

**UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**IMPACTO DEL PROCESO DE MICROFILTRACIÓN TANGENCIAL SOBRE EL
VALOR DE LA MORA (*Rubus spp*) COMO ALIMENTO FUNCIONAL.**

Tesis sometida a la consideración de la
Comisión del Programa de Estudios de
Posgrado en Ciencia de Alimentos para optar
al grado de Magister Scientiae en
Ciencia de Alimentos

SONIA COZZANO FERREIRA

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2007

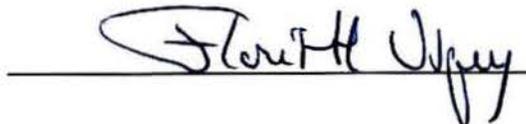
Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencia de Alimentos de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado de Magister Scientiae.

Los miembros del Tribunal y el candidato, fueron en el siguiente orden:

M.Sc. Ruth de la Asunción Romero
Representante del Decano del SEP



M.Sc. Floribeth Viquez Rodriguez
Director de Tesis



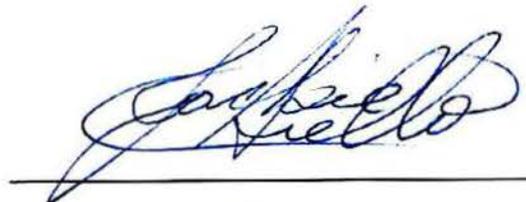
Dra. Ana Mercedes Pérez Carvajal
Asesor



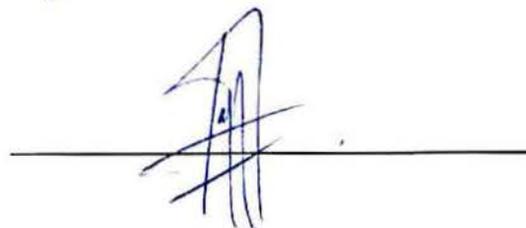
Dr. Fabrice Vaillant Barka
Asesor



M.Sc. Jacqueline Aiello Ramírez
Directora del Programa de
Posgrado en Ciencia de Alimentos



Ing. Agr. Sonia Cozzano Ferreira
Candidata



A nuestras familias quienes nos alentaron a emprender esta aventura y estuvieron con nosotros compartiendo y festejando cada etapa cumplida.

A mis sobrinitos Germán, Sabrina, Sofía, Santiago y Lucía, cuyos pequeños grandes cambios me perdí de ver, pero a quienes espero contagiar en la aventura de estudiar y conocer “nuevos mundos”.

A Gaby mi amor, mi cómplice y todo...

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA) y al Posgrado en Ciencia de Alimentos de la Universidad de Costa Rica, por haberme permitido esta oportunidad de desarrollo profesional y personal.

Al proyecto "Producing added value from under-utilised tropical fruit crops with high commercial potential" (PAVUC), en cuyo marco se desarrolló éste trabajo.

A Gisela Kopper, Ruth de la Asunción, Jacqueline Aiello y Floribeth Viquez, por haber confiado en mí a la distancia aún antes de conocernos...

A todos los profesores de la Maestría, quienes a lo largo de estos dos años en tierras Ticas me acompañaron y estimularon mi desarrollo en las diferentes áreas, regalándome una gran maleta de conocimientos.

A los profesores que me acompañaron en la recta final: Fabrice Vaillant (*por la contundencia de sus observaciones*), Ana Mercedes Pérez (*por su calidez, y por enseñarme que la solución a un gran problema está en verlo como varios pequeñitos*), Floribeth Viquez (*por su fortaleza que me transmitió constante confianza y estímulo*) y muy especialmente a Óscar Acosta (*quién me acompañó diariamente haciendo las más increíbles peripecias para hacer este trabajo posible*).

A Yanine Chan y Mady Cissé, gracias por compartir su experiencia y ahorrarme algunos tropezones!!!

A los compañeros del Laboratorio de química del CITA: Gera, Mariela, Ale, María, Deisy y muy especialmente a Randall Cordero y a María Laura Montero porque su compromiso y esfuerzo fueron imprescindibles para terminar a tiempo.

A los Asistentes del proyecto PAVUC, Kattia Herrera y Manuel Montero por su muy gentil asistencia en la parte práctica.

A Jairol Bustos por su apoyo técnico y especialmente a Doña Marielus Torres quién con gran paciencia y ternura me ayudó a correr algunas piedras que se presentaron en mi camino.

A Marco Vinicio (del CIA) por su importante apoyo en la primera etapa del trabajo.

A la dupla fantástica, Alonso y Camacho, quienes me apoyaron en las labores más pesadas de este trabajo.

A Giovanni González por su espíritu colaborador, amistad y generosidad; a todo el personal de la Escuela de Tecnología de Alimentos y del CITA, por recibirme diariamente con una afectuosa sonrisa, Pura vida!

A los "Megafiesteros" mis compañeros y amigos de la maestría con quienes he compartido infinidad de historias que formarán parte de mis futuras nostalgias.

A Vanesa López, "mi compinche" con quién hemos compartido largas jornadas de estudio en estos dos años, pero también hemos disfrutado y cultivado una gran amistad.

A nuestra tía Edel y a toda la familia Solis por brindarnos el condimento imprescindible, el calor de familia, para que esta receta fuera perfecta!

Por todo lo que nos une . . . pura vida!

ÍNDICE

Tribunal examinador.....	i
Dedicatoria.....	ii
Agradecimientos.....	iii
ÍNDICE.....	2
ÍNDICE de CUADROS.....	5
ÍNDICE FIGURAS.....	6
RESUMEN.....	7
INTRODUCCIÓN.....	8
I. JUSTIFICACIÓN.....	9
II. OBJETIVOS.....	14
2.1 Objetivo general.....	14
2.2 Objetivos específicos.....	14
III. MARCO TEÓRICO.....	15
3.1 Características botánicas y agronómicas de la mora.....	15
3.1.1 Clasificación taxonómica y morfología de la mora.....	15
3.1.2 Origen del cultivo de mora.....	18
3.1.3 Situación nacional: características de la producción de mora en Costa Rica y variedades explotadas.....	18
3.1.4 Características generales de la variedad "Vino" costarricense.....	20
3.2 Características morfológicas y bioquímicas de la pared celular de la fruta.....	21
3.3 Principales enzimas para la degradación de la pared celular.....	24
3.3.1 Pectinasas.....	24
3.3.2 Celulasas.....	25
3.4 Principales compuestos benéficos para la salud presentes en la mora y su evolución a lo largo del desarrollo del fruto.....	26
3.4.1 Compuestos bioactivos.....	26
3.4.2 Evolución de los compuestos antioxidantes lo largo del desarrollo del fruto.....	36
3.5 Características generales de las tecnologías de membranas y pretratamientos enzimáticos.....	39
3.5.1 Tecnología de membranas.....	39
3.5.2. El proceso de microfiltración tangencial.....	41
3.5.3 Principales variables de control del proceso de microfiltración tangencial (MFT).....	43
3.5.4 Pretratamiento enzimático.....	45
IV METODOLOGÍA.....	47
4.1 Localización.....	47
4.2 Materia prima.....	47
4.3 Escala de madurez del fruto y plan de cosecha.....	48

4.4 Caracterización físico química según estado de madurez del fruto.....	48
4.4.1 Análisis de la fruta fresca entera.	49
4.4.2 Análisis de la fruta homogenizada liofilizada.....	52
4.5 Caracterización química de la pared celular de la mora.....	52
4.6 Determinación del preparado enzimático y la concentración de enzima a utilizar para la licuefacción de la pared celular de la mora variedad Vino durante el proceso de microfiltración tangencial.	54
4.6.1 Diseño experimental.	54
4.6.3 Preparación de la materia insoluble en alcohol y agua (MIAA) para el tratamiento enzimático.	55
4.7 Aplicación del pretratamiento enzimático para la obtención de jugo clarificado de mora mediante microfiltración tangencial y evaluación de su efecto sobre las propiedades funcionales.	57
4.7.1 Ensayos.....	57
4.7.1 Ensayos.....	58
4.7.3 Evaluación	58
 V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	 60
5.1 Caracterización físico-química y como alimento funcional de la mora (<i>Rubus spp</i>) a diferentes estados de madurez.....	60
5.1.1 Influencia del grado de madurez sobre las características fenotípicas de la mora.....	60
5.1.2 Influencia del grado de madurez sobre la composición química de la mora.	62
5.1.3 Influencia del grado de madurez de la mora sobre la capacidad antioxidante (ORAC), contenido de polifenoles totales, antocianinas totales y vitamina C.	67
5.2 – Caracterización de la pared celular de la mora y resultados de su hidrólisis enzimática.	75
5.3 Licuefacción enzimática de la pared celular	79
5.4 Microfiltración tangencial del jugo de mora.....	85
5.4.1 Comportamiento general de la mora durante el proceso de microfiltración tangencial.....	85
5.4.2 - Características físico-químicas del jugo de mora en cada etapa del proceso de MFT.....	91
5.4.3 - Efecto del proceso de microfiltración tangencial sobre las propiedades antioxidantes del jugo de mora.	96
 VI. CONCLUSIONES	 101
 VII. BIBLIOGRAFÍA.....	 105
 VIII. ANEXOS	 112
8.1 Métodos de análisis químicos y físicos	112
8.1.1 Peso (g) de la fruta entera	112
8.1.2 Dimensiones de cada fruta	112
8.1.3 Color por Hunter L* a* b*	112
8.1.4 Acidez titulable	112
8.1.5 Determinación de pH.....	112
8.1.6 Grados Brix	112

8.1.7	Determinación de cenizas totales	112
8.1.8	Determinación de azúcares totales	113
8.1.9	Fibra dietética total por método enzimático.....	113
8.1.10	Polifenoles totales, azúcares reductores y cuantificación de vitamina C....	114
8.1.11	Capacidad antioxidante método ORAC	116
8.1.12	Determinación de antocianinas totales.....	117
8.1.13	Determinación del contenido de proteínas.....	117
8.1.14	Humedad	118
8.1.15	Grasa cruda por extracto etéreo	118
8.1.16	Carbohidratos totales + Lignina	118
8.1.17	Material insoluble en alcohol (MIA) de mora	119
8.1.18	Pectina soluble	120
8.1.19	Material insoluble en alcohol y agua (MIAA)	121
8.1.20	Determinación del contenido de almidón de la MIAA.....	123
8.1.21	Determinación de lignina en la MIAA de mora	123
8.1.22	Determinación de fibras insolubles: hemicelulosa y celulosa de la MIAA...	125
8.1.23	Proteólisis del material insoluble en alcohol.....	127
8.1.24	Amilólisis del material insoluble en alcohol	127
8.1.25	Hidrólisis enzimática del MIAA de mora.	128
8.1.26	Determinación de ácido galacturónico (AGU)	130
8.1.27	Determinación de azúcares totales por el Método de Antrona	132
8.2	Comparación de los resultados de caracterización físico-química y de actividad antioxidante de la mora costarricense respecto a otras variedades y especies.	136
8.3	Actividades enzimáticas de los preparados comerciales ¹	138

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1	Contenidos promedio o rangos reportados para polifenoles totales, antocianinas totales y capacidad antioxidante en mora.....	32
Cuadro 2	Métodos de análisis más frecuentes utilizados para análisis de polifenoles totales, antocianinas totales y capacidad antioxidante de mora.....	33
Cuadro 3	Rangos promedios para capacidad antioxidante, antocianinas y fenoles según la escala de madurez definida para mora (vr. Chester, Hull y Triple Crown).....	37
Cuadro 4	Características de los principales procesos de membrana.....	41
Cuadro 5	Síntesis de los principales métodos de análisis utilizados.....	50
Cuadro 6	Caracterización fenotípica de la mora según escala de madurez propuesta.....	62
Cuadro 7	Caracterización química de la mora según escala de madurez propuesta.....	64
Cuadro 8	Contenido de antioxidantes naturales, Vit.C, y actividad antioxidante (ORAC) de la mora costarricense variedad vino.....	68
Cuadro 9	Principales componentes de la pared celular de la mora costarricense expresados como % (p/p) de MIA (material insoluble en alcohol) y de MIAA (material insoluble en alcohol y agua purificada).....	77
Cuadro 10	Principales componentes de la pared celular de la mora costarricense expresados como % (p/p) de fruta fresca y jugo pulposo sin semilla.....	78
Cuadro 11	Porcentaje de ácido galacturónico (%AGU) y azúcares neutros (%AN) liberados como resultado de la hidrólisis de la pared celular.....	81
Cuadro 12	Cambios en la turbidez del jugo durante la primera etapa del proceso de microfiltración tangencial.....	86
Cuadro 13	Análisis de repetibilidad de los ensayos de MFT.....	91
Cuadro 14	Cambios en la turbidez del jugo durante la segunda etapa del proceso de microfiltración tangencial.....	92
Cuadro 15	Efecto del tratamiento enzimático del jugo de mora sobre sus propiedades físico-químicas.....	94
Cuadro 16	Efecto de la membrana de filtración tangencial sobre las propiedades físico-químicas del jugo.....	94
Cuadro 17	Efecto del pretratamiento enzimático sobre el contenido de antocianinas totales, polifenoles totales y capacidad antioxidante.....	97
Cuadro 18	Efecto del pasaje del jugo a través de la membrana sobre el contenido de antocianinas totales, polifenoles totales y capacidad antioxidante.....	97
Cuadro 19	Comparación del contenido y capacidad antioxidante de la mora costarricense vs. otras variedades.....	136

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Caracterización morfológica de la mora.....	17
Figura 2	Estructura básica de la pared celular.....	22
Figura 3	Flavonoides. Estructura básica y tipos.....	28
Figura 4	Principio de la microfiltración tangencial.....	42
Figura 5	Sucesión de análisis realizados para la cuantificación de los componentes de la pared celular de la mora.....	53
Figura 6	Diagrama de flujo realizado para la selección del preparado enzimático comercial de mejor comportamiento en la licuefacción de la MIAA de mora.....	56
Figura 7	Esquema simplificado de la unidad piloto de microfiltración tangencial.....	57
Figura 8	Diagrama del proceso realizado para la obtención de jugo clarificado de mora.....	59
Figura 9	(Foto) Color de la mora según la escala de madurez propuesta.....	60
Figura 10	Contenido y evolución de carbohidratos totales en base al peso seco según estado de madurez de la mora.....	67
Figura 11	Correlación entre el contenido de polifenoles totales, antocianinas totales y capacidad antioxidante (ORAC).....	72
Figura 12	Correlación entre los parámetros que definen el color de la mora y el contenido de antocianinas en base fresca.....	73
Figura 13	Diagrama de aislamiento de las diferentes fracciones de la pared celular de la mora.....	75
Figura 14	Evolución del porcentaje de ácido galacturónico (%AGU) en función del tipo y concentración de preparado comercial utilizado.....	82
Figura 15	Evolución del porcentaje de azúcares neutros (%AN) en función del tipo y concentración de preparado comercial utilizado.....	83
Figura 16	Porcentaje de hidrólisis total de la mora según preparado comercial y concentración.....	83
Figura 17	Flujo de permeado y Factor de Reducción Volumétrico (FRV) del jugo de mora a través del tiempo de microfiltración tangencial.....	85
Figura 18	Evolución del flujo de permeado en función del FRV corregido por turbidez.....	87
Figura 19	Correlación entre el Factor de Reducción Volumétrico (FRV) y turbidez del retenido obtenido durante la clarificación por microfiltración tangencial.....	90
Figura 20	Procedimiento empleado para la cuantificación de los polifenoles totales, azúcares reductores y Vit. C en muestras de mora homogeneizada y liofilizada.....	115
Figura 21	Comparación del contenido de sólidos solubles y acidez de la mora costarricense vs otras variedades al estado maduro.....	136
Figura 22	Capacidad antioxidante de la mora costarricense respecto a otras especies en estado maduro.....	137
Figura 23	Capacidad antioxidante de la mora costarricense respecto a otras variedades en estado maduro.....	137

RESUMEN

La presente investigación procuró abordar la caracterización de la mora costarricense (*Rubus spp.*) desde el punto de vista de sus propiedades como alimento funcional, y en particular, la forma en que dicha funcionalidad se mantiene a través del proceso de industrialización de jugo clarificado por la técnica de microfiltración tangencial.

Se estableció una escala de maduración de la mora que logra relacionar la apariencia exterior de la fruta con su composición físico-química, y en particular con el contenido en antocianinas y polifenoles, y capacidad antioxidante (ORAC).

Fue caracterizada la pared celular de la mora, donde se destaca el alto contenido de pectinas insolubles (39%), de hemicelulosa (23%), de lignina (14,5%) y un resultado relativamente bajo de celulosa (13,5%).

Se probaron tres preparados enzimáticos para hidrolizar la pared celular de la mora, de manera de obtener un mejor rendimiento de flujo durante la fase posterior de microfiltración. El mejor tratamiento está asociado con el uso de Klerzyme 150 ®, a una concentración de 100ppm, obteniéndose un flujo de permeado promedio de 82 L/h.m².

La cantidad de polifenoles totales y antocianinas del jugo pulposo no cambió significativamente en su pasaje a través de la membrana. En el jugo clarificado de mora se recuperaron el 96% de las antocianinas y el 95% de los polifenoles. Sin embargo, la capacidad antioxidante (ORAC) fue de un 77,5% respecto al jugo pulposo (en base seca).

El uso de membranas de microfiltración tangencial para la elaboración de jugo de mora, es una buena alternativa, tanto desde el punto de vista del mantenimiento de las propiedades antioxidantes de la fruta, como desde el punto de vista de su factibilidad técnica.

INTRODUCCIÓN

Este documento presenta el trabajo de investigación realizado para la obtención del título de Magister Scientiae de la Maestría en Ciencia de Alimentos de la Universidad de Costa Rica, IMPACTO DEL PROCESO DE MICROFILTRACIÓN TANGENCIAL SOBRE EL VALOR DE LA MORA (*Rubus spp*) COMO ALIMENTO FUNCIONAL.

Aborda un tema de estudio de potencial interés para Costa Rica, como lo es el fruto de la mora (*Rubus spp.*) cuyas propiedades benéficas desde el punto de vista de la salud, han sido abordadas por primera vez en el país mediante la determinación de su contenido en compuestos antioxidantes, además de analizar nuevas alternativas de procesamiento a partir de la introducción de tecnologías de membranas, como lo es la microfiltración tangencial (MFT).

El documento se divide en seis capítulos principales. El primero de ellos aborda la justificación del trabajo, tanto por las propiedades como alimento funcional de las frutas y en particular la mora, como en cuanto a la tecnología que se utilizó para su procesamiento como jugo clarificado. En el segundo capítulo se presentan los objetivos. El tercer capítulo introduce los principales aspectos teóricos de referencia del trabajo, tanto desde una perspectiva botánica como bioquímica del fruto, así como la tecnología utilizada y sus características. El cuarto capítulo explica la metodología de investigación. Los resultados y su discusión son presentados en el quinto capítulo. Por último, en el sexto capítulo se plantean las principales conclusiones del trabajo.

Es deseo de la autora que este trabajo sea de interés y utilidad para quienes se encuentran interesados en alternativas saludables para el procesamiento de alimentos y opciones de producción e industrialización de frutas.

I. JUSTIFICACIÓN

En los últimos años se ha incrementado la atención puesta sobre el rol en la salud de los alimentos consumidos. Según Nicoli *et al.*, (1999), estamos en medio de una revolución que está cambiando el concepto de alimento y la forma de alimentarnos. En adición a sus propiedades nutricionales y sensoriales, los alimentos han sido recientemente reconocidos por su acción como agentes protectores contra enfermedades.

La creciente comprensión de la relación existente, entre los alimentos consumidos y las repercusiones positivas y negativas que éstos ejercen en nuestra salud, han derivado en un nuevo paradigma, el de la "dieta-salud". En este sentido, se pone cada vez más énfasis sobre los aspectos positivos de la dieta, a tal punto, que actualmente se asume el estatus de "alimento funcional" cuando estos ofrecen beneficios fisiológicos adicionales a los requerimientos básicos nutricionales (Kaur & Kapoor, 2001).

Distintos estudios epidemiológicos han probado consistentemente la asociación significativamente positiva que existe entre la ingesta de frutas y hortalizas y la prevención y reducción de la mortalidad por enfermedades coronarias, cánceres comunes y enfermedades degenerativas (arteriosclerosis, artritis, alzheimer) propias del envejecimiento (Szeto *et al.*, 2004; Kaur & Kapoor, 2001; Havsteen, 2002).

Según la FAO y la OMS (2003), se estima que la ingesta insuficiente de frutas y hortalizas es responsable de 2,7 millones de muertes cada año, y figura entre los 10 principales factores de riesgo contribuyentes a la carga de mortalidad que se enumeran en el "Informe sobre la salud en el mundo para el 2002".

"Se estima que la baja ingesta de frutas y hortalizas es responsable del 31% de las cardiopatías isquémicas y del 11% de los accidentes cardiovasculares que se registran en el mundo. El Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (CIIC) de la OMS calcula que el porcentaje de casos de cáncer prevenibles causados por una baja ingesta de frutas y

hortalizas oscila entre un 5% y un 12% respecto de todos los cánceres, y entre un 20% y un 30% respecto de los cánceres del tracto gastrointestinal superior” (FAO-OMS, 2003).

En los últimos años ha venido aumentando el conocimiento acerca de los diferentes compuestos bioactivos presentes en frutas, hortalizas, cereales, semillas, vino, té, plantas aromáticas, etc., los que les otorgan la capacidad de promover la buena salud y prevenir o aliviar enfermedades. Entre estos compuestos se encuentran principalmente los antioxidantes naturales (antocianinas, flavonoides, ácido ascórbico, carotenoides y tocoferoles), las fibras y otros compuestos biológicos (Dimitrios, 2006; Wrolstad, 2004; Nijveldt *et al.* 2001; Havsteen, 2002; Martínez-Flores *et al.*, 2002; Kaur & Kapoor, 2001).

En Costa Rica, estas preocupaciones no solo atienden a los nuevos hábitos de vida y de consumo (Ronderos, 2006) sino a las nuevas posibilidades de generación de riquezas a partir de productos que satisfagan estas nuevas demandas.

En este campo, son importantes los estudios en torno al procesamiento de frutas autóctonas que mantengan su capacidad antioxidante en el producto desarrollado, tal como es crecientemente requerido en el mercado. Por este motivo es muy importante contemplar el tipo de procesamiento que se escogerá, ya que este afecta el contenido, la actividad y la bio-disponibilidad de los compuestos naturales de las frutas y hortalizas (Nicoli *et al.*, 1999). El desarrollo de productos en base a frutas, tendientes a mantener la mayor cantidad y calidad de sus compuestos bioactivos, representa una forma congeniada con el ritmo actual de vida y el consumo diario de frutas.

La elaboración de jugos a partir de frutas encuentra un espacio interesante en este nicho de mercado y en consecuencia, la demanda ha ido en aumento siendo su producción una actividad altamente competitiva (Vaillant *et al.* 2004; Faigh, 1995). Los jugos clarificados se caracterizan principalmente por su transparencia y homogeneidad lo cual se logra por una remoción complementaria de los sólidos en suspensión (Vaillant, 2000). El jugo clarificado de manzana ha sido el pionero en el mercado mundial (Girard & Fukumoto, 2000), Sin embargo, existen muchos nichos de mercado para frutas tropicales o alimentos funcionales como sería

el caso de la mora, que aún no han sido explorados a escala industrial con tecnologías amigables tanto con el ambiente como con los componentes propios del producto a procesar.

En este sentido la utilización de tecnologías de membranas aparece como una “ventana” competitiva caracterizada por el logro de productos de excelente calidad.

Las tecnologías de membranas, y en particular la microfiltración tangencial, presenta múltiples ventajas para que sea adoptada por la industria de alimentos, ya que no requiere grandes espacios físicos y puede ser adaptada a distintas capacidades de procesamiento, siendo el costo de inversión del equipo proporcional a la superficie de membrana involucrada (Sharma *et al.*, 2003).

En cuanto a la calidad de los productos obtenidos, estos son organoléptica, microbiológica, y nutricionalmente superiores a los logrados con los procesos tradicionales de obtención de jugos (Vaillant *et al.*, 2004). Esto se debe a que la tecnología de membranas utiliza temperatura ambiente o bajas temperaturas, lo que minimiza los daños térmicos de los componentes sensibles, permitiendo una mejor calidad general y la conservación de sabores, vitaminas y componentes del aroma, entre otros (Sharma *et al.*, 2003; Girard & Fukumoto, 2000).

El empleo de membranas para la clarificación de jugos de frutas es una tecnología que se considera aún en desarrollo y aunque ya existe mucha información a nivel experimental, son muy pocos los desarrollos realizados con frutas tropicales a escala industrial, sobre todo en la industria costarricense.

La microfiltración tangencial (como único proceso o acoplada a otros procesos membrenarios) se ha empleado con gran éxito en la clarificación de jugos de diferentes frutas, tales como: naranja (Cissé *et al.*, 2005), maracuyá (Vaillant *et al.*, 1999), melón (Vaillant *et al.*, 2005 a), manzana (Carneiro *et al.*, 2005) y maracuyá (Carvalho *et al.*, 2002). Sin embargo, a la fecha, no hay estudios publicados sobre el uso de esta tecnología en la clarificación de jugo de mora, ni del efecto de este procesamiento sobre sus componentes bioactivos, lo que representaría

un gran aporte científico- tecnológico pensando en una futura implementación en la industria nacional en pro de nuevos horizontes de mercado.

Son conocidos los fenómenos de colmatación de la membrana (Girard & Fukumoto, 2000) ocasionados por los sólidos insolubles de la mayoría de las frutas pulposas, que hace necesario la utilización de un pretratamiento enzimático para lograr una adecuada licuefacción de algunas fracciones de la pared, de manera de poder aumentar los rendimientos (Vaillant *et al.*, 1999). Dado el poco conocimiento específico de estos procesos utilizando la mora como sustrato, es necesaria una evaluación completa de este aspecto. Esta evaluación incluirá como primer paso, el conocer los componentes de la pared celular responsables de la colmatación, para luego definir cuál será el preparado enzimático que permita obtener mejores rendimientos durante el proceso de obtención de jugo clarificado.

La mora es un fruto perteneciente al género *Rubus* de la vasta familia de las *Rosáceas*, que se caracteriza por un alto contenido en compuestos fenólicos, antocianinas y vitaminas, los que ofrecen grandes beneficios para la salud, debido al poder antioxidante que ejercen en nuestro organismo. Los componentes antioxidantes presentes en distintas variedades de mora, principalmente híbridos comerciales, han sido estudiados con gran interés en los últimos años (Fan-Chiang & Wrolstad, 2005; Siriwoham & Wrolstad 2004; Siriwoham *et al.*, 2004; Benbenuti *et al.*, 2004; Moyer *et al.*, 2002; Sellappan *et al.*, 2002; Wang & Lin, 2000).

En Costa Rica, el cultivo de mora integra a más de 800 familias y se estima que el área total de cultivo oscila entre las 600 y 800 hectáreas (Castro & Cerdas, 2005). Reviste particular importancia la caracterización de los componentes benéficos para la salud de la variedad de mora "vino", debido a que se trata de la más extendida en el país, y la que cuenta con mayor aceptación por parte de los consumidores (Flores *et al.*, 2003). Este conocimiento otorgará sin lugar a dudas, beneficios promocionales desde el punto de vista comercial tanto a nivel nacional como internacional.

Aunque la mora como fruta fresca se consume en estado maduro, las características del cultivo asociadas a la gran amplitud de período de cosecha, hacen muy difícil lograr lotes de

frutas totalmente homogéneas en un solo estado. Por tal motivo, la presente investigación procurará evaluar su composición fisico-química a diferentes estados de madurez. Esto permitirá una mejor selección de la materia prima a utilizarse en el desarrollo de jugos u otros alimentos funcionales a partir de mora.

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Determinar el potencial de la mora como alimento funcional, a diferentes estados de madurez y las condiciones de pretratamiento enzimático óptimas de la pulpa para la producción de jugo clarificado por microfiltración tangencial.

2.2 Objetivos específicos

- 2.2.1 Determinar el potencial nutricional de la mora fresca y sus propiedades como alimento funcional, a diferentes estados de madurez.
- 2.2.2 Cuantificar y caracterizar la pared celular de la mora y determinar el efecto de preparados enzimáticos comerciales sobre la hidrólisis de los componentes parietales.
- 2.2.3 Definir las condiciones de pretratamiento enzimático para la obtención de un jugo clarificado mediante microfiltración tangencial.
- 2.2.4 Evaluar el efecto del proceso de microfiltración tangencial sobre los compuestos antioxidantes de la mora (polifenoles, antocianinas, vitamina C y capacidad antioxidante (ORAC)).

III. MARCO TEÓRICO

3.1 Características botánicas y agronómicas de la mora

3.1.1 Clasificación taxonómica y morfología de la mora.

El género *Rubus* de la extensa familia de las Rosáceas, contiene un amplio grupo de especies de pequeños frutos, dentro del cual se encuentra la mora. La mora, o zarza, o zarza-mora, es el nombre que vulgarmente recibe en diferentes partes del mundo un grupo de especies de este género. Dada la importante distribución geográfica de esta planta, son muchas las especies que reciben el nombre de mora o hacen referencia a este fruto.

La mora, se describe como una planta con hojas de bordes dentados tri o pentafoliadas dependiendo de la especie y estado de desarrollo. En igual sentido, las inflorescencias pueden ser de color blanco o moradas, de posición axial o terminal, con cinco pétalos y sépalos (Flores *et al.*, 2003).

Las plantas de moras se clasifican por sus hábitos de crecimiento en: arbustivo o erecto (crecen hacia arriba, presentan entrenudos largos y pocas ramificaciones laterales), semierecto (los tallos son similares a los anteriores pero caen por su peso) y de crecimiento rastrero (sus tallos son más herbáceos con entrenudos cortos que no tienen tendencia a subir). El ciclo de vida del cultivo de mora es perenne, lo que permite que exista producción casi todo el año (Castro & Cerdas, 2005; Flores & Argüello, 2005; Flores *et al.*, 2003; Franco & Giraldo, 1999). Sin embargo, la mayor producción en Costa Rica ocurre en los meses de marzo y abril (Flores *et al.*, 2003; Cerdas & Montero, 1992).

La mora es un fruto agregado, es decir que proviene de una sola flor pero con múltiples ovarios sobre la superficie de un receptáculo único (Figura 1). Cada una de las flores dará origen a un fruto individual del tipo drupa, o drupeola. Es por esta razón que la mora es considerada una polidrupa (Ryugo, 1993).

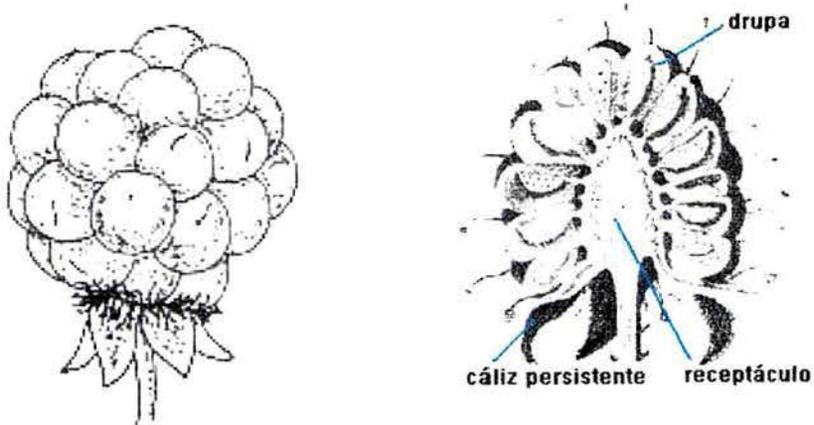
Las pequeñas drupas se encuentran unidas al receptáculo caroso del cual no se desprenden al momento de la cosecha (Flores & Argüello, 2005; Flores *et al.*, 2003). Dichas polidrupas pueden presentar de 30 a 90 frutos cada una, pueden ser de forma redondeada o elipsoidal, de color rojo a morado oscuro, de sabor más o menos ácido y de un peso variable en torno a los 3g, dependiendo de la variedad y del estado de desarrollo (Castro & Cerdas, 2005; Flores & Argüello, 2005).

La drupa es un tipo de fruto que se caracteriza por tener un mesocarpo caroso, fibroso o correoso y su endocarpo lignificado o endurecido (es el caso típico del durazno). Al interior de este conjunto (llamado pericarpo) se encuentra la semilla.

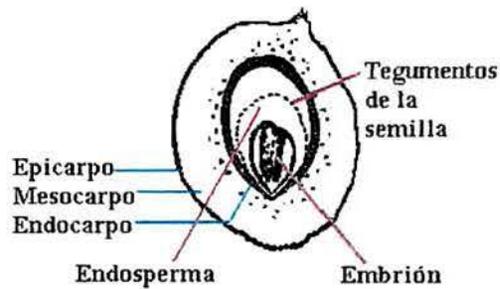
A diferencia de la frambuesa, las moras son glabras y sus drupeolas pueden ser separadas unas de otras. También es característico de la mora el no desprenderse del receptáculo, así como mantener el cáliz, y el pedúnculo al menos si la fruta es cosechada con menos de 8°Brix (Castro & Cerdas, 2005), elementos que deben tenerse en consideración a la hora de la cosecha para no forzar la fruta.

Desde el punto de vista de este trabajo, estas características deben ser tenidas en cuenta, ya que lo que finalmente se consume, y se procesa de la mora, es este conjunto de partes florales comestibles y las drupeolas.

ESQUEMA DE UNA POLIDRUPA



ESQUEMA DE UNA DRUPEOLA (DRUPA DE UNA POLIDRUPA)



FRUTO DE RUBUS Spp.



Fuentes: adaptado de <http://www.biologia.edu.ar/botanica/tema6/image6/rubusdib.gif> y <http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/ibc99/botanica/botanica/bw/rubulm.gif>

Figura 1 – Caracterización morfológica de la mora.

3.1.2 Origen del cultivo de mora

Las moras son nativas de Asia, Europa, América del Norte y del Sur (Anónimo, s.f.) En las zonas altas del Centro y Sur de América se encuentran cultivos de moras silvestres (Castro & Cerdas, 2005, Flores *et al.*, 2003).

Históricamente la mora ha sido considerada un fruto con múltiples propiedades nutricionales y medicinales (Castro & Cerdas, 2005). En Europa estos frutos han sido utilizados por más de 2000 años con propósitos medicinales (Anónimo, s.f.). Esto se debe a que la fruta se caracteriza por poseer un alto contenido de antioxidantes, vitamina C y fibra (Castro & Cerdas, 2005).

3.1.3 Situación nacional: características de la producción de mora en Costa Rica y variedades explotadas.

En Costa Rica el género *Rubus* se extiende en las fracciones más altas del país (de altitudes en torno a los 1400 a 2500 metros sobre el nivel del mar) ubicadas principalmente en el Cerro de la Muerte y sus alrededores (Flores *et al.*, 2003).

Los mayores volúmenes de producción son aportados por las zonas de Dota, El Guarco, León Cortés y partes altas de Pérez Zeledón (Castro & Cerdas, 2005). La explotación de dicho cultivo generalmente se combina con otras actividades agrícolas y es mayoritariamente considerado como un cultivo silvestre. Esto hace difícil la estimación del volumen y área de producción, así como del número de productores vinculados a la actividad (Flores & Argüello, 2005; Flores *et al.*, 2003), lo que explica que a la fecha no existan registros formales a nivel nacional (Flores *et al.*, 2003). Castro & Cerdas (2005) sostienen que esta actividad integra a más de 800 familias costarricenses y estiman que si se compactaran todas las plantaciones de moras criollas que se encuentran en forma dispersa en el país, el área total de cultivo sería de unas 600 a 800 hectáreas.

Hasta mediados de los años 90 la producción se manipuló de forma artesanal con variedades silvestres, a partir de entonces comienza en el país una etapa de validación, adaptación y adopción de nuevas técnicas de producción que incluyen: poda, producción de semilla in vitro, utilización de distancia de siembra y adecuación del manejo poscosecha (Castro & Cerdas, 2005). Sin embargo, actualmente el 91,7% de las plantaciones de mora están compuestas por variedades criollas o silvestres, y solamente el 8,3% de estas plantaciones presentan algún grado de tecnificación (Flores *et al.*, 2003). Por esta razón los rendimientos del cultivo son aún muy bajos, no superando las 2 toneladas /Ha/año (Cerdas & Montero, 1992).

Aunque no se ha formalizado la clasificación de las variedades criollas costarricenses a nivel de especie, es posible distinguirlas por sus diferencias morfológicas y son señaladas con los nombres con que vulgarmente son reconocidas en las zonas moreras (Flores *et al.*, 2003). Entre las moras criollas o silvestres se conocen las siguientes variedades: Vino con espinas rojas, Vino con espinas blancas, Vino sin espinas, Negrita, Ratón, Castilla y Caballo (Castro & Cerdas, 2005, Flores & Argüello, 2005; Flores *et al.*, 2003). La variedad Vino es la más extendida en el país debido a que este material presenta mejores niveles de producción, calidad y aceptación general de la fruta (Flores *et al.*, 2003).

Las variedades híbridas que se encuentran en Costa Rica son originarias de América del Norte (principalmente de Carolina, Michigan y Texas). Estas variedades híbridas se han introducido en el país desde mediados de los años 80, siendo conocidas con los nombres comerciales: Rosboroug, Shawnse, Brazos, Cherokee y Comanche, aunque su desempeño no fue el esperado y por tanto su adopción ha sido baja entre los agricultores (Flores *et al.*, 2003).

