



CARTA DE AUTORIZACIÓN

CÓDIGO

AP-BIB-FO-06

VERSIÓN

1

VIGENCIA

2014

PÁGINA

1 de 1

Neiva, 19 de mayo 2021

Señores

CENTRO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN

UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA

Ciudad

El (Los) suscrito(s):

Paola Andrea García Rincón, con C.C. No. 52.709.998 de Bogotá,

Autor(es) de la tesis y/o trabajo de grado o \_\_\_\_\_

Titulado Desarrollo de un cremogenado de copoazú adicionado con probiótico y prebiótico presentado y aprobado en el año 2021 como requisito para optar al título de Doctor en Agroindustria y Desarrollo Agrícola Sostenible;

Autorizo (amos) al CENTRO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN de la Universidad Surcolombiana para que, con fines académicos, muestre al país y el exterior la producción intelectual de la Universidad Surcolombiana, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera:

- Los usuarios puedan consultar el contenido de este trabajo de grado en los sitios web que administra la Universidad, en bases de datos, repositorio digital, catálogos y en otros sitios web, redes y sistemas de información nacionales e internacionales “open access” y en las redes de información con las cuales tenga convenio la Institución.
- Permita la consulta, la reproducción y préstamo a los usuarios interesados en el contenido de este trabajo, para todos los usos que tengan finalidad académica, ya sea en formato Cd-Rom o digital desde internet, intranet, etc., y en general para cualquier formato conocido o por conocer, dentro de los términos establecidos en la Ley 23 de 1982, Ley 44 de 1993, Decisión Andina 351 de 1993, Decreto 460 de 1995 y demás normas generales sobre la materia.
- Continúo conservando los correspondientes derechos sin modificación o restricción alguna; puesto que, de acuerdo con la legislación colombiana aplicable, el presente es un acuerdo jurídico que en ningún caso conlleva la enajenación del derecho de autor y sus conexos.

De conformidad con lo establecido en el artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, “Los derechos morales sobre el trabajo son propiedad de los autores”, los cuales son irrenunciables, imprescriptibles, inembargables e inalienables.

EL AUTOR/ESTUDIANTE:

Firma:

PAOLA ANDREA GARCÍA RINCÓN

Vigilada Mineducación



TÍTULO COMPLETO DEL TRABAJO: DESARROLLO DE UN CREMOGENADO DE COPOAZÚ ADICIONADO CON PROBIÓTICO Y PREBIÓTICO

**AUTOR O AUTORES:**

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre
García Rincón	Paola Andrea

**DIRECTOR Y CODIRECTOR TESIS:**

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre
Amorocho Cruz Gutiérrez Guzmán	Claudia Milena Nelson

**ASESOR (ES):**

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre

**PARA OPTAR AL TÍTULO DE: DOCTOR EN AGROINDUSTRIA Y DESARROLLO AGRÍCOLA SOSTENIBLE**

**FACULTAD: INGENIERIA**

**PROGRAMA O POSGRADO: DOCTORADO EN AGROINDUSTRIA Y DESARROLLO AGRÍCOLA SOSTENIBLE**

**CIUDAD: Neiva**

**AÑO DE PRESENTACIÓN: 2021**

**NÚMERO DE PÁGINAS: 192**

**TIPO DE ILUSTRACIONES (Marcar con una X):**



Diagramas \_\_\_ Fotografías x Grabaciones en discos \_\_\_ Ilustraciones en general \_\_\_ Grabados \_\_\_ Láminas \_\_\_  
Litografías \_\_\_ Mapas \_\_\_ Música impresa \_\_\_ Planos \_\_\_ Retratos \_\_\_ Sin ilustraciones \_\_\_ Tablas o  
Cuadros x

**SOFTWARE** requerido y/o especializado para la lectura del documento:

**MATERIAL ANEXO:**

**PREMIO O DISTINCIÓN** (*En caso de ser LAUREADAS o Meritoria*):

**PALABRAS CLAVES EN ESPAÑOL E INGLÉS:**

<u>Español</u>	<u>Inglés</u>	<u>Español</u>	<u>Inglés</u>
1. <u>Alimentos funcionales</u>	<u>Funcional foods</u>	6. _____	_____
2. <u>Probiótico</u>	<u>probiotic</u>	7. _____	_____
3. <u>Cremogenados</u>	<u>cremogenates</u>	8. _____	_____
4. <u>Calidad</u>	<u>quality</u>	9. _____	_____
5. <u>Diseño de mezcla</u>	<u>mix desig</u>	10. _____	_____

**RESUMEN DEL CONTENIDO:** (Máximo 250 palabras)

La industria hortofrutícola ha avanzado en el mundo, igualmente el auge de los productos desarrollados a partir de frutas y hortalizas sin conservantes; ha aumentado los estándares hacia los alimentos más saludables, con mayores nutrientes con beneficios sistemáticos y sin conservantes o componentes químicos; el copoazú es un fruto con alto contenido de compuestos activos, producido en la Amazonia, su cadena productiva tiene el propósito de generar nuevos productos a base de este con valor agregado y que cumpla los estándares del consumidor basados en la seguridad alimentaria. El objetivo de esta tesis fue desarrollar un cremogenado a base de Copoazú (*Theobroma grandiflorum*) con adición de probiótico y prebiótico. Se utilizó la metodología de superficie de respuesta, con un diseño central compuesto, cara centrada ( $\alpha=1$ ) (20 experimentos), variables independientes (inulina, biomasa, tiempo de homogenización) y las variables dependientes actividad de agua ( $a_w$ ), humedad ( $X_w$ ), pH, sólidos solubles, potencial Z (ZP), tamaño de partícula ( $D_{10}$ ,  $D_{50}$ ,  $D_{90}$ ), viscosidad ( $\mu$ ) y Log UFC/g; para posterior evaluación de la estabilidad del cremogenado a base de copoazú con inserción de probiótico durante el almacenamiento (temperatura:  $6\pm 2^\circ\text{C}$ , tiempo = 0, 1,2,3,4,5, Y 6 meses, se evaluaron las variables



dependientes actividad de agua ( $a_w$ ), humedad ( $X_w$ ), °Brix, pH, acidez, potencial zeta ( $\zeta$ ), tamaño de partícula ( $D_{10}$ ,  $D_{50}$  y  $D_{90}$ ), viscosidad ( $\mu$ ), y análisis de infrarrojo.

Para las pulpas se observó una tendencia positiva general con respecto a la contaminación microbiana de muestras con *Salmonella* y *Listeria*, no se detectaron en las muestras evaluadas, además el recuento de aerobios mesófilos totales se encontraron debajo del límite de referencia. La aparición de coliformes totales apesar de estar dentro del límite destacó la necesidad de una acción correctiva. Los resultados de las pulpas frescas analizadas mostraron que en general los recuentos más altos se asocian a las materias primas sin tratamiento, así mismo los recuentos más bajos se asociaron a las pulpas congeladas con tratamiento. En la evaluación de estabilidad del producto vs tiempo mostraron resultados favorables para un producto durante tres meses para dos tratamientos planteados.

**ABSTRACT:** (Máximo 250 palabras)

The fruit and vegetable industry has advanced in the world, likewise the rise of products developed from fruits and vegetables without preservatives; it has raised the standards towards healthier foods, with higher nutrients with systematic benefits and without preservatives or chemical components; copoazú is a Amazon fruit with a high content of active compounds, its production chain has the purpose of generating new products based on this with added value and that meets consumer standards based on food safety. The objective of this thesis was to develop a cream based on copoazú (*Theobroma grandiflorum*) with the addition of probiotic and prebiotic. The response surface methodology was used with a central compound design, centered face ( $\alpha=1$ ) (20 experiments), independent variables (inulina 2-4%), biomass (2-2,5%), homogenization time (5 – 10 minutes)) and the dependent variables, water activity ( $a_w$ ), humidity ( $X_w$ ), pH, soluble solids, Z potential (ZP), particle size ( $D_{10}$ ,  $D_{50}$ ,  $D_{90}$ ), viscosity ( $\mu$ ), and log CFU/ g; for subsequent evaluation of the stability of the copoazú-based creamogenate with probiotic and prebiotic insertion during storage (temperature:  $6 \pm 2^\circ \text{C}$ , time= 0,1,2,3,4,5 and 6 months, the dependent variables and infrared analysis.

For the pulps, a general positive trend was observed with respect to the microbial contamination of samples with *Salmonella* and *Listeria*, they were not detected in the evaluated samples, in addition the total mesophilic aerobic count was below the reference limit. The appearance of total coliforms despite being within the limit highlighted the need for corrective action. The results of the fresh pulps analyzed showed that in general the highest counts are associated with raw materials without treatment, likewise the lowest counts were associated with frozen pulps with treatment. The experimental optimization provided the following results in two different analyzes, the interaction of the factors with the dependent variable Log CFU/ g of probiotic growth and the factors with the dependent



variables; the first optimization was Biomass 2%, inulin 4%, and homogenization time 5 minutes, and the second Biomass 2%, inulin 4% and homogenization time 10 minutes, reliable models with a low difference between the theoretical value and the experimental value. In the evaluation of product stability vs time, they showed favorable results for a product during three months for two proposed treatments; likewise, the viability of the probiotic was evaluated over time and the respective sensory analysis, conferring the product the category of acceptable in storage for three months.

The analysis of this study allowed a more conscious look to support the production of native fruits with quality, and focus on improvements and emerging critical problems. The cremogenated product produced, in addition to being an alternative and agro industrial development, strengthens the productive chains of the Amazon region and even of Colombia regarding the food matrix.

#### APROBACION DE LA TESIS

**Nombre Presidente Jurado:** Misael Cortes Rodríguez

Firma:

**Nombre Jurado:** Jhon Fredy Castañeda Gómez

---

FIRMA DEL JURADO

Firma:



DESCRIPCIÓN DE LA TESIS Y/O TRABAJOS DE GRADO

<b>CÓDIGO</b>	<b>AP-BIB-FO-07</b>	<b>VERSIÓN</b>	<b>1</b>	<b>VIGENCIA</b>	<b>2014</b>	<b>PÁGINA</b>	<b>5 de 5</b>
---------------	---------------------	----------------	----------	-----------------	-------------	---------------	---------------

Nombre Jurado: José Rodolfo Velázquez Martínez

Firma: \_\_\_\_\_

**UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA**

**FACULTAD DE INGENIERIA**

**DESARROLLO DE UN CREMOGENADO DE COPOAZÚ ADICIONADO CON  
PROBIÓTICO Y PREBIÓTICO**



**TESIS DOCTORAL**

Presentado por:

**Paola Andrea García Rincón**

Dirigida por:

Dra. Claudia Milena Amorocho Cruz

Dr. Nelson Gutiérrez Guzmán

Florencia, Caquetá – Mayo 2020

**DESARROLLO DE UN CREMOGENADO DE COPOAZÚ ADICIONADO CON  
PROBIÓTICO Y PREBIÓTICO**

**PAOLA ANDREA GARCÍA RINCÓN**

Trabajo de investigación como requisito parcial para optar al título de Doctor en  
Agroindustria y Desarrollo Agrícola Sostenible

Dirigido por:

**Claudia Milena Amorocho Cruz, D.E.A, PhD.**

**Nelson Gutiérrez Guzmán, MSc, PhD.**

Grupos de investigación: Agroindustria-USCO (Universidad Surcolombiana)

Biotecnología y Control de Calidad de Alimentos (Uniamazonia)

**UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA  
FACULTAD DE INGENIERIA  
DOCTORADO EN AGROINDUSTRIA Y DESARROLLO AGRÍCOLA SOSTENIBLE  
2020**

Nota de Aceptación

---

---

---

---

Presidente del Jurado

---

Jurado

---

Jurado

Florencia, Caquetá, Mayo 2020

**Dedicatoria**

A Dios y la Virgen quienes son mi fortaleza en mi interior.

*Este trabajo fue realizado mediante muchas situaciones diferentes en mi vida, que la verdad nunca pensé tener que afrontar y era tan fácil como decir no más, desde el cambio de temas, hasta la motivación para escribir; el amor a mis hijos y a mis padres son mis cimientos como persona, escogí la vida académica y a ella vivir la vida junto a los proyectos de investigación que amo trabajar desde mi pregrado por lo que le doy gracias a Dios por darme unos padres luchadores y darme el estudio que siempre he querido, hoy por hoy termino mi trabajo y doy gracias por la vida, por mi familia, mi hermano, mis padres, mamá, papá y mis hijos, los amo con el corazón. Gracias por aguantar, gracias por presionarme.*

*Ser feliz es reflejar amor a los que amo.  
Gracias Dios por este logro*

## AGRADECIMIENTOS

A mis directores que ocupan un lugar especial en mi ser profesional y como persona, mil gracias por enseñarme la paciencia y la seguridad de su respaldo. Al doctor Nelson, gracias por hacerme parte de la familia CESURCAFE, quién me enseñó que lo que te propongas se puede lograr, gracias por darme esa seguridad que irradian; a la doctora Claudia, un ser muy especial, ser de luz espiritual, quien quiero mucho, es una persona amigable, muy responsable, que me enseñó que la paciencia indica dar y cumplir sin ser exagerados, muchas gracias por todo tu conocimiento y hacerme sentir parte importante de tu trabajo y de tu entorno, representación de la belleza e inteligencia de una mujer capaz y luchadora.

Gracias a mi familia a quien dedico este trabajo y más que esto todas las actividades que realizo. Mi padre mi fuerza, mi madre mi corazón y mi amiga incondicional, mi hermano mi amor eterno, mis nenes y mis sobrinos la ternura hecha vida.

Gracias Profe Wilson, nunca he conocido una persona más inteligente, espero seguir trabajando y aprender que la lealtad no es necesario estar todos los días al lado, y que este sentimiento se evidencia hasta en el quehacer mínimo. A mi queridísima doctora Andrea Hermosa, gracias por tu ayuda, por tus enseñanzas de tranquilidad y tu direccionamiento. Dios los bendiga.

A mis hijos son mis tesoros, gracias por la paciencia por las noches que no estuvieron conmigo, por entender que mi trabajo es nuestro sustento, y seguir adelante es seguir siendo feliz al lado de Dios.

A todo mi grupo de investigación porque son parte fundamental de mi tesis, Andrea, Jorge, Andrés, Juan David, Erika, Marcela, Ricardo, Oriana, Manuel, todos todos.

A Leidy Laura le agradezco por su apoyo desde que nos conocimos una niña, que busca salir adelante, adorable y convencida de su lucha. Un placer conocerte.

Y a todo el equipo de trabajo de CESURCAFE, especialmente a Erika Cortes quien fue una amiga incondicional en mi pasantía internacional.

Es innegable toda la ayuda del equipo Uniamazonia, te hace sentir parte de un equipo, a mi querida coordinadora de programa Delia Magaly quien es mi amiga desde el cole, gracias por tu confianza y confiar en mi buen trabajo.

Gracias a mis amigas personales que son como mis hermanas Luz Stella y Mónica.

Gracias a mi querido Tío padrino, en quien confío plenamente, y me hace sentir segura de mis capacidades.

Gracias Vida.

