



**DESARROLLO Y ESTABILIZACIÓN DE COLORANTES ALIMENTARIOS A
PARTIR DE EXTRACTOS DE MORAS**

Erika Maryori Niño Vega

Trabajo fin de máster presentada al Instituto Politécnico de Braganza
y a la Universidad de Salamanca para obtención del
Grado de Maestre en Farmacia y Química de Productos Naturales

Orientado por

Profesora Doctora Isabel C.F.R. Ferreira

Doctora Lillian Barros

Braganza

Julio de 2019



Desarrollo y estabilización de colorantes alimentarios a partir de extractos de moras

Este trabalho é financiado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER) através do Programa Operacional Regional Norte 2020, no âmbito do Projeto NORTE-01-0145-FEDER-023289 (DeCodE) e Norte-01-0247-FEDER-024479 (projeto *Mobilizador ValorNatural*), e pelo programa FEDER-Interreg España-Portugal, no âmbito do projeto 0377_Iberphenol_6_E.





AGRADECIMIENTOS

Salir de casa e ir corriendo detrás de un sueño, es dejar todo lo que amamos y enfrentarnos a un mundo nuevo y así llegue a Portugal, llena de expectativas y de miedos a conocer un continente, otro país con otra lengua y diferentes personas; las cuales hicieron de este tiempo una experiencia maravillosa y por esto quiero agradecer a cada uno de los que estuvieron presentes.

En primer lugar, a Dios, a la virgen de Chiquinquirá y a mi ángel de la guarda, quienes me cuidan y me guían en cada paso que doy.

A la Profesora Isabel y al profesor Pablo por la colaboración brindada desde el primer momento para poder llegar a Europa y durante todo este tiempo para cursar y culminar este máster con el mayor éxito, al igual que la Doctora Lillian quien me guío en este proceso de investigación.

A Carla por ser una gran tutora que a pesar de todos los problemas siempre lucho para hacer todo de la mejor manera posible, y por ser una maravillosa persona que fue más allá de la parte profesional y me brindo su apoyo incondicional y sabios consejos; a Inês, Andreia, Ângela, José, Tó, Marcio y João quienes siempre me ayudaron con la mejor disposición y calidez y a los demás integrantes del grupo BioChemCore.

A las diferentes personas que se convirtieron en mi familia en Bragança, especialmente a Adriana por ser mi hermana y mi compañera de aventuras disfrutando conmigo los buenos momentos, pero sobre todo apoyándome en los más difíciles, a Lucas por ser como un hermano mayor y brindarme su apoyo incondicional, a Mikel por aguantarme cada día y sacarme las mejores sonrisas, a Ana por su maravillosa amistad y hacerme sentir su familia como mía, y a Murillo, Poli y Denilson por brindarme su compañía y hacer de este, un lugar especial.

A Sanket por ser mi nuevo hogar, volverse mi mayor compañía y brindarme todo su amor y lo mejor de sí mismo para hacerme feliz.

A mi mamita y mis gemelos por quienes soy lo que soy hasta ahora y lucho por ser mejor cada día, por cada palabra de aliento, de motivación y cada demostración de amor a la distancia, y al resto de mi familia especialmente a mis tías Gloria, Jacky y Stella, a Kris y a Juliana quienes me han mostrado que la lejanía no es impedimento para seguir estando presentes.



Desarrollo y estabilización de colorantes alimentarios
a partir de extractos de moras

Por último, agradezco y dedico este trabajo a mi abue Estrella y a mi Tino o mejor, mi padre, quienes siempre me apoyaron incondicionalmente en cada etapa de mi vida y especialmente en poder cumplir este sueño y aunque en este momento ya no están con nosotros, sé que están felices, orgullosos y celebrando este día conmigo.



INDICE

RESUMEN	XIV
RESUMO.....	XVI
ABSTRACT.....	XVIII
1. ESTADO DEL ARTE.....	1
1.1. Colorantes alimentares	1
1.1.1. Historia y definición	1
1.1.2. Colorantes sintéticos vs. Naturales	1
1.1.3. Particularidades de color de las antocianinas.....	3
1.2. Obtención de colorantes alimentares de origen natural	6
1.2.1. <i>Morus nigra</i> L.	6
1.2.2. <i>Rubus fruticosus</i> L.	8
1.2.3. Extracción de moléculas con capacidad colorante.....	9
1.2.4. Estabilización de formulaciones colorantes.....	11
1.3. Colorantes naturales en la industria alimentaria	14
2. OBJETIVOS	15
2.1. General	15
2.2. Específicos	15
3. METODOLOGIA.....	17
3.1. Muestras	17
3.2. Patrones y reactivos.....	17
3.3. Determinación de la composición química	18
3.3.1. Azúcares libres.....	18
3.3.2. Ácidos orgánicos.....	18



3.3.3.	Tocoferoles	19
3.3.4.	Compuestos antociánicos.....	20
3.4.	Evaluación de las propiedades bioactivas	20
3.4.1.	Actividad antioxidante	21
3.4.2.	Actividad antimicrobiana.....	23
3.4.3.	Citotoxicidad en células no tumorales	24
3.5.	Preparación de los extractos colorantes	25
3.6.	Evaluación preliminar de las condiciones de pasteurización	26
3.6.1.	Proceso de contaminación.....	26
3.6.2.	Pasteurización	26
3.6.3.	Evaluación de la carga microbiana	27
3.7.	Estabilización	28
3.7.1.	<i>Spray drying</i>	28
3.7.2.	Gelificación térmica.....	29
3.8.	Evaluación de la estabilidad de las diferentes formulaciones colorantes.....	30
3.8.1.	Medida de color	30
3.8.2.	Control de la composición antociánica	30
3.8.3.	Control de la carga microbiana	31
3.8.4.	Control de la citotoxicidad en células no tumorales.	31
3.9.	Análisis estadístico	31
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
4.1.	Determinación de la composición química	33
4.1.1.	Azúcares.....	33
4.1.2.	Tocoferoles	34
4.1.3.	Ácidos orgánicos.....	35
4.1.4.	Composición antociánica	36
4.2.	Evaluación de propiedades bioactivas.....	39



4.2.1.	Evaluación de la actividad antioxidante	39
4.2.2.	Evaluación de la actividad antibacteriana.....	41
4.2.3.	Evaluación de actividad antifúngica	46
4.3.	Determinación de las condiciones de pasteurización	49
4.4.	Evaluación de la estabilidad de las diferentes formulaciones	50
4.4.1.	Evaluación de la estabilidad del color y las antocianinas a lo largo del tiempo...	50
4.4.2.	Evaluación de la carga microbiana	59
4.4.3.	Evaluación de actividad citotóxica	67
5.	CONCLUSIÓN	68
6.	BIBLIOGRAFIA	69



INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los colorantes naturales de acuerdo con su naturaleza química (Lock Sing, 1997).....	3
Tabla 2. Clasificación taxonómica APGIII de <i>Morus nigra</i> L. Tomado de: (Linnaeus, 2018). 6	
Tabla 3. Clasificación taxonómica APGIII de <i>Rubus fruticosus</i> L. Tomado de (Linnaeus, 1995)	9
Tabla 4. Métodos de encapsulación de metabolitos secundarios y sus características. Tabla adaptada de (Mahdavi, Jafari, Ghorbani, & Assadpoor, 2014).	12
Tabla 5. Azúcares libres encontrados en los extractos de los frutos de <i>Morus nigra</i> L. y <i>Rubus fruticosus</i> L. (mg/gE).....	34
Tabla 6. Tocoferoles encontrados en los extractos liofilizados de los frutos de <i>Morus nigra</i> L. y <i>Rubus fruticosus</i> L. (mg/gE).....	35
Tabla 7. Ácidos orgánicos encontrados en los extractos liofilizados de los frutos de <i>Morus nigra</i> L. y <i>Rubus fruticosus</i> L. (mg/gE).....	35
Tabla 8. Tentativa de identificación de antocianinas con su determinado tiempo de retención (TR), longitud de onda máxima (λ_{max}) e información de los espectros de masa en el extracto de <i>Morus nigra</i> L.	37
Tabla 9. Tentativa de identificación de antocianinas con su determinado tiempo de retención (TR), longitud de onda máxima (λ_{max}) e información de los espectros de masa en el extracto de <i>Rubus fruticosus</i> L.....	38
Tabla 10. Actividad antioxidante del extracto y las formulaciones colorantes de <i>Morus nigra</i> L.	40
Tabla 11. Actividad antioxidante del extracto y las formulaciones colorantes de y <i>Rubus fruticosus</i> L.	40
Tabla 12. Actividad antibacteriana de los extractos liofilizados de los frutos de <i>Morus nigra</i> L. y <i>Rubus fruticosus</i> L.	43
Tabla 13. Actividad antibacteriana de las formulaciones líquidas y sólidas de <i>Morus nigra</i> L.	45
Tabla 14. Actividad antibacteriana en zumo control zumo con pectina y zumo con goma adraganta de <i>Rubus fruticosus</i> L.	45
Tabla 15. Actividad antifúngica de los extractos liofilizados de los frutos de <i>Morus nigra</i> L. y <i>Rubus fruticosus</i> L.	46



Tabla 16. Actividad antifúngica en zumo control, zumo con pectina y zumo con goma adraganta de <i>Morus nigra</i> L.....	48
Tabla 17. Actividad antifúngica en zumo control, zumo con pectina y zumo con goma adraganta de <i>Rubus fruticosus</i> L.	48
Tabla 18. Recuentos microbianos de las muestras analizadas inoculadas con aproximadamente 10^6 células/mL (n=3).	49
Tabla 19. Análisis microbiano de las formulaciones sólidas de <i>Rubus fruticosus</i> L. almacenadas a temperatura ambiente durante 3 meses.	60
Tabla 20. Análisis microbiano de las formulaciones sólidas de <i>Rubus fruticosus</i> L. almacenadas en frío durante 3 meses	61
Tabla 21. Análisis microbiano de las formulaciones sólidas de <i>Morus nigra</i> L. almacenadas a temperatura ambiente durante 3 meses.	64
Tabla 22. Análisis microbiano de las formulaciones sólidas de <i>Morus nigra</i> L. almacenadas en frío durante 3 meses.	65



INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura y sustituyentes de las antocianinas (Garzón, 2008).	3
Figura 2. Influencia del pH en la estructura de las antocianinas (Garzón, 2008).	5
Figura 3. Fruto en diferentes etapas de maduración de <i>Morus nigra</i> L. (Tormo, 2014).	6
Figura 4. Compuestos fenólicos encontrados en <i>Morus nigra</i> L.:	8
Figura 5. Fruto en diferentes etapas de maduración de <i>Rubus fruticosus</i> L. (Chadi, 2011).	8
Figura 6. Extracción de tocoferoles.	19
Figura 7. Cerebro de cerdo para análisis de actividad antioxidante	21
Figura 8. Muestra preparada para pasteurización.	27
Figura 9. Formulaciones de <i>Morus nigra</i> L. mediante spray drying.	29
Figura 10. Formulaciones líquidas de <i>Morus nigra</i> L. y <i>Rubus fruticosus</i> L. obtenidas mediante gelificación térmica.....	30
Figura 11. Medida de color.....	30
Figura 12. Representación del perfil cromatográfico de antocianinas del extracto de <i>Morus nigra</i> L. obtenido por HPLC-DAD a 520 nm.	37
Figura 13. Representación del perfil cromatográfico de antocianinas del extracto de <i>Rubus fruticosus</i> L. obtenido por HPLC-DAD a 520 nm.	38
Figura 14. Evolución de los parámetros colorimétricos: L* (a), a* (b), y b* (c) y contenido (mg/g de extracto) en antocianinas (d) de las formulaciones sólidas de <i>Rubus fruticosus</i> L. (control, maltodextrina o maltodextrina-goma arábica). sem: semanas; Tamb: temperatura ambiente.....	52
Figura 15. Evolución de los parámetros colorimétricos: L* (a), a* (b), y b* (c) y contenido (mg/g de extracto) de antocianinas (d) en formulaciones líquidas de <i>Rubus fruticosus</i> L. (control, pectina y goma adraganta). sem: semanas; Tamb: temperatura ambiente	54
Figura 16. Evolución de los parámetros colorimétricos: L* (a), a* (b), y b* (c) y contenido (mg/g de extracto) en antocianinas (d) en las formulaciones sólidas de <i>Morus nigra</i> L. (control, maltodextrina y maltodextrina-goma arábica). sem: semanas; Tamb: temperatura ambiente.....	56
Figura 17. Evolución de los parámetros colorimétricos: L* (a), a* (b), y b* (c) y contenido (mg/g de extracto) de antocianinas (d) en las formulaciones líquidas de <i>Morus nigra</i> L. (control, pectina y goma adraganta). sem: semanas; Tamb: temperatura ambiente.	57



- Figura 18. Distribución tridimensional de marcadores para las distintas formulaciones de ambas especies según los coeficientes de las funciones discriminantes definidas a partir de los parámetros colorimétricos y contenidos en antocianinas. C: control; S: sólido; L: líquido; M: maltodextrina; GA*: goma arábica, GA: goma adraganta59
- Figura 19. Representación de las medias marginales estimadas de: a. levaduras y b. hongos para *Rubus fruticosus* L. almacenados a temperatura ambiente durante tres meses.....62
- Figura 20. Representación de las medias marginales estimadas de microorganismos aeróbicos mesofílicos para *Rubus fruticosus* L. almacenados en frío durante tres meses63
- Figura 21. Representación de las medias marginales estimadas de: a. levaduras y b. hongos para *Rubus fruticosus* L. almacenados a temperatura ambiente durante tres meses.....66



LISTA DE ABREVIATURAS

- AAPH:** Dicloro-hidrato de 2,2'-azobis (2-amidinopropano)
- BHT:** Solución de hidroxitolueno butilado
- CMB:** Concentración mínima bactericida
- CMF:** Concentración mínima fungicida
- CMI:** Concentración mínima inhibitoria
- DMEM:** Medio Eagle modificado por Dulbecco
- DPPH:** 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo
- DRBC:** Cloranfenicol de dicloran de rosa de bengala
- ECACC:** Colección Europea de Cultura Celular Animal
- FAME:** Esteres metílicos de ácidos gordos
- FBS:** Cuero fetal de vacuno
- FRAP:** Capacidad de reducción férrica del plasma
- GC- FID:** Cromatografía gaseosa con detector de ionización de llama
- HBSS:** Colución salina balanceada de Hank
- HPLC-RI:** Cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a un detector de índice de refracción
- HPLC:** Cromatografía líquida de alta eficiencia
- IC₅₀:** Concentración para lograr el 50% de inhibición de peroxidación lipídica
- IDA:** Ingesta diaria admisible
- INT:** Cloruro de p-iodonitrotetrazólico
- MA:** Agar extracto de malta
- MHB:** Caldo Mueller Hinton
- MYP:** Manitol, yema de huevo, polimixina
- ORAC:** Capacidad de absorción de radicales de oxígeno



PCA: *Plate count agar*

PLP2: Cultura primaria de células de hígado porcino

SRB: Sulforodamina B

TCA: Ácido tricloroacético

TEAC: Capacidad antioxidante equivalente de Trolox

TFA: Ácido fluoroacético

TSB: Caldo triptona de soja

UFLQ-PDA: Cromatografía líquida ultrarrápida acoplada a un detector de matriz de fotodiodos

VRLA: *Violet red bile lactose agar*



RESUMEN

El uso de colorantes alimentarios se hace cada vez más frecuente, ya que el color es uno de los criterios más influyentes a la hora de aceptar o rechazar un producto. La industria busca no solo un producto que proporcione un color estable, si no que a su vez sea aceptado por el consumidor, el cual cada vez está más informado y consciente sobre su salud, y por ello es más frecuente que prefiera alimentos que tengan aditivos naturales frente a los artificiales. Así, en este trabajo se caracterizaron extractos de frutos de *Morus nigra* L. y *Rubus fruticosus* L. con relación a su composición química, particularmente en antocianinas, ácidos orgánicos, azúcares libres y tocoferoles. Así mismo, debido a la riqueza de estos frutos en antocianinas, se pretendió preparar diferentes formulaciones colorantes líquidas y sólidas por gelificación térmica y *spray drying* usando como estabilizantes la goma adraganta, pectina citrus, maltodextrina y goma arábica. Además, las propiedades bioactivas de los extractos y de los colorantes fueron evaluadas a través de sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas. Adicionalmente, se estudió la estabilidad de las diferentes formulaciones colorantes durante 3 meses de almacenamiento a temperatura ambiente y en condiciones refrigeradas. Para eso, se controló la variación de color y de concentración de antocianinas, así como parámetros de seguridad alimentaria como la carga microbiana y la citotoxicidad.

Los extractos de *M. nigra* y *R. fruticosus* revelaron como azúcares y ácidos orgánicos mayoritarios la fructosa y la glucosa, el ácido málico y el ácido oxálico, respectivamente; en *M. nigra* se han detectado las 4 isoformas de tocoferol y en *R. fruticosus* apenas se encontró α -tocoferol. Respecto a las antocianinas, en *M. nigra* se han identificado cianidina-3-*O*-glucosa y cianidina-*O*-ramnosa-*O*-hexosa, en cuanto que en *R. fruticosus* se identificaron cianidina-3-*O*-glucosa, cianidina-*O*-hexosa, cianidina-*O*-pentosa y cianidina-3-*O*-dioxaloilglucosa. Los extractos y las formulaciones colorantes demostraron una considerable actividad antioxidante y antimicrobiana. De un modo general, las formulaciones sólidas revelaron una mayor estabilidad a lo largo del tiempo de almacenamiento, presentando menor variación de color y concentración de antocianinas. En términos de carga microbiana, los recuentos efectuados en el tiempo inicial y final se encontraron dentro de los límites aceptables para productos alimentarios, en el caso de las formulaciones sólidas; sin embargo, en las líquidas se observó una contaminación significativa, por lo que han sido considerados no aptos para consumo. Por otro lado, ninguna de las formulaciones presentó citotoxicidad.



Desarrollo y estabilización de colorantes alimentarios a partir de extractos de moras

Por lo mismo, este estudio logró conseguir una completa caracterización de los extractos de frutos de *M. nigra* y *R. fruticosus*, así como de sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas. Además, se obtuvieron formulaciones colorantes estables para aplicación en la industria alimentaria.



RESUMO

O uso de corantes alimentares é cada vez mais frequente, uma vez que a cor é um dos critérios mais influentes no momento de aceitar ou rejeitar um produto. A indústria procura não só um produto que proporcione uma cor estável, mas também que, por outro lado, seja aceite pelo consumidor, que é cada vez mais consciente da sua saúde e, por isso, é mais frequente que prefira alimentos que tenham aditivos naturais. Assim, neste trabalho foram caracterizados extratos de frutos de *Morus nigra* L. e *Rubus fruticosus* L. no que respeita à sua composição química, nomeadamente em antocianinas, ácidos orgânicos, açúcares livres e tocoferóis. Dada a riqueza destes frutos em antocianinas, pretendeu-se preparar diferentes formulações de corantes líquidas e sólidas por gelificação térmica e *spray drying* usando como estabilizantes goma adraganta, pectina citrus, maltodextrina e goma arábica. As propriedades bioativas dos extratos e dos corantes foram avaliadas através das suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas. Adicionalmente, estudou-se a estabilidade das diferentes formulações corantes ao longo de 3 meses de armazenamento à temperatura ambiente e refrigerada. Para tal, controlou-se a variação da cor e da concentração de antocianinas, bem como parâmetros de segurança alimentar como a carga microbiana e a citotoxicidade.

Os extratos de *M. nigra* y *R. fruticosus* revelaram como açúcares e ácidos orgânicos maioritários a frutose e a glucose, o ácido málico e o ácido oxálico, respetivamente; em *M. nigra* foram detetadas as 4 isoformas de tocoferol e em *R. fruticosus* apenas se encontrou α -tocoferol. Em relação às antocianinas, em *M. nigra* foram identificadas cianidina-3-*O*-glucósido e cianidina-*O*-ramnósido-*O*-hexósido, enquanto em *R. fruticosus* se identificaram cianidina-3-*O*-glucósido, cianidina-*O*-hexósido, cianidina-*O*-pentósido e cianidina-3-*O*-dioxaloilglucósido. Os extratos e as formulações corantes demonstraram uma considerável atividade antioxidante e antimicrobiana. De um modo geral, as formulações sólidas revelaram uma maior estabilidade ao longo do tempo de armazenamento, apresentando uma menor variação de cor e concentração de antocianinas. Em termos de carga microbiana, as contagens efetuadas no tempo inicial e final encontraram-se dentro dos limites aceitáveis para produtos alimentares, no caso das formulações sólidas; no entanto, nas líquidas foi observada uma contaminação significativa, tendo estas sido consideradas impróprias para consumo. Por outro lado, nenhuma das formulações apresentou citotoxicidade.



Desarrollo y estabilización de colorantes alimentarios
a partir de extractos de moras

Assim, através deste estudo foi conseguida uma caracterização completa dos extratos de *M. nigra* e *R. fruticosus*, bem como das suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas. Para além disso, obtiveram-se formulações corantes estáveis para aplicação na indústria alimentar.



ABSTRACT

Given the importance of the colour at the moment of accepting or rejecting a product, the use of food colorants is getting more frequent. The industry searches for products that can confer stable colours, but can also be easily accepted by the consumer, which is increasingly informed and aware of the health effects that these compounds can exert and, consequently, prioritize foodstuff that contain natural additives instead of artificial ones. Thus, in this work fruits from *Morus nigra* L. and *Rubus fruticosus* L. were characterized in terms of anthocyanins, organic acids, free sugars, and tocopherols. Given their richness in anthocyanins, this study also aimed to prepare different liquid and solid colouring formulations by thermal gelation and spray drying using as stabilizer agents gum arabic, citrus pectin, maltodextrin, and gum arabic. The bioactive properties of the extracts and colouring formulations were assessed by their antioxidant and antimicrobial properties. Additionally, the stability of these colorants was assessed over 3 months of storage at room and refrigerated temperatures. For that purpose, the variation of colour and anthocyanins' concentration was controlled, as well as safety parameters such as the microbial load and cytotoxicity.

The extracts of *M. nigra* and *R. fruticosus* revealed fructose and glucose, malic and oxalic acids as major free sugars and organic acids, respectively; in *M. nigra*, four isoforms of tocopherol were detected and in *R. fruticosus* only α -tocopherol was found. Regarding anthocyanins, in *M. nigra*, cyanidin-3-*O*-glucoside and cyanidin-*O*-ramnoside-*O*-hexoside were identified, while in *R. fruticosus*, cyanidin-3-*O*-glucoside, cyanidin-*O*-hexoside, cyanidin-*O*-pentoside and cyanidin-3-*O*-dioxalolglucoside were detected. The extracts and the colouring formulations revealed considerable antioxidant and antimicrobial properties. Generally, the solid formulations revealed a higher stability over time, with lower variations of colour and anthocyanins' concentration. In terms of microbial load, the counts observed at time 0 and at 3 months of storage were within the limits considered safe for food products, in the case of the solid formulations; nevertheless, in liquid formulations, a significant contamination was observed, being these considered improper for consumption. On the other hand, none of the formulations revealed cytotoxicity.

This study allowed a complete characterization of *M. nigra* and *R. fruticosus* extracts and their antioxidant and antimicrobial properties. Moreover, stable colouring formulations for food industry application were obtained.



1. ESTADO DEL ARTE

1.1. Colorantes alimentares

1.1.1. Historia y definición

A lo largo de la evolución, el hombre fue desarrollando mejores maneras de supervivencia haciendo la vida cada vez más fácil y práctica en diferentes aspectos, siendo la alimentación uno de los más importantes. Una de las primeras metas fue la conservación de los alimentos para lo cual en el paleolítico estos eran expuestos al humo y posteriormente, en el neolítico, se les adicionaba sal y vinagre (Ibáñez, Torres, & Irigoyen, 2003) . Luego, alrededor de 1500 a.C., en Egipto, se realizaban dulces con extracto de vino y ya en la edad media se añadían colorantes como ocre o extractos de acelga o zanahoria para eliminar la monotonía de las comidas (Lakshmi, 2014).

A principios del siglo XIX, con el desarrollo de la química, se impulsó el uso de cromato de plomo y sulfito de mercurio, los cuales al ser tóxicos fueron reemplazados por brea de hulla y a mediados de este mismo siglo se descubrieron colorantes azoicos de tintes luminosos, los cuales se usaron primero en textiles y posteriormente en alimentos (Sánchez, 2013). Sin embargo, también se desarrollaron diferentes instrumentos analíticos que permitieron determinar la presencia de diversas sustancias potencialmente tóxicas en una gran variedad de alimentos, por lo cual para finales del mismo siglo se generó la primera ley de seguridad de aditivos alimentarios (Sharma, McKone, & Markow, 2011).

1.1.2. Colorantes sintéticos vs. Naturales

La primera percepción que se tiene de un alimento es su color, característica que puede ser altamente influyente puesto que mediante de esta, el ser humano crea una idea de la composición del alimento y hasta puede llegar a influenciar otros parámetros como el olor o sabor, por lo cual, se puede llegar a condicionar el éxito o el fracaso de un producto (Lakshmi, 2014).

Según la FDA (Food and Drug Administration), un colorante se define como cualquier tinte, pigmento u otra sustancia fabricada u obtenida de vegetales, animales o minerales capaz de



impartir color a un alimento, medicamento, cosmético o parte del cuerpo humano (Barrows, Lipman, & Bailey, 2003) y se puede clasificar en sintético o natural de acuerdo con el medio de obtención (Belmonte, Arroyo, Vázquez, Cruz, & Peña, 2016).

Los colorantes son de los aditivos alimentares más usados, ya que con estos se puede tanto restaurar el color original de un alimento perdido por algún proceso tecnológico o de almacenamiento, corregir variaciones naturales del color, identificar el color del alimento cuando este es débil o poco uniforme, o conceder un color al alimento que lo identifique o le otorgue cierta característica (Parra, 2004).

Colorantes sintéticos

Un colorante se considera sintético cuando es generado o modificado químicamente. Su clasificación más conocida es en compuestos azoicos y no azoicos, siendo los primeros los más representativos, ya que al tener la presencia del grupo azo conjugado con anillos aromáticos se puede obtener una gran variedad de colores; por otro lado, entre los no azoicos se tienen compuestos triarilmetano (azul y verde), indigotina (azulado), xanteno (rojo brillante) y quinoleínicos (amarillo intenso) (Aguirre, 2018; Belmonte et al., 2016).