Entre las formas de comercialización de esta fruta, se mencionan las siguientes: fruta fresca, congelada y su transformación en productos a base de mora (pulpas, mermeladas, jaleas, refrescos, helados, yogurt). La información disponible a nivel nacional no permite realizar estimaciones fidedignas de volúmenes claros de producción, destinos (mercado nacional, exportación) y formas de comercialización.

3.1.4 Características generales de la variedad "Vino" costarricense

Esta variedad se caracteriza por presentar hojas trifoliadas con espinas en tallos, pecíolos y envés de sus hojas, de no ser podada, el hábito de crecimiento es generalmente rastrero (Castro & Cerdas, 2005).

Se distinguen dos tipos de moras "vino con espinas" según el color de sus espinas. Las hay con espinas blancas y con espinas rojas; las características morfológicas de tallos, hojas, flores y frutos son similares (Flores & Argüello, 2005).

Los frutos de esta variedad presentan forma alargada, con un peso promedio que oscila entre 1,8 y 2,2 g, un diámetro ecuatorial de 1,4 cm y uno longitudinal de 1,9 a 2,2 cm (Flores *et al.*, 2005). Las inflorescencias cuajan alrededor de 45 drupeolas que conforman el fruto y son de color negro (Cerdas & Castro, 2005).

Flores & Argüello (2005) realizaron un estudio del comportamiento fisicoquímico de cuatro variedades de mora ("Vino espina roja", "Vino espina blanca", "Castilla" y "Negrita") provenientes de cuatro zonas moreras del país (La Cima, La Luchita, Providencia y La Luchita respectivamente). Se encontró que el contenido de humedad de las variedades "Vino" osciló entre un 80 a 85%, su pH entre 2,54 y 2,57, los grados Brix entre 9 y 12,75, siendo el contenido de cenizas de 0,304 a 0,455 %.

Según Flores *et al.* (2003), la variedad "Vino" cuenta con las mejores características organolépticas (color negro y sabor), físicas (firmeza y tamaño mediano), químicas (acidez y grados Brix), de mercado (tanto nacional como internacional) y biológicas (resistencia a plagas y enfermedades). Estas fortalezas hacen que la variedad determine el mercado a tal punto que cuando hay mora Vino disponible, las demás variedades se ven desplazadas, deprimiendo sus precios.

El jugo de mora en 100 g de porción ofrece: 5,30 g de fibra dietética, 1,2 g de proteínas, 0,6 g de grasa, 13,2 g de carbohidratos totales, 0,6 g de cenizas, 34 mg de calcio, 20 mg de

magnesio, 196 mg de potasio, 36 mg de fósforo, 2,0 mg de hierro, 18 mg de vitamina C, 0,06 mg de vitamina B₆ y 34 mg de ácido fólico (INCAP-OPS (1996) y INCAP-OPS (2000) citados por Castro & Cerdas, 2005).

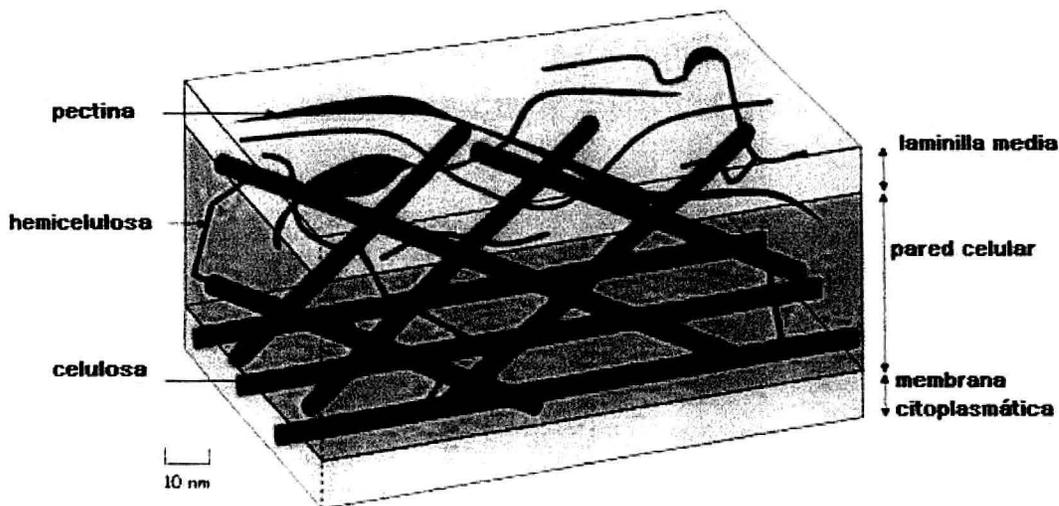
3.2 Características morfológicas y bioquímicas de la pared celular de la fruta.

La pared celular es una estructura particular de los vegetales y algunos microorganismos, es externa a la membrana celular, no encontrándose en el Reino Animal. En los vegetales, la pared puede tener características específicas dependiendo de su ubicación en la planta.

En términos generales la pared celular de los vegetales es una matriz compleja de polímeros de azúcares que suelen subdividirse según su diferente función en: pectinas, celulosa-hemicelulosa, y proteínas (Buckeridge & Tiné, 2001).

Aunque las proporciones y la forma de organización de los compuestos en la pared suele variar en función del tipo de planta, e incluso del tejido del que se trate, generalmente se encuentra, a partir de la membrana celular, una pared primaria sostenida por una estructura de microfibrillas de celulosa, seguida de una laminilla media que une cada célula con la pared de la siguiente (Figura 2). En algunos casos y como capas posteriores se constituye una pared secundaria, característica de la "madera" (xilema), del esclerénquima, así como de las esclereidas que se presentan en algunos frutos (células modificadas presentes en peras y guayabas). La pared secundaria es particularmente lignificada (Vaillant, 2000).

En los frutos, dada la necesidad de rápido crecimiento y flexibilidad de los tejidos, las paredes suelen ser del tipo primario (Vaillant, 2000). Aunque esto depende del tipo de tejido, al ser generalmente parénquimas de reserva, la existencia de lignificación es baja. Por otra parte suele ser bastante importante la proporción de laminilla media (Vaillant, 2000).



Fuente: adaptado de: <http://webpublic.ac-dijon.fr/pedago/svt/schemassvt/IMG/cache-545x265/paroi-545x265.jpg>

Figura 2 – Estructura básica de la pared celular.

Los principales componentes de la pared se encuentran asociados a diferentes funciones y varían a lo largo de la maduración del fruto.

La **celulosa** es un polímero fuertemente agregado de largas cadenas de unidades de glucosa, unidas por enlaces β 1-4 glucosídicos. Estas largas cadenas lineales, se encuentran unidas entre sí por enlaces de hidrógeno intramolecular, conformando microfibrillas. Su largo (basado en el tipo de unión β) y ancho (entre 4 y 30 nm) varían en función de la fuente del material vegetal. Cada microfibrilla cuenta con una subestructura con regiones más ordenadas (cristalinizadas) y otras más amorfas (menos polimerizadas). Las paredes primarias suelen tener menor grado de polimerización. (Vaillant, 2000; Cosgrove, 1997; Ryugo, 1993). Esta estructura confiere a la celulosa propiedades importantes como: gran resistencia física, estabilidad química y relativa resistencia a la hidrólisis enzimática (Cosgrove, 1997).

La **hemicelulosa** es en realidad un heterogéneo grupo de glicanos no cristalinos que tienen poca sujeción en la pared. Aunque existen algunas moléculas fundamentalmente lineales, lo más común es que presenten gran cantidad de ramificaciones (Whistler & BeMiller, 1997) las que pueden presentar enlaces covalentes con la lignina, o enlaces hidrógeno con la celulosa (Vaillant, 2000). La más común y estudiada de las hemicelulosas es el xyloglucano, una

estructura ramificada cuya columna es un 1-4 β -D-glucopiranosil con cadenas cortas conteniendo xylosa y galactosa (Cosgrove, 1997).

La **pectina** es en realidad otro conjunto de sustancias (sustancias pécticas) cuya presencia es marcada en la laminilla media y el resto del espacio intercelular. También son muy importantes en las paredes primarias de los frutos, a veces hasta llegando a apartar las células vegetales de los mismos. Se trata del polisacárido más soluble de la pared (Berk, 1980). El elemento que reúne a estas sustancias se encuentra en su esqueleto común poligalacturónico de ácidos galacturónicos unidos por enlaces de tipo α 1-4 (Pérez & Carpita, 2006; Vaillant, 2000). Su subestructura general puede ser esquematizada en regiones con características diferenciadas: por una parte de "zonas lisas" compuesta de homogalacturanos, y otras zonas "erizadas", compuestas de rhamnogalacturonanos, de donde se insertan diferentes tipos de ramificaciones. Estas ramificaciones distinguen los tipos de pectina, siendo las más comunes: los arabinanos, galactanos y arabinogalactanos (Pérez-Almeida & Carpita, 2006; Vaillant, 2000).

La **lignina** por su parte es un compuesto característico de las paredes secundarias, que confieren la mayor rigidez a los tejidos. No se trata de un polisacárido, sino de un polímero tridimensional de fenoles de base denominados monolignoles. Estos monolignoles son derivados de los ácidos *p*-cumárico, ferúlico y sinapico y pueden establecer diferentes tipos de enlaces entre sí, además de ligar otro tipo de moléculas, complejizando la estructura (Sama-Manchado & Cheynier, 2006).

Las **proteínas estructurales** de la pared son bastante variadas y se vinculan a los fenómenos de transporte y biocatálisis. Se clasifican en función de su amino-ácido predominante y generalmente se encuentran glicosiladas, como por ejemplo las Proteínas Ricas en Hidroxiprolina (HRGPs), las Proteínas Ricas en Prolina (PRPs), o las Proteínas Ricas en Glicina (GRPs), (Vaillant, 2000; Cosgrove, 1997). En la compleja red de polisacáridos y proteínas estructurales también es posible encontrar diversas proteínas solubles con actividad enzimática. También es posible encontrar ácidos fenólicos, taninos, ceras, que aunque poco

importantes desde un punto de vista cuantitativo, pueden tener importantes efectos en los procesos tecnológicos (Vaillant, 2000).

Tal como comentan Buckeridge & Tiné (2001) la pared celular se presenta como una especie de *super-polímero* con estructura cuaternaria con características dinámicas.

3.3 Principales enzimas para la degradación de la pared celular.

Dada la composición descrita de la pared celular de las frutas, es necesario conocer el funcionamiento de las enzimas que la afectan, de manera de comprender las posibilidades tecnológicas de su utilización como herramienta complementaria en la producción de jugos.

En este capítulo se describe someramente la acción de las Pectinasas y las Celulasas.

3.3.1 Pectinasas

Las pectinasas se clasifican de acuerdo a su modo de acción sobre la fracción galacturónica de la molécula de pectina. Básicamente existen tres tipos de pectinasas: la pectinliasa, la poligalacturonasa y la pectinesterasa.

La pectinliasa actúa sobre la cadena de ácido galacturónico rompiendo los enlaces de tipo β , en particular donde existe al menos uno de los dos residuos metilado. Cuanto mayor metilación de la molécula, mayor actividad de estas enzimas (Vaillant, 2000; Nagodawithana, 1993).

La poligalacturonasa hidoliza los enlaces glucosídicos entre dos unidades de ácido galacturónico no esterificado. Al contrario de lo que ocurre con la pectinliasa la acción de las poligalacturonasas disminuye cuando aumenta el grado de metilación (Vaillant, 2000).

La pectinesterasa actúa sobre los grupos éster metílicos de los ácidos galacturónicos.

3.3.2 Celulasas

Las celulasas se agrupan en tres familias principales: las endoglucanasas, las celobiohidrolasas, y las β -glucosidasas (Vaillant, 2000).

Las endoglucanasas actúan al azar sobre los enlaces glucosídicos internos de la celulosa (β 1-4) liberando oligosacaridos de glucosa.

Las celobiohidrolasas continúan la hidrólisis de estos trozos desde los extremos no reductores de la molécula, liberando unidades de celobiosa.

Las β -glucosidasas hidrolizan estas unidades de celobiosa en glucosa.

Es importante desde el punto de vista del presente trabajo, tener en cuenta que las celulasas (y las hemicelulasas) también actúan en las zonas "erizadas" de las pectinas.

Los preparados comerciales disponibles en el mercado son combinaciones de poligalacturonasas (PG), pectinesterasas (PE), pectinliasas (PL), endocelulasas (CX) y exocelulasas (C1). Estas enzimas son naturales, pues derivan del aislamiento a partir de microorganismos (bacterias y hongos) que producen enzimas extracelulares.

Tales preparados no son ingredientes de los alimentos, sino que simplemente actuarán en el proceso como auxiliares tecnológicos.

3.4 Principales compuestos benéficos para la salud presentes en la mora y su evolución a lo largo del desarrollo del fruto.

3.4.1 Compuestos bioactivos

Las frutas y las hortalizas se han ganado el estatus de "alimentos funcionales" capaces de promover la buena salud y prevenir o aliviar enfermedades. Este tipo de alimentos puede brindar una óptima mezcla de fitoquímicos tales como antioxidantes naturales y fibras entre otros compuestos biológicos (Kaur & Kapoor, 2001).

Los principales grupos de antioxidantes naturales presentes en frutas y hortalizas son los polifenoles y las vitaminas (Kaur & Kapoor, 2001), los cuales recientemente han sido definidos como "antioxidantes dietarios" (National Academy of Sciences (1998); citado por Urquiaga *et al.*, 1999).

"Un antioxidante dietario es una sustancia presente en los alimentos que disminuye significativamente los efectos adversos de las especies reactivas de oxígeno, especies reactivas de nitrógeno, o ambas sobre las funciones fisiológicas normales en humanos" (National Academy of Sciences (1998); citado por Urquiaga *et al.*, 1999).

A continuación se presenta una breve revisión de los más importantes antioxidantes presentes en frutas y en particular en las moras.

3.4.1.1 Polifenoles:

Los polifenoles incluyen varias clases de compuestos fenólicos que son metabolitos secundarios del metabolismo de las plantas y que representan una parte integral para la dieta de humanos y animales (Siriwaharn *et al.*, 2004).

Dependiendo de su estructura química puntual, estos metabolitos actúan como antioxidantes donadores de hidrógeno y también como quelantes de iones metálicos, previniendo la

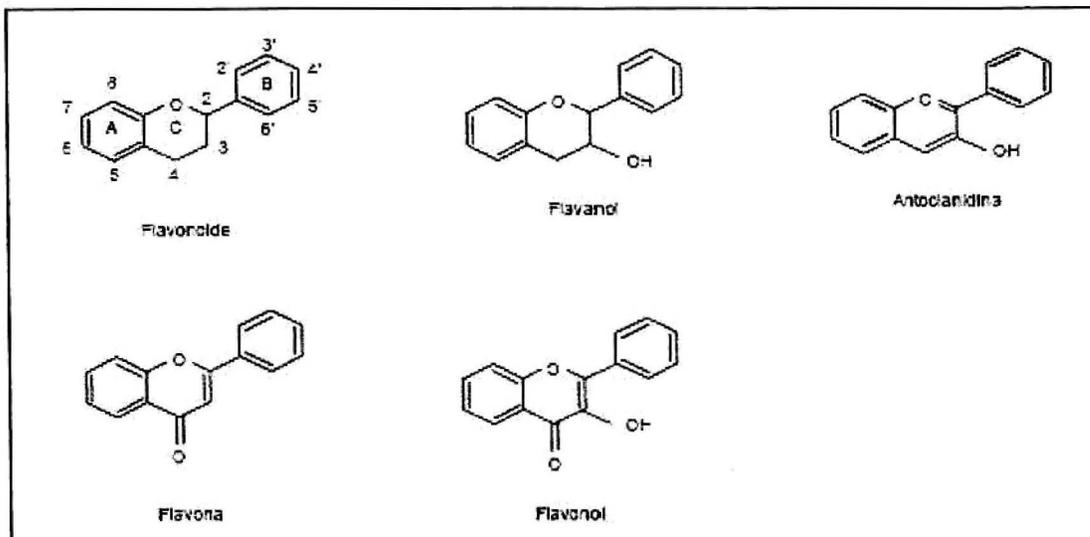
formación de metales catalizadores, o inhibiendo las especies radicales (Kaur & Kapoor, 2001). Su funcionalidad es también expresada por su acción inhibidora o activadora de una amplia variedad de sistemas enzimáticos (Sanchez-Moreno *et al.*, 1999, citados por Sellappan *et al.*, 2002).

Estos metabolitos polifenólicos en las plantas, funcionan protegiéndolas contra el estrés biológico y ambiental. Es así que son sintetizados como respuesta al ataque por patógenos tales como la infección por hongos o bacterias, o por la exposición prolongada a alta energía de radiación (Shetty (1997) y Briskin (2000), citados por Vatterm *et al.* 2005). Existen dos modos de acción de estos metabolitos de defensa: por efectos tóxicos directos (por ejemplo la producción de fitoalexinas) o por una activa y rápida deposición de lignina en la pared celular como barrera defensiva al progreso del parásito (Sama-Manchado & Cheynier, 2006; Bennet & Wallsgrove (1994), Strack (1997) citados por Häkkinen, 2000). Sin embargo, el rol preciso de los compuestos fenólicos en el refortalecimiento de la pared celular para la protección de las plantas ha sido pobremente definido debido a limitantes en el conocimiento para su análisis y por la complejidad de la arquitectura de la pared celular (Matern & Grimmig (1994) citados por Robards & Antolovich, 1997).

3.4.1.2 Flavonoides:

El término flavonoide es el nombre colectivo que se utiliza para mencionar a los pigmentos de las plantas que son generalmente derivados de benzo- γ -pirona (Hasvsteen, 2003). Más de 4000 variedades de flavonoides ya han sido identificados (Nijveldt *et al.*, 2001). Dentro de este grupo de compuestos se encuentran las flavonas, isoflavonas, catequinas y los compuestos rojos, azul y morados como las antocianinas (Moyer *et al.*, 2002).

Los flavonoides se caracterizan por presentar un bajo peso molecular y compartir un esqueleto común de definilpiranos ($C_6-C_3-C_6$), compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) unidos a través de un anillo (C) de pirano heterocíclico como es mostrado en la Figura 3 (Martínez- Flores *et al.*, 2002).



Fuente: Martínez-Flores *et al.* (2002).

Figura 3 - Flavonoides. Estructura básica y tipos.

Los flavonoides ($C_6-C_3-C_6$) poseen varios grupos hidroxilo unidos a su estructura de anillos (los que le confieren la capacidad de neutralizar radicales libres) y se encuentran normalmente como glicósidos. Generalmente las posiciones de glicosilación son 7-hidroxilo en flavonas, isoflavonas y dihidroflavonas; 3- y 7-hidroxilo en flavonoles y dihidroflavonoles; 3- y 5- en antocianidinas (Urquiaga *et al.*, 1999). Bajo la forma de glicósidos son más solubles en agua y menos reactivos frente a los radicales libres que su aglicona o flavonoide respectivo (Martínez-Flores *et al.*, 2002).

En base a su estructura química estos compuestos pueden ser divididos en varias clases, siendo las 4 principales las siguientes: i) **los flavonoles** que se caracterizan por presentar una estructura plana debido al doble enlace que presentan en el anillo central. Uno de los integrantes más representativo de este grupo es la quercitina, que se encuentra en cebollas, brócoli, manzana y drupas (Nijveldt *et al.*, 2001). La quercitina posee un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y un grupo hidroxilo en posición C₃ (Martínez-Flores *et al.*, 2002); ii) **los flavonones** se encuentran principalmente en frutas cítricas y un ejemplo de flavonoide de este grupo es la naringina; iii) **flavanos** o grupo de las catequinas, las que se encuentran principalmente en el té verde y negro, y vino tinto, y poseen un grupo OH en el carbono 3 del

anillo central (Martínez- Flores *et al.*, 2002); iv) **las antocianidinas** que se encuentran en fresas y otros pequeños frutos, uvas, vino y té (Nijveldt *et al.*, 2001).

Estos últimos compuestos son los pigmentos hidrosolubles responsables del color de flores, plantas y frutas y cumplen un importante rol para la polinización y dispersión de las semillas de las plantas (Wu, *et al.*, 2006). La biosíntesis de antocianinas, es específica de algunos tejidos y durante determinado período de desarrollo de la planta (Del Valle *et al.*, 2005). Únicamente seis antocianinas se presentan comúnmente en las plantas superiores, ellas son: pelargonidina, peonidina, cianidina, malvidina, petunidina y delphinidina (Wu, *et al.*, 2006; Del Valle, *et al.*, 2005). Se caracterizan por presentar un grupo OH en el carbono 3 del anillo central y además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del mismo anillo (Martínez-Flores *et al.*, 2002). En las moras la antocianina predominante es la cianidina (Cy) (Wu *et al.*, 2006, Fang- Chiang & Wrolstad, 2005). Debido al rol potencial que estos pigmentos naturales presentan en la industria alimentaria dado su intenso color y sus beneficios en la la salud recientemente están siendo evaluada su aislamiento y purificación (Wu *et al.*, 2006; Shi *et al.*, 2005; Wrolstand, 2004). Se estima que en promedio se consumen 12,5 mg de antocianinas/día/persona provenientes de diferentes alimentos (Wu *et al.*, 2006).

La concentración de los flavonoides en las frutas depende tanto de factores genéticos como ambientales, entre los que se mencionan: el tipo de cultivar, las condiciones del cultivo (localización geográfica, presencia de enfermedades, tipo de suelo), el estado de madurez, los métodos de cosecha, almacenamiento y procesamiento (Sami-Manchado & Cheynier, 2006; Siriwoham *et al.*, 2004; Benbenuti *et al.*, 2004; Sellappan *et al.*, 2002). A su vez, existe especificidad de compuestos fenólicos en algunas frutas lo que permite identificar adulteración de productos (Sami-Manchado & Cheynier, 2006; Sellappan *et al.*, 2002).

Reacción del organismo frente a las sustancias oxidantes

Las células y tejidos del cuerpo son continuamente amenazados por el daño causado por radicales de oxígeno y especies reactivas de oxígeno, las cuales se originan tanto del

metabolismo normal del oxígeno como por agentes exógenos al organismo (De Groot, 1994; Grace, 1994, citados por Nijveldt *et al.*, 2001).

Se estima que un 2% del oxígeno consumido por un organismo normal forma especies reactivas del oxígeno (EROS), de las cuales varias son radicales libres (Urquiaga *et al.*, 1999). A estas sustancias se suman los factores ambientales tales como: contaminación, radiación, fumado de cigarrillos, herbicidas, etc., que pueden también generar radicales libres, que en exceso, pueden causar serios daños celulares y genéticos (Kaur & Kapoor, 2001).

Los radicales libres son definidos como moléculas que no están equilibradas en electrones por lo que son altamente inestables y reactivas. Algunos ejemplos de radicales libres derivados del oxígeno incluyen: superóxido (O_2^-), hidroxilo (OH^\cdot), hidroxiperoxilo (HOO^\cdot), peroxilo (ROO^\cdot) y alcoxilo (RO^\cdot). Los radicales libres de oxígeno y nitrógeno pueden ser convertidos en otras especies reactivas tales como: peróxido de hidrógeno (H_2O_2), hipocloruro ($HOCl$), hipobromuro ($HOBr$) y el peróxido de nitrito ($ONOO^-$) (Fang *et al.*, 2002; Kaur & Kapoor, 2001).

El organismo humano, cuenta principalmente con dos barreras de defensa contra estas moléculas reactivas: las de tipo enzimático (principalmente enzimas: catalasa, superperóxido dismutasa y glutatión peroxidasa) y las de tipo no enzimática (glutatión, urato, ubiquinol, proteínas plasmáticas, entre otros compuestos) (Havsteen, 2002; Urquiaga *et al.*, 1999). A estas defensas se le suma el aporte dietario de antioxidantes naturales tales como: ácido ascórbico, polifenoles, tocofenoles y carotenoides (Sies, 1997, citado por Benbenuti, 2004).

Cuando la producción de radicales libres en el cuerpo supera la capacidad de las "barreras de defensa antioxidante" se produce lo que se conoce como "estrés oxidativo". Bajo esta situación, las especies reactivas del oxígeno y radicales libres, permanecen activos atacando lípidos de membranas, proteínas nucleares, membranas celulares, enzimas y material genético (ADN y ARN). Como consecuencia de esta descontrolada actividad de las EROS se desencadenan ciertas enfermedades crónicas tales como cáncer, enfermedades coronarias y enfermedades degenerativas (Byes & Perry, 1992, citados por Benbenuti *et al.*, 2004; Havsteen, 2002; Kaur & Kapoor, 2001; Urquiaga *et al.*, 1999).

Polifenoles reportados en moras (*Rubus spp.*)

A pesar de que existen varios estudios científicos que mencionan las virtudes de los antioxidantes encontrados en diferentes frutas, son pocos los que contribuyen cuantitativamente al conocimiento en este sentido sobre las moras (*Rubus spp.*).

El principal componente de la fracción antocianina reportado en mora es cianidina-3-glicósido (Fan-Chiang & Wrolstad, 2005; Reyes-Carmona *et al.*, 2005; Sirowoharn *et al.*, 2004; Dugo *et al.*, 2001). Es por esto que el contenido de antocianinas se expresa en relación a esta fracción.

En un estudio realizado por Sirowoharn & Wrolstad (2004) determinaron que el principal flavonoide encontrado en la fruta de mora fue el glicósido de quercitina, mientras que en semillas se encuentran principalmente catequinas, epicatequinas y derivados del ácido elágico.

En el Cuadro 1, se muestra una síntesis de los resultados obtenidos por diferentes autores en estudios realizados en mora. Los datos presentados corresponden a un mismo método de análisis, realizado en fruta en estado maduro¹ y expresado en base fresca. En el Cuadro 2, se hace referencia de los análisis citados por los distintos autores.

¹ Se escoge presentar el estado maduro debido a que se asume que es el que prefiere el consumidor, sin embargo es sabido que no necesariamente es el estado con mayores contenidos de tales compuestos.

Cuadro 1- Contenidos promedios o rangos reportados por diferentes autores en mora para polifenoles totales (Método Folin-Ciocalteu), antocianinas totales (método diferencia de pH) y capacidad antioxidante (método "Oxygen Radical Absorbance Capacity", ORAC).

Principales Variedades Utilizadas	Polifenoles totales (mg/100g)	Antocianinas totales (mg/100g)	Capacidad Antioxidante (μmoles de TE/g)	Autor
Chester, Hull y Triple Crown	226	153,3	28,2	Wang & Lin., (2000)
Cherokee, Chester, Marion, Triple Crown.	275 a 678	80 a 230	33 a 78	Moyer et al., (2002)
Choctaw, Kiowa	486	116	-----	Sellappan et al., (2002)
R. fruticosus, R. idaeus	289,3	88,7	-----	Benbenuti et al., (2004).
Marion, Evergreen	903 a 960	131 a 221	58,5 a 60,9	Siriwoham et al., (2004)
Marion, Evergreen	822 a 844	151 a 225	34,3 a 35,5	Siriwoham & Wrolstad, (2004)
Diferentes variedades y localidades geográficas	-----	70,3 a 201	-----	Fan-Chiang & Wrolstad, (2005)

Fuente: elaboración propia en base a los autores citados.

Cuadro 2- Métodos de análisis más frecuentemente utilizados para análisis de polifenoles totales, antocianinas totales y capacidad antioxidante en mora.

Determinación en Mora	Método de análisis empleado en la cuantificación	Referencia
Polifenoles totales	Colorimétrico (Folin-Citocalteu), (Slinkard & Singleton 1977).	Wang & Lin, (2000); Reyes-Carmona <i>et al.</i> , (2005)
	Colorimétrico (Folin-Citocateu), (Singleton <i>et al.</i> , 1965).	Benbenuti <i>et al.</i> , (2004); Moyer <i>et al.</i> , (2002); Sellappan <i>et al.</i> , (2002); Siriwoham <i>et al.</i> , (2004) y Sirowoham & Wrolstad (2004).
Antocianinas totales	pH diferencial (pH 1 y 4,5) (Giusti <i>et al.</i> , 2001)	Benbenuti <i>et al.</i> , (2004) ; Moyer <i>et al.</i> , (2002); Sellappan <i>et al.</i> , (2002) ; Siriwoham <i>et al.</i> , (2004) Sirowoham & Wrolstad (2004) y Fan-Chiang & Wrolstad (2005).
	HPLC por el método de Barritt & Torres, (1973)	Reyes-Carmona <i>et al.</i> , (2005)
	pH diferencial (pH 1 y 4,5) (Cheng & Breen, 1991)	Wang & Lin, (2000)
Capacidad Antioxidante	ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) (Cao <i>et al.</i> , 1993)	Wang & Lin, (2000)
	ORAC y FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Power) (Cao <i>et al.</i> , 1997)	Moyer <i>et al.</i> , (2002)
	ORAC (Cao <i>et al.</i> , 1993) y FRAP (Betzie & Strain, 1996)	Siriwoham <i>et al.</i> , (2004); Sirowoham & Wrolstad (2004)
	ORAC (Dávalos <i>et al.</i> , (2004) y FRAP (Benzoe & Strain, 1996)	Reyes-Carmona <i>et al.</i> , (2005)
	ABTS (Re <i>et al.</i> , 1999)	Sellappan <i>et al.</i> , (2002)
	DPPH (Brand- William <i>et al.</i> , 1965; Sanchez- Moreno, 2002)	Benbenuti <i>et al.</i> , (2004).

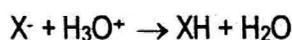
Mecanismos de acción de los antioxidantes y métodos de evaluación

Los antioxidantes pueden desactivar radicales libres básicamente por medio de dos mecanismos de acción: neutralización de radicales libres por transferencia de átomos de hidrógeno (HAT) y por transferencia simple de electrones (SET) para reducir algún compuesto incluyendo metales, carbonilos y radicales (Prior *et al.*, 2005). Estos mecanismos pueden ocurrir en forma paralela, y el mecanismo dominante en un sistema dado estará determinado por la estructura y propiedades del antioxidante, solubilidad, coeficiente de partición y el sistema solvente. La energía de disociación del enlace (BDE) y el potencial de ionización (IP) son los factores más importantes para determinar los mecanismos y la eficacia de los antioxidantes (Wright *et al.*, citados por Prior *et al.*, 2005).

Los métodos basados en el mecanismo HAT miden la habilidad de un antioxidante de atrapar radicales libres por donación de hidrógeno (AH = cualquier donador de hidrógeno, X cualquier radical libre) (Prior *et al.*, 2005).



Los métodos basados en el mecanismo SET, revelan la habilidad de un antioxidante potencial en transferir un electrón para reducir cualquier compuesto, incluyendo metales, carbonilos y radicales:



Existen varios ensayos para determinar la capacidad antioxidante, basados en los métodos anteriores. La mayoría de los métodos basados en HAT aplican un esquema de reacción competitiva, en el cual un antioxidante y un sustrato compiten por radicales. Estos ensayos incluyen inhibición de autoxidación inducida de lipoproteínas de baja densidad, ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) y TRAP (Total Radical Trapping Antioxidant Parameter) (Huang *et al.*, 2005).

Los ensayos basados en SET miden la capacidad de un antioxidante en la reducción de un oxidante, el cual cambia de color cuando se reduce. El grado de cambio de color es relacionado con la concentración del antioxidante en la muestra. Estos ensayos incluyen: polifenoles totales por reactivo de Folin-Ciocalteu (FCR), TEAC (Trolox Equivalence Antioxidant Capacity), FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Power), potencial antioxidante total usando complejo Cu (II) como oxidante (Huang *et al.*, 2005).

3.4.1.3 - Vitaminas

Colectivamente la vitamina C, vitamina E y el β -caroteno son nombradas como las vitaminas antioxidantes. Varios estudios mencionan que la población mundial no está consumiendo los niveles necesarios de estas vitaminas antioxidantes para combatir el daño oxidativo, porque no consumen frutas y hortalizas (Kaur & Kapoor, 2001).

La vitamina C es la principal vitamina reportada en moras. El ácido ascórbico es un antioxidante hidrosoluble importante por su aporte a la salud. Esto ha sido reconocido en Estados Unidos, por el reciente aumento de la ingesta diaria de ácido ascórbico, recomendando 75 y 90 mg por día para mujeres y hombres respectivamente con un adicional de 35 mg diarios para los fumadores (Larikin, 2000 citado por Szeto *et al.*, 2002).

Estudios realizados por Szeto *et al.*, (2002), estimaron el contenido total de vitamina C (ácido ascórbico más dehidroascórbico) expresándolo como mg/Kg de peso fresco. Los contenidos de vitamina C en orden decreciente fueron los siguientes: fresas (770 mg/Kg fresco), kiwi (590 mg/Kg fresco), limón (580mg/Kg fresco), naranja (540mg/Kg fresco), mango (370 mg/Kg fresco), uva (360mg/Kg fresco), mandarina (200mg/Kg fresco), piña (120 mg/Kg fresco), banana (110 mg/Kg fresco), pera (60 mg/Kg fresco), manzana verde (60 mg/Kg fresco) y uva verde (30 mg/Kg fresco). En este estudio también se dejó en evidencia el importante aporte que realiza el ácido ascórbico a la capacidad antioxidante total de las frutas. Es así que por ejemplo el 73% en kiwi y el 39% en fresa de la capacidad antioxidante total (método FRAP) se explica por el contenido de ácido ascórbico.

Reyes-Carmona *et al.* (2005) realizaron análisis del contenido de ácido ascórbico en moras provenientes de dos regiones diferentes (México y EEUU). Utilizaron el ácido L-ascórbico como estándar y encontraron niveles desde 0,08 meq/g (variedad Comanche) a 0,82 meq/g (variedad Brazos). Benbenuti *et al.* (2004) reportan un contenido promedio para *Rubus spp.* de 12,9 mg /100 g de peso fresco en ácido ascórbico reducido analizado por HPLC.

3.4.1.4 Fibra dietética

La fibra dietética está compuesta por todos los polisacáridos y lignina que no pueden ser hidrolizados en su pasaje por el tracto digestivo humano. La fibra dietaria, ha sido asociada con alteraciones positivas del ambiente colónico brindando protección contra enfermedades colono-rectales así como presentando una fuerte actividad antioxidante (Calixeto, 1998 citado por Kaur & Kapoor, 2000).

3.4.2 Evolución de los compuestos antioxidantes lo largo del desarrollo del fruto.

Es sabido que a medida que cualquier fruta madura, se producen cambios en todos sus componentes y estructuras que hacen que éstas sean más sabrosas y apetecibles. Sin embargo, en este apartado se hará referencia únicamente a los cambios que sufren las moras en aquellos compuestos que hacen a estas frutas interesantes por su contribución a la salud: polifenoles, antocianinas y capacidad antioxidante.

Los resultados de la investigación de Wang & Lin (2000), evidenciaron la influencia de la especie y el grado de madurez sobre la capacidad antioxidante (ORAC), el contenido total de antocianinas y el contenido total de fenoles. La escala de madurez evaluada por estos autores fue: fruta verde, rosada y madura igualmente empleada para la cosecha de las tres especies evaluadas (moras, fresas y frambuesa). Las moras y fresas en estado verde consistentemente rindieron el más alto valor de ORAC, mientras que las frambuesas rojas lo hicieron en estado maduro. En todas las frutas el estado rosa presentó el más bajo valor de ORAC. Para las tres especies, el valor de ORAC estuvo correlacionado con el contenido total de fenoles independientemente del estado de madurez, mientras que el contenido total de antocianinas

presentó una relación lineal con los valores de ORAC solo en el estado maduro. En el Cuadro 3, se resumen los rangos promedios obtenidos por estos autores en moras (variedades Chester, Hull y Triple Crown) para capacidad antioxidante, antocianinas y fenoles según la escala de madurez definida para el fruto.

Cuadro 3- Rangos promedios para capacidad antioxidante, antocianinas y fenoles según la escala de madurez definida para mora (variedades: Chester, Hull y Triple Crown).

Escala	Capacidad Antioxidante (μM de TE/g)		Antocianinas totales (mg cianidina 3-glucósido/100g)		Fenoles Totales (mg GAE equi/100g)	
	Peso Fresco	Peso Seco	Peso Fresco	Peso Seco	Peso Fresco	Peso Seco
Verde	23,4 a 28,8	165,8 a 177,8	0,5 a 1,3	3,9 a 9,2	252 a 326	1786 a 2310
Rosa	13,7 a 17,6	86,8 a 97,3	7,9 a 10,7	50,1 a 67,7	247 a 262	1438 a 1657
Madura	20,3 a 24,6	120 a 146,4	133,5 a 171,6	794,6 a 1020,8	204 a 248	1214 a 1476

Fuente: Adaptado de Wang & Lin (2000).

En el trabajo realizado por Siriwoham *et al.* (2004), con variedades de mora híbridas (Marion y Evergreen) se fijaron tres estados de madurez:

- Moras insuficientemente maduras (con colores entre rojos y negros)
- Moras totalmente maduras (colores negros brillantes)
- Mora sobremadura (colores negros sin brillo).

