D**

### **DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES**

#### **(NMX-V-006-1985)**

#### **Determinación de la solución Soxhlet**

Colocar 10 mL de la solución soxhlet (formada por partes iguales del reactivo de Fehling A y B de Fehling) adicionarle 40 mL de agua destilada a un matraz Erlenmeyer de 250 mL, adicionar perlas de ebullición y calentar a ebullición por un minuto. Por otra parte preparar una solución de glucosa al 0.5% y colocarla en una bureta. Adicionar la solución de glucosa a la solución del

matraz hasta obtener una coloración azul suave y posteriormente adicionar 5 gotas de azul de metileno como indicador y seguir adicionando hasta obtener una coloración rojo ladrillo.

### **Determinación de azúcares reductores totales**

Colocar 50 mL de muestra en un matraz Erlenmeyer de 100 mL y se le adiciona 10 mL gota a gota de HCl concentrado. Calentar en un baño de agua a 60° C durante 10 minutos, enfriar a temperatura ambiente y neutralizar con NaOH 5N. Aforar a 100 mL y homegeneizar y valorar con la solución de glucosa al 0.5%.

## APÉNDICE A

### Matriz de correlación de Pearson para los licores de mora

Variables	Fenoles	AM <sup>1</sup>	%CP <sup>2</sup>	AA <sup>3</sup>	AR <sup>4</sup>	% Alc. Vol.	Acidez	pH	DC <sup>5</sup>	L*	a*	b*	C*	h
<b>Fenoles</b>	<b>1</b>	0.035	-0.064	0.679	0.205	-0.290	0.456	-0.104	0.273	-0.099	-0.065	-0.168	-0.086	-0.117
<b>AM<sup>1</sup></b>	0.035	<b>1</b>	<b>-0.916</b>	0.381	0.592	-0.543	-0.538	-0.649	0.302	-0.434	-0.525	-0.641	-0.512	<b>0.972</b>
<b>%CP<sup>2</sup></b>	-0.064	<b>-0.916</b>	<b>1</b>	-0.547	-0.626	0.628	0.529	<b>0.810</b>	-0.526	0.596	0.522	0.712	0.525	-0.882
<b>AA<sup>3</sup></b>	0.679	0.381	-0.547	<b>1</b>	0.272	-0.299	-0.200	-0.399	0.649	-0.459	-0.116	-0.451	-0.160	0.202
<b>AR<sup>4</sup></b>	0.205	0.592	-0.626	0.272	<b>1</b>	-0.746	-0.213	-0.648	0.202	-0.447	-0.603	-0.660	-0.604	0.590
<b>% Alc. Vol.</b>	-0.290	-0.543	0.628	-0.299	-0.746	<b>1</b>	-0.114	<b>0.679</b>	-0.170	0.447	0.578	0.618	0.580	-0.530
<b>Acidez</b>	0.456	-0.538	0.529	-0.200	-0.213	-0.114	<b>1</b>	0.125	-0.214	0.179	0.035	0.219	0.040	-0.496
<b>pH</b>	-0.104	-0.649	<b>0.810</b>	-0.399	-0.648	0.679	0.125	<b>1</b>	-0.410	<b>0.836</b>	0.766	0.867	0.775	-0.702
<b>DC<sup>5</sup></b>	0.273	0.302	-0.526	0.649	0.202	-0.170	-0.214	-0.410	<b>1</b>	-0.140	0.236	-0.101	0.211	0.222
<b>L*</b>	-0.099	-0.434	0.596	-0.459	-0.447	0.447	0.179	<b>0.836</b>	-0.140	<b>1</b>	<b>0.827</b>	<b>0.940</b>	0.858	-0.461
<b>a*</b>	-0.065	-0.525	0.522	-0.116	-0.603	0.578	0.035	<b>0.766</b>	0.236	0.827	<b>1</b>	<b>0.906</b>	<b>0.998</b>	-0.601
<b>b*</b>	-0.168	-0.641	0.712	-0.451	-0.660	0.618	0.219	<b>0.867</b>	-0.101	<b>0.940</b>	<b>0.906</b>	<b>1</b>	<b>0.926</b>	-0.656
<b>C*</b>	-0.086	-0.512	0.525	-0.160	-0.604	0.580	0.040	0.775	0.211	0.858	<b>0.998</b>	<b>0.926</b>	<b>1</b>	-0.581
<b>h</b>	-0.117	<b>0.972</b>	-0.882	0.202	0.590	-0.530	-0.496	-0.702	0.222	-0.461	-0.601	-0.656	-0.581	<b>1</b>

Los valores en negrita son significativamente diferentes de 0 con un nivel de significación alfa=0.05