Estos colorantes son muy utilizados en la industria debido a que ofrecen colores variados con diferentes tonalidades, uniformes y persistentes, son de alta pureza, se pueden obtener grandes cantidades, tienen bajo costo, son solubles en agua, son de fácil utilización y estables a diferentes temperaturas, pH y a la luz (Téllez, 2009). Sin embargo, desde hace unos años se ha prohibido el uso de algunos de estos colorantes al demostrarse que son tóxicos para el ser humano, lo que ha generado nuevamente un gran interés en los colorantes naturales (Sánchez, 2013).

Colorantes naturales

Se consideran colorantes naturales cuando son extraídos de sustancias vegetales, animales o minerales, estos en su gran mayoría son vistos como colorantes inocuos y por tanto las limitaciones de uso que presentan son mucho menores que las limitaciones de los colorantes sintéticos (Ibáñez et al., 2003). Se pueden encontrar diferentes maneras de clasificar estos colorantes ya sea por sus características físicas, su uso tradicional o sus características químicas, siendo esta una de la más usada (**Tabla 1**).



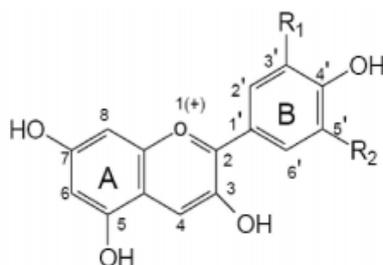
Tabla 1. Clasificación de los colorantes naturales de acuerdo con su naturaleza química (Lock Sing, 1997).

Naturaleza química	Compuesto	Color
Tetrapirroles	Ficobilinas	Azul – verde
	Clorofila	Verde
Carotenoides	Carotenoides	Amarillo – naranja
Flavonoides	Flavonas	Blanco crema
	Flavonoles	Amarillo – blanco
	Chalconas	Amarillo
	Auronas	Amarillo
	Antocianinas	Rojo – azul
Xantonas	Xantonas	Amarillo
Quinonas	Naftoquinonas	Rojo – azul – verde
	Antraquinonas	Rojo – púrpura
Derivados indigoides e indoles	Indigo	Azul – rosado
	Betalaínas	Amarillo – rojo

1.1.3. Particularidades de color de las antocianinas

Las antocianinas son el grupo de pigmentos hidrosolubles más importantes, detectables en la región visible por el ojo humano; se encuentran en grandes cantidades de vegetales confiriéndoles colores desde rojo hasta el azul y están presentes en diferentes partes de las plantas como en frutas, hojas, tallos y algunas veces en las raíces. Además de dar color a las plantas, también presentan funciones antimicrobianas, antivirales y protectoras contra la radiación (Aguirre, 2018; Castañeda-Sánchez & Guerrero-Beltrán, 2015).

Las antocianinas son glúcidos de antocianidinas pertenecientes a la familia de los flavonoides, las cuales tienen una estructura básica con dos anillos aromáticos A y B unido por una cadena de tres carbonos. Se han identificado 6 antocianinas principales, las cuales se diferencian por las variaciones en número y orientación de los sustituyentes hidroxilo y metoxilo en el anillo B (**Figura 1**); teniendo que las más hidroxiladas presentan tonalidades hacia el azul mientras que las más metoxiladas tienen tonalidades rojas (Garzón, 2008).



Aglicona	Substitución		λ_{max} (nm)
	R ₁	R ₂	Espectro visible
Pelargonio	H	H	494 naranja
Cianidina	OH	H	506 naranja – rojo
Delfinidina	OH	OH	508 azul – rojo
Peonidina	OCH ₃	H	506 naranja – rojo
Petunidina	OCH ₃	OH	508 azul – rojo
Malvidina	OCH ₃	OCH ₃	510 azul – rojo

Figura 1. Estructura y sustituyentes de las antocianinas (Garzón, 2008).



La parte glucídica de las antocianinas es dada por sustituciones en las posiciones 3, 5 y/o 7 por mono, di o trisacáridos, los cuales aumentan su solubilidad. Estas sustituciones pueden ser por glucosa, xilosa, ramnosa, arabinosa, rutinosa, soforosa, sambubiosa y gentobiosa. Además, también se puede presentar la acilación de los residuos de azúcares con ácidos orgánicos, de tipo cinámicos como el cafeico, *p*-cumárico, ferúlico y sinápico o alifáticos como el acético, málico, malónico, oxálico y succínico (Castañeda-Sánchez & Guerrero-Beltrán, 2015).

Actualmente, se ha generado un aumento en el interés por las antocianinas principalmente por ser colorantes naturales hidrosolubles no tóxicos, lo que permite su uso en la industria alimentaria, pero además por sus grandes propiedades antioxidantes, habiendo presentado en diferentes estudios variadas propiedades benéficas para la salud como prevención de enfermedades cardiovasculares, cáncer, neuronales y diabetes, entre otras (Zapata, 2014).

Sin embargo, las antocianinas son moléculas con baja estabilidad, que se pueden ver alteradas por factores como su propia estructura química, pH, concentración, temperatura, presencia de oxígeno, ácido ascórbico o agua, ya sea en el momento de su procesamiento o durante su almacenamiento (Aguirre, 2018).

En soluciones acuosas, las antocianinas son más estables en su forma de ion oxonio o catión flavílio, de color rojo intenso, el cual se ve favorecido a valores de pH menores a 2. No obstante, al aumentar el pH se genera una pérdida del protón y adición de agua en la posición 2 llegando a un equilibrio entre la pseudo-base carbinol o hemiacetal y la forma chalcona, siendo estas incoloras e inestables. Por último, a pH superior a 7 se presentan formas quinoidales de color violeta, las cuales por oxidación del aire se degradan rápidamente (**Figura 2**) (Garzón, 2008).



Desarrollo y estabilización de colorantes alimentarios a partir de extractos de moras

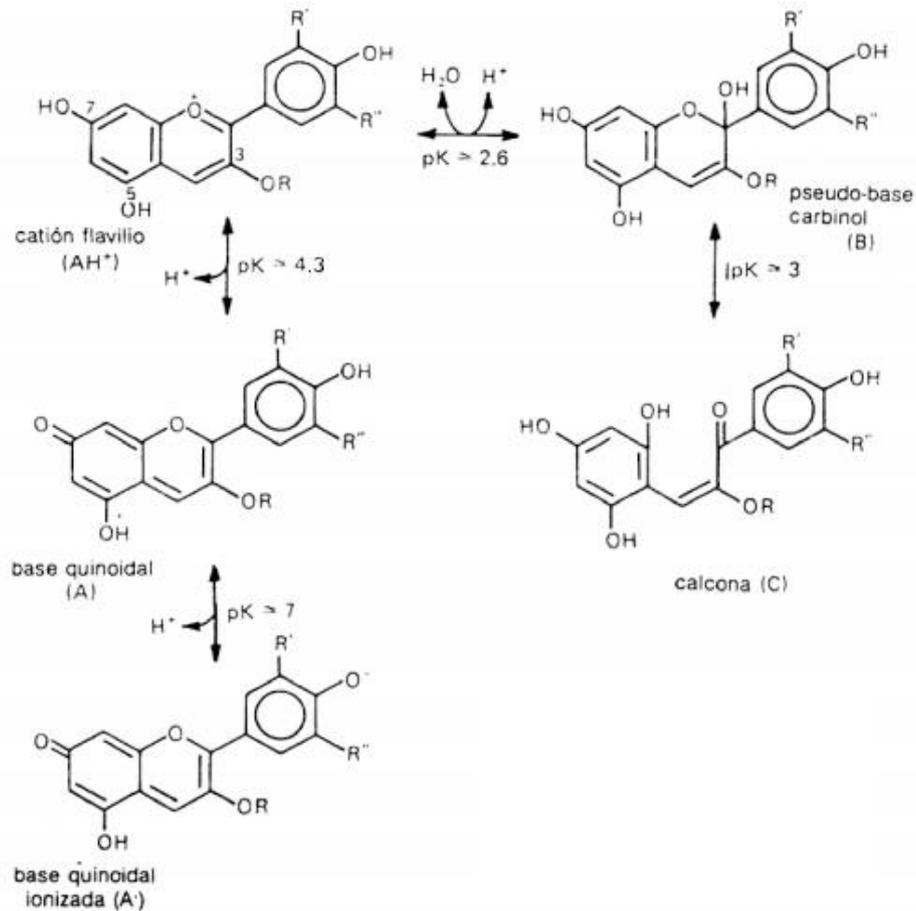


Figura 2. Influencia del pH en la estructura de las antocianinas (Garzón, 2008).

Por otro lado, el mayor problema que se presenta con la temperatura es que al aumentarse se genera la pérdida del azúcar de la posición 3 de la molécula, esto a su vez genera la apertura del anillo teniendo como consecuencia la pérdida del color. Esta misma condición se puede generar por oxidación de las antocianinas, ya sea por reacción directa con el oxígeno, con compuestos que han sido previamente oxidados o por generación de peróxido de hidrógeno por reacción en sinergia del oxígeno y el ácido ascórbico. Así mismo, cuando los azúcares están en bajas concentraciones, pueden degradar las antocianinas al actuar como un nucleófilo atacando el catión flavílio, formando la pseudo-base carbinol (Cano, 2011; Zapata, 2014).

Además, se presentan problemas de estabilidad al tener concentraciones altas de las antocianinas puesto que se generan procesos de autoasociación entre dos cationes flavílio, dos formas hemiacetal, dos bases quinoidales o una base quinoidal y un catión flavílio; asimismo esta falta de estabilidad también se puede generar con la presencia de luz ya que esta acelera la degradación de las moléculas antociánicas (Aguirre, 2018; Garzón, 2008).



1.2. Obtención de colorantes alimentares de origen natural

1.2.1. *Morus nigra* L.

La especie *Morus nigra* L. es nativa de Irán, sin embargo, por muchos años ha sido adaptada a diferentes temperaturas y ambientes logrando tener cultivos en Asia, Europa, América y África (Özgen, Serçe, & Kaya, 2009). Es una planta angiosperma perteneciente a la familia Moraceae (**Tabla 2**) que puede llegar hasta una altura de 15 m con un tronco recto y robusto de color marrón oscuro. Sus hojas son grandes, alternas y pecioladas con forma redondeada o acorazonada, de color verde oscuras, ásperas por el haz y con el borde dentado.



Figura 3. Fruto en diferentes etapas de maduración de *Morus nigra* L. (Tormo, 2014).

En la primavera florece formando grupos alargados y compactos, posteriormente las flores femeninas maduran y se tornan carnosas generando moras rojas y ácidas, que al madurarse se tornan púrpura oscura y al final toman un sabor agridulce (**Figura 3**) (Galán, Gamarra, García, & Alvarez, 2013; Z. Wu, Zhe-Kun, & Gilbert, 2004).

Tabla 2. Clasificación taxonómica APGIII de *Morus nigra* L. Tomado de: (Linnaeus, 2018).

Clase	Equisetopsida C. Agardh
Subclase	Magnoliidae Novák ex Takht.
Superorden	Rosanae Takht.
Orden	Rosales Bercht. & J. Presl
Familia	Moraceae Gaudich
Genero	<i>Morus</i> L.
Especie	<i>Morus nigra</i> L.



Estas frutas han sido históricamente usadas en la medicina china para el tratamiento de diabetes, hipertensión, anemia y artritis y en Turquía para las lesiones bucales, (Özgen et al., 2009). Asimismo, se han fabricado bebidas alcohólicas por medio de la fermentación de estas frutas y las hojas han sido usadas tanto para la crianza de gusanos de seda, como para obtener extractos con propiedades alisantes de piel. En la actualidad, se ha demostrado diferentes propiedades de este fruto como antiinflamatorias, antinociceptivas, sedantes, emolientes, hipoglicemiantes, citotóxicas, antisépticas, antifúngicas, antibacterianas, hepatoprotectoras y como reemplazo hormonal (Chen et al., 2016; Kutlu, Durmaz, Ateş, Yilmaz, & Çetin, 2011; Tonioni et al., 2011). Todas estas propiedades sumadas con la gran capacidad antioxidante que posee, la cual inclusive es mayor a la de otros tipos de moras, han hecho que se genere un gran interés por estas en la industria alimentaria (Feng et al., 2015; Naderi, Asgary, Sarraf-Zadegan, Oroojoy, & Afshin-Nia, 2004; Tormo, 2014).

Entre los compuestos presentes en *M. nigra* se tienen los ácidos grasos, siendo el más abundante el ácido linoléico, seguido por el palmítico y el oléico (Ercisli & Orhan, 2008; Sánchez-Salcedo, Sendra, Carbonell-Barrachina, Martínez, & Hernández, 2016). También presenta altos niveles de azúcares siendo los principales fructosa y glucosa además de ácidos orgánicos, siendo mayormente cítrico y málico; así como diferentes minerales, especialmente potasio, fósforo y calcio. Debido a esta variada composición se ha potencializado su uso en el área alimentaria, cosmético y farmacéutico (Ercisli & Orhan, 2007; Özgen et al., 2009).

Sin embargo, sus componentes más importantes son los flavonoides, especialmente las antocianinas, puesto que son las responsables de su color y su gran capacidad antioxidante. Principalmente se encuentran 3 antocianinas que están presentes en la mayoría de las moras, siendo estas la cianidina 3-glucosido, quercetina 3-rutinosido y kaempferol 3-rutinosido, sin embargo, *M. nigra* presenta otras cuatro antocianinas: quercetina 3-glucosido, cianidina 3-rutinosido, pelargonidina 3-glucosido y pelargonidina 3-rutinosido, que presentan la misma importancia (**Figura 4**). Además, en el 2001, Dugo et al. Reportaron la presencia de cianidina 3-soforosido. Gracias a esta variedad de antocianinas se puede evidenciar un notable aumento de sus propiedades antioxidantes respecto a otros tipos de moras (Costa, 2015; Pawlowska, Oleszek, & Braca, 2008).

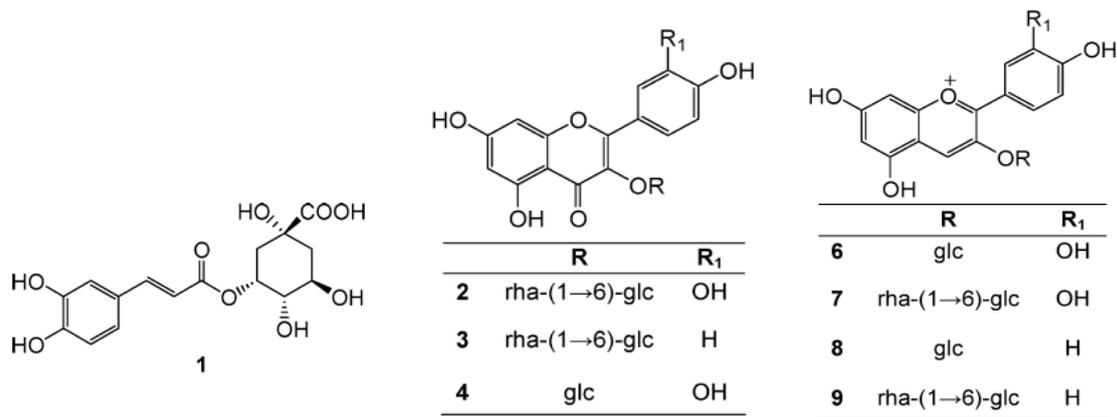


Figura 4. Compuestos fenólicos encontrados en *Morus nigra* L.:

1- ácido 5-cafeoilquínico, **2-** quercetina 3-rutinosido; **3-** kaempferol 3-rutinosido; **4-** quercetina 3-glucosido; **6-** cianidina 3-glucosido; **7-** cianidina 3-rutinosido; **8-** Pelargonidina 3-glucosido; **9-** pelargonidina 3-rutinosido (Pawlowska et al., 2008).

1.2.2. *Rubus fruticosus* L.

Es una especie de mora arbustiva de porte erecto o rastrero perteneciente a la familia Rosaceae Juss. (**Tabla 3**) que puede llegar hasta una altura de 3 metros; sus hojas son verde oscuras en la parte superior y verde claras en la parte inferior; los frutos se forman en racimos al final de las ramas, los cuales en la madurez se tornan negros o púrpura rojizo oscuro con un sabor dulce-ácido (**Figura 5**), conteniendo en su interior semillas marrones claras u oscuras. Se cree que esta planta tiene su origen en Armenia, sin embargo, ya se encuentra extendida por toda Europa, Asia, Oceanía y América. (Antunes, 2013; Zia-Ul-Haq, Riaz, De Feo, Jaafar, & Moga, 2014).



Figura 5. Fruto en diferentes etapas de maduración de *Rubus fruticosus* L. (Chadi, 2011).



Este fruto, al igual que *Morus nigra* L., es considerado altamente nutritivo al estar compuesto por 85% de agua, 10% de carbohidratos y contener grandes cantidades de minerales (Mg, Fe, K y Ca) y vitaminas (A, B, C, K y E). también posee diferentes compuestos fenólicos principalmente ácidos y antocianinas; por el lado de los ácidos fenólicos los que se encuentran en mayores cantidades son el ácido elágico, ácido gálico, ácido catequínico, ácido caféico, ácido *p*-cumárico y ácido ferúlico y por el lado de las antocianinas las mayoritarias son cianidina-3-glicósido, cianidina-3-arabinósido y cianidina-3-galactósido, sin embargo, también se encuentran en menores cantidades malvidina-3-glicósido, pelargonidina-3-glicósido, cianidina-3-xilósido, cianidina-3-rutinósido y cianidina 3-molinil glucósido. Además de estos presenta altas cantidades de fructosa y glucosa, flavonoides como kaempferol y mircetin y en los frutos inmaduros algunos carotenoides como todo-trans-luteína y todo-trans-zeaxantina.

Debido a esta variada composición se ha logrado evidenciar su capacidad como agente antiinflamatorio, anticancerígeno, antimutagénico, antidiabético, antiviral y principalmente antioxidante (D. S. Ferreira, 2008; Milivojević et al., 2011; Zia-Ul-Haq et al., 2014).

Tabla 3. Clasificación taxonómica APGIII de *Rubus fruticosus* L. Tomado de (Linnaeus, 1995)

Clase	Equisetopsida C. Agardh
Subclase	Magnoliidae Novák ex Takht.
Superorden	Rosanae Takht.
Orden	Rosales Bercht. Y J. Presl
Familia	Rosaceae Juss.
Género	<i>Rubus</i> L.
Especie	<i>Rubus fruticosus</i> L.

1.2.3. Extracción de moléculas con capacidad colorante

Al trabajar con moléculas provenientes de matrices naturales se debe tener en cuenta que estas se encuentran en una mezcla con una gran variedad de compuestos, por lo que, para poder obtener de la manera más pura posible la molécula o familia de moléculas deseadas, se debe recurrir a diferentes métodos de extracción dependiendo de la naturaleza de dichas moléculas. Esto incluye determinar el mejor solvente para realizar este proceso, puesto que debe ser capaz de disolver los metabolitos de interés, ser fácil de eliminar, no debe reaccionar con la matriz y al realizar pigmentos para el área alimentar este no puede ser tóxico. Así mismo es importante tener en cuenta el tamaño de las partículas, la porosidad y la temperatura puesto que muchos metabolitos son termolábiles (Melgar, 2011; Oliveira Filho, 2017).



Algunos de los métodos más sencillos de extracción son la infusión y la maceración, el primero es muy rápido y es normalmente usado para partes blandas, por ejemplo, Mena et al., en 2015 obtuvo fácilmente metabolitos como saponinas, flavonoides o azúcares reductores de *Sapindus saponaria* L.; la maceración por su parte puede dejarse en extracción desde 24 horas hasta varios meses, por ejemplo, Castillo & Ramírez, en 2006, realizaron la extracción de flavonoides de frutos de *Vitis vinifera* L. (uva), *Fragaria vesca* L. (fresa) y *Morus nigra* L. (mora) mediante maceración por 14 días en donde se obtuvieron porcentajes de metabolitos muy similares a los obtenidos mediante extracción por Soxhlet con etanol y etanol acidificado.

La extracción por Soxhlet es una de las más usadas puesto que permite generar una buena extracción debido a la repetición de ciclos, esto acompañado de la temperatura permite obtener compuestos no solubles en agua. Este método fue utilizado tanto en extracción alcalina como ácida por Oliveira Filho en 2017, para la obtención de un colorante natural a partir del bagazo generado por la alta producción de uvas en Brasil y Rio Grande, en donde se evidenció que la extracción alcalina presenta altos porcentajes de extracción de flavonoides, en especial antocianinas.

Otros métodos muy usados para extracción y que pueden usarse como complementos de otros, son la extracción por ultrasonido y microondas, siendo que la primera usa sonidos de alta frecuencia para generar el desprendimiento de los metabolitos de interés (Azuola & Vargas, 2007) y la segunda usa microondas para generar movimientos moleculares que contribuyen a acelerar la transferencia de energía y por tanto de los metabolitos (Gómez, Sosa & López, 2016). En 2011, Oliveros et al. realizaron la extracción de cumarinas de las semillas de *Dipteryx odorata* L. mediante tres técnicas, infusión, maceración y maceración con ultrasonido, siendo esta última la que presenta el mayor rendimiento de extracción; por su lado, la extracción por microondas aplicada en aceites esenciales de *Piper auritum* L. (acuyo) con el fin de evaluar su actividad antifúngica, ha proporcionado un rendimiento de extracción superior a los reportados anteriormente con otros métodos como destilación por arrastre de vapor o extracción supercrítica (Gómez, Sosa, & López, 2016)

La técnica de fluido supercrítico surgió como una gran alternativa a los métodos de extracción convencionales puesto que permite realizar la extracción a bajas temperaturas, evitando así la degradación de diferentes metabolitos secundarios permitiendo el uso de solventes económicos y no tóxicos, siendo el dióxido de carbono uno de los más trabajados (A. Castillo & Linares, 2001). En 2009, Giraldo et al. realizaron la extracción de carotenoides presentes en *Capsicum*



annuum L., evidenciando que este método generó rendimientos similares a los obtenidos por soxhlet con acetato de etilo, hexano y éter de petróleo, pero a un mejor costo y con menor contaminación.

La extracción por enzimas es otra técnica relativamente moderna y que está siendo muy desarrollada. Uno de los estudios en los que más se evidenció su efectividad fue al extraer antocianinas de la cáscara de uva ya que las enzimas alteran la estructura de la pared celular, lo que mejora el rendimiento de extracción de los compuestos fenólicos en general (Maier, Göppert, Kammerer, Schieber, & Carle, 2007).

Por otro lado, se ha evidenciado que la realización de zumos permite una fácil obtención de diferentes metabolitos como las antocianinas, siendo estas una de las más usadas para la realización de colorantes naturales, por ejemplo, Türkyılmaz et al., en 2019, realizaron zumos de Guindas (*Prunus cerasus* L.) de la variedad Kütahya, con las cuales obtuvieron las cantidades necesarias de antocianinas (168 mg/L de cianidin-3-glucosilrutinosido y 62 mg/L de cianidin-3- rutinosido) para realizar un análisis de copigmentación.

1.2.4. Estabilización de formulaciones colorantes

A pesar de que en este momento los colorantes naturales están tomando mucha fuerza en diferentes campos industriales como el alimentaria o el textil, en especial porque difícilmente pueden llegar a ser tóxicos y tienen la posibilidad de agregar propiedades a los alimentos, lo que genera un aumento en sus beneficios para la salud del ser humano, estos presentan una gran desventaja frente a los colorantes artificiales: su sensibilidad a factores como luz, pH, temperatura y oxígeno, entre otros (Laleh, Frydoonfar, Heidary, Jameei, & Zare, 2006; Pariza, 2009).

Por consiguiente, se han realizado diferentes avances en el desarrollo de metodologías que permitan aumentar la estabilidad de estos colorantes, llegando principalmente a establecerse diferentes procesos de encapsulación (**Tabla 4**), en donde se recubre la sustancia activa (núcleo) con algún material de revestimiento (encapsulante) para evitar las diferentes interacciones. Estos dan como resultado diferentes formas de cápsulas como filmes, esferas o partículas irregulares y varias estructuras como porosas, compactas, amorfas o cristalinas. Para el éxito de cada uno de estos procesos es importante realizar una buena selección del material encapsulante, elección que se hará teniendo en cuenta las propiedades físicas y químicas del



principio activo, el método mediante el cual se va a encapsular, la aplicación de este y el tamaño de partícula que se quiere obtener (Souza, 2012).

Tabla 4. Métodos de encapsulación de metabolitos secundarios y sus características. Tabla adaptada de (Mahdavi, Jafari, Ghorbani, & Assadpoor, 2014).

Método de encapsulación	Tamaño Partícula (μm)	Ventajas	Desventajas
<i>Spray drying</i>	10-400	Económico Amplia variedad de material de encapsulantes Alta eficiencia de encapsulación Estabilidad del producto Posible producción a gran escala	Altas temperaturas Dificultad en control del tamaño de partícula Rendimientos moderados en lotes pequeños
<i>Freeze drying</i>	20-5000	Posibilidad de encapsular sustancias termosensibles inestables en solución acuosa	Tiempos largos Proceso y almacenamiento costoso
Revestimiento de lecho fluido	20-200	Económico	Control de tamaño de partícula
Emulsificación	0,2-5000	Se pueden incorporar polares, apolares y anfifílicos	Limite en el número de emulsificantes aptos Dificultad en control de formación de cápsula
Extrusión de fusión	300-5000	Recubrimiento total Temperatura relativamente baja	Difícil obtener cápsulas con materiales de recubrimiento extremadamente viscosos
Expansión rápida de fluidos supercríticos	10-400	No tóxico Fácil eliminación de solvente Proceso a bajas temperaturas y atmósfera inerte.	El núcleo y el encapsulante deben ser solubles en el fluido supercrítico
Gelificación iónica	-	Se evitan solventes orgánicos y condiciones extremas de temperatura y pH	Usado a escala de laboratorio Generalmente cápsulas con alta porosidad
Gelificación térmica	-	Se evitan solventes orgánicos y condiciones extremas de pH	Usado a escala de laboratorio Generalmente cápsulas con alta porosidad
Separación de fases (Coacervación)	10-800	Método a temperatura ambiente	Uso de solventes tóxicos Coacervados complejos son altamente inestables Método costoso y complejo
Método de emulsión	1-100	Se puede obtener micro-nanocapsulas con poca distribución de tamaños	Inestable a tensiones ambientales como calentamiento o secado Limitación en emulsionantes aptos



La técnica más usada en la industria alimentaria es el *spray drying*, puesto que, a pesar de ser una técnica antigua, empleada desde 1950, y de los diferentes avances en otros métodos de encapsulación, esta sigue siendo una de las metodologías más económicas, con alta calidad, rendimiento, tamaño y estabilidad de las cápsulas, además de presentar una gran variedad de agentes encapsulantes incluyendo polisacáridos como almidones, inulina (Saéñz, Tapia, Chávez, & Robert, 2009) maltodextrina (Arrazola, Herazo, & Alvis, 2014) o dextrosa (Nayak & Rastogi, 2010), jarabes de maíz, goma arábiga (Pante, 2014) y goma de mezquite (Jiménez-Aguilar et al., 2011), lípidos como ácido esteárico, mono y diglicéridos y proteínas como gelatina, caseína, suero de leche, soja y trigo (Idham, Muhamad, & Sarmidi, 2012).