*'Que nuestro alimento sea  
nuestra medicina;  
Que nuestra medicina  
sea nuestro alimento'*  
**Hipócrates , 500 a.c.**

## Contenido

LISTA DE TABLAS.....	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xiv
LISTA DE ANEXOS.....	xvii
RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	3
INTRODUCCIÓN .....	5
OBJETIVOS .....	8
Objetivo general.....	8
Objetivos específicos.....	8
CAPITULO I.....	9
1 <i>Theobroma</i> spp IMPORTANCIA EN LA AGROINDUSTRIA.....	9
1.1 ANTECEDENTES .....	9
1.2 Características taxonómicas y propagación del <i>Theobroma grandiflorum</i> .....	10
1.3 Composición fisicoquímica .....	12
1.4 Distribución y cosecha.....	12
1.5 Usos generales y agroindustriales .....	12
1.6 Otros estudios y usos agroindustriales .....	13
2 ALIMENTOS FUNCIONALES.....	15
2.1 ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL.....	15
2.2 Conceptos de ALIMENTOS FUNCIONALES.....	19
2.3 PROBIÓTICOS.....	20
2.3.1 Consideraciones para un probiótico .....	21
2.3.2 Mecanismo de acción en la Probiosis.....	23

2.4 PREBIÓTICOS .....	32
2.4.1 Propiedades de un prebiótico .....	33
2.4.2 Mecanismo de acción en la prebiosis .....	35
2.5 COMPONENTES IMPORTANTES EN LOS ALIMENTOS FUNCIONALES.....	35
2.5.1 Fibra dietética.....	35
2.5.2. Antioxidantes.....	36
2.5.3 Aceites, acidos grasos y fosfolípidos .....	38
2.6 UTILIDAD DE LOS ALIMENTOS FUNCIONALES EN PATOLOGÍAS HUMANAS .....	38
2.6.1 Relación inmunológica con los probióticos. ....	39
3 CREMOGENADOS .....	40
3.1 LOS ALIMENTOS CREMOGENADOS EN EL CONTEXTO COLOIDAL.....	40
3.2. FUERZAS RESPONSABLES DE LA ESTABILIDAD COLOIDAL.....	43
3.2.1 Ingredientes de importancia tecnológica en la estabilidad coloidal .....	44
3.3 PROPIEDADES DE LOS SISTEMAS COLOIDALES .....	48
Tamaño de partícula. ....	48
Potencial Z.....	49
Reología en sistemas coloidales. ....	50
Análisis por espectroscopia.....	52
4 ANÁLISIS SENSORIAL.....	53
4.1 Ensayos de evaluación sensorial .....	54
4.2 PRUEBAS SUBJETIVAS O AFECTIVAS.....	55
Prueba de aceptación .....	55
Prueba de preferencia.....	56
4.3 PRUEBA ANALITICA: Discriminación.....	58
4.4 PRUEBA ANALITICA: Descriptivas.....	58

4.5 ANÁLISIS SENSORIAL MEDIANTE ATRIBUTOS.....	59
4.6 ESQUEMA DE EVALUACION SENSORIAL- ATRIBUTOS A EVALUAR – PERFILES DE LOS PANELISTAS – DISEÑO ESTADÍSTICO .....	62
5 NORMATIVIDAD .....	65
EDULCORANTES.....	72
CREMOGENADO .....	73
CAPITULO I.....	76
BIBLIOGRAFIA .....	76
CAPITULO II.....	89
EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS Y MICROBIOLÓGICAS DE PULPA DE COPOAZÚ .....	89
INTRODUCCIÓN .....	89
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	91
Área de estudio.....	91
2.1 Muestras .....	91
2.2 Contenido de humedad y actividad del agua .....	92
2.3 Acidez titulable y mediciones de pH .....	92
2.4 Índice de refracción.....	92
2.5 Lípidos totales.....	92
2.6 Proteína bruta.....	93
2.7 Mediciones ATR-FTIR.....	93
2.8 Control de Calidad microbiológica de la pulpa.....	93
2.9 Análisis estadístico .....	95
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	95
4. CONCLUSIÓN .....	102
CAPITULO II.....	103

BIBLIOGRAFIA .....	103
CAPITULO III.....	109
OPTIMIZACIÓN EXPERIMENTAL DE LA FORMULACIÓN Y EL PROCESO DE OBTENCIÓN DE UN CREMOGENADO DE COPOAZÚ ADICIONADO CON PROBIÓTICO Y PREBIÓTICO .....	109
INTRODUCCIÓN .....	109
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	111
Sitio de estudio.....	111
2.1 Materiales.....	111
2.2 Elaboración y formulación del cremogenado .....	111
2.3. Diseño experimental del Cremogenado.....	112
2.4 Caracterización del cremogenado. ....	112
2.5 Análisis estadístico.....	113
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	113
Diseño de formulaciones del cremogenado. ....	113
Optimización del cremogenado de copoazú con adición de probiótico y prebiótico.....	123
4. CONCLUSIONES .....	124
BIBLIOGRAFIA .....	125
CAPITULO III.....	125
CAPITULO IV .....	129
ESTABILIDAD DE UN CREMOGENADO A BASE DE COPOAZÚ Y VIABILIDAD DEL PROBIÓTICO INSERTADO EN EL PRODUCTO DESARROLLADO DURANTE EL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO.....	129
INTRODUCCIÓN .....	129
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	130
2.1 Recolección de frutos y pulpa.....	130
2.2 Preparación del cremogenado.....	131

2.3 Almacenamiento.....	131
2.4 Caracterización del cremogenado. ....	131
2.4.1 Propiedades de estabilidad. ....	132
2.4.2 Características de viscosidad. ....	132
2.4.3 Evaluación del contenido total de compuestos fenólicos, flavonoides y Vitamina C. ....	132
Determinación de fenoles totales .....	132
2.4.4 Determinación de la capacidad antioxidante por métodos hidrófilicos, ABTS, DPPH. ....	133
2.4.5 Espectroscopia FT-IR.....	134
2.4.6 Viabilidad del <i>L.casei</i> ATCC 393. ....	134
2.4.7 Control de Calidad microbiológica del cremogenado a base de Copoazú con probiótico. ....	135
2.4.8 Análisis sensorial.....	136
2.8 Análisis estadístico.....	136
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	137
3.5 Análisis de espectroscopia FT-IR .....	147
3. 6 Viabilidad del <i>L.casei</i> ATCC 393 .....	154
CONCLUSIÓN .....	165
BIBLIOGRAFÍA .....	167
CAPITULO IV .....	167

## LISTA DE TABLAS

<b>CAPITULO I</b>		Pág
Tabla 1	Atributos sensoriales evaluados .....	62
Tabla 2	Evaluación cualitativa según calificación de las formulaciones del producto a desarrollar .....	63
<b>CAPITULO II</b>		Pág
Tabla 1	Muestras de Copoazú de diferentes áreas de cultivo en la región de Caquetá en Colombia .....	91
Tabla 2	Parámetros fisicoquímicos de muestras de pulpa de Copoazú de diferentes áreas de cultivo. ....	98
Tabla 3	Caracterización microbiológica de la Pulpa de copoazú .....	99
Tabla 4	Caracterización microbiológica de la Pulpa de copoazú pasteurizada, congelada .....	99
Tabla 5	Análisis de presencia o ausencia de <i>Listeria</i> spp y <i>Salmonella</i> spp como indicador de contaminación. ....	100
<b>CAPITULO III</b>		Pág
Tabla 1	Diseño de elaboración del cremogenado a base de Copoazú con adición de probiótico .....	113
Tabla 2	Resultados del diseño experimental con las variables dependientes .....	119
Tabla 3	Efecto estadístico de las variables dependientes en función con los factores. ....	120
Tabla 4	Resultados de optimización y experimentales del cremogenado a base de copoazú con adición de probiótico. ....	126
<b>CAPITULO IV</b>		Pág

Tabla 1	Ingredientes de los cremogenados de tratamientos TA y TB	.....131
Tabla 2	ANOVA de los atributos de calidad en el almacenamiento del cremogenado tratamiento A	.....137
Tabla 3	ANOVA de los atributos de calidad en el almacenamiento del cremogenado tratamiento B	.....137
Tabla 4	Señales de mayor absorción observadas en espectro ATR-FTIR de cremogenado a base de copozú con adición de probiótico, tratamiento A mes 4	.....149
Tabla 5	Señales de mayor absorción observadas en espectro ATR-FTIR de cremogenado A (M4)	.....151
Tabla 6	Caracterización microbiológica del cremogenado a base de copozú con inserción de <i>L. casei</i> (Tratamiento A).	.....157
Tabla 7	Caracterización microbiológica del cremogenado a base de Copozú con inserción de <i>L. casei</i> , (Tratamiento B)	.....158
Tabla 8	Presencia o ausencia de <i>Listeria</i> sp como indicador de contaminación de cremogenado con inserción de <i>L.casei</i> TA, TB.	.....160
Tabla 9	Presencia o ausencia de <i>Salmonella</i> spp como indicador de contaminación.	.....160
Tabla 10	Frecuencias relativas por columnas (expresadas como porcentajes)	.....163

## LISTA DE FIGURAS

<b>CAPITULO I</b>		Pág
Figura 1	La microbiota normal y los probióticos interactúan con el organismo anfitrión en actividades metabólicas y funciones inmunes	.....25
Figura 2	Mecanismo de acción ejercida por las bacterias probióticas	.....26
Figura 3	Mecanismo de acción de los prebióticos	.....35
Figura 4	Ilustración de dos mecanismos diferentes (a y b) de formación de la tricapa en una monocapa de hidrofobina sujeta a compresión	.....45
Figura 5	Etapas en la formación de fibrillas de tipo amiloide	.....46
Figura 6	Una gota de aceite estabilizada por proteína y por el conjugado proteína y polisacárido	.....47
Figura 7	Diferencia de potencial como una función de la distancia desde la superficie de una partícula suspendida en un medio de dispersión	.....49
Figura 8	Diagrama de análisis sensorial	.....55
Figura 9	Escala no estructurada con valor máximo de 5	.....61
<b>CAPITULO II</b>		Pág
Figura 1	Promedio medio de espectros ATR-FTIR de muestras de pulpa seca de Copoazú. Color azul (zona 1), color rojo (zona 2), color negro (zona 3).	.....97
Figura 2	Diagrama de dispersion ACP de espectros ATR- FTIR, zona 1 (■), zona 2 (●) and zona 3 (*)	.....98
<b>CAPITULO III</b>		Pág

Figura 1	Volúmenes de respuesta de las variables dependientes en función de las independientes para la optimización de cremogenado a base de copoazú con adición de probiótico	.....119
----------	---	----------

#### CAPITULO IV

Pág

Figura 1	Promedio medio de cenizas, aw, Xw, sólidos solubles (SST) y acidez titulable del cremogenado a base de Copoazú con inserción del probiótico, durante el almacenamiento de $6 \pm 2^{\circ}\text{C}$	.....139
Figura 2	Promedio de los valores de viscosidad ( $\mu$ ), PZ, índice de estabilidad del cremogenado a base de copoazú con inserción del probiótico, durante el almacenamiento de $6 \pm 2^{\circ}\text{C}$ .	.....140
Figura 3	Promedio de los valores de tamaño de partícula ( $D_{10}$ , $D_{50}$ , $D_{90}$ ), flavonoides, fenoles totales, vitamina C, ABTS, DPPH de los tratamientos (A y B) del cremogenado a base de copoazú durante el tiempo de almacenamiento.	.....143
Figura 4	Espectro ATR-FTIR de cremogenado tratamiento A mes 4 (M4). Curva promedio de tres determinaciones	.....149
Figura 5	Espectro ATR-FTIR de cremogenado tratamiento B mes 1 (M1). Curva promedio de tres determinaciones	.....151
Figura 6	Variación mensual de las señales del espectro ATR-FTIR de cremogenado A de copoazú. Cada curva es el promedio de tres determinaciones.	.....152
Figura 7	Variación mensual de las señales del espectro ATR-FTIR de cremogenado B de copoazú. Cada curva es el promedio de tres determinaciones	.....154

Figura 8	Conteo de <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 393 en el tiempo de almacenamiento (6 meses) del cremogenado a base de copoazú	.....155
Figura 9	Análisis de componentes principales del cremogenado con inserción de probiótico.	.....157
Figura 10	Promedio de la aceptación del cremogenado a base de copoazú con <i>L.casei</i> ATCC 393, para los tratamientos (A y B) durante el tiempo de almacenamiento (6 mes)	.....161
Figura 11	Promedios de compra del cremogenado a base de copoazú con <i>L.casei</i> ATCC 393, para TA y TB durante el tiempo de almacenamiento	.....162
Figura 12	Análisis de escala de agrado con género, vs mes del almacenamiento	.....163
Figura 13	Análisis de escala de agrado con género, vs mes del almacenamiento	.....164
Figura 14	Análisis multivariado sensorial de los dos tratamientos TA y TB, entre mujeres (Fem), hombres (mas) y la escala de agrado durante el tiempo de almacenamiento 6 meses	.....164

## LISTA DE ANEXOS

	Pág
ANEXO I. Formato de toma de datos análisis sensorial.	.....178

## RESUMEN

La industria hortofrutícola ha avanzado en Colombia y en el mundo durante los últimos años, en búsqueda del bienestar del individuo, igualmente el auge de los productos desarrollados a partir de frutas y hortalizas sin conservantes; siendo una oportunidad para las empresas de generar nuevos productos. El cambio del pensamiento de los consumidores hacia lo ingerido, ha aumentado los estándares hacia los alimentos más saludables, con mayores nutrientes con beneficios sistemáticos y sin conservantes o componentes químicos; lo que genera el incremento al desarrollo, el copoazú es un fruto con alto contenido de compuestos activos, producido en la Amazonia, su cadena productiva tiene el propósito de generar nuevos productos a base de este con valor agregado y que cumpla los estándares del consumidor basados en la seguridad alimentaria. El objetivo de esta tesis fue evaluar la calidad microbiológica y fisicoquímica de la pulpa de copoazú fresca y congelado en la zona Amazónica, durante tres meses (Florencia – Caquetá – Colombia), determinar la contaminación microbiana y presencia de bacterias potencialmente patógenos; fueron probados para mesófilos, recuento de mohos y levaduras, recuento *E.coli*, detección de *Salmonella* spp y detección de *Listeria* spp. Así mismo se propuso diseñar y desarrollar un cremogenado a base de Copoazú (*Theobroma grandiflorum*) con adición de probiótico y prebiótico. Se utilizó la metodología de superficie de respuesta con un diseño central compuesto, cara centrada ( $\alpha=1$ ) (20 experimentos), variables independientes (inulina (2-4%), biomasa (2 - 2.5%), tiempo de homogenización (5 - 10 minutos)) y las variables dependientes actividad de agua ( $a_w$ ), humedad ( $X_w$ ), pH, sólidos solubles, potencial Z (ZP), tamaño de partícula ( $D_{10}$ ,  $D_{50}$ ,  $D_{90}$ ), viscosidad ( $\mu$ ) y Log UFC/g; para posterior evaluación de la estabilidad del cremogenado a base de copoazú con inserción de probiótico durante el almacenamiento (temperatura:  $6\pm 2^\circ\text{C}$ , tiempo = 0, 1,2,3,4,5, Y 6 meses, se evaluaron las variables dependientes actividad de agua ( $a_w$ ), humedad ( $X_w$ ), °Brix, pH, acidez, potencial zeta ( $\zeta$ ), tamaño de partícula ( $D_{10}$ ,  $D_{50}$  y  $D_{90}$ ), viscosidad ( $\mu$ ), y análisis de infrarrojo.

Para las pulpas se observó una tendencia positiva general con respecto a la contaminación microbiana de muestras con *Salmonella* y *Listeria*, no se detectaron en las muestras evaluadas, además el recuento de aerobios mesófilos totales se encontraron debajo del límite de referencia. La aparición de coliformes totales apesar de estar dentro del límite destacó la necesidad de una acción correctiva. Los resultados de las pulpas frescas analizadas mostraron que en general los recuentos más altos se asocian a las materias primas sin tratamiento, así mismo los recuentos más bajos se asociaron a las pulpas congeladas con tratamiento. La optimización experimental proporcionó los siguientes resultados en dos análisis diferentes, la interacción de los factores con la variable dependiente Log UFC/g de crecimiento probiótico y los factores con las diez variables dependientes; la primera optimización fue Biomasa de 2%, Inulina 4%, y tiempo de homogenización 5 minutos, y la segunda Biomasa 2%, Inulina 4% y tiempo de homogenización 10 minutos, modelos confiables con una diferencia baja

entre el valor teórico y valor experimental. En la evaluación de estabilidad del producto vs tiempo mostraron resultados favorables para un producto durante tres meses para dos tratamientos planteados; igualmente se evaluó la viabilidad del probiótico durante el tiempo y el análisis sensorial respectivo, confiriendo al producto la categoría de aceptable en el almacenamiento por tres meses.

El análisis de este estudio permitió una mirada más consciente para apoyar la producción de frutos nativos con calidad, y enfocar las mejoras y los problemas críticos emergentes. El producto de cremogenado elaborado además de ser una alternativa y desarrollo agroindustrial, fortalece las cadenas productivas de la región Amazónica e incluso de Colombia al respecto de la matriz alimentaria.

**Palabras clave:** Alimentos funcionales, probiótico, copoazú, *Theobroma grandiflorum*, cremogenados, indicadores microbiológicos de contaminación y de calidad, microbiología de alimentos, diseño de mezcla, superficie respuesta, propiedades físicoquímicas de estabilidad, control de calidad.

## ABSTRACT

The fruit and vegetable industry has advanced in Colombia and in the world in recent years, in search of the well-being of the individual, likewise the rise of products developed from fruits and vegetables without preservatives; being an opportunity for companies to generate new products. The change in consumer thinking towards what is ingested has raised the standards towards healthier foods, with higher nutrients with systematic benefits and without preservatives or chemical components; what generates the increase in development, copoazú is a Amazon fruit with a high content of active compounds, its production chain has the purpose of generating new products based on this with added value and that meets consumer standards based on food safety. The objective of this thesis was to evaluate the microbiological and physicochemical quality of the fresh and frozen copoazú pulp in the Amazon region, for three months (Florencia – Caqueta – Colombia), to determine the microbial contamination and the presence of potentially pathogenic bacteria; were tested for mesophiles, yeast and mold count, E.coli count, detection of *Salmonella* spp and *Listeria* spp. Likewise, it was proposed to design and develop a cream based on copoazú (*Theobroma grandiflorum*) with the addition of probiotic and prebiotic. The response surface methodology was used with a central compound design, centered face ( $\alpha=1$ ) (20 experiments), independent variables (inulina 2-4%), biomass (2-2,5%), homogenization time (5 – 10 minutes)) and the dependent variables, water activity ( $a_w$ ), humidity ( $X_w$ ), pH, soluble solids, Z potential (ZP), particle size ( $D_{10}$ ,  $D_{50}$ ,  $D_{90}$ ), viscosity ( $\mu$ ), and log CFU/ g; for subsequent evaluation of the stability of the copoazú – based creamogenate with probiotic and prebiotic insertion during storage (temperature:  $6 \pm 2^\circ \text{C}$ , time= 0,1,2,3,4,5 and 6 months, the dependent variables and infrared analysis.

For the pulps, a general positive trend was observed with respect to the microbial contamination of samples with *Salmonella* and *Listeria*, they were not detected in the evaluated samples, in addition the total mesophilic aerobic count was below the reference limit. The appearance of total coliforms despite being within the limit highlighted the need for corrective action. The results of the fresh pulps analyzed showed that in general the highest counts are associated with raw materials without treatment, likewise the lowest counts were associated with frozen pulps with treatment. The experimental optimization provided the following results in two different analyzes, the interaction of the factors with the dependent variable Log CFU/ g of probiotic growth and the factors with the ten dependent variables; the first optimization was Biomass 2%, inulin 4%, and homogenization time 5 minutes, and the second Biomass 2%, inulin 4% and homogenization time 10 minutes, reliable models with a low difference between the theoretical value and the experimental value. In the evaluation of product stability vs time, they showed favorable results for a product during three months for two proposed treatments; likewise, the viability of the probiotic was evaluated over time and the respective sensory analysis, conferring the product the category of acceptable in storage for three months.