Para esta escala de madurez, ellos observaron un incremento en el contenido de antocianinas al pasar de moras insuficientemente maduras a sobremaduras (en var. Marion fue de 74,7 a 317 y en Evergreen de 69,9 a 164 mg/100g de peso fresco). Sin embargo, el contenido total de polifenoles no mostró un cambio marcado con la maduración, siendo no significativo al pasar de insuficientemente maduro a maduro, y significativo al pasar de maduro a sobremaduro, al menos en Marion. En ambas variedades el estado insuficientemente maduro fue el que presentó la menor capacidad antioxidante. Para Marion, el rango de incremento de la capacidad antioxidante (ORAC) al pasar de insuficientemente maduro a sobremaduro fue de 43 a 62,7 micromoles de Trolox equivalente por g de peso fresco, mientras que en

Evergreen la variación fue de 46,1 a 64,4 micromoles de Trolox equivalente por cada g de peso fresco.

Según Hernández & Bautista (s/f) se distinguen tres fases de crecimiento del fruto de mora: i) fase de crecimiento acelerado, ii) fase de reposo o crecimiento lento y iii) fase de crecimiento rápido. En la primera fase de crecimiento se incrementa sustancialmente el contenido de clorofila sobre el de antocianinas y se estimula la síntesis de hormonas del crecimiento (auxinas y giberelinas). Ocurre división y multiplicación celular. En la segunda fase se produce una disminución en el contenido de clorofilas pero no se estimula la síntesis de antocianinas. En esta fase, se sintetizan ácidos orgánicos (necesarios para el ciclo del ácido tricarboxílico) que participarán en la fijación de CO₂ en el ácido málico. También se evidencia una traslocación de sustancias orgánicas hacia las semillas. En la tercera fase, aumenta la síntesis de antocianinas y se produce un cambio de color rojo a púrpura oscuro, con crecimiento rápido del fruto explicado por el estímulo de las fitohormonas para el alargamiento celular. Esta tercera fase coincide con el aumento de azúcares explicado por una mayor traslocación de fotosintatos al fruto y/o a la hidrólisis de sustancias cementantes de la pared celular. Al aumentar la concentración de azúcares en el fruto, se acumula más agua y el fruto aumenta de peso y tamaño.

3.5 Características generales de las tecnologías de membranas y pretratamientos enzimáticos.

El objetivo primario de la industria de los jugos de frutas es la de obtener los mayores rendimientos posibles, con la máxima productividad, manteniendo o mejorando la calidad y estabilidad del producto final (Faigh, 1995).

Por un lado, los pretratamientos enzimáticos son capaces de hidrolizar las paredes celulares de las frutas para una más eficiente extracción del jugo, reducción de la viscosidad, y prevención de la separación en fases. Por el otro, el uso de membranas de microfiltración tangencial, para la obtención de jugo clarificado, ha demostrado ofrecer múltiples ventajas tanto económicas como de calidad, y conservación de la mayoría de las propiedades nutricionales y organolépticas de los jugos. Del acoplamiento de estas dos tecnologías indudablemente surge la posibilidad de obtención de un jugo de alta calidad y buenos rendimientos, viable de ser implementado en la industria nacional.

3.5.1 Tecnología de membranas

La primera membrana sintética fue reportada en 1855 (Cheryan, 1998), sin embargo, a pesar de que existe gran interés y se ha generado mucho conocimiento científico en torno al uso de esta tecnología, son pocos los reportes de su implementación a escala industrial siendo la industria láctea la más proclive a su incorporación, por esta razón es considerada una tecnología en desarrollo.

En forma sencilla el proceso de filtración con membranas, se puede ilustrar como la circulación de fluidos por superficies semipermeables donde los componentes de dichos fluidos la atraviesan de manera selectiva sin sufrir alteraciones químicas ni físicas (Sharma *et al.*, 2003).

La tecnología de membranas puede ser empleada para concentrar, fraccionar o purificar fluidos generando dos corrientes que son diferentes en su composición y características. El

producto puede ser la materia acumulada en la superficie de la barrera (retenido) o el fluido filtrado conocido como permeado (Girard & Fukumoto, 2000).

Los principales procesos de separación con membranas son: ósmosis reversa (RO), nanofiltración (NF), ultrafiltración (UF), microfiltración (MF), diálisis, electrodiálisis (ED) y pervaporación, los que cubren un amplio rango de partículas que pueden separar y diferentes aplicaciones (Cheryan, 1998). Más recientemente las investigaciones en torno al tema de concentración de líquidos sensibles al calor se refieren a dos nuevas y emergentes tecnologías que son: la destilación membranaria y la evaporación osmótica (Bélafi –Bakó & Koroknai, 2006; Vallaint *et al.*, 2005a). Dependiendo del tamaño del poro de las membranas, diferentes componentes pueden ser separados o concentrados (Girard & Fukomoto, 2000). Algunas de las diferencias más relevantes entre estos procesos se resumen en el Cuadro 4.

Los procesos membranarios son relativamente eficientes en energía porque no involucran cambios de fase para la remoción de agua. Estos procesos se realizan a bajas temperaturas (4 a 50°C), minimizando los daños térmicos de producto (Girard & Fukumoto, 2000). En comparación a los procesos tradicionales de evaporación, mientras éstos requieren invertir 500 KJ de energía para extraer un litro de agua, un proceso membranario requiere 25 KJ de energía (Sharma *et al.*, 2003).

Según Cheryan (1998), las membranas pueden ser clasificadas por: i) naturaleza de la membrana (natural versus sintética), ii) estructura de la membrana (porosa versus no porosa), iii) aplicación de la membrana para la separación de fases gaseosas, gas-líquido, líquido-líquido, etc, iv) mecanismo de acción de la membrana, (adsortiva versus difusiva, de intercambio iónico, osmóticas, o membranas no selectivas o inerte).

Cuadro 4 - Características de los principales procesos de membrana.

Proceso	Fuerza motriz	Composición retenido	Composición permeado
Osmosis	Potencial químico	Solutos y agua	Agua
Osmosis Inversa	Presión	Todos los solutos y agua	Agua
Nanofiltración	Presión	Moléculas pequeñas, sales divalentes, ácidos disociados, agua	Iones monovalentes, ácidos no disociados, agua.
Microfiltración	Presión	Partículas suspendidas, agua.	Solutos disueltos y agua.
Ultrafiltración	Presión	Moléculas grandes, agua	Moléculas pequeñas, agua
Destilación membranaria	Temperatura	Solutos	Agua
Evaporación osmótica	Concentración	Solutos	Agua

Fuente: Adaptado de Cheryan (1998), Bélafi-Bakó & Koroknai (2006); Petrotos & Lazarides (2001).

3.5.2. El proceso de microfiltración tangencial

La filtración tangencial es definida por Vaillant *et al.*, (2004), como: "separación sólido –líquido de compuestos de un fluido presurizado a través de membranas semipermeables, por medio de un sistema de bombeo que garantiza la presión transmembranaria, que es la fuerza motriz de este proceso"

En el proceso de microfiltración tangencial (MFT), la alimentación circula de modo paralelo a la membrana porosa (Figura 4), lo que reduce la formación de un depósito de solutos sobre la membrana aumentando el rendimiento del proceso. Otra ventaja de la MFT es que ofrece dos corrientes de salida: la del retenido que no logra atravesar la membrana y la de del permeado, pudiendo ser ambas productos con valor comercial (Figura 4). En el caso de jugos clarificados el interés está puesto en el permeado (Vaillant *et al.*, 2004; Girard & Fukomoto, 2000, Vaillant *et al.*, 1999).

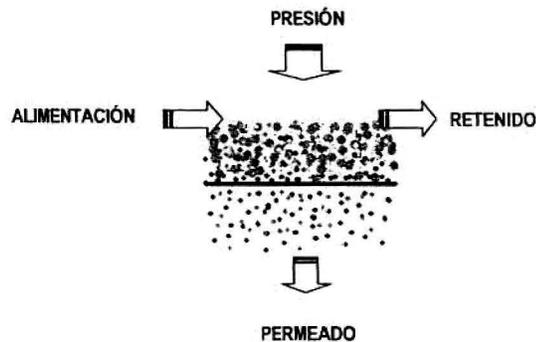


Figura 4 - Principio de la microfiltración tangencial (MFT).

Las membranas de microfiltración presentan tamaños de poros de $0,10\ \mu\text{m}$ a más de $5\ \mu\text{m}$, y como lo indica su nombre, retienen partículas con tamaños en el rango del “micrón”, tales como: células, bacterias, hongos, gránulos de almidón, glóbulos de grasa o látex, etc., por lo que muchas veces es mencionada como proceso de “pasteurización en frío” (Cheryan, 1998).

Cuando se elaboran jugos clarificados con esta tecnología se persiguen básicamente dos propósitos: la eliminación de sólidos insolubles en suspensión y coloides y la estabilización microbiana (Vaillant *et al.*, 2004; Girard & Fukumoto, 2000).

Vaillant *et al.*, (2004) mencionan que en el caso de membranas cerámicas con $0,2\ \mu\text{m}$ de diámetro de poro, los azúcares, ácidos, vitamina C y aromas oxigenados (aldehídos, ésteres, alcoholes alifáticos y terpenoles) logran atravesar la membrana, por lo tanto el contenido de estas sustancias, tanto en el jugo fresco como en el retenido y el permeado, van a tener concentraciones similares.

Carneiro *et al.*, (2002), microfiltraron a escala piloto (membrana tubular de polieterosulfona, $0,3\ \mu\text{m}$ de tamaño promedio de poro) jugo de piña (con pre- tratamiento enzimático) no encontrando diferencias significativas en el pH, acidez y sólidos solubles durante el procesamiento. Como las concentraciones de azúcares y ácidos no cambiaron durante el proceso se considera que el jugo clarificado obtenido mantiene los sabores y aromas del jugo original.

Similares resultados son aportados por Cissé *et al.*, (2005), durante la microfiltración de jugo de naranja, utilizando el mismo módulo piloto que se utiliza en esta investigación. Ellos encontraron que la membrana no retuvo los azúcares y los ácidos orgánicos ya que no hubo diferencias significativas entre el jugo fresco, el retenido y el permeado. Sin embargo, los compuestos apolares tales como hidrocarburos terpénicos y carotenoides fueron fuertemente retenidos por la membrana.

Vaillant *et al.*, (2005a), obtuvieron similares resultados en jugo de melón; el permeado del proceso de MFT resultó ser de alta calidad organoléptica, incluso muy similar a la del jugo inicial. Sin embargo, los carotenoides no lograron atravesar la membrana, quedando fuertemente concentrados en el retenido junto a los sólidos insolubles.

3.5.3 Principales variables de control del proceso de microfiltración tangencial (MFT).

Según Girard & Fukomoto (2000), los principales parámetros de operación que deben ser controlados durante el proceso de microfiltración por su incidencia en el flujo de permeado son: velocidad tangencial (U); temperatura; presión transmembranaria (P_{tm}); y el factor de reducción volumétrico (FRV).

3.5.3.1 Velocidad tangencial (U)

Se refiere a la velocidad central promedio del fluido cuando circula del lado del retenido (Vaillant, 2000). Este factor tiene gran influencia en el flujo del permeado y generalmente se acepta que a mayor velocidad tangencial, mayor flujo, existiendo un límite fijado por la capacidad de las bombas y el costo energético. El valor máximo de $7\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ es el aceptado para la industria (Vaillant *et al.*, 2004).

3.5.3.2. Temperatura

Este factor influye de forma positiva sobre el flujo del proceso debido al efecto sobre la reducción de la viscosidad del fluido. El límite máximo de temperatura a utilizar estará fuertemente determinado por el efecto que cause en la calidad nutricional y sensorial sobre el producto final (Vaillant *et al.*, 2004).

3.5.3.3. Presión transmembranaria (P_{tm}),

Se define como la diferencia de presión promedio que existe entre ambos lados de la membrana correspondiente a los compartimentos del retenido y del permeado. La presión promedio se calcula como la suma entre la presión relativa de entrada (P_{ent}) y salida (P_{sal}) en el compartimento de retenido, menos la presión relativa promedio en el compartimento de permeado (P_{per}). Generalmente, y en nuestro caso, el compartimento permeado es abierto para dejar salir por gravedad el permeado, y por consiguiente, la presión relativa es nula. Tenemos entonces la fórmula siguiente (Girard & Fukumoto, 2000).

$$P_{tm} = (P_{ent} + P_{sal})/2 - P_{per} \quad (1)$$

P_{in} corresponde a la presión dentro de la membrana (lado del fluido alimentado), P_{ext} corresponde a la presión por fuera de la membrana (lado de salida del permeado) y P_{per} corresponde a la presión del permeado. La influencia de la presión transmembranaria sobre el flujo es muy variable y dependiente de las características de la materia prima con que se esté trabajando (Vaillant *et al.*, 2004).

3.5.3.4. Factor de reducción volumétrica (FRV)

Se define como la relación existente entre el volumen total alimentado al sistema (V_f) y el volumen total retenido (V_r) como se indica en la ecuación 2 (Vaillant *et al.*, 2004; Vaillant *et al.*, 1999). El volumen de permeado se indica como V_p.

$$FRV = V_f/V_r = (V_p + V_r)/V_r \quad (2)$$

Este término (FRV), es un indicador de la viabilidad industrial del proceso ya que permite estimar el rendimiento del retenido y del permeado. Es de esperar por tanto, que en un proceso de microfiltración tangencial para la obtención de jugo clarificado, se busque un valor de FRV alto ya que indicaría mayor rendimiento de permeado y menor de retenido, el cual es considerado en este caso un subproducto, pero no deben ser descuidados los costos energéticos (Vaillant *et al.*, 2004; Vaillant *et al.*, 2001).

Según Girard & Fukumoto (2000), existe un rápido descenso inicial del flujo de permeado que se explica por la formación de una capa de sólidos que colmatan la membrana. De acuerdo a Carneiro *et al.* (2002), los principales factores que contribuyen al decrecimiento del flujo de permeado son el colmataje de la membrana, el bloqueo de los poros y el incremento de la viscosidad del jugo. La principal desventaja de la microfiltración tangencial de jugos pulposos es el colmataje de la superficie de la membrana, lo cual resulta en una disminución del flujo (Carneiro *et al.*, 2002; Vaillant *et al.*, 2001, Girard & Fukumoto, 2000). Por esta razón el pretratamiento enzimático se vuelve imprescindible para la hidrólisis de esos polisacáridos y aumentar los flujos del proceso (Vaillant *et al.*, 2004).

3.5.4 Pretratamiento enzimático

Con el fin de lograr mejorar la filtración, los jugos de frutas son con frecuencia previamente tratados con enzimas, con el objetivo de hidrolizar principalmente los polisacáridos solubles responsables del aumento de la viscosidad (pectinas). Este tratamiento es solamente efectivo para jugos con bajo contenido en pulpa (manzana, uva). En el caso de jugos con mayor contenido de pulpa se requiere un tratamiento enzimático más agresivo, que permita no solamente reducir la viscosidad, sino que también la licuefacción de los polisacáridos insolubles de la pared celular tales como: pectina, celulosa, lignina y hemicelulosa. Estos últimos componentes son responsables del decrecimiento del rendimiento del proceso ya que al acumularse en la vecindad de la membrana provocan una reducción significativa del flujo del permeado (Vaillant *et al.*, 2001, Girard & Fukumoto, 2000, Vaillant *et al.*, 1999). En el

caso de jugos pulposos la presencia de pectinasas y celulasas es esencial, presentando un efecto sinérgico significativo (Vaillant, *et al.*, 2001).

IV METODOLOGÍA

A continuación en el Cuadro 5, se presenta un resumen de las principales metodologías empleadas en el desarrollo de esta investigación. El detalle de las mismas se presenta en el capítulo 8.

4.1 Localización

La presente investigación fue desarrollada en el Laboratorio de Química del Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA) y en los Laboratorios de Química y de Análisis Sensorial de la Escuela de Tecnología de Alimentos, ubicados en la Ciudad Universitaria Rodrigo Facio de la Universidad de Costa Rica (UCR). Los análisis de la fruta entera fresca se realizaron en el Laboratorio de Poscosecha del Centro de Investigaciones Agronómicas (CIA), los análisis de capacidad antioxidante de la fruta y del jugo clarificado de mora en el Centro de Investigaciones de Ciencias del Mar y Limnología (CIMAR) y los ensayos de microfiltración tangencial en el Centro de Investigación en Productos Naturales (CIPRONA), ubicados en las instalaciones de la Ciudad de la Investigación de la Universidad de Costa Rica (UCR).

4.2 Materia prima

Se utilizó mora (*Rubus adenotricchus*) de la variedad localmente conocida como "Vino con espinas". Para cumplir con el primer objetivo planteado en la presente investigación, las moras fueron cosechadas de la parcela del Sr. Víctor Garita, ubicada a 2200 msnm, en La Trinidad, distrito de Copey, Cantón de Santa María de Dota, a 38 Km de San José a tres estados de madurez los que son definidos más adelante en este capítulo.

Para el progreso de los restantes objetivos (2.2.2 a 2.2.4) se adquirieron moras de la misma variedad (Vino) a la Asociación de Productores y Exportadores de Mora y Frutales de Altura (APROCAM), exclusivamente en estado maduro (estado 3 de la escala propuesta) y congelado (-20°C). Estas frutas fueron cosechadas en la zona sur de las provincias de San

José y Cartago, en las vecindades del Cerro de la Muerte y zona de Los Santos (alturas de producción entre los 1700 y 2200 msnm).

4.3 Escala de madurez del fruto y plan de cosecha.

Las frutas fueron cosechadas a tres estados de madurez según se indica a continuación:

1. Fruta de madurez intermedia (color rosa).
2. Fruta a $\frac{3}{4}$ de madurez (color rojo).
3. Fruta totalmente madura (color negro, textura firme y no sobremadurada).

Para la recolección de las muestras la parcela se dividió en tres lotes (A, B y C), de los que se tomaron una muestra de fruta en cada estado de madurez. La muestra consistió en un total de 2,0 – 2,5 kg de fruta (10 canastas con 200 – 250 g cada una). Se seleccionaron solamente frutos sanos, sin daño mecánico o biológico aparente, a los grados de madurez establecidos. Se recolectaron procurando tomar solamente frutas medianas y grandes (evitando las moras pequeñas). Las frutas fueron recolectadas y colocadas inmediatamente en recipientes utilizados por los productores para la cosecha (canastas plásticas cerradas). Cada canasta fue rotulada según el lote y el grado de madurez correspondiente (A, B, C y 1, 2, 3), según el caso. Se colocaron en hieleras con hielo en el fondo y se transportaron al CITA. Una vez allí, las frutas de un mismo lote y estado de madurez fueron mezcladas para su homogenización, obteniendo 9 muestras: A1, A2, A3, B1, B2, B3, C1, C2, C3. A partir de cada muestra, se tomó una porción representativa (250 g) de fruta entera.

4.4 Caracterización físico química según estado de madurez del fruto.

Con el fin de conocer las variaciones de diferentes propiedades físico-químico a los tres estados de madurez en estudio, se realizaron los análisis que se detallan a continuación.

4.4.1 Análisis de la fruta fresca entera.

Los análisis sobre la fruta entera fueron realizados el mismo día del muestreo en el Laboratorio de Poscosecha del CIA. Para estos análisis se utilizó una porción representativa (250 g) de fruta entera de cada muestra (A1, A2, A3, B1, B2, B3, C1, C2, C3) y se determinó: peso de la fruta, dimensiones (ancho y largo) y color (Colorímetro Colorflex de Hunter Lab.) Las mismas muestras fueron homogenizadas utilizando una licuadora doméstica para determinar: sólidos solubles ($^{\circ}$ Brix), acidez titulable y pH (Anexo 8.1 secciones 8.1.1 a 8.1.5). Los resultados fueron procesados por medio de un análisis de varianza (ANDEVA)², y las diferencias de los promedios correspondientes a cada estado de madurez, fueron comparadas utilizando la prueba Tukey con un valor de α de 0,05

El resto de las muestras fueron unificadas según su estado de madurez y en el Laboratorio de Química del CITA el mismo día de muestreo se determinó: humedad, grados brix y color (Anexo 8.1 secciones 8.1.14, 8.1.6 y 8.1.3). Cada una de estas muestras homogenizadas fue congelada en nitrógeno líquido y posteriormente liofilizada en recipientes protegidos de la luz, hasta alcanzar una humedad de alrededor del 0,7%. Los resultados obtenidos de humedad, grados brix y color a cada estado de madurez, fue evaluado por medio de un análisis de varianza (ANDEVA) y los promedios fueron comparados utilizando la prueba de Tukey con un valor de α de 0,05.

Las muestras liofilizadas fueron homogenizadas y empacadas en bolsas laminadas opacas y mantenida en congelación (cámara de -20°C) para consecutivos análisis. La homogenización de las frutas no implicó la eliminación de semillas u otras partes de la mora, consistió simplemente en el mezclado de las mismas.

² En todos los análisis estadísticos realizados para esta tesis se utilizó el programa estadístico de SAS Institute JMP versión 5.1.

Cuadro 5 – Síntesis de los principales métodos utilizados

Valor Medido	Abreviatura	Método	Materiales	Unidad	Referencia
COLOR	L* a* b*	Hunter Lab	Equipo Colorflex Huter Lab		
SOLIDOS SOLUBLES	° Brix	Refractometría	Refractómetro tipo ABBE	° Brix	932.12 AOAC (1990)
HUMEDAD		Medición de la pérdida de peso por evaporación de agua en estufa al vacío	Estufa de vacío (20 ± 5 mm de Hg) 69 a 71 °C	% Humedad	920.151 y 934.06 de AOAC (1999) CITA e (2006)
CENIZAS TOTALES		Cuantificación de residuo inorgánico resultante de la incineración de la muestra a 550°C.	Mufla	% de la materia fresca y de la materia seca	AOAC (1999) CITA a (2006)
AZÚCARES TOTALES		Cuantificación e identificación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	Cromatógrafo Shimadzu RID-6A	% de la materia fresca y de la materia seca	AOAC (1993) CITA b (2006)
FIBRA DIETÉTICA TOTAL	FDT	Método enzimático	Kit Sigma Chemical Co. No TDF-100 con: Alfa amilasa; Proteasa; Amiloglucosidasa	% de la materia fresca y de la materia seca	985.29 AOAC (1999) CITA c (2006)
CARBOHIDRATOS TOTALES + LIGNINA		Diferencia (Materia Seca – Proteína – Ceniza – Grasa – ácidos orgánicos).		% de la materia fresca y de la materia seca	
CARBOHIDRATOS DISPONIBLES		Diferencia (Carbohidratos totales + lignina – fibra dietética)		% de la materia fresca y de la materia seca	
PROTEÍNAS		Contenido de nitrógeno total (Kjeldahl)	Digestor Foss Tecator 2020 2200 Kjtec auto destillation	% de la materia fresca y de la materia seca	920.152 AOAC (1999) CITA d (2006)
GRASA		Extracción con éter de petróleo.	Extractor intermitente Soxhlet	% de la materia fresca y de la materia seca	AOAC (1993) CITA f (2006)
POLIFENOLES TOTALES		Reacción de óxido reducción	Espectrofotómetro Shimadzu Solución Folin Citocalteu Solución CaCO ₃ Solución de ácido gálico	mg de ácido gálico equivalente / 100g (mgGAEeq/100g)	Slinkard & Singleton (1977) adaptado por Brat <i>et al.</i> (2005)

CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	ORAC	Espectrofotometría de fluorescencia	Trolox (patrón antioxidante) Fluoresceína de sodio AAPH (patrón radicales libres)	μmol de Trolox equivalente / g. (μmolTE/g)	Ou (2001) modificado por Vaillant (2005)
ANTOCIANINAS TOTALES		pH diferencial - basado en los cambios estructurales de las antocianinas	Espectrofotómetro UV-visible (Shimadzu UV-1700 Pharma Spec.) Buffer pH 1 y pH 4,5	mg de cianidin 3-glucósido / 100g	Giusti & Wtolstan (2001)
MATERIAL INSOLUBLE EN ALCOHOL	MIA	Lavado de la pulpa con etanol anhidro / etanol 80% / acetona y secado con éter.	Filtro Büchner con vacío.	g/100g	Brillouet (1988)
MATERIAL INSOLUBLE EN ALCOHOL Y AGUA	MIAA	Lavado con agua destilada (4°C)	Filtro Büchner con vacío.	g/100g	
PECTINA SOLUBLE EN AGUA	PSA	Recuperación del agua de lavado de la MIAA	Rotavapor Büchi 461 (a 50°C)	g/100g	
DETERMINACIÓN DE LIGNINA DEL MIAA		Eliminación de sustancias glucosídicas del MIAA con H ₂ SO ₄ recuperando la lignina insoluble.		% de MIAA	Effand (1977)
DETERMINACIÓN DE FIBRA INSOLUBLE (Hemicelulosa y Celulosa)		Acción combinada de detergentes ácidos y neutros.			Van Soest & Robertson (1981)
HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL MIAA		Hidrólisis de la pared celular purificada (MIAA) con preparados comerciales.			Brillouet (1988) adaptado para mora
DETERMINACIÓN DE ÁCIDO GALACTURÓNICO	AGU	Espectrofotometría a 500 nm Metahidroxidifenil (MHDP)	Espectrofotómetro UV-visible Shimadzu UV-1700 Pharma Spec.)	% AGU	Blumenterena & Asbor Hansen (1973)
DETERMINACIÓN DE AZÚCARES NEUTROS	AN	Espectrofotometría a 625 nm Antrona	Espectrofotómetro UV-visible Shimadzu UV-1700 Pharma Spec.)	% AN	Dubois (1956)

4.4.2 Análisis de la fruta homogenizada liofilizada.

A las frutas liofilizadas correspondientes a los tres estados de madurez (1, 2 y 3), se les determinó: cenizas totales, azúcares totales, fibra dietética total, proteínas, grasa, humedad, carbohidratos totales, polifenoles totales, antocianinas totales, contenido de vitamina C y capacidad antioxidante por el método ORAC. Con los resultados obtenidos se realizó un ANDEVA por cada variable y los promedios fueron comparados (a los tres estados de madurez), utilizando la prueba de Tukey con un valor de α de 0,05.

Al término de este primer objetivo, se construyó una escala de maduración de la mora costarricense, que permitiera apreciar las variaciones en las propiedades físico-químicas y funcionales de la fruta en relación con la apariencia de la fruta.

4.5 Caracterización química de la pared celular de la mora.

La caracterización de la pared celular de la mora se realizó con dos objetivos fundamentales: conocer los componentes que aportan a la fracción fibra dietética de la mora como alimento funcional; y la de adquirir una mayor comprensión de la acción del preparado enzimático comercial seleccionado para la licuefacción de la pared celular. Como fue mencionado anteriormente (apartado 4.2), a partir de este punto se trabajó únicamente con la mora en estado maduro (estado 3 de la escala propuesta).

Con el fin de caracterizar y cuantificar los componentes constituyentes de la pared celular de la mora, se procedió a extraer el material insoluble en alcohol y agua (MIAA), y se le evaluó el contenido de pectina, almidón, proteína, lignina, hemicelulosa, celulosa y cenizas. En la Figura 5, se presenta la sucesión simplificada de los análisis que se realizaron y en el Anexo 8.1 (secciones 8.1.17 a 22; 8.1.13 y 8.1.7) se describen los métodos de análisis a utilizar.

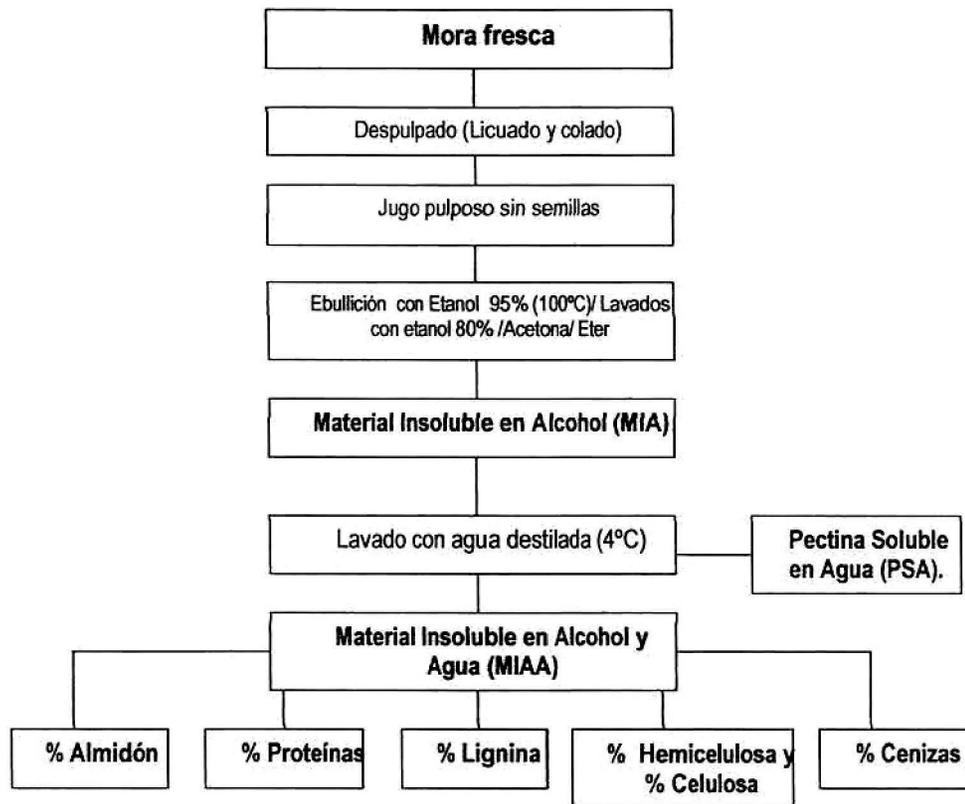


Figura 5 - Sucesión de análisis realizados para la cuantificación de los componentes de la pared celular de la mora.

4.6 Determinación del preparado enzimático y la concentración de enzima a utilizar para la licuefacción de la pared celular de la mora variedad Vino durante el proceso de microfiltración tangencial.

La selección del preparado enzimático comercial y de las condiciones de acción busca reducir la viscosidad y el contenido de sólidos insolubles en suspensión que disminuyen el flujo de permeado durante el proceso de obtención del jugo clarificado de mora por microfiltración tangencial. En base a los resultados obtenidos de composición de la pared celular de la mora, los reportes de la actividad enzimática de los preparados comerciales realizada por INIAP (se presenta en el Anexo 8.2) y el procedimiento que se detalla en la sección 4.6.1, se seleccionó la enzima idónea para tal fin.

4.6.1 Diseño experimental.

Se probaron **tres preparados enzimáticos comerciales** (Klerzyme 150, Rapidase vegetable juice y Clarex citrus 12 XL de la firma comercial DMS Food Specialties - Mexico) a **tres concentraciones** (100, 50 y 25 ppm), manteniendo el **tiempo de incubación y la temperatura constantes** (1 hora y 35°C respectivamente), sobre la pared celular purificada de la mora (MIAA)³. La utilización de un tiempo de incubación de 1 hora es mencionado por Vaillant et al. (1999) como máximo aceptable en la industria de las frutas.

El diseño experimental fue **aleatorio irrestricto** con 9 tratamientos enzimáticos y tres repeticiones por tratamiento. Las **variables de respuesta** fueron el **contenido de azúcares neutros** (evaluado por el método de Antrona) y de **ácido galacturónico**, medidas sobre el sobrenadante resultante del proceso de centrifugación posterior al tratamiento con enzimas, descrito en el Anexo 8.1 (secciones 8.1.26 y 8.1.27).

Los resultados obtenidos en las variables de respuesta fueron procesados utilizando el programa JMP versión 5.1 de SAS. La escogencia del pretratamiento enzimático para el

³ Las concentraciones de los preparados comerciales fueron calculadas en base al contenido de MIAA en 1 Kg de pulpa de mora.

proceso de microfiltración tangencial de jugo de mora, se realizó por medio de un análisis de varianza, utilizando la prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$). El criterio planteado para la selección del preparado comercial más adecuada fue aquel que demostró un mejor comportamiento para ambas variables de respuesta.

4.6.3 Preparación de la materia insoluble en alcohol y agua (MIAA) para el tratamiento enzimático.

Para evitar posibles interferencias por la presencia de almidón y de proteínas citoplasmáticas en el desempeño de los preparados enzimáticos comerciales sobre la MIAA, previamente se se determinó el contenido de estos componentes. Cuando los contenidos en alguno de estos componentes fue mayor al 5% se consideró necesaria su extracción. En la Figura 6, se muestra el diagrama de flujo de los pasos a seguidos para la selección de la enzima comercial de mejor comportamiento en la licuefacción de la MIAA de mora. En el Anexo 8.1 (secciones 8.1.17, 8.1.19 y 8.1.23 a 27) se describe cada análisis.

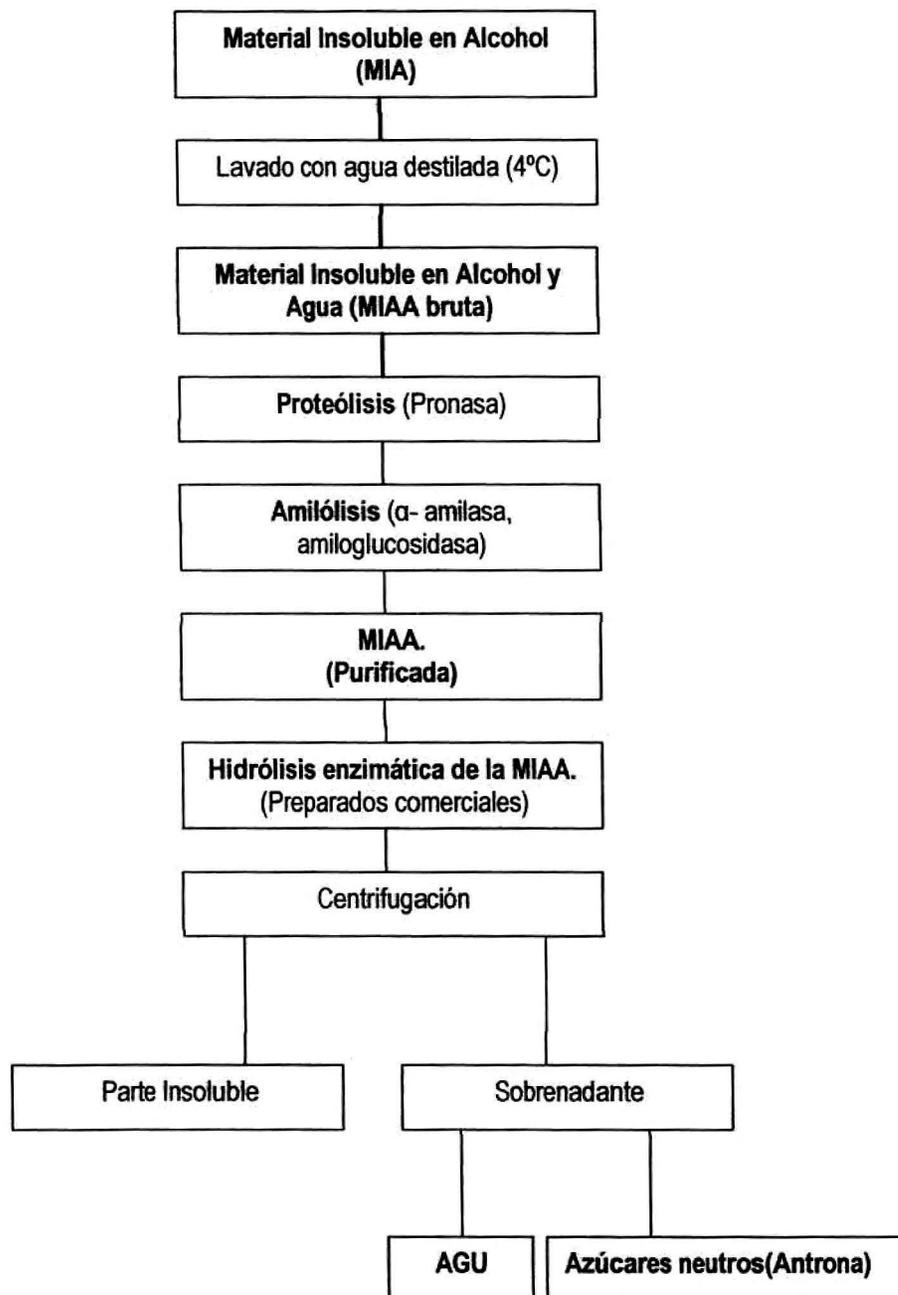


Figura 6 - Diagrama de flujo realizado para la selección del preparado enzimático comercial de mejor comportamiento para la licuefacción de la MIAA de mora.

4.7 Aplicación del pretratamiento enzimático para la obtención de jugo clarificado de mora mediante microfiltración tangencial y evaluación de su efecto sobre las propiedades funcionales.

De los resultados obtenidos en la sección precedente (4.6), se seleccionó el preparado enzimático comercial para tratar la pulpa de mora madura, previo a la operación de microfiltración tangencial. En la Figura 7, se presenta un esquema simplificado de los componentes de la unidad piloto de microfiltración tangencial que se utilizó para estos ensayos.