Sin embargo, también son utilizadas otras técnicas como la gelificación térmica, con la cual se ha evaluado la encapsulación de diferentes antocianinas con glucano (Xiong, Melton, Eastel, & Siew, 2006), alginatos (Pasin, 2014) y sobre todo curdlana (D. Ferreira, Faria, Grosso, & Mercadante, 2009) puesto que es un recubrimiento que no pierde sus capacidades gelificante en pH debajo de 2.

Además, se debe tener presente que la mayoría de los colorantes naturales actualmente utilizados son de composición antociánica, lo que hace que sea necesario garantizar un pH menor a 3 puesto que al estar en niveles superiores a este se puede generar la formación del hemiacetal o chalcona, perdiendo así su capacidad colorante. También se debe tener en cuenta que este tipo de flavonoides presenta la capacidad de generar copigmentación, mediante la cual esta característica se hace más intensa, brillante y muchas veces la estabiliza protegiéndola de los diferentes factores que pueden degradarla. Este fenómeno puede originarse por la interacción de las antocianinas con flavonoides, ácidos fenólicos (Fan et al., 2019), polifenoles, alcaloides, aminoácidos y antocianinas, generando en el último caso una autoasociación (Suárez, Yazán, & Narváez, 2016).

Por otra parte, es necesario tener en cuenta que se debe garantizar la conservación de los preparados a partir de fuentes naturales, siendo la liofilización uno de los procesos más usados, puesto que elimina el agua contenida en la muestra mediante presión y bajas temperaturas, permitiendo la obtención de un sólido inocuo; estas condiciones además de disminuir la posibilidad de contaminación, ayudan a la conservación de diferentes metabolitos especialmente las antocianinas, como lo evidenció Rojano et al., en 2011, al analizar muestras de açai colombiano (*Euterpe oleracea* Mart) y demostrar que las muestras liofilizadas contienen un 95% de antocianinas, cantidades similares a las reportadas anteriormente para la



fruta fresca en Brasil. Sin embargo, muchos de los colorantes naturales son líquidos, siendo para estos, la pasteurización una de las mejores maneras de garantizar su inocuidad, y a pesar de que implique temperaturas altas (alrededor de 80-95 °C) se ha evidenciado que al ser por poco tiempo (15-20 min) no genera una degradación de las antocianinas y por tanto, no altera su capacidad antioxidante, como se evidenció en 2015 por Proaño, donde al realizar un zumo de mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunt) y pasteurizarlo a 80 °C por 15 minutos, se mantuvo la capacidad antioxidante y se cumplió con las características tanto físico-químicas como de salubridad.

1.3. Colorantes naturales en la industria alimentaria

En noviembre de 2011 se publicó el reglamento comisión (UE) N° 1129/2011 en donde se evidencian los colorantes naturales que son permitidos para el uso alimentario con sus respectivas siglas y en caso de ser necesario, la cantidad máxima que se puede usar. Esta aceptación de su uso ha llevado a una expansión en la investigación de nuevos colorantes alimentarios y diferentes matrices de aplicación (Europea, 2013).

Actualmente, hay una gran variedad de investigaciones teniendo por un lado el desarrollo de nuevos colorantes, por ejemplo el extracto de arándano azul adicionado a queso *petit-suisse* con prebióticos en donde se demostró la alta aceptación por la población mexicana (Rueda-Enriquez, Sanchez-Vega, & Lara-Sagahón, 2015), o el uso de esta misma fruta en queso para untar (Zhang, Yang, & Zhao, 2011); la coloración de productos cárnicos con oleorresina de pimentón o polvo de ciruela seca con los cuales se disminuyó su oxidación mejorando así su conservación (Martínez, Martínez, García, Cuaran, & Ocampo, 2016); o la adición de extracto oleoso de residuos de chontaduro para la coloración de salchichas Frankfurt (Pinzón-Zárate, Hleap-Zapata, & Ordóñez-Santos, E, 2015). Por otro lado, no solo se investiga hacia la obtención de estos, sino también buscando su conservación y transporte. Como ejemplos de la diversidad de desarrollos en pro de la generación de aditivos alimentarios naturales, se están desarrollando liposomas transportadores de β -carotenos y antocianinas provenientes de zarzamora, las cuales fueron más resistentes y presentaron una gran tasa de liberación (Villa-García, Martín-Martínez, & Pedroza-Islas, 2015), e igualmente nanopartículas poliméricas y sólidas lipídicas y ciclodextrinas para el transporte de diferentes matrices, entre otros.



2. OBJETIVOS

2.1. General

Debido a la alta demanda de nuevos colorantes naturales por parte de la industria alimentaria, se realizaron extractos de dos tipos de moras, *Morus nigra* L. y *Rubus fruticosus* L., con los que se generaron colorantes naturales sólidos y líquidos a base de antocianinas y se pretendió evaluar su estabilidad durante 3 meses. Los extractos de estas moras fueron también caracterizados con respecto a su composición química y propiedades bioactivas.

2.2. Específicos

1. Se buscó obtener extractos acuosos de *Morus nigra* L. y *Rubus fruticosus* L., con un alto contenido de antocianinas.
2. Se proyectó caracterizar químicamente los extractos por medio del análisis de azúcares libres, ácidos orgánicos, tocoferoles y compuestos antociánicos.
3. Se pretendió evaluar la actividad antioxidante y antimicrobiana de los extractos, bien como la citotoxicidad.
4. Se planteo determinar el mejor método de pasteurización de los extractos acuosos garantizando su calidad microbiológica con la menor degradación de antocianinas posible.
5. Se buscó formular colorantes alimentarios líquidos con cada fruto, por gelificación térmica, mediante la adición de pectina y goma adraganta como estabilizantes y se almacenaron a temperatura ambiente y refrigerados a 3 °C.
6. Se diseñó preparar colorantes alimentarios sólidos (en polvo) con cada fruto mediante la técnica de *spray drying*, con adición de maltodextrina y una mezcla de maltodextrina + goma arábiga, los cuales se almacenaron a temperatura ambiente y refrigerados a 3 °C.
7. Se pretendió monitorizar la estabilidad a lo largo de tres meses de las formulaciones líquidas y sólidas de los dos frutos.
 - i) Se procuró evaluar las propiedades colorantes (color y concentración de antocianinas) y la seguridad microbiológica (carga microbiana) y citotóxica de los colorantes a lo largo de 3 meses.



Desarrollo y estabilización de colorantes alimentarios
a partir de extractos de moras

ii) Se buscó confirmar las propiedades bioactivas (antioxidantes y antimicrobianas) de las diferentes formulaciones colorantes.



3. METODOLOGIA

3.1. Muestras

Para este estudio fueron obtenidos de la empresa Ponto Agrícola - Unipessoal, Lda., 1300 g de frutos congelados de *Morus nigra* L. y fueron colectados 900 g de *Rubus fruticosus* L. en Bragança (Trás-os-Montes). Se tomó la totalidad de los frutos congelados de cada especie y se realizaron zumos que luego se centrifugaron y se filtraron a vacío para eliminar la pulpa, las semillas y todos los demás residuos sólidos y se liofilizaron permitiendo obtener un total de extracto de 166 g de *Morus nigra* L. y 107 g de *Rubus fruticosus* L.

3.2. Patrones y reactivos

Los agentes estabilizantes pectina citrus, goma adraganta, maltodrextosa y goma arábica fueron adquiridos en Sigma, los solventes etanol y acetonitrilo de grado HPLC se obtuvieron en Fisher Scientific, los patrones (cianidina 3-glucósido y peonidina 3-glucósido) en Polyphenols. El dicloro-hidrato de 2,2'-azobis (2-amidinopropano) (AAPH), el estándar del éster metílico para ácidos grasos (FAME), así como el ácido acético, ácido fórmico, elipticina, sulforodamina B (SRB), Azul de Tripano, ácido tricloroacético (TCA), Tris y los patrones de azúcares (fructosa, glucosa, sacarosa y melecitosa) fueron adquiridos en Sigma - Aldrich. El suero fetal de vacuno (FBS), la solución salina balanceada de Hank (HBSS), la tripsina, la solución de penicilina / estreptomicina y el éter dietílico eran de la marca Lab-Scan. El tolueno y el ácido sulfúrico fueron obtenidos de Sigma Chemical Co., el RPMI-1640 (centro Instituto Memorial Parque Roswell) y el medio DMEM (Medio Eagle modificado por Dulbecco) en la empresa Hyclone. Las células RAW 264.7 fueron compradas a la ECACC (Colección Europea de Cultura Celular Animal), el Kit de Reactivos Griess fue de Promega, el cloruro de p-iodonitrotetrazólico (INT) de Panreac Applichem, el caldo triptona de soja (TSB) y el caldo Mueller Hinton (MHB) en Biolab®. Los demás reactivos químicos utilizados se adquirieron en Sigma Chemical Co. Todos los demás productos químicos eran de grado analítico y obtenidos a través de proveedores comunes. El agua destilada utilizada fue tratada en un sistema de purificación Milli-Q (Millipore, modelo A10, Billerica, MA, USA). Los microorganismos *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Aspergillus parasiticus* and *Zygosaccharomyces rouxii* fueron proveídos por el Centro de Investigación de Montaña del Instituto Politecnico de Bragança, el caldo de soja triptico (TSB) y el extracto de malta de agar (MEA) fueron adquiridos en Liofilchem-ITALY.



3.3. Determinación de la composición química

Para el análisis de la composición química de los extractos de *Morus nigra* L. y *Rubus fruticosus* L. se determinó:

3.3.1. Azúcares libres

Para preparar la muestra se pesaron 200 mg de cada uno de los extractos, se disolvieron en 2 mL de agua, las soluciones resultantes se filtraron en filtros de nylon de 0,2 μm de Millipore y se transfirieron a viales ámbar; estas muestras se inyectaron en un equipo de cromatografía líquida de alta eficiencia (Knauer, sistema Smartline) acoplado a un detector de índice de refracción (Knauer, Smartline 2300) (HPLC-RI), con una columna 100-5 NH_2 Eurospher (4,6 x 250 mm, 5 mm, Knauer); para la separación cromatográfica se utilizó como fase móvil acetonitrilo/agua desionizada, 70:30 (v/v) a flujo constante de 1 mL/min (Dias et al., 2015). Con el cromatograma obtenido se identificaron los azúcares presentes mediante comparación de los tiempos de retención de los patrones y la cuantificación de estos se hizo mediante el método de patrón externo, expresando los resultados en mg de compuesto por g de extracto

3.3.2. Ácidos orgánicos

Para determinar los ácidos orgánicos presentes en los frutos se tomaron 200 mg de los extractos liofilizados y se disolvieron en 2 mL de agua, las soluciones se pasaron por un filtro de nylon de 0,2 μm de Millipore y se vertieron en viales ámbar, estas se inyectaron en un equipo de cromatografía líquida ultrarrápida acoplado a un detector de matriz de fotodiodos (UFLQ-PDA) con una columna C18 SphereClone (Phenomenex) de fase reversa (5 mm, 250 mm x 4,6 mm) termostaticada a 35 °C, la elución se realizó de forma isocrática con ácido sulfúrico (3,6 mmol/L) con flujo constante de 0,8 mL/min (Pereira et al., 2014). Con el cromatograma obtenido se identificaron los diferentes ácidos orgánicos mediante comparación de los tiempos de retención de los patrones comerciales y su cuantificación se realizó relacionando las áreas de los picos, registradas a 215 nm y 245 nm (para el ácido ascórbico) con curvas de calibración obtenidas de estándares comerciales de cada compuesto: ácido oxálico ($y = 9 \times 10^6 x + 377946$, $R^2 = 0,994$); ácido málico ($y = 863548x + 55571$, $R^2 = 0,999$). Los resultados fueron expresados en mg de compuesto por g de extracto.



3.3.3. Tocoferoles

Se tomaron 500 mg de cada uno de los extractos liofilizados y se les adicionaron 100 μ L de solución de hidroxitolueno butilado (BHT) (10 mg/mL) y 250 μ L de tocol (50 μ g/mL), posteriormente se adicionaron 4 mL de metanol, 4 mL de hexano y 2 mL de solución saturada de cloruro sódico agitando en vortex por 1 min entre cada adición, luego se centrifugó a 4000 g por 5 minutos (**Figura 6**) y se transfirió el sobrenadante a un vial ámbar, se repitió el proceso dos veces más desde la adición del hexano y se agregó sulfato de sodio anhidrido para deshidratar el extracto obtenido, a continuación se evaporó el hexano mediante corriente de nitrógeno, se disolvió en 2 mL de *n*-hexano, se filtró con filtros de nylon de 0,2 μ m y se transfirió a un vial ámbar.



Figura 6. Extracción de tocoferoles.

Las muestras se analizaron en un equipo HPLC con sistema integrado de bomba Smartline pump 1000, desgasificador Smartline manager 5000, autosampler AS-2057 y detector ultravioleta 2500 UV a 295 nm. Este se encuentra conectado en serie con un detector de fluorescencia FP-2020 programado para una excitación de 290 nm y una emisión de 330 nm. La columna cromatográfica usada es de fase normal Polyamide II (2504,6 mm) mantenida a 30 °C (horno Grace 7971 R), se utilizó *n*-hexano: éter etílico (70:30, v/v) como fase móvil a un flujo constante de 1 mL/min, habiéndose inyectado de 20 μ L de muestra. Con el cromatograma obtenido se realizó la identificación de los diferentes compuestos por comparación de picos con estándares comerciales y la cuantificación mediante la señal de fluorescencia con el método de estándar interno, expresando las cantidades finales en mg por g de extracto.



3.3.4. *Compuestos antociánicos*

Para este análisis se pesaron 10 mg de los extractos liofilizados, se disolvieron en 2 mL de etanol:agua (80:20, v/v), luego se filtró a un vial y se realizó la determinada identificación. La separación cromatográfica se logró con una columna de Waters Spherisorb S3 ODS-2 C18 (3 μ m, 4,6 mm - 150 mm, Waters, Milford, MA, EE. UU.) a una temperatura de 35°C. Los disolventes utilizados fueron: ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1% en agua (A) y acetonitrilo (B). El gradiente de elución siguió estos parámetros: 10 % de B durante 3 min, de 10 a 15 % de B durante 12 min, 15 % de B durante 5 min, de 15 a 18 % de B durante 5 min, de 18 a 30 % de B durante 20 min, de 30 a 35 % de B durante 5 min, y de 35 a 10 % de B durante 10 min. El tiempo total de ejecución resultante fue de 60 minutos, seguido de un reacondicionamiento de la columna de 10 minutos, utilizando un caudal de 0,5 mL/min. La detección en línea doble se llevó a cabo en el DAD utilizando 520 nm como la longitud de onda y en un espectrómetro de masas (MS) conectado al sistema de HPLC a través de la salida de la célula DAD. La detección de MS se realizó en modo positivo, utilizando un espectrómetro de masas Linear Ion Trap LTQ XL (Thermo Finnigan, San Jose, CA, EE. UU.), el cual está equipado con una fuente ESI. El nitrógeno sirvió como gas de nebulización (50 psi); el sistema se operó con un voltaje de pulverización de 4,8 kV, una temperatura de la fuente a 320 °C, un voltaje capilar de 14 V. La compensación de la lente del tubo se mantuvo a un voltaje de 75 V. El escaneo completo cubrió el rango de masa desde m/Z 100 a 1500. La adquisición de datos se realizó con Xcalibur sistema de datos (Thermo Finnigan, San José, CA, EE. UU.) (Gonçalves et al., 2017).

Tanto los compuestos antociánicos fueron identificados de acuerdo con sus espectros de UV y masas, comparando los tiempos de retención de compuestos estándar, datos obtenidos en la literatura y mediante el software Xcalibur® (ThermoFinnigan), expresando las cantidades finales en mg por g de extracto.

3.4. Evaluación de las propiedades bioactivas

Se evaluaron diferentes propiedades bioactivas de los extractos de *Morus nigra* L. y *Rubus fruticosus* L.:



3.4.1. Actividad antioxidante

Esta propiedad se evaluó para los extractos de *Morus nigra* L. y *Rubus fruticosus* L. así como para las diferentes preparaciones colorantes sólidas y líquidas, primero mediante el método de inhibición de peroxidación lipídica (TBARS) y guiados por los resultados obtenidos en este se realizó el método de evaluación de capacidad inhibidora de la hemólisis oxidativa (OxHLIA).

TBARS

En este ensayo se utilizó tejido cerebral de cerdo como matriz a oxidar, por lo cual, primero se preparó una suspensión de este con tampón tris-HCl (20 mM; pH:7,4) (**Figura 7**), se centrifugó y se tomó el sobrenadante; aparte se pesó 5 mg de cada muestra y se disolvieron en 2 mL de agua destilada y a partir de esta se realizaron 6 diluciones en serie, quedando en total 7 concentraciones para cada muestra, cada una con 200µL de muestra, además se realizó un blanco de agua y uno de solución tampón de tris-HCl; posteriormente se adicionaron 100 µL de ácido ascórbico, 100 µL de sulfato ferroso y 100 µL de la suspensión de cerebro de cerdo y se incubaron en un baño termostático a 37,5 ° C por una hora; luego se agregaron 500 µL de ácido tricloroacético (28%) para frenar la reacción seguido de 380 µL de ácido tiobarbitúrico (2%) y se llevó a incubación a 80 ° C por 20 minutos.



Figura 7. Cerebro de cerdo para análisis de actividad antioxidante

Para poder realizar la lectura es necesario retirar las proteínas, por tanto, se centrifugaron a 3000 rpm por 5 minutos y se midió la intensidad del color del sobrenadante a una absorbancia de 532 nm en un espectrofotómetro UV-Vis (Specord 200, Analytik Jena, Jena, Alemania) (Pinela, Barros, Carvalho, & Ferreira, 2012). El porcentaje de inhibición fue calculado mediante la fórmula:

$$\text{Porcentaje de inhibición (\%)} = 100 \frac{A-B}{A} \quad \text{Ecuación 1}$$



Donde A y B corresponden a las absorbancias del control y de las soluciones con extracto respectivamente; los resultados obtenidos fueron expresados en IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$), lo que se refiere a la concentración de muestra requerida para lograr el 50% de la inhibición de la peroxidación lipídica.

OxHLIA

Esta prueba genera la inhibición de la hemólisis inducida por radicales libres en una suspensión de eritrocitos de oveja sana (pH:7,4). Para este ensayo se tomó como referencia los resultados obtenidos en TBARS, con lo cual se determina una concentración óptima para cada muestra, estas se pesan y se disuelven en 2 mL de PBS y se realizan 5 diluciones en serie. El ensayo se realizó en una placa de 48 pozos donde se adicionó 400 μL de cada muestra, también se realizó una línea control con PBS y una línea de hemólisis completa trabajada con agua, posteriormente se agregó 200 μL de la suspensión de sangre y se lleva a agitación constante con incubación a 37 °C por 10 minutos; posteriormente se añadieron 200 μL del agente oxidante AAPH (160nM en PBS), se midió la densidad óptica en un lector de microplacas (ELX800, Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, EUA) a 690 nm y se llevó a incubación nuevamente por 10 minutos; estos ciclos de incubación y lectura se realizaron aproximadamente por 300 minutos manteniendo las condiciones trabajadas por (Takebayashi, Iwahashi, Ishimi, & Tai, 2012).

Para el tratamiento de datos se calculó la población de eritrocitos que se mantuvieron intactos (P) mediante:

$$P(\%) = 100 \left(\frac{S_t - HC_0}{S_0 - HC_0} \right) \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde S_0 y S_t corresponden a las densidades ópticas de las muestras a 0 y t minutos, respectivamente, y HC_0 corresponde a la densidad óptica de la hemólisis completa a tiempo 0. Los resultados se expresaron en tiempo necesario para generar hemólisis (Δt), calculado mediante:

$$\Delta t (\text{min}) = Ht_{50}(\text{muestra}) - Ht_{50}(\text{control}) \quad \text{Ecuación 3}$$



Donde Ht_{50} es el tiempo hemolítico del 50% de la población de eritrocitos, obtenido de la curva de hemólisis representada para cada dilución del extracto. Los valores de Δt se correlacionaron con las diferentes concentraciones de los extractos, llegando así a establecer la concentración de extracto requerida para retrasar la hemólisis en un tiempo fijo. Así mismo, se calculó la concentración requerida para retardar la hemólisis (EC_{50} , $\mu\text{g/mL}$) en 60 y 120 min.

3.4.2. Actividad antimicrobiana

Se analizó actividad antibacteriana y antifúngica de los dos extractos liofilizados y de cada una de las preparaciones colorantes; utilizando microorganismos obtenidos en el laboratorio micológico, departamento de fisiología vegetal, instituto de investigación biológica “Sinisa Stankovic”, Universidad de Belgrado; trabajando así con las siguientes bacterias Gram positivas, Gram negativas y hongos:

Bacterias Gram positivas: *Bacillus cereus* (aislado de alimentos), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) y *Listeria monocytogenes* (NCTC 7973).

Bacterias Gram negativas: *Escherichia coli* (ATCC 35210), *Enterobacter cloacae* (aislado humano) y *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311).

Hongos: *Aspergillus fumigatus* (ATCC 1022), *Aspergillus versicolor* (ATCC 11730), *Aspergillus niger* (ATCC 6275), *Penicillium funiculosum* (ATCC 36839), *Penicillium ochrochloron* (ATCC 9112) y *Trichoderma viride* (IAM 5061).

Para la actividad antibacteriana, los cultivos frescos de bacterias se ajustaron mediante espectrofotometría a una concentración de 1×10^5 CFU/mL. Las CFU/mL solicitadas correspondieron a una suspensión bacteriana determinada en un espectrofotómetro a 625nm (DO625). Se cultivaron diferentes diluciones del inóculo en un medio sólido para comprobar la ausencia de contaminación y la validez de este. Luego, en todos los pozos de las microplacas se adicionaron 100 μL de medio digerido de soja (TSB) y 10 μL de inóculo, posteriormente se incubaron durante 24 horas a 37 °C. Terminado esto, se adicionó 40 μL de idonitrotetrazolio colorido (INT) (0,2 mg/mL) y se volvió a incubar a 37 °C durante 30 min antes de realizar la respectiva lectura.

Los resultados fueron dados según la concentración mínima de inhibición (alrededor del 50%) del crecimiento de las bacterias, realizando una comparación con el control positivo, determinando así el respectivo CMI (concentración mínima inhibitoria). Todas las muestras



analizadas, se determinaron por el método colorimétrico microbiano de viabilidad, basado en la reducción del color del INT, y comparado con un control positivo (estreptomina y ampicilina) para cada una de las bacterias (Soković, Glamočlija, Marin, Brkić, & Van Griensven, 2010).

En cuanto a la actividad antifúngica, los hongos se mantuvieron en agar extracto de malta (MA) y los cultivos se almacenaron a 4 °C, subcultivándose una vez al mes. Las esporas de los hongos se lavaron de la superficie de placas de agar con solución salina estéril al 0,85% que contenía Tween 80 al 0,1% (v/v) y se ajustaron a una concentración de aproximadamente $1,0 \times 10^5$ en un volumen final de 100 μ L/pozo. Los inóculos se almacenaron a 4 °C para su uso posterior. Las diluciones de los inóculos se cultivaron en MA sólido para verificar la ausencia de contaminación y la validez del inóculo. La determinación de CMI se realizó mediante una técnica de dilución en serie utilizando microplacas de 96 pozos. Las soluciones de las muestras se añadieron al MA que contenía el inóculo fúngico. Las microplacas se incubaron durante 72 h a 28 °C. Las concentraciones más bajas sin crecimiento visible (usando un microscopio binocular) se definieron como CMI (Soković & Van Griensven, 2006).

3.4.3. Citotoxicidad en células no tumorales

Se evaluó la hepatotoxicidad con una cultura primaria de células hepáticas no tumorales mediante el método de solforrodamina B (SRB) (Abreu et al., 2011). Los resultados fueron expresados en GI_{50} (μ g/mL), lo cual corresponde a la concentración de extracto que inhibe el 50% de la proliferación celular.

Este ensayo se llevó a cabo con una cultura primaria de hígado de cerdo (PLP2); su tratamiento comenzó con un lavado con HBSS, una solución salina que contiene penicilina (100 U/mL) y estreptomina (100 μ g/mL), posteriormente se dividió en frascos para tejidos de 25 cm² en medio DMEM suplementado con FBS (10%), aminoácidos no esenciales (2 mM), penicilina (100 U/mL) y estreptomina (100 μ g/mL). Estos frascos fueron incubados a 37°C con atmosfera húmeda y 5% de CO₂. El crecimiento celular fue monitorizado con la ayuda de un microscopio de contraste de fase (TS100, Nikon) y cada dos días de incubación fue sustituido en medio.

Luego de verificar que se tenga una cantidad suficiente de células para realizar este ensayo, se adicionó tripsina (enzima proteolítica) para garantizar el desprendimiento y desaglomeración



celular que se presentaba en los frascos, se observó cada 5 min para garantizar el desprendimiento de estas, después se añadieron 3mL de medio de cultura para inactivar la tripsina y evitar la destrucción celular, enseguida se centrifugó (5 min, 1200 rpm), recolectó y resuspendió en 5mL de medio de cultura RPMI. De la suspensión resultante se retiraron 50 μ L y se homogenizaron junto con otros 50 μ L de solución de azul de tripano para realizar el conteo de células en una cámara de Neubauer, donde la porción de células muertas debe ser inferior al 5%; con esta cuantificación se determinó y adicionó la cantidad de suspensión celular necesaria para llegar a 1.0×10^4 células/ pozo en la microplaca y se dejó por 24 h para garantizar su adhesión; al pasar este tiempo se adicionaron cada una de las muestras a probar y se incubaron a 37 °C por 48 h.