The analysis of this study allowed a more conscious look to support the production of native fruits with quality, and focus on improvements and emerging critical problems. The cremogenated product produced, in addition to being an alternative and agro industrial development, strengthens the productive chains of the Amazon region and even of Colombia regarding the food matrix.

**Keywords:** Funcional foods, probiotic, copoazu, *Theobroma grandiflorum*, cremogenates, microbiological indicators of contamination and quality, mix design, responsive surface, physicochemical stability properties, quality control

## INTRODUCCIÓN

El departamento del Caquetá hace parte de la región Amazónica Colombiana, posee una gran biodiversidad de flora, dentro de las cuales presenta frutos comestibles altamente promisorios; estos pueden constituirse en alternativas agropecuarias de alto impacto socio económico para la región, en la cual predominan factores limitantes, como deficientes sistemas de comercialización, altos costos de insumos, variaciones estacionales de precios en las cosechas e ineficiente manejo de poscosecha de los productos perecederos (Barrera *et al*, 1996). Adicionalmente, es necesario estimular el consumo de fruta en nuestra población, el cual es mínimo (45,8 kg percapita), en comparación a lo recomendado por la FAO (59,8Kg, 400 g/diario percapita) (FAO, 2018).

Una de las especies con mejores características sensoriales de olor y sabor, es el Copoazú, conocido comúnmente como el “*cacao silvestre*”, estas características lo hacen valioso para el autoconsumo, con un gran potencial económico para el desarrollo de agroindustrias regionales (plantas procesadoras), dentro de modelos de explotación agrícola acordes con las condiciones socio económicas y ecológicas de la Amazonía colombiana (Barrera *et al*, 1996).

La Amazonia Colombiana posee una biodiversidad natural reinante propia de la región, ofrece otras especies de cacao, entre las que se encuentran el Copoazú (*T. grandiflorum*), y Maraco (*T. bicolor*), cacaos amazónicos con un alto potencial como materia prima de la industria de los chocolates (Hernández, 2006).

El copoazú es una especie nativa de la Amazonía, un fruto que posee una relación de pulpa y de semillas, de 2 a 1, así que se puede aprovechar la pulpa, caso contrario al cacao (*Theobroma cacao*), el cual sólo se puede aprovechar la semilla. La pulpa del Copoazú es de color blanco, con altos contenidos de fósforo, pectina y contenidos medios de calcio y vitamina C, es aprovechada para la elaboración de sorbetes, néctares, yogures, mermeladas y licores; al igual la semilla puede ser utilizada para la fabricación de varios productos de uso cosmético y producto alimentario como el chocolate (Rojas *et al*, 1996; Criollo *et al*, 2010).

Por otro lado, esta planta de la Familia Malvaceae, perteneciente al género *Theobroma*, ha sido comercializada e industrializada especialmente su semilla para obtener cupulate, el cual es un producto similar al chocolate derivado del cacao (*Theobroma cacao*) con características físicas, químicas y sensoriales muy similares; así el Copoazú ha sido llamado cacao amazónico (SPTB, 1999).

Este fruto amazónico posee algunos beneficios como el aporte de ácidos grasos insaturados y antioxidantes; en el proceso de elaboración de chocolate y de cupulate, se asocian los mismos parámetros, variables y puntos críticos, al igual que la fermentación, secado, tostado, molienda de los granos y molturación, esto se debe en

gran medida a la semejanza botánica y de composición entre el cacao y el copoazú (Nazaré *et al*, 1990; Fedecacao, 2004).

La fermentación en los granos del cacao y copoazú se convierte en el principal proceso de beneficio; durante este proceso cualquier tipo de cambios ocurridos son fundamentales por la presencia de agentes precursores del aroma y sabores típicos que le dan la calidad al producto de cacao (Fedecacao, 2004).

La fermentación de cacao en Colombia, tiene estudios muy profundos, de larga duración, llegando a conclusiones concretas de las condiciones propicias para una óptima fermentación. Por otro lado, el proceso fermentación en el Copoazú, ha generado que los centros de investigaciones amazónicos en los últimos años, junto con universidades, realicen investigaciones en este proceso, sobresaliendo el trabajo de grado realizado por Hernández y León en el 2003, donde se evaluó las etapas de fermentación y secado del proceso de beneficio de semillas de copoazú (*Theobroma grandiflorum* Wild Ex Spreng Schum) a nivel de laboratorio simulando condiciones de la región amazónica. Este trabajo describió tiempos, números de volteos, caracterizaciones físicas y químicas del grano en la fermentación. Es una investigación pionera en generar conocimiento sobre el proceso de beneficio del copoazú y por lo tanto un aporte valioso para la industrialización del grano del cacao amazónico (Criollo *et al*, 2010).

El copoazú por ostentar propiedades sensoriales únicas, al igual que poseer pulpa, puede ser aprovechado como suplemento alimenticio de diferentes tipos como por ejemplo la elaboración de cremogenados, estos a su vez son productos generados de la transformación de las frutas frescas, producto no fermentado que se obtienen por molturación, tamizado o ultrahomogenización de la parte comestible, sin eliminar la fracción acuosa que constituye el zumo (Heldman, 2003; Bonat, 2016).

La generación de matrices a base de copoazú como helados, jugos, néctares, mermeladas, puede ser considerada como un desarrollo tecnológico importante para la Amazonía, puesto que se logra en el procesado, el mantenimiento de las características nutricionales y sensoriales iniciales de las frutas de origen, reduciendo costos y volumen de almacenamiento (Salamanca *et al*, 2008; Reyes *et al*, 2007); siendo la elaboración de un nuevo producto a base de esta materia prima. El objetivo de este trabajo es el desarrollo de un cremogenado a base de copoazú, teniendo en cuenta características de calidad microbiológica y físicas en el procesado; el copoazú al tener en su composición ácidos orgánicos y antioxidantes lo hacen un alimento funcional, al adicionar un probiótico se está ampliando sus características funcionales en quien lo consume. Lo anterior debido a la importancia de la elaboración y de la generación de desarrollo de nuevos productos a base de materias primas de la región con potencial funcional, que puedan prevenir y mejorar enfermedades o el estado de salud y

conociendo que los esfuerzos de los probióticos se ha fundamentado en el sector lácteo el desarrollo de un producto funcional a base de fruta abrirá la mente del desarrollo de nuevas tecnologías en el sector hortifructícola.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

Desarrollar un cremogenado de copoazú (*Theobroma grandiflorum*) adicionado con probiótico y prebiótico.

### Objetivos específicos

- Caracterizar las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas de la pulpa de copoazú.
- Optimizar experimentalmente la formulación y el proceso de obtención de un cremogenado de copoazú adicionado con probiótico y prebióticos.
- Determinar la estabilidad fisicoquímica del cremogenado con probiótico y prebiótico durante el almacenamiento.

## CAPITULO I

### 1 *Theobroma* spp IMPORTANCIA EN LA AGROINDUSTRIA

#### 1.1 ANTECEDENTES

El género *Theobroma* es tropical, distribuido a través del hemisferio entre 18°N y 15°S, palabra derivada del griego Theo: Dios y Broma: Alimento, es decir, alimento de dioses (Rusconi, 2010; Batista, 2009). Se han descrito 22 especies, dentro de las cuales se encuentra la más utilizada en la industria chocolatera *Theobroma cacao*, de las 22 especies doce han sido descritas y de estas 9 son nativas de la Amazonia. Este género tiene un alto potencial económico en la región Amazónica y uso sostenible para beneficio del mundo. Dentro de las especies nativas se encuentra el *Theobroma grandiflorum* (Copoazú), que se destaca por su pulpa aromática y cremosa, *Theobroma bicolor* (Maraco), y *Theobroma subincanum* (Macambillo) (Cardona, 2013; Sterling, 2014).

Estas especies son consideradas promisorias porque todas las partes de su fruta tienen diferentes potenciales de uso llamativos, entre la industria cosmética y alimentaria (Cardona, 2013). La mayoría de los árboles son medianos y se encuentran en suelos relativamente fértiles, sus hojas son oblongas con peciolo cortos (Sterling, 2014).

En cuanto al *Theobroma grandiflorum* su nombre significa “Flores Grandes” (Hernández, 2010), el cual es el más usado comercialmente después del cacao; tiene algunos carbohidratos de alto peso molecular como homogalacturano que representa 2% de la pulpa seca y almidón con alto contenido de amilosa que representa 13% de pulpa seca desgrasada con un 71 % de amilosa (Souza, 1999; Cardona, 2013).

En Colombia, las investigaciones en *Theobroma* se han incrementado desde el año 2010. En el departamento del Caquetá, en la zona de San José del Guaviare se han realizado ensayos agronómicos con cacao tradicional y copoazú y se han elaborado estudios de mercadeo del fruto. Igualmente, en el departamento del Guaviare, se han realizado estudios en el crecimiento y cosecha de este fruto (Hernández, 2012). La Universidad Nacional ha reportado en su gran mayoría estudios referentes al procesamiento tanto de la fruta como de la semilla; por otro lado, la Universidad de los Andes ha reportado sobre compuestos volátiles de la pulpa (Hernández, 2010); Brasil se ha enfocado en aspectos como variedad, condiciones ecológicas y prácticas agronómicas; además del cultivo, las operaciones de postcosecha y valor nutritivo del fruto, la caracterización del almidón de la pulpa y las fracciones pécticas en las mismas. Adicionalmente, las características fisicoquímicas de los ácidos grasos extraídos de la semilla y el mejoramiento genético del cultivo; otros países que han sobresalido son Ecuador y Portugal en tecnología de postcosecha (Hernández, 2010; Venturieri, 2011).

Este apartado del presente documento nos permite indagar en uno de los géneros de mayor actividad biotecnológica; se pretende observar desde sus generalidades hasta sus potenciales usos agroindustriales.

## Historia del uso del cacao

Este tema se centra en el origen del estudio de la naturaleza dinámica y autónoma, para este caso el naturalista sueco Linneo, al que le debemos la clasificación de los seres vivos especialmente para nuestro tema tratado, fue quien denominó al árbol o tipo en estudio como el género *Theobroma*, “La comida de los dioses” debido a que los aztecas creían que el árbol del cacao era de origen divino y que su bebida confería discreción y sabiduría (Batista, 2009). La palabra *grandiflorum*, correspondiente a la especie, es de origen tupí y significa “cacao grande” (Hernández, 2010).

El copoazú es considerado un cacao silvestre, los primeros en cultivar cacao fueron los olmecas, estos lo enseñaron a los mayas que lo sembraron en la península de Yucatán y lo vendían a los aztecas, los cuales tostaban y molían sus semillas, haciendo una bebida, que se servía en las ceremonias religiosas, estas bebidas eran condimentadas con ingredientes como flores aromáticas, vainilla, chile, miel silvestre y achiote (Nisao, 2007). Adicionalmente los aztecas empleaban los granos del cacao como moneda (Kilian, 1955).

El primer encuentro europeo con el cacao tuvo lugar cuando Cristóbal Colón durante su cuarto y último viaje, se topó con una gran canoa comercial maya que llevaba entre su carga granos de cacao, pero fue por Hernán Cortés que llegó a España junto a sus instrumentos de elaboración en 1528 y fue así como los embajadores religiosos españoles fueron los primeros en difundir el uso del chocolate en el Viejo Mundo; lo cual provocó un proceso de integración en que aportó el cacao y vainilla, se le añadió leche y azúcar, el medio oriente las almendras y por último la lejana india la canela. Durante un par de siglos el cacao era utilizado exclusivamente para la fabricación de chocolate como bebida, ya en 1842, John Cadbury, de Inglaterra, fabricó “el chocolate para comer” y pronto se difundió por el resto de Europa y fue así como incrementaba la importancia del cacao y demás especies del mismo género (Kilian, 1955).

### 1.2 Características taxonómicas y propagación del *Theobroma grandiflorum*

La clasificación botánica del *Theobroma grandiflorum*, es reportada por Souza (1999) como sigue: Clase Magnolioidae, subclase Caryophyllidae, orden Malvales, Familia Sterculiaceae, género *Theobroma*, especie *grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum, es una planta originaria de la Amazonia oriental brasilera (FAO, 1994).

El copoazú es una planta leñosa que puede crecer hasta 18 m, es de ciclo perenne, sus ramas son verticiladas, de color oscuro con ramas terminales tomentosas, posee hojas simples y alternas, enteras, tienen haz verde brillante, envés tomentos y gris; cáliz con 5 pétalos verde pálido, tomentoso estrellado en la cara inferior, blancos en haz con una mancha roja en la base; cinco pétalos blancos (Rojas, 1996). Las flores del copoazú son hermafroditas, pero presenta barreras anatómicas extremadamente eficientes que evitan el acceso directo de los granos de polen, de anteras al estigma (Alves, 2003). El fruto es una capsula indehisciente, perfumados con olor agradable, liso elipsoide de 25 cm de largo por 12 cm de ancho, de color café cobrizo, semillas envueltas en un arilo ácido y dulce; la cascara es dura, recubierta por pilosidades color café rojizo, el color de la pulpa es amarillo crema, la semilla posee una grasa aromática similar a la manteca de cacao (Hernández, 2000).

Según lo publicado por Melgarejo 2006, se presenta 3 variedades cultivadas en la Amazonia: Redondo, el cual es común en la Amazonia, es un fruto con tamaño mediano, con un peso de 1,5 Kg; Mamorana, fruto grande, elongado que termina en punta, con un peso 2,5-4 Kg; y Mamau, fruto sin semilla (partenocárpico) con un peso 2,3 Kg.

La propagación se puede realizar por método sexual, asexual también llamada vegetativa o por acodo aéreo. Varios autores coinciden en que el método se escoge de acuerdo a los intereses que se tengan. En el método sexual las semillas deben ser grandes, pesadas, tomadas de plantas con buena producción, frutos grandes, libres de enfermedades y sembradas en los tres primeros días; para mejores resultados a dichas semillas se les debe retirar toda la pulpa y secar en condiciones de sombra, antes de ser sembradas. Existen dos formas de realizar la siembra: ponerla a germinar en semillero para posteriormente pasarla a bolsa o ponerla en la bolsa directamente, bajo estas condiciones el tiempo de germinación será entre 6 y 8 días con un porcentaje de rendimiento del 80 a 98 % (Gutiérrez, 2005). En el Centro de investigaciones Macagual el porcentaje de germinación fue de 80% para 2001 y en sus publicaciones aseguran que en Brasil se ha reportado hasta 98% (Castañeda, 2001). Pasados 5 o 6 meses deben ser plantados en el sitio definitivo, realizando hoyos de 30 x 30 cm y 40 cm de profundidad, generalmente con 5 m de distancia entre una y otra. Para un mejor resultado se agrega aproximadamente 1 Kg de materia seca al hoyo (Rojas, 1996).

El método asexual es el más recomendado por varios autores, con este se obtienen en tiempo más corto plantas con mayor resistencia y tolerancia a enfermedades como escoba de bruja, *Crinipellis pernicioso*, con frutos con mayor porcentaje de frutas o sin semillas. Para este método se pueden utilizar tipos de injertos: de púa o yema terminal y de yema o escudo, se debe tener especial cuidado al escoger el injerto, este debe proceder de ramas con crecimiento vertical, para mejor desarrollo de la planta, en caso de escogerse una de crecimiento horizontal, deberá ser tutorada en un semillero hasta que adquiera un hábito de crecimiento vertical (Medrano, 2010; Rojas, 1996).

Por último, el codo aéreo sirve para multiplicar plantas seleccionadas con características deseables que son difíciles de obtener por método sexual, por la alta alogamia de la especie (Melgarejo, 2006; Gutiérrez, 2005). Tiene las ventajas de ser de bajo costo y muy fácil de realizar. Este método no supera el método asexual y los resultados no han sido muy positivos pero si variables (Gutiérrez, 2005).

### 1.3 Composición fisicoquímica

La composición porcentual en materia seca, de la semilla de copoazú reportada por Castro (2010), son proteína 20%, grasas 50,8%, carbohidratos 15,9%, fibras 9,6%, cenizas 3,7%.

La pulpa de copoazú tiene un alto contenido de carbohidratos, fibra, proteína, potasio y magnesio y bajo contenido de sodio (Cardona, 2013). Tiene un valor nutricional de 100g, en acidez 2,15%, pH 3,3, humedad 89%, aminoácidos 21,9%, extracto etéreo 0,53 %, cenizas 0,67%, solidos totales 11%, azucares reductores 3%, pectina 90 %, fosforo 10%, calcio 40 %, vitamina C 23,1 %.

### 1.4 Distribución y cosecha

El Copoazú se atribuye a la Amazonia Nororiental como centro de distribución. Es ampliamente conocido y cultivado en la región occidental de la hoya amazónica (Manaos-Brasil, Leticia-Colombia, Iquitos-Perú y áreas fronterizas de Colombia-Brasil-Venezuela y Colombia-Brasil-Perú). En el caso de Colombia la semilla se trajo por Manaos Brasil al Putumayo y de allí se ha venido extendiendo hasta el Caquetá (Melgarejo, 2006).

Durante su maduración no presenta cambios característicos que sirvan para identificar el momento oportuno en el que deban ser cosechados, por lo que el tiempo es un buen indicativo; sin embargo, este varía según la localidad, para el departamento del Caquetá se ha registrado que este es de  $130 \pm 5$  días. En el municipio de San José del Guaviare se ha reportado que el tiempo al que se deben cosechar los frutos es de 240 días (Hernández, 2010).