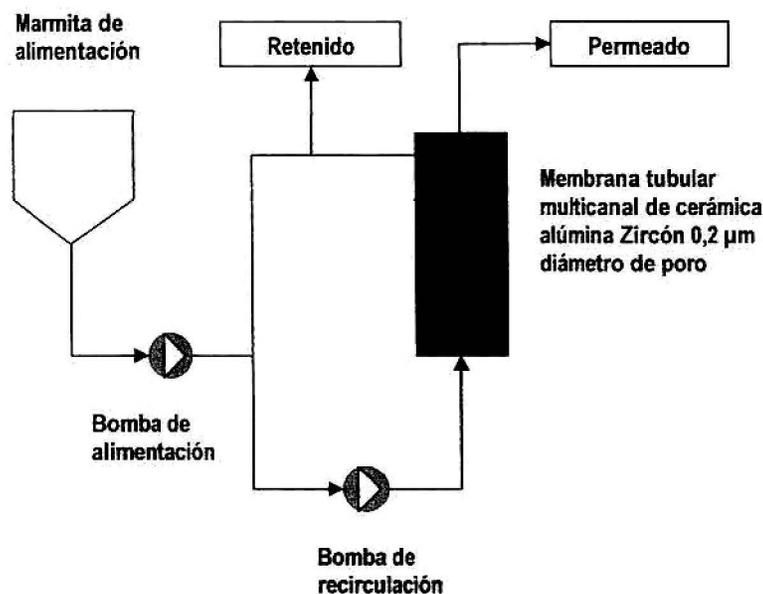


Figura 7 - Esquema simplificado de la unidad piloto de microfiltración tangencial.

4.7.1 Ensayos

Se realizaron **tres (3) ensayos de microfiltración de 1 hora de duración**, los cuales permitieron obtener muestras de jugo y producto retenido, para la evaluación de las propiedades funcionales del producto.

4.7.3 Evaluación

Se evaluó el efecto de las operaciones de pretratamiento enzimático y clarificación sobre las propiedades funcionales de la mora, en los jugos de fruta: **previo al tratamiento enzimático**, **al final del tratamiento enzimático** y luego de la **operación de microfiltración**. En la Figura 8, se presenta el diagrama de flujo del proceso realizado para la obtención de jugo clarificado de mora, las flechas de color rojo indican los puntos de toma de muestras para los análisis.

La fruta congelada procedente de APROCAM, se descongeló por un período de 24h a 5°C. Una vez descongelada se obtuvo la pulpa utilizando una despulpadora (Indiana), en dos etapas, en la primera se utilizó una malla de 1,524 mm de abertura de poro la que permitió obtener una pulpa de mora en la cual el grueso de semillas y tallos fue eliminado. En una segunda etapa la pulpa fue procesada con una malla de 0,838 mm de abertura de poro obteniéndose una pulpa libre de semillas e impurezas.

El paso siguiente consistió en el calentamiento de la pulpa en una marmita hasta una temperatura de $35\pm 1^\circ\text{C}$. Cuando la pulpa alcanzó dicha temperatura se procedió al agregado del preparado enzimático (Klerzyme 150) a razón de 100ppm. Durante la hora de incubación, se agitó el jugo fue agitado manualmente en forma esporádica.

Habiéndose cumplido el pretratamiento enzimático, se comenzó el proceso de clarificación. Durante el proceso de MFT, se mantuvo una P_{tm} de 1,65 bar, una velocidad tangencial (U) de 7m/s y una temperatura promedio de $35\pm 1^\circ\text{C}$. La recopilación de datos de volumen de permeado (L), flujo (L/h), temperatura del permeado, la presión de entrada, y de salida (bar) se realizó manualmente.

La toma de muestras se realizó lo más cuidadosamente posible y posteriormente fueron llevadas a la cámara de congelación de frutas.

Al culminar cada ensayo, con el fin de no perder permeabilidad de la membrana, el equipo fue lavado siguiendo las indicaciones del fabricante.

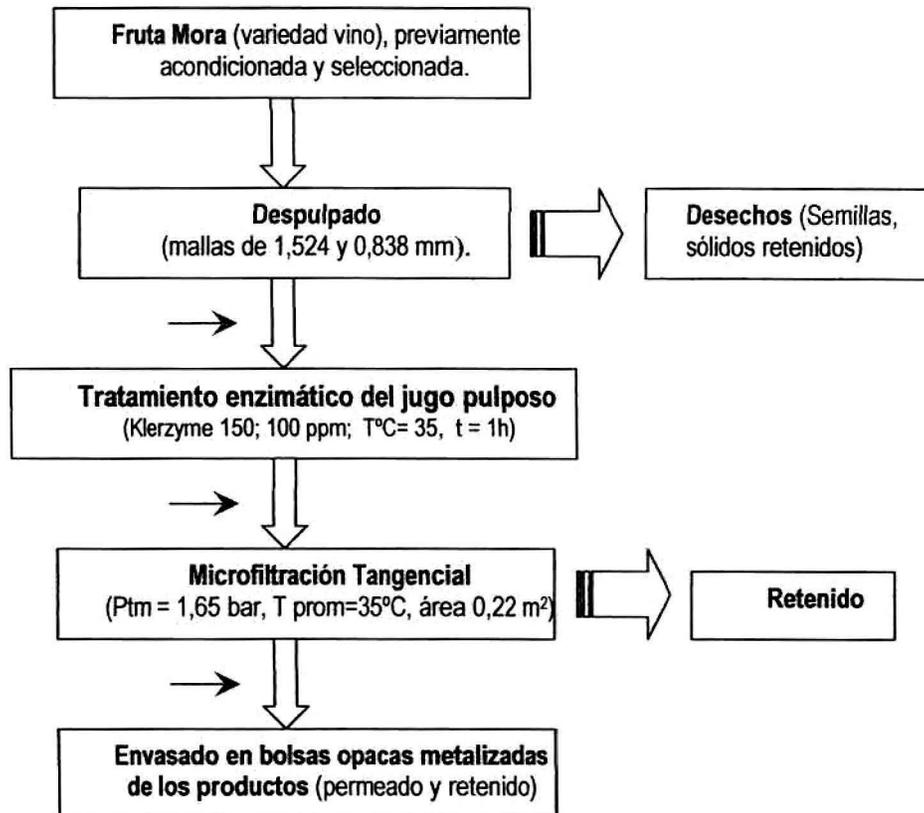


Figura 8 - Diagrama del proceso realizado para la obtención de jugo clarificado de mora

A las muestras se les determinó el pH, grados Brix, color, polifenoles total, contenido de vitamina C, antocianinas totales y capacidad antioxidante por el método ORAC (Anexo 8.1, secciones 8.1.3 a 8.1.6 y 8.1.10 a 8.1.12). Los resultados fueron analizados por separado utilizando la prueba t de Student ($\alpha = 0,05$).

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Caracterización físico-química y como alimento funcional de la mora (*Rubus spp*) a diferentes estados de madurez.

5.1.1 Influencia del grado de madurez sobre las características fenotípicas de la mora.

En la Figura 9, se muestra el color y la apariencia general de la fruta, a los 3 estados de madurez propuestos y la caracterización fenotípica cuantitativa que se presenta en el Cuadro 6.



Figura 9. (fotografía) Color de la mora según la escala de madurez propuesta (Grado 1: estado de madurez intermedio, Grado 2: tres cuartos de madurez, Grado 3: totalmente madura).

Cambios en el peso, dimensiones y color de la fruta. El peso de la fruta se incrementa conforme avanza el estado de madurez (Cuadro 6) con un valor promedio de 2,7g al alcanzar el estado maduro. Estos cambios de peso se acompañan con cambios en las dimensiones de la fruta, la cual se torna más ancha (1,5 cm en promedio) y larga (2,0 cm en promedio) en el estado maduro. Estos resultados muestran que los cambios de forma y peso se acompañan con cambios del color externo de la fruta, lo cual coincide con la etapa final de desarrollo de la mora mencionada por Hernández-Gil & Bautista (s/f).

Respecto a los parámetros de color externos, la luminosidad (L^*) disminuye significativamente ($p < 0,05$) al pasar del estado de madurez intermedio al totalmente maduro, indicando que la fruta se oscurece (Figura 9). El parámetro b^* (indicador de los cambios de color de amarillo a azul en el eje de las ordenadas) presenta el menor valor absoluto al estado de fruta totalmente madura y es significativamente diferente ($p < 0,05$) respecto al estado de tres cuartos de madurez (Cuadro 6). El parámetro a^* (indicador de los cambios de color que van de verde a rojo) varía significativamente ($p < 0,05$) entre los grados de madurez, siendo mayor para el estado de tres cuartos de madurez y menor para la fruta totalmente madura (Cuadro 6).

Con el propósito de visualizar los cambios en el color de la fruta a los estados de madurez planteados se estimaron los valores de "Hue" (que indica el tono o variación con respecto al estado puro del color) y el valor de "Chroma" (que indica la intensidad o pureza del color) con las fórmulas expuestas en el anexo 8.1.3.

En el estado de madurez intermedio y el estado de madurez tres cuartos, el Hue obtuvo valores de 0,2, no difiriendo significativamente entre ambos estados. Este valor además indica una posición muy cercana al eje de las abcisas en las variaciones del color rojo (Figura 9). Para la fruta en estado madura, el valor de Hue fue de 0,3 (existe diferencia significativa a $p < 0,05$) lo que indica que en este caso existe una tendencia mayor hacia el rojo y el azul (menores valores absolutos de a^* y b^*).

La diferencia entre los estados intermedio y tres cuartos de madurez, es que el primero los colores son menos intensos (Chroma) y más luminoso (L) (menos oscuro). No obstante, al pasar al estado de fruta completamente madura aumenta el "Hue" significativamente (0,3) posicionándose más hacia los tonos azules y rojos mezclados con negros (indicados por la disminución significativa de la luminosidad). Los resultados del análisis de color (Hunter Lab) son coincidentes con lo que visualmente se puede observar en el momento de la cosecha de la fruta (Figura 9).

Cuadro 6. Caracterización fenotípica de la mora según la escala de madurez propuesta¹.

Estado De madurez	Peso (g)	Ancho (cm)	Largo (cm)	Color (Hunter Lab)				
				L*	a*	b*	Hue	Chroma
Intermedio	1,8 ± 0,4 c	1,3 ± 0,1 c	1,8 ± 0,2 b	32,1 ± 0,8 a	31,4 ± 0,6 b	7,0 ± 0,4 b	0,20 ± 0,01b	7,0 ± 0,4a
Tres cuartos	2,1 ± 0,6 b	1,3 ± 0,1 b	1,8 ± 0,2 b	24,1 ± 0,5 b	35,9 ± 0,2 a	8,4 ± 0,3 a	0,20 ± 0,01b	8,0 ± 0,3b
Madura	2,7 ± 0,8a	1,5 ± 0,1 a	2,0 ± 0,3 a	15,2 ± 0,7 c	25,8 ± 1,4 c	6,4 ± 0,4 b	0,300 ± 0,003a	6,4 ± 0,4a

¹ Datos expresados como promedio ± desviación estándar. Peso, ancho y largo n=60, color n=3. Letras distintas en la misma columna indican diferencia significativas ($P \leq 0,05$, Tukey).

5.1.2 Influencia del grado de madurez sobre la composición química de la mora.

En el Cuadro 7 se presentan los resultados de la composición química de la mora, a los 3 estados de madurez propuestos.

Materia seca, acidez, pH y °Brix. El contenido de materia seca del fruto (%) disminuye significativamente ($p < 0,05$) a medida que se alcanza el estado completamente maduro. Esto se explica por el aumento en el contenido de humedad, que ejerce un efecto de "dilución" sobre los componentes de la materia seca de la fruta.

Este aumento en humedad va acompañado de un aumento de peso como ya se mencionó. Los sólidos solubles totales (°Brix) se incrementan significativamente del estado intermedio al maduro (5 a 8° Brix en base fresca). Según Castro & Cerdas (2005), el valor de 8 °Brix es un indicador de que la fruta ha llegado al estado maduro.

No hay diferencia significativa entre los valores de acidez para a los estados intermedio y tres cuartos de madurez, pero éstos son mayores que los valores encontrados para el estado maduro (2,82 vs 2,25 g ácido cítrico/100g).

Este comportamiento es similar al reportado por Siriwoham *et al.* (2004), donde se observó una disminución de 2,3 a 1,3 g de ácido cítrico / 100g de fruta fresca y un aumento en los °Brix (11 a 18 °Brix para el cultivar Evergreen y 9,46 a 16 para el cultivar Marion).

Las variaciones de pH en la fruta concuerdan con el comportamiento de la acidez: no hay diferencia significativa entre los valores de pH para los estados intermedio y tres cuartos de madurez, pero estos son menores que los valores encontrados para el estado maduro.

González *et al.* (2000), reportan valores más altos de sólidos solubles (15,52 y 11,96 °Brix en cultivares Wild y Thornless, respectivamente) así como de pH (4,45 y 3,64) y más bajos para la acidez reportada como g de ácido cítrico / 100g de fruta fresca (0,37 y 1,16 en cultivares Wild y Thornless, respectivamente).

Reyes-Carmona *et al.* (2005), observaron que los niveles de acidez, sólidos solubles (°Brix) y pH evaluados en moras producidas en diferentes climas y regiones geográficas difieren significativamente. Por ejemplo, las moras de Oregon (variedades Marion y Siskiyou) tuvieron altos valores de acidez (3,46 y 2,55 g de ácido cítrico/100 g de fruta respectivamente) en contraste con las moras producidas en México (1,66 a 1,77 g de ácido cítrico/100 g de fruta), atribuido principalmente a las bajas temperaturas durante el desarrollo del fruto en Oregon (11 °C en contraste con los 18 °C en México. Ello implica una menor degradación de los ácidos orgánicos. A su vez, las variedades de Oregon presentaron mayor contenido de sólidos solubles que las mexicanas de cualquier estación de cosecha, lo que es explicado por encontrarse esos genotipos adaptados a un fotoperíodo más largo en el verano (debido a su latitud) lo que conlleva a un período mayor de traslocación de fotosintatos al fruto.

En el caso de las moras costarricenses, las características agroclimáticas de la zona de cultivo y el genotipo, podrían determinar frutas menos dulces y más ácidas respecto a las reportadas por Reyes-Carmona *et al.* (2005) (Anexo 8.2).

Cuadro 7. Caracterización química de la mora según escala de madurez propuesta¹.

Base húmeda

Parámetro	Estado de madurez		
	Intermedio	Tres cuartos	Madura
Materia seca	17,2 ± 0,5 c (3)	16,0 ± 0,4 b (3)	15,0 ± 0,3 a (3)
pH	2,30 ± 0,03 b (3)	2,30 ± 0,01 b (3)	2,5 ± 0,1 a (3)
Acidez (equ. g Ac. cítrico / 100 g)	2,7 ± 0,1 a (6)	2,8 ± 0,1 a (6)	2,3 ± 0,2 b (6)
Sólidos solubles (°Brix)	5,0 ± 0,1 c (6)	6,4 ± 0,2 b (6)	7,7 ± 0,1 a (6)
Ceniza (%)	0,60 ± 0,03 a (3)	0,50 ± 0,05 ab (3)	0,50 ± 0,02 b (3)
Proteína (%)	1,20 ± 0,01 a (3)	1,00 ± 0,02 b (3)	0,90 ± 0,05 c (3)
Grasa (%)	1,10 ± 0,02 a (3)	0,8 ± 0,4 a (3)	0,8 ± 0,1 a (3)
Fibra dietética (%)	9,5 ± 1,0 a (3)	8,2 ± 0,5 ab (2)	6,5 ± 0,4 b (3)
Carb. totales + lignina (%)	11,6 ± 0,4 a (3)	10,8 ± 0,5 ab (3)	10,6 ± 0,1 b (3)
Carb. disponibles (%)	2,1 ± 0,6 b (3)	2,5 ± 0,1 ab (2)	4,1 ± 0,3 a (3)
Azúcares totales (%)	0,9 ± 0,1 c (3)	2,7 ± 0,1 b (2)	3,3 ± 0,2 a (3)
Sacarosa (%)	nd (3)	nd (2)	nd (3)
Glucosa (%)	0,50 ± 0,03 b (3)	1,4 ± 0,5 a (2)	1,7 ± 0,1 a (3)
Fructosa (%)	0,40 ± 0,03 b (3)	1,3 ± 0,4 a (2)	1,5 ± 0,1 a (3)

Base seca

Parámetro	Estado de madurez		
	Intermedio	Tres cuartos	Madura
Ceniza (%)	3,5 ± 0,1 a (3)	3,4 ± 0,3 a (3)	3,1 ± 0,2 a (3)
Proteína (%)	7,0 ± 0,2 a (3)	6,3 ± 0,2 b (3)	5,9 ± 0,3 b (3)
Grasa (%)	6,1 ± 0,2 a (3)	5 ± 2 a (3)	5,0 ± 0,9 a (3)
Fibra dietética (%)	55 ± 5 a (3)	52 ± 3 ab (2)	43 ± 2 b (3)
Carb. Totales+ lignina (%)	67,4 ± 0,7 a (3)	68 ± 3 a (3)	71 ± 1 a (3)
Carb. disponibles (%)	12 ± 4 b (3)	15,7 ± 0,6 ab (2)	28,0 ± 3,0 a (3)
Azúcares totales (%)	5,5 ± 0,5 c (3)	17,3 ± 0,5 b (2)	22 ± 1,5 a (3)
Sacarosa (%)	nd a (3)	nd a (2)	nd a (3)
Glucosa (%)	3,0 ± 0,2 b (3)	9 ± 3 a (2)	11,7 ± 0,7 a (3)
Fructosa (%)	2,5 ± 0,2 b (3)	8 ± 3 a (2)	10,4 ± 0,8 a (3)

¹ Datos expresados como promedio ± desviación estándar; número entre paréntesis indica el n° de repeticiones (n). Letras distintas en la misma fila indican diferencia significativas (P ≤ 0,05, Tukey). nd = no detectado.

Cenizas, Proteína y Grasa. El contenido de cenizas y proteínas en base fresca disminuye significativamente a medida que el fruto transita del estado intermedio al totalmente maduro (Cuadro 7). Sin embargo, visto en base seca, no se evidencian diferencias significativas para el contenido de cenizas entre los tres estados de madurez evaluados ni para proteínas entre los últimos dos estados de madurez (Cuadro 7). La disminución en base fresca de estas fracciones es explicada por un efecto de dilución al presentar el fruto un mayor contenido de agua. El contenido de grasa (%) tanto en base seca como en fresca, no varía significativamente con el transcurso de la maduración de la mora.

El contenido (%) final en base fresca de cenizas, proteínas y grasa, en ninguno de los casos supera el 1%, siendo estos valores comunes para la mayoría de las frutas.

Carbohidratos totales + lignina, fibra dietética y carbohidratos disponibles. Los carbohidratos totales + lignina en base fresca, disminuyen significativamente (11,6 a 10,6%) al pasar del estado de madurez intermedio al completamente maduro (Cuadro 7). Sin embargo, al observar su evolución en base seca no se encuentran diferencias significativas (Figura 10). Esto se explica por el efecto de "dilución" de los carbohidratos a causa del aumento significativo en el contenido de agua.

La mora, como la mayoría de las frutas, a medida que va alcanzando el estado totalmente maduro, cambia los tipos de carbohidratos que la conforman pero no la cantidad. En la Figura 10, se observa claramente que a medida que avanza el desarrollo del fruto, disminuye significativamente el contenido de fibra (polisacáridos). Simultáneamente se observa un aumento significativo en el contenido de carbohidratos disponibles. Según Hernández-Gil & Bautista (s/f), el aumento de azúcares disponibles es explicado por una mayor traslocación de fotosintatos al fruto y/o a la hidrólisis de sustancias cementantes de la pared celular (pectina). Como se observa en el Cuadro 7, la cantidad de azúcares totales (HPLC) es levemente inferior al contenido en azúcares disponibles (estado maduro). Esto es explicado por diferencias en la precisión a la hora del cálculo. Mientras los azúcares disponibles se estiman por diferencia (fibra dietética – "carbohidratos totales + lignina") los azúcares totales se cuantifican e identifican directamente a través de HPLC.

Al aumentar la concentración de azúcares disponibles dentro de las células del fruto aumenta el potencial osmótico (más concentración de solutos intracelulares), permitiendo el ingreso de agua desde el exterior. Este proceso lleva a la acumulación de agua en el fruto y a su aumento de peso y tamaño (Cuadro 7).

La mora costarricense en estado totalmente maduro, se distingue como un alimento rico en fibra, aportando en promedio 6,5g de fibra dietética por cada 100g de fruta fresca. Estos valores son muy superiores a los reportados por la UdeA (1995) en pulpa de mora de Castilla (1,36 – 1,38%). Pak (2003), utilizando el mismo método de análisis de fibra dietética que el empleado en la presente investigación, reporta un valor promedio de $2,41 \pm 1,26$ % de fibra dietética para las 38 frutas analizadas, entre las que se incluyen: ciruelas, uvas, papaya, manzanas verdes y rojas, higos, duraznos, nectarinas, damascos, fresas, melones, pera, plátano y naranjas entre otras. Aunque este es un valor promedio, ninguna de estas frutas se aproxima al nivel de fibra dietética que aporta la mora costarricense. Esto es explicado porque nuestros análisis a los distintos estados de madurez fueron realizados con la fruta entera, la cual contiene las semillas. El material insoluble en alcohol (MIA) de la pared celular es un estimador de la fibra dietética que contiene la fruta. Como veremos más adelante, la mora contiene 2,9% de Material Insoluble en Alcohol (MIA) en jugo pulposo sin semillas. Esta diferencia (de 6,45% de fibra dietética en la fruta y de 2,9% de fibra dietética valorada como MIA en el jugo pulposo sin semilla) estaría dada por la presencia de las semillas al estimar el valor para la fruta entera.

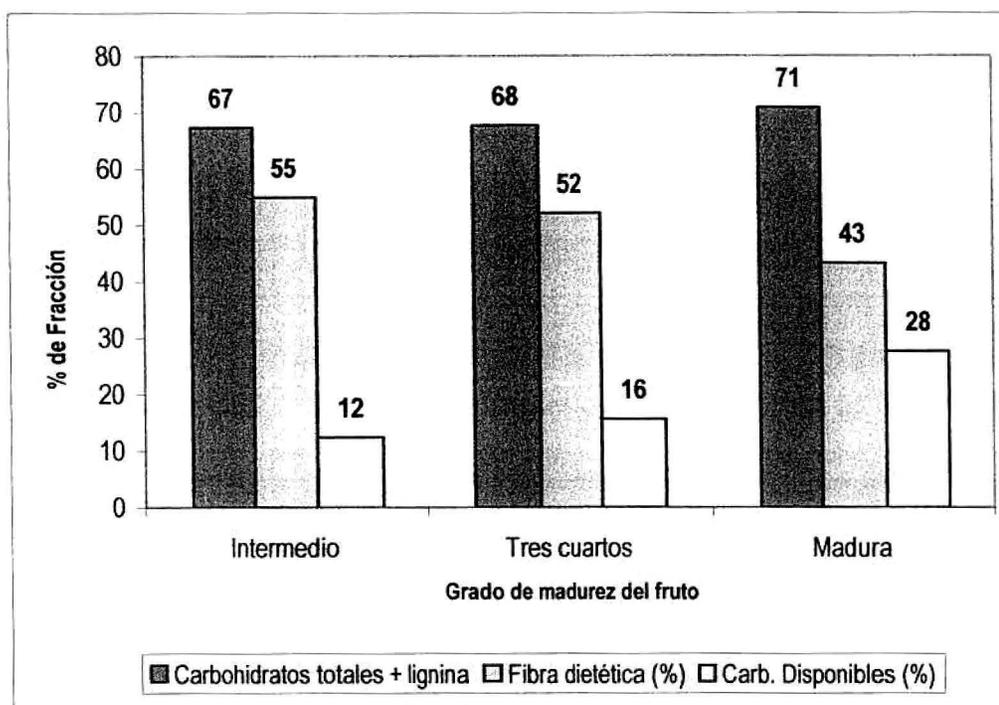


Figura 10 - Contenido y evolución de los carbohidratos totales (% promedio, base seca) según estados de madurez de la mora.

Azúcares totales por HPLC: Los principales azúcares encontrados en las moras son glucosa y fructosa, los cuales aumentan significativamente a medida que transcurre el desarrollo del fruto (Cuadro 7). En estado maduro la mora contiene en promedio un contenido de glucosa de $1,7 \pm 0,1\%$ en base fresca ($11,7 \pm 0,7\%$ base seca) y $1,5 \pm 0,1\%$ de fructosa en base fresca ($10,4 \pm 0,8\%$ base seca). No se detectó la presencia de sacarosa en ninguno de los estados de madurez evaluados. Estos resultados coinciden con los reportados por Wrolstad et al. (1980) quienes encontraron únicamente glucosa y fructosa (por medio de resinas de intercambio iónico) en moras (*Rubus spp.* e híbridos)

5.1.3 Influencia del grado de madurez de la mora sobre la capacidad antioxidante (ORAC), contenido de polifenoles totales, antocianinas totales y vitamina C.

La influencia del grado de madurez sobre el contenido de antocianinas totales, polifenoles totales, vitamina C y capacidad antioxidante se presenta en el Cuadro 8.

Cuadro 8 - Contenido de antioxidantes naturales, vitamina C y actividad antioxidante (ORAC) de la mora costarricense variedad vino ¹

Base húmeda (BH)

Parámetro	Estado de madurez		
	Intermedio	3/4 Madurez	Maduro
ORAC ($\mu\text{mol TE/g}$) ²	38,3 \pm 0,1 b	42,9 \pm 2,6 b	64,3 \pm 3,9 a
Polifenoles totales (mg / 100 g) ³	580,6 \pm 23,6 a	458,7 \pm 62,8 b	524,8 \pm 24,4 ab
Antocianinas (mg / 100 g) ⁴	8,6 \pm 1,8 c	28,2 \pm 1,8 b	77,0 \pm 10,6 a
Vitamina C (mg / 100 g) ⁵	4,2 \pm 0,5 a	3,5 \pm 1,3 a	2,9 \pm 1,3 a

Base seca (BS)

Parámetro	Estado de madurez		
	Intermedio	3/4 Madurez	Maduro
ORAC ($\mu\text{mol TE/g}$) ²	222,3 \pm 6,4 b	269,2 \pm 19,9 b	431,6 \pm 30,0 a
Polifenoles totales (mg / 100 g) ³	3368,5 \pm 48,4 ab	2874,0 \pm 324,9 b	3521,1 \pm 107,0 a
Antocianinas (mg / 100 g) ⁴	49,8 \pm 10,3 c	177,3 \pm 14,7 b	517,0 \pm 62,3 a
Vitamina C (mg / 100 g) ⁵	24,4 \pm 2,1 a	22,2 \pm 8,0 a	19,6 \pm 8,6 a

¹Datos expresados como promedio \pm desvío estándar (para cada grado de madurez (n = 3). Letras diferentes en la misma fila indican diferencia significativas (P \leq 0,05).

²Datos expresados como micromoles de Trolox equivalentes (TE) por g de fruta fresca o fruta seca.

³Total de polifenoles expresados como mg equivalentes de ácido gálico (GAE) por 100 g de fruta fresca o 100 g de fruta seca.

⁴ Total de antocianinas expresadas como mg cianidina 3-glucósido por 100 g de fruta fresca o fruta seca

⁵. Expresado como mg equivalentes de ácido gálico (GAE) por 100 g de fruta fresca o 100 g de fruta seca.

Contenido en polifenoles totales. El mayor contenido de polifenoles (581 \pm 24) mg de GAE equiv/100 g peso fresco ocurre en el estado intermedio. Este contenido disminuye significativamente al pasar a $\frac{3}{4}$ de madurez (459 \pm 63 mg GAE equiv /100g peso fresco). En esta etapa el comportamiento coincide con lo reportado por Wang & Lin (2000), quienes encontraron que los polifenoles totales decrecen significativamente con la maduración de la mora (295 a 226 mg de GAE equiv/100g de fruta fresca) al pasar del estado verde a maduro.

Del estado $\frac{3}{4}$ de madurez al de fruta totalmente madura se visualizó un aumento significativo en el contenido de polifenoles totales de la mora costarricense (525 \pm 24 mg GAE equi/100g de BH). En términos absolutos en el estado maduro, la mora costarricense posee similares contenidos de polifenoles que los reportados por Sellappan *et al.* 2002, los cuales son de 555

mg GAE equi/100g fruta fresca y 417 mg GAE equi/100g fruta fresca para las variedades Choctaw y Kiowa respectivamente. Los valores reportados por Moyer (2002) son de 460 mg GAE equi/100g fruta fresca como valor promedio para las moras analizadas. Los resultados encontrados en Costa Rica son superiores a los reportados por Benbenuti *et al.* (2004), quienes reportan en promedio un contenido de $289,3 \pm 55,8$ mg de GAE equivalente /100g de mora fresca.

Si se observa en el Cuadro 8 el contenido de polifenoles, sin tomar en cuenta el agua que presenta la fruta (peso seco), al pasar del estado intermedio al de $\frac{3}{4}$ de madurez no se observa una disminución significativa de los mismos (de 3368 a 2874 mg de GAE equi/100g BS) contrario a lo observado en base al peso fresco de la fruta. El mayor contenido de polifenoles ocurre en el estado de fruta totalmente madura (3521 ± 107 mg de GAE equivalente/100g de fruta). El método de Folin-Ciocalteu cuantifica todos los polifenoles (flavonoides, no-flavonoides y antocianinas) presentes en la muestra y como se discutirá más adelante en el estado maduro la fruta presenta un mayor contenido de antocianinas, lo que hace aumentar el contenido total de polifenoles. Según Sama-Manchado & Cheynier (2006), generalmente en el estado maduro de los frutos rojos, el perfil de polifenoles está dominado por las antocianinas.

En base a lo observado, se infiere que el contenido de polifenoles no presenta un patrón de linealidad con el avance de la maduración de la fruta. Este comportamiento coincide con el reportado por Siriwoham *et al.* (2004). En su caso, el contenido de polifenoles tendió a decrecer del estado insuficientemente maduro al maduro (975 a 903 mg GAE equiv/100g de fruta fresca) y se incrementó al pasar de maduro a sobremaduro (903 a 1541mg GAE equiv/100g de fruta fresca) tal como ocurre en las moras costarricenses estudiadas. En términos absolutos los contenidos en polifenoles totales reportados por estos autores (inclusive para el estado insuficientemente maduro) son superiores a los encontrados en esta investigación, entre un 40 a 42%.

Wang & Lin (2000), encontraron que los polifenoles totales en frambuesa decrecen significativamente al pasar del estado verde a rosado y luego aumentan al pasar del estado

rosa al maduro, siendo un comportamiento similar al que se identificó en este trabajo para las moras.

Contenido en antocianinas totales. Las antocianinas totales se incrementaron significativamente ($p < 0,05$), con el avance del estado de madurez (de 8,6 a 77,0 mg/100g BH 50 a 517,0 mg/100g BS al pasar del estado intermedio al maduro) (Cuadro 8). Este comportamiento coincide con el reportado por Wang & Lin (2000), sin embargo, en términos absolutos los contenidos finales de antocianinas son más bajos (50% inferiores) al pasar de fruta rosada a madura.

En el estado maduro las moras costarricenses contienen entre un 41 y 70% menos antocianinas (BH) que el reportado por Siriwoham *et al.* (2004), para 11 cultivares de mora.

Los resultados encontrados en la presente investigación, están entre los rangos reportados por Moyer *et al.* (2002) de 70 a 230 mg /100g para 27 moras híbridas, y por Fan-Chian & Wrolstad (2005), quienes reportan rangos de 70,3 a 201 mg/100g de peso fresco para 18 diferentes cultivares de mora, Sin embargo, están por debajo del promedio (141 mg/100g y 137 mg/100g de fruta fresca, respectivamente). Benvenuti *et al.*, (2004) reportan valores promedio similares a los del presente trabajo ($88,7 \pm 24,4$ mg de cianidina 3-glucósido/100g de fruta fresca) en 8 cultivares de mora.

Reyes-Carmona *et al.*, (2005) concluyen que las diferencias en los contenidos de compuestos fenólicos parecerían ser más fuertemente explicadas por causas genóticas que por variaciones en climas o estaciones de crecimiento de los cultivos.

Contenido en vitamina C. El contenido de vitamina C en moras no cambia significativamente con el estado de madurez, siendo en promedio de 3,6 mg/100g de fruta fresca y 22 mg/100g de fruta en base seca. Hasta el momento son pocas las investigaciones que mencionan el contenido de vitamina C en la mora como realmente relevante. Benvenuti *et al.* (2004), reportan valores promedio para un total de 8 cultivares de mora de 12,9 mg/100g de peso fresco, lo que representa un contenido de 3,6 veces más que los encontrados en la presente

investigación. Este autor determina el contenido de vitamina C por HPLC, lo que podría estar incidiendo en esta diferencia.

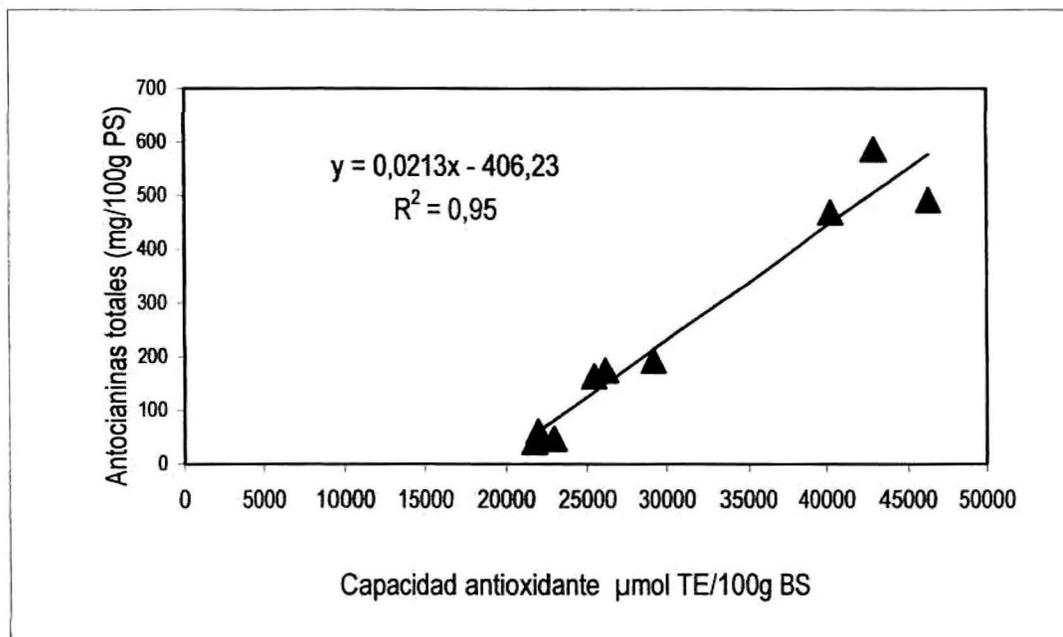
Capacidad antioxidante (ORAC). La capacidad antioxidante de las moras varía con el estado de madurez (Cuadro 8). Se observó un aumento significativo desde el estado intermedio al estado maduro (38,3 a 64 $\mu\text{moles TE/g BH}$ y de 222 a 432 $\mu\text{moles TE/g BS}$). No se encontraron diferencias significativas entre el estado intermedio y el $\frac{3}{4}$ de madurez. Estos resultados son superiores a los reportados por Wang & Lin (2000) quienes obtuvieron valores de ORAC entre 75 a 50 % inferiores para el estado rosado y maduro respectivamente.

Siriwohan *et al.* (2004), reportan valores de 58,5 a 60,9 $\mu\text{moles TE/g BH}$ al estado maduro y Siriwohan & Wrolstand (2004), reportan valores de 34,3 a 35,5 $\mu\text{moles TE/g BH}$. Los valores de ORAC de las moras costarricenses, se encuentran dentro del rango de los valores reportados por Moyer *et al.* (2000), (33 a 70,6 $\mu\text{moles TE /g BH}$) para un total de 27 moras híbridas.

Aún cuando, el contenido de polifenoles totales disminuye al pasar del estado de madurez intermedia a $\frac{3}{4}$ de madurez BH (Cuadro 8), la capacidad antioxidante de las moras se mantiene sin cambios significativos ($p < 0,05$) al transcurrir este cambio de estado. Esto se explica por el aumento significativo ($p < 0,05$) y sostenido durante los tres estados de madurez de las antocianinas.

Se encontró una correlación positiva significativa ($p < 0,05$) entre la capacidad antioxidante de la fruta y el contenido de antocianinas de las moras, mientras que resultó no significativa ($p > 0,05$) entre el contenido de polifenoles y la capacidad antioxidante (Figura 11).

Este comportamiento coincide con el reportado por Reyes-Carmona *et al.* 2005 y Wang & Lin (2000).



Antocianinas totales expresadas como mg de cianidina 3-glicósido/100g de fruta fresca. Capacidad antioxidante-ORAC, expresada como μmoles de Trolox equivalente cada 100g de fruta seca (BS). Valor de correlación resultante de la corrida estadística de los datos (JMP versión 5.1)

Figura 11 – Correlación entre el contenido de antocianinas totales ($\text{mg}/100\text{g}$ de fruta en base seca) y la capacidad antioxidante-ORAC (μmoles de Trolox equivalente cada 100g BS)

Estos valores de correlación indican que la capacidad antioxidante de las moras costarricenses está fuertemente explicada por el aumento en el contenido en antocianinas totales en BS ($R^2 = 95\%$). Al pasar del estado intermedio al maduro el contenido de antocianinas aumenta 10 veces, y la capacidad antioxidante se duplica (Cuadro 8).

No obstante, esto no significa que el contenido de polifenoles no contribuye a la capacidad antioxidante, lo que sucede es que el comportamiento de los polifenoles durante el transcurso de la escala de madurez, no es lineal. Es más, si se observa en el Cuadro 8, en el estado intermedio donde la cantidad de antocianinas es la más baja de la escala (49,8 $\text{mg}/100\text{g}$), la

fruta ya presenta casi el 52% de la capacidad antioxidante que alcanza al estado maduro, del cual un 40% se debe a los polifenoles.