Después las células se fijaron añadiendo 100 μ L de ácido tricloroacético frío al 10% y se dejaron nuevamente en incubación durante 1 hora a 4 °C, luego se lavó la microplaca con agua desionizada y se secó con aire, se añadieron 100 μ L de solución de SRB (0,1 % en ácido acético al 1%) en cada pozo y se dejó a temperatura ambiente durante 30 minutos; después, se lavó la microplaca con ácido acético (1 %) para remover el exceso de SRB y se dejó secar. La SRB ligada se solubilizó en 200 μ L de Tris-HCl (10 mM; pH 7,4) con un agitador de microplacas (Stat Fax-2100, Awareness Technologies, Westport). Todo el procedimiento se realizó en condiciones de asepsia en una cabina de flujo laminar (AV-30/70, Telstar), evitando así posibles contaminaciones y alteraciones de los resultados.

Por último, se midió la absorbancia a 540 nm teniendo como control positivo la elipticina, este proceso se llevó a cabo en un lector de microplacas (ELX800, Bio-Tek Instruments, Winooski). Los resultados fueron expresados en GI_{50} (μ g/mL), es decir, concentración de extracto que inhibe el 50 % del crecimiento celular.

3.5.Preparación de los extractos colorantes

Se realizaron extractos concentrados en agua de *Morus nigra* L. y *Rubus fruticosus* L. con una licuadora, posteriormente se centrifugaron, se filtraron a vacío con papel filtro Whatman No. 4 y se liofilizaron. El extracto liofilizado de cada uno de los frutos se disolvió en agua a una concentración 100 mg/mL, a esta solución se le adicionó ácido cítrico (0.1 M) para asegurar un pH cercano a 3 y luego se dividió en bolsas herméticas con resistencia a cambios de temperatura de 200 mL para el proceso de pasteurización.



3.6. Evaluación preliminar de las condiciones de pasteurización

De acuerdo con la Food and Drug Administration, los zumos de frutos son susceptibles a la contaminación por algunos microorganismos, por lo tanto, requieren ser sometidos a un proceso de descontaminación que pueda causar que se reduzca por un factor de cien mil la carga microbiana.

3.6.1. Proceso de contaminación

Para verificar la eficacia del proceso de pasteurización en la reducción de la cantidad de estos contaminantes, se prepararon zumos mediante el proceso descrito en el **apartado 3.5** y antes del proceso de pasteurización se contaminaron con: *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Aspergillus parasiticus*, and *Zygosaccharomyces rouxii*. Estos microorganismos se seleccionaron de acuerdo con su prevalencia en este tipo de productos; también se incluyó un control sin contaminar.

Para la preparación del pre-inóculo, se suspendieron células los microorganismos *E. coli*, *B. cereus* y *Z. rouxii* de cultivos de 1 día en caldo de soja tríptico (TBS) y se incubaron a 36 °C por 24 h; luego se determinó la densidad óptica usando un densitómetro Den-1B (Biosan Latvia) y se ajustó la densidad óptica a 1×10^9 células/mL. El pre-inóculo fúngico fue preparado por inoculación en extracto de malta de agar (MEA) y se incubó por 7 días a 25 °C en la oscuridad. Posterior a la incubación, se adicionaron al cultivo 2 mL de solución de Tween 80 (0,05%) y se lavaron las esporas para obtener una suspensión, esta suspensión de esporas fue ajustada a 10^9 esporas /mL con una cámara de recuento de Neubauer. Las muestras fueron contaminadas aproximadamente con 10^6 células /mL de cada microorganismo, y el número viable de células fue confirmado por la técnica de recuento de placa. Posteriormente estas muestras se sometieron al proceso de pasteurización como el descrito en el **apartado 3.6.2.** y fueron analizadas para verificar la eficacia de este proceso.

3.6.2. Pasteurización

Las bolsas plásticas de cierre hermético con resistencia al calor, con los diferentes extractos de los dos frutos en su interior (**Figura 8**), se llevaron a un baño termostático a 97 °C controlando que la temperatura interior de los zumos llegara a 90 °C, donde se mantuvo durante 1 minuto e



inmediatamente después las bolsas se llevaron a un baño de hielo hasta que los zumos llegaron a una temperatura de 3 °C; garantizando así la inocuidad de los zumos sin llegar a generar una degradación de las antocianinas presentes en cada fruto.

En el caso de las muestras que habían sido contaminadas, se les realizó una evaluación de la carga microbiana luego de la pasteurización, los otros zumos se sometieron a procesos de pasteurización y estabilización por gelificación térmica y *spray drying* y por último se evaluó la carga microbiana.



Figura 8. Muestra preparada para pasteurización.

3.6.3. Evaluación de la carga microbiana

Luego de la pasteurización se tomaron 5 mL de cada uno de los zumos y se les adicionó 45 mL de agua peptonada, obteniendo una suspensión 10^1 con la cual se prepararon diluciones en serie desde la suspensión inicial hasta llegar a 10^{-6} ; en el caso de las muestras de *spray drying*, se tomó 1 g de muestra y se le adicionaron 9 mL de agua peptonada, obteniendo una suspensión 10^1 . Con estas soluciones se realizó:

Conteo aeróbico de placas (conteo totalmente viable; ISO 4833-2:2013).

Las diluciones fueron inoculadas en PCA (*plate count agar*) por la técnica de vertido en placa, y en duplicado. Se adicionó 1 mL de suspensión a la placa y 15 mL de PCA líquido (Mantenido a 50 °C en un baño de agua o un incubador); esto se homogenizó y se dejó solidificar, luego fue encubado a 30 °C por 72 h en posición invertida. Por último, en las placas que presentaron entre 15 y 300 colonias se realizó el recuento.

Culiformes (y E. coli; ISO 4832:2006)

Las diluciones se inocularon en medio VRLA (*violet red bile lactose agar*) por la técnica de vertido en placa, por duplicado. Se adicionó 1 mL de suspensión en la placa con 15 mL de



VRBLA líquido (Mantenido a 50 °C en un baño de agua o un incubador); se homogenizó y se dejó solidificar, luego, en la parte superior del medio se agregaron 4 mL de VRBLA y se dejó solidificar; posteriormente se incubó a 30 °C por 48 h en posición inversa. Por último, se realizó un recuento en las placas que contenían entre 10 e 150 colonias.

Levaduras y mohos (ISO 21527-1/2:2008)

Las diluciones fueron inoculadas en DRBC (cloranfenicol de dicloran de rosa de bengala) mediante la técnica de placa de extensión, en duplicado. Se adicionaron 0,2 mL de suspensión y 15 mL de medio a la placa y se esparcieron con un esparcidor desechable. Las placas se incubaron a 25 °C por 5 días en posición vertical. En las placas que contenían menos de 150 colonias se realizó el recuento de levadura y moho por separado después de 2 y 5 días de incubación.

Bacillus cereus (ISO 7932:2004)

Las diluciones se inocularon en medio MYP (manitol, yema de huevo, polimixina) por la técnica de placa de extensión, en duplicado. Se adicionaron 0,2 mL de suspensión en una placa que contenía 15 mL de medio y se extendió con un esparcidor desechable; luego se incubó a 30 °C durante 24-48 h en posición invertida. Por último, se realizó un conteo en las placas que contenían entre 10 y 150 colonias.

3.7. Estabilización

Para estabilizar los zumos colorantes pasteurizados se realizaron dos procesos: *spray drying* mediante el cual se obtuvieron formulaciones sólidas y gelificación térmica obteniéndose formulaciones líquidas.

3.7.1. Spray drying

Las muestras de *Morus nigra* L. y *Rubus fruticosus* L. fueron secadas mediante la técnica *spray drying*, usando 0 %, 20 % de maltodextrina o una combinación de 10 % de maltodextrina y 10 % de goma arábiga (*M. nigra* control, *M. nigra* maltodextrina, *M. nigra* maltodextrina- goma arábiga, *R. fruticosus* control, *R. fruticosus* maltodextrina, *R. fruticosus* maltodextrina- goma arábiga) como adyuvantes de secado, se analizó la eficiencia del proceso de aspersion y la pertinencia del uso de estos adyuvantes. El porcentaje trabajado (20 %) fue relativo al



contenido sólido de la muestra analizada y fue seleccionado después de un proceso de optimización al probar con diferentes concentraciones de adyuvantes, obteniéndose el mejor rendimiento con 20 % de adyuvantes. Estas soluciones fueron preparadas inmediatamente después de la atomización, donde las muestras fueron mezcladas con el adyuvante de secado y se dejaron homogenizar mediante agitación por 10 minutos a temperatura ambiente. El equipo usado fue un Mini Spray Dryer B-290 Büchi (Flawil, Switzerland), configurado en modo de operación normal (diámetro de la boquilla: 0,7 mm; volumen atomizado: 200 mL, contenido de sólidos <33 %). Las condiciones de operación fueron: temperatura de entrada de 140 °C, temperatura de salida de 72 °C, aspiración 90 % y bomba 20 % (6 mL/min). Las muestras recogidas secas (**Figura 9**) se mantuvieron en matraces estériles protegidos de la luz (4 °C) hasta su posterior análisis. El rendimiento global se estimó como la relación entre el peso del polvo recuperado (base seca) y el peso de la solución atomizada (base seca) (Moser, Souza, & Nicoletti Telis, 2017).



Figura 9. Formulaciones de *Morus nigra* L. mediante spray drying.

3.7.2. Gelificación térmica

Para este proceso se tomaron 240 mL de zumo pasteurizado de cada fruto y se dividieron en 3 partes iguales, donde a los primeros 80 mL se le adicionó 1,5 % de pectina citrus, a los segundos 0,15 % de goma adraganta y la última fracción fue el control, a la cual no se le realizó ninguna adición de estabilizantes. Los tres preparados se homogenizaron hasta la disolución total de los agentes encapsulantes en el sumo y posteriormente se llevaron a calentamiento con agitación constante, hasta alcanzar una temperatura de 85 °C; luego de cada formulación se extrajo una parte para diferentes análisis en el tiempo 0 y el restante se dividió en dos fracciones almacenando una en frío y la otra a temperatura ambiente (**Figura 10**).



Figura 10. Formulaciones líquidas de *Morus nigra* L. y *Rubus fruticosus* L. obtenidas mediante gelificación térmica

3.8. Evaluación de la estabilidad de las diferentes formulaciones colorantes

3.8.1. Medida de color

A cada una de las formulaciones tanto líquidas como sólidas de cada uno de los frutos se le realizó una medida de color cada 30 días mediante el uso de un colorímetro (modelo CR-400, Konica Minolta Sensing Inc.) (**Figura 11**), usando el iluminador C y una abertura del diafragma de 8mm; las calibraciones se hicieron con azulejo blanco al comienzo de las mediciones; posteriormente los valores obtenidos de CIE L* (luminosidad), a* (verde/rojo) y b* (azul/amarillo) se trataron en el software “Spectra Magic Nx” (versión CM- S100W 2.03.0006).



Figura 11. Medida de color

3.8.2. Control de la composición antocianica

Se realizaron análisis de HPLC de las preparaciones colorantes tanto líquidas (gelificación térmica) como sólidas (spray drying) de los dos frutos en el tiempo 0 y cada mes durante tres meses. Para esto las formulaciones líquidas fueron filtradas (1 mL) a un vial y las sólidas (100



mg) fueron disueltas en etanol:agua (80:20, v/v; 1 mL), luego se filtró a un vial; y posteriormente se realizó el mismo proceso descrito en el **apartado 3.3.4**

3.8.3. Control de la carga microbiana

Las diferentes formulaciones líquidas (extracto control, extracto con pectina y extracto con goma) y sólidas (extracto control, extracto con maltodextrina y extracto con mezcla de maltodextrina y goma arábica) realizadas de *Morus nigra* L. y *Rubus fruticosus* L. fueron sometidas a una evaluación de la carga microbiana en el tiempo 0 y en el tiempo final de acuerdo con lo descrito en el **apartado 3.6.3.**, siendo posible así, determinar su inocuidad a través del tiempo.

3.8.4. Control de la citotoxicidad en células no tumorales.

Este ensayo se realizó en los tiempos inicial y final para cada una de las formulaciones líquidas y sólidas realizadas de *Morus nigra* L. y *Rubus fruticosus* L., de acuerdo con lo descrito en el **apartado 3.4.3.**, con lo cual se hace posible verificar la seguridad de las formulaciones, siendo así aptas para su uso alimentar.

3.9. Análisis estadístico

Todos los análisis se realizaron por triplicado y los resultados se presentaron como media \pm desviación estándar. En la composición química se aplicó un teste *t*-student en el programa SPSS v. 20.0.

Para el análisis de la carga microbiana, las pruebas estadísticas se realizaron a un nivel de significancia del 5 % utilizando el software SPSS Statistics (IBM SPSS Statistics para Windows, versión 22.0. Armonk, NY: IBM Corp.). Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) basado en la prueba de Tukey (cuando se verificó la homocedasticidad de las distribuciones) o la prueba de Tamhane T2 (distribuciones heterocedásticas) para clasificar las diferencias estadísticas entre los diferentes parámetros evaluados. El cumplimiento de los requisitos de ANOVA, específicamente la normalidad de la distribución de los resultados y la homogeneidad de las varianzas se verificó mediante una prueba de Shapiro Wilk y una prueba



de Levene, respectivamente, los resultados se trataron con un ANOVA de dos vías, lo que permitió una comprensión individualizada de cada factor

Para el análisis de la variación del color y de la concentración de antocianinas a lo largo del tiempo, se hizo un análisis discriminante lineal (LDA) para caracterizar el efecto de las diferentes formulaciones (líquidas y sólidas) independientemente de los distintos tiempos y temperaturas de almacenamiento. Las variables se seleccionaron secuencialmente (*stepwise*), considerando el teste de Wilks con las probabilidades habituales de F (3,84 para seleccionar y 2,71 para excluir). Este procedimiento se basa en la verificación simultánea de la significancia de todas las variables seleccionadas previamente a la inclusión de una nueva. El objetivo principal fue estimar la relación entre las variables dependientes categóricas (diferentes formulaciones) con las variables cuantitativas independientes (resultados obtenidos para los parámetros colorimétricos y contenido de antocianinas). Para evaluar la adecuación del modelo discriminante, se aplicó un procedimiento de validación cruzada interna. Los testes estadísticos se han aplicado considerando un valor de $\alpha = 0,05$ (95 % de confianza), utilizando el *software* IBM SPSS Statistics for Windows, versión 25.0. (IBM Corp., USA).



4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Determinación de la composición química

4.1.1. Azúcares

En este estudio se encontraron cinco azúcares libres en *Morus nigra* L. y seis en *Rubus fruticosus* L., donde a pesar de que *R. fruticosus* tiene la presencia de un azúcar más que *M. nigra*, esta última es la que presenta una mayor cantidad total de azúcares (449 ± 2 y 373 ± 1 mg/g de extracto). En la **tabla 5** se puede observar que tanto para *M. nigra* como para *R. fruticosus* el azúcar mayoritario fue fructosa (248 ± 2 y 201 ± 1 mg/g de extracto, respectivamente) seguido por glucosa ($229,9 \pm 0,3$ y $163,5 \pm 0,1$ mg/g de extracto, respectivamente) evidenciándose además, que *M. nigra* es la que contiene mayor cantidad de estos; sin embargo, la alta predominancia de fructosa sobre glucosa no es totalmente concordante con lo reportado anteriormente por Gundogdu, et al. en 2011 para *M. nigra*, donde, el azúcar mayoritario fue glucosa ($7,748 \pm 0,002$ g/100g fw) seguido con poca diferencia por fructosa ($5,634 \pm 0,009$ g/100g fw); o con el trabajo publicado por Özgen et al. (2009) en el cual, para diferentes genotipos de moras obtuvo niveles de glucosa entre $3,63 \pm 0,05$ y $7,12 \pm 0,05$ g/100mL y de fructosa entre $4,86 \pm 0,02$ y $6,40 \pm 0,0,9$ g/mL, estando los dos azúcares en cantidades muy similares. Por el lado de *R. fruticosus*, se presenta una concordancia con el estudio realizado por Milivojević et al. (2011) donde se encontraron $64,5 \pm 2,74$ mg/g fw de glucosa y $76,1 \pm 2,18$ mg/g fw de fructosa, confirmando que este último es el mayoritario.

Además de estos dos azúcares principales, tanto en *M. nigra* como en *R. fruticosus*, se tiene la presencia de trazas de rafinosa ($5,085 \pm 0,23$ y $12,14 \pm 0,61$ mg/g de extracto), trealosa ($3,49 \pm 0,184$ y $5,275 \pm 0,12$ mg/g de extracto) y sacarosa ($2,695 \pm 0,077$ y $200,915 \pm 0,99$ mg/g de extracto); y en el caso de *R. fruticosus* se evidenció la presencia de un sexto azúcar sin identificar ($21,045 \pm 0,997$ mg/g de extracto), siendo este el mayoritario entre las trazas. Sin embargo, en estos estudios mencionados, se realizaron extracciones específicas de los frutos liofilizados y no del extracto acuoso de los frutos, como en este trabajo, por lo que los resultados no pueden ser directamente comparados.



Tabla 5. Azúcares libres encontrados en los extractos de los frutos de *Morus nigra* L. y *Rubus fruticosus* L. (mg/ g de extracto).

Azúcares	<i>Morus nigra</i> L.	<i>Rubus fruticosus</i> L.	Valor de <i>p</i> teste <i>t</i> -Student
Fructosa (mg/gE)	248±2	201±1	<0,001
Glucosa (mg/gE)	229,9±0,3	163,5±0,1	<0,001
Sacarosa (mg/gE)	2,70±0,08	3,7±0,2	<0,001
Trealosa (mg/gE)	3,5±0,1	5,3±0,1	<0,001
Rafinosa (mg/gE)	5,1±0,2	12,1±0,6	<0,001
Desconocido (mg/gE)	-	21±1	-
TOTAL	449±2	373±1	<0,001

4.1.2. Tocoferoles

Los tocoferoles son los antioxidantes liposolubles naturales más importantes en el área nutricional; en *M. nigra* se encontraron las cuatro isoformas (**Tabla 6**), siendo α -tocoferol (43±2 mg/g de extracto) la predominante, seguida por γ -tocoferol (12,5±0,2 mg/g de extracto); y en cantidades inferiores, δ -tocoferol (5,5±0,1 mg/g de extracto) y β -tocoferol (1,27±0,03 mg/g de extracto). Por otro lado, en *R. fruticosus* se halló únicamente α -tocoferol, en una cantidad de 6,1 ± 0,1 mg/g de extracto. Al comparar las dos especies, se evidencia que *M. nigra* muestra casi siete veces más contenido en α -tocoferol que *R. fruticosus*, lo que puede justificar el hecho de haber obtenido mejores resultados con *M. nigra* en el ensayo de evaluación antioxidante TBARS.

En el estudio de Wajs-bonikowska et al. en 2017 se hallaron las isoformas α -, γ - y δ -tocoferol en muestras de *R. fruticosus* colectado en Polonia, se compararon tres solventes (CO_2 supercrítico, hexano y etanol) para la extracción de tocoferoles en este fruto, y en los tres casos se obtuvieron cantidades inferiores (0,72 ± 0,06; 0,70 ± 0,05; y 0,51 ± 0,08, respectivamente) de α -tocoferol a las obtenidas en este trabajo, lo que soporta la decisión de realizar un zumo del fruto para su análisis, con el objetivo de obtener mayor cantidad de compuestos bioactivos que en un extracto obtenido a partir de un solvente.



Tabla 6. Tocoferoles encontrados en los extractos liofilizados de los frutos de *Morus nigra* L. y *Rubus fruticosus* L. (mg/ g de extracto).

Tocoferoles	<i>Morus nigra</i> L.	<i>Rubus fruticosus</i> L.	Valor de <i>p</i> teste <i>t</i> -Student
α -Tocoferol	43 \pm 2	6,1 \pm 0,1	<0,001
β -Tocoferol	1,27 \pm 0,03	-	-
γ -Tocoferol	12,5 \pm 0,2	-	-
δ -Tocoferol	5,5 \pm 0,1	-	-
TOTAL	62 \pm 2	6,1 \pm 0,1	<0,001

4.1.3. Ácidos orgánicos

Los ácidos orgánicos son compuestos que generan una gran influencia en las propiedades organolépticas de los frutos y pueden ayudar a la preservación de su valor nutricional, siendo altamente usados en la industria alimentaria ya sea como antioxidantes, acidulantes o preservantes dependiendo de su naturaleza (Koyuncu, 2004). En este estudio se encontraron altas cantidades de ácido málico acompañado por la presencia de ácido oxálico (**Tabla 7**), siendo estos ácidos, mayores en *M. nigra* (146,9 \pm 0,6 y 14,91 \pm 0,09 mg/ g de extracto respectivamente) que en *R. fruticosus* (101,9 \pm 0,2 y 5,52 \pm 0,02 mg/ g de extracto).

Estos resultados de ácido málico en *M. nigra* son concordantes con los presentados por Koyuncu (2004) en donde, al evaluar diferentes genotipos de moras negras reportó niveles entre 35,40 y 198,50 mg/g para este, sin embargo, para el ácido oxálico el valor máximo reportado en dicho estudio fue de 1,176 mg/ g de extracto, el cual está por debajo de los niveles encontrados en este trabajo.

Tabla 7. Ácidos orgánicos encontrados en los extractos liofilizados de los frutos de *Morus nigra* L. y *Rubus fruticosus* L. (mg/ g de extracto).

Ac. Orgánicos	<i>Morus nigra</i> L.	<i>Rubus fruticosus</i> L.	Valor de <i>p</i> teste <i>t</i> -Student
Oxálico	14,91 \pm 0,09	5,52 \pm 0,02	<0,001
Málico	146,9 \pm 0,6	101,9 \pm 0,2	<0,001
TOTAL	161,8 \pm 0,6	107,3 \pm 0,2	<0,001

Por otro lado Kafkas et al. (2006) reportaron valores entre 0,6 \pm 0,7 mg/g extracto y 11,0 \pm 2,7 mg/g extracto de ácido málico para diferentes moras de la familia *Rubus*, confirmando la prevalencia de este frente a los demás ácidos, como el ácido ascórbico el cual en algunas muestra no se evidenció. Por otro lado, en este mismo estudio reportaron una ausencia de ácido cítrico, el cual tampoco fue encontrado en *M. nigra* ni *R. fruticosus*, la cual posiblemente se



generó al analizar el extracto disuelto en agua y no realizar una extracción con ácido metafosfórico para la obtención de ácidos orgánicos.

Es importante destacar que los valores de la composición química de estos frutos se ven alterados por diferentes factores como lo son el lugar de cultivo, temperatura, humedad, tierra, método y tiempo de recolecta, método de almacenamiento, tratamiento de la muestra, entre otros (Milivojević et al., 2011). Además de esto, se debe tener en cuenta que en este estudio se trabajó con el zumo liofilizado del fruto y en la mayoría de los casos no se realizó ningún tipo de extracción para la obtención de un compuesto específico y que los datos se expresaron en mg/g de extracto; todas estas variables hacen que estos valores no sean comparables directamente con la mayoría de los estudios disponibles hasta el momento.

4.1.4. Composición antociánica

Las antocianinas son pigmentos naturales que pueden variar desde tonalidades azules hasta rojas, los cuales actualmente están siendo muy usados por la industria no solo por la buena coloración que genera sino también por presentar diversas propiedades bioactivas.

La tentativa de identificación de las antocianinas mediante análisis por UPLC-DAD-ESI/MS en *Morus nigra* L. y *Rubus fruticosus* L., tuvieron por base los tiempos de retención (Tr), longitudes de onda de absorción máxima de la región de UV-Vis (λ_{\max}), ión pseudomolecular ($[M+H]^+$) e fragmentación del ion molecular (MS^2), siendo que, siempre que fuera posible, se compararon con patrones disponibles o literatura.

En el extracto de zumo de *M. nigra* se lograron identificar 2 antocianinas (**Tabla 8**), la **Figura 12** presenta el perfil cromatográfico de los compuestos antociánicos detectados. El compuesto 1 (cianidina-3-*O*-glucosa) fue identificado positivamente en comparación con las características cromatográficas y de MS relativamente al patrón comercial. El compuesto 2 ($[M+H]^+$ a m/z 595) presentó dos fragmentos MS^2 revelando dos pérdidas de una unidad de ramnosa y otra de hexosa (m/z a 287; -146 u + -162 u, respectivamente), por tanto, se identificó como cianidina-*O*-ramnosa-*O*-hexosa.

Estas antocianinas, especialmente la primera, es muy característica por estar presente en altas cantidades en este tipo de frutos, por ejemplo, en 2008 Pawlowska et al., registró una cantidad de 17,9 mg/10 g de fruto fresco.



Tabla 8. Tentativa de identificación de antocianinas con su determinado tiempo de retención (TR), longitud de onda máxima (λ_{\max}) e información de los espectros de masa en el extracto de *Morus nigra* L.

Pico	TR (min)	λ_{\max} (nm)	[M-H] ⁻ (m/z)	Fragmentos mayoritarios MS ² (m/z)	Tentativa de antocianina
1	19,47	515	449	287(100)	Cianidina-3- <i>O</i> -glucosa
2	20,08	512	595	449(30),287(100)	Cianidina- <i>O</i> -ramnosa- <i>O</i> -hexosa

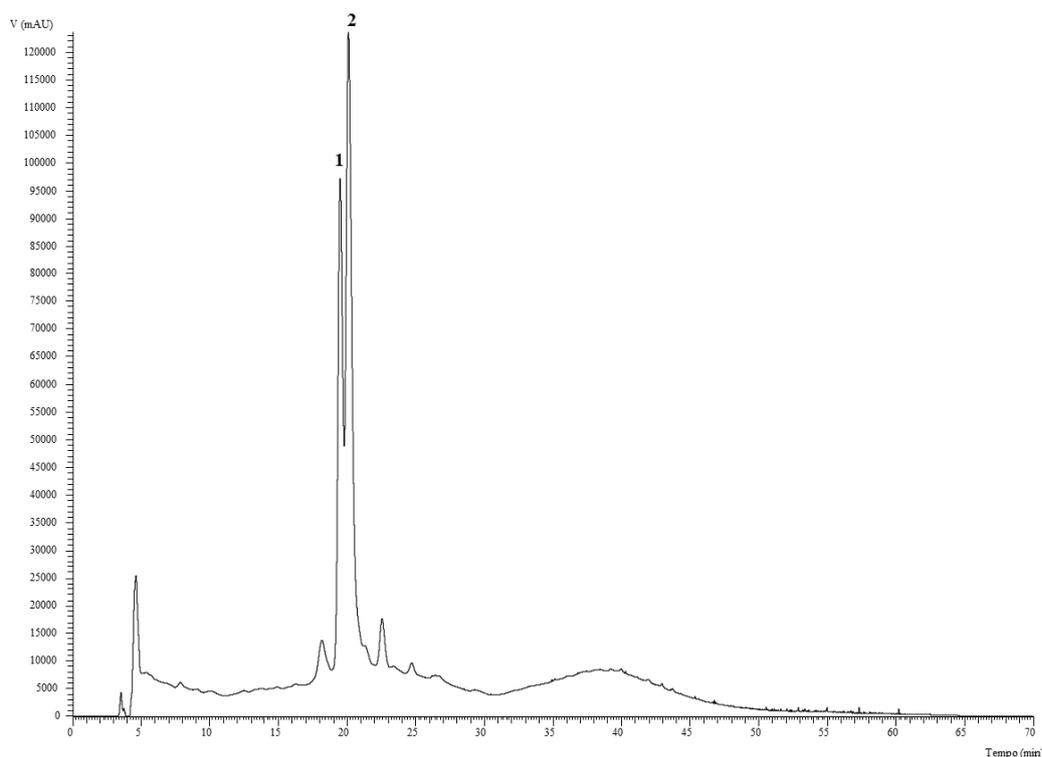


Figura 12. Representación del perfil cromatográfico de antocianinas del extracto de *Morus nigra* L. obtenido por HPLC-DAD a 520 nm.