### 1.5 Usos generales y agroindustriales

El fruto del *Theobroma grandiflorum* tiene cualidades nutritivas, y diferentes usos; de la almendra se extrae un licor similar al del cacao, con alto porcentaje de ácidos grasos insaturados (linóleo y oleico), tiene un sabor suave y agradable, ha sido catalogado como notas frutales semejante a los cacaos finos (Criollo, 2010). El fruto del copoazú es totalmente aprovechado, es fuente considerable de grasas, proteínas y carbohidratos, la pulpa se puede consumir fresca y se usa para elaboración de jugos, dulces, cremas, compotas, sorbetes, licores, mermeladas, néctares incluso yogurt, batidos, helados, dulces y hasta pasteles y galletas. La semilla para la fabricación de chocolate blanco,

tiene un alto contenido de proteínas. La cáscara en descomposición es utilizada como abono orgánico (Castañeda, 2001).

Para la producción del deshidratado de copoazú se puede realizar congelado o después de despulpado, las condiciones del proceso para deshidratado reportadas por Medrano (2010), fueron temperatura de secado 60°C, durante 6 horas, resultando un producto con actividad de agua 0,49, una humedad 14,72%, pH de 2,75, con un índice de oscurecimiento de 64,72.

#### 1.6 Otros estudios y usos agroindustriales

Además de los usos ya mencionados, varios autores han buscado innovar utilizando frutos amazónicos, para la creación de bebidas, para lo que se han realizado estudios de los métodos de clarificación de jugos de Copoazú, utilizando enzimas pectolíticas, y amilolíticas (amilasa) o la mezcla de enzimas (100 ppm cada una, 43°C, 60 min), las cuales se inactivan por calentamiento 90°C, 5 min. También se reportan evaluaciones con adición de 0,15 g/L de gelatina con 5 min de agitación seguido de 12 h sedimentación y la separación final del producto de floculación (centrifugación 14000 rpm a 4°C durante 30 min) (Cardona, 2013). Igualmente lo reportado por Sandhya (2016) donde indica, el uso de inóculos en el grano de copoazú aumenta los valores característicos de sus componentes bioactivo.

Se ha evaluado el contenido polifenólico y la actividad antioxidante de diferentes etapas de procesamiento del grano del *Theobroma grandiflorum*, en 3 zonas del relieve del departamento del Caquetá, vega, lomerío y montaña, encontrando que los granos fermentados presentan el mayor contenido polifenólico y la mayor actividad antioxidante; mientras que en los granos secos y tostados se obtiene una pérdida entre el 39 - 45%, con respecto a la actividad antioxidante determinada en los granos fermentados, de cada zona geográfica (Galeano, 2012; Hue, 2016).

En comparación con el cacao, el licor producido por el copoazú aunque es semejante, posee características mejores en cuanto a porcentaje de ácidos grasos insaturados. Otra diferencia se establece en el desarrollo de su punto máximo de temperatura, en cuanto al cacao está entre el segundo y el tercer día, mientras que en el copoazú está entre el sexto y el séptimo día.

La influencia del grosor de la cascarilla, elevada acidez y exceso de mucílago, afecta el normal desarrollo de la fermentación y se presenta la germinación del grano que afecta la calidad sensorial del producto terminado (Criollo, 2010).

El copoazú a diferencia del cacao, produce una almendra cuyo grosor de cascarilla se encuentra alrededor de los 0,54 mm, superiores a las del cacao de línea con espesor de 0,26 mm. La diferencia del grosor de la cascarilla implica que el trabajo con la almendra de copoazú requiera de un mejor desarrollo en la etapa de fermentación y niveles de acidez superiores, que logren traspasar la cascarilla llegando al interior del grano, donde se desarrollan los precursores de aroma y sabor del cacao (Criollo, 2010).

El copoazú aunque no originario de Colombia, es un fruto que nace y se desarrolla con facilidad en los suelos Amazónicos, a pesar de su facilidad y su cotidianidad actual, es un fruto poco explotado por lo que son más relevantes los estudios realizados en Brazil. Sin embargo, en los últimos años se han visto estudios de maestría y doctorado de investigadores Colombianos que destacan la importancia de antioxidantes, polifenoles y otros compuestos de este fruto Amazónico; en esta revisión se alcanza a visualizar algunos de los estudios avanzados (Herrera, 2013; Castro, 2010; Hernandez, 2010; Medrano, 2010).

El tema de uso agroindustrial lo mueve el interés de innovar en una comunidad específica, "Caquetá", donde ha ido avanzando en sus propuestas de emprendimiento aunque poco notorias en el país en general. El copoazú se caracteriza por sus reportes en alto contenido de antioxidantes. Por otro lado, en su producción del deshidratado a diferencia de otras frutas como el borojo se puede realizar congelado o después de despulpado (Medrano, 2010).

## 2 ALIMENTOS FUNCIONALES

### 2.1 ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL

El buen vivir no es para muchos un concepto que tenga relevancia con el comer sano o saludable, hoy por hoy se debate la industria en generar placer o salud con los alimentos (Illanes, 2015). Los alimentos fundamentan su relevancia en la cotidianidad de la humanidad, por la necesidad fisiológica; sin embargo para los interesados en el tema los alimentos presentan su importancia por sus componentes, y por ejercer efectos físicos y psicológicos beneficiosos, por la presencia de sustancias que son adicionales a los componentes nutricionales básicos conocidos (Olagnero *et al.*, 2007); la investigación en nutrición recupera importancia hoy, así mismo los alimentos funcionales, frente a las enfermedades relacionadas con los hábitos alimenticios, como diabetes, cáncer, fallas cardíacas, enfermedades cardiovasculares en general, alergias, hipertensión, sobre peso y obesidad (Illanes, 2015; Ezzati *et al.*, 2005). La relación o efectos de estas enfermedades no tiene población objeto de edad certera, y además se vive mayor incremento en países en vía de desarrollo que aunque se presenta en los países desarrollados, se observa mayor accesibilidad a alimentos más saludables (Ezzati *et al.*, 2005).

La industria alimentaria es un campo importante en la economía mundial, la Unión Europea realiza gran parte de la transformación de materias primas agrícolas y suministro de alimentos. Aunque en innovación y nuevos productos es considerado un tema de baja investigación; ha recuperado fortaleza en las industrias alimentarias mediante el cambio y ofrecimiento de conocimiento de los alimentos a la población; así aumenta entonces la innovación para satisfacer las expectativas del consumidor. Por otro lado, la industria alimentaria ha enfrentado varios problemas técnicos y cambios económicos en la sociedad, por lo que las empresas se han llevado a repensar y conocer más sobre alimentos de estilo de vida saludable (Bigliardi, 2013).

El impacto de la ciencia y la tecnología e innovación se ha reflejado en varios campos sin ser la alimentación la excepción, por lo que los especialistas en nutrición han generado un auge de la creación de nuevos productos en aras de un futuro más saludable, fundamentados en los alimentos funcionales y nutracéutico (Guzmán, 2009; Annunziata, 2011; Valenzuela, 2014). En general los alimentos funcionales se definen cuando contiene cualquier componente que afecte de manera específica y positiva al consumidor, como en la reducción de riesgo de enfermedades, en el bienestar, en mantener una buena salud, en su estado psicológico (Olagnero *et al.*, 2007; Alvarez *et al.*, 2021).

Definir un tipo de alimento no es tan fácil como los no expertos creerían; en los últimos años se busca establecer las diferencias entre tipos de alimentos como los funcionales y los nutraceuticos y su distinción entre los medicamentos; sin embargo, los entes gubernamentales son los encargados de evitar la agresión del mercado, el vender por vender, protegiendo sus intereses. De manera general, en el caso de los alimentos funcionales debe cumplir un requisito específico, contener un componente activo que ayude a la funcionalidad de los organismos de cualquier ser, animal o humano. El alimento funcional a diferencia del alimento nutraceutico debe tener apariencia de alimento, mientras que el alimento nutraceutico puede tener componentes aislados de alimentos pero que su presentación o venta puede ser mediante cápsulas, comprimidos, en polvo, líquido en fin, a manera de ejemplo para alimentos funcional (AF) puede ser una leche con adición de ácidos grasos omega-3 de origen marino, o con adición de fitoesteroles, o ácido linoleico; por lo contrario un alimento nutraceutico se representa con cápsulas o comprimidos que contengan omega 3, fitoesteroles o ácido linoleico (Luengo, 2007, Valenzuela, 2014).

Cada tipo de alimento funcional o producto nutraceutico se deben tratar con sus diferencias dadas a la ingesta diaria recomendada, en el caso de los nutraceuticos, debe ser más controlada a razón de su concentración de los componentes. Los estudios se iniciaron en Japón en los años setenta, se dieron por el envejecimiento progresivo de la población, y de diferentes enfermedades crónicas como osteoporosis, anemia, estreñimiento, disfunciones cardiovasculares, iniciando con investigaciones en la liberación de células en animales; aunque se tiene reporte que se inició en China 100 a.C ya que, el continente Asiatico cuentan con la tradición de atribuir propiedades curativas o terapéuticas a los alimentos y a las hierbas como un saber popular (Al-sheraji *et al.*, 2013); utilizado en la Dinastia Este Han, aproximadamente hacia el año 100 a.C. Otro término muy parecido, alimentos especiales, se utilizó en trabajos medicos en la Dinastia Song en el año 1000 (Goetzke *et al.*, 2014). El concepto de alimentos funcionales como lo conocemos hoy, fue generado en el año 1980 en Japón, aquel alimento que se consume de forma normal y sirve para mejorar la salud, como por ejemplo contenidos de minerales, vitaminas o la presencia de fibra. Por lo contrario, un producto nutraceutico se definió como un suplemento dietario que no se encuentra en una matriz no alimenticia, tomado de un alimento una sustancia natural bioactiva concentrada (Luengo, 2007; Pérez, 2006; Valenzuela, 2014). En el occidente tampoco es considerado un concepto nuevo, dado que el alimento está íntimamente ligado a una salud óptima. En el siglo XVI A.C Hipócrates médico griego dejó un legado “que el alimento sea tu medicina y la medicina sea tu alimento”. Situandonos en el siglo XXI, esta filosofía del “alimento como medicina” es la base del paradigma de los alimentos funcionales (Olmedilla, 2013).

Estos alimentos se desarrollaron específicamente para dar mejor calidad de vida, y reducir los riesgos para varias enfermedades denominados alimentos FOSHU, por la abreviatura en inglés de “Food with Specific Health Uses”, aquí se aprueba que se mencionen los efectos fisiológicos en los consumidores (Illanes, 2015), dentro de los cuales se encuentra los prebióticos, probióticos, antioxidantes, ácidos grasos en general (Valenzuela, 2014; Alvidrez *et al.*, 2002; Illanes, 2015).

De otro lado, el concepto de nutracéutico fue incorporado por el Dr. Stephen de Felice, director de la Fundación de medicina Innovativa en el año 1989, enfocado en alimentos con la capacidad de fortalecer la salud, para la prevención de enfermedades y mejora de funciones fisiológicas del organismo; en ese mismo año el Dr. Herbert Pierson, director del Programa de Alimentos Diseñados del Instituto Nacional del Cáncer los denominó alimentos diseñados a aquellos que contienen naturalmente o que son enriquecidos con componentes químicos, biológicamente activos (Pérez, 2006; Valenzuela, 2014).

Históricamente, la nutrición ha tenido una evolución de la siguiente manera, para el siglo XVIII se habló de alimentación como energía, para el siglo XIX se tenía en cuenta los principios inmediatos, para inicios del siglo XX se fundamentó en las vitaminas, y durante el siglo XX se genera el término de dieta equilibrada, dieta mediterránea, como fruto de los nuevos sistemas de producción y los requerimientos de los mercados internacionales y para el siglo XXI se define el concepto de “alimento sano”, aquel alimento libre de riesgo para la salud y que conserva su capacidad nutricional, su atractivo a los sentidos, su pureza y su frescura, se pasa a otro concepto más actual de alimento funcional a alimentos funcionales y nutracéuticos (Mensink *et al.*, 2003).

La interrelación de disciplinas como la Biología Molecular, la Biotecnología, la Informática, entre otras, con la Nutrición, permite a las industrias alimentarias el desarrollo de nuevos productos con funciones adicionales a las del alimento original (Richardson *et al.*, 2003). Surge entonces a partir de estos nuevos enfoques, otros conceptos para identificar características particulares dentro de estos alimentos novedosos (Riccardi, 2004). El tema de funcionalidad hoy en día es la principal estrategia para la creación de nuevos productos alimenticios (Jiménez, 2004).

En Europa y Norte América, el concepto de alimento funcional aparece recientemente gracias a la evidencia científica de la relación existente entre salud y dieta. Hasta los primeros años de la década de los 80, los estudios fueron enfocados principalmente hacia las enfermedades por falta de nutrientes, a partir de ese momento los estudios se enfocaron a descubrir el potencial preventivo de los alimentos (Araya *et al.*, 2003). Por lo que resulta importante la reglamentación sobre estos alimentos, y esto depende de cada país, por ejemplo en la Unión Europea se basa en la seguridad de consumo, mientras que en Estados Unidos se enfoca en los efectos (El Sohaimy, 2012).

Actualmente, America Latina es un potencial en la producción y consumo de alimentos funcionales, ya que cuenta con grandes recursos naturales, amplia biodiversidad de flora y fauna asociada a gran variedad de plantas y frutos comestibles, con potenciales y efectos beneficiosos para la salud. Es responsabilidad de los gobiernos diseñar las políticas para fomentar la investigación científica y la producción de nuevos alimentos o componentes alimenticios con propiedades funcionales, teniendo en cuenta que podrían ser una importante alternativa para contribuir a mejorar la calidad de vida de la población (Marreno, 2015; Sarmiento, 2003).

Colombia no cuenta con un mercado especializado en esta nueva tendencia del consumidor; en los últimos años se han generado cambios en la dinámica de la industria alimentaria, donde estimula la creación de nuevos productos y tecnologías (Lajolo, 2002). El mercado de los alimentos funcionales, es un negocio muy atractivo no solo por efectos sobre la salud, sino por los márgenes de rentabilidad que maneja, alrededor del 60% (Seddon, 2002).

Algunas empresas colombianas en el sector de lácteos invierten tiempo y dinero para ser las pioneras a nivel nacional con los alimentos beneficiosos para la salud. Una en particular es el caso de Alpina con la marca Yox en el 2007 y seguidamente de Regeneris, los cuales son productos que cuentan con propiedades funcionales ayudando a la digestión y al tracto intestinal (Juárez, 2007).

### **Alimentos funcionales en el departamento del Caquetá**

El departamento del Caquetá cuenta con diversas empresas en el sector de elaboración de alimentos siendo una de mayor concentración la industria láctea, en donde tiempos atrás se elaboraban productos en su totalidad con sabores o ingredientes artificiales, en la actualidad contamos con la tendencia de apuntar a alimentos funcionales los cuales van dirigidos al mejoramiento de la salud o a la reducción de las carencias de alimentación que se tienen en el departamento. Los consumidores caqueteños están aumentando la inclinación por los alimentos actualmente sofisticados, donde el contacto con el exterior ha creado al consumidor ser más consciente al momento de comprar productos bajos en grasa, de alto contenido vitamínico y la nueva tendencia de alimentos con propiedades probióticas las cuales tiene la capacidad de ayudar en mejorar la digestión de los consumidores, lo cual ha generado un cambio en el negocio de los alimentos. Las empresas inician con la generación y elaboración de productos funcionales tales como Yogurth con adición de probióticos donde se tiene especial cuidado en el tema de calidad y presentación de los productos.

## 2.2 Conceptos de ALIMENTOS FUNCIONALES

Existen diferentes conceptos de alimentos funcionales para “todo aquel alimento semejante en apariencia física al alimento convencional, consumido como parte de la dieta diaria, pero capaz de producir demostrados efectos metabólicos o fisiológicos, útiles en el mantenimiento de una buena salud física y mental, en la reducción del riesgo de enfermedades crónico-degenerativas; además de sus funciones nutricionales básicas” IFIC (Consejo Internacional de Información sobre Alimentos, 2006). Por otro lado, aunque no se ha definido para la Unión Europea, la EUFIC en el proyecto FUFOS lo definió; “alimento funcional, puede ser un alimento natural, un alimento al que se ha añadido un componente, o un alimento al que se le ha quitado un componente mediante medios tecnológicos o biológicos. También puede tratarse de un alimento en el que se ha modificado la naturaleza de uno o más de sus componentes, o en el que se ha modificado la biodisponibilidad de uno o más de sus componentes, o cualquier combinación de estas posibilidades”; el Consejo de Alimentación y Nutrición de la Academia de Ciencias de los Estados Unidos los conceptualiza como “alimentos modificados o que contienen ingredientes que demuestren acciones que incrementan el bienestar del individuo o que disminuyen los riesgos de enfermedades, más allá de la función tradicional de los ingredientes que contienen”, o la elaborada por ILSI (International Life Science Institute) los define como “alimentos que en virtud de la presencia de componentes fisiológicamente activos, proveen beneficios para la salud más allá de la acción clásica de los nutrientes que contienen” (Valenzuela, 2014).