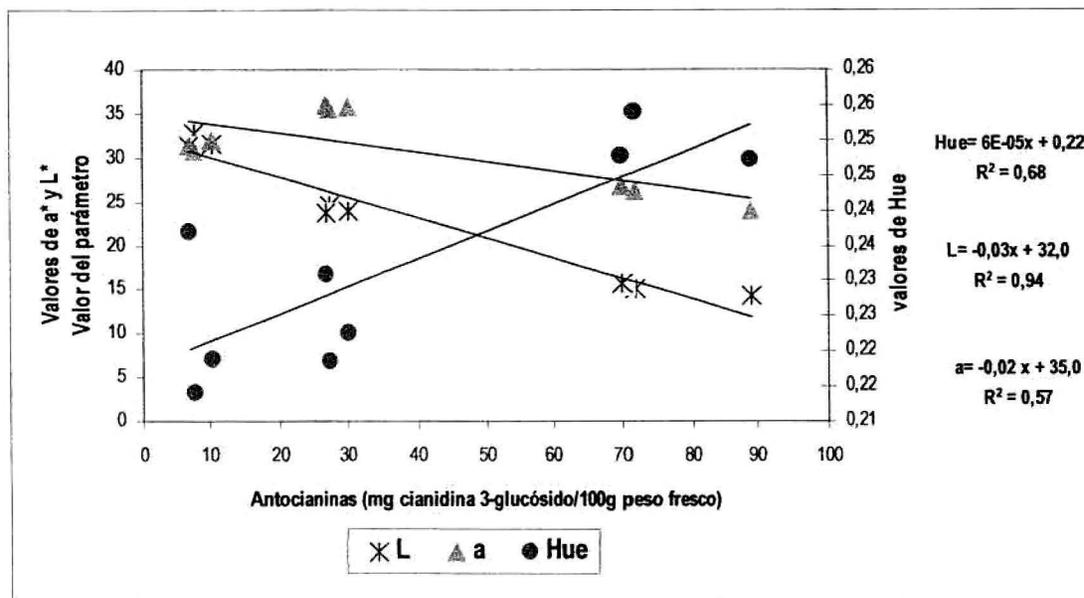


Figura 12- Correlación entre los parámetros que definen significativamente ($p < 0,05$) el color de la mora (L^* , a^* y Hue) y el contenido de antocianinas en la fruta en base fresca.

Se encontró que los parámetros L (luminosidad), a^* y "Hue" están significativamente ($p < 0,05$) correlacionados con el contenido de antocianinas de la fruta a los diferentes estados de madurez propuesto (Figura 12).

Por otra parte, que el "Chroma" y el parámetro b no presentaron una relación lineal significativa ($p > 0,05$) con el contenido de antocianinas. El parámetro L es el que mejor se correlaciona con el contenido de antocianinas de la fruta ($R^2 = 0,94$). Es decir, visualmente, cuanto menos luminosa sea la mora (más oscura) mayor será el contenido en antocianinas y por tanto su capacidad antioxidante. Sin embargo, para poder utilizar el valor de L para predecir el contenido de antocianinas ($L = 32 + 0,03$ [Antocianinas mg/100g]) es necesario aumentar el número de observaciones (e incluir moras de diferentes fincas) y volver a realizar el análisis estadístico.

No obstante, la escala de madurez propuesta es una herramienta muy útil que permite desde la finca, cosechar la materia prima en el estado más conveniente, según el objetivo de

procesamiento que se persiga. Por ejemplo, para la obtención de jugos que posean alta capacidad antioxidante, se recomienda utilizar como materia prima moras en el estado maduro, dado que presentan la mayor concentración de antocianinas y éstas están fuertemente correlacionadas ($R^2=0,95$) con la capacidad antioxidante (ORAC). Si interesara el contenido de polifenoles, cualquier estado de maduración sería adecuado. En el caso de buscar la purificación de antocianinas para ser utilizadas como colorantes naturales, posiblemente se debería escoger la mora en estado maduro.

Para ubicar los resultados de contenidos de antioxidantes y capacidad antioxidante con respecto a otros valores reportados en la bibliografía para diferentes especies y variedades de moras, referirse al Anexo 8.2.

5.2 – Caracterización de la pared celular de la mora y resultados de su hidrólisis enzimática.

En la Figura 13, presenta nuevamente el esquema para la obtención de la pared celular y la identificación de sus diferentes fracciones, señalando los rendimientos obtenidos en cada etapa.

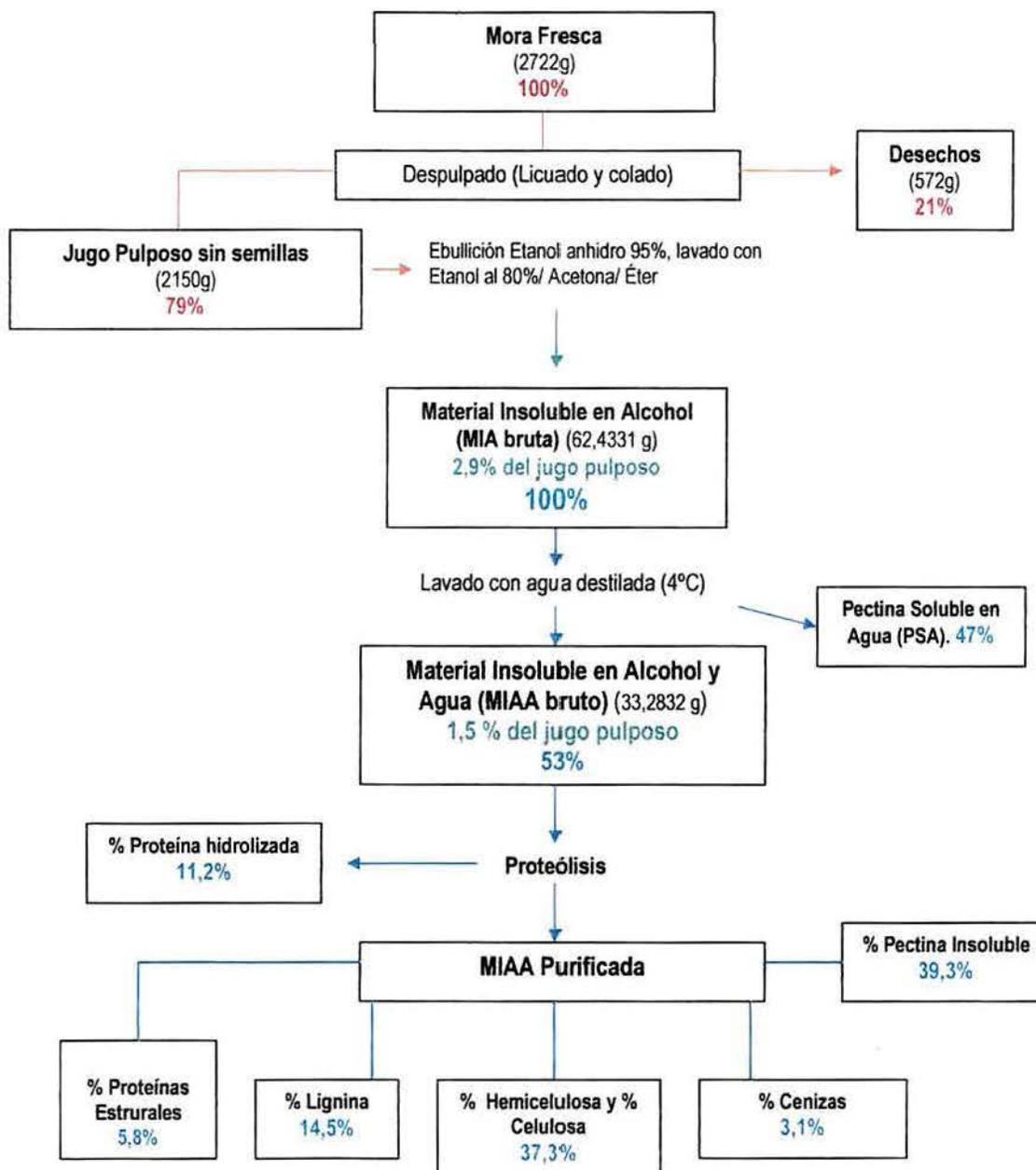


Figura 13 - Diagrama de aislamiento de las diferentes fracciones de la pared celular de la mora.

En la Figura 13, en rojo, se muestran los porcentajes de pulpa y desechos con respecto a los kg de fruta procesada, obteniéndose un 79% de jugo pulposo de mora sin semilla y un 21% de desechos que incluyen semillas y tallos.

De esa fracción de jugo pulposo sin semilla se obtuvo un 2,9% de material insoluble en alcohol (MIA), que tras sucesivos lavados con agua, permitió la obtención de un 1,5% de material insoluble en alcohol y agua (MIAA). Es decir que la MIAA representa el 53% de la MIA. El rendimiento en MIA es coincidente con el reportado (2,98%) por Dongowski & Sembréis (2001) en otra rosácea: la manzana (*Malus pumila*).

Tomando a la MIA de referencia (100%) se obtuvo un 46,6% de pectina soluble en agua (PSA) y cerca de un 53% de MIAA (los datos en relación a la MIA se presentan en azul).

No se detectó almidón en el análisis de la MIAA, mientras que se detectó un 17% de proteínas. La metodología de precipitación alcohólica de las macromoléculas, implica la separación de todos los componentes de la pared celular. Sin embargo, también co-precipitan algunos contaminantes tales como el almidón y algunas proteínas citoplásmicas. En nuestro caso, la mora madura no contiene almidón y por lo que no fue necesario hacer una amilólisis. No obstante, el alto contenido de proteínas en la MIAA permite deducir la presencia, de una contaminación por proteínas citoplasmáticas. Por lo que se requiere una proteólisis para eliminarlas, ya que estas son más sensibles al ataque de las proteasas que las proteínas de constitución que son parte integrante de la pared celular. Esta extracción también es beneficiosa para poder usar la pared purificada en las pruebas de ataque enzimático con preparados comerciales, ya que éstas dificultan la hidrólisis compitiendo por sitios de hidrólisis privilegiados en los sustratos (Brillouet *et al.* 1988). Tras la hidrólisis enzimática, se logró una reducción del 11,2% del contenido de proteínas de la MIAA. Esto permite suponer que el 5,8% de proteínas restante (que no logró extraerse tras 6 h de hidrólisis con una proteasa) correspondería a la fracción de proteínas estructurales de la pared celular de la mora.

Al final de la misma Figura 13, en azul, se muestra el resto de las fracciones obtenidas (presentadas como porcentaje de la MIAA purificada) cuyo detalle se presenta en el Cuadro 9.

Cuadro 9 – Principales componentes de la pared celular de la mora costarricense, expresados como % (p/p) de MIA (material insoluble en alcohol) y de MIAA (material insoluble en alcohol y agua purificada)¹.

	Hemicelulosa (%)	Celulosa (%)	Lignina (%)	Ceniza (%)	Proteína ² (%)	Pectina Hidrosoluble (%) ³	Pectina Insoluble (%) ³
MIA bruta	12,7 ± 1,5	7,2 ± 1,4	7,7 ± 0,2	1,6 ± 0,2	3,050 ± 0.002	46,7	20,8
MIAA purificada	23,8 ± 2,9	13,5 ± 2,6	14,5 ± 0,4	3,1 ± 0,4	5.80 ± 0,04	–	39.3

¹ Datos expresados como % promedio ± desviación estándar (con n=4 cada fracción y n=2 para proteína).

² % de proteína luego de la hidrólisis enzimática (proteasa).

³ Valores estimados por diferencia: Pectina hidrosoluble=(MIA (g) – MIAA (g)/ MIA (g))*100.

Pectina insoluble = [(MIAA (g)- Σ g celulosa, hemicelulosa, lignina, cenizas, proteína)/ MIAA (g)]*100]

La pared celular de la mora está compuesta mayoritariamente por pectina soluble (46,7% de la MIA) y pectina insoluble (20,8% de la MIA), seguida de las fracciones de hemicelulosa (12,7% de la MIA), lignina (7,7%) y celulosa (7,2%). La fracción de proteína total fue de 9,06%, aunque luego de la hidrólisis, esta se redujo a 3,05% de la MIA. Las cenizas por su parte significaron un 1,6% de la MIA.

Dado que no existen reportes en la literatura acerca de la composición de la pared celular de la mora, ha sido difícil comparar estos resultados con otros estudios. No obstante, el objetivo 1 de este trabajo (Cuadro 7), permitió determinar que la mora en estado maduro posee un contenido muy alto de fibra dietética (43,3% BS). El contenido de MIA obtenido en el trabajo (el cual es un buen estimador de la fibra dietética), sin embargo, es de un 20% BS. Esta diferencia de más de 20 puntos porcentuales se debe a que la fruta fue analizada incluyendo las semillas, mientras que para el análisis de la pared se utilizó jugo pulposo sin semillas.

Lund & Smoot (1982) caracterizaron la composición de la fibra dietética de algunas frutas tropicales y algunos vegetales, utilizando para ello el método de Van Soest para evaluar hemicelulosa y celulosa; y el método de permanganato para evaluar lignina. Los resultados

expresados como rangos promedio en base al peso fresco (para carambola, piña, sapodilla, papaya, mango, entre otros) fueron: de 0,1 a 0,9% para celulosa; 0,025% a 0,17% para lignina, y 0,04% a 0,4% para hemicelulosa. Estos autores señalan que a pesar de que estudios previos sugieren que los componentes de la fibra de las frutas tropicales no difieren significativamente de frutas provenientes de otras latitudes, en general, algunas frutas tropicales contienen altos contenidos en componentes particulares de la fibra. Por ejemplo, se encontró un alto nivel de hemicelulosa en piña, y de celulosa en sapodilla.

Tratando de establecer algunas comparaciones con los resultados obtenidos por estos autores, se procedió a expresar los resultados en relación al peso fresco del fruto sin semilla y al jugo pulposo sin semilla utilizado para la extracción de la pared celular (Cuadro 10).

Cuadro 10 – Principales componentes de la pared celular de la mora costarricense, expresados como % (p/p) de fruta fresca y jugo pulposo sin semilla.

	Hemicelulosa (%)	Celulosa (%)	Lignina (%)	Ceniza (%)	Proteínas (%)	Pectinas	
						Hidrosoluble (%)	Insoluble (%)
Fruta fresca (s/semilla)	0,29	0,17	0,18	0,04	0,07	1,07	0,48
Jugo pulposo	0,37	0,21	0,22	0,05	0,09	1,35	0,60

Como puede apreciarse en el Cuadro 10, los resultados obtenidos en la presente investigación están comprendidos dentro de los valores encontrados por Lund & Smoot (1982) para frutas tropicales. La lignina sería el único componente que saldría un poco del rango, lo que puede ser explicado por la ocurrencia de un mayor depósito de esta fracción en la pared como consecuencia de factores ambientales estresantes para la planta (Häkkinen, 2000 Matern & Grimmig (1994), citados por Robards & Antolovich, 1997); o por la forma de procesar la fruta para la obtención de la pulpa (con licuadora y colador de tipo doméstico) lo que pudo haber molido semilla y endocarpo lignificado que pasaron a ser parte de la muestra de pared purificada. También se procesaron el receptáculo y el cáliz persistente que son partes comestibles del fruto, pero que desde su composición pueden tener pared secundaria.

5.3 Licuefacción enzimática de la pared celular

Hemos visto que la mora es rica en paredes celulares si se compara con otras frutas. Esto implica una serie de problemas tecnológicos a la hora de realizar las operaciones de extracción del jugo, filtración y/o prensado. Entre más intactas sean las paredes celulares, estas retienen el jugo y por consiguiente pueden disminuir drásticamente los rendimientos de extracción. También, la pectina soluble, que es el principal componente responsable de la alta viscosidad del jugo, interfiere en los procesos siguientes de filtración y eventualmente concentración.

Por estas razones, se estudió la posibilidad de degradar la pared celular de la mora con la ayuda de enzimas exógenas producidas comercialmente a partir de micro-organismos. Dado la predominancia en la pared celular de las pectinas solubles e insolubles, de la celulosa y hemicelulosa, se seleccionó enzimas comerciales que contienen las siguientes actividades⁴ (Anexo 8.3):

- **Klerzyme 150 (DMS)**, presenta muy fuerte actividad poligalacturonasa (866 UI/mL), pectinesterasa (409 UI/mL), pectinliasa (344 UI/mL), endocelulasa (112 UI/mL) y exocelulasa (4 UI/ml).
- **Clarex citrus 12XL (DMS)**, presenta alta actividad poligalacturonasa (549UI/mL), pectinesterasa (350 UI/mL), pectinliasa (317 UI/mL), endocelulasa (112UI/mL) y exocelulasa (36 UI/mL).
- **Rapidase vegetable juice (DMS)** se destaca por tener alta actividad poligalacturonasa (369 UI/mL), pectinesterasa (433 UI/mL), endocelulasa (124 UI/mL) y exocelulasa (10 UI/ml).

Se aplicaron estas preparaciones enzimáticas para hidrolizar la pared celular purificada (MIAA) con el fin de conocer su capacidad de acción sobre este sustrato complejo. Los resultados del comportamiento de los diferentes preparados enzimáticos comerciales

⁴ Información suministrada por el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias- Quito-Ecuador.

evaluados para la hidrólisis de la pared celular purificada de la mora (MIAA purificada) se presentan en el Cuadro 11.

Debe tenerse presente, tal como fue desarrollado en el marco teórico, que la acción de las enzimas puede ser evaluada en función de los productos de la hidrólisis de cada uno de sus sustratos específicos. La acción de las pectinasas se evaluó a partir del contenido de ácido galacturónico (AGU) del sobrenadante, mientras que la acción de las celulasas y hemicelulasas fue evaluada a partir de la cantidad de azúcares neutros (AN). No obstante, los valores absolutos de estas fracciones resultó por debajo del esperado tomando en cuenta la composición de la pared celular de la mora (Cuadro 11).

Por otra parte, para conocer el contenido "máximo" de AGU y AN que eventualmente podría rendir la hidrólisis enzimática de la pared celular, se realizó una hidrólisis química⁵ (Cuadro 11). Estos resultados mostraron un contenido de AGU en el sobrenadante de $5,40 \pm 0,06\%$ el que representa alrededor del 13% de la pectina insoluble identificada en la pared celular. El contenido de azúcares neutros fue de $18,0 \pm 0,5\%$, el que representa un 48% del total de azúcares que potencialmente podrían encontrarse fundamentado en el contenido de polisacáridos en la pared (celulosa + hemicelulosa).

A pesar de lo anteriormente expuesto, los preparados comerciales evaluados (Klerzyme 150 ®, Clarex citrus 12XL ® y Rapidase vegetable juice ®) a diferentes concentraciones (100, 50 y 25 $\mu\text{L}/\text{Kg}$ de pulpa, manteniendo temperatura de incubación y tiempo constantes de 35°C y 1 hora respectivamente) mostraron un desempeño significativamente diferente ($p < 0,05$) para la hidrólisis de la pared celular purificada de la mora (MIAA). Los análisis de contenido de AGU y AN del sobrenadante resultante de la hidrólisis (sin tomar en cuenta las diferencias en valores absolutos respecto a la composición de la pared celular) comprueban que ellos están hidrolizando la pared (Cuadro 11).

⁵ La hidrólisis química se realizó de igual forma que en la determinación de lignina (Anexo 8.1.18), pero ajustando la cantidad de ácido a la proporción de pared puesta a hidrolizar. Por ejemplo, para 10 mg de MIAA, se utilizan $200\mu\text{L}$ H_2SO_4 al 72% v/v, más 2,8 mL de agua destilada.

Cuadro 11 - Porcentaje de ácido galacturónico (%AGU) y azúcares neutros (%AN) liberados como resultado de la hidrólisis de la pared celular (MIAA) ¹.

Preparado comercial	Dosis empleada (μL/Kg pulpa)	% AGU Abs ² .	% AGU Rel ³ .	% AN Abs ² .	% AN.Rel ³ .
Klerzyme 150 (DMS)	100	3,6 ± 0,1 a	66,4 ± 0,6 a	5,4 ± 0,2 a	10,0 ± 0,2 a
	50	3,40 ± 0,07 b	62,2 ± 0,9 ab	4,2 ± 0,2 b	7,6 ± 0,4 bc
	25	3,1 ± 0,1 c	57,1 ± 1,4 bc	2,5 ± 0,1 d	4,7 ± 0,2 e
Clarex Citrus 12XL (DMS)	100	3,10 ± 0,06 c	55,8 ± 0,4 cd	3,8 ± 0,1 b	7,0 ± 0,1 bc
	50	2,60 ± 0,03 de	47,1 ± 0,6 de	3,8 ± 0,1 b	7,0 ± 0,2 bc
	25	2,30 ± 0,08 f	42,0 ± 2,9 ef	2,8 ± 0,5 cd	5,2 ± 0,8 de
Rapidase vegetable Juice (DMS)	100	2,70 ± 0,02 d	50,6 ± 0,5 f	4,2 ± 0,3 b	8,3 ± 0,6 b
	50	2,50 ± 0,03 ef	45,0 ± 1,0 fg	3,6 ± 0,1 bc	6,7 ± 0,1 bc
	25	2,00 ± 0,05 g	37,2 ± 1,8 g	2,3 ± 0,1 d	4,3 ± 0,2 d
Hidrólisis⁴ Química		5,4 ± 0,06		18,0 ± 0,5	

¹ Datos expresados como promedios ± desviación estándar; Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas entre los tratamientos (test de Tukey, $p < 0,05$; $n=2$).

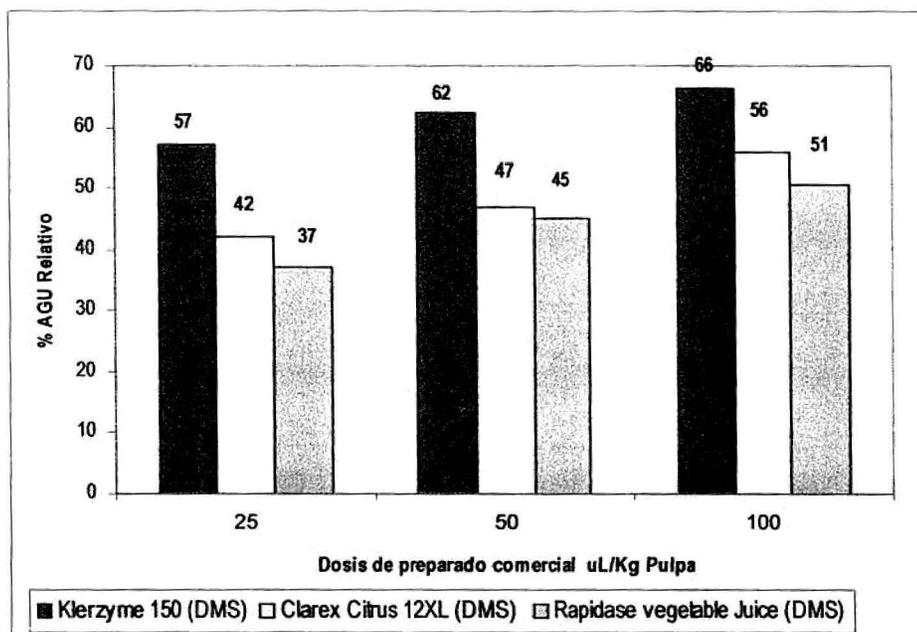
² Absoluto, se refiere al porcentaje directamente resultante de la hidrólisis enzimática de la pared celular purificada de mora (MIAA).

³ Relativo, expresa el resultado en relación a la concentración proveniente de la hidrólisis química de la MIAA [(μg de AGU o AN liberados en la hidrólisis enzimática / μg de AGU o AN liberados en la hidrólisis química) x 100]

⁴ Se refiere a los AGU y AN liberados luego de hidrolizar la pared en caliente con H₂SO₄.

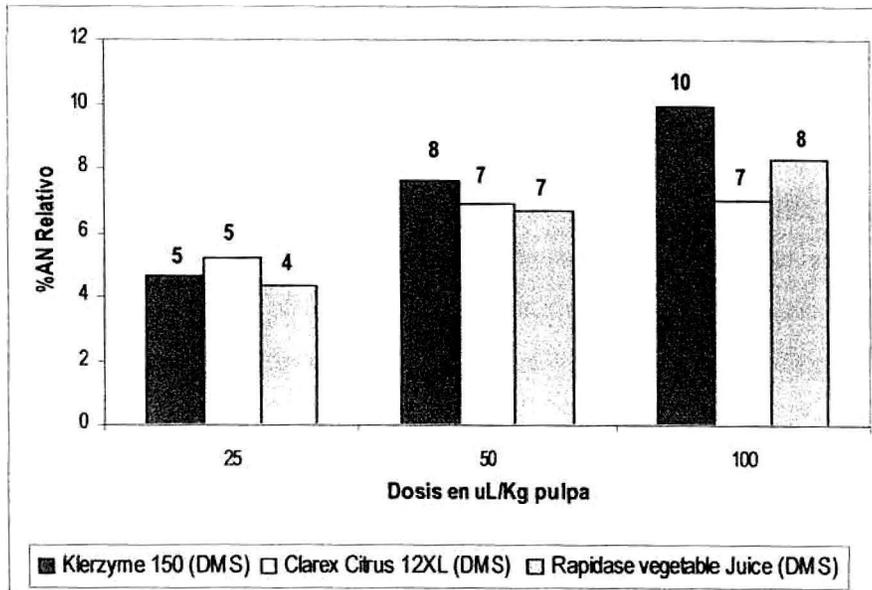
Como se observa en el Cuadro 11, en para todas las enzimas y concentraciones evaluadas, se observa una clara tendencia al aumento del porcentaje de hidrólisis (medido como % AGU o % AN liberados) al aumentar la dosis de enzima. El mejor comportamiento enzimático se obtuvo con el preparado comercial Klerzyme®, que presentó los mayores rendimientos de %AGU y de %AN a todas las concentraciones utilizadas (Figuras 14 y 15). Incluso a 25 μL/Kg de pulpa no se encontró diferencia significativa ($p < 0,05$) con Clarex citrus 12XL® a su mayor concentración (100 μL/Kg de pulpa). Esto se explica porque este preparado comercial presenta una muy fuerte actividad pectinolítica, asociado principalmente a la actividad como poligalacturonasa y pectineresterasa. Ambas enzimas además cuentan con un importante grado de complementación, al requerirse la acción de la pectinesterasa (que desesterifica las pectinas) para la posterior hidrólisis del enlace glucosídico (α 1-4) de las pectinas (Nagodawithana & Reed, 1993).

Como ya fue mencionado, Klerzyme ® es un preparado enzimático que combina una fuerte actividad pectinolítica con otra celulolítica. Dadas estas características, se evidenció un efecto sinérgico en la eficiencia de la hidrólisis realizada con esta enzima (Figura 16). Vaillant *et al.* (1999) y Vaillant *et al.* (2005) obtuvieron similares comportamientos cuando el pretratamiento enzimático se realizó con preparados comerciales que combinaban pectinasas con celulasas, frente a aquellos preparados que solo desarrollaban alta actividad pectinolítica o celulolítica, por separado. En este caso, aún cuando el preparado comercial tiene poca actividad exocelulasa, fue más efectiva la acción de la Klerzyme ® que la de Clarex citrus 12XL ®, incluso a nivel de azúcares neutros (%AN), debido posiblemente a este efecto sinérgico mencionado. En este sentido, también hay que tener presente que la mora es una fruta cuya pared tiene una mucho mayor presencia de pectina (y menos azúcares), lo que también respaldaría la mejor acción de Klerzyme ®.



Las barras representan el % AGU promedio relativo a la concentración proveniente de la hidrólisis química de la MIAA.

Figura 14 - Evolución del % de ácido galacturónico relativo (AGU relativo) en función del tipo y concentración de preparado comercial utilizado.



Las barras representan el % AN promedio relativo a la concentración proveniente de la hidrólisis química de la MIAA.

Figura 15 - Evolución del % de azúcares neutros (AN) en función del tipo y concentración de preparado comercial utilizado.

Tal como se ha comentado, en las Figuras 14 y 15 se observa claramente la superioridad del preparado Klerzyme 150®, con el que se obtuvo el máximo porcentaje de ácidos galacturónicos relativo para todas las concentraciones evaluadas.

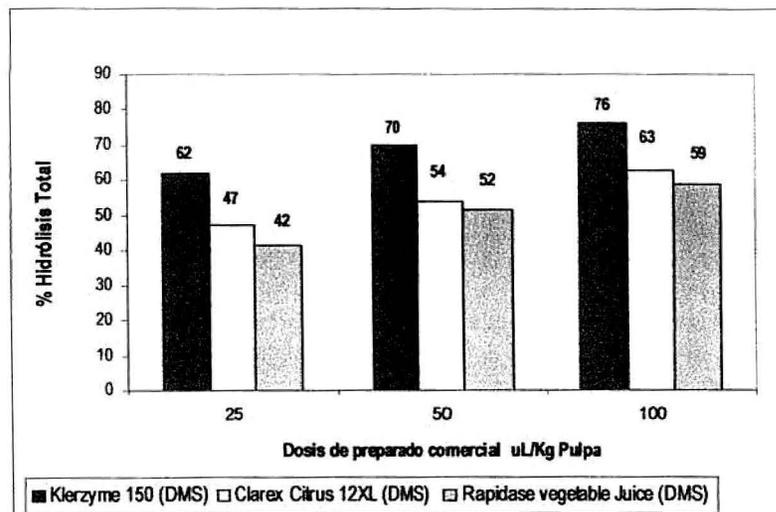


Figura 16 - Porcentaje de hidrólisis total de la MIAA de mora según preparado comercial y concentración.

Para evaluar de manera más completa, qué porcentaje efectivo de la pared es hidrolizado por estas enzimas, se estimó el % de hidrólisis total de la siguiente forma:

$$\% \text{ de hidrólisis total} = [(\% \text{AGU} + \% \text{AN}) / 100 \text{g MIAA}] \times 100$$

En la Figura 16 se puede ver cómo la acción más importante sobre la pared celular es ejercida por el preparado comercial Klerzyme.

Como fue comentado, en términos absolutos los porcentajes de azúcares neutros y de ácido galacturónicos tanto en la hidrólisis química como en la enzimática son muy bajos respecto a lo esperado por la composición de la pared celular. No obstante, con base en las tendencias de mejor comportamiento para la hidrólisis de la pared que presentó el preparado Klerzyme 150®, y dado que el precio⁶ es igual que el de Clarex citrus® y sustancialmente menor que el de Rapidase vegetable juice®, se escogió dicho preparado como pre-tratamiento enzimático en el proceso de microfiltración tangencial.

⁶ Klerzyme 150®, 14,50 \$/kg; Clarex citrus®, 14,50 \$/Kg; Rapidase vegetable juice®, 33,0 \$/Kg. Precios suministrados por DMS-México a febrero del 2007.

5.4 Microfiltración tangencial del jugo de mora.

A continuación se describe el comportamiento general de la mora durante el transcurso de la operación de microfiltración tangencial (MFT) y seguidamente el efecto de este tipo de procesamiento sobre las propiedades como alimento funcional de la fruta.

5.4.1 Comportamiento general de la mora durante el proceso de microfiltración tangencial

Si bien no fue objetivo de esta tesis el estudio en profundidad del proceso de microfiltración tangencial desde el punto de vista de ingeniería del proceso, a continuación se presenta la descripción del comportamiento de la mora bajo tales condiciones de procesamiento.

Se realizaron tres ensayos de de MFT, siguiendo las mismas condiciones de operación ($P_{tm} = 1,6$ bar; $T = 34,9 \pm 1,7$ °C y Velocidad tangencial ($U = 7$ m/s), las que permitieron obtener las siguientes curvas de flujo de permeado (J_p) y factor de reducción volumétrico en función del tiempo de operación (Figura 17).

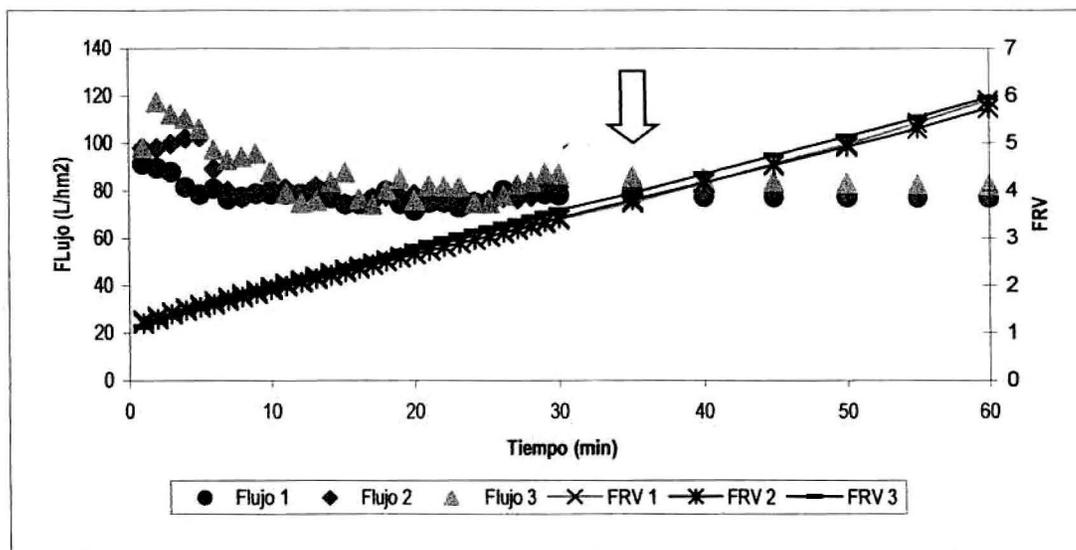


Figura 17 - Flujo de permeado (J_p) y Factor de Reducción Volumétrico (FRV) del jugo de mora a través del tiempo de microfiltración tangencial ($P_{tm} = 1,6$ bar; $T = 34,9 \pm 1,7$ °C) para los tres ensayos realizados

La Figura 17, lleva a plantear la hipótesis de que la variación del flujo de permeado (J_p -L/hm²) y el factor de reducción volumétrico (FRV) a través del tiempo es la misma para los tres ensayos de MFT.

Con el propósito de comprobar dicha hipótesis se realizó un análisis de repetibilidad de los ensayos, utilizando el test de Tukey con un nivel $\alpha = 0,05$ para evidenciar las posibles diferencias. Se evaluaron los flujos de permeado (J_p) en función del factor de reducción volumétrico (FRV) y FRV corregido por la turbidez inicial del jugo (NTU₀). Los resultados de tal análisis se presentan en el Cuadro 12.

Cuadro 12 - Análisis de repetibilidad de los ensayos de MFT de jugo de mora ¹.

	Turbidez NTU ₀ ²	J_{pA} ³	J_{pB} ⁴	J_{pC} ⁵
Ensayo 1	16115 a	78,2 b	79,2 b	79,0 a
Ensayo 2	16063 a	81,4 b	82,3 ab	82,0 a
Ensayo 3	11100 b	87,0 a	85,0 a	82,2 a

¹ Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas entre los ensayos ($p < 0,05$),

² Turbidez del jugo pulposo antes de iniciar la operación de MFT (al culminar el pretratamiento con enzimas)

³ Flujo promedio de permeado expresado como $J_{pA} = f(\text{FRV})$

⁴ Flujo promedio de permeado expresado como $J_{pB} = f(\text{FRV} \times \text{NTU}_0)$

⁵ Flujo promedio de permeado expresado como $J_{pC} = f(\text{FRV} \times \text{NTU}_0)$, sin tomar en cuenta los primeros 5 valores de FRV x NTU₀ del ensayo tres.

Como se observa en el Cuadro 12, si se evalúa el J_{pA} (L/hm²) el cual es función del FRV, se concluye que los ensayos de MFT 1 y 2 no difieren significativamente ($p < 0,05$) explicado porque la turbidez del jugo pulposo inicial, es estadísticamente igual; bajo este modo de observación el ensayo 3, se presenta como significativamente ($p < 0,05$) superior en rendimientos que los anteriores.

Teniendo en cuenta dicha diferencia en la turbidez inicial, se procedió a evaluar los J_{pB} el cual es función de los factores de reducción volumétricos de cada ensayo corregido por la turbidez del jugo al inicio de los mismos (FRV x NTU₀). De este modo se pudo observar que los J_{pB} (L/hm²) promedio del ensayo 1, no difiere del ensayo 2, y este tampoco es diferente al del ensayo 3. Sin embargo, se sigue manteniendo la diferencia significativa ($p < 0,05$) entre el ensayo 1 y 3 (Cuadro 12).

Al observar la evolución de los flujos de permeado promedio de cada ensayo en función del FRV corregido por la turbidez inicial ($FRV \times NTU_0$) del jugo se constata que el hecho de iniciar el proceso de MFT en el ensayo 3 con un valor de turbidez en el jugo pulposo significativamente menor ($p < 0,05$), conduce a mayores flujos de permeado (Figura 18). Esto es una importante observación que deberá ser explorada en futuras investigaciones, a fin de valorar diferentes pretratamientos que reduzcan la turbidez inicial de los jugos para la obtención de mayores rendimientos. Con base en la diferencia de turbidez inicial de los jugos, se eliminaron los cinco primeros valores de J_p del ensayo 3 (valores circulados en la Figura 18), para que pudiera ser comparable con los restantes ensayos. De esta forma se puede afirmar (con 95% de confianza), que bajo nuestras condiciones de ensayo ($P_{tm} = 1,6$ bar; $T = 34,9 \pm 1,7$ °C y $U = 7$ m/s) y para jugos de mora con valores de turbidez inicial comprendidas entre 11100 a 16115 NTU, los altos flujos encontrados de 82 (L/hm^2) promedio para los tres ensayos, pueden ser alcanzados.