Al realizar el análisis cromatográfico de *Rubus fruticosus* L. se logró evidenciar la presencia de 4 antocianinas (**Tabla 9**), siendo todas identificadas como derivados glicósidos de cianidina. La **Figura 13** presenta el perfil cromatográfico de las antocianinas presentes en este fruto. El compuesto 2 (cianidina-3-*O*-glucosa) fue positivamente identificado comparativamente con el patrón comercial. El compuesto 1 ([M+H]⁺ a m/z 449) presentó el mismo ion pseudomolecular que el compuesto 2, con una pérdida de una hexosa (-162 u). En este caso no fue posible identificar la posición y la naturaleza de la porción de la hexosa, porque los tiempos de retención del pico no corresponde a ninguna de los padrones disponibles. El compuesto 3



($[M+H]^+$ a m/z 419) perdió -132, correspondiente a una pentosa, siendo este compuesto tentativamente identificado como cianidina-*O*-pentosa. El compuesto 4 ($[M+H]^+$ a m/z 593) fue identificado como cianidina-3-*O*-dioxaloilglucosa teniendo en consideración lo descrito en la literatura, pues este compuesto es encontrado en muchos frutos (X. Wu & Prior, 2005; Zhao, 2007).

Tabla 9. Tentativa de identificación de antocianinas con su determinado tiempo de retención (TR), longitud de onda máxima (λ_{\max}) e información de los espectros de masa en el extracto de *Rubus fruticosus* L.

Pico	TR (min)	λ_{\max} (nm)	$[M-H]^-$ (m/z)	Fragmentos mayoritarios MS ² (m/z)	Tentativa de antocianina
1	16,69	518	449	287(100)	Cianidina- <i>O</i> -hexosa
2	19,55	518	449	287(100)	Cianidina-3- <i>O</i> -glucosa
3	24,01	517	419	287(100)	Cianidina- <i>O</i> -pentosa
4	30,14	519	593	287(100)	Cianidina-3- <i>O</i> -dioxaloilglucosa

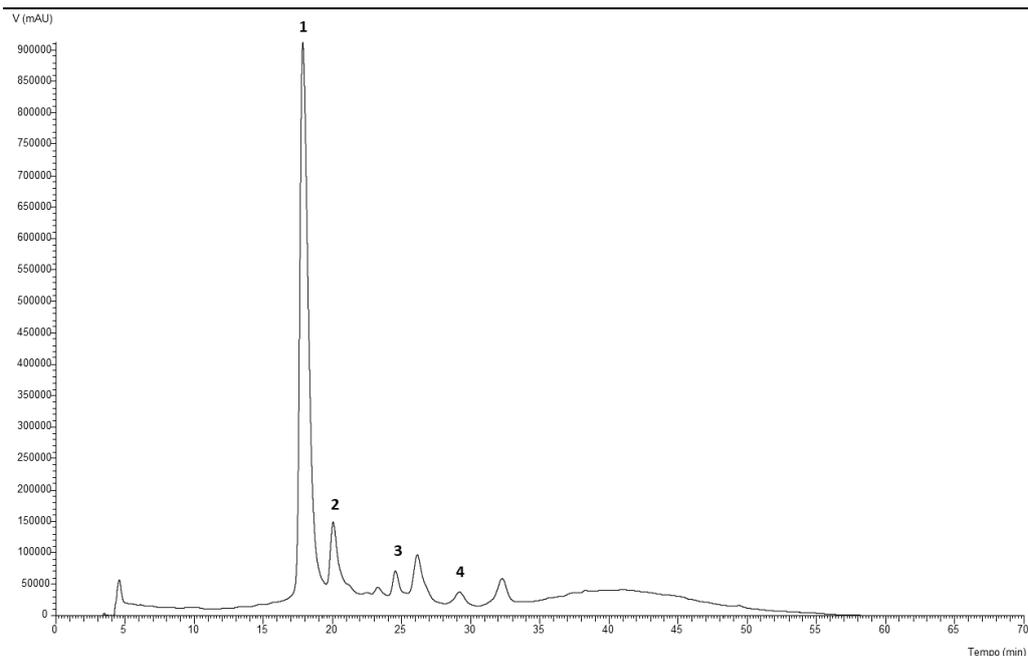


Figura 13. Representación del perfil cromatográfico de antocianinas del extracto de *Rubus fruticosus* L. obtenido por HPLC-DAD a 520 nm.

Se evidencia que en los dos frutos se tiene la presencia de cianidina-3-*O*-glucosa, la cual es característica en las moras; además de encontrar diferentes derivados de cianidina. La presencia y variedad de estas antocianinas, además de proporcionar una alta capacidad antioxidante,



también confiere propiedades anticancerígenas, antitumorales, antiinflamatorias y antidiabéticas.

4.2. Evaluación de propiedades bioactivas

4.2.1. Evaluación de actividad antioxidante

Durante el proceso de fabricación de un alimento, es necesario controlar las diferentes variables que puede ocasionar el deterioro de este. Una de estas variables es la oxidación la cual puede ocasionar sabores desagradables, así como la pérdida de aminoácidos esenciales, vitaminas liposolubles y otras biomoléculas. Por otro lado, cuando esta oxidación ocurre en el cuerpo humano, se dan efectos destructivos que originan enfermedades y afecciones en la salud como inflamación, aterosclerosis o envejecimiento. Esto hace que en cualquier estudio alimentario se realicen ensayos de capacidad antioxidante con el fin de evitar lo anteriormente mencionado y por el contrario buscar alternativas que eviten dicha oxidación (Zhong & Shahidi, 2015)

Por tanto, se realizó el análisis de la capacidad antioxidante en los frutos de *Morus nigra* L. y *Rubus fruticosus* L. y de cada una de las preparaciones, así como de los extractos, por medio de los ensayos OxHLIA y TBARS registrándose los datos de IC₅₀ en la **Tabla 10** para *M. nigra* y en la **Tabla 11** para *R. fruticosus*. Al observar los extractos de los dos frutos se evidencia que estos presentan capacidad antioxidante, así *M. nigra* mostró en el ensayo de TBARS una mayor capacidad con respecto a *R. fruticosus* y los dos frutos, mayores actividades con respecto al control positivo Trolox, que presenta un IC₅₀ de 139±5 µg/mL; ya que solo se necesita 39±2 µg/mL del primer fruto para inhibir el 50% de la peroxidación lipídica, a diferencia del segundo fruto que necesita una cantidad superior (100±2 µg/mL)

En el caso del ensayo OxHLIA, ninguno de los dos frutos logró superar el IC₅₀ mostrado por el control (85±2 µg/mL para 60 min y 183±4 µg/mL para 120 min); sin embargo, *R. fruticosus*, presentó una capacidad antioxidante cercana a la del control, puesto que solo se necesita 120±7 µg/mL para retardar el 50% de la hemólisis de eritrocitos en 60 min y 215±3 µg/mL en 120 min, siendo estos valores menores de la mitad del IC₅₀ presentado por *Morus nigra* L. (253±10 µg/mL para 60 min y 569±14 µg/mL para 120 min).



Tabla 10. Actividad antioxidante del extracto y las formulaciones colorantes de *Morus nigra* L.

			OXHLIA IC ₅₀ , µg/mL		TBARS IC ₅₀ , µg/mL
			60 min	120 min	
Extracto			253±10b	569±14b	39±2c
Formulaciones colorantes	Líquidas	Control	99±4f	414±8d	64±3c
		Pectina	203±10c	515±9c	84,1±0,5b
		Goma	348±9a	693±7a	83±2b
	Sólidas	Control	166±5a	324±17e	55,6±0,4d
		Maltodextrina	124±5d	286±10f	51±1d
		Maltodextrina+Goma	108±5e	296±11f	52±2d
Trolox			85±2g	183±4g	139±5a

En el caso de la técnica TBARS con *Morus nigra* L. (**Tabla 10**), se evidencia que el control presenta una mejor capacidad de inhibir la peroxidación lipídica (IC₅₀, 64±3 µg/mL) seguida por las formulaciones con goma (IC₅₀, 83±2 µg/mL) y pectina (IC₅₀, 84,1±0,5 µg/mL), las cuales presentan valores de IC₅₀ muy cercanos entre sí.

En el caso de las formulaciones realizadas mediante spray drying con *M. nigra* se observa que las dos formulaciones preparadas mejoraron la capacidad antioxidante en relación al control, donde el extracto con mezcla de maltodextrina y goma arábica presento los mejores resultados al solo necesitar 108±5 µg/mL para retardar la hemólisis de eritrocitos por una hora, sin embargo a las dos horas (IC₅₀, 296±11 µg/mL) presenta mejor actividad el extracto con maltodextrina (IC₅₀, 286±10 µg/mL), además en los tres casos se obtuvieron IC₅₀ menores que para el extracto. En TBARS el polvo con maltodextrina es el que presenta mejor actividad (IC₅₀, 286±10 µg/mL aunque no está muy alejado de los valores obtenidos con el control (IC₅₀, 55,6±0,4 µg/mL) y con mezcla de maltodextrina y goma arábica (IC₅₀, 52±2 µg/mL).

Tabla 11. Actividad antioxidante del extracto y las formulaciones colorantes de y *Rubus fruticosus* L.

			OXHLIA IC ₅₀ , µg/mL		TBARS IC ₅₀ , µg/mL
			60 min	120 min	
Extracto			120±7a	215±3c	100±2b
Formulaciones colorantes	Líquidas	Control	94±5c	275±8a	78±1e
		Pectina	65±3e	273±9a	89±1d
		Goma	55±3e	258±10b	88±1d
	Sólidas	Control	81±3d	194±6d	78,4±0,8e
		Maltodextrina	108±5b	250±4b	101±2b
		Maltodextrina+Goma	106±5bc	248±5b	94,9±0,2c
Trolox			85±2d	183±4d	139±5a



En el caso de las actividades de *Rubus fruticosus* L. (**Tabla 11**), se observa que, en las dos técnicas trabajadas, todos los preparados presentan mejor capacidad oxidante que la mostrada por el extracto, y específicamente en TBARS todas las formulaciones presentan un IC_{50} para la inhibición de la peroxidación lipídica menor a la expuesta por el control trolox. En las formulaciones preparadas mediante gelificación térmica, se observa que en la técnica TBARS el mejor antioxidante fue el control (IC_{50} , $78 \pm 1 \mu\text{g/mL}$), el cual no presenta una gran diferencia con los preparados con goma (IC_{50} , $88 \pm 1 \mu\text{g/mL}$) y pectina (IC_{50} , $89 \pm 1 \mu\text{g/mL}$). Respecto a OxHLIA, el extracto con goma fue el mejor para reducir en 50% la hemólisis de eritrocitos por 1 hora (IC_{50} , $81 \pm 3 \mu\text{g/mL}$), sin embargo, a las 2 horas presenta mejor actividad el extracto con pectina (IC_{50} , $273 \pm 9 \mu\text{g/mL}$).

En las formulaciones sólidas de *R. fruticosus*, se evidencia que el control (IC_{50} , $78,4 \pm 0,8 \mu\text{g/mL}$) es el que presenta mejor capacidad de inhibición de la peroxidación lipídica seguido por el extracto con mezcla de maltodextrina y goma arábiga (IC_{50} , $94,9 \pm 0,2 \mu\text{g/mL}$) y el extracto con maltodextrina (IC_{50} , $101 \pm 2 \mu\text{g/mL}$), siendo que no se presentan diferencias muy grandes entre las tres formulaciones, además se puede observar que este mismo patrón se evidencia en el ensayo de OxHLIA para los dos tiempos estudiados.

El fenómeno observado en las formulaciones líquidas de *M. nigra* y en las formulaciones sólidas de *R. fruticosus*, donde los controles presentaron una mejor capacidad antioxidante que los dos preparados microencapsulados, podría ser debido a que en estos últimos no se presentó una liberación total de las moléculas bioactivas de los agentes encapsulantes, por tanto, se hace necesario una mayor cantidad de muestra para lograr inhibir el 50 % de la peroxidación lipídica.

4.2.2. Evaluación de actividad antibacteriana

En la industria alimentaria se tiene una búsqueda constante de productos que contribuyan a la salud del consumidor, y que tengan una alta aceptación por parte de este, el cual quiere que sea mínimamente tratado y preferiblemente con el uso de aditivos naturales. Por tanto, la evaluación de la capacidad antimicrobiana de un producto ayuda a conocer que aditivos se pueden utilizar, con el fin de prolongar la vida útil, evitando su degradación al inhibir bacterias y hongos que son malos para la salud aportando una seguridad al consumidor. Esta propiedad es atribuida en su mayoría, a los compuestos fenólicos presentes en los extractos o aceites esenciales de plantas. Debido a esto, se analizó la capacidad antimicrobiana en los frutos de



Morus nigra L. y *Rubus fruticosus* L. utilizando tres bacterias gram positivas, tres bacterias gram negativas y 6 hongos de importancia en el área de la salud. Los datos obtenidos se expresaron en concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) o concentración mínima fungicida (CMF) según corresponda.

Actividad antibacteriana de los extractos

Al evaluar la actividad antibacteriana en los extractos liofilizados de *Morus nigra* L. y *Rubus fruticosus* L., consignados en la **Tabla 12**, se evidencia que ambos frutos presentan dicha actividad en todas las bacterias gram positivas y gram negativas trabajadas en este ensayo, mostrando concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) y concentraciones mínimas bactericidas (CMB) muy similares, siendo todas estas, mayores a las concentraciones determinadas en los controles positivos. Entre las bacterias gram positivas, *M. nigra* y *R. fruticosus*, evidenciaron un mejor efecto en *Bacillus cereus*, tanto en las concentraciones mínimas necesarias para inhibir el crecimiento (5,01 y 5,03 mg/mL, respectivamente) como en las concentraciones mínimas necesarias para tener un efecto bactericida (10,02 y 10,06 mg/mL, respectivamente).

Escherichia coli fue la bacteria perteneciente a las gram negativas, en la que se evidenció mejor actividad inhibitoria por parte de los dos frutos presentando CMI similares (2,50 mg/ml), sin embargo, *M. nigra* presenta mejor capacidad bactericida (CMB: 5,01 mg/mL) que *R. fruticosus* (CMB: 2,51 mg/mL).



Tabla 12. Actividad antibacteriana de los extractos liofilizados de los frutos de *Morus nigra* L. y *Rubus fruticosus* L.

	<i>Morus nigra</i> L.		<i>Rubus fruticosus</i> L.		Estreptomycina		Ampicilina		
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	
Bacterias Gram positivas									
<i>Bacillus cereus</i>	5,01	10,02	5,03	10,06	0,10	0,20	0,25	0,40	
<i>Staphylococcus aureus</i>	20,04	20,04	13,41	20,12	0,04	0,10	0,25	0,45	
<i>Listeria monocytogenes</i>	10,02	20,04	10,06	20,12	0,20	0,30	0,40	0,50	
Bacterias Gram negativas									
<i>Escherichia coli</i>	2,50	5,01	2,51	2,51	0,20	0,30	0,40	0,50	
<i>Enterobacter cloacae</i>	10,02	20,04	13,41	20,12	0,20	0,30	0,25	0,50	
<i>Salmonella Typhimurium</i>	10,02	20,04	13,41	20,12	0,20	0,30	0,75	1,20	

Los valores de CMI (Concentración mínima inhibitoria) y CMB (Concentración bactericida) son presentados en mg/mL.

Actividad antibacteriana de las formulaciones líquidas y sólidas de Morus nigra L.

Al analizar la actividad antibacteriana de las diferentes preparaciones sólidas y líquidas de *M. nigra* (**Tabla 13**), se determinó que a pesar de que presentan concentraciones por encima de estreptomycina y ampicilina, todas tienen capacidad inhibitoria y bactericida, evidenciándose que en general las formulaciones sólidas fueron las que necesitaron concentraciones más bajas y por tanto presentaron mejores actividades; más específicamente el control sólido presentó los niveles más bajos de CMI y CMB en la mayoría de las bacterias, con excepción de *E. coli* la cual se inhibió mejor con la formulación líquida control (CMI: 1,25 mg/mL; CMB: 2,51 mg/mL) y *Bacillus cereus* que fue más susceptible a la inhibición con la formulación líquida con goma adraganta (CMI:5 mg/mL); sin embargo las concentraciones necesarias de las preparaciones con maltodextrina y mezcla de maltodextrina y goma arábica no son muy diferente de las obtenidas para el control.

Por el lado de las preparaciones líquidas, la que presentó mejor capacidad antibacteriana fue el control, aunque sin presentar mayores diferencias con las concentraciones obtenidas con el extracto con pectina y el extracto con goma adraganta, a excepción de *Listeria monocytogenes* y *Enterobacter cloacae* donde esta última presentó CMI y CMB del doble de las del control.



Actividad antibacteriana de las formulaciones líquidas y sólidas de Rubus fruticosus L.

Respecto a la actividad antibacteriana de las formulaciones preparadas con *R. fruticosus*, presentados en la **Tabla 14** se puede observar que aunque presentan concentraciones inhibitorias y bactericidas mayores a las del control, todas presentan bioactividad, sin embargo, las formulaciones con mejores resultados fueron las sólidas, especialmente el control con las bacterias gram positivas, excepto con *B. cereus*, la cual, presento mayor inhibición y eliminación con el preparado de extracto con maltodextrina (CMI: 2,51 mg/mL; CMB: 5,02 mg/mL). Para las bacterias gram negativas se obtuvieron mejores resultados con la formulación de extracto con mezcla de maltodextrina y goma arábica, la cual, en la mayoría de los casos, tuvo concentraciones de la mitad de las obtenidas con maltodextrina y el control.

Por el lado de las formulaciones líquidas se observa que las tres presentan prácticamente las mismas concentraciones inhibitorias y bactericidas con todas las bacterias trabajadas, a excepción de *E. coli* la cual tuvo mejores resultados con goma adraganta (CMI: 1,25 mg/mL; CMB: 2,5 mg/mL).



Tabla 13. Actividad antibacteriana de las formulaciones líquidas y sólidas de *Morus nigra* L.

		<i>Bacillus cereus</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Listeria monocytogenes</i>		<i>Escherichia coli</i>		<i>Enterobacter cloacae</i>		<i>Salmonella Typhimurium</i>	
		CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
Formulación líquida	Control	5,03	10,06	10,06	20,12	5,03	10,06	1,25	2,51	5,03	10,06	10,06	20,12
	Pectina	5,04	10,08	13,44	20,16	13,44	20,16	1,26	2,52	7,56	20,16	7,56	20,16
	Goma	5	10	13,33	20	13,33	20	2,5	5	10	20	10	20
Formulación sólida	Control	6,81	6,81	3,41	6,81	3,41	3,41	3,41	3,41	1,7	1,7	1,7	3,41
	Maltodextrina	8,52	8,52	4,26	8,52	4,26	4,26	4,26	8,52	2,13	2,13	2,13	4,26
	Maltodextrina+goma	8,52	8,52	4,26	8,52	4,26	4,26	4,26	8,52	4,26	4,26	4,26	4,26
	Estreptomicina	0,10	0,20	0,04	0,10	0,20	0,30	0,20	0,30	0,20	0,30	0,20	0,30
	Ampicilina	0,25	0,40	0,25	0,45	0,40	0,50	0,40	0,50	0,25	0,50	0,75	1,20

Los valores de CMI (Concentración mínima inhibitoria) y CMB (Concentración bactericida) son presentados en mg/mL.

Tabla 14. Actividad antibacteriana en zumo control zumo con pectina y zumo con goma adraganta de *Rubus fruticosus* L.

		<i>Bacillus cereus</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Listeria monocytogenes</i>		<i>Escherichia coli</i>		<i>Enterobacter cloacae</i>		<i>Salmonella Typhimurium</i>	
		CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
Formulación líquida	Control	5,03	10,06	10,06	20,12	10,06	20,12	2,515	5,03	10,06	20,12	10,06	20,12
	Pectina	5	10	10	20	10	20	2,5	5	10	20	10	20
	Goma	5	10	10	20	10	20	1,25	2,5	10	20	10	20
Formulación sólida	Control	2,53	5,06	5,06	13,49	5,06	10,12	1,26	2,53	5,06	10,12	5,06	10,12
	Maltodextrina	2,51	5,02	20,08	20,08	10,04	20,08	2,51	5,02	10,04	20,08	10,04	20,08
	Maltodextrina+goma	5,03	10,06	10,06	20,12	10,06	26,83	1,25	2,51	5,03	10,06	5,03	10,06
	Estreptomicina	0,10	0,20	0,04	0,10	0,20	0,30	0,20	0,30	0,20	0,30	0,20	0,30
	Ampicilina	0,25	0,40	0,25	0,45	0,40	0,50	0,40	0,50	0,25	0,50	0,75	1,20

Los valores de CMI (Concentración mínima inhibitoria) y CMB (Concentración bactericida) son presentados en mg/mL.



4.2.3. Evaluación de actividad antifúngica

Se realizaron ensayos para evaluar las capacidades inhibitoria y fungicida de los dos extractos y cada una de las formulaciones, para 6 hongos (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus niger*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium ochrochloron* y *Trichoderma viride*), usando ketoconazol como control positivo de bioactividad, expresando los resultados obtenidos en concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima fungicida (CMF).

Actividad antifúngica de los extractos

En las concentraciones inhibitorias y fungicidas de los extractos liofilizados de *M. nigra* y *R. fruticosus*, consignados en la **Tabla 15**, se evidencia que los extractos presentan actividad inhibitoria en todos los hongos trabajados, a pesar de que presentan concentraciones mayores a las del control positivo, siendo que, para todos estos, los dos frutos presentaron prácticamente la misma concentración necesaria para generar dicha bioactividad, con excepción de *A. versicolor*, para el cual *M. nigra* presenta un CMI de 2,51 mg/mL, el cual es mucho menor al de *R. fruticosus* (CMI: 20,12 mg/mL). Además, *T. viride* fue el hongo mejor inhibido por los dos frutos (CMI: 1,25 mg/mL).

De igual manera, los extractos presentaron concentraciones para acción fungicida muy similares, mostrando efectividad en la mayoría de los hongos a excepción de *A. niger*, en el cual no se generó la eliminación del hongo a la concentración de extracto probada.

Tabla 15. Actividad antifúngica de los extractos liofilizados de los frutos de *Morus nigra* L. y *Rubus fruticosus* L.

	<i>Morus nigra</i> L.		<i>Rubus fruticosus</i> L.		Ketoconazol*	
	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF
<i>Aspergillus flavus</i>	5,01	10,02	5,03	10,06	0,25	0,50
<i>Aspergillus versicolor</i>	2,51	5,01	20,12	>20,12	0,20	0,50
<i>Aspergillus niger</i>	20,04	>20,04	20,12	>20,12	0,20	0,50
<i>Penicillium funiculosum</i>	2,51	5,01	2,52	5,03	0,20	0,50
<i>Penicillium ochrochloron</i>	2,51	5,01	2,52	5,03	1,00	1,50
<i>Trichoderma viride</i>	1,25	2,51	1,26	2,52	1,00	1,50

Los valores de CMI (Concentración mínima inhibitoria) y CMF (Concentración fungicida) son presentados en mg/mL.



Actividad antifúngica de las formulaciones líquidas y sólidas de Morus nigra L.

En la valoración de la capacidad antifúngica de las diferentes formulaciones de *M. nigra* (**Tabla 16**), se evidencia que las formulaciones líquidas son las que presentan una mejor bioactividad, sobre todo la realizada con goma arábica, la cual logro generar actividad con las concentraciones más bajas en 5 de los hongos, e inclusive, con *T. viride* demostró mejores resultados (CMI: 0,56 mg/mL; CMF: 1,25 mg/mL) que los obtenidos con ketoconazol (CMI: 1,00 mg/mL; CMF: 1,25 mg/mL); por su lado, el extracto con pectina aunque no presenta concentraciones tan bajas como goma arábica, presentando actividad con la mayoría de los hongos a excepción de *A. niger*, con el cual no presenta ningún tipo de acción con la concentración máxima trabajada en el ensayo.

Las tres formulaciones sólidas también mostraron bioactividad en la mayoría de los hongos, donde el preparado con maltodextrina y goma arábica fue el más efectivo de estos, sobre todo con *T. viride* y *A. versicolor* (CMI: 4,26 mg/mL; CMF: 8,52 mg/mL) donde presentó los mismos valores entre ellos, y con el preparado con maltodextrina con el último hongo mencionado. Sin embargo, las tres formulaciones sólidas, a la concentración trabajada, no presentaron actividad fungicida para *P. ochrochloron*, y lo mismo sucede para control y maltodextrina con *A. niger*.

Actividad antifúngica de las formulaciones líquidas y sólidas de Rubus fruticosus L.

En un aspecto general, al observar los datos de bioactividad de *R. fruticosus* (**Tabla 17**), se puede decir que la preparación sólida con maltodextrina es la que presenta la mejor capacidad antifúngica, puesto que de todas las preparaciones fue la que presentó las mejores concentraciones inhibitorias y fungicidas para *A. versicolor* (CMI: 1,26 mg/mL; CMF: 2,51 mg/mL), *A. niger* (CMI: 3,77 mg/mL; CMF: 5,02 mg/mL) y *P. ochrochloron*, (CMI: 2,51 mg/mL; CMF: 5,02 mg/mL), sin embargo, las otras dos preparaciones sólidas no presentan datos muy diferentes a estos, siendo que el control presenta los mejores valores de CMI y CMF para *P. funiculosum* (1,27 y 2,53 mg/mL, respectivamente) y *T. viride* (0,91 y 1,27 mg/mL).