El efecto positivo de un alimento funcional puede ser tanto en el mantenimiento del estado de salud como en la reducción del riesgo de padecer una enfermedad o generar un aumento de la producción debido a mejor aprovechamiento de los nutrientes (Prentice *et al.*, 2003). Cualquier definición de alimento funcional debe converger hacia aquel alimento que tenga un impacto positivo en la salud del animal y/o humano ya sea previniendo o curando alguna enfermedad, además del valor nutritivo que contiene (Rafter *et al.*, 2004). Su importancia radica en el aporte de nutrientes al organismo, los cuales se han demostrado en funciones del cuerpo, proporcionando un mejor estado de salud y bienestar, igualmente estos alimentos ejercen un papel preventivo debido a que disminuye algunos factores de riesgo ante ciertas enfermedades el cual debe ser continuo en la ingesta puesto que es un alimento y no un fármaco (Diplock *et al.*, 1999; Chen, 2011; Illanes, 2015).

Teniendo en cuenta los conceptos anteriormente dados, un concepto más general podría definirse de la siguiente manera, los alimentos funcionales pueden ser naturales o procesados, y deben tener además de valor nutritivo normal de un alimento, ingredientes que favorezcan alguna actividad específica de función fisiológica del organismo, que esté relacionado con el papel metabólico o fisiológico sobre el crecimiento, desarrollo, manutención y otras funciones normales del organismo, debe favorecer también el estado físico y el estado

mental de una persona. Se refiere con actividades fisiológicas a la relación con un óptimo crecimiento y desarrollo, con el mantenimiento de los sistemas fisiológicos, sistema cardiovascular, hepático, endocrino, ginecológico, digestivo, osteoarticular, renal o nervioso; definitivamente son una oportunidad para el desarrollo de nuevo producto alimenticio o suplemento, para el aporte fisiológico del control y prevención de enfermedades, dentro de estos encontramos los alimentos que contengan determinados minerales, vitaminas, ácidos grasos o fibra alimentaria, cualquier alimentos que se le adicionen sustancias biológicamente activas, como los fotoquímicos u otros antioxidantes, también dentro de estos encontramos los probióticos, como por ejemplo microorganismos presentes en bebidas fermentadas los cuales mejoran la flora y motilidad intestinal y reducen la presencia de ciertos tipos de úlceras en el tracto gastrointestinal, alimentos que pueden coadyudar al optimizar las condiciones del tracto mediante la acción bactericida y antiinflamatoria, ayuda en lesiones gástricas, y enfermedades producidas por ejemplo *Helicobacter pylori* (Luengo, 2007; Pérez, 2006).

Entre los ejemplos que encontramos para alimentos funcionales según diferentes autores están los tomates con alto contenido de licopeno, carotenoide presente en sandías y pimientos rojos el cual reduce el riesgo de cáncer de próstata, las frutas y verduras cuyos flavonoides neutralizan los radicales libres oxidantes; algunos compuestos como los terpenos de los vegetales verdes y granos que funcionan como antioxidantes, protegiendo a los lípidos, a la sangre y a otros fluidos corporales; betacarotenos presentes en la zanahoria disminuye el daño celular, luteína de los vegetales verdes ayudan a la visión, fibra insoluble como la cáscara de trigo y otras gramíneas minizan el cáncer de colón, el éster estanol de la soja, trigo y maíz mengua la presencia de colesterol en sangre (Luengo, 2007), igualmente componentes prebióticos, antioxidantes, ácido fólico, fitoesteroles, fitoestrógenos sirve como regulador homeostático de lípidos en sangre (Valenzuela, 2014)

En cuanto a las carnes, el pescado es rico en ácidos grasos omega 3, el cual previene el riesgo de enfermedades cardiovasculares, y es coadyuvante para las funciones mentales y visuales. Los productos lácteos tienen cantidades de ácido linoleico que mejora la composición de células corporales y reduce el riesgo de algunos cánceres.

### 2.3 PROBIÓTICOS

El término se utilizó por primera vez en 1954 con el cual se hacía referencia a sustancias necesarias para llevar una vida sana. El concepto más utilizado es "microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del huésped" dado por un programa en conjunto con FAO/OMS panel. La propuesta original señaló que ciertas bacterias eran benéficas para el ser humano, atribuido a Ilya Metchnikoff cuando trabajaba en el instituto Pasteur a principios del siglo XX (Binns, 2013).

La palabra “probiótico” proviene del latín “pro” que significa “para” y del griego “Biótico” que significa “Vida” (Binns, 2013), hace referencia a bacterias que se aíslan del tracto intestinal de animales o humanos, y causan efectos benéficos en la salud de estos, esencialmente en el sistema inmunológico, motivo por lo que se adicionan a algunos alimentos que se encuentran en el mercado, principalmente en yogures, pero también en queso, leches fermentadas y no fermentadas, zumos, batidos, cereales, barras nutritivas, y fórmula para bebés. Adicionalmente se comercializan como suplementos dietarios y medicamentos, en este último caso se ha recurrido a la encapsulación de estos con el fin de protegerlos del medio durante el almacenamiento del producto (Rodríguez, 2012; Sanders, 2007; Lopez, 2010).

Dentro de las características fisiológicas de los probióticos las más relevantes está la resistencia a la acidez estomacal y de las secreciones pancreáticas como son la bilis y las enzimas digestivas; cuando su ubicación es a través del intestino, diferente a si su ubicación es por ejemplo la boca. En general el microorganismo debe mostrar beneficio para el consumidor, deben ser no patógenos, no tóxicos y no deben tener efectos colaterales, este debe permanecer durante la vida útil del producto, tener un número adecuado para imprimir beneficios de salud; además de ser compatible con la matriz alimentaria para mantener las propiedades sensoriales deseadas (Sanders, 2007; Kellow *et al.*, 2014).

### *Lactobacillus caseí*

La especie *Lactobacillus caseí* corresponde a microorganismos que cumplen funciones de probióticos, especialmente para fermentación de leche, y otros productos, es utilizado también como intensificador y acelerador de sabores de ciertos quesos que se maduran con bacterias (Velásquez, 2012).

En el ser humano, el efecto beneficioso es la prevención de la alteración de la microbiota intestinal y tiene efectos positivos en la prevención del cáncer de vejiga. Adicionalmente estimula respuestas inmunológicas previniendo infecciones causadas por la familia *Enterobacteriaceae* (Rodríguez, 2009).

#### 2.3.1 Consideraciones para un probiótico

Para considerar un microorganismo probiótico se debe seguir las instrucciones de la FAO 2006.

Selección de cepas probióticas para su utilización en seres Humanos. Se considera importante no el origen sino la especificidad de la acción, y de mucha importancia la capacidad de mantenerse vivo en el lugar del destino.

Clasificación e identificación de las distintas cepas. Se recomienda que la asignación de nombres se realice conforme al Código Internacional de

Nomenclatura para asegurar la comprensión a nivel internacional. Y si existe una nueva debe ser incluida en la colección. La identificación se puede hacer por (tipificación genética) se lleve a cabo utilizando métodos tales como la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE), con ensayos iniciales de fenotipo, seguidos de la identificación genética mediante métodos tales como la hibridación de ADN con ADN, la determinación de secuencias del ARN 16S u otros métodos reconocidos internacionalmente. En el segundo de los casos, debería utilizarse el Proyecto de base de datos ribosómica (RDP) para confirmar la identidad ([www.cme.msu.edu/RDP/](http://www.cme.msu.edu/RDP/)).

Definición y medición de los beneficios de los probióticos para la salud. Para usar microorganismo como cualquier otro componente que ingresa al organismo debe indicar dosificación y duración recomendadas por el fabricante o los fabricantes, la cantidad mínima necesaria para la efectividad del probiótico, por lo que se aconseja salga del estudio realizado *in vitro* e *in vivo* en animales y en seres humanos.

Métodos de prueba para establecer los beneficios para la salud que confieren los microorganismos probióticos.

Los protocolos que se les debe realizar a las bacterias para establecer los beneficios para salud son:

- Tolerancia al ácido y la bilis (Resistencia a la acidez gástrica y Resistencia a los ácidos biliares)
- La producción de sustancias antimicrobianas
- Capacidad de adherencia a las células del intestino humano. (Adherencia a mucosas y/o a células epiteliales humanas y líneas celulares)

Resistencia a la acidez gástrica. Resistencia a los ácidos biliares

Otros protocolos para verificar el posible mecanismo probiótico que intervienen en el control de patógenos intestinal:

- Producción de sustancias antimicrobianas. Actividad antimicrobiana contra potenciales bacterias patógenas)
- Exclusión competitiva de la fijación de patógenos
- Competencia por los nutrientes
- Modulación del sistema inmunitario
- Capacidad para reducir la adhesión de agentes patógenos a superficies.
- Actividad hidrolasa de sales biliares. Resistencia a espermicidas (aplicable a probióticos para uso vaginal).

Es permitido adicionar a los productos alimenticios probióticos que contengan  $\beta$ -galactosidasa para aliviar los problemas de digestión de la lactosa; sin embargo, también se observan efectos similares para la salud en el caso de bacterias

iniciadoras de la fermentación de la lactosa, por ejemplo *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* y *S. thermophilus* en productos lácteos fermentados.

A pesar que los probióticos se denominan como bacterias inocuas (GRAS), el grupo de trabajo del documento FAO y OMS 2006, recomiendan que las cepas tengan la siguiente caracterización:

1. Determinación de los patrones de resistencia a los antibióticos
2. Evaluación de ciertas actividades metabólicas (por ejemplo, producción de D-lactato, desconjugación de sales biliares)
3. Evaluación de efectos colaterales durante estudios en seres humanos
4. Supervisión epidemiológica de incidentes adversos en los consumidores (después de la comercialización)
5. Si la cepa en estudio pertenece a una especie que se sabe que produce toxinas con efectos sobre mamíferos, debe realizarse un ensayo para determinar la producción de toxina.
6. Si la cepa en estudio pertenece a una especie con conocido potencial hemolítico, se requiere la determinación de la actividad hemolítica. La evaluación de la falta de infectividad de una cepa probiótica en animales inmunocomprometidos agregaría más confianza en la inocuidad del probiótico.

### 2.3.2 Mecanismo de acción en la Probiosis

Investigaciones en humanos y modelos animales han demostrado el beneficio clínico de cepas probióticas sobre el tratamiento de enfermedades como cáncer de colon (efecto anticancerígeno), enfermedad inflamatoria intestinal, diarrea (actividad antimicrobiana), complicaciones postoperatorias e intolerancia a la lactosa debido a su acción sobre células afectadas (Bernal, 2017).

El mecanismo de acción de los *Lactobacillus* según Furtado (2013), es multifactorial y en general de las cepas probióticas, diferente a lo publicado por Amorocho (2011), donde no todas las cepas de *Lactobacillus* inhiben a los patógenos, esta característica probiótica depende de la cepa. Uno de los principales mecanismos de acción de los probióticos es la generación de bajo pH en el medio debido a la producción de ácido láctico a concentraciones de 20-40 mM, y de otros ácidos dependiendo del tipo de cepa que actúa como un permeabilizador de la membrana exterior de los patógenos Gram negativos, aumentando de esta manera y haciendo más susceptible a las moléculas antimicrobianas permitiendo que penetren en las bacterias.

Igualmente, la producción de otros ácidos orgánicos, bacteriocinas y el aumento de la producción de inmunoglobulina A sobre la mucosa, contribuye como defensa del hospedador contra la adhesión de patógenos entéricos mejorando la inmunidad intestinal (Furtado, 2013).

La acción del pH contra otros microorganismos es tan efectiva como lo reportado por Amorocho (2011), *L. casei* (CECT475) y *L. acidophilus* (9O3) inhibieron la cepa de referencia *H. pylori* NCTC11637 por medio del sobrenadante.

Fernández, 2017 enumera el mecanismo de acción de los probióticos de la siguiente manera, teniendo en cuenta que este mecanismo es muy dispar ya que no todos actúan de la misma forma sobre el huésped.

1. Competición con bacterias nocivas por: Desplazamiento de su sitio de unión al epitelio, inhibición de su crecimiento y/o muerte mediante la producción de compuestos antibacterianos o reducción del pH.
2. Mejora de la función de barrera intestinal.
3. Producción de nutrientes importantes para la función intestinal.
4. Inmunomodulación.

Igualmente lo describe Furtado (2013), el mecanismo de acción de los probióticos, es por la inhibición de número de células viables mediante la producción de compuestos con actividad antimicrobiana, y compitiendo por nutrientes y sitios de adhesión. También alteran el metabolismo microbiano aumentando o disminuyendo la actividad enzimática y estimulando la inmunidad del huésped mediante el aumento de niveles de anticuerpos y actividad de macrófagos.

Por otro lado, la Organización Mundial de Gastroenterología (2011) señala el mecanismo de acción de los probióticos, afectan al ecosistema intestinal estimulando los mecanismos inmunitarios de la mucosa y estimulando los mecanismos no inmunitarios a través de antagonismo y competencia con patógenos potenciales como se muestra en la Figura 1. Fenómeno que media la mayoría de los efectos beneficiosos, incluyendo la reducción de la incidencia y severidad de la diarrea, uno de los usos más ampliamente reconocidos de los probióticos; así mismo, reducen el riesgo de cáncer de colon en modelos animales, probablemente debido a su capacidad de suprimir la actividad de ciertas enzimas bacterianas que pueden aumentar los niveles de pro carcinógenos, pero esto no ha sido probado en humanos.

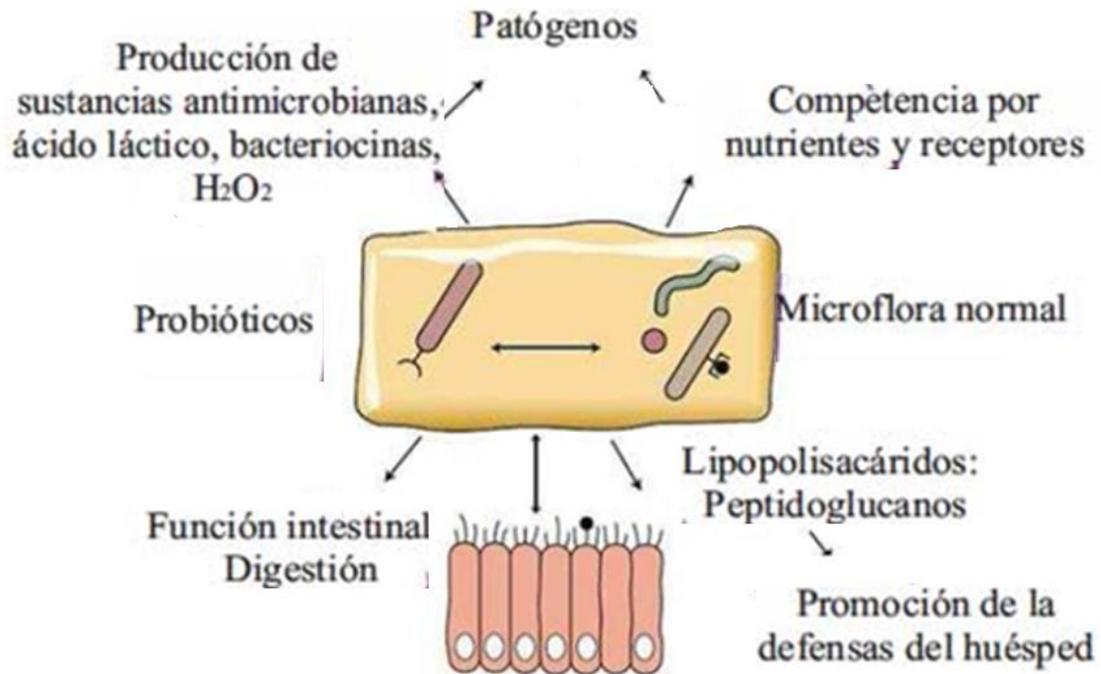


Figura 1. La microbiota normal y los probióticos interactúan con el organismo anfitrión en actividades metabólicas y funciones inmunes, y previenen la colonización de microorganismos oportunistas y patógenos. (Organización Mundial de Gastroenterología, 2011)

El mecanismo de acción de los probióticos reportado por Guzmán (2012), se resume de manera concreta como mecanismos intraluminales (incrementa la secreción mucosa e inhibición de la adherencia de las bacterias patógenas, acidificación del colon por fermentación de nutrientes), por mecanismos epiteliales (incremento de la función de barrera del epitelio, disminuye la permeabilidad favoreciendo el cierre de las uniones intercelulares) y por mecanismo inmunomoduladores (acciones inmunomoduladoras secreción de bacteriocinas, estimula la respuesta mucosa al estrés, inhibición de la hipersensibilidad visceral).

Se ha presentado el mecanismo de acción por Hessissen 2016 mediante la competencia de bacterias nocivas por el desplazamiento del su sitio de unión al epitelio, por la inhibición de su crecimiento y/o muerte mediante la producción de compuestos antibacterianos o reducción de pH, como se muestra en la Figura 2.