<sup>1</sup>Antocianinas monoméricas

<sup>2</sup>% color polimérico

<sup>3</sup>Actividad Antioxidante

<sup>4</sup>Azúcares reductores

<sup>5</sup>Densidad de color

## APÉNDICE B

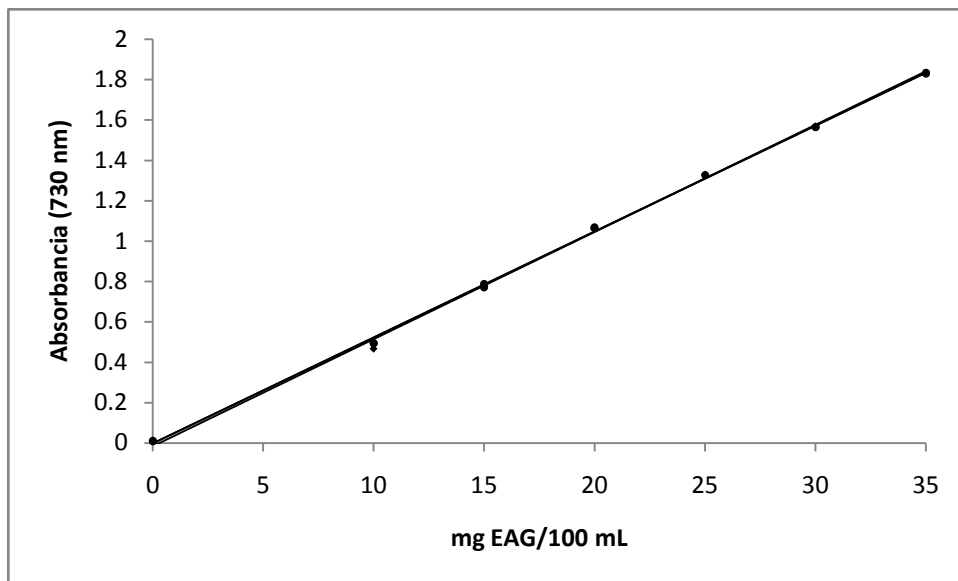
### Matriz de correlación de Pearson para el Licor control

Variables	Mes	AM mg/L	Fenoles	L*	a*	b*	C*	h	DC	% CP	AA
Mes	<b>1</b>	-0.803	0.824	0.950	<b>0.997</b>	0.122	0.855	0.533	-0.215	<b>0.965</b>	-0.727
AM mg/L	-0.803	<b>1</b>	-0.418	-0.860	-0.774	-0.224	-0.775	-0.210	-0.355	-0.657	<b>0.974</b>
Fenoles	0.824	-0.418	<b>1</b>	0.820	0.814	0.392	0.450	0.292	-0.380	0.808	-0.249
L*	0.950	-0.860	0.820	<b>1</b>	0.922	0.410	<b>0.703</b>	0.242	0.050	0.837	-0.741
a*	<b>0.997</b>	-0.774	0.814	0.922	<b>1</b>	0.048	0.879	0.598	-0.281	<b>0.982</b>	-0.710
b*	0.122	-0.224	0.392	0.410	0.048	<b>1</b>	-0.346	-0.752	0.560	-0.094	-0.025
C*	0.855	-0.775	0.450	0.703	0.879	-0.346	<b>1</b>	0.780	-0.257	0.882	-0.822
h	0.533	-0.210	0.292	0.242	0.598	-0.752	0.780	<b>1</b>	-0.753	0.720	-0.307
DC	-0.215	-0.355	-0.380	0.050	-0.281	0.560	-0.257	-0.753	<b>1</b>	-0.455	-0.338
% Color polimérico (CP)	<b>0.965</b>	-0.657	0.808	0.837	<b>0.982</b>	-0.094	0.882	0.720	-0.455	<b>1</b>	-0.608
Actividad antioxidante(AA)	-0.727	<b>0.974</b>	-0.249	-0.741	-0.710	-0.025	-0.822	-0.307	-0.338	-0.608	<b>1</b>

Los valores en negrita son diferentes de 0 con un nivel de significación alfa

## APÉNDICE C

### CURVA DE CALIBRACIÓN PARA POLIFNEOLES TOTALES

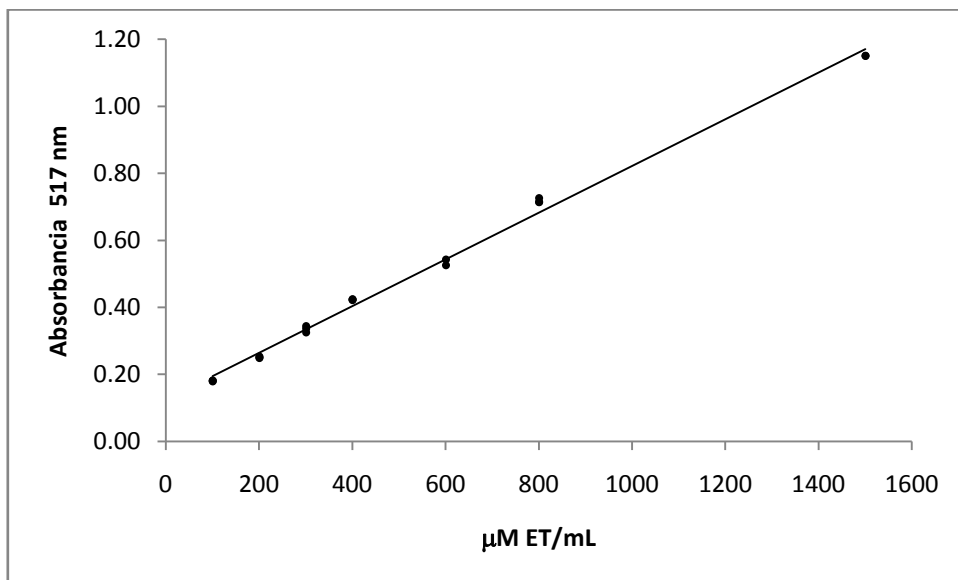


$$Y = 0.052X - 0.005$$

$$R^2 = 0.999$$

## APÉNDICE D

### CURVA DE CALIBRACIÓN PARA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE



$$Y = 0.000694X + 0.127$$

$$R^2 = 0.996$$