Respecto a las formulaciones sólidas, se puede evidenciar que estas también presentan una gran capacidad antifúngica a excepción de el extracto con pectina contra *A. niger*, con la cual no presenta acción fungicida a las concentraciones testeadas; de estas tres, el preparado con goma adraganta fue el que presento los mejores resultados, seguido con valores muy similares por el control.



Tabla 16. Actividad antifúngica en zumo control, zumo con pectina y zumo con goma adraganta de *Morus nigra* L.

		<i>Aspergillus fumigatus</i>		<i>Aspergillus versicolor</i>		<i>Aspergillus niger</i>		<i>Penicillium ochrochloron</i>		<i>Penicillium funiculosum</i>		<i>Trichoderma viride</i>	
		CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF
Formulación líquida	Control	2,51	5,03	1,26	2,51	5,03	10,06	5,03	10,06	2,51	5,03	1,88	2,51
	Pectina	10,08	20,16	5,04	10,08	>20,16	>20,16	7,56	10,08	2,52	5,04	1,26	2,52
	Goma	2,50	5,00	2,50	5,00	5,00	10,00	2,50	5,00	2,50	5,00	0,56	1,25
Formulación sólida	Control	13,63	27,27	6,81	27,27	27,27	>27,27	27,27	>27,27	13,63	27,27	2,13	13,63
	Maltodextrina	17,05	17,05	4,26	8,52	34,09	>34,09	34,09	>34,09	17,05	34,09	2,13	4,26
	Maltodextrina+goma	8,52	17,05	4,26	8,52	17,05	34,09	34,09	>34,09	8,52	34,09	4,26	8,52
	Ketoconazol	0,25	0,50	0,20	0,50	0,20	0,50	1,00	1,50	0,20	0,50	1,00	1,50

Los valores de CMI (Concentración mínima inhibitoria) y CMF (Concentración mínima fungicida) son presentados en mg/mL.

Tabla 17. Actividad antifúngica en zumo control, zumo con pectina y zumo con goma adraganta de *Rubus fruticosus* L.

		<i>Aspergillus fumigatus</i>		<i>Aspergillus versicolor</i>		<i>Aspergillus niger</i>		<i>Penicillium ochrochloron</i>		<i>Penicillium funiculosum</i>		<i>Trichoderma viride</i>	
		CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF
Formulación líquida	Control	2,52	5,03	1,26	2,52	5,03	10,06	3,77	5,03	2,52	5,03	1,26	2,52
	Pectina	20,00	>20,00	2,50	5,00	20,00	>20,00	5,00	10,00	2,50	5,00	0,90	1,25
	Goma	2,50	5,00	2,50	5,00	5,00	10,00	5,00	10,00	2,50	5,00	1,25	2,50
Formulación sólida	Control	2,53	5,06	1,27	2,53	5,06	10,12	5,06	10,12	1,27	2,53	0,91	1,27
	Maltodextrina	2,51	5,02	1,26	2,51	3,77	5,02	2,51	5,02	2,51	5,02	2,51	5,02
	Maltodextrina+goma	5,03	10,06	1,26	2,52	5,03	10,06	5,03	10,06	2,52	5,03	1,26	2,52
	Ketoconazol	0,25	0,50	0,20	0,50	0,20	0,50	1,00	1,50	0,20	0,50	1,00	1,50

Los valores de CMI (Concentración mínima inhibitoria) y CMF (Concentración mínima fungicida) son presentados en mg/mL.



4.3. Determinación de las condiciones de pasteurización

Al trabajar en el área alimentaria, se debe tener en cuenta que la mayoría de los productos presentan una alta posibilidad de estar contaminados con diferentes microorganismos, por lo cual se hace necesario determinar maneras de asegurar su inocuidad. La pasteurización es uno de los procesos más usados para este fin, puesto que mediante el uso de diferentes temperaturas se puede reducir la presencia de agentes patógenos; generando así una esterilización parcial de los alimentos alterando lo menos posible su composición química (Leon & Jaimes Portilla, 2018).

En este trabajo se realizó un estudio preliminar de pasteurización con muestras de *M. nigra*, las cuales fueron contaminadas con 4 microorganismos, evaluando dos temperaturas (80 °C y 90 °C) (**Tabla 18**) para determinar con cuál de estas se lograba la eliminación de estos microorganismos sin generar una pérdida de las antocianinas presentes en el fruto.

Respecto a las muestras contaminadas sin pasteurizar, se evidencia una diferencia entre la contaminación de 10^6 y los recuentos determinados, lo cual puede deberse a desviaciones entre las densidades ópticas y las células viables, que normalmente ocurren cuando las suspensiones se miden por densitometría. Sin embargo, también es importante tener en cuenta que parte de esta reducción se puede deber a las características del colorante como el nivel de acidez necesario para mantener estables las antocianinas o por la actividad antimicrobiana que poseen estas moléculas.

Tabla 18. Recuentos microbianos de las muestras analizadas inoculadas con aproximadamente 10^6 células/mL (n=3).

	Contamina- ción inicial (antes de pasteurizar) (LOG ₁₀ CFU/mL)	Contamina- ción después de pasteurizar a 80°C (LOG ₁₀ CFU/mL)	Contamina- ción después de pasteurizar a 90°C (LOG ₁₀ CFU/mL)	LOG ₁₀ reducción muestras contamina- das sin pasteurizar	LOG ₁₀ reducción post pasteuri- zar a 80°C	LOG ₁₀ reducción del ciclo post pasteurizar a 90°C
<i>Escherichia coli</i>	5,36±0,02	nd	nd	3,57	nd	nd
<i>Bacillus cereus</i>	3,46±0,06	nd	nd	3,75	nd	nd
<i>Aspergillus parasiticus</i>	4,44±0,05	2,82±0,05	nd	4,33	5,96	nd
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	3,59±0,03	2,31±0,08	nd	4,02	5,26	nd

Al analizar la presencia de microorganismos en las muestras pasteurizadas a 80 °C, se evidencia que los microorganismos *E. coli* y *B. cereus* aparentemente fueron eliminados por completo,



sin embargo, la levadura y el hongo todavía presentaron recuentos significativos de colonias. Por otro lado, en las muestras que se llevaron hasta los 90 °C, no se encontró presencia de ninguno de los microorganismos, demostrando que esta temperatura es la más eficiente en la inhibición de estos microorganismos, lo que permite la preservación de los colorantes desarrollados. Por lo tanto, se seleccionó la pasteurización a 90 °C para aplicar en las muestras de *R. fruticosus*.

4.4. Evaluación de la estabilidad de las diferentes formulaciones

4.4.1. Evaluación de la estabilidad del color y las antocianinas a lo largo del tiempo.

Cada vez es mayor la búsqueda de colorantes a base de antocianinas puesto que son aditivos alimentares naturales, los cuales permiten obtener colores variados con la ventaja de presentar diferentes bioactividades, sin embargo, uno de los mayores problemas que presentan este tipo de colorantes es su baja estabilidad que conlleva a una rápida degradación de las antocianinas; y por tanto se genera una pérdida de color, esto hace que sea necesario buscar alternativas de conservación de estos como lo es la microencapsulación (Arrazola et al., 2014).

En el análisis de estabilidad de las antocianinas de las diferentes formulaciones líquidas y sólidas se presentaron las mismas moléculas identificadas en el **apartado 4.1.4**, y por tanto para la cuantificación a lo largo del tiempo se evaluó el total de antocianinas presente en cada preparación colorante.

Por tanto, luego de obtener formulaciones colorantes sólidas y líquidas se realizó el control del color a lo largo de 3 meses, midiendo esta característica al tiempo 0 y posteriormente, cada 28 días, donde para cada medición se obtuvieron valores de luminosidad (L), tonalidad verde/rojo (a) y tonalidad amarilla/azul (b).

Con relación a *R. fruticosus* (**Figuras 14 y 15**), considerando en primera medida las formulaciones sólidas, cabe destacar que las preparaciones de maltodextrosa y maltodextrosa-goma arábica mostraron valores más altos de luminosidad (**Figura 14a**) e intensidad del color rojo (**Figura 14b**), lo que ya no ocurrió en el caso del color amarillo (**Figura 14c**). Al comparar estos resultados con el contenido de antocianinas (**Figura 14d**), se evidencia que a pesar de ser superior en el control (resultado esperado ya que una gran parte de las formulaciones contenían



Desarrollo y estabilización de colorantes alimentarios a partir de extractos de moras

maltodextrina o maltodextrina-goma arábica), permitió un tono rojo más fuerte en las formulaciones con agentes microencapsulantes.

En cualquier caso, no se observaron diferencias sustanciales en ninguno de los parámetros analizados, ya sea en función del tiempo de almacenamiento (hasta 12 semanas), o de la temperatura a la que se almacenaron las muestras (temperatura ambiente o 3 °C).



Desarrollo y estabilización de colorantes alimentarios a partir de extractos de moras

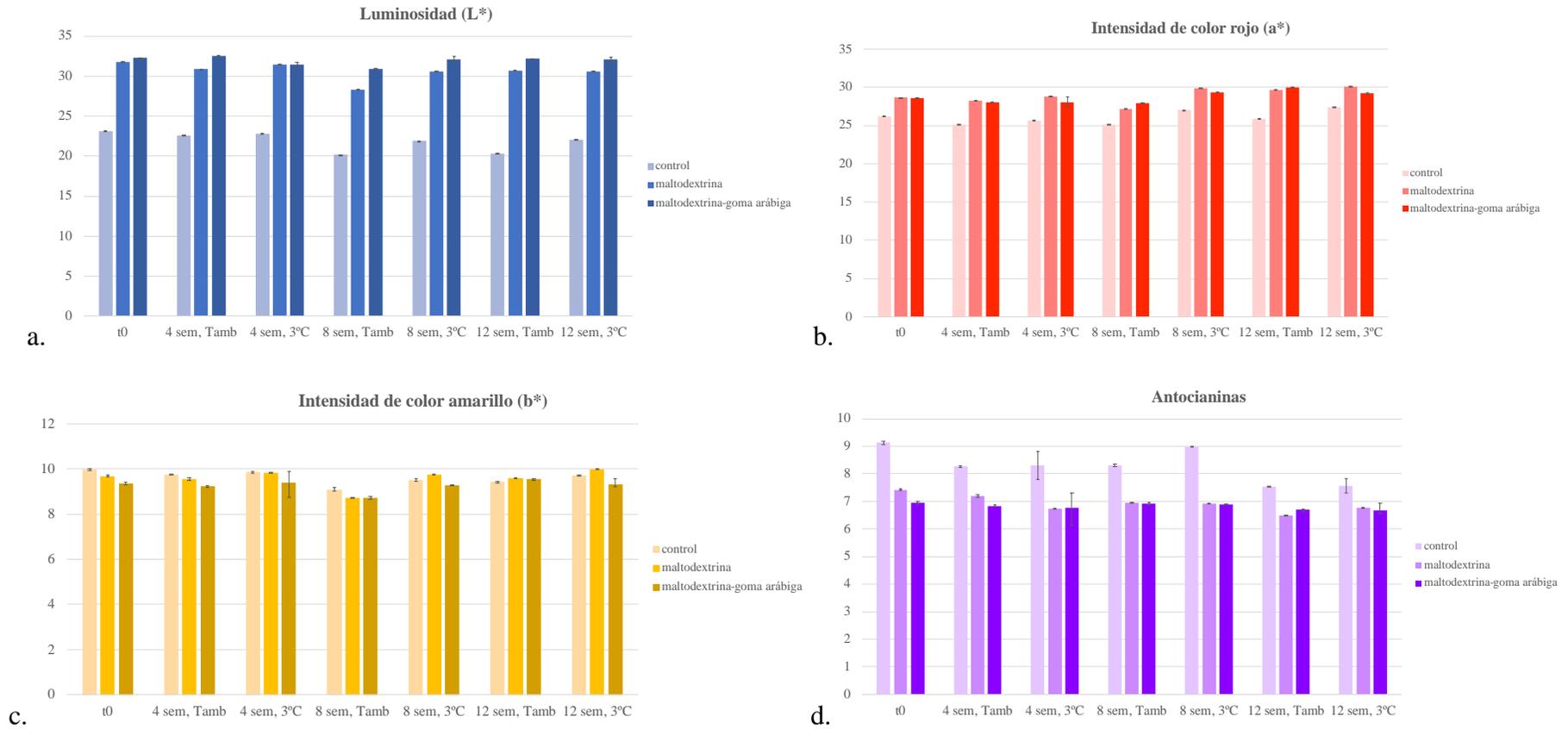


Figura 14. Evolución de los parámetros colorimétricos: L* (a), a* (b), y b* (c) y contenido (mg/g de extracto) en antocianinas (d) de las formulaciones sólidas de *Rubus fruticosus* L. (control, maltodextrina o maltodextrina-goma arábica). sem: semanas; Tamb: temperatura ambiente.



Se obtuvo un resultado muy diferente con las formulaciones líquidas del jugo de *R. fruticosus*; cómo se puede observar en la **Figura 15**, la luminosidad (**Figura 15a**) y la intensidad del color rojo (**Figura 15b**) fueron menores que las obtenidas para las formulaciones sólidas, además de esto, presentaron una mayor heterogeneidad de resultados para los diferentes tiempos y temperaturas de almacenamiento, lo que es una evidencia de la menor estabilidad (así como una menor eficiencia de coloración) de las formulaciones líquidas en comparación con las sólidas.

Con respecto a la intensidad del color amarillo (**Figura 15c**), los resultados fueron similares a los obtenidos para las formulaciones sólidas, lo que concuerda con la composición colorante del control de las formulaciones líquidas, esencialmente constituido por antocianinas. En relación con estos compuestos fenólicos, los niveles cuantificados también fueron similares a los obtenidos en las formulaciones sólidas, una vez más en niveles ligeramente más altos en la muestra control (**Figura 15d**), lo cual se justifica por el hecho de que las formulaciones contienen otros componentes, y no solamente extracto.



Desarrollo y estabilización de colorantes alimentarios a partir de extractos de moras

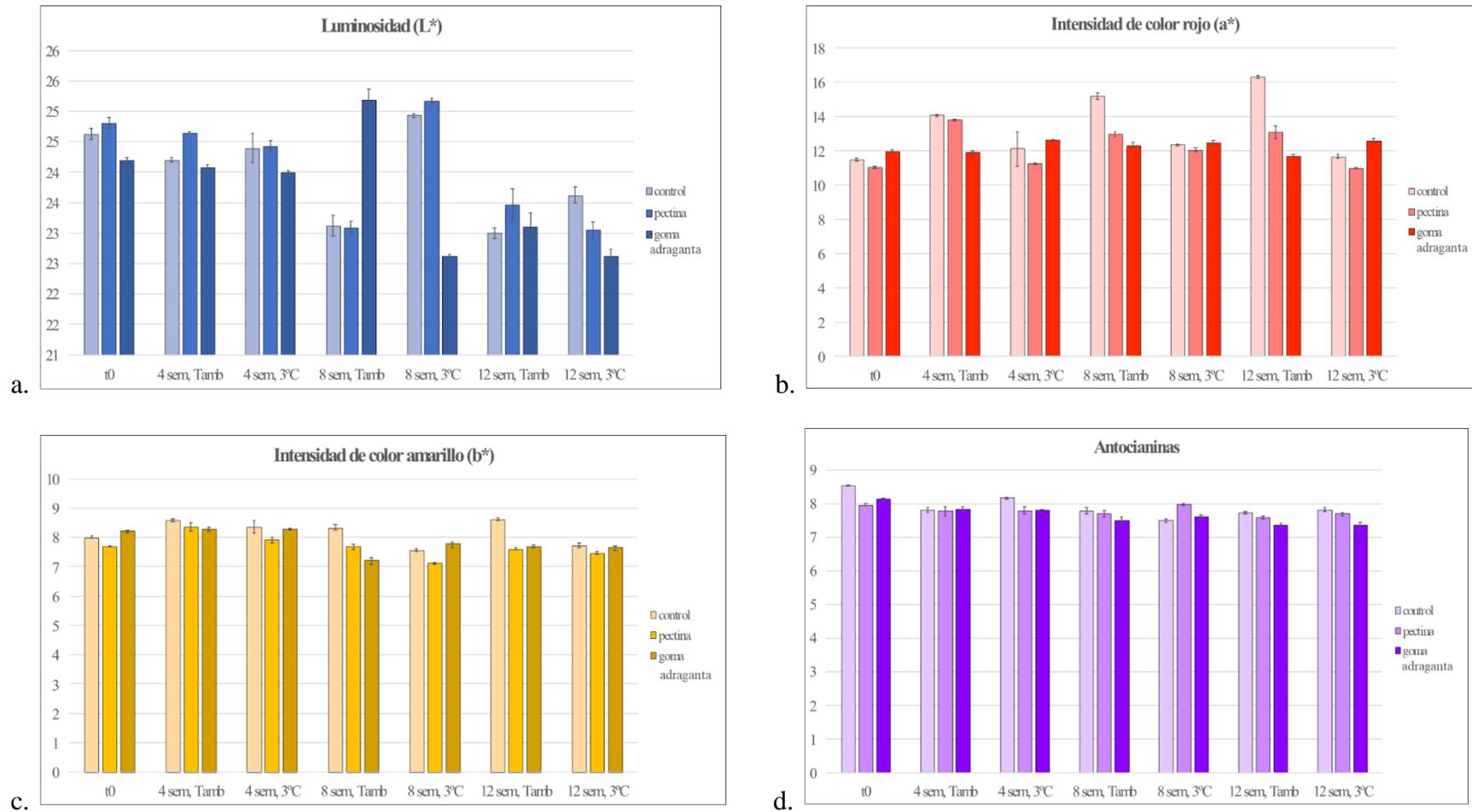


Figura 15. Evolución de los parámetros colorimétricos: L* (a), a* (b), y b* (c) y contenido (mg/g de extracto) de antocianinas (d) en formulaciones líquidas de *Rubus fruticosus* L. (control, pectina y goma adraganta). sem: semanas; Tamb: temperatura ambiente



Teniendo en cuenta los resultados obtenidos para las formulaciones sólidas de *M. nigra* (**Figuras 16 y 17**), la mayor luminosidad (**Figura 16a**) medida en estas muestras es notable cuando se compara con la observada en las formulaciones de *R. fruticosus*. Por otro lado, la formulación preparada con maltodextrina-goma arábica fue una vez más la que demostró mejores resultados (mayor luminosidad), aunque, en este caso con diferencias más significativas en comparación con las formulaciones preparadas solo con maltodextrina, que en su conjunto fueron mucho mejores que el control.

Con relación a la intensidad del color rojo (**Figura 16b**) y del color amarillo (**Figura 16c**), y aunque los valores registrados también fueron más altos que los medidos en las formulaciones homólogas de *R. fruticosus*, se ha verificado que las formulaciones sólidas no permitieron obtener los mismos niveles de color que los de control.

Finalmente, los resultados de los niveles de antocianinas (**Figura 16d**) fueron prácticamente idénticos a los cuantificados en las formulaciones sólidas de las formulaciones de *R. fruticosus*.

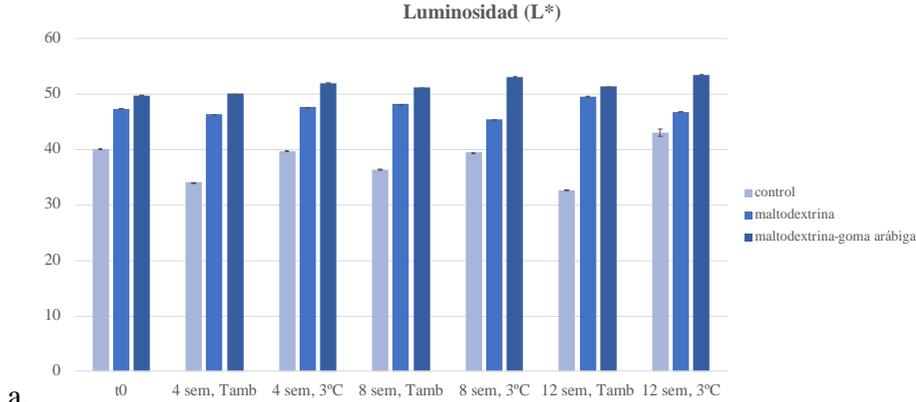
En relación con las formulaciones líquidas de *M. nigra*, fue notorio que permitieron valores más altos de luminosidad (**Figura 17a**) e intensidad de color rojo (**Figura 17b**), y que presentaron también una mayor estabilidad en comparación con las mismas formulaciones preparadas con zumo de *R. fruticosus*.

Con respecto a la intensidad del color amarillo (**Figura 17c**), a pesar de mostrar los valores más altos para las formulaciones líquidas de *M. nigra* en comparación con las formulaciones de *R. fruticosus*, se ha concluido, que las primeras, presentaron valores más bajos de este parámetro colorimétrico que los logrados para el control.

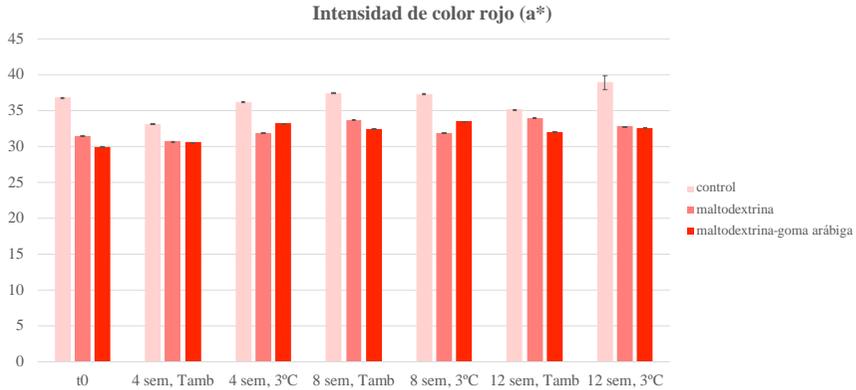
A pesar de las diferencias en los parámetros colorimétricos, las formulaciones líquidas de los zumos de ambas especies presentaron valores de contenido en antocianinas idénticos (**Figura 15d y 17d**).



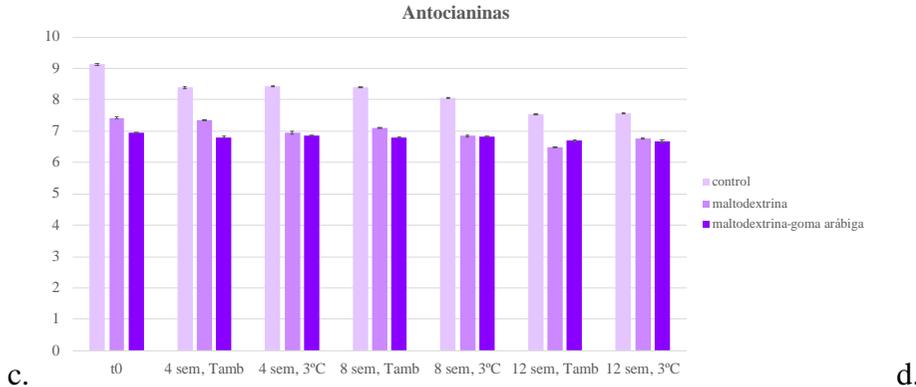
Desarrollo y estabilización de colorantes alimentarios a partir de extractos de moras



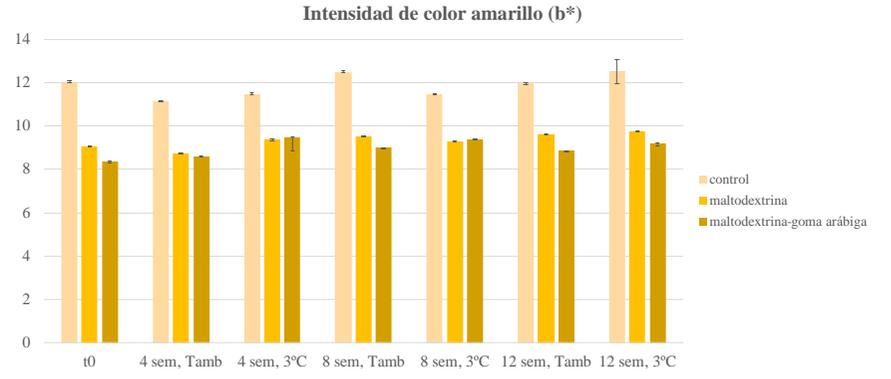
a.



b.



c.



d.

Figura 16. Evolución de los parámetros colorimétricos: L* (a), a* (b), y b* (c) y contenido (mg/g de extracto) en antocianinas (d) en las formulaciones sólidas de *Morus nigra* L. (control, maltodextrina y maltodextrina-goma arábica). sem: semanas; Tamb: temperatura ambiente.