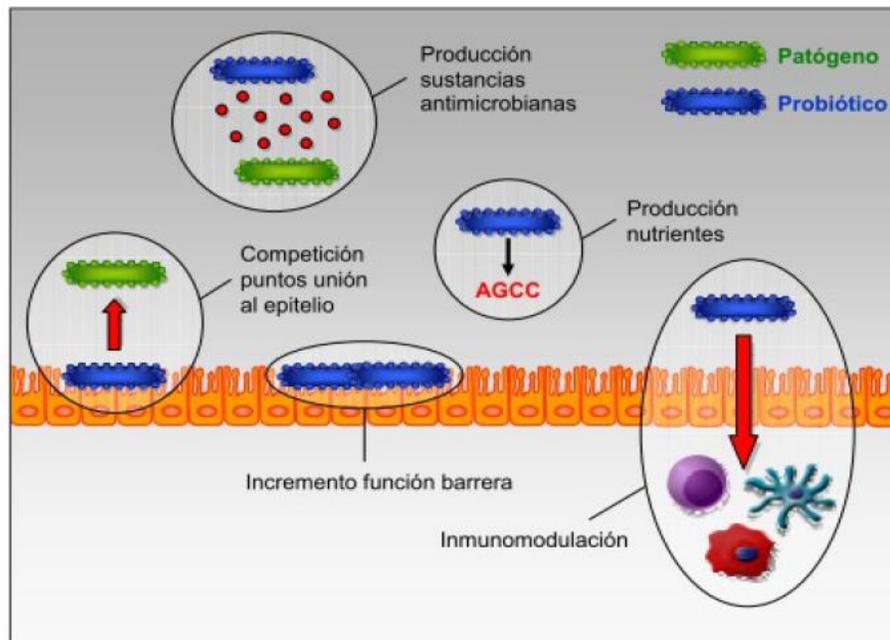


Figura 2. Mecanismo de acción ejercida por las bacterias probióticas. (Hessissen, 2016)

### Acción antimicrobiana de los microorganismos en los alimentos

Los aditivos antimicrobiales de los alimentos actúan sobre ADN, síntesis de proteínas, actividad enzimática, pared celular y transporte de nutrientes de microorganismos. El mecanismo de acción de ácidos orgánicos es dependiente de pH, de forma que tales compuestos a bajo pH existen en estado no disociado que permite la permeación a través de la membrana plasmática microbiana, de forma que al entrar a la célula encuentran un pH mayor, lo cual lleva a una acumulación intracelular de aniones y protones, posteriormente lleva a ruptura de la membrana, inhibición de reacciones metabólicas esenciales, estrés potencial sobre la homeostasis del pH intracelular y acumulación de aniones tóxicos. El peróxido de hidrogeno es un oxidante que produce radicales libres hidroxilo (OH) los cuales atacan componentes celulares esenciales (lípidos, proteínas, ADN) donde grupos sulfidrilos y enlaces dobles expuestos son susceptibles de modificación química. La sal de mesa puede disminuir la actividad acuosa de los alimentos explicando su actividad antimicrobiana llevando a acumulación letal de aminoácidos en microorganismos aparte de la reducción de oxígeno en agua, inhibiendo la supervivencia de organismos aeróbicos (Nair *et al.*, 2019).

En producto fermentando de tubérculo de cassava se han aislado bacterias ácido lácticas (*L. casei*, *L. delbrueckii*, *L. brevis*, *L. plantarum*, *L. pentosus*, *L. fermentum* y *L. acidophilus*) que producen sustancias antimicrobianas (bacteriocinas, ácido

fenil láctico, ácido láctico, ácido acético, etanol, peróxido de hidrógeno, diacetilo y reuterina) contra bacterias gram positivas y gram negativas tales como *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Enterococcus faecalis* (Adeyemo et al 2018).

La miel de manuka derivada del árbol *Leptospermum scoparium* presenta actividad antimicrobial contra bacterias patógenas como *Staphylococcus aureus* y *Helicobacter pylori*. La actividad antimicrobiana se debe a la producción de peróxido de hidrógeno producido mediante la enzima glucosa oxidasa, metilgloxal (compuesto 1,2-dicarbonílico) (Atrott y Henle 2009).

Los compuestos antimicrobiales más estudiados son los aceites esenciales (AE), que son compuestos volátiles que corresponden a metabolitos secundarios conformados por terpenos y fenil propanoides. Los terpenos o terpenoides son activos contra bacterias, hongos y protozoos. Con respecto al mecanismo de acción de los AE se ha sugerido que contienen un gran número de componentes y es probable que sus modos de acción (p. e. sinergias) involucren muchos objetivos en la célula bacterial. La hidrofobicidad de los AE les permite distribuirse en los lípidos de la membrana celular y mitocondria, volviéndolas permeables y conllevando a fuga de contenido celular. Esta actividad de AE se potencia con bajo pH, baja temperatura y bajos niveles de oxígeno. De otro lado, los compuestos fenólicos también han mostrado actividad antimicrobial. Algunas de las moléculas consisten de un simple anillo fenólico sustituido con algunos grupos hidroxilos como los ácidos cinámico y cafeico. Otros como los flavonoides, presentan tres anillos fenólicos con muchos grupos hidroxilo como en el extracto de cáscara de mango, observándose que un aumento en la hidroxilación resulta en un aumento en la actividad antimicrobiana. El extracto enriquecido en flavonoides de cáscara de fruta cítrica mostró que la preparación con enzima pectinasa 62L eficientemente convirtió glicósidos comunes en sus agliconas del extracto y su deglicosilación aumento la actividad antimicrobial contra bacterias gram negativas del extracto enriquecido en flavonoides (Ayala *et al.*, 2011).

Se han adicionado agentes antimicrobiales tales como ácidos orgánicos (ácido cítrico, propiónico, sórbico, ascórbico), bacteriocinas de fuentes microbiales (péptidos como nisina, lacticina y natamicina) o enzimas de fuentes animales (lisozima, lactoferrina) en películas o cubiertas comestibles como estrategia para preservación de alimentos. Los ácidos orgánicos aumentan la concentración de protones disminuyendo el pH externo, afectan la integridad de la membrana celular e interfieren con el transporte de nutrientes y metabolismo energético. La aplicación de películas de quitosano conteniendo ácido acético o propiónico en la superficie de carne procesada y almacenada por 7 días a 4 y 10°C inhibe completamente el crecimiento de *Enterobacteriaceae* y *Serratia liquefaciens*. Las bacteriocinas tienen un efecto sobre la síntesis de peptidoglicano y sobre la permeabilidad de la membrana citoplasmática, promueven la salida de aminoácidos desde el citoplasma de un número de bacterias gram positivas,

disipan el potencial de membrana y gradiente iónico, inhiben la síntesis de ARN, ADN y proteínas y alteran el funcionamiento de la membrana citoplasmática. El uso de nisina con EDTA incrementa el efecto antimicrobiano debido a que el agente quelante hace la pared celular de microorganismos gram negativos más permeable y susceptible a nisina. Combinaciones de nisina con alginato de calcio en películas comestibles redujeron de 1,8 a 4,6 log ufc/ml después de 72 a 96 h de exposición a 4°C con *Salmonella typhimurium* Nar. La lisozima es una enzima presente en muchos alimentos como leche y huevos y es un agente bactericida contra bacterias gram positivas. La inactivación es causada por ruptura del enlace entre ácido N-acetil murámico y N-acetilglucosamina del peptidoglicano constituyente de la pared celular. Se ha registrado el efecto antimicrobial de películas de quitosano-lisozima contra *Pseudomonas fluorescens* y *Listeria monocytogenes*. Los compuestos fenólicos también se han usado como agentes antimicrobiales dado que generan cambios irreversibles en la hidrofobicidad de las membranas, generan aberturas en la membrana celular conllevando a la pérdida de constituyentes intracelulares, dañan el ADN, se acomplejan con enzimas (Benbettaieb *et al.*, 2018). También se han usado estos agentes antimicrobianos en empaques activos tales como polietileno de baja densidad, polipropileno, poliamida entre otros (Khaneghah *et al.*, 2018).

La actividad antimicrobial de la leche es atribuida a inmunoglobulinas, lactoferrina, lactoperoxidasa y lisozima. Adicionalmente, hay una variedad de péptidos antibacteriales encriptados dentro de la secuencia de proteínas de la leche que son liberados bajo hidrólisis controlada de la proteína precursora. De la lactoferrina se han obtenido péptidos como: a) péptidos catiónicos, los cuales interactúan con las membranas externa y citoplasmática causando la muerte celular debido a un mecanismo multigolpe que involucra acción sobre más de un objetivo iónico b) lactoferrinas, cuya actividad antimicrobial está asociada a una proporción de triptófano/arginina en el péptido (Fadaei, 2012).

Se ha registrado en aceite de linaza que los ácidos grasos insaturados y lignano son los principales metabolitos que exhiben actividad antimicrobial contra un número de cepas microbiales incluyendo *Streptococcus agalactiae* (NCIM 2401), *Micrococcus luteus* (ATCC 10240, ITCC9341), *Staphylococcus aureus* (ITCC8531, ATCC 29737), *Bacillus pumilus* (ATCC 14884), *Enterococcus faecalis* (ATCC 51299), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Bacillus brevis* (ITCC7096), *Bacillus cereus* (ATCC 11778) y *Escherichia coli* (ATCC 8739). Se ha registrado que el componente fenólico encontrado en linaza induce la desintegración de ADN bacterial e inhibe la actividad girasa. La ADN girasa es una enzima bacterial importante que pertenece a las topoisomerasas las cuales catalizan el superenrollamiento negativo y dependiente de ATP de ADN circular cerrado de doble hebra. Se ha sugerido que el ácido linoleico selectivamente inhibe un componente esencial de la síntesis de ácidos grasos bacteriales conocido como proteína transportadora enoil-acil reductasa (Fab I) de forma que se afecta la producción de lípidos de la membrana celular (Fadzir *et al.*, 2018).

El extracto acuso de *Allium sativum* posee efectiva actividad antibacterial contra patógenos clínicos resistentes a muchos fármacos y pueden ser probados como componentes dietarios naturales para manejar resistencia de fármacos a bacteremia. La alicina y otros compuestos azufrados podría ser los principales agentes antimicrobiales de *A. sativum* activos contra un número de bacterias gram negativas y gram positivas, tales como *Staphylococcus*, *Salmonella*, *Vibrio*, *Mycobacteria*, *Proteus* spp y *Helicobacter pylori* (Gupta *et al.*, 2015).

El extracto de acetato de etilo de la baya de *Empetrum nigrum* L ha mostrado buena actividad antimicrobiana contra *B. atrophaeus* (MIC 125 µg/ml), *K. rhizophila* (MIC 125 µg/ml), *M. luteus* (MIC 63 µg/ml), y *S. epidermidis* (MIC 125 µg/ml) siendo mayor la actividad en bacterias gram positivas comparado con bacterias gram negativas, lo cual podría explicar dado que las bacterias gram negativas poseen una pared celular localizada entre las membranas interna y externa de la célula, mientras que las bacterias gram positivas tienen una pared celular que constituye la capa externa de la célula; por lo tanto, las bacterias gram negativas son resistentes al extracto de *E. nigrum* (Hyun *et al.*, 2018).

Se ha registrado actividad antimicrobial de hongo comestible *Agaricus blazei* contra peritonitis e infecciones orales especialmente aquellas causadas por bacterias gram positivas considerándose que péptidos y proteínas de alto peso molecular son los responsables de la actividad biológica. Dado que *A. blazei* contiene cantidades significativas de β-glucanos, estos compuestos pueden estimular la síntesis y secreción de citoquinas por macrófagos, especialmente compuestos proinflamatorios.

Las melanoidinas son compuestos de alto peso molecular, de color café y con contenido de nitrógeno y generados en la fase final de la reacción de Maillard y están presentes en alimentos y subproductos de alimentos mostrando potencial antimicrobiano. La capacidad de quelación de metales puede explicar la actividad antimicrobiana, ya que las melanoidinas pueden atrapar cationes los cuales son esenciales para el crecimiento y supervivencia de bacterias patógenas. En melanoidinas de pan se ha visto inhibición de enterobacterias en el tracto gastrointestinal humano en ensayos *in vitro*, lo cual se asocia a actividad antiinflamatoria. En melanoidinas de café se ha registrado efecto anticariogénico debido a la inhibición de la adhesión de *Streptococcus mutans*, el mayor agente causal de la caries dental humana, a estructuras de hidroxapatita (Mesías *et al.*, 2017).

### **Propiedades antioxidantes de los microorganismos**

Shalaby, *et al.*, 2013, ha identificado el modo de acción de algunos alimentos, basándose en análisis de detección de oxidación de lípidos y proteínas, además plantean el posible efecto geroprotector de los antioxidantes presentes en alimentos, con alta eficiencia potencial pero que no iguala la capacidad

antioxidante de las enzimas antioxidantes naturales de los organismos. Uno de los inconvenientes grandes del uso de antioxidantes naturales es garantizar su acción, una vez es aislado y mezclado con otros ingredientes en los alimentos.

Se estima que aproximadamente nueve géneros de bacterias, incluyendo tanto Gram-positivas como Gram-negativas, producen el compuesto con actividad antioxidante. Además, se reporta que cerca de 750 especies de hongos filamentosos, algunos actinomicetos y levaduras también sintetizan compuestos con actividad antioxidante (Gupta, *et al.*, 2015).

Las bacterias gram-positivas como *Streptomyces antioxidans* MUSC 164T, que es recuperado del suelo de manglar ubicado en Tanjung Lumpur (Malasia) presenta actividad antioxidante y neuroprotectora contra el peróxido de hidrogeno, el análisis químico reveló que la cepa produce pirazinas y compuestos fenólicos que podrían explicar la bioactividad (Ser, *et al.*, 2016). Dicha cepa había sido probada anteriormente en muestras de manteca.

Zhao, *et al.*, 2013, aislaron cepas del hongo *Penicillium thomii* Q1 de raíces de pinos de bosques y demostraron que estos tienen la capacidad de sintetizar compuestos antioxidantes endógenos como los carotenoides y el ascorbato, así como algunas enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa (CAT); se plantea que la forma de acción antioxidante podría regenerar el  $\alpha$ -tocoferol, que está involucrado en la eliminación de los radicales peróxido y el oxígeno singlete, presentando una mayor acción en presencia de Cu, ya que este favorece la acumulación de ascorbato.

Otro estudio, ha publicado que especies como *Aspergillus candidus* CCRC 31543 presenta dos compuestos antioxidantes importantes uno es el ergosterol, que es el principal componente de esteroles en la membrana del hongo y cuya actividad antioxidante resulta de la interacción entre el anillo aromático hidrófobo de los esteroides y los residuos de fosfolípidos de la membrana celular. Un segundo compuesto identificado es la terfenilina, un compuesto que presenta actividad antioxidante superior a la del  $\alpha$ -tocoferol gracias a sus tres grupos hidroxilo y un sustituyente orto-metoxi con respecto al grupo hidroxilo del anillo central (Yen, *et al.*, 2003).

Algunas células fúngicas tienen la capacidad de eliminar radicales  $O_2$ , provenientes de la cercosporina que se genera cuando el hongo parasita una planta, se cree que la piridoxina producida por cepas CR de *Cercospora Kikuchii* apaga la cercosporina excitada mediante la donación de un electrón, además se ha planteado que podría funcionar como un inhibidor redox de la cercosporina produciendo ion superóxido que es más tolerante por las células vivas. Adicionalmente sugiere que la degradación oxidativa de las vitaminas B6 puede ocurrir durante los procesos en los que se produce  $O_2$ , como el procesamiento y almacenamiento de alimentos (Bilski, *et al.*, 2000).

*Lentinus edodes* un hongo ampliamente cultivado en Asia Oriental, principalmente China reporta presencia de polisacáridos con pesos bajos y moderados presentan fuerte actividad antioxidante. El mecanismo antioxidante fue propuesto por Yen, *et al*, 2008, quien propone que la actividad de algunos polisacáridos puede deberse al suministro de hidrógeno del mismo, que se combina con radicales y forma un radical estable para terminar la reacción de la cadena radical, otra posibilidad es que el polisacárido puede combinarse con los iones radicales que son necesarios para la reacción en cadena del radical; entonces se termina la reacción.

En los organismos vivos la producción de ROS depende del estrés oxidativo y de las condiciones aeróbicas; en el caso de las proteínas se entiende que la protección a la oxidación se produce principalmente en los aminoácidos que contienen azufre, ejemplo la cisteína (Cys) y la metionina (Met); entendiéndose que la oxidación de la metionina da como resultado un cambio conformacional de la molécula o una pérdida de la función de las proteínas. *Corynebacterium glutamicum*, una bacteria Gram-positiva que producen micotiol un compuesto antioxidante que parece desempeñar un papel en la regeneración de enzimas antioxidantes, bajo estrés oxidativo (Si, *et al.*, 2015).

Woldegiorgis, *et al.*, 2014 demostraron que extractos del hongo *A. campestris* provenientes de Etiopia tenía la mayor actividad antioxidante comparado con otras especies como *P. ostreatus*, *L. edodes*, *L. sulphureus*, *T. clypeatus*, *T. microcarpus* y *T. letestuiy* consecuentemente mayor contenido de compuestos fenólicos totales y flavonoides totales. En los extractos de *A. campestris* se encontró ácido gálico como principal contribuyente, permitiendo obtener la más baja concentración efectiva del extracto para atrapar el 50% de los radicales libres evaluados.

A partir de levaduras como *P. rhodoxyma* se sintetizan compuestos de tipo carotenoide como la astaxantina, que surge a través de la vía del mevalonato, donde el compuesto precursor es el Acetil-Coa que se condensa para formar mevalonato y posteriormente el primer carotenoide (fitoeno), luego ocurre el proceso de deshidrogenación y ciclación produciendo  $\beta$ -caroteno y posteriormente la astaxantina. Aun así, la astaxantina posee atributos únicos como mayor polaridad que otros carotenoides y mayor actividad antioxidante principalmente por la presencia de grupos 3-hidroxilo y 4-ceto en ambos anillos iones terminales (Schmidt *et al.*, 2011).