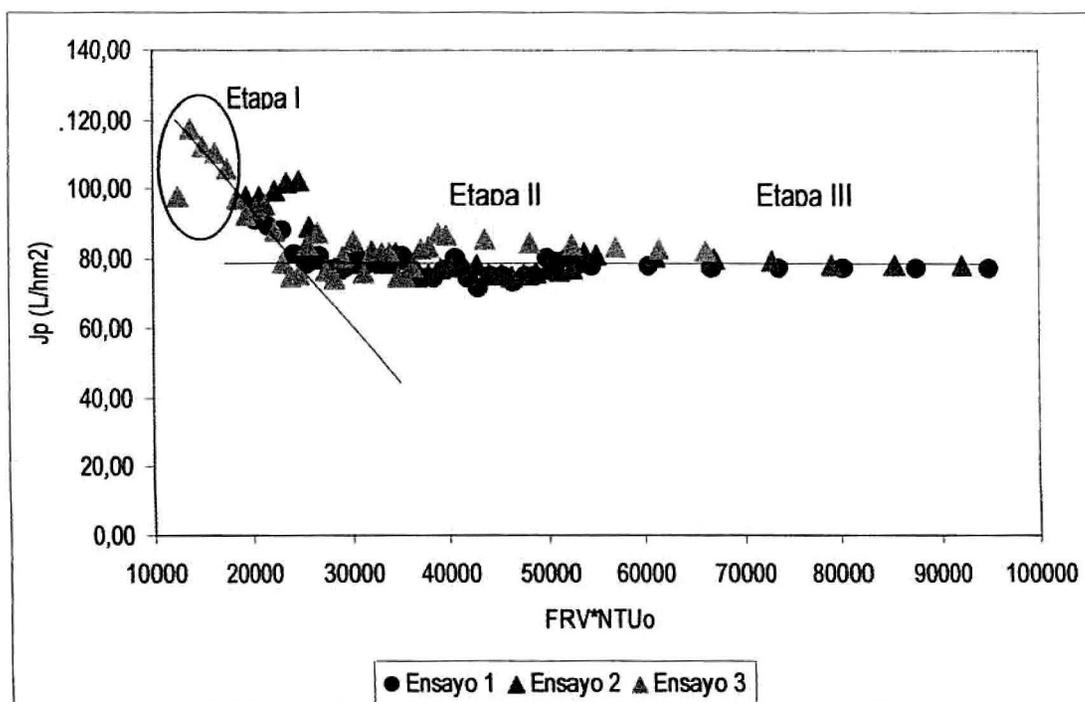


Figura 18 – Evolución del flujo de permeado (J_p) en función del FRV corregido por turbidez.

En términos generales el comportamiento de la mora durante la operación de MFT, se puede dividir en tres grandes etapas (I, II y III) (Figura 18):

Etapa I, que abarca aproximadamente los primeros 5-8 minutos de ensayo (Figura 18), cuando se inicia la operación, en donde se observa que el flujo de permeado (J_p) disminuye rápidamente pasando de 100 a 76 L/h.m² (en promedio). Esto es explicado por la formación de una capa inicial de sólidos sobre la membrana, que hace aumentar la resistencia de la misma al pasaje del jugo (Girard & Fukumoto 2000). Esto representa una caída de alrededor de 24% respecto al flujo inicial. Esta caída es menor a la reportada por Vaillant *et al.* (2005a) para jugo de melón (50% del flujo inicial).

Etapa II, en la que una vez superado el establecimiento de la capa límite inicial de colmataje, los flujos tienden a ser constantes, mientras que el FRV aumenta. Este período corresponde a valores de FRVx NTUo comprendidos entre 24000 a 45000 aproximadamente (Figura 18).

Etapa III, caracterizada por el mantenimiento de un flujo constante entre los 75 a 85 L/hm². Ocurre a valores de FRVx NTUo superiores a 45000 (Figura 18).

El flujo promedio reportados para estos ensayos (82 L/hm²) es mayor al reportado por Vaillant (2001) para mora de Castilla cultivada en Colombia (70 ± 8 L h⁻¹m²) y por Brealey (2005) (70/hm²) para mora costarricense de la misma variedad. Vino que la utilizada en esta investigación.

El factor de reducción volumétrica (FRV), al finalizar el proceso de MFT (últimos 15 minutos) alcanza un valor promedio de 5 ($\pm 0,5$) (Figura 17). Este valor refleja el alto rendimiento del proceso donde al menos el 80% del jugo alimentado logró atravesar la membrana mientras que el restante 20% forma parte del retenido. El valor de FRV es superior al encontrado por Brealey (2005), trabajando con la misma variedad de mora y el mismo equipo piloto que se utilizó para el presente trabajo (FRV = 4,2 al cabo de 50 min de microfiltración). Estas diferencias posiblemente se deban a que Brealey (2005), utilizó menores presiones transmembranarias ($1,2 \pm 0,2$ bar). También influyeron las condiciones de pretratamiento enzimático las cuales fueron 150 ppm de Rapidase Pomaliq 2F® (de la misma firma comercial que Klerzyme ®) por una hora a 30°C. Según Vaillant *et al.* (1999), el preparado comercial

Rapidase Pomaliq 2F ® tiene un buen balance entre pectinasas y celulasas lo que permite el incremento del flujo de permeado de maracuyá, explicado por un efecto sinérgico entre ambas actividades. Sin embargo, como ya fue anteriormente discutido, Klerzyme ® expresa una relación más fuerte en actividad pectinolítica respecto a la celulolítica, pero por las características de la pared celular de la mora (alto nivel de pectinas) y bajo contenido relativo de celulosa, se expresa un efecto sinérgico tal que es suficiente para desestabilizar la estructura de la pared celular y permitir la obtención de altos rendimientos.

Vaillant *et al.* (2001), observaron que existe una relación entre el intervalo en que el flujo de permeado permanece estable y el valor de FRV para cada fruta en particular. Por ejemplo reportan valores de FRV de 3,5 para mandarina y piña, 3,2 en naranjilla, 3,0 en maracuyá y en mora de castilla, y 1,3 mango. Cissé (2005), reporta un FRV de 3,5 para la MFT de naranja.

En el caso de la mora, bajo las condiciones de ensayo empleadas en este trabajo ($P_{tm} = 1,6$ bar; $U = 7$ m/s, $T (^{\circ}C) = 34,9 \pm 1,7$ $^{\circ}C$) y de tratamiento enzimático (100 μ L de Klerzyme 150 ® /Kg de pulpa; 1 hora de incubación a 35 $^{\circ}C$), FRV promedio de 4,7 se presentó como el adecuado para mantener una densidad de flujo constante y buenos rendimientos al menos para el tiempo escogido de ensayo (Figura 17). Este valor es mayor que el reportado por Vaillant *et al.* (2001) para mora de Castilla (FRV = 3).

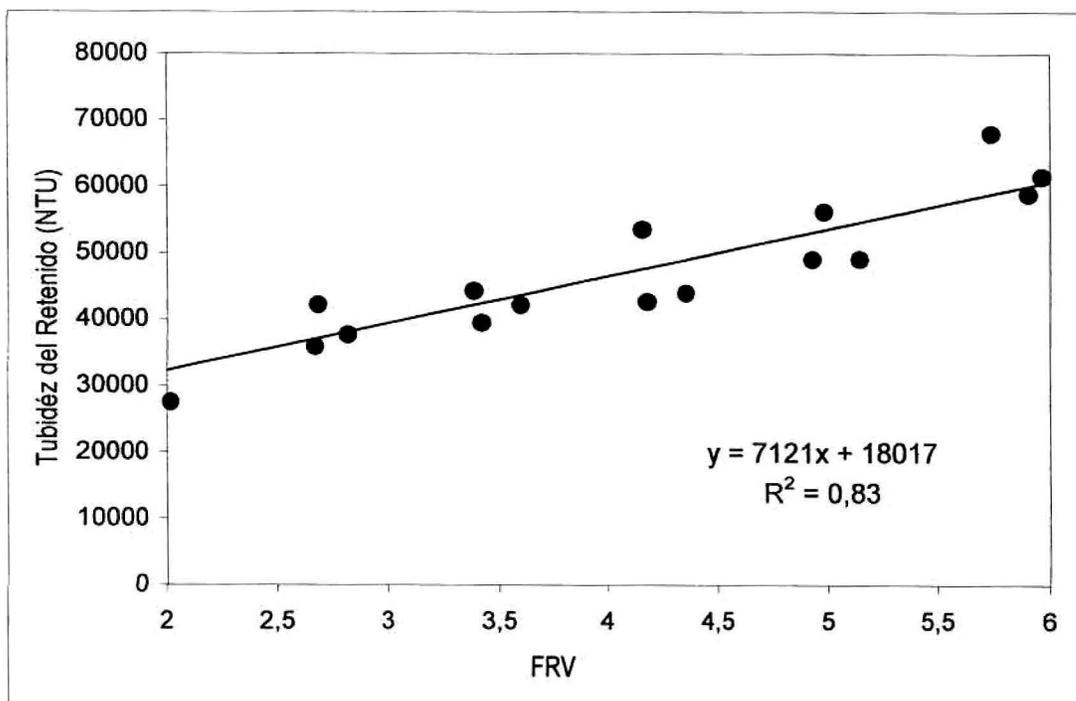


Figura 19 - Correlación entre el factor de reducción volumétrico (FRV) y turbidez del retenido, obtenido durante la clarificación por microfiltración tangencial (n=3).

En la Figura 19, se observa cómo a medida que el FRV aumenta se incrementan linealmente los sólidos suspendidos en el retenido. El análisis de regresión lineal (JMP 5.1), fue significativo ($p < 0,05$), indicando que los valores se ajustan al modelo con un R^2 ajustado = 0,8. A partir de la turbidez de retenido se puede predecir cómo evoluciona el FRV durante el tiempo de MFT.

Según Vaillant *et al.*, (2001), el valor de turbidez del retenido puede ser usado como un indicador lineal del valor de FRV en el caso de maracuyá. Vaillant *et al.* (2005a), para el caso de jugo clarificado de melón por microfiltración tangencial encontraron un comportamiento similar al expuesto anteriormente con un valor de $R^2 = 0,87$.

Según Vaillant *et al.* (2004), los flujos de permeado deben ser superiores a 50 L/hm² para que la tecnología de microfiltración sea técnicamente factible para una aplicación industrial con miras a la obtención de jugos clarificados de frutas. En la presente investigación, los flujos de permeado logrados se encuentran dentro del rango propuesto por lo que sería posible implementar esta tecnología industrialmente. No obstante, es conveniente realizar más

ensayos de MFT optimizando todos los parámetros que influyen en el rendimiento (P_{tm}, velocidad tangencial, concentración de enzima, FRV) para verificar estas tendencias.

5.4.2 - Características físico-químicas del jugo de mora en cada etapa del proceso de MFT.

A continuación se discutirá el efecto de las enzimas y el pasaje del jugo a través de la membrana sobre las características físico-químicas del jugo de mora.

En el Cuadro 13, se muestran los niveles de turbidez promedio (\pm desviación estándar) hallados en la primera etapa del proceso de MFT (desde jugo pulposo alimentado a jugo tratado con enzimas). No se evidenciaron diferencias significativas ($p < 0,05$, prueba t Student) en la turbidez (NTU) entre ambos jugos. Por otra parte, la turbidez del retenido al finalizar los ensayos de MFT, fue de 74263 NTU (± 13171). Este valor resultó significativamente más alto respecto al jugo de alimentación, lo que indica que a medida que transcurre el proceso, los sólidos solubles se van acumulando en la membrana, permitiendo el paso de jugo para ser clarificado

Cuadro 13 - Cambios en la turbidez del jugo durante la primera etapa del proceso de microfiltración tangencial (MFT)¹.

Etapa 1- MFT	Turbidez (NTU)
Jugo pulposo de alimentación	11898 \pm 3742 a
Jugo pulposo con enzima	14482 \pm 2740 a

¹ Datos expresados como promedio \pm desviación estándar (n=3).

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) evaluadas por la prueba t de Student.

Como se observa en el Cuadro 14, el jugo clarificado al finalizar el proceso de MFT, presentó una reducción significativa en la turbidez (NTU) respecto al jugo tratado con enzima, utilizado como alimentación del equipo.

Sin embargo, en la presente investigación no se logró obtener los valores de NTU (< 1 NTU) mencionados por Pérez *et al.*, (2006) encontrados con jugos clarificados de piña ($0,9 \pm 0,1$ NTU), naranja ($1 \pm 0,1$ NTU), noni ($1,2 \pm 0,1$ NTU), limón ($0,7 \pm 0,1$ NTU), melón ($0,9 \pm 0,1$ NTU), banano ($0,7 \pm 0,1$ NTU) y mora ($0,4 \pm 0,1$ NTU). Vaillant *et al.*, (2005a), encontraron valores de 0,6 NTU en jugo clarificado de melón utilizando el mismo equipo piloto que el utilizado en la presente investigación.

Estos autores sostienen que con membranas de cerámica con $0,2 \mu\text{m}$ de diámetro de poro, se retienen completamente tanto los microorganismos como los sólidos solubles obteniéndose un permeado totalmente estéril y clarificado con valores de turbidez incluso inferiores a 0,5 NTU.

Cuadro 14 - Cambios en la turbidez del jugo durante la segunda etapa del proceso de microfiltración tangencial (MFT)¹.

Etapa 2- MFT	Turbidez (NTU)
Jugo pulposo con enzima	$14482 \pm 2740\text{a}$
Jugo clarificado ²	$5,3 \pm 2,8\text{b}$
Retenido a FRV 5	$74263 \pm 13170\text{a}^3$

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) evaluadas por la prueba t de Student.

¹ Datos expresados como promedio \pm desviación estándar ($n=3$). ³ Diferencia significativa reportada en base a los jugos pulposos.

Charyan (1998), menciona valores de turbidez comprendidos entre 2 y 5 NTU para jugos clarificados de manzanas obtenidos por métodos convencionales. Tomando en cuenta la incertidumbre que presenta la medición con el turbidímetro utilizado (10%), la turbidez del jugo clarificado de esta investigación, estaría dentro del rango normal para jugos clarificados.

Brealey (2005), trabajando con mora de la variedad Vino y con el mismo equipo piloto que el utilizado en esta investigación, obtuvo valores de $0,4 \pm 0,1$ NTU (dato expresado como promedio \pm intervalo de confianza de 95% y $n=1$) en el producto clarificado.

Es posible que al no acompañar el proceso de MFT con el envasado aséptico del producto, haya ocurrido contaminación posterior al pasaje a través de la membrana, con microorganismos naturalmente presentes en el ambiente. Esto pudo haber ocasionado el

inicio de proceso de fermentación del jugo de mora y por tanto el aumento de la turbidez. En el momento de los ensayos, las muestras se empacaron y guardaron en cámara de frío (-20 °C), sin embargo, la congelación no fue completa (capacidad de frío excedida) inclusive transcurridos dos días desde el primer ensayo, se notaba que las muestras estaban frías pero no congeladas. Esta posible contaminación posterior, sumada a las condiciones de refrigeración inadecuadas y al hecho de haber realizado las mediciones de turbidez a más de 72 horas desde el primer ensayo pueden ser las responsables de estos valores altos de turbidez determinados. No obstante, estos problemas de inadecuado manejo de las muestras, no cambian la validez de los resultados ya que una turbidez < 5NTU significa un jugo totalmente clarificado dado que el ojo humano no puede detectar diferencias entre 1 y 10 NTU.

pH y °Brix. En el Cuadro 15, se puede observar que el pH y los °Brix del jugo durante el transcurso de la etapa 1 del proceso de MFT (pre-tratamiento enzimático), no se modificaron significativamente ($p < 0,05$), por lo que puede suponer que el pretratamiento enzimático no modifica estos parámetros y por tanto no hay un efecto de la hidrólisis enzimática sobre los atributos sensoriales del jugo.

De igual modo no se presentaron cambios significativos del pH ni de los °Brix al transcurrir la etapa 2 (Cuadro 16) de microfiltración. Estos resultados coinciden con los de Carneiro *et. al.* (2002), quienes microfiltraron a escala piloto (membrana tubular de polieterosulfona, 0,3 μm de tamaño promedio de poro) jugo de piña (con pre- tratamiento enzimático), no encontrando diferencias significativas en el pH, acidez y sólidos solubles durante el procesamiento. Similares resultados son aportados por Cissé *et. al.* (2005), durante la microfiltración de jugo de naranja utilizando el mismo módulo piloto que el utilizado en esta investigación. Ellos encontraron que la membrana no retuvo los azúcares ni los ácidos orgánicos ya que no hubo diferencias significativas entre el pH y los °Brix del jugo fresco, el retenido y el permeado.

Cuadro 15 - Efecto del tratamiento enzimático del jugo de mora sobre sus propiedades físico – químicas.

Etapa 1- MFT	pH	°Brix	L*	a*	b*	HUE	Chroma
Jugo pulposo de alimentación	2,5±0,1 a	12,8±0,3 a	4,4±0,5 b	20,2±2,3 b	5,3±0,9 b	0,26±0,02 b	20,8± 2,3 b
Jugo pulposo tratado con enzima	2,5±0,1 a	12,8±0,3 a	8,2±0,7 a	27,3±0,8 a	9,5±0,9 a	0,35±0,02 a	29,0±1,0 a

¹ Datos expresados como promedio ± desviación estándar (n=3). Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas (p<0,05) evaluadas por la prueba t de Student.

Cuadro 16 - Efecto de la membrana de filtración tangencial sobre las propiedades físico – químicas del jugo.

Etapa 2- MFT	pH	°Brix	L*	a*	b*	HUE	Chroma
Jugo pulposo tratado con enzima	2,5±0,1 a	12,8±0,3 a	8,2±0,7 a	27,3±0,8 a	9,48±0,8 a	0,35±0,02 a	29 ±1,0 a
Jugo clarificado	2,5±0,03 a	12,8±0,3 a	1,7±0,2 b	4,8±0,8 b	0,83±0,3 b	0,17± 0,04 b	5,0 ±0,8 b

¹ Datos expresados como promedio ± desviación estándar (n=3). Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas (p<0,05) evaluadas por la prueba t de Student.

Realizando un procedimiento de microfiltración semejante al presente, Brealey (2005), reporta para jugo de mora clarificado resultados más altos de pH ($2,7 \pm 0,02$) y menores ° Brix ($8,40 \pm 0,02$) a los encontrados en la presente investigación. Posiblemente esto esté explicado por diferencias en las características de la materia prima impartidas por el ambiente (estación de cosecha, temperatura promedio de la zona agroclimática, etc.) ya que en ambos casos tanto la variedad como la zona de cosecha es similar (Copey de Dota).

Vaillant *et. al*, (2004) mencionan que en el caso de membranas cerámicas con $0,2 \mu\text{m}$ de diámetro de poro como la que se utilizó en esta investigación, los azúcares, ácidos, vitamina C y aromas oxigenados (aldehídos, esterés, alcoholes alifáticos y terpenoles) logran atravesar la membrana por lo tanto el contenido de estas sustancias tanto en el jugo fresco, como en el retenido y el permeado van a tener concentraciones similares.

Color. Durante la primera etapa del proceso de microfiltración tangencial (jugo natural a jugo tratado con enzimas) se observó un aumento significativo en los parámetros L^* , a^* , b^* que definen el color del jugo. El parámetro L^* , disminuyó significativamente ($p < 0,05$), lo que indica que el jugo tratado con enzimas fue más luminoso (con menos negro). El parámetro a^* , referente a los cambios en torno a los colores rojos ($-a$ =verde y a =rojo) y el parámetro b^* , referente a los cambios de púrpura a amarillo ($-b$ =azul y b =amarillo) aumentaron significativamente ($p < 0,05$). El "Hue" y el "Chroma" también aumentaron significativamente ($p < 0,05$). Estos cambios en los niveles de tales parámetros, estaría indicando que el color del jugo con tratamiento enzimático se ve modifica tornándose hacia los rojos y azules más vivos y luminosos.

El cambio en el color se explica porque las antocianinas (principal pigmento hidrosoluble de las moras) son liberadas al medio como consecuencia de la licuefacción de la pared celular, ya que las mismas se reservan en las vacuolas de las células hipodermales (Robards & Antolovich, 1997), específicamente en las vacuolas de las tres a cuatro primeras capas celulares hipodérmicas de las drupas, y en algunos casos en el mesocarpio y las semillas (Cantos *et al.* 2002, citado por Del Valle, 2005; Kalt, 2005).

Como se muestra en el Cuadro 16, durante la segunda etapa del proceso de MFT, el color cambia significativamente en todos sus parámetros. El parámetro L^* disminuye de $8,2(\pm 0,7)$ a $1,7(\pm 0,2)$ lo que es explicado por la reducción de sólidos (que quedan retenidos por la membrana). Esto estaría dando evidencia de la clarificación efectiva del jugo de mora. El "Hue" y el "Chroma" se reducen significativamente ($p < 0,05$). Es decir, el jugo clarificado de mora, tiende a ser una mezcla de colores (disminuye la pureza - Chroma), el Hue tiende a un ángulo de 0° donde se ubican los tonos rojos, el parámetro b se ubica firmemente en los tonos azules y disminuye la luminosidad L (aumentando el negro en la mezcla). El oscurecimiento se debe a la remoción de sólidos en el proceso de clarificación, que incluso al centrifugar o permitir decantar los sólidos de un jugo pulposo, dejan el sobrenadante más oscuro de forma similar al clarificado. También podría haber un efecto por la oxidación de las antocianinas que se sospecha ocurre al bombear el jugo a través de la membrana como se discute más adelante.

Los cambios en el pH no fueron significativos ($p < 0,05$) en ninguna de las dos etapas del proceso de MFT por cuanto las antocianinas no sufrieron ningún cambio estructural que supusiera un drástico cambio de color (Wrolstad, 2004).

Por otra parte, y como se puede observar en los Cuadros 17 y 18, no se evidencia un cambio significativo ($p < 0,05$) en el contenido de antocianinas y polifenoles totales en el pasaje del jugo a través de la membrana, por lo que los cambios de color estarían siendo explicados principalmente por pérdida de sólidos insolubles (fragmentos de paredes celulares) que forman parte del retenido.

5.4.3 - Efecto del proceso de microfiltración tangencial sobre las propiedades antioxidantes del jugo de mora.

A continuación se presenta el efecto del tratamiento enzimático del jugo y el de clarificación por membranas sobre las propiedades como alimento funcional (contenido en antocianinas, polifenoles y capacidad antioxidante) del jugo de mora.

Antocianinas totales. En el Cuadro 17 se puede apreciar que las antocianinas aumentan con el pretratamiento enzimático (97,8 a 110 mg /100 mL BH), siendo este efecto explicado por la hidrólisis de la pared celular y su liberación desde las vacuolas, lo que aumenta su disponibilidad en la fase acuosa del jugo ya que son pigmentos hidrosolubles (Rice-Evans, 1996 citado por Shi *et al.*, 2005).

Sin embargo, al expresar los resultados en base a la materia seca que contiene el jugo, no se observan diferencias significativas ($p < 0,05$) en el contenido de antocianinas. La cantidad de antocianinas presentes durante el pre-tratamiento con enzimas no cambia y no se pierde de forma significativa ($p < 0,05$) una vez que el jugo atraviesa la membrana, recuperándose un 96% de las mismas en BS (Cuadro19).

Es importante destacar que el comportamiento de los pigmentos antocianínicos frente al tratamiento de clarificación con membranas representa una ventaja, que hace de esta

tecnología una alternativa interesante para el procesamiento de las moras. Este comportamiento no es igual para todos los pigmentos presentes en las frutas en general, por ejemplo: al utilizar membranas cerámicas de (0,2 μm de diámetro poro) en la clarificación de jugo de naranja (Cissé *et al.*, 2005) y de melón (Vaillant *et al.*, 2005a) se reporta que los carotenoides (compuestos apolares) son concentrados en el retenido, inclusive afectando la coloración del producto lo que puede reducir la aceptación del jugo por los consumidores.

Cuadro 17 - Efecto del pretratamiento enzimático sobre el contenido de antocianinas totales, polifenoles totales y capacidad antioxidante expresados en base fresca y en base seca (BH y BS)¹

Etapa 1- MFT	Antocianinas totales	Polifenoles totales	Capacidad antioxidante ORAC (μM de TE/mL) ⁴
	(mg cianidina 3-glucósido/100mL) ²	(mg GAE equi / 100mL) ³	
Datos expresados en base fresca (BH)			
Jugo pulposo de alimentación	97,9 \pm 0,8 b	345,7 \pm 32,8 a	40,5 \pm 5,4 a
Jugo pulposo tratado con enzima	110,4 \pm 4,1 a	378,8 \pm 20,3 a	42,5 \pm 3,6 a
Datos expresados en base seca (BS)			
Jugo pulposo de alimentación	778 \pm 86 a	2761 \pm 453 a	320 \pm 15,5 a
Jugo pulposo tratado con enzima	814 \pm 45 a	2795 \pm 216 a	312 \pm 13,1 a

¹Datos expresados como promedio \pm desviación estándar (n = 3). Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativas ($P \leq 0,05$) prueba t de Student; ²Total de antocianinas expresados como mg cianidina 3-glucósido cada 100mL de jugo. ³Total de polifenoles expresados como mg equivalentes de ácido gálico (GAE) cada 100mL de jugo. ⁴Datos expresados como micromoles de Trolox equivalentes (TE)/mL de jugo.

Cuadro 18 - Efecto del pasaje del jugo a través de la membrana sobre el contenido de antocianinas totales, polifenoles totales y capacidad antioxidante¹

Etapa 2- MFT	Antocianinas totales	Polifenoles totales	Capacidad antioxidante ORAC (μM de TE/mL) ⁴
	(mg cianidina 3-glucósido/100mL) ²	(mg GAE equi / 100mL) ³	
Datos expresados en base fresca (BH)			
Jugo pulposo pulposo con tratamiento enzimático	110,4 \pm 4 a	378,8 \pm 20 a	42,5 \pm 3,6 a
Jugo clarificado	103,7 \pm 2 a	350,4 \pm 13 a	32,2 \pm 3,3 b
Datos expresados en base seca (BS)			
Jugo pulposo pulposo con tratamiento enzimático	814,1 \pm 45,0 a	2796,0 \pm 216,2 a	313,0 \pm 13,1a
Jugo clarificado	785,0 \pm 90,1 a	2657,4 \pm 361,2 a	242,5 \pm 19,2 b

¹Datos expresados como promedio \pm desviación estándar (n = 3). Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativas ($P \leq 0,05$) prueba t de Student; ²Total de antocianinas expresados como mg cianidina 3-glucósido cada 100mL de jugo. ³Total de polifenoles expresados como mg equivalentes de ácido gálico (GAE) cada 100mL de jugo. ⁴Datos expresados como micromoles de Trolox equivalentes (TE)/mL de jugo y jugo.

Polifenoles totales. En cuanto al contenido total de polifenoles, no se encontraron cambios significativos ($p < 0,05$) por acción del tratamiento enzimático así como tampoco se evidenciaron pérdidas significativas al atravesar la membrana (Cuadros 17 y 18). En el jugo clarificado se recuperó el 95% (BS) de los polifenoles presentes en el jugo pulposo.

López *et al.* (2005) durante la microfiltración tangencial de vinagres de vinos rosados y rojos, encontraron bajos decrecimientos en el contenido de polifenoles totales ($< 15\%$).

Vitamina C. No fue detectada la presencia de vitamina C (determinada mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu) ni en los jugos pulposos (con y sin tratamiento enzimático) ni en los clarificados. Debido al hecho de no haber encontrado vitamina C en el jugo de alimentación, se puede inferir que la pérdida de vitaminas ocurrió antes del procesamiento del jugo. Una posible vía de pérdida pudo haber sido el uso de fruta en estado congelado. Como es sabido, existe un efecto negativo del almacenamiento en congelación por largos periodos de tiempo sobre el contenido de vitamina C lo que ocasiona pérdidas comprendidas entre los 33 a 55% (Ancos 2000 citado por Mullen, 2002). En el presente trabajo, se desconoce el tiempo en que las moras permanecieron en la cámara de congelación de APROCAM.

Capacidad antioxidante (ORAC).

El tratamiento enzimático no modificó en forma significativa ($p < 0,05$) la capacidad antioxidante del jugo pulposo (Cuadro 17). Sin embargo, el jugo mora clarificado presentó una reducción significativa ($p < 0,05$) de 22,5% (BS) en la capacidad antioxidante respecto al jugo pulposo (Cuadro 18).

Al evaluar las posibles razones de esta reducción y teniendo en cuenta que el jugo clarificado conserva más del 95% de antocianinas y polifenoles totales, surge la inquietud de la ocurrencia de una oxidación química de los compuestos antioxidantes de la fruta al ser bombeados a través de la membrana.

El método ORAC se basa en el empleo de una sustancia con un doble enlace nitrogenado llamada AAPH, que es fuente de radicales libres. El AAPH presente en el medio, es neutralizado por los antioxidantes presentes en la mora, hasta que llega un momento en el cual éstos se agotan. En ese momento, el AAPH comienza a atacar la fluoresceína y por tanto se reduce la fluorescencia resultando en una menor área bajo la curva y por tanto menor valor de ORAC (ANEXO sección 8.1.11). Las antocianinas y los polifenoles del jugo pulposo, pueden reaccionar frente al oxígeno incorporado por el bombeo y perder átomos de hidrógeno. Esta reacción además estaría siendo catalizada por la superficie metálica de la planta piloto. La donación de hidrógeno (mecanismo HAT) ocurre muy rápidamente incluso en segundos (Prior *et al.*, 2005). Como las estructuras químicas de las antocianinas son muy grandes, el hecho de ceder un átomo de H al medio, no hace que éstas se desintegren por el contrario permanecen estables en la solución sin que se afecte su determinación como antocianinas totales.

Como los átomos de hidrógeno fueron donados antes del ensayo de ORAC (es decir durante la alimentación al sistema), cuando se realiza el análisis sobre el jugo clarificado, a pesar de que las antocianinas y polifenoles están presentes casi en su totalidad (94 y 93% respectivamente) ya no tienen tanto hidrógeno para neutralizar al AAPH y por tanto la capacidad ORAC se ve disminuida.

La cantidad de compuestos con actividad antioxidante (polifenoles y antocianinas) no se degradan al atravesar la membrana, lo que se reduce es su capacidad de neutralizar los radicales libres presentes en el medio (AAPH) debido posiblemente a la oxidación química por incorporación de oxígeno al jugo al forzar el jugo de alimentación a pasar por la membrana.

En términos generales, a pesar de que existe una reducción significativa ($p < 0,05$) en la capacidad antioxidante del jugo clarificado de mora respecto al jugo pulposo, esta reducción no parecería ser tan importante si se compara con otros tipos de procesamiento de jugos frutales. Por ejemplo, los resultados de Klopotek *et al.* (2005), trabajando con fresas, demuestran que existe una pérdida de compuestos fenólicos del 27% en jugo y 14% en néctar durante el proceso de pasteurización. Las antocianinas pasaron de un 100% en fresas frescas

a 67% en el jugo pasteurizado y un 57% en néctar calentado. Estas pérdidas de antocianinas, polifenoles así como de vitamina C durante el procesamiento de las fresas condujeron a una reducción significativa de la capacidad antioxidante en los productos. Lee *et al.* (2002), trabajando con arándanos, recuperaron solamente entre 13 a 23% de antocianinas y 36 a 39 % de los polifenoles totales en el jugo prensado pasteurizado, mientras que cerca de un 42% de antocianinas y 15% de polifenoles permanecieron en la torta de la prensa.

Si bien hasta el momento, en la literatura científica no se reportan resultados de contenido de antocianinas, polifenoles totales y de la capacidad antioxidante, específicamente para jugos clarificados de mora, en un esfuerzo por conseguir patrones de comparación de estos resultados, se intentó utilizar la escala de maduración propuesta en el capítulo 5, sección 5.1, de este trabajo. Sin embargo, debido al hecho de tratarse de materias primas diferentes (fruta entera vs jugo) de diferente procedencia, calidad y manejo postcosecha, no es posible concluir terminantemente. Las moras utilizadas para el desarrollo de la escala de maduración, fueron cosechadas cuidadosamente, tratando de no escoger aquellos frutos que aún estaban muy pequeños, o aquellos dañados por insectos etc. Además todas provienen de la misma finca ubicada en La Trinidad, distrito de Copey de Dota. En cambio, para los ensayos de microfiltración se utilizaron moras de segunda calidad, constituida por mezclas de frutas provenientes de distintas fincas, con diferentes cuidados en el manejo, condiciones climáticas, etc. Todo esto implica una diferencia sustancial en la calidad de la materia prima para ambos objetivos.

Por otra parte, para la escala de madurez se analizó la fruta entera (con piel y semillas) mientras que para los análisis de MFT, se utilizó mora despulpada, esto implica que no tenía semillas y posiblemente también se perdió gran parte de la piel de las drupas que son los lugares más importantes de reserva de las antocianinas. Esto reduce el nivel de estos antioxidantes y también de la capacidad antioxidante (Waterhouse & Walzem 1998 citados por Kalt, 2005).

VI. CONCLUSIONES

Los resultados alcanzados para los diferentes objetivos de este trabajo permiten extraer una serie de conclusiones importantes desde el punto de vista de las oportunidades de la mora costarricense como alimento funcional y para su utilización como materia prima de diferentes procesos industriales.

En cuanto al primer objetivo, puede afirmarse la **existencia de una relación positiva entre el grado de madurez caracterizado a partir de la descripción visual de la fruta, con respecto a sus propiedades como alimento funcional**. Los aumentos de peso, cambios en las dimensiones y cambios de color de la fruta, a medida que avanzan los estados de madurez propuestos, se corresponden con los cambios en cuanto a sus propiedades físico-químicas y como alimento funcional. Es decir, se evidencian cambios en el pH, acidez, azúcares totales, humedad, así como en el contenido antocianinas y capacidad antioxidante (ORAC).

La fibra dietética disminuyó significativamente con el transcurso de la maduración de la fruta, conforme fueron aumentando los carbohidratos disponibles. Este comportamiento es el que generalmente ocurre en la mayoría de las frutas. Sin embargo, **se destaca el alto aporte de fibra dietética en el estado completamente maduro (de consumo)**, el que alcanza los 6,5g por cada 100g de fruta en base al peso húmedo de toda la infrutescencia (polidrupa).

El contenido total de polifenoles de las moras no mostró un cambio marcado con la madurez de la fruta. Se encontró una disminución significativa al pasar del estado intermedio al de tres cuartos de madurez (3368 a 2874 mg de GAE /100g de fruta en base seca) y un posterior incremento al estado maduro (3521 mg de GAE /100g de fruta en base seca).

Las moras costarricenses presentan una muy alta capacidad antioxidante y ésta aumenta significativamente ($P < 0,05$) con el avance del estado de madurez de la fruta (pasando de 38 a 64 μ moles TE/g de fruta fresca). **La capacidad antioxidante (ORAC) de las moras costarricenses según el avance de la madurez está explicada por el cambio**

en el contenido en antocianinas encontrándose una correlación significativa ($p < 0,05$) con un R^2 de 0,95. Por otra parte el contenido de polifenoles no presentó una significativa correlación con el valor de ORAC ($p > 0,05$ y $R^2 = 0,20$) debido a que los mismos no presentan un comportamiento lineal entre el estado intermedio y maduro. Sin embargo, los polifenoles explican el 40% de la capacidad antioxidante al menos para el estado intermedio.

Se encontró que los parámetros L (luminosidad), a y "Hue" están significativamente ($p < 0,05$) correlacionados con el contenido de antocianinas de la fruta a los diferentes estados de madurez. El parámetro L fue el que mejor se correlacionó con el contenido de antocianinas de la fruta ($R^2 = 0,94$). Es decir, **visualmente, cuanto menos luminosa sea la mora (más oscura) mayor será el contenido en antocianinas y por tanto su capacidad antioxidante.**

El contenido de vitamina C de las moras costarricenses es en promedio de 3,55 mg/100g de fruta fresca y no cambia significativamente con el estado de madurez.

Los cambios en la forma (largo y ancho) así como en el color externo de la piel, hacen de esta escala de madurez una herramienta fácil de aplicar al momento de la recolección de los frutos en pro de adquirir moras de alta calidad, que constituyan alimentos funcionales.

En términos generales, la mora costarricense se puede definir como más ácida y menos dulce que lo reportado en la bibliografía para frutas de otras procedencias. Si bien desde el punto de vista sensorial, su mayor acidez y menor dulzor puede resultar desventajoso, su alta capacidad antioxidante (ORAC) hace de la mora costarricense una fruta altamente competitiva en el mercado internacional.

En relación al segundo objetivo perseguido en esta investigación, **se consiguieron caracterizar los componentes de la pared celular purificada de la mora (MIAA).** En su composición se destaca el alto contenido de pectina insoluble (39%), lignina (14,5%) y el relativamente bajo contenido de celulosa (13,5%). Esta caracterización permite afirmar la necesidad del uso de preparados comerciales con alta actividad pectinolítica, pero que

contengan también un buen equilibrio con actividad celulolítica, para permitir la mejor desestructuración de la pared y la mejor acción de las enzimas pectinolíticas.

Los mejores resultados durante la hidrólisis enzimática de la pared celular purificada de la mora (MIAA), se obtuvieron con el preparado comercial Klerzyme 150® utilizado a una concentración de 100ppm. Este preparado comercial que posee actividad fuertemente pectinolítica y una más débil actividad celulolítica, fue suficiente para lograr la hidrólisis del 76% de la pared celular.

El buen desempeño de Klerzyme ® quedó claramente demostrado al realizar los ensayos de microfiltración tangencial. **Se lograron obtener muy buenos flujos de permeado, alcanzando en promedio para los tres ensayos realizados valores de 82,0 (±8,9) L/hm².**

La repetibilidad de los ensayos demostró que bajo las condiciones de operación utilizadas, y para jugos de mora con una turbidez inicial comprendida entre los 11.100 y 16.100 NTU, es posible predecir y repetir este comportamiento con altos flujos de permeado.

Un valor de FRV (factor de reducción volumétrico) de 4,7 en promedio, permitió alcanzar flujos estables sin colmataje de la membrana. Inclusive al finalizar los ensayos de MFT (al cabo de 1h) se obtuvieron flujos aún constantes y el FRV continuó aumentando.

Para ninguna de las dos etapas del proceso de MFT, el pH y los sólidos soluble se modificó de forma significativa. Aparentemente la membrana utilizada permite la obtención de similares características sensoriales en el producto final que en el jugo pulposo.

El pretratamiento enzimático no modificó significativamente ($p>0,05$) el contenido de antocianinas ni el de polifenoles del jugo pulposo.

El jugo clarificado de mora no presentó cambios significativos en el contenido de antocianinas y polifenoles totales, recuperándose el 96% y el 94% (BS) respectivamente.

En el jugo clarificado se recuperó un 77% de la capacidad antioxidante (ORAC) del jugo pulposo. A pesar de esta disminución significativa, aún se mantiene una muy alta capacidad antioxidante que lo hace de interés como alimento funcional.

Dado que no se encuentran pérdidas de antocianinas, polifenoles totales, cambios en los azúcares solubles (°Brix) y pH del jugo en el pasaje a través de la membrana, **la obtención de jugo clarificado de mora, representa una ventaja, que hace de esta tecnología una alternativa interesante para el procesamiento de esta fruta y la elaboración de un alimento funcional con alto contenido de compuestos antioxidantes.**

Aunque este aporte al conocimiento de la mora costarricense y a sus posibles utilidades a través de la tecnología de MFT debe ampliarse, parece existir un campo verdaderamente importante de desarrollo que beneficiará al sector productor de moras, así como brindará nuevas alternativas de alimentos funcionales.

VII. BIBLIOGRAFÍA

ANÓNIMO, s/f. Blackberry and Raspberry. INTERNET:
[\(20/9/2006\)](http://www.uga.edu/fruit/rubus.htm)

AOAC. 1999. Oficial Methods of Análisis, 16ª ed. Rev 5: 985.29; 942.15; 935.42; 920.105.

AOAC. 1990. Oficial Methods of Análisis, 15ª ed. Rev 5: 981.12

BENBENUTI, S., PELLATI, F., MELEGARI, M., & BERTELLI, D. 2004. Polyphenols, Anthocyanin, Ascorbic Acid, and Radical Scavenging Activity of Rubus, Ribes, and Aronia. *Journal of Food Science*, 69(3):FCT164-FCT169.

BERK, Z. 1980. Introducción a la Bioquímica de los Alimentos. Ed. Manual Moderno. México.

BLUMENKRANTZ, N. & ASBOE-HANSEN, G. 1973. New method for quantitative determination of uronic acid. *Analytical Biochemistry*, 54:484-489.

BELÁFI-BAKÓ, K. & KOROKNAI, B. 2006. Enhanced water flux in fruit juice concentration: Coupled operation of osmotic evaporation and membrane distillation. *Journal of Membrane Science*, 259:187-193.

BREALEY, K. 2005. Obtención de una bebida clarificada natural a base de lactosuero y jugo de frutas, mediante la aplicación de la microfiltración tangencial. Tesis Lic. En Tecnología de Alimentos. Universidad de Costa Rica, Escuela de Tecnología de Alimentos. San José.

BRILLOUET, J., ROUAU, X., HOEBLER, C., BARRY, J., CARRÉ, B. & LORTA, E. 1988. A New Method for Determination of Insoluble Cell Wall and Soluble Nonstarchy Polydaccarides from Plant Materials. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 36 (5): 969-979.

BUCKERIDGE, M. & TINÉ, A. 2001. Composição polisacárida: estrutura da parede celular e fibra alimentar. In Lajolo, F., Saura, F., Wittig, E. & Wenzel, E. *Fibra dietética en Iberoamérica: Tecnología y Salud*. Ed. Varela. Brasil. 43-60.

CARNEIRO, L., DOS SANTOS, I., DOS SANTOS, F., MARTINS, V. & CORREA, L. 2005. Cold sterilization and clarification pineapple juice by tangencial microfiltration. *Destillation*, 148:93-98.

CASTRO, J. & CERDAS, M. eds. 2005. Mora (*Rubus spp*): Cultivo y Manejo Poscosecha. M.A.G. Costa Rica.

CARVALHO, D., SABINO, A., BLUMENBERG, D., MARTINS, V., CORREA, L. & COURI, S. 2002. Cashew apple juice standarization by microfiltration. *Destillation*, 148: 61-65.

CERDAS, M. & MONTERO, M. 1992. Diagnóstico Preliminar del manejo Postcosecha de la mora (*Rubus* sp.) en Santa María de Dota y el Guarco. *Agronomía Costarricense*, 16(2):257-263.

CISSE, M., VAILLANT, F., PEREZ, A., DORNIER, M. & REYNES, M. 2005. The quality of orange juice processed by coupling crossflow microfiltration and osmotic evaporation. *International Journal of Food Science and Technology*, 40: 105-116.

CITA. 2006 a. Cenizas Totales, AQCITA- M004. Emisión N° 6. San José, Costa Rica.

CITA. 2006 b. Azúcares por HPLC, AQCITA-M006. Emisión N° 7. San José, Costa Rica.

CITA. 2006 c. Fibra dietética total por método enzimático, AQCITA-M007. Emisión N°6. San José, Costa Rica.

CITA. 2006 d. Nitrógeno total por método Kjeldahl utilizando equipo Foss Tecator, AQCITA-M003. Emisión N°6. San José, Costa Rica.

CITA. 2006 e. Humedad en estufa de vacío. AQCITA-M002. Emisión N°6. San José, Costa Rica.

CITA. 2006 f. Grasa cruda por extracto etéreo, AQCITA-M005. Emisión N°7. San José, Costa Rica.

CITA. 2006 g. Almidón por método enzimático. AQCITA-M018. Emisión N°3. San José, Costa Rica.

CHERYAN, M. 1998. Ultrafiltration and Microfiltration handbook. Lancaster: Technomic.

COSGROVE, D. 1997. Assembly and enlargement of the primary cell wall in plants. *Cell and Developmental Biology*, 13:171-201.

DIMITRIOS, B. 2006. Sources of natural Phenolic antioxidants. *Trends in Food Science & Technology*, 17:505-512.

DONGOWSKI, G. & SEMBRIES, S. 2001. Effects of Commercial Pectolytic and Cellulolytic Enzyme Preparations on the Apple Cell Wall. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49: 4236-4242.

DUBOIS, M., HAMILTON, J., REBERS, P.A. & SMITH, F. 1956. Colorimeter method for determination of sugar and related substances. *Analytical Chemistry*, 28:300-356.

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 Agriculture and Food Chemistry*, 49 (8): 3987-3992.

- EFFLAND, M.** 1977. Modified Procedure to Determine acid-Insoluble Lignin. In Wood and Pulp. TAPPI. 60(10):143-144.
- FAIGH, J.** 1995. Enzyme Formulations for Optimizing Juice Yields. Food Technology, 79-83.
- FANG, Y., YANG, S. & WU, G.** 2002. Free Radicals, Antioxidants, and Nutrition. Nutrition, 18(10): 872-879.
- FAN-CHIANG, H. & WROLSTAD, R.** 2005. Anthocyanin Pigment Composition of Blackberry. Journal of Food Science and Technology, 70(3):C198-C202.
- FAO & OMS.** 2003. Enfoque unificado para la promoción del consumo de frutas y vegetales. Ginebra. INTERNET. www.who.int/mediacentre/news/releases/2003/pr84/es/index.htm (9/10/2006)
- FLORES, D. & ARGÜELLO, F.** (eds). 2005. Cultivo de la Mora: Innovaciones tecnológicas. Tecnológica de Costa Rica. Costa Rica.
- FLORES, D., MONTERO, A., OROZCO, R. & ARGÜELLO, F.** (eds). 2003. Memoria: Primer foro taller Nacional sobre cultivo de mora (*Rubus* spp.) El Empalme. COSTA RICA
- FRANCO, G. & GIRALDO, M.**, (eds). 1999. El cultivo de la mora. FERIVA. Colombia.
- GEORGÉ, S. BRAT. P., ALTER, P. & AMIOT, M.** 2005. Rapid Determination of Polyphenols and Vitamin C in Plant-Derivates Products. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 53:1370-1373.
- GIRARD, B. & FUKUMOTO, L. R.** 2000. Membrane Processing of Fruit Juices and Beverages: A Review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 40(2): 91-157.
- GIUSTI, M. & WROLSTAD, R.** 2001. Anthocyanins: Characterization and measurement with UV-visible spectroscopy. In: Wrolstad, RE, editor. Current protocols in food analytical chemistry. New York: John Wiley, F1.2:1-13.
- GONZÁLEZ, E., ANCOS, B. & CANO, P.** 2000. Partial characterization of peroxidasa and polyphenol oxidase activities in blackberry fruits. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 48:5459-5464.
- HÄKKINEN, S.** 2000. Flavonols and Phenolic acid in berries and berry products. Doctorial dissertation, Faculty of Medicine of University of Kuopio. Finlandia.
- HAVSTEEN, B. H.** 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. Pharmacology & Therapeuties, 96:67-202.
- HERNÁNDEZ-GIL, R. & BAUTISTA, D.** s/f. Crecimiento y cambios bioquímicos durante el proceso de maduración de la mora (*Rubus glaucus* BENTH.). Agronomía Tropical, 27(2): 225-233.

- HUANG, D., OU, B. & PRIOR, R.** 2005. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53 (6): 1841 -1856.
- KALT, W.** 2005. Effects of Production and Processing Factors on Major Fruit and Vegetable Antioxidants. *Journal of Food Science*, 70(1):R11-R19.
- KAUR, C., & KAPOOR, H.** 2001. Review: Antioxidants in fruit and vegetables-the millennium's health. *International Journal of Food Science and Technology*, 36: 703-725.
- KLOPOTEK, Y., OTTO, K. & BOHM, V.** 2005. Processing Strawberries to different Products alters contents of Vitamin C, Total phenolics, Total anthocyanins and Antioxidant Capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(14): 5640-5646.
- LEE, J., DURST, R. & WROLSTAD, R.** 2002. Impact of Juice Processing on Blueberry Anthocyanins and Polyphenolics: Comparison of Two Pretreatments. *Journal of Food Science*, 67(5):1660-1667.
- LÓPEZ, F., PESCADOR, P., GÜELL A, C., MORALES, M., GARCÍA, M., PARRILLA, A. & TRONCOSO A.** 2005. Industrial vinegar clarification by cross-flow microfiltration: effect on colour and polyphenol content. *Journal of Food Engineering* 68: 133–136.
- LUND, E. & SMOOT, J.** 1982. Dietary Fiber Content of Some Tropical Fruits and Vegetables. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 30: 1123-1127.
- MARTÍNEZ-FLORES, S., GONZÁLEZ-GALLEGO, J., CULEBRAS, J. & TUÑÓN, M.** 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*, XVII (6): 271-278.
- MOYER, R., HUMMER, K., FINN, C., FREI, B. & WROLSTAD, R.** 2002. Anthocyanins, Phenolics, and Antioxidant Capacity in Diverse Small Fruits: *Vaccinium*, *Rubus* and *Ribes*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50:519-525.
- MULLEN, W., STEWART, A., LEAN, M., GARDENER, P., DUTHIE, G. & CROZIER, A.** 2002. Effect of freezing and storage on phenolics, ellagitannins, flavonoids and antioxidante Capacity of red raspberry. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 5197-5201.
- NAGODAWITHANA, T. & REED, G.** 1993. *Enzymes in Food Processing*. 3a. Ed. Academic Press. San Diego. Estados Unidos.
- NICOLI, M., ANESE, M. & PARPINEL.** 1999. Influence of processing on the antioxidant properties of fruit and vegetable. *Food Science and Technology*, 10:94-100.
- NIJVELDT, R., VAN NOOD, E., VAN HOORN, D., BOELENS, P., VAN NORREN, K., & VAN LEEUWEN, P.** 2001. Flavonoids: a review of probable mechanism of action potential applications. *Journal of Clinical Nutrition*, 74:418-425.

OU, B., HAMPSCH-WOODILL, M. & PRIOR, R. 2001. Development and Validation of an Improved Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49(10):4619-4626.

PAK, N. 2003. Fibra dietética en frutas cultivadas en Chile. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 53(4).

PÉREZ, A., ACOSTA, O., CHAN, Y. & VAILLANT, F. 2006. Impact of cross-flow microfiltration on antioxidant compounds of tropical fruit juices. *World Congress IUFOST*, (13th.). Nantes, Francia.

PÉREZ-ALMEIDA, I. & CARPITA, N. 2006. Las β -galactosidasas y la dinámica de la pared celular. *Advertencia*, 31(7):476-483.

PETROTOS, K. B. & LAZARIDES H., N. 2001. Osmotic concentration of liquid foods. *Journal of Food Engineering*, 49:201-206.

PRIOR, R., WU, X. & SCHAICH, K. 2005. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53 (10):4290-4302.

REYES-CARMONA, J., YOUSEF, G., MARTÍNEZ-PENICHE, R., & LILA, M. 2005. Antioxidant Capacity of Fruit Extracts of Blackberry (*Rubus* sp.) Produced in Different Climatic Regions. *Journal of Food Science*, 70(7): S497- S502.

ROBARDS, K. & ANTOLOVICH, M. 1997. Analytical Chemistry of Fruit Bioflavonoids. A Review. *Analyst*, 122: 11R-34R.

RONDEROS, M. 2006. Las enfermedades cardiovasculares en Costa Rica. INTERNET. <http://www.cor.ops-oms.org/TextoCompleto/documentos/las%20ECV%20en%20COR.doc>. (10/10/06).

RYUGO, K. 1993. *Fruticultura: Ciencia y Arte*. AGT. México.

SARNI-MANCHADO, P. & CHEYNIER, V. 2006. *Les polyphénols en agroalimentaire*. Lavoisier. Francia.

SELLAPPAN, S., AKOH, C. & KREWER, G. 2002. Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Georgia-Grown Blueberries and Blackberries. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50:2432-2438.

SHARMA, S., MULVANEY, S. & RIZVI, S. 2003. *Ingeniería de Alimentos: Operaciones unitarias y prácticas de Laboratorio*. Mexico: LIMUSA WILEY.

SHI, J., NAWAZ, H., POHORL, J., MITTAL, G., KAKUDA, Y. & JIANG, Y. 2005. Extraction of polyphenolics from plant material for functional foods-engineering and technology. *Food Reviews International*, 21: 139-166.

SIRIWOHARN, T., WROLSTAD, R., FINN, C. & PEREIRA, C. 2004. Influence of Cultivar, Maturity, and Sampling on Blackberry (*Rubus* L. Hibrids) Anthocyanins, Polyphenolics, and Antioxidant Properties. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52: 8021-8030.

SIRIWOHARN, T. & WROLSTAD, R. 2004. Polyphenolics Composition of Marion and Evergreen Blackberries. *Journal Food Science*, 69 (4): FCT 233- FCT 239.

SLINKARD, K. & SINGLETON, V.L. 1977. Total phenol analysis: Automation and Comparison with Manual Methods. *American Journal of Ecology Viticulture*, 28(1): 49-55

SZETO, Y., KWOK, T. & BENZIE, I. 2004. Effects of a Long-Term Vegetarian Diet on Biomarkers of Antioxidants Status and Cardiovascular Disease Risk. *Nutrition*, 20(10):863-866.

SZETO, Y., TOMLINSON, B. & BENZIE, F. 2002. Total antioxidant and ascorbic acid content of fresh fruits and vegetables: implications for dietary planning and food preservation *British Journal of Nutrition*, 87:55-59.

UdeA- (Universidad de Antioquia- Facultad de Química Farmacéutica). 1995. Pulpas de frutas tropicales. INTERNET.

http://huitoto.udea.edu.co/FrutasTropicales/mora_de_castilla.html (10/2/07)

URQUIAGA, I., URZÚA, U. & LEIGHTON, F. 1999. Antioxidantes Naturales. Impacto en la Salud. In Congreso Latinoamericano de Grasas y Aceites. 8°. Chile.

VAILLANT, F., MILLAN, P., O'BRIEN, G., DORNIER, M. DECLoux, M. & REYNES, M. 1999. Crossflow microfiltration of passion fruit juice after partial enzymatic liquefaction. *Journal of Food Engineering*, 42: 215-224.

VAILLANT, F. 2000. Clarification et concentration de jus de fruits tropicaux pulpeaux associant traitements enzymatiques, microfiltration tangentielle et évaporation osmotique. Thèse de Doctorat, Spécialité Génie de Procédés. L'École Nationale Supérieure des Industries Agricoles et Alimentaires. Montpellier. France.

VAILLANT, F., MILLAN, P., DORNIER, M. DECLoux, M. & REYNES, M. 2001. Strategy for economical optimisation of clarification of pulpy fruit juices using crossflow microfiltration. *Journal of Food Engineering*, 48: 83-90.

VAILLANT, F., PEREZ, A. & VIQUEZ, F. 2004. Microfiltración tangencial: una alternativa innovadora para la transformación de frutas tropicales. *La Alimentación Latinoamericana*, 252: 38-46.

VAILLANT, F., CISSE, M., CHAVERRI, M., PEREZ, A., DORNIER, M., VIQUEZ, F. & DHUIQUE-MAYER, C. 2005 a. Clarification and concentration of melon juice using membrane processes. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 6:213-220.

VAILLANT, F. PEREZ, A., DÁVILA, I., DORNIER, M. & REYNES, M. 2005 b. Colorant and antioxidant properties of red-purple pitahaya. *Fruits*, 60 (1):1-10

VALLE, G., DEL., GONZÁLEZ, A. & BAÉZ, R. 2005. Antocianinas en uva (*Vitis vinifera*) y su relación con el color. *Revista de Fitotecnia Mexicana*, 28(4):359-368.

VAN SOEST, P. ROBERTSON, J. & LEWIS, B. 1981. The detergent system of analysis and its application to human foods. In *The Analysis of dietary fiber in food*. James and Otheander (Eds). P 123-158.

VATTEM, D., GHAEDIAN, R. & SHETTY, K. 2005. Enhancing health benefits of berries through phenolic antioxidant enrichment: focus on cranberry. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*. 14 (2):120-130

VORAGEN, A., TIMMERS, J., LINNSEN, J., SCHOLS, H. & PILNIK, W. 1983. Methods of analysis for cell wall polysaccharides of fruit and vegetables. *Z. Lebensm. Unters Forsh*, 177: 251-256.

WANG, S. & LIN, H. 2000. Antioxidant Activity in Fruit and Leaves of Blackberry, Raspberry, and Strawberry Varies with Cultivar and Developmental Stage. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48:140-146.

WHISTLER, R. & BEMILLER, J. 1997. *Carbohydrate Chemistry for Food Scientists*. American Association of Cereal Chemists, Estados Unidos de América.

WROLSTAD, R. 2004. Anthocyanin Pigments-Bioactivity and Coloring Properties. *Journal of Food Science*, 69(5): 419-421.

WROLSTAD, R., CULBERTSON, J., NAGAKI & MADERO, F. 1980. Sugars And non-volatile acids of blackberries. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 28:558-553.

WU, X., BEECHER, G., HOLDEN, J., HAYTOWTTZ, D., GERHARDT, S. & PRIOR, R. 2006. Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 54(11):4069-4075.

VIII. ANEXOS

8.1 Métodos de análisis químicos y físicos

8.1.1 Peso (g) de la fruta entera

Se realizó utilizando una balanza analítica marca Sartorius.

8.1.2 Dimensiones de cada fruta

Se determinó el diámetro ecuatorial y longitudinal utilizando un vernier expresando los resultados en cm.

8.1.3 Color por Hunter L* a* b*

El color se evaluó utilizando un colorímetro ColorFlex de Hunterlab.

Se estimó el Hue y el Croma de acuerdo a las siguientes fórmulas:

$$\text{Hue} = b/a$$

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

8.1.4 Acidez titulable

Se determinó según el método 942.15 de AOAC (1999).

8.1.5 Determinación de pH

Se determinó según el método 981.12 de AOAC (1999).

8.1.6 Grados Brix

Se utilizó un refractómetro marca Fisher Scientific con una escala de 0 a 95° brix, efectuándose la lectura a 23°C.

8.1.7 Determinación de cenizas totales

La cuantificación del contenido de cenizas totales en la fruta se realizó utilizando el método 940.26 para fruta fresca de la AOAC (1999) (CITA, 2006a). El método consistió en la medición de la masa de residuo inorgánico que queda después de quemar la muestra, a temperatura entre 500 y 600 °C.

8.1.8 Determinación de azúcares totales

Para la cuantificación de los azúcares totales se utilizó un equipo de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), empleando el método acreditado por el Laboratorio de Química del CITA (CITA, 2006 b). El cual consiste en la extracción de los azúcares de la muestra y la inyección del extracto en la columna de HPLC adecuada para obtener la separación de los azúcares presentes en la muestra.

La cuantificación e identificación de los azúcares se realizó inyectando patrones de sacarosa, glucosa y fructosa de concentración conocidas, los cuales se utilizaron para calibrar el equipo en cuanto a concentraciones y para la identificación por los tiempos de retención. Las concentraciones de cada azúcar encontrada en la muestra se expresaron como % (p/p) de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\%(p/p) = (\%p/v / \text{Peso de muestra}) \times 100$$

8.1.9 Fibra dietética total por método enzimático

La cuantificación del contenido de fibra dietética total se realizó por el método enzimático 985.29 de la AOAC (1999), acreditado por el Laboratorio de Química del CITA (CITA, 2006 c). Este método se basa en una hidrólisis enzimática de almidón y proteína (hidrólisis parcial), la cual se realiza en tres etapas, utilizando Termoamyl (α -amilasa estable al calor), proteasa y amiloglucosidasa. La fibra dietética soluble se precipita con etanol, obteniéndose por medio de filtración y repetidos lavados del precipitado de fibra total dietética (FTD). A este residuo se le analizó el contenido de proteína y cenizas para realizar las respectivas correcciones. Los resultados se expresaron en % de FTD por cada 100 g de muestra de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\%FDT = \frac{[g \text{ residuo} - ((\% \text{ proteína residuo} + \% \text{ cenizas residuo})/100) \times g \text{ residuo} - g \text{ blanco}]}{g \text{ muestra}} \times 100$$

8.1.10 Polifenoles totales, azúcares reductores y cuantificación de vitamina C

Para la estimación del contenido de polifenoles, azúcares reductores y vitamina C se utilizó el método propuesto por Slinkard & Singleton (1977), modificado por Georgé et al. (2005) y adaptado para el análisis de mora.

El principal reactivo de esta reacción es el ácido mixto fosfomolibdotungstico ($H_3PMo_{12}O_{40}$) conocido como reactivo de Folin – Ciocalteu. Originalmente este reactivo es de color amarillo pero es reducido a óxidos azules de tungsteno ($W_8 O_{23}$) y molibdeno ($Mo_8 O_{23}$), durante la oxidación fenólica. La reacción ocurre bajo condiciones alcalinas con carbonato de calcio. Los compuestos azules formados son detectados por espectrofotometría a 760 nm y representan la cantidad de compuestos fenólicos presentes en la muestra, normalmente expresados como equivalentes de ácido gálico.

En la Figura 20, se muestra el procedimiento que se utilizó para tal cuantificación tanto en la fruta liofilizada en sus tres estados de madurez. Para la cuantificación de estos componentes en los jugos de mora el procedimiento fue similar, pero no se realizó los pasos de extracción.

El jugo pulposo fue centrifugado (5000 rpm/10 min) y la determinación se realizó sobre el sobrenadante previamente filtrado con papel Wathman número 4. El jugo jugo clarificado no requirió ninguna modificación. En ambos casos se tomaron 100 μ L de jugo y se aforaron en un balón de 10 mL con metanol. A partir de este punto el procedimiento básicamente fue el mismo que el presentado en la Figura 20.

Las muestras obtenidas en los pasos A, B y C fueron colocadas en un baño a 50 °C por 15 minutos y fueron seguidamente enfriadas en un baño de hielo antes de realizar las lecturas en el espectrofotómetro. La cuantificación de polifenoles, vitamina C y azúcares reductores se midió espectrofotométricamente (760 nm) contra una curva de ácido gálico con el reactivo de Folin-Ciocalteu. La estimación se realizó por diferencias entre las lecturas espectrofotométricas (tomando en cuenta las diluciones efectuadas) como sigue:

1. Se grafica las concentraciones contra las absorbancia. Con regresión lineal se interpolan los valores de absorbancia de las muestras.
2. De la regresión lineal $y = mx + b$ se tiene el valor de la pendiente (m) y del intercepto (b). Donde y es el valor de la absorbancia y x la concentración en mg/L de ácido gálico.
3. De esta manera:

$$C_n A = (y - b) / m * f_d * V \text{ extractante (L)} / \text{masa de la muestra (g)}$$

$$C_n B = (y - b) / m * f_d * V \text{ extractante (L)} / \text{masa de la muestra (g)}$$

$$C_n A = (y - b) / m * f_d * V \text{ extractante (L)} / \text{masa de la muestra (g)}$$

$$C_n \text{ polifenoles totales} = C_n A - C_n B$$

$$C_n \text{ Vitamina C} = C_n B - C_n C$$

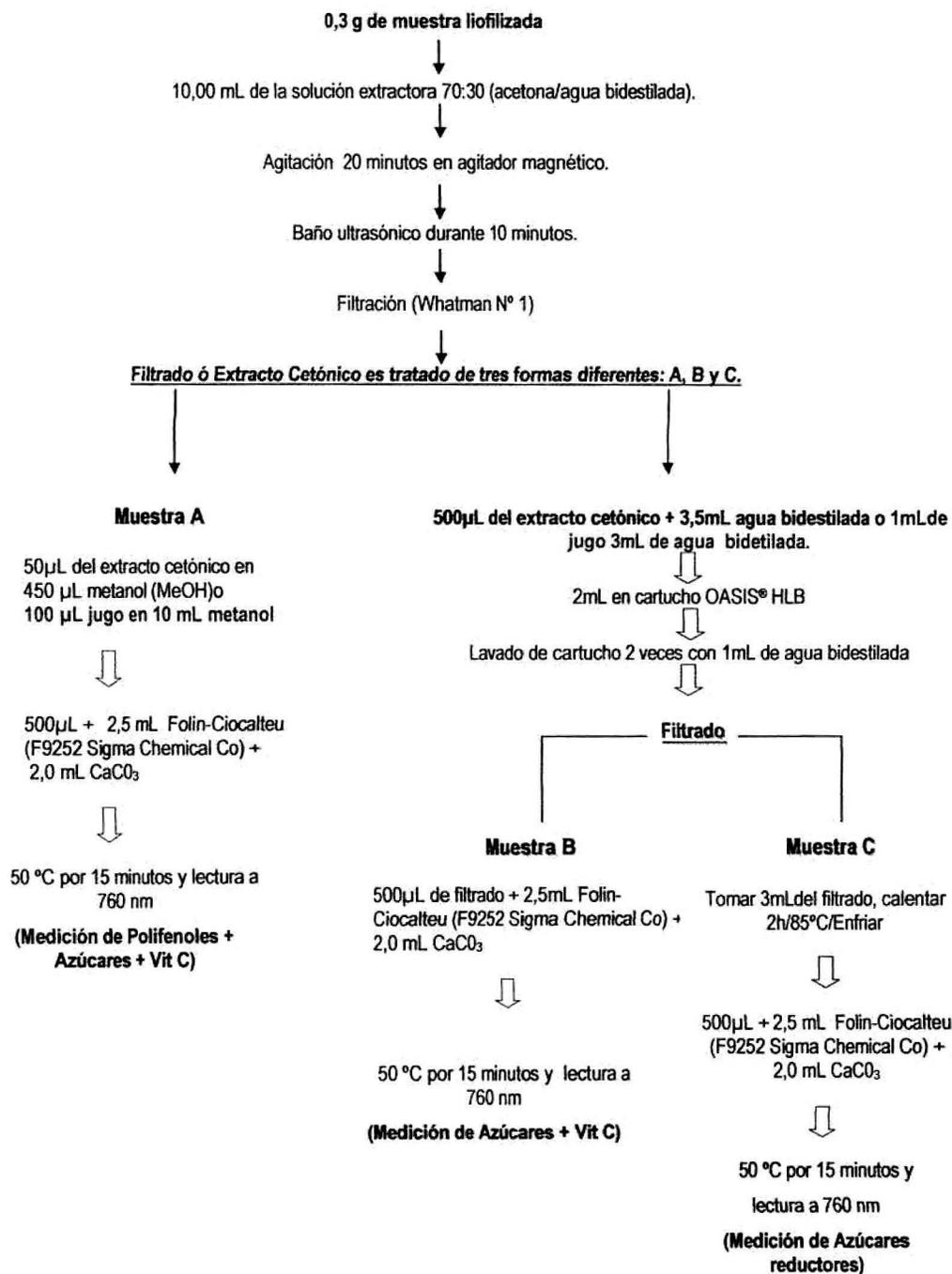


Figura 20 - Procedimiento empleado para la cuantificación de polifenoles, azúcares reductores y vitamina C en muestras de mora liofilizadas o jugos.

8.1.11 Capacidad antioxidante método ORAC

Con este método de análisis se busca verificar la capacidad que poseen los antioxidantes presentes en la mora de absorber los radicales de oxígeno presentes en el medio, demostrándolo por medio de espectrofotometría de fluorescencia. Para ello se utilizó el método descrito por Ou et al. (2001), conocido como método ORAC, del inglés "Oxygen Radical Absorbance Capacity" adaptado por Vaillant et al. (2005b).

En forma simplificada para el análisis se utilizó una disolución de Trolox (6-hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid. 238813, Aldrich) como solución patrón de antioxidante. Se empleará una sustancia con un doble enlace nitrogenado llamada AAPH (2,2'-azobis (2 - amidinopropane) dihydrochloride (Wako Co.), como fuente de radicales libres y fluoresceína de sodio (Sigma Chemical Co.), como indicador de fluorescencia en la lectura espectrofotométrica.

El análisis consistió en la neutralización de los radicales libres suministrados en el medio por el reactivo AAPH, por parte de los antioxidantes presentes naturalmente en las moras. La reacción entre los antioxidantes y el AAPH presenta mayor afinidad que la reacción de este último y la fluoresceína. Así la fluorescencia se mantiene hasta que se agotan los antioxidantes naturales y la fluoresceína comienza a ser atacada por los radicales libres (AAPH). A medida que esta última reacción transcurre, se produce la caída de la intensidad de fluorescencia y es posible la construcción de la cinética de la reacción de pérdida de fluorescencia respecto al tiempo. Con el Trolox se construyó una curva patrón y otra curva de caída de la intensidad de fluorescencia en el tiempo. El área bajo la curva es proporcional a la concentración de Trolox por tanto fue posible interpolar la concentración de antioxidantes en la muestra de mora. El resultado se expresó como $\mu\text{mol Trolox Equivalente /g}$ de muestra.

8.1.12 Determinación de antocianinas totales

Para la determinación del contenido de antocianinas en las muestras de mora liofilizadas se utilizó el método de Giusti & Wrolstad (2001). El método se basa en los cambios estructurales que sufren las antocianinas con los cambios de pH, los cuales se manifiestan por la diferencia en los espectros de absorbancia. La forma coloreada oxonia predominante prevalece a pH 1,0 y la forma hemiacetálica incolora a pH 4,5.

Para la valoración se pesaron 2 g de mora liofilizada; a un gramo se le agregó 75 mL de buffer de fosfatos a pH de 1,0 y el otro gramo igual cantidad de buffer de fosfatos a pH de 4,5. Ambos recipientes se colocaron en un agitador magnético por 15 minutos. Seguidamente la muestra se centrifugó y filtró para eliminar el posible sedimento que obstaculice la lectura.

Se realizaron las disoluciones que sean necesarias hasta lograr que la absorbancia de la solución fuera de 0,4 – 0,6 UA a pH 1,00. Se realizaron las lecturas en el espectrofotómetro UV visible (SHIMADZU, UV -1700 Pharma Spec) de cada una de las soluciones a las dos longitudes de onda requeridas (700 y 510 nm) contra un blanco de agua. La concentración final de antocianinas (mg/100g de fruta), se calculó en base a las diferencias de absorbancia (pH de 1 y 4,5) entre los 500 y 700 nm tomando en cuenta las diluciones y el peso de la muestra como sigue:

$$B = [(A_1 - A_2) \times df/p - (A_3 - A_4)] \times fd/p \times V \times 10^3 \times 445,2 / 29600$$

A₁ = A_{510 nm} a pH 1.0

A₂ = A_{700 nm} a pH 1.0

A₃ = A_{510 nm} a pH 4.5

A₄ = A_{700 nm} a pH 4.5

B = concentración de antocianinas mg/100g

fd = Factor de dilución

p = masa de muestra

V = Volumen de alícuota de buffer

29600 = Absorbancia molar de la antocianina mayoritaria (en este caso cianidina 3 – glucósido)

445,2 = peso molecular de la antocianina mayoritaria en la fruta (en este caso cianidina 3 – glucósido)

8.1.13 Determinación del contenido de proteínas

La cuantificación del contenido de proteínas se realizó en forma indirecta a través del contenido de nitrógeno total por el método 920.105 de Kjeldahl recomendado por la AOAC (1999) y acreditado por el Laboratorio de Química del CITA, (CITA, 2006 d). Se utilizó un equipo FOSS TECATOR modelo 2020 digestor y 2200 kjeltec auto destillation.

Para el análisis se pesa por duplicado 5g de muestra de mora liofilizada, el % de nitrógeno resultante se corrige con el factor de 6,25 para expresar el % de proteína contenido en la muestra:

$$\% \text{ Proteína} = \% \text{ Nitrógeno} \times 6,25$$

8.1.14 Humedad

El contenido de humedad de las muestras se realizó siguiendo el método recomendado por la AOAC (1999) y acreditado por el Laboratorio de Química del CITA (CITA, 2006 e). El método consiste en la medición de la pérdida de peso debido a la evaporación de agua en una estufa de vacío.

Las cápsulas a utilizar se secan entre 98 – 100°C durante una hora, se enfrían y se pesan. Se pesan 5g de muestra y se introducen en la estufa, secando a una temperatura de 67- 71°C con un vacío de 20 ± 5 pulgadas de Hg, durante aproximadamente 6 horas, hasta alcanzar un peso constante. Los cálculos se hacen siguiendo la siguiente fórmula y se expresan como g de humedad por 100g de fruta.

$$\% \text{ Humedad} = [\text{PCM-PCMS} / \text{PCM-PC}] \times 100$$

PC = Peso cápsula vacía

PCM = Peso de cápsula + muestra

PCMS = Peso de cápsula + muestra seca

8.1.15 Grasa cruda por extracto etéreo

La cuantificación del contenido de grasa estuvo a cargo del Laboratorio de Química del CITA y se realizó por medio de la extracción del material seco (obtenido de la determinación de la humedad a vacío) con éter etílico como solvente en un aparato de extracción intermitente Soxhlet (AOAC, 1999; CITA f, 2006).

8.1.16 Carbohidratos totales + Lignina

La estimación del contenido total de carbohidratos de la mora se hizo por diferencia, a partir del contenido de humedad, cenizas, proteínas y grasa, con la siguiente ecuación.

$$\text{Carbohidratos totales + Lignina} = 100 - (\% \text{ humedad} + \% \text{ proteínas} + \% \text{ de grasa} + \% \text{ cenizas} + \% \text{ ácidos orgánicos})$$

8.1.17 Material insoluble en alcohol (MIA) de mora

La cuantificación de la MIA se realizó según el método propuesto por Brillouet et al. (1988) siguiendo el protocolo que se detalla a continuación.

Reactivos necesarios:

Etanol absoluto (>95% de pureza)

Etanol 80%

Éter dietílico (Aldrich)

Acetona (Aldrich)

- Licuar moras frescas y colar la pulpa para retirarle las semillas (licuadora y colador doméstico)
- Pesar 100 g de pulpa de mora y colocarla en un Erlenmeyer de 1L.
- Adicionar 400 mL de etanol absoluto (95%) y calentar hasta ebullición. Dejar transcurrir 30 minutos desde iniciado el burbujeo, manteniendola mezcla con agitación magnética.⁷
- Filtrar con tela de dacrón sobre un filtro Büchner.
- Lavar el precipitado con dos volúmenes de etanol al 80% (un volumen equivale a los gramos de fruta pesados) sin encender el vacío, revolviendo con una cuchara para promover que el solvente este en contacto con el producto.
- Encender el vacío y permitir que el solvente escurra.
- Lavar con dos volúmenes de etanol absoluto (95%) exactamente igual que en el paso anterior.
- Lavar con dos volúmenes de acetona (igual que en los casos anteriores, apagar el vacío durante el lavado y encenderlo al final).
- Adicionar 1 volumen de éter y llevar el precipitado que se encuentra en la tela sobre el filtro Büchner a la campana a temperatura ambiente para permitir que se seque (al menos 3 horas).
- Colocar el precipitado (MIA) en cajas de Petri (previamente secadas a 100 °C por 1 hora y pesadas en balanza analítica).
- Llevar a estufa al vacío a una temperatura de 55°C durante toda la noche, hasta desecación completa.
- Pesar el material insoluble en alcohol, pulverizar con molinillo para muestras y almacenar a -20°C.

Expresar los resultados g de MIA por cada 100 g de pulpa de mora.

⁷ Si al cabo de los 30 minutos, la muestra aún continúa muy coloreada, filtrar con tela dracon sobre un filtro Büchner y colocar etanol "limpio" llevándolo a ebullición por 30 minutos más.

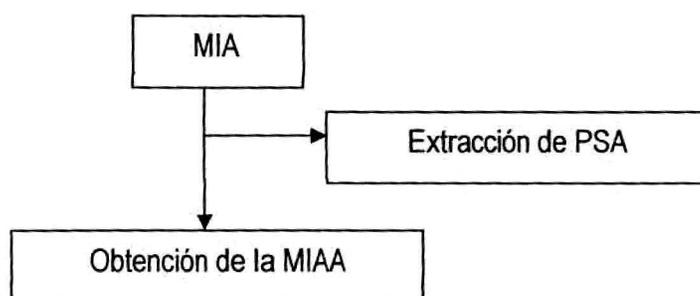
8.1.18 Pectina soluble

Para la cuantificación del contenido de pectinas solubles, se extrajo la pectina contenida en una determinada cantidad de material insoluble en alcohol (MIA). Para eso se empleó el método reportado por Voragen et al. (1983) que se presenta en el punto 8.1.19.

8.1.19 Material insoluble en alcohol y agua (MIAA)

La obtención de la MIAA se efectuó siguiendo el protocolo que se detalla a continuación:

- Pesar la MIA (material insoluble en alcohol)
- Colocarla sobre tela dracon en un filtro Büchner.
- Lavar el precipitado de MIA (material insoluble en alcohol) con agua destilada a 4°C.
- Encender el vacío para que drene el agua.
- Realizar la prueba cualitativa de Antrona (Dubois et al., 1956) sobre el agua de escurrido luego de cada lavado hasta que de negativa.
- Cuando la prueba cualitativa de Antrona de negativo, recuperar la MIAA que queda sobre la tela dracon en una bolsa plástica de alta densidad.
- Rápidamente congelar bajo nitrógeno para luego ser liofilizada y finalmente reducido su tamaño de partícula.
- Pesar el MIAA luego de liofilizada y expresarlo g por cada 100 g de MIA.



Obtención de las pectinas solubles (método de Voragen *et al.*, 1983).

- Recuperar el agua de lavado de la MIA a 4°C.
- Filtrar con papel cualitativo número 4.
- Concentrar en un rotavapor (BÜCHI, 461) a 50°C.
- Recuperar el concentrado del rotavapor (concentrar hasta un volumen de fácil recuperación) en una bolsa plastica de alta densidad.
- Congelar bajo nitrógeno y liofilizar.
- Pesar la PSA resultante de la liofilización. Expresar como g de pectina por cada 100 g de de MIA.

Reactivos:

Disolver 200 mg de antrona en 100ml de H₂SO₄ concentrado. La disolución se realiza agitando con pastilla magnética con sumo cuidado. **La preparación se efectúa al momento de utilizarla** y se debe proteger de la luz (es altamente sensible a la misma).

Prueba colorimétrica (Dubois , 1956):

- Se toma una alícuota del agua de lavado (100µl) de la MIA.
- Se coloca en un tubo de ensayo conteniendo 1,15 mL de agua destilada.
- Agregar lentamente 2,5 mL de reactivo de Antrona (hacerlo en un baño de agua hielo)
- Se preparan dos "blancos" conteniendo una alícuota de 100µl de agua destilada en sustitución al volumen de muestra.
- Se comparan los tubos conteniendo las muestras con los tubos "blancos", estos deben tener la misma coloración si no es así se deben continuar los lavados de la MIA hasta que los tubos "muestra" tengan el mismo color que los tubos "blancos".

8.1.20 Determinación del contenido de almidón de la MIAA

La determinación del contenido de almidón de la MIAA de mora, estuvo a cargo del Laboratorio de Química del CITA y se determinó enzimáticamente por el método acreditado y documentado por el CITA (CITA, 2006 g). El método consiste en la hidrólisis del almidón a unidades de glucosa utilizando una α -amiloglucosidasa (E.C. 3.2.1.3) incubando por 16 horas, pH de 4,5 y a temperatura de 55°C. Posteriormente se realizó la determinación de la concentración de glucosa con un método enzimático (glucosa oxidasa) que consiste en el desarrollo de color utilizando un kit de reactivos (suministrados por TICO LAB). Para llevar a cabo el análisis se realizó una curva de calibración con glucosa preparando los patrones con concentraciones conocidas. La lectura de color se realizó en espectrofotómetro UV-visible a 505 nm de absorbancia. Los resultados fueron expresados en %.

8.1.21 Determinación de lignina en la MIAA de mora

El contenido de lignina presente en la muestra del MIAA de mora se determinó por el método propuesto por Effland (1977). El principio se basa en que la lignina es insoluble en medio ácido concentrado, por tanto, en presencia de H_2SO_4 al 72 %, se disuelven todas las sustancias glucosídicas quedando solamente la lignina bruta. Para la determinación se siguió el protocolo que se expone a continuación:

Reactivo:

- **H_2SO_4 al 72 % (v/v).**
Medir 720 mL de H_2SO_4 y aforar a un volumen de 1000 mL en un balón aforado.

Procedimiento:

- Pesar 200 mg de MIA proteolizada (MIAA) o 50 mg para el caso de la fracción de MIA con pectinas solubles en agua, en erlenmeyer de 250 mL, por triplicado (**PM**).
- Agregar a cada uno 4 mL de H_2SO_4 al 72% v/v.
- Colocar en baño a 30 °C por una hora en agitación (speed 5) con magnetos (todos iguales).
- Luego lavar con 56 mL de H_2O destilada y coloque en una botella de vidrio.
- Autoclavar a 121 °C y 16 hPa (1,1 bar) por una hora.
- Filtrar con papel Whatman GF/A (24 mm de diámetro) previamente pesado e identificado. Se hacen lavados con un volumen de 300 mL de H_2O destilada (esto se hace para eliminar la solución ácida).
- Tome el papel filtro, colóquelo en un crisol y deje a 100 °C durante 5 horas en estufa. (El crisol debe de haberse tratado previamente colocándolo en estufa a 100 °C por

una hora, se deja enfriar en un desecador y se mide el peso del mismo vacío). Pesarse el crisol (**P1**)

- Incinere los crisoles con los filtros en mufla a 550 °C por 4 horas y deje en un desecador hasta alcanzar la temperatura ambiente, pese hasta peso constante (**P2**).

Cálculos:

$$\% \text{ Lignina} = [(P_1 - P_2) / PM] \times 100$$

P₁: es el peso después de secar a 100°C/1

P₂: peso después de incinerar en mufla (4 horas 550 °C)

PM: peso inicial de la MIAA

8.1.22 Determinación de fibras insolubles: hemicelulosa y celulosa de la MIAA

Para la determinación del contenido de fibra insoluble de la MIAA de mora se utilizó el método reportado por Van Soest et al. (1981). La asociación de los detergentes neutros y ácidos solubilizan los polisacáridos no celulóticos, las proteínas y los ácidos nucleotidos. Los componentes que quedan son las celulosas y hemicelulosas que se pueden cuantificar.

La acción de cada detergente es la siguiente:

- NDS: Quitar el nitrógeno con un detergente neutro.
- ADS: Hidrolisar la hemicelulosa con un detergente ácido.

Reactivos necesarios:

- **NDS = detergente neutro (extracción de celulosa, hemicelulosa y lignina)**
 - Lauryl sulfato de sodio 30 g
 - EDTA deshidrato (SIGMA E-4884) 18,61 g
 - tetraborato de sodio (ALDRICH 22,173-2) 6,81 g
 - Disodio hidrogenofosfato anhidro (MERCK) 4,56 g
 - Etilen glicol (SIGMA D-8779) 10 ml
 - Agua destilada 1000 ml

- **ADS = detergente ácido (digestion de hemicelulosa, precipitación de celulosa y lignina)**
 - Bromuro hexadecil trimetil amonio (MERCK 814119) 20 g
 - Acido sulfúrico 1N (EM UN 1880) (utilizar el ácido sulfúrico para completar en un balón de 1000 ml)

Procedimiento:

- Pesar 0,5 g de MIAA o 0,25 g de pectina en un erlenmeyer para calentar a reflujo (PE).
- Añadir 25 ml NDS. Poner a ebullición durante 30 minutos, en un reflujo con destilador usando calentadores. Activar el cronómetro cuando inicia el burbujeo. Dejar enfriar a temperatura ambiente.
- Añadir 25 ml de NDS. Poner a ebullición 1 hora en reflujo con calentadores, activando el cronómetro cuando inicie el burbujeo.
- Filtrar con tela dracon enjuagando con agua destilada. Se recupera los residuos que quedan en el filtro y se colocan en un crisol, tratado a 100 °C por 1 hora y pesado.
- Poner en una estufa a 100°C por 8 horas.
- Enfriar en un desecador. Pesar y anotar. Sea P₁.
- Recuperar la fracción sólida en un erlenmeyer de 250 mL y añadir 25 mL de ADS. Raspar con agitador las paredes del crisol para recuperar lo máximo.
- Colocar en un **baño María** a 100 °C por una hora y filtrar sobre tela dracon.

- Poner la parte residual en crisoles previamente tratados a 100 °C por 1 hora y pesados.
- Poner en una estufa a 100°C por 8 horas. Colocar en desecador y dejar enfriar hasta temperatura ambiente, pesar y anotar. Sea P_2 .

Cálculos:

$$\% \text{ Hemicelulosa} = [(P_1 - P_2) / PE] \times 100$$

$$\% \text{ Celulosa} = [(P_2 - \text{Peso de Lignina}) / PE] \times 100$$

Nota: Peso de Lignina se obtiene del método de la Determinación de Lignina.

8.1.23 Proteólisis del material insoluble en alcohol

Para la proteólisis del material insoluble en alcohol y agua (MIAA), se utilizó el método propuesto por Brillouet et al. (1988). Se pesaron 2,5 g de MIAA previamente liofilizado y tamizado hasta obtener un diámetro de partícula inferior a 0,5mm. Se añadieron 100mL de buffer de fosfatos (0,1 M) pH 7,5, se colocaron en un baño a 40°C, con agitación 100 rpm, y se añadieron 2,5 mL de enzima proteasa de *Streptomyces griseus* (SIGMA del Kit Dietary fiber total TDF – 100A) incubando por 6 horas. Seguidamente se centrifugó a 15000 g durante 25 minutos a 20°C. El sobrenadante fue filtrado con papel filtro cuantitativo Whatman N° 4. El precipitado se congeló en nitrógeno líquido, fue liofilizado y pesado, obteniéndose así la fracción MIAA sin proteínas.

8.1.24 Amilólisis del material insoluble en alcohol

Para la amilólisis del material insoluble en alcohol (MIAA), se utilizó el método propuesto por Brillouet et al. (1988). Se pesaron 2,5 g de MIAA previamente desproteínizada molida y tamizada. Se le agregaron 100mL de agua destilada y se llevaron a un baño hirviendo por 30 minutos utilizando un agitador –calentador. Se agregaron 150mL de buffer de acetato 0,1 M, pH 5 y luego 0,250 mL de α -amilasa de *Bacillus licheniformis* termorresistente dejando por 15 minutos el mismo baño maría a 100°C con calentador – agitador. Seguidamente se detuvo la reacción en un baño a 40°C para luego agregar 2,5 de solución de amiloglucosidasa de *Rhizopus* dejando incubar en ese baño por 2 horas. Inmediatamente se centrifugó a 15000g por 10 minutos a 20°C, se filtró con papel filtro Whatman N°4. El precipitado se congeló en nitrógeno líquido, fue liofilizado y pesado.

8.1.25 Hidrólisis enzimática del MIAA de mora.

Las enzimas presentes en los preparados enzimáticos comerciales, son mezclas de pectinasas, poligalacturonasas, pectinesterasa, celulasa, proteasas y amilasas. Al mezclar determinada cantidad de enzimas con la pared celular purificada de la mora, a cierta temperatura y tiempo, los polisacáridos de la pared celular (pectina, hemicelulosa y celulosa) serán hidrolizados. El preparado comercial de mejor desempeño sobre la pared purificada (evaluado por la cantidad de azúcares neutros y ácidos galacturónicos libreados al medio) se comportará de igual modo sobre la pulpa de fruta. Con esto se busca disminuir la viscosidad y solubilizar los sólidos solubles en suspensión (SIS) del jugo pulposo, para reducir el colmataje de la membrana de microfiltración y aumentar los flujos de jugo clarificado durante el proceso.

A- Reactivos necesarios:

- **Buffer citrato 0,1M pH de 2,8**

Preparación del buffer

Solución A: pesar 9,605 g de ácido cítrico 0,1M y disolver en 500 mL de agua destilada.
Solución B : pesar 5,365 g de fosfato de sodio dibásico heptahidratado [SIGMA S9390 98-102%] $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y disolver en 100 mL de agua destilada.

422 mL de A + 78 mL de B + agua destilada hasta 1000 mL.

En caso de ser necesario ajustar el pH gota a gota con el volumen restante de A o B dependiendo de si se desea bajar o subir el pH respectivamente.

B- Modo operativo:

- Pesar 10 mg de MIAA y colocar en un tubo Eppendorff de 1,5 mL.
- Colocar la concentración de enzima ***adecuada teniendo en cuenta el % que representa la MIAA en la pulpa de fruta*** y completar con el buffer de citrato hasta 1 mL.
- ***Se preparan "blancos químico" por duplicado para cada preparado enzimático y concentración.*** Los mismos llevan pared celular (MIAA) y buffer de citrato, y son tratados en igual forma que los tubos con enzima.
- Colocar los todos los tubos bien cerrados (use parafilm para asegurar bien la tapa) en el baño a 35 °C con agitación rápida por 1 hora. ("Shaking water bath" marca GCA PRECISION®).

- Al cumplir la hora de tratamiento, en los tubos “**blancos químicos**” colocar la concentración de enzima correspondiente para inmediatamente ser inactivada.
- Colocar los todos los tubos (“muestra” y “blancos”) en baño en ebullición por 2 minutos para inactivar las enzimas.
- Centrifugar 15 minutos a 5000 rpm.
- Realizar la prueba AGU y de Antrona sobre el sobrenadante cristalino sin sólidos en suspensión (sección 8.1.26 y 8.12.7 de este capítulo). En los tubos “blancos químicos” también se realiza dichas pruebas, con el objetivo de corregir las absorbancias debidas al preparado comercial.

8.1.26 Determinación de ácido galacturónico (AGU)

La determinación de ácidos galacturónicos se realizó como forma de verificar la efectividad de los tratamientos enzimáticos. Se siguió el método de metahidroxidifenil reportado por Blumenkrantz & Asboe-Hansen (1973).

Los ácidos urónicos se determinan según el método del metahidroxidifenil (**MHDP**). Sobre la acción del ácido sulfúrico concentrado, los poli u oligosacáridos son hidrolizados en osas neutras y eb ácidos urónicos. Los monómeros de los ácidos liberados son deshidratados en derivados furfuroilos que forman con el metahidroxidifenil un complejo de color rosado presentando un máximo de absorción a **520nm**. El método es muy específico las osas neutras no forman un complejo con el metahidroxidifenil.

A - Reactivos:

- **Hidroxido de sodio al 0,5% (p/v).**
(1,25 g NaOH (J. T. Baker 3722-5), en 250 mL de agua destilada)
- **Metahidroxidifenil (MHDP) ($C_6H_5C_6H_4OH$).**
(Disolver 37,5mg de MHDP [3-phenilphenol 90% ALDRICH 26225-0] en 25 mL de NaoH al 0,5%).
- **Tetraborato de sodio al 0,0125M (BORAX).**
(Disolver 447mg de tetraborato de sodio [SIGMA B-0127] en 100mL de H_2SO_4 a 95-97%)
- **Ácido D-galacturónico monohidratado ($C_6H_{10}O_7 \cdot H_2O$) a 1000 $\mu g/mL$**
(Disolver 27,31 mg de AGU [Fluka (Biochemika) > 97%], en 25mL de agua destilada)

B - Modo operativo general:

- Este modo operativo se aplica tanto para los tubos "**muestra**" como para los tubos "**blanco**" con la diferencia que en estos últimos el MHDP se sustituye por NaOH al 0,5%. Se prepara un blanco por cada muestra es decir que se hacen dos series.
- Introducir **2,4 mL** de BORAX en un tubo de ensayo (10ml con tapa rosca).
- Agregar lentamente **0,4 mL** de muestra (diluída o no). Agitar en vortex.
- Colocar los tubos en baño maría a 100°C por 10 minutos exáctos, y luego enfriar en agua hielo.
- Añadir 40 μ L de MHDP en los tubos "muestras" y 40 μ L de NaOH 0,5% para los tubos "blanco". Agitar en vortex.
- Leer la absorbancia a 520 nm exáctamente 10 minutos después de haber agregado el MHDP.

C - Modo operativo utilizado para verificar la licuefacción enzimática de la pared celular de la mora:

- Se tomaron 600 μ L del sobrenadante resultante de la hidrólisis de la MIAA de mora y se llevaron a 2mL con agua destilada (ver 8.1.25).
- Del tubo anterior se tomaron 150 μ L de muestra y se colocaron en un tubo de ensayo (por triplicado para cada enzima y cada concentración a evaluar).
- Los blancos se prepararon con 150 μ L de agua.
- Se colocó 250 μ L de agua destilada en cada tubo conteniendo la muestra o los blancos. Triplicado.
- Se introdujeron 2,4 mL de BORAX en cada tubo de ensayo lentamente, mientras los tubos permanecieron en un baño de agua hielo. Cuando estuvieron fríos se agitaron en vortex.
- Posteriormente los tubos fueron colocados en baño María a 100°C por 10 minutos exáctos, y luego enfriar en agua hielo.
- Se añadieron 40 μ L de MHDP en los tubos "muestras" y 40 μ L de NaOH 0,5% para los tubos "blanco". Agitar en vortex.
- Se leyó la absorbancia a 520 nm exáctamente 10 minutos después de haber agregado el MHDP.

E-Construcción de la curva patrón:

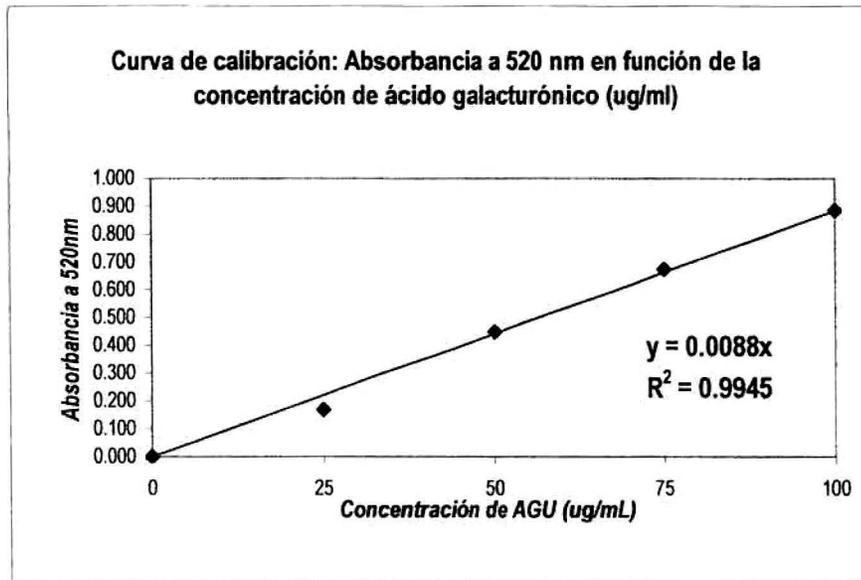
- Preparar una **solución madre**⁸ de ácido galacturónico monohidratado a **1000 μ g/mL (1000 ppm)**: pesar 100 mg de ácido galacturónico en un balón aforado de 100 mL, completar con agua destilada.
- La curva patrón se prepara con ácido galacturónico entre 0-100 μ g/mL (de 0 - 100 ppm).

Todos los tubos (de 10mL) deben ser tratados según el modo operativo descrito en el punto 4⁹.

Concentración de AGU μg/mL o ppm	Volúmen de AGU (μL) o Sol. Madre	Volumen de agua destilada (μL)	Absbancia a 520 nm.
0	0	400	0
25	10	390	0.169
50	20	380	0.448
75	30	370	0.674
100	40	360	0.885

⁸ La solución madre se puede guardar a -20 °C.

⁹ Recordar que el agregado de NaOH o MHDP se realiza de manera exactamente cronometrada, una serie a la vez y con un minuto exacto de diferencia entre cada tubo, **se espera exactamente 10 minutos desde el primer tubo de la serie** y se leen las absorbancias, primero la de los blancos y luego la de los patrones a 520 nm.



Cálculos:

$$\% \text{ AGU} = \frac{[(\text{Abs. M} - \text{Abs. B}) \times \text{factor de dilución} \times 0,9]}{(\text{Pendiente de la curva} \times \text{peso de la muestra} \times 1000)} \times 100$$

- **% AGU:** % de ácido galacturónico en relación a la masa de extracto testeado.
- **Abs M:** Absorbancia del tubo "muestra" a 520 nm.
- **Abs B:** Absorbancia del tubo "Blanco" sin enzima a 520 nm.
- **0,9=** % AGU en una molécula de AGU hidratado y se calcula como el peso molecular de AGU deshidratado/ peso molecular del AGU monohidratado.

$$\begin{aligned} \text{PM AGU hidratado} &= 212,2 \text{ g/mol} \\ \text{PM H}_2\text{O} &= 18 \text{ g/mol} \\ \mathbf{0,9} &= \mathbf{(212,2 - 18) / 212,2} \end{aligned}$$

- **Pendiente de la curva:** ver punto 5 (mL/μg)
- **Peso de la muestra (mg).**

Recordar la resta de los "blancos químicos" por cada preparado comercial y concentración utilizados en la hidrólisis enzimática de la pared (8.1.25)

Los resultados fueron expresados como g AGU/100g de MIAA.

8.1.27 Determinación de azúcares totales por el Método de Antrona

La determinación de azúcares totales para verificar la efectividad de los tratamientos enzimáticos se realizó siguiendo el método reportado por Dubois (1956).

Por este método se realiza una hidrólisis de los polisacáridos en medio ácido en caliente. La antrona reacciona con las hexosas y las aldopentosas para dar un complejo de color azul-verdoso, presentando un máximo de absorbancia a 625 nm. En ausencia de azúcares neutros, el medio cambia a amarillo, que es el color de la antrona. Es un método muy sensible, que permite determinar concentraciones en azúcares totales de 0 a 50 mg/L. Teniendo en cuenta la gran sensibilidad del método es necesario efectuar diluciones en la muestra a analizar.

A- Reactivos:

- **Reactivo de Antrona al 0,2% en H₂SO₄**
(0,2 g de Antrona [SIGMA (A-1631)] en 100 mL de H₂SO₄)
Esta preparación se realiza al momento de utilizarla y se debe de proteger de la luz.
- **Glucosa D (+) SIGMA G-7528 (patrón)**
(preparación de una solución madre de 50 µg/mL.)

B- Aplicaciones del método de Antrona:

- ***Para la verificación de la ausencia de azúcares neutros de las muestras de MIA luego de varios lavados con etanol al 80% (test colorimétrico- análisis cualitativo).***

El modo de operación utilizado es análogo al descrito en la sección 4 con la excepción de la evaluación de azúcares neutros en las muestras que es visual. Los tubos que quedan amarillos luego del tratamiento térmico contienen poco o no contienen azúcares neutros.

- ***Para la estimación de la concentración de azúcares neutros en las muestras que hayan tenido una hidrólisis enzimática (Análisis cuantitativo)***

La estimación de los azúcares neutros se hace a partir de una curva patrón de glucosa que se presenta en el punto F de este protocolo. Y el modo operativo específicamente utilizado con las moras en el punto E.

C- Modo operativo general:

- En un tubo de ensayo por muestra colocar 1,15 mL de agua destilada.
- Agregar 100 μ L de muestra, previamente filtrada en papel Wharman 4 y agitar en vortex.
- Colocar los tubos en baño de agua hielo y añadir 2,5 mL de disolución de Antrona
Tapar los tubos.
- Preparar los blancos con los mismos reactivos exepcto la muestra que se sustituye por un mismo volumen (100 μ L) de agua destilada.
- Agitar todos los tubos en vortex.
- Colocar los tubos en baño a ebullición por **10 minutos exactos**
- Enfriar los tubos en agua – hielo y agitaar en vortex.
- Realizar las lecturas de absorbancia a **625nm**.

D- Modo operativo específicamente utilizado para cuantificar la licuefacción de la MIAA de mora:

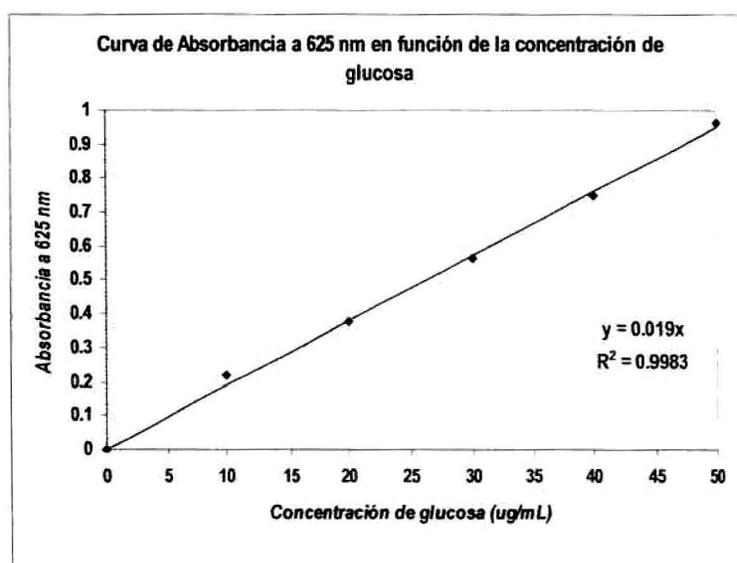
- Se tomaron 600 μ L del sobrenadante resultante de la hidrólisis de la MIAA de mora y se llevaron a 2mL con agua destilada (ver 8.1.25). Este tubo se definió como solución de trabajo.
- En un tubo de ensayo por se colocó 850 μ L de agua destilada (por triplicado para cada preparado comercial y concentración a evaluar).
- Se agregaron 400 μ L de muestra (solución de trabajo)
- Se colocaron los tubos en en baño de agua hielo y se les añadió 2,5 mL de disolución de Antrona . Se taparon los tubos .
- Se prepararon los blancos de con los mismos reactivos exepcto la muestra que se sustituye por un mismo volumen (400 μ L) de agua destilada para realizar el cero del espectrofotómetro.
- Se agitaron los tubos en vortex.
- Se colocaron los tubos en baño a ebullición por **10 minutos exactos**
- Se enfriaron en agua – hielo y agitaar en vortex.
- Se realizaron las lecturas de absorbancia a **625nm**.

F- Construcción de la curva patrón.**Preparación de la solución madre a concentración de 50 μ g/mL:**

- Pesar 0,25 g de glucosa en 50 mL de agua bidestilada
- Tomar 0,25 mL y diluir a 25 mL (la concentración obtenida es de 0,050 mg/ml o 50 μ g/mL o 50 ppm).

Preparar una curva patrón de 0 a 50 mg/mL):

Concentración de glucosa $\mu\text{g/L}$	Volumen de la solución de glucosa diluída (mL)	Volumen de agua destilada (mL)	Absorbancia a (625 nm)
0	0	1,25	0
10	0,25	1,00	0,217
20	0,50	0,75	0,376
30	0,75	0,50	0,562
40	1,00	0,25	0,750
50	1,25	0,00	0,962



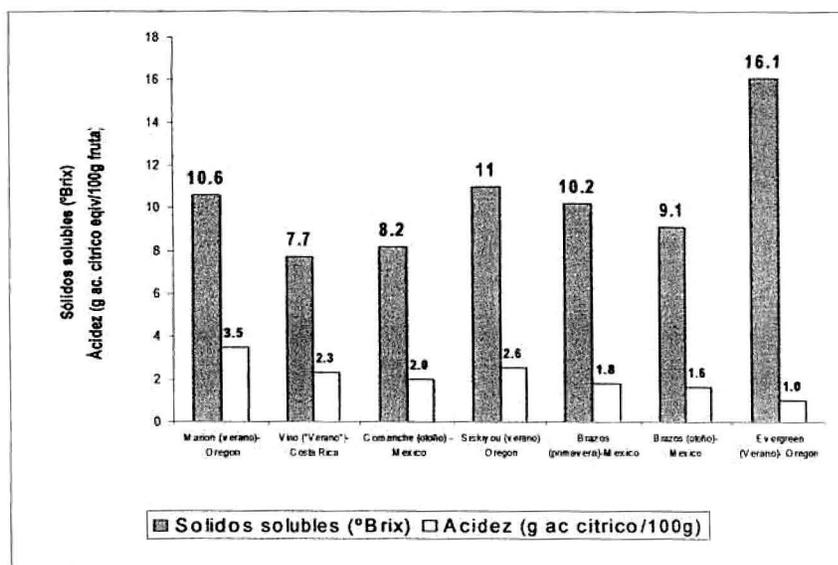
E- Cálculos:

El cálculo de la concentración de azúcares neutros ($\mu\text{g/ mL}$) presentes en la muestra se efectúan interpolando al absorbancia en la curva patrón.

$$\% \text{ AN} = \frac{(\text{Abs. muestra} - \text{Abs. Blanco} / \text{pend.}) \times \text{Factor de dilución} \times \text{Volumen final} \times 100}{\text{masa de la muestra} (\mu\text{g})}$$

Recordar la resta de los "blancos químicos" por cada preparado comercial y concentración utilizados en la hidrólisis enzimática de la pared (8.1.25).

8.2 Comparación de los resultados de caracterización físico-química y de actividad antioxidante de la mora costarricense respecto a otras variedades y especies.



Fuente: Reyes-Carmona *et al.* (2005).

Figura 21 - Comparación del contenido de sólidos solubles y acidez de la mora costarricense vs otras variedades al estado maduro.

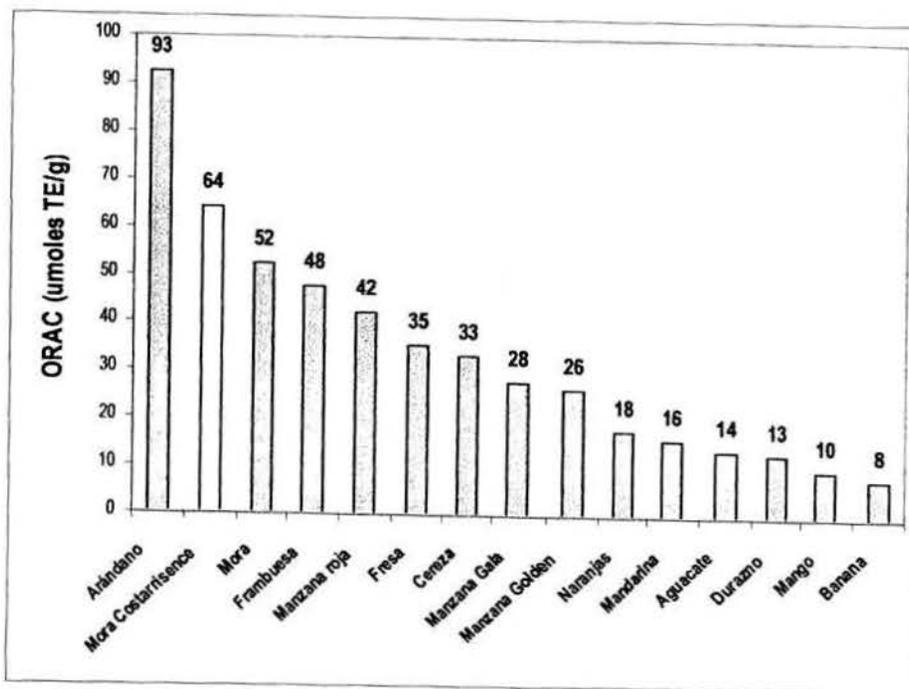
Cuadro 19 – Comparación del contenido y capacidad antioxidante de la mora costarricense vs otras variedades reportadas.¹

Principales variedades utilizadas	Polifenoles totales (mg/100g) ²	Antocianinas totales (mg/100g) ³	Capacidad Antioxidante (µmoles de TE/g)	Autor
Chester, Hull y Triple Crown	226	153,3	28,2	Wang & Lin., (2000)
Cherokee, Chester, Marion, Triple Crown.	275 a 678	80 a 230	33 a 78	Moyer <i>et al.</i> , (2002)
Choctaw, Kiowa	486	116	-----	Sellappan <i>et al.</i> , (2002)
R. fruticosus, R. idaeus	289,3	88,7	-----	Benbenuti <i>et al.</i> , (2004).
Marion, Evergreen	903 a 960	131 a 221	58,5 a 60,9	Siriwoham <i>et al.</i> , (2004)
Marion, Evergreen	822 a 844	151 a 225	34,3 a 35,5	Sirowoham & Wrolstad, (2004)
Diferentes var. y localidades.	-----	70,3 a 201	-----	Fan-Chiang & Wrolstad, (2005)
Mora var. Vino Costarricense	525,0	77,0	64,3	

¹ Valores correspondientes a promedios o rangos en base fresca y para frutos en estado maduro.

² Datos expresados como mg de GAE equivalentes /100g de fruta (método Folin-Ciocalceu).

³ Datos expresados como mg de cianidina 3-glucósido /100g de fruta (método pH diferencial)



Fuente: Wu et al., 2004.

Figura 22 - Capacidad antioxidante (ORAC) de la mora costarricense respecto a otras especies en estado maduro (BH).

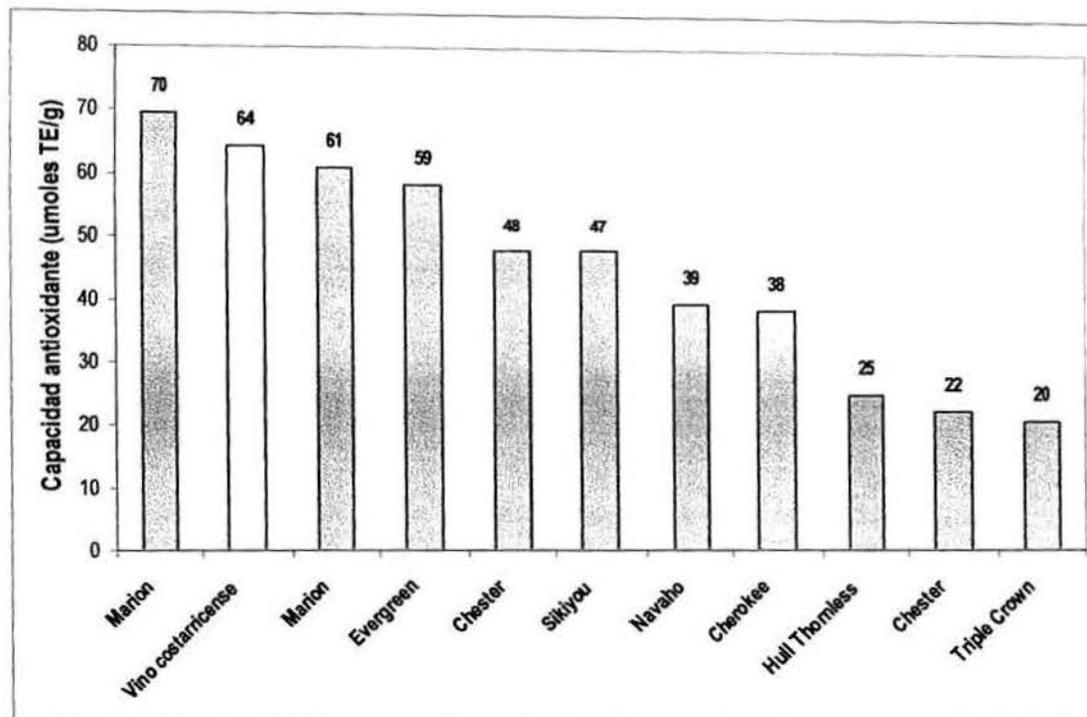


Figura 23 - Capacidad antioxidante (ORAC) de la mora costarricense respecto a otras variedades en estado maduro (BH).

8.3 Actividades enzimáticas de los preparados comerciales¹

Preparado comercial	Actividad enzimática de las enzimas (UI/mL)				
	Pectinliasa	Poligalacturonasa	Pectinesterasa	Endocelulasa	Exocelulasa
Klerzyme 150®	344	866	409	112	4
Clarex citrus 12XL®	317	549	350	112	36
Rapidase Vegetable Juice®	188	369	433	124	10

¹ Información suministrada por el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias- Quito-Ecuador.