Desarrollo y estabilización de colorantes alimentarios a partir de extractos de moras

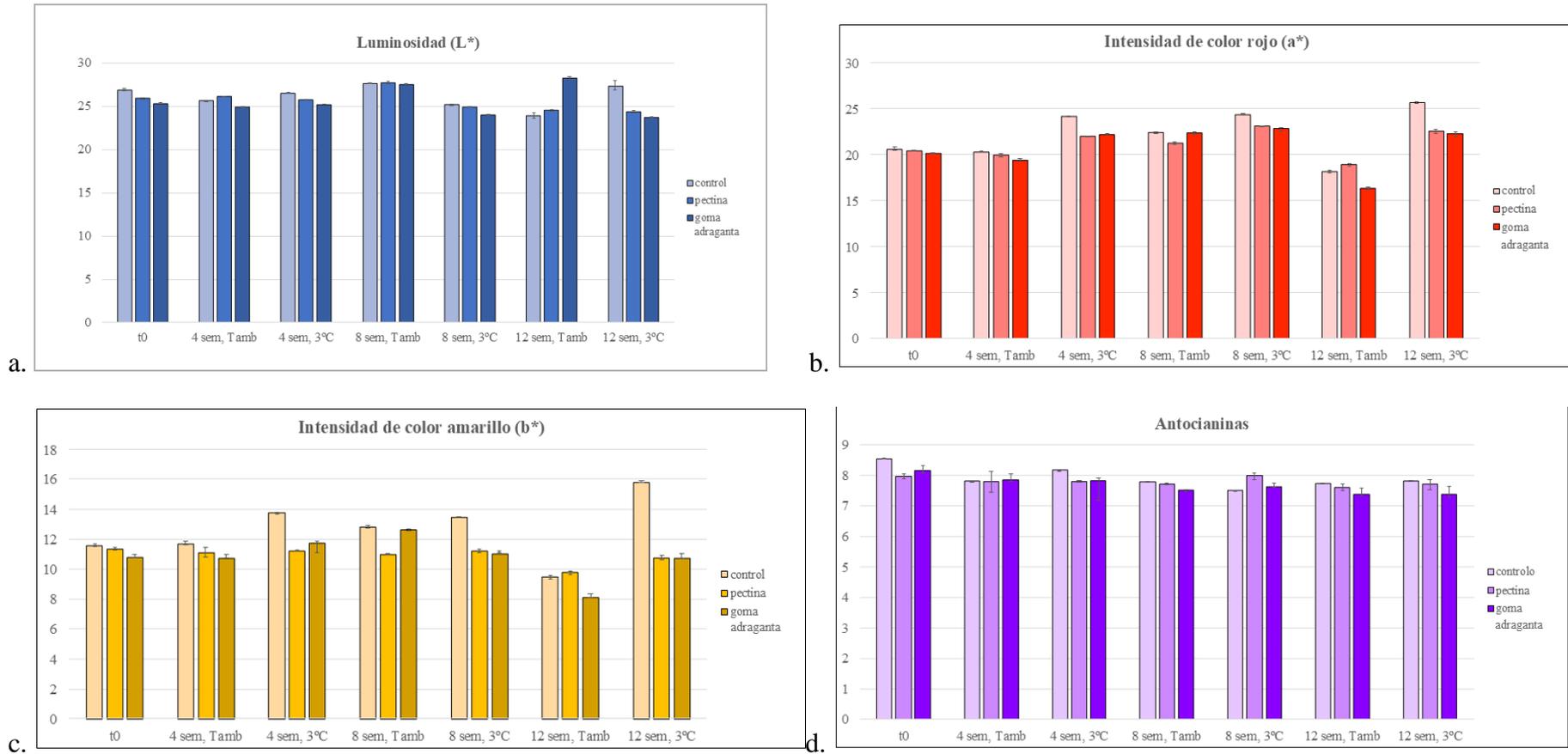


Figura 17. Evolución de los parámetros colorimétricos: L* (a), a* (b), y b* (c) y contenido (mg/g de extracto) de antocianinas (d) en las formulaciones líquidas de *Morus nigra* L. (control, pectina y goma adraganta). sem: semanas; Tamb: temperatura ambiente.



Análisis discriminante lineal

Después de identificar algunas diferencias individuales en cada una de las muestras, se realizó un análisis discriminante lineal para evaluar las correlaciones entre los parámetros colorimétricos (variables cuantitativas independientes) y las distintas formulaciones (líquidas o sólidas de ambas especies) (**Figura 18**). Se seleccionaron variables independientes significativas de acuerdo con el test de λ de Wilks. Solo las variables con rendimiento estadísticamente significativo ($p < 0,050$) se mantuvieron en el modelo estadístico.

Las tres funciones con poder discriminante más alto (primera función: 85,2 %, segunda función: 12,5 %, tercera función: 0,2 % de la varianza observada) se definieron para las distintas formulaciones con la contribución de todos los parámetros L^* , a^* , b^* y contenido en antocianinas (todas seleccionadas como si tuvieran capacidad discriminante significativa). En una primera observación de la representación de estas tres funciones, resulta evidente que las formulaciones líquidas se han distinguido de las sólidas, mayoritariamente por la influencia de la intensidad de color rojo (valores más elevados en las formulaciones líquidas de acuerdo con su localización en el lado positivo del eje), la variable con más alta correlación con la función 1. Además, se observa una separación entre las muestras control y las formulaciones sólidas, que no se evidencia en las formulaciones líquidas. Esta separación resultó en primer lugar del contenido en antocianinas, significativamente superior en las muestras control debido a que las que están encapsuladas presentan un gran porcentaje de maltodextrina o maltodextrina-goma arábiga, lo que hace que la cantidad de antocianinas sea menor; por tanto, las formulaciones líquidas se muestran como más adecuadas al presentar cantidades de estabilizantes más pequeñas.

En cuestión de rendimiento de clasificación, 61,9 % de los grupos originales y 58,3 % de los grupos obtenidos por validación cruzada han sido clasificados correctamente según el método de validación empleado.

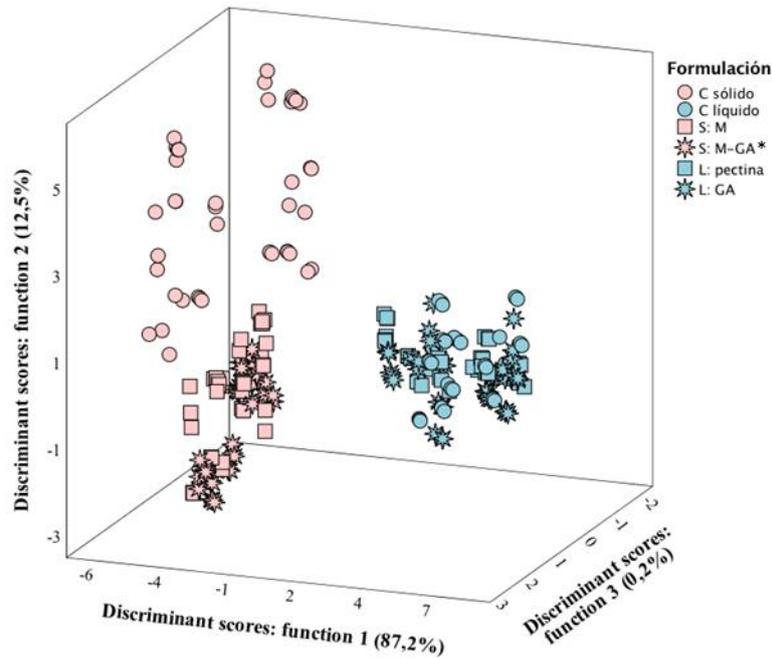


Figura 18. Distribución tridimensional de marcadores para las distintas formulaciones de ambas especies según los coeficientes de las funciones discriminantes definidas a partir de los parámetros colorimétricos y contenidos en antocianinas. C: control; S: sólido; L: líquido; M: maltodextrina; GA*: goma arábica, GA: goma adraganta

4.4.2. Evaluación de la carga microbiana

Se evaluó la carga microbiana según lo descrito en el **apartado 3.6.3**, de los extractos y de cada una de las formulaciones colorantes líquidas y sólidas, en el tiempo 0, después del proceso de pasteurización y preparación de las formulaciones, y en el tiempo de 3 meses de almacenamiento en temperatura ambiente y 3 °C.

En el tiempo inicial, tanto en las formulaciones líquidas como en las sólidas, se verificó que la carga microbiana inicial se encontraba dentro de los valores admisibles para alimentos. Sin embargo, transcurridos 2 meses, en las muestras líquidas almacenadas a temperatura ambiente se pudo evidenciar la presencia de contaminación por la producción de gases con olor ácido fuerte y, en las muestras líquidas almacenadas a 3°C se observó un crecimiento de colonias; debido a esto se omitió realizar el análisis de carga microbiana en el tiempo final puesto que ya se determinó que no eran aptas para consumo.

Por otro lado, en las formulaciones sólidas se ha evaluado la carga microbiana en el tiempo final y, como se informó en la sección de análisis estadístico, los resultados se trataron con un



ANOVA de dos vías, lo que permitió una comprensión individualizada de cada factor. En la **Tabla 19** se representa la carga microbiana de los microorganismos aerobios mesófilos, coliformes, levaduras y hongos de la muestra de *R. fruticosus*. Los dos tiempos analizados (cero y tres meses) se representan en la parte superior de la tabla, mientras que en la parte inferior los tres tipos de formulación (TF). Las **tablas 20, 21 y 22** también siguen este estilo de formato. Los valores presentes en los promedios de cada tiempo de almacenamiento comprenden los valores de los tres tipos de incorporación, de la misma manera se presentan para cada tipo de formulación, los cuales comprenden los valores para ambos tiempos de almacenamiento.

Por lo tanto, los valores de las desviaciones estándar no deben verse como una medida de precisión, ya que representan valores obtenidos en diferentes condiciones, sino un rango de valores máximos y mínimos. Por lo tanto, la **Tabla 19** revela que además de que no se detectaron coliformes en ninguna muestra, en ninguno de los tiempos, hubo una interacción significativa para las levaduras y los hongos, y algunas tendencias se pueden extraer de las medias marginales estimadas (MME). Al analizar la **Figura 19 (a)** es posible verificar que, para las levaduras, el control registró presencia de estos contaminantes en el tiempo cero, sin embargo, después de los tres meses no se registraron, mientras que, para las muestras con maltodextrina, no se registró en ningún momento.

Tabla 19. Análisis microbiano de las formulaciones sólidas de *Rubus fruticosus* L. almacenadas a temperatura ambiente durante 3 meses.

			Microorganismos			
			Aerobios	Coliformes	Levaduras	Hongos
			Mesofílicos			
Tiempo de Almacenamiento (TA)	0 meses		1±2	0±0	1±2	3,14±0,19
	3 meses		1±2	0±0	0±0	0±0
<i>p</i> -value (n=15)	Prueba T Student		0,407	-	<0,001	<0,001
Tipo de formulación (TF)	Control		3,5±0,1 ^a	0±0	2±2	2±2
	Maltodextrina		0±0 ^b	0±0	0±0	1±2
	Maltodextrina+Goma		0±0 ^b	0±0	0±0	2±2
<i>p</i> -value (n=10)	Prueba Tukey's HSD		<0,001	-	<0,001	<0,001
TA×TF (n=30)	<i>p</i> -value		0,498	-	<0,001	<0,001

En cada fila, para el tiempo de almacenamiento, un asterisco (*) representa una diferencia estadísticamente significativa entre los dos tiempos, mientras que, para el tipo de incorporación, las letras también representan una diferencia de significación, con una significancia de 0,05. Las desviaciones estándar presentadas se calcularon a partir de los resultados obtenidos en diferentes condiciones. Por lo tanto, no deben interpretarse como medidas de precisión, sino más bien como un rango de valores.



En el caso de los hongos (**Figura 19, b**), también está claro que, con el tiempo, todas las muestras tendieron a cero, aunque inicialmente, las formulaciones con maltodextrina registraron un valor inferior al del control. Finalmente, en la **tabla 19**, es posible verificar que el tipo de incorporación fue determinante en el caso de los microorganismos aerobios mesofílicos, ya que estos solo se registraron en las muestras de control, registrando una diferencia significativa entre ellos. Por último, en el tiempo de almacenamiento, no hubo diferencias significativas entre el tiempo cero y el tiempo tres meses.

En relación con la **tabla 20**, que solamente difiere de la **tabla 19**, en que la temperatura de almacenamiento de las muestras durante los 3 meses fue en frío, es posible verificar que hubo una interacción significativa para ambos factores en todos los microorganismos. A diferencia de las muestras almacenadas a temperatura ambiente, las cuales no presentaron una interacción significativa para los microorganismos aeróbicos mesófilos, en las formulaciones almacenadas en frío se evidencia que la tendencia fue aumentar a lo largo del tiempo, como se observa en la **Figura 20**. Aunque en las muestras con maltodextrina, no se presentaron valores para estos microorganismos en el tiempo cero, en las muestras control ya se evidenciaban valores entre 3 y 4 UFC/g.

Tabla 20. Análisis microbiano de las formulaciones sólidas de *Rubus fruticosus* L. almacenadas en frío durante 3 meses

			Microorganismos Aerobios Mesofílicos	Coliformes	Levaduras	Hongos
Tiempo de Almacenamiento (TA)		0 meses	1±2	0±0	1±1	3,1±0,2
		3 meses	3,4±0,7	0±0	1±1	2,9±0,1
<i>p</i> -value (n=15)	Prueba T Student		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Tipo de formulación (TF)	Control		3,8±0,2	0±0	2±2	3,2±0,2
	Maltodextrina		2±2	0±0	0±0	2,89±0,08
	Maltodextrina+Goma		1±1	0±0	1±2	3,15±0,06
Valor- <i>p</i> (n=10)	Prueba Tukey's HSD		<0,001	-	<0,001	<0,001
TA×TF (n=30)	Valor - <i>p</i>		<0,001	-	<0,001	<0,001

En cada fila, para el tiempo de almacenamiento, un asterisco (*) representa una diferencia estadísticamente significativa entre los dos tiempos, mientras que, para el tipo de incorporación, las letras también representan una diferencia de significación, con una significancia de 0,05. Las desviaciones estándar presentadas se calcularon a partir de los resultados obtenidos en diferentes condiciones. Por lo tanto, no deben interpretarse como medidas de precisión, sino más bien como un rango de valores.

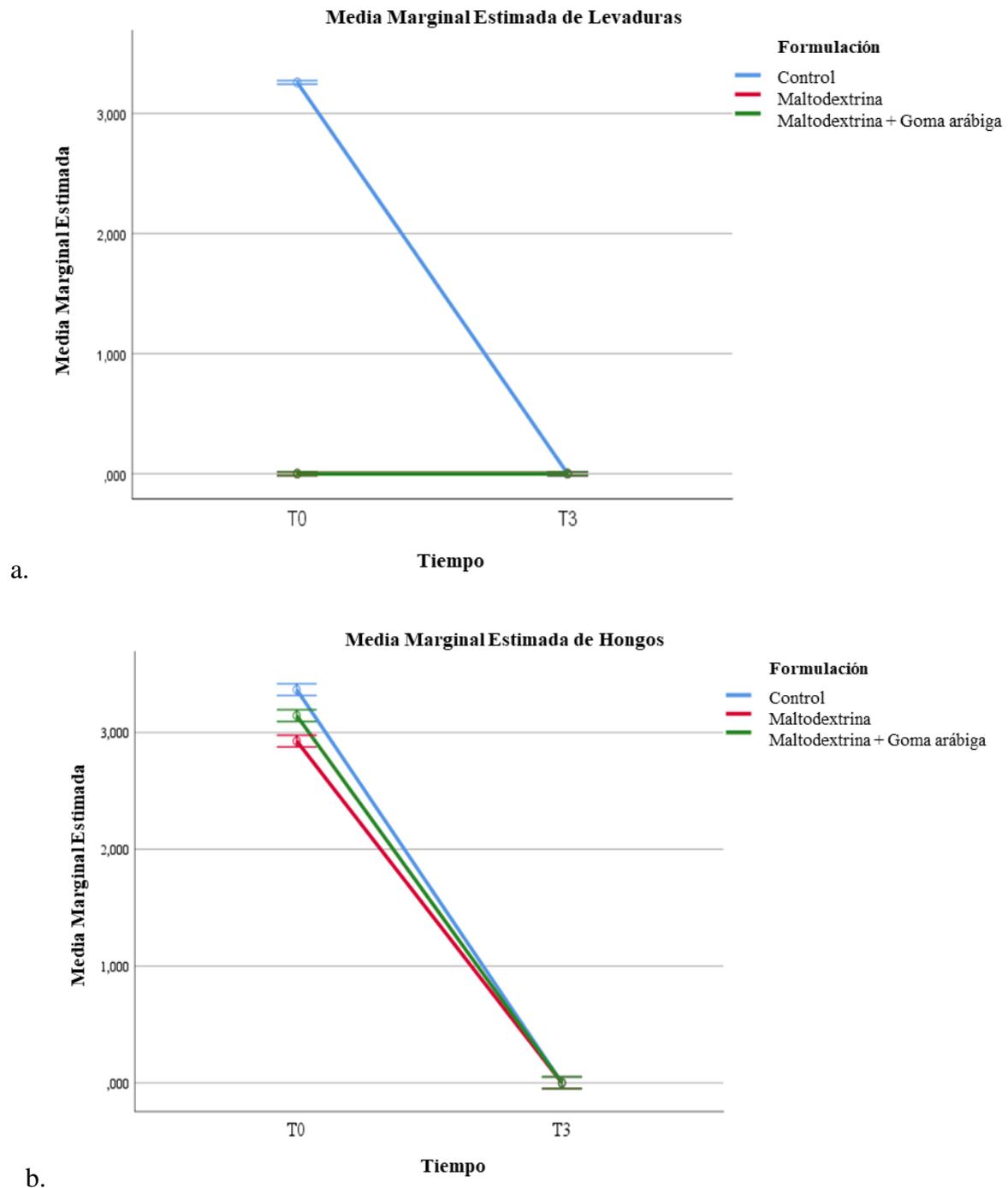


Figura 19. Representación de las medias marginales estimadas de: a. levaduras y b. hongos para *Rubus fruticosus* L. almacenados a temperatura ambiente durante tres meses.

En los recuentos de levadura, las muestras con maltodextrina no revelaron, en ninguno de los tiempos de almacenamiento, este microorganismo. Además, como se esperaba, no se detectaron coliformes en ninguna de las muestras a lo largo de los tres meses.



Comparativamente, el almacenamiento a temperatura ambiente parece ser más beneficioso en el control de microorganismos, verificándose una disminución de estos en el transcurso del tiempo, especialmente para las levaduras y los hongos.

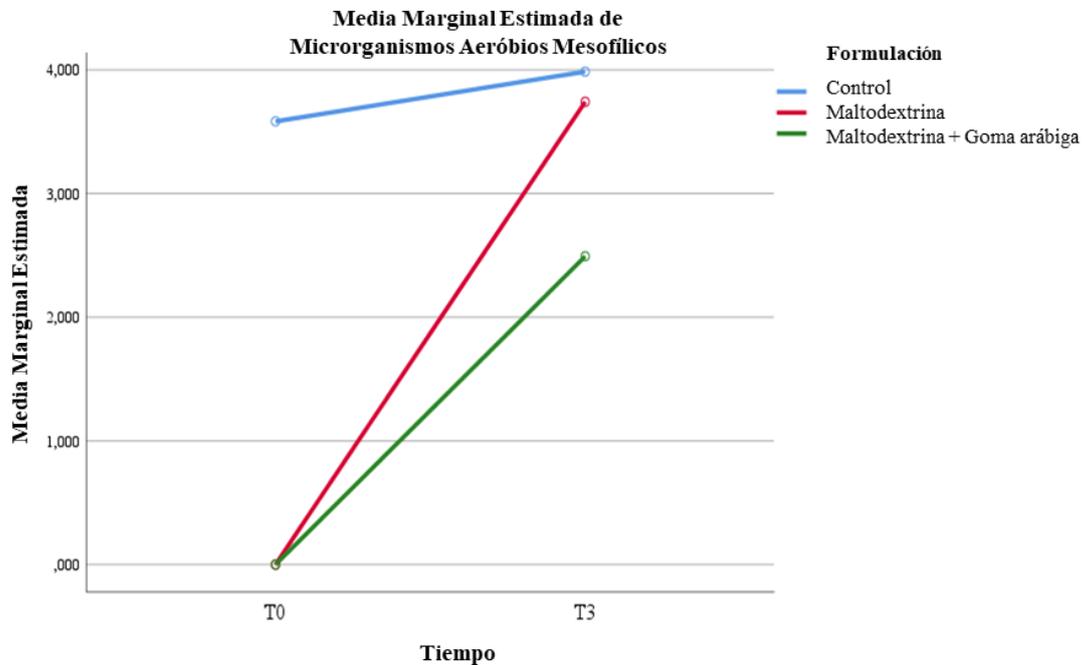


Figura 20. Representación de las medias marginales estimadas de microorganismos aeróbicos mesofílicos para *Rubus fruticosus* L. almacenados en frío durante tres meses

Los valores obtenidos para *M. nigra* almacenados a temperatura ambiente durante tres meses se muestran en la **Tabla 21**. Es posible verificar una vez más que hubo una interacción significativa entre el tiempo de almacenamiento y el tipo de formulación, con todos los microorganismos ($TA \times TF < 0,05$). Nuevamente, los coliformes no fueron detectados en ninguna muestra; en cuanto a las levaduras, no registraron contaminación en la formulación que contenía maltodextrina con goma arábica y en el caso de los hongos no se detectaron en ninguna de las muestras que contenían maltodextrina.



Tabla 21. Análisis microbiano de las formulaciones sólidas de *Morus nigra* L. almacenadas a temperatura ambiente durante 3 meses.

			Microorganismos Aerobios Mesofílicos	Coliformes	Levaduras	Hongos
Tiempo de Almacenamiento (TA)	de	0 meses	2±2	0±0	2±1	1±1
		3 meses	3,0±0,4	0±0	2±1	1±1
<i>p</i> -value (n=15)		Teste T Student	<0,001	<0,001	<0,001	0,032
Tipo de formulación (TF)		Control	3,7±0,5	0±0	3,12±0,06	2,9±0,1
		Maltodextrina	2,5±0,1	0±0	3,0±0,3	0±0
		Maltodextrina+Goma	2±2	0±0	0±0	0±0
<i>p</i> -value (n=10)		Tukey's HSD test	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
TA×TF (n=30)		<i>p</i> -value	<0,001	<0,001	<0,001	0,016

En cada fila, para el tiempo de almacenamiento, un asterisco (*) representa una diferencia estadísticamente significativa entre los dos tiempos, mientras que, para el tipo de incorporación, las letras también representan una diferencia de significación, con una significancia de 0,05. Las desviaciones estándar presentadas se calcularon a partir de los resultados obtenidos en diferentes condiciones. Por lo tanto, no deben interpretarse como medidas de precisión, sino más bien como un rango de valores.

La **tabla 22** representa el análisis microbiano durante los tres meses de las formulaciones de *M. nigra*, que se conservaron en frío. Una vez más, se registró una interacción significativa para todos los microorganismos, lo que reveló que tanto el tiempo como el tipo de formulación contribuyeron al comportamiento de las muestras, excepto en los hongos donde el parámetro influyente fue el tipo de formulación, evidenciándose que las preparaciones microencapsuladas no presentaron o tuvieron menor contaminación que el control. Desde la MME (**Figura 21, a**), se puede verificar que inicialmente los microorganismos aerobios mesófilos en el control tuvieron un recuento más alto, mientras que la muestras que contenían maltodextrina no presentaron esto, debido a que contenía un valor entre dos y tres unidades formadoras de colonias. Sin embargo, después de tres meses de almacenamiento, el control disminuyó los valores de estos microorganismos, mientras que ambas muestras con maltodextrina aumentaron. Cabe resaltar que no se detectaron coliformes en ninguna muestra; y en las muestras que contenían maltodextrina y goma arábica no se detectaron levaduras y hongos. Además, en el caso de los hongos (**Figura 21, b**), la única muestra que tenía este contaminante en tiempo cero, mantuvo la misma carga microbiana durante los tres meses, mientras que en las muestras con maltodextrina aumentó entre los tiempos de almacenamiento. Al comparar con *R. fruticosus*, se observa una similitud, debido a que también se evidencia que el almacenamiento a temperatura ambiente es más favorable que a bajas temperaturas, aunque las diferencias no fueron muy altas. Una razón por la cual se presenta esta diferencia puede estar relacionada con la humedad del sitio de almacenamiento. Por lo tanto, incluso si las

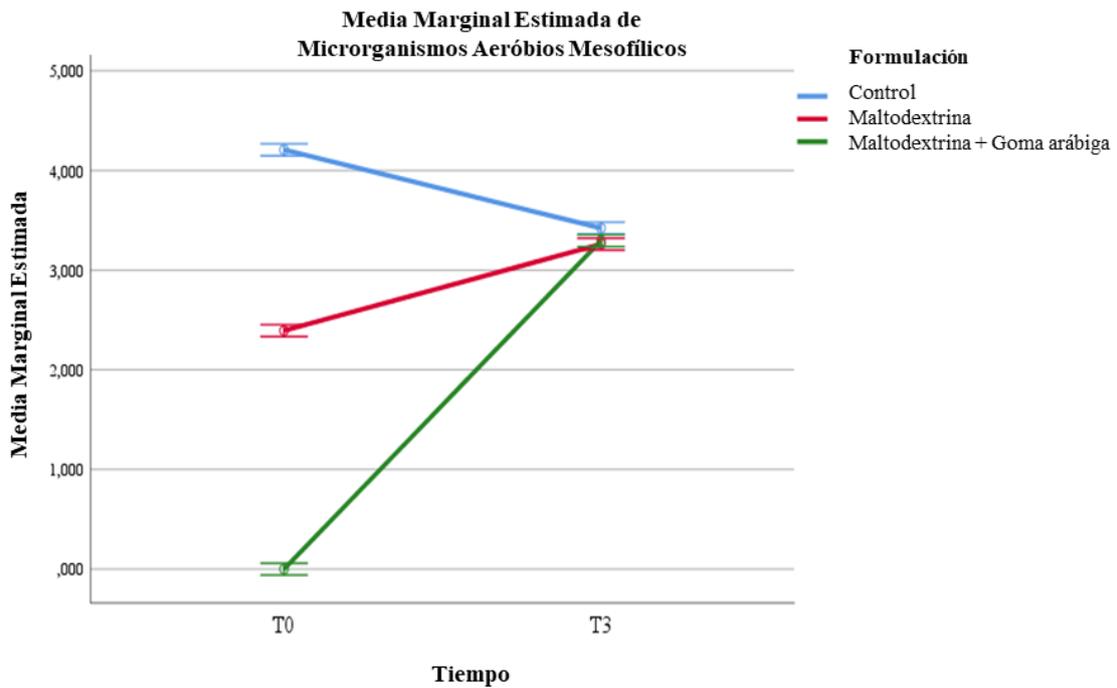


temperaturas son bajas, pero la ubicación de almacenamiento tiene una humedad relativa más alta, ayudará al desarrollo de microorganismos.