En la nutrición humana ya se han incluido algunos alimentos que se consideran seguros y que contienen microorganismos que potencian algunas propiedades en el organismo, dichos microorganismos se conocen como probióticos, dentro de los más utilizados incluyen *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Enterococcus* spp., entre otros pero cabe resaltar que dicha funcionalidad depende de la cepa y no de la especie ya que podrían ser funcionales en otros organismos superiores pero no en todos (Syngai, *et al.*, 2016). Algunos autores han afirmado que

microorganismos probióticos con capacidad antioxidante como *Bifidobacterium lactis* BS05, *Lactobacillus acidophilus* LA06 y *Lactobacillus brevis* LBR01, *Lactobacillus plantarum*, *L. helveticus*, *L. acidophilus*, *Lactobacillus fermentum*, *L. casei*, *L. rhamnosus* GG, los cuales tienen la capacidad de producir péptidos bioactivos contra la peroxidación de lípidos o ácidos grasos, ya demostrado en leche (Mishra *et al.*, 2005).

Teniendo en cuenta los trabajos enfocados en la implementación de microorganismos en procesos industriales, ya sea de tipo fermentativo o incluido como parte de la receta nutricional, se ha demostrado que todos los microorganismos sintetizan moléculas antioxidantes, como respuesta a los diferentes procesos oxidativos en los que se ven involucrados. Se ha difundido en medios científicos que la mayoría de compuestos antioxidantes se genera durante la transformación de productos alimenticios, debido al estrés oxidativo que tienen lugar durante la transformación de alimentos de tipo proteico, lipídico y glucosídico; tal es el caso de la mayoría de probióticos usados para alimentación humana y animal. A pesar de los trabajos publicados acerca de la capacidad antioxidante de los microorganismos, es bien sabido que los mecanismos de defensa antioxidante deben ser profundizados, aún más cuando se han demostrado que las moléculas sintetizadas por los microorganismos transforman o inactivan las diferentes ROS. Hasta el momento solo se podría afirmar que los antioxidantes sintetizados a partir de microorganismos proviene de algunas moléculas bioactivas como péptidos y proteínas (la actividad depende solo de la presencia de algunos aminoácidos), algunos esteroides presentes en la pared celular, así como compuestos de tipo carotenoide exclusivo en algunos microorganismos y enzimas que generan protección celular en el microorganismo, regulando los procesos y permitiendo que los mismos cumplan su actividad durante el proceso industrial de producción de alimentos.

## 2.4 PREBIÓTICOS

Los prebióticos son glúcidos no digeribles, que estimulan el crecimiento o la actividad de los microorganismos autóctonos, resultando un beneficio para la salud (Guillot, 2018). Existe distintas definiciones para este término, en 1995 se publicó la primera definición como “un ingrediente alimentario no digerible que afecta beneficiosamente al hospedador al estimular el crecimiento de un número de especies bacterianas en el colon”, posteriormente la Internacional Asociación Científica de probióticos y prebióticos (ISAPP) en el año 2010, definió "Un ingrediente alimenticio fermentado selectivamente que se traduce en cambios específicos, en la composición y/o actividad de la microbiota gastrointestinal, por lo tanto confiriendo beneficios sobre la salud del huésped" (Binns, 2013). Por otro lado, se ha definido como ingredientes no digeribles de la dieta que afectan de manera positiva al huésped, estimulando de forma selectiva el crecimiento y/o la actividad metabólica de un número limitado de cepas de bacterias colónica; se caracterizan por ser moléculas grandes, que no son digeribles en el tracto

gastrointestinal por la enzimas digestivas correspondientes, por lo cual en el intestino grueso es responsabilidad de la microbiota degradarlas (Olagnero *et al.*, 2007; Barrio, 2006; De las Cagigas *et al.*, 2002; Fuertes, 2019).

Los prebióticos complementan la acción de los probióticos, estos se encargan de la selectiva estimulación de la microbiota beneficiosa del huésped, estimulando el crecimiento y la actividad del microorganismo de interés. Un alimento puede ser considerado prebiótico si cumple las siguientes características: no debe ser hidrolizado o absorbido en la parte alta del tracto digestivo, debe ser fermentado selectivamente por una o un número limitado de bacterias potencialmente benéficas del colon, por ejemplo bifidobacterias y lactobacilos, debe actuar de forma benéfica en la microbiota colónica, al reducir los microorganismos patógenos e incrementado las especies sacarolíticas (Olagnero *et al.*, 2007).

La demanda mundial de prebióticos se estima en alrededor de 167.000 toneladas y 390 millones de euros para el año 2016. Los fructooligosacáridos (FOS), inulina, isomalto-oligosacáridos (OMI), povidexrosa, lactulosa y el almidón resistente se consideran los principales componentes prebióticos. Los oligosacáridos, tales como los oligosacáridos de soja (SOS), los galacolisacáridos (GOS) y los xiloligosacáridos (XOS), también se comercializan en Japón como agentes prebióticos. Las fuentes de estos compuestos son variadas, están presentes naturalmente en las frutas, las verduras, el bambú, la miel y la leche, pueden ser producidos a partir de residuos lignocelulósicos (Figuro, 2019).

#### 2.4.1 Propiedades de un prebiótico

1. No debe ser hidrolizado o absorbido en el tracto gastrointestinal superior.
2. Resistente al pH gástrico y a la hidrólisis de las enzimas digestivas.
3. No absorberse en el intestino delgado.
4. Debe ser metabolizado por microorganismos intestinales.
5. Debe estimular selectivamente el crecimiento o actividad intestinal de bacterias beneficiosas para la salud.

Estudios demuestran el beneficio del prebiótico solo y en conjunto con probióticos, favoreciendo la ingesta de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* en conjunto con buenos hábitos de ejercicio, lograron reducir el estreñimiento, y su efecto se evidencia sin consumo hasta 6 semanas posteriores (Amarocho, 2011). Igualmente se han publicado evidencias científicas de beneficios de los prebióticos – probióticos en problemas respiratorios, donde se evidencia la reducción en la gravedad de enfermedades respiratorias en niños entre 3 a 5 años.

Entre los beneficios reportados de los prebióticos se encuentra, la estimulación del crecimiento de bacterias fermentativas (bifidobacterias y lactobacilos), generan AGCC (ácidos grasos de cadena corta), que producen un descenso del pH controlando el desarrollo de ciertas especies que tienen efectos perjudiciales para

la salud, ejercen un efecto protector frente a infecciones debido a las propiedades antiadherentes que presentan, favorecen la absorción de minerales, reducen la presión arterial, niveles de glucosa, colesterol y triglicéridos, disminuyen la síntesis de triglicéridos y ácidos grasos en el hígado previniendo el riesgo de padecer diabetes, obesidad y arteroesclerosis como se muestra en la Figura 3, la lactulosa se utiliza como tratamiento de la encefalopatía portal sistémica (Cerdó, 2019).

**Inulina.** Es un carbohidrato no digerible que se encuentra en muchos vegetales, frutas y cereales. A nivel industrial se extrae de la raíz de achioria y es adicionado en alimentos funcionales. Junto a los (FOS) fructooligosacáridos son conocidos como fructanos y están constituidos básicamente por cadenas de fructosa, se usa junto con sus derivados como espesante, emulsificante, gelificante, sustituto de azúcares y de grasas (Madrigal, 2007).

La inulina poco se hidroliza en el estómago e intestino delgado sin formación de monosacáridos y se fermenta en el intestino por la microflora, dando como resultado pequeñas cadenas de ácidos grasos, ácido láctico y gases. La inulina no incrementa la glicerina; por lo tanto, es utilizada en alimentos para diabéticos, adicionalmente porque con la ingesta constante disminuye triglicéridos de la sangre. Otro beneficio que se le atribuye a la inulina es la mejora de absorción de calcio, siendo importante para el tratamiento de osteoporosis, fortalece el sistema inmunológico, aumenta la biodisponibilidad de minerales y mejora el metabolismo de las grasas (Madrigal, 2007).

**FOS.** Han sido utilizados en la industria alimentaria como prebióticos y edulcorantes; varias investigaciones han demostrado que no poseen potencial tóxico, genotóxico o carcinogénico. Si se exceden las cantidades recomendadas el único efecto es diarrea (Muñoz, 2011). Al igual que los demás prebióticos se fermentan y en el caso de los FOS también lo hacen en la última porción del intestino grueso en donde existen el mayor número de bacterias y se produce lactato y ácidos carboxílicos de cadena corta, en los que se encuentran ácido acético, propílico y butírico, encargados de descender el pH fecal, favoreciendo la absorción de calcio y magnesio (Muñoz, 2011).

**Oligofruktosa.** Oligosacáridos de la sacarosa, que se aíslan de fuentes vegetales como la raíz de cebolla y el ajo, tienen algunas características de la fibra, y ayuda a la absorción del calcio, reducen en sangre el colesterol de tipo LDL y glucosa. La oligofruktosa disminuye la lipogénesis hepática, la aterosclerosis, favorece el crecimiento de microorganismos como el *Bifidobacterium*, lo cual favorece para evitar el cáncer de colon

## 2.4.2 Mecanismo de acción en la prebiosis

El mecanismo de acción de los prebióticos es afectar a las bacterias intestinales aumentando el número de bacterias anaerobias beneficiosas y disminuyendo la población de microorganismos potencialmente patógenos (WGO, 2011).

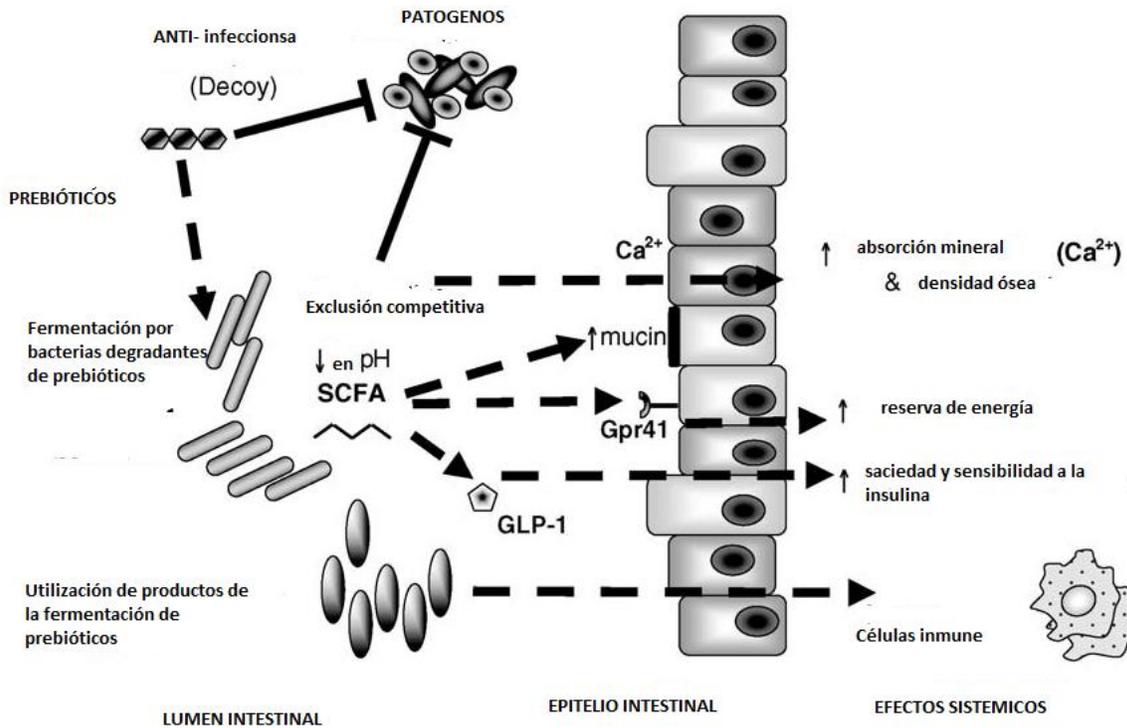


Figura 3. Mecanismo de acción de los prebióticos (Saulnier *et al.*, 2009; Velásquez, 2016)

## 2.5 COMPONENTES IMPORTANTES EN LOS ALIMENTOS FUNCIONALES

**2.5.1 Fibra dietética.** Un bajo consumo de fibra en la dieta se correlaciona con cáncer del colon; son polisacáridos de origen vegetal; los humanos no poseen enzimas para hidrolizar es decir no hay presencia de alfa glucosidasas, la fibra insoluble de los alimentos de origen vegetal facilita la digestión dado que directamente estimula la masticación, salivación y secreción de jugos digestivos, ayuda al volumen del bolo alimenticio y aumenta el volumen fecal con la frecuencia de deposición, consecuentemente ayuda a mantener los movimientos peristálticos. La fibra soluble por lo contrario retarda el vaciamiento gástrico

facilitando de esta manera el retraso de la absorción de glucosa en el intestino, y así aumento de gases por la presencia de bacterias, favoreciendo el tránsito y evitando el estreñimiento.

#### 2.5.2. Antioxidantes

Vitamina C. En el diario vivir todos nos encontramos expuestos a diferentes oxidantes, como el humo de los carros, la gran contaminación del entorno y adicionalmente algunos alimentos los contienen, el organismo a manera de respuesta libera radicales libres (RL), que aunque gran parte es neutralizado por antioxidantes biológicos, otros pueden dañar las membranas y posteriormente dañar el ADN celular, provocando envejecimiento, y enfermedades como cáncer, problemas cardiovasculares, es por ello que son tan importantes los antioxidantes dado que por su estructura química inhiben la formación de radicales libres, para cuantificar su acción antioxidante en los alimentos se utiliza técnica como ORAC (Oxygen Radical Absorbing Capacity).

Entre estos encontramos la vitamina C ácido ascórbico, compuesto hidrosoluble inhibidor de los lípidos presentes en el plasma, se encuentra en la frutas como la guayaba, naranja, limón, y en verduras de hojas verdes; reacciona con los radicales libres y pasan a ser radicales ascorbilo; que se descomponen para producir ácido ascórbico y ácido deshidroascórbico; igualmente captura radicales libres tóxicos como radicales superóxido o hidroxilos y genera tocoferoles a partir de los radicales tocoferilo; es un regenerador de la vitamina E. Su absorción es en el intestino delgado entre el 80-90% esto es cuando se ingiere en baja concentración de lo contrario mayor 1g/día se reduce. Esta vitamina se encuentra en el plasma en forma reducida, mediante los transportadores de glucosa y otros transportadores específicos que son más rápidos que los de la glucosa pero son inhibidos por estos, son llevados al interior de las células, para ser transportada se oxida a ácido deshidroascórbico, reduciéndose después a ascorbato en el interior de la célula. El transportador específico de la vitamina C es más rápido y eficiente que el transportador de la glucosa, que se inhibe por la glucosa y es estimulado por la insulina. Por este motivo, los diabéticos tienen una mayor concentración plasmática de ácido deshidroascorbico por arriba de lo normal.

Vitamina E o tocoferol,  $\alpha$  tocoferol, antioxidante liposoluble que se encuentran en fuentes de origen vegetal ricas en aceite, en aceites vegetales, germen de trigo, semillas oleaginosas (nueces, almendras, cacahuates,) y verduras de hoja verde. Si en el organismo no hay niveles suficientes los radicales libres oxidan los ácidos grasos de la membrana celular por tal razón es necesaria para evitar el envejecimiento prematuro; está relacionada con otras vitaminas, como el mejoramiento de la absorción de la vitamina A, también aumenta su acción antioxidante en presencia del cinc.

Su absorción está relacionada con los lípidos micelas de la dieta, su función está ligada a las grasas, y de funciones pancreáticas y biliar normal, en su absorción es captado por los quilomicrones y las lipoproteínas de muy baja densidad VLDL por sus siglas en inglés "*very low density lipoprotein*", que están en la linfa y se almacena en el hígado y en el tejido adiposo, posteriormente la vitamina se vuelve a unir a la VLDL y a las lipoproteínas de alta densidad HDL por sus siglas en inglés "*high density lipoprotein*", para ser captadas por las células (Guzmán, 2009).

Isoflavonas, estos compuestos están en algunos vegetales especialmente en la soya, dentro de este grupo encontramos la daidzeína, la gliciteína y la genisteína; juegan un papel importante en la disminución de enfermedades como cáncer, problemas cardiovasculares y síntomas asociados a la menopausia, las isoflavonas están en los alimentos en forma conjugada cuando son consumidos estos compuestos se hidrolizan en el intestino por la acción del  $\beta$ -glucosidasas generando aglicoles y productos bioactivos como daidzeína y genisteína, los cuales pueden ser absorbidos de mejor manera. Así mismo, está relacionado con el consumo de carbohidratos, dado que hay mayor presencia de equol que tiene mayor acción que su precursor la daidzeína (Guzmán, 2009).

Flavonoides y antocianinas. Los flavonoides son pigmentos normales de las células de color de los alimentos, se conocen aproximadamente 800 flavonoides dentro de los grupos más importantes están los flavonoles (canferol, quercetina y mirecetina), otro grupo son las flavonas (apigenina, luteolina y tricetina) regularmente se encuentran en el pericarpio igualmente se encuentra en los vinos por lo que se le atribuye a esta bebida la prevención de los problemas cardiovasculares, cáncer y otros problemas degenerativos.

Carotenos, es un compuesto  $\beta$  caroteno, el efecto benéfico está relacionado a los ataques cardiacos, y funciona como antioxidante liposoluble y aumenta la eficiencia del sistema inmunológico; dentro de los más importantes están los licopenos responsables del color rojo del tomate, calabazas, espinacas y la sandía y se relaciona con la prevención del cáncer, por la presencia de  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno,  $\beta$  cryptoxantina, luteína y zeaxantina que reduce el riesgo de cáncer de próstata; los vegetales de verde oscuro y amarillo o anaranjado son fuente excelente de  $\beta$  caroteno.

Selenio-metionina, es un compuesto anticancerígeno se obtiene mediante el cultivo de levadura que incorpora este mineral a la proteína, es fundamental en los mamíferos para la producción de una de las enzimas protectoras antioxidantes conocida como glutatión peroxidasa, la selenometionina, el selenio no es tóxico asociado a una contraparte inorgánica, está relacionada con la reducción del cáncer del pulmón, próstata y colon, igualmente involucra enfermedades cardiovasculares.

Fitoesteroles, son esteroides de origen vegetal muy similar estructuralmente al colesterol, tiene un efecto hipocolesterolemico, cuando se ingiere 1-3g/día, su acción metabólica, inhibe la absorción intestinal de colesterol al competir en la incorporación del colesterol a las micelas mixtas, adicionalmente inhibe la actividad de la enzima acetil CoA- colesterol – acetil transferasa y con eso baja la esterificación del colesterol en las células entéricas, lo cual disminuye el colesterol total plasmáticos y del colesterol – LDL, sin que cambie la concentración del colesterol HDL.

### 2.5.3 Aceites, ácidos grasos y fosfolípidos

Las sustancias que se encuentran especialmente en el aceite de pescado tienen un efecto protector que inhibe la viscosidad de la sangre, reduciendo así el riesgo de formación de trombos, estas sustancias son como los ácidos grasos omega 3, docosahexaenoico (DHA), eicosapentaenoico (EPA) y grasas poliinsaturadas, en especial de tipo omega 3, (AGPI n-3), ácido EPA y ácido DHA, entre los más conocidos como un buen plato (pescados azules) son el salmón, trucha, sardina, atún, peces que consumen bastante fitoplancton a lo cual se le atribuye los niveles altos de las sustancias mencionadas. En el aceite de oliva está presente grasas monoinsaturadas como ácido oleico, tiene también una acción protectora al favorecer el incremento en la concentración del colesterol bueno (HDL-c) y evita la oxidación del colesterol malo (LDL-c). Beneficiosos para enfermedades coronarias, arritmias cardíacas, e infartos agudos de miocardio, y prevención de la trombosis.

## 2.6 UTILIDAD DE LOS ALIMENTOS FUNCIONALES EN PATOLOGÍAS HUMANAS

La principal función de la alimentación es aportar los nutrientes necesarios para satisfacer las necesidades metabólicas y funcionales de las personas. A través de los macronutrientes (carbohidratos, lípidos y proteínas) y de los micronutrientes (vitaminas y minerales esenciales), además del agua, consumidos en forma equilibrada y de acuerdo a los requerimientos de cada edad y sexo, llegar hasta el propósito de vivir más, abiertamente se propone, tener una vejez digna, recuperando el concepto de vida saludable y de alimentación saludable.

Los problemas de salud se incrementan precisamente por la necesidad diaria de competir, esto hace que no exista tiempo para cocinar, y entre más desarrollado el país (o el mundo) mayor alternativas de alimentación, la oferta es tanta que nubla el juicio y dificulta la mejor decisión para la salud por tal razón entre mayor sea el desarrollo mayor ha sido demostrada la obesidad, lo que representa falta de una dieta equilibrada, que disminuyen los nutrientes donde no existe las cantidades necesarias (Luengo, 2007).

Lo anterior ubica a diferentes enfermedades de base, que se puede mejorar su sintomatología con algunos alimentos, así mismo las alternativas son para todo tipo de población o alguna en cuestión, entre las enfermedades tratables, se encuentra las dislipidemias, diabetes, y obesidad, y síndrome metabólico, arteriosclerosis, e hipertensión arterial.

#### 2.6.1 Relación inmunológica con los probióticos.

Teniendo en cuenta que la disbiosis es el desbalance de la microbiota natural, esta se ha visto afectada por la mala alimentación, y repercute su incremento de desbalance en enfermedades inmunológicas, como enfermedades alérgicas. Sin embargo se ha demostrado que las alergias y enfermedades en relación se restablecen mediante el uso prebióticos y probióticos. Se ha mencionado en varios trabajos que el origen de las exageradas respuestas alérgicas inicia en el tracto gastrointestinal siendo la alergia a alimentos la más común «todas las enfermedades comienzan en el tracto gastrointestinal». Hipócrates.

Existen otros planteamientos como el de «old friends» que fortalece la teoría de la tolerancia alimentaria, que señala a la microbiota gastrointestinal (MGI) como ayudante en la maduración de las células dendríticas, son las células fagocíticas o células presentadoras de antígeno; así mismo la microbiota promueve la diferenciación, como también interviene en la supresión de la respuesta inflamatoria por los antígenos de bacterias comensales.

Un mecanismo importante de los probióticos es estimular los receptores tipo Toll. Los probióticos y prebióticos son usados en diferentes patologías alérgicas, dermatitis atópica, rinitis alérgica, asma bronquial, alergia alimentaria, así como APLV (Alergia a las Proteínas de la Leche de la Vaca), cólico. Los probióticos disminuyen la probabilidad de eccema en los niños con dermatitis atópica, son recomendados para la ingesta en el último trimestre de embarazo y en la lactancia.

En cuanto a las alergias alimentarias, ocurre disminución de la microbiota gastrointestinal con aumento del grupo *Clostridia* y *S. aureus* con una disminución de Bifidobacterias y Enterococos, los síntomas de estas alergias se ven disminuidas en la presencia de probióticos como *L. rhamnosus* GG, *Bifidobacterium breve* y *Bifidobacterium lactis*. Igualmente se ha demostrado el beneficio de estas cepas en conjunto (*L. rhamnosus* GG, *Bifidobacterium breve*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium lactis*) generando tolerancia a diferentes alimentos. En el caso de *Lactobacillus rhamnosus* GG se ha demostrado el aumento de bacterias productoras de ácidos grasos de cadena corta, en especial de butirato (Loredo *et al.*, 2017).

### 3 CREMOGENADOS

El concepto de cremogenado, se asimila cerca de un puré de fruta, según el Real Decreto 781/2013, y en Real Decreto 667/1983, realiza una definición más precisa del cremogenado en su artículo 10, como “productos procedentes de la molturación de las partes comestibles de frutas o vegetales, lavados, sanos y maduros, conservados exclusivamente por procedimientos físicos”, si de lo contrario se usara un método de conservante se debe aclarar, como lo menciona en el artículo 11.

Estos productos han alcanzado gran importancia en la economía, debido al uso de frutas de cada región, como base para la elaboración de productos (Aguilar, 2014), para ese autor el procedimiento de elaboración consta de deshuesado, triturado y tamizado con malla de 0,5 mm, posterior enfriamiento a 25 ° C y se conserva mediante la cadena de frío.

#### 3.1 LOS ALIMENTOS CREMOGENADOS EN EL CONTEXTO COLOIDAL

Un número considerable de alimentos naturales y procesados consisten en sus emulsiones totalmente, parcial, o han estado en estado emulsionado en algún momento durante su producción, incluyendo leche, crema, bebidas de frutas, fórmula de niños, sopas, masa de pastel, cubierta de ensaladas, mayonesas, postres, en fin. La gran diversidad de características fisicoquímicas y sensoriales exhibidas por los productos alimenticios a base de emulsión es el resultado de los diferentes tipos de ingredientes y condiciones de procesamiento utilizados para crearlos.

Ha habido una tendencia creciente dentro de la industria alimentaria a relacionar las propiedades fisicoquímicas y sensorial de las emulsiones alimentarias con el tipo, concentración, estructura e interacciones de sus componentes constituyentes. La investigación en esta área se lleva a cabo en muchos niveles estructurales diferentes, desde el estudio de la estructura y las interacciones de las partículas moleculares y coloidales, hasta el estudio de la reología, la estabilidad y las propiedades ópticas de las emulsiones, el estudio del sabor, olor, sensación en la boca y apariencia de productos finales entre otros.

La fisicoquímica de los alimentos se puede interpretar entre otros aspectos como de reología, la textura de los alimentos donde se habla de cremoso, batido, tostado, dorado, esponjoso en general; y para el análisis científico se denomina dispersiones que es cuando las partículas son mayores a  $2 \times 10^{-4}$  cm se consideran simplemente mezclas.

En términos generales el tamaño de partícula de la fase acuosa (soluto) puede ser orientado para definir las mezclas entre, soluciones, suspensiones, emulsiones y coloides. En una solución, las partículas son aproximadamente del tamaño de las

moléculas del soluto, es decir de 0.1 a  $1 \times 10^{-7}$  cm, casi diez veces el tamaño de un átomo de hidrógeno. En una suspensión, las partículas son suficientemente grandes como para ser retenidas en un filtro, 0.6 a  $2 \times 10^{-4}$  cm, regularmente se separa, si la mezcla de una sustancia en un líquido se deja reposar, ejemplo de estos son los puré, cremas de espárragos, alcachofas, algunos aderezos (vinagre y aceite, que llevan ajo, sal etc), tienen que agitarse para ser usados, y entre más fuerte sea esta agitación; igualmente mayor sea el tiempo de agitación, más tiempo tardará en separarse sus fases, por la producción de partículas pequeñas en la tracción mecánica, este procedimiento se usa en la leche homogeneizada, se pasa la leche en una malla fina, que rompe pequeñas partículas de grasa, para mejorar la estabilidad en la dispersión.

Una emulsión consiste en dos líquidos inmiscibles normalmente agua y aceite, con uno de los líquidos dispersos como pequeñas gotas esféricas en el otro. En una emulsión, las partículas se mantienen dispersas por la presencia de una tercera sustancia llamada emulsificante. El tamaño de las partículas de una emulsión es semejante al de un coloide aunque en ocasiones es mayor, (partículas de diámetro de  $10^{-7}$  a  $10^{-4}$  cm), normalmente en los alimentos se reporta el diámetro de la gota esta entre 0,1 a 100  $\mu\text{m}$ , por ejemplo el aderezo de ensalada se puede agitar bien, para evitar el crecimiento de gotitas de aceite que hacen que se forme la capa separada, la adición de otra sustancia impide que las gotas de aceite se separen, estos agentes emulsificantes pueden ser jabón, detergente y mayonesa; esta última es una suspensión estabilizada por la lecitina contenida en la yema de huevo.

Las emulsiones pueden ser clasificadas de acuerdo con su distribución espacial del aceite y las fases acuosas. Un sistema que consiste en gotas de aceite dispersas en una fase acuosa es llamado "oil in water, O/W emulsion" por ejemplo la leche, la crema, los aderezos, la mayonesa, las bebidas, las sopas y las salsas. Un sistema que consista en gotas de agua dispersos en una fase de aceite es llamada "water in oil, W/O emulsion" por ejemplo la margarina, y la mantequilla. Las sustancias que forma las gotas, en una emulsión es llamada *dispersante, discontinuo o fase interna*, mientras que la sustancia que forma el líquido circundante se llama *fase continua o externa*, entonces las gotas serían la fase dispersa y el líquido circundante es la fase continua.

La concentración de gotas en una emulsión se describe generalmente en términos de la fracción de volumen de fase dispersa. Existen otras emulsiones como por ejemplo aceite en agua en aceite (O/W/O), o agua en aceite en agua (W/O/W), esta última emulsión consiste en gotas de agua dispersas dentro de gotas grandes de aceite, las cuales están así mismas dispersan en una fase continua de agua.

El proceso de convertir dos líquidos inmiscibles por separado en una emulsión, o de reducir el tamaño de las gotas en una emulsión preexistente, se conoce como "homogenización" que generalmente someten los líquidos a una intensa agitación

mecánica, por ejemplo, mezcladores de alta velocidad, homogeneizadores de válvulas de alta presión y molinos coloidales. La fuerza impulsora de este proceso es el hecho de que el contacto entre las moléculas de aceite y agua es termodinámicamente desfavorable, de modo que las emulsiones que son un sistema termodinámicamente inestable, es posible generar emulsiones cinéticamente estable mediante un periodo de tiempo (pocos días, semanas, meses o años), incluyendo sustancias *estabilizadoras*.

Un estabilizante es un ingrediente que puede ser usado para aumentar la estabilidad de una emulsión y puede ser clasificado por su acción emulsificante, o depende de la modificación de la textura sobre donde actúa. Los emulsificantes son *moléculas activas de superficie* “*surface – active molecules*” que se absorben en la superficie de las gotas recién formadas durante la homogenización, formando una membrana protectora que evita que las gotas se acerquen lo suficiente como para agregarse. La mayoría de los emulsionantes son moléculas anfifílicas, es decir, tienen regiones polares y no polares en la misma molécula. Los emulsionantes más comunes utilizados en la industria alimentaria son los tensioactivos de moléculas pequeñas, fosfolípidos, proteínas y polisacáridos.

Los modificadores de textura pueden ser divididos entre dos categorías sobre su modelo de operación y las características reológicas de sus soluciones: agentes espesantes y gelificantes. Los agentes espesantes son ingredientes que son usados para incrementar la viscosidad de la fase continua de la emulsión, mientras que los gelificantes son ingredientes que son usados para formar un gel en la fase continua del sistema coloidal. Los modificadores de textura por lo tanto aumentan la estabilidad de la emulsión o el sistema coloidal en cuestión, por el retardamiento del movimiento de las gotas. En la industria alimentaria los más usados son polisacáridos y proteínas en emulsiones O/W y cristal grasa en emulsiones W/O.

Una apreciación de la diferencia entre la estabilidad termodinámica de un sistema y su estabilidad cinética es crucial para comprender las propiedades de las emulsiones alimentarias, un sistema que consiste en una gran cantidad de moléculas que pueden ocupar dos estados diferentes de energía libre  $G$  bajo,  $G$  alto (ver Ecuación 1).

El estado con la energía libre más baja es el que es termodinámicamente favorable y, por lo tanto, el que las moléculas tienen más probabilidades de ocupar en equilibrio termodinámico, los dos estados se pueblan de acuerdo con la distribución de Boltzmann (Ecuación 1).

$$n_{\text{high}} / n_{\text{low}} = \exp(-(G_{\text{high}} - G_{\text{low}})/kT) \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde  $n_{\text{low}}$  y  $n_{\text{high}}$  son el número de moléculas que ocupan los niveles de energía  $G_{\text{high}}$  y,  $G_{\text{low}}$ ,  $k$  es la constante de Boltzmann's ( $k=1,38 \times 10^{-23} \text{J K}^{-1}$ ),  $T$  es la

temperatura absoluta. En cuanto mayor es la diferencia entre los dos niveles de energía libre en comparación con la energía térmica del sistema, mayor es la fracción de moléculas en el estado de energía libre más bajo. En la práctica, un sistema puede no ser capaz de alcanzar el equilibrio durante la escala de tiempo de una observación debido a la presencia de una barrera de energía libre  $\Delta G^*$ , entre los dos estados. Un sistema en el estado de alta energía libre debe adquirir una energía libre mayor que  $\Delta G^*$  antes de que pueda pasar al estado de baja energía.

Por otro lado, en los coloides, las partículas son mayores que las moléculas pero menores que las de una suspensión, de manera que se tiene una mezcla homogénea. Uno de los coloides más conocidos es la gelatina, una proteína con muchos grupos polares, tales como  $-C=O$  (carbonilo) y  $N-H$  (imino), que pueden generar enlaces hidrógeno con el agua (polar); cuando la gelatina (coloide) está dispersa en el agua caliente forma lo que se denomina *sol*, al enfriarse se forma un *gel*, (líquido disperso en un sólido), la gelatina se precipita al adicionar un líquido, donde puede ocurrir *sinéresis*, que consiste en la formación de un líquido por las moléculas diluidas en el coloide, ocurre cuando se enfría, el gel se contrae y expulsa el agua.

Dentro de los coloides comunes se encuentra la leche, las moléculas de caseína, se dispersan por su carga negativa, cuando se aglomeran estas proteínas normalmente la catalogamos como leche cortada o mala, lo cual ocurre con la producción de ácido láctico (carga positiva) por la fermentación de los azúcares, se une a las moléculas de caseína neutralizándolas.

### 3.2. FUERZAS RESPONSABLES DE LA ESTABILIDAD COLOIDAL

Dentro de las propiedades de los sistemas coloidales se encuentra la formación de coágulo de manera espontánea, y su movimiento con trayectoria zigzagueante debido al choque de las moléculas de disolvente, es denominado movimiento browniano, del cual depende la persistencia del estado coloidal de la disolución, por la repulsión de sus partículas entre sí, y la resistencia a precipitar. Un coloide es cualquier producto con pequeñas partículas en suspensión dentro de un medio continuo, en la cual se puede identificar dos fases, fase dispersa, donde se forman partículas y puede ser líquida, sólida o gaseosa y la fase dispersante (continua), es el medio donde se dispersan las partículas; igualmente pueden ser líquidas, sólidas o gaseosas (regularmente son fluidas).

Se pueden clasificar según su comportamiento en contacto con el agua o constitución química, hidrofílico (tiene grupos polares fuertes e interactúan fácilmente con el agua), hidrofóbico, ejemplo de estos es la leche y el emulsificante es la grasa, este tipo de soluciones pueden generar geles o sustratos sólidos. Igualmente se pueden denominar suspensoides (liófilos o hidrófilos) se mantienen en dispersión, por sus cargas eléctricas, y por

emulsoides (liófilos o hidrófilos) el agente estabilizante que predomina es el grado de hidratación de las partículas. También se clasifican según su estructura, molecular, (como el almidón), micelar, las estructuras no son moléculas sino conglomerados de muchas moléculas o grupos de átomos unidos por fuerzas