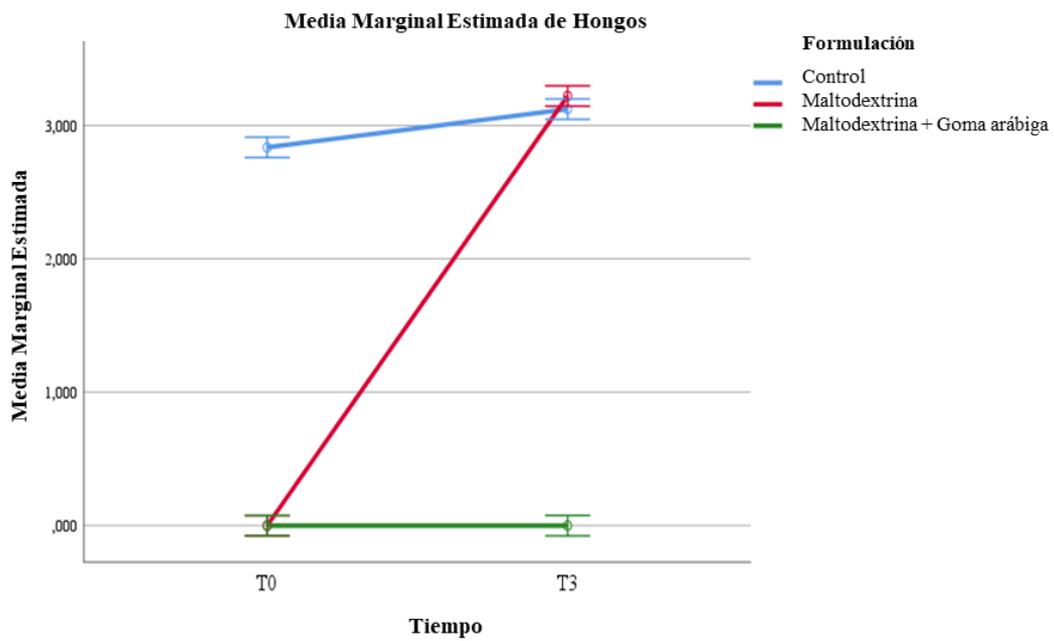
Tabla 22. Análisis microbiano de las formulaciones sólidas de *Morus nigra* L. almacenadas en frío durante 3 meses.

			Microorganismos			
			Aerobios Mesofílicos	Coliformes	Levaduras	Hongos
Tiempo de Almacenamiento (TA)	0 meses		2±2	0±0	2±1	1±1
	3 meses		3,32±0,08	0±0	2±1	2±2
<i>p</i> -value (n=15)	Teste T Student		0,028	<0,001	0,114	0,942
Tipo de formulación (TF)	Control		3,8±0,4	0±0	3,05±0,09	2,9±0,2a
	Maltodextrina		2,8±0,5	0±0	3,0±0,3	2±2b
	Maltodextrina+Goma		2±2	0±0	0±0	0±0c
<i>p</i> -value (n=10)	Tukey's HSD test		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
TA×TF (n=30)	<i>p</i> -value		<0,001	<0,001	<0,001	0,855

En cada fila, para el tiempo de almacenamiento, un asterisco (*) representa una diferencia estadísticamente significativa entre los dos tiempos, mientras que, para el tipo de incorporación, las letras también representan una diferencia de significación, con una significancia de 0,05. Las desviaciones estándar presentadas se calcularon a partir de los resultados obtenidos en diferentes condiciones. Por lo tanto, no deben interpretarse como medidas de precisión, sino más bien como un rango de valores.



a.



b.

Figura 21. Representación de las medias marginales estimadas de: a. levaduras y b. hongos para *Morus nigra* L. almacenados a temperatura ambiente durante tres meses.



4.4.3. Evaluación de actividad citotóxica

Se realizó la valoración de la actividad citotóxica de los extractos y de cada una de las formulaciones colorantes líquidas y sólidas, en células no tumorales de hígado de cerdo, después del proceso de pasteurización y preparación de las formulaciones, y al cumplir los tres meses de almacenamiento en temperatura ambiente y a 3°C, mostrando que no hay actividad, debido a que no presentaron toxicidad hasta la concentración máxima analizada (400 µg/mL).

Los resultados obtenidos demuestran que no hay riesgo de toxicidad con las preparaciones realizadas y, por tanto, desde este punto de vista, son aptas para su incorporación en diferentes matrices alimentares sin presentar un riesgo para la salud del consumidor.



5. CONCLUSIÓN

Dada la importancia de los colorantes en la industria alimentaria, este estudio tuvo como principal objetivo la formulación de colorantes naturales a base de antocianinas. Así, se estudió la composición química y la bioactividad de extractos preparados a partir de frutos de *Morus nigra* L. y *Rubus fruticosus* L., donde se evidenció su riqueza en azúcares, tocoferoles, ácidos orgánicos y principalmente, la presencia de diferentes antocianinas. Estos compuestos son los primordiales responsables de la coloración de estos frutos y por eso se realizaron zumos con elevadas concentraciones de antocianinas para posteriormente preparar colorantes sólidos y líquidos. Para eso, los extractos fueron pasteurizados en las condiciones óptimas establecidas, y posteriormente se sometieron a dos procesos de estabilización: *spray drying* con el uso de maltodextrina y una mezcla de maltodextrina y goma arábiga como agentes encapsulantes; y gelificación térmica con pectina y goma adraganta como estabilizantes; posteriormente todas las formulaciones fueron almacenadas en frío y a temperatura ambiente.

De manera general, las formulaciones sólidas presentaron una mayor estabilidad a lo largo de los tres meses de almacenamiento. A pesar de la contaminación mínima inicial de las formulaciones sólidas y líquidas, en los sólidos, la técnica de *spray drying* reveló ser eficiente para impedir el crecimiento microbiano. Sin embargo, en las formulaciones líquidas, se verificó la presencia de contaminación por la producción de gases con olor ácido fuerte y crecimiento de colonias, por lo que en estas se omitió realizar el análisis de carga microbiana en el tiempo final puesto que ya se determinaron no aptas para consumo. Por otro lado, ninguna de las formulaciones demostró citotoxicidad en células hepáticas no tumorales, siendo por eso consideradas adecuadas para aplicación en alimentos sin riesgos de toxicidad.

Así, como perspectivas futuras, se podría dar continuación a este estudio en el sentido de buscar alternativas de estabilización de los extractos para formulaciones líquidas. Para eso, se podrían testar nuevos estabilizantes o técnicas de estabilización. Por otro lado, sería interesante aplicar los colorantes obtenidos en diferentes matrices alimentarias para evaluar su estabilidad en las mismas, en términos de color y otras características fisicoquímicas consideradas relevantes en cada una de las matrices.



6. BIBLIOGRAFÍA

- Abreu, R. M. V, Ferreira, I. C. F. R., Calhelha, R. C., Lima, R. T., Vasconcelos, M. H., Adegas, F., ... Queiroz, M. J. R. P. (2011). Anti-hepatocellular carcinoma activity using human HepG2 cells and hepatotoxicity of 6-substituted methyl 3-aminothieno[3,2-b]pyridine-2-carboxylate derivatives: In vitro evaluation, cell cycle analysis and QSAR studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46(12), 5800–5806.
- Aguirre, N. (2018). *Desarrollo de un colorante natural desde el fruto del saúco negro (Sambucus nigra) para uso en la industria alimentaria*. Universidad de las Américas.
- Antunes, L. E. C. (2013). Amora-preta (Rubus spp). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 28(3), 339–558.
- Arrazola, G., Herazo, I., & Alvis, A. (2014). Microencapsulación de antocianinas de berenjena (*Solanum melongena* L.) mediante secado por aspersión de la estabilidad de su color y capacidad antioxidante. *Informacion Tecnologica*, 25(3), 31–42.
- Azuola, R., & Vargas, P. (2007). Extracción de sustancias asistida por ultrasonido (EUA). *Tecnología En Marcha*, 20(4), 30–39.
- Barrows, J., Lipman, A., & Bailey, C. (2003). Color additives: FDA's regulatory process and historical perspectives. Estados Unidos: U.S. Food and Drug Administration. Retrieved January 8, 2019, from <https://www.fda.gov/industry/color-additives/color-additives-history>
- Belmonte, L., Arroyo, I., Vázquez, M., Cruz, D., & Peña, E. (2016). Colorantes artificiales en alimentos Synthetic dyes in food stuff. *Naturaleza Y Tecnologia Universidad De Guanajuato*, 8(10), 24–38.
- Cano, A. (2011). *Extracción y uso de tres pigmentos naturales a partir de tomate de árbol (Solanum betaceum Cav.), mortiño (Vaccinium myrtillus L.) y mora de castilla (Rubus glaucus) como alternativa colorante natural para alimentos*. (tesis de pregrado). Escuela Politécnica del Ejército, Ecuador.
- Castañeda-Sánchez, A., & Guerrero-Beltrán, J. (2015). Pigmentos en frutas y hortalizas rojas: antocianinas. *Temas Selectos de Ingenieria de Alimentos*, 9, 25–33.
- Castillo, A., & Linares, D. (2001). Montaje De Un Extractor De Fluidos Presurizados. *Revista*



Amazónica de Investigación Alimentaria, 14(1), 9–14.

- Castillo, S., & Ramírez, I. (2006). *Ensayo preliminar para la obtención de colorantes naturales a partir de especies vegetales comestibles*. (Tesis de licenciatura). Universidad del Salvador, El Salvador.
- Chadi, D. (2011). Blackberry (*Rubus fruticosus* L.). Georgia, Estados Unidos; Center of Invasive Species and Ecosystem Health. Retrieved December 12, 2018, from <https://www.invasive.org/browse/detail.cfm?imgnum=5440220>
- Chen, H., Pu, J., Liu, D., Yu, W., Shao, Y., Yang, G., ... He, N. (2016). Anti-inflammatory and antinociceptive properties of flavonoids from the fruits of black mulberry (*Morus nigra* L.). *PLoS ONE*, 11(4), 1–14.
- Costa, G. R. (2015). *Efeito de extratos ricos em antocianinas ou elagitaninos de amora silvestre (Morus nigra L.), amora preta (Rubus spp), e grumixama (Eugenia brasiliensis Lam) no crescimento e em marcas epigenéticas*. (Tesis doctoral). Universidade de São Paulo, Brasil.
- Dias, M. I., Barros, L., Morales, P., Sánchez-Mata, M. C., Oliveira, M. B. P. P., & Ferreira, I. C. F. R. (2015). Nutritional parameters of infusions and decoctions obtained from *Fragaria vesca* L. roots and vegetative parts. *LWT - Food Science and Technology*, 62(1), 32–38.
- Dugo, P., Mondello, L., Errante, G., Zappia, G., & Dugo, G. (2001). Identification of anthocyanins in berries by narrow-bore high-performance liquid chromatography with electrospray ionization detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(8), 3987–3992.
- Ercisli, S., & Orhan, E. (2007). Chemical composition of white (*Morus alba*), red (*Morus rubra*) and black (*Morus nigra*) mulberry fruits. *Food Chemistry*, 103(4), 1380–1384.
- Ercisli, S., & Orhan, E. (2008). Some physico-chemical characteristics of black mulberry (*Morus nigra* L.) genotypes from Northeast Anatolia region of Turkey. *Scientia Horticulturae*, 116(1), 41–46.
- Europea, U. Reglamento (UE) N° 1129/2011 de la comisión de 11 de noviembre de 2011 por el que se modifica el anexo II del Reglamento (CE) n°1333/2008 del parlamento europeo y del consejo para establecer una lista de aditivos alimentarios de la Unión, Pub. L. No.



2011R1129, 11 1 (2013). Unión Europea.

- Fan, L., Wang, Y., Xie, P., Zhang, L., Li, Y., & Zhou, J. (2019). Copigmentation effects of phenolics on color enhancement and stability of blackberry wine residue anthocyanins: Chromaticity, kinetics and structural simulation. *Food Chemistry*, 275, 299–308.
- Feng, R. Z., Wang, Q., Tong, W. Z., Xiong, J., Wei, Q., Zhou, W. H., ... Li, L. X. (2015). Extraction and antioxidant activity of flavonoids of *Morus nigra*. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8(12), 22328–22336.
- Ferreira, D., Faria, A., Grosso, C., & Mercadante, A. (2009). Encapsulation of Blackberry anthocyanins by thermal gelation of curdlan. *J. Braz. Chem. Soc.*, 20(10), 1908–1915.
- Ferreira, D. S. (2008). *Compostos bioativos em amora-preta e encapsulação do seu extrato antociânico por gelificação térmica com curdlana*. (Tesis de Máster). Universidade Estadual de Campinas, Brasil.
- Galán, P., Gamarra, R., García, J., & Alvarez, S. (2013). *Morus nigra* L. Madrid, España: Árboles Ibéricos. Retrieved January 4, 2019, from <https://www.arbolesibericos.es/especie/morusnigra>
- Garzón, A. (2008). Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos. *Acta Biol. Colomb.*, 13(3), 27–36.
- Giraldo, F., Gil, M., Alzate, L. M., Restrepo, A. M., Millán, L., Ordoñez, A., & Restrepo, C. (2009). Comparación de métodos de extracción de oleoresina de páprika (*Capsicum annum* L.) convencionales con una tecnología amigable al medio ambiente. *Producción + Limpia*, 4(1), 17–26.
- Gómez, N., Sosa, M., & López, A. (2016). Extracción asistida con microondas de aceite esencial de acuyo (*Piper auritum*) y evaluación de su efecto antifúngico contra *Penicillium expansum*. *Investigación y Desarrollo En Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 1(1), 173–178.
- Gonçalves, G. A., Soares, A. A., Correa, R. C. G., Barros, L., Haminiuk, C. W. I., Peralta, R. M., ... Bracht, A. (2017). Merlot grape pomace hydroalcoholic extract improves the oxidative and inflammatory states of rats with adjuvant-induced arthritis. *Journal of Functional Foods*, 33, 408–418.
- Gundogdu, M., Muradoglu, F., Sensoy, R. I. G., & Yilmaz, H. (2011). Determination of fruit



- chemical properties of *Morus nigra* L., *Morus alba* L. and *Morus rubra* L. by HPLC. *Scientia Horticulturae*, 132(1), 37–41.
- Ibáñez, F., Torres, P., & Irigoyen, A. (2003). *Aditivos alimentarios*. Universidad Publica de Navarra. España.
- Idham, Z., Muhamad, I. I., & Sarmidi, M. R. (2012). Degradation kinetics and color stability of spray-dried encapsulated anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa* L. *Journal of Food Process Engineering*, 35(4), 522–542.
- Jiménez-Aguilar, D. M., Ortega-Regules, A. E., Lozada-Ramírez, J. D., Pérez-Pérez, M. C. I., Vernon-Carter, E. J., & Welti-Chanes, J. (2011). Color and chemical stability of spray-dried blueberry extract using mesquite gum as wall material. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(6), 889–894.
- Kafkas, E., Koşar, M., Türemiş, N., & Başer, K. H. C. (2006). Analysis of sugars, organic acids and vitamin C contents of blackberry genotypes from Turkey. *Food Chemistry*, 97(4), 732–736.
- Koyuncu, F. (2004). Organic acid composition of native black mulberry fruit. *Chemistry of Natural Compounds*, 40(4), 367–369.
- Kutlu, T., Durmaz, G., Ateş, B., Yilmaz, I., & Çetin, M. Ş. (2011). Antioxidant properties of different extracts of black mulberry (*Morus nigra* L.). *Turkish Journal of Biology*, 35(1), 103–110.
- Lakshmi, C. G. (2014). Food coloring: The natural way. *Research Journal of Chemical Sciences Res. J. Chem. Sci*, 4(2), 2231–2606.
- Laleh, G., Frydoonfar, H., Heidary, R., Jameei, R., & Zare, S. (2006). The effect of light, temperature, pH and species on stability of anthocyanin pigments in four berberis species. *Pakistan Journal of Nutrition*, 5(1), 90–92.
- Leon, C., & Jaimes Portilla, J. (2018). Efecto de la pasteurización y la temperatura de incubación en la fermentación alcohólica del mosto de mora. *@limentech, Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 15(2), 45.
- Linnaeus, C. (2018). *Morus nigra* L. Saint Louis, Missouri: Trópicos. Retrieved January 4, 2019, from <http://www.tropicos.org/Name/21300470>
- Linnaeus, C. von. (1995). *Rubus fruticosus* L. Saint Louis, Missouri: Trópicos. Retrieved



January 4, 2019, from <http://www.tropicos.org/Name/27801830>

- Lock Sing, O. (1997). *Colorantes naturales* (Fondo edit). Lima, Perú: Pontificia Universidad Católica del Perú.
- Mahdavi, S. A., Jafari, S. M., Ghorbani, M., & Assadpoor, E. (2014). Spray-drying Microencapsulation of anthocyanins by natural biopolymers: a review. *Drying Technology, 32*(5), 509–518.
- Maier, T., Göppert, A., Kammerer, D. R., Schieber, A., & Carle, R. (2007). Optimization of a process for enzyme-assisted pigment extraction from grape (*Vitis vinifera* L.) pomace. *European Food Research and Technology, 227*(1), 267–275.
- Martínez, J., Martínez, J., García, L., Cuaran, J., & Ocampo, Y. A. (2016). Pigmentos vegetales y compuestos naturales aplicados en productos cárnicos como colorantes y/o antioxidantes: revisión. *INVENTUM, 21*(11), 51–62.
- Melgar, J. R. (2011). *Propuesta para obtención de un colorante natural a partir de fruto de Syxygium cumini (cerezo beliceño) para ser utilizado como colorante en la industria textil.* (Tesis de licenciatura). Universidad de El Salvador, El Salvador.
- Memon, A. A., Memon, N., Luthria, D. L., Bhangar, M. I., & Pitafi, A. A. (2010). Phenolic Acids Profiling and Antioxidant Potential of Mulberry (*Morus Laevigata* W., *Morus Nigra* L., *Morus Alba* L.) Leaves and Fruits Grown in Pakistan. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, 60*(1), 25–32.
- Mena, L., Tamargo, B., Salas, E., Plaza, Enrique, I. L., Blanco, Y., Otero, A., & Sierra, G. (2015). Determinación de saponinas y otros metabolitos secundarios en extractos acuosos de *Sapindus saponaria* L. (jaboncillo). *Revista Cubana de Plantas Medicinales, 20*(1), 106–116.
- Milivojević, J., Maksimović, V., Nikolić, M., Bogdanović, J., Maletić, R., & Milatović, D. (2011). Chemical and antioxidant properties of cultivated and wild fragaria and rubus berries. *Journal of Food Quality, 34*(1), 1–9.
- Moser, P., Souza, R. T. De, & Nicoletti Telis, V. R. (2017). Spray Drying of Grape Juice From Hybrid CV. BRS Violeta: Microencapsulation of Anthocyanins Using Protein/Maltodextrin Blends as Drying Aids. *Journal of Food Processing and Preservation, 41*(1).



- Naderi, G. A., Asgary, S., Sarraf-Zadegan, N., Oroojy, H., & Afshin-Nia, F. (2004). Antioxidant activity of three extracts of *Morus nigra*. *Phytotherapy Research*, 18(5), 365–369.
- Nayak, C. A., & Rastogi, N. K. (2010). Effect of selected additives on microencapsulation of anthocyanin by spray drying. *Drying Technology*, 28(12), 1396–1404.
- Oliveira Filho, J. F. de. (2017). *Extração de Corante Natural a Partir do Resíduo da Uva*. (Tesis de licenciatura). Universidad Federal do Rio Grande do Norte. Brasil.
- Oliveros, A., Cordero, I., Paredes, D., Buendia, D., & Macías, F. A. (2011). Extracción y cuantificación de cumarina mediante HPLC-UV en extractos hidroetanólico de semillas de *Dipteryx odorata*. *Revista Latinoamericana de Química*, 39(1–2), 17–31.
- Özgen, M., Serçe, S., & Kaya, C. (2009). Phytochemical and antioxidant properties of anthocyanin-rich *Morus nigra* and *Morus rubra* fruits. *Scientia Horticulturae*, 119(3), 275–279.
- Pante, G. (2014). *Desenvolvimento, encapsulação e caracterização da polpa integral de amora-preta (Rubus sp.) aplicada em frozen yogurt*. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.
- Pariza, A. L. (2009). *Desenvolvimento de sistemas microparticulados e de filmes a base de quitosana e corante natural cúrcuma*. Universidade Federal de Santa Catarina.
- Parra, V. (2004). *Estudio comparativo en el uso de colorantes naturales y sintéticos en alimentos, desde el punto de vista funcional y toxicológico*. Universidad Austral de Chile.
- Pasin, B. L. (2014). *Estudio de la gelificación de alginatos para encapsulación: caracterización, preparación y aplicaciones en alimentos funcionales*. Universitat de Barcelona.
- Pawlowska, A. M., Oleszek, W., & Braca, A. (2008). Quali-quantitative analyses of flavonoids of *Morus nigra* L. and *Morus alba* L. (Moraceae) fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(9), 3377–3380.
- Pereira, E., Barros, L., Calhella, R. C., Dueñas, M., Carvalho, A. M., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. F. R. (2014). Bioactivity and phytochemical characterization of *Arenaria Montana* L. *Food and Function*, 5(8), 1848–1855.
- Pinela, J., Barros, L., Carvalho, A. M., & Ferreira, I. C. F. R. (2012). Nutritional composition



- and antioxidant activity of four tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) farmer' varieties in Northeastern Portugal homegardens. *Food and Chemical Toxicology*, 50(3–4), 829–834.
- Pinzón-Zárate, L. X., Hleap-Zapata, J. I., & Ordóñez-Santos, E. L. (2015). Análisis de los parámetros de color en salchichas Frankfurt adicionadas con extracto oleoso de residuos de chontaduro (*Bactris Gasipaes*). *Información Tecnológica*, 26(5), 45–54.
- Proaño, C. (2015). *Elaboración de un refresco de mortiño (Vaccinium floribundum)*. Universidad Tecnológica Equinoccial.
- Rojano, B., Zapata, I., Alzate, A., Mosquera, A., Cortés, F., & Gamboa, L. (2011). Polifenoles y actividad antioxidante del fruto liofilizado de palma naidi (Açaí Colombiano) (*Euterpe oleracea* Mart). *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 64(2), 6213–6220.
- Rueda-Enriquez, S., Sanchez-Vega, E., & Lara-Sagahón, A. (2015). Queso Petit-Suisse de arándano azul con prebióticos. In M. Ramirez (Ed.), *Tendencias de innovación en la ingeniería de alimentos* (1ra ed., pp. 139–165). OmniaScience.
- Saénz, C., Tapia, S., Chávez, J., & Robert, P. (2009). Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*). *Food Chemistry*, 114(2), 616–622.
- Sánchez-Salcedo, E. M., Sendra, E., Carbonell-Barrachina, Á. A., Martínez, J. J., & Hernández, F. (2016). Fatty acids composition of Spanish black (*Morus nigra* L.) and white (*Morus alba* L.) mulberries. *Food Chemistry*, 190, 566–571.
- Sánchez, R. (2013). La química de los colorantes en los alimentos. *Química Viva*, 12(3), 234–246.
- Sharma, V., McKone, H. T., & Markow, P. G. (2011). A global perspective on the history, use, and identification of synthetic food dyes. *Journal of Chemical Education*, 88(1), 24–28.
- Soković, M., Glamočlija, J., Marin, P. D., Brkić, D., & Van Griensven, L. J. L. D. (2010). Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an in vitro model. *Molecules*, 15(11), 7532–7546.
- Soković, M., & Van Griensven, L. J. L. D. (2006). Antimicrobial activity of essential oils and their components against the three major pathogens of the cultivated button mushroom, *Agaricus bisporus*. *European Journal of Plant Pathology*, 116(3), 211–224.
- Souza, A. (2012). *Análise microestrutural da polpa de amora-preta (Rubus spp.) co-*



cristalizada por sacarose. Dspace. Universidade Federal do Paraná.

- Suárez, M., Yazán, E., & Narváez, G. (2016). *Influencia de la estabilización por copigmentación intermolecular sobre la capacidad antioxidante de antocianinas del fruto de Vaccinium floribundum Kunth. infoANALITICA* (Vol. 6).
- Takebayashi, J., Iwahashi, N., Ishimi, Y., & Tai, A. (2012). Development of a simple 96-well plate method for evaluation of antioxidant activity based on the oxidative haemolysis inhibition assay (OxHLIA). *Food Chemistry*, 134(1), 606–610.
- Téllez, A. (2009). *Solubilización y estabilidad de las microemulsiones del colorante natural Neocandentona. Instituto Politécnico Nacional Escuela Superior De Comercio Y Administración Sección De Estudios De Posgrado E Investigación Unidad Santo Tomás. Instituto Politécnico Nacional.*
- Tonioni, G., Santos, T. R., Macedo, R., Peters, V. M., Narciso, M., da Silveira, R. de C., & Guerra, M. de O. (2011). Efficacy of *Morus nigra* L. on reproduction in female Wistar rats. *Food and Chemical Toxicology*, 50(3–4), 816–822.
- Tormo, R. (2014). *Morus nigra* L. (Moraceae). Retrieved from http://www.plantasyhongos.es/herbarium/htm/Morus_nigra.htm
- Türkyılmaz, M., Hamzaoğlu, F., & Özkan, M. (2019). Effects of sucrose and copigment sources on the major anthocyanins isolated from sour cherries. *Food Chemistry*, 281, 242–250.
- Villa-García, M., Martín-Martínez, E., & Pedroza-Islas, R. (2015). Liposomas como nanotransportadores de antioxidantes y estudio de tasa de liberación. In M. Ramírez (Ed.), *Tendencias de innovación en la ingeniería de alimentos* (1ra ed., pp. 215–250). OmniaScience.
- Wajs-bonikowska, A., Stobiecka, A., Bonikowski, R., Krajewska, A., Sikora, M., & Kula, J. (2017). A comparative study on composition and antioxidant activities of supercritical carbon dioxide, hexane and ethanol extracts from blackberry (*Rubus fruticosus*) growing in Poland. *J Sci Food Agric.*, 97(11), 3576–3583.
- Wu, X., & Prior, R. L. (2005). Systematic Identification and Characterization of Anthocyanins by HPLC-ESI-MS / MS in Common Foods in the United States : Fruits and Berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2589–2599.



- Wu, Z., Zhe-Kun, Z., & Gilbert, M. (2004). *Morus nigra* Linnaeus. China: Flora of China. Retrieved January 4, 2019, from http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=2&taxon_id=220008839
- Xiong, S., Melton, L. D., Easteal, A. J., & Siew, D. (2006). Stability and antioxidant activity of black currant anthocyanins in solution and encapsulated in glucan gel. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(17), 6201–6208.
- Zapata, L. M. (2014). *Obtención de extracto de antocianinas a partir de arándanos para ser utilizado como antioxidante y colorante en la industria alimentaria*. Universidad Politécnica de Valencia.
- Zhang, X., Yang, Y., & Zhao, D. (2011). Effect of blueberry on spreadable processed cheese. *Journal of Northeast Agricultural University (English Edition)*, 18(2), 73–78.
- Zhao, Y. (2007). *Berry Fruit: Value-Added Products for Health Promotion*. London, New York: CRC Press.
- Zhong, Y., & Shahidi, F. (2015). *Methods for the assessment of antioxidant activity in foods. Handbook of Antioxidants for Food Preservation*. Elsevier Ltd.
- Zia-Ul-Haq, M., Riaz, M., De Feo, V., Jaafar, H. Z. E., & Moga, M. (2014). Rubus fruticosus L.: Constituents, biological activities and health related uses. *Molecules*, 19(8), 10998–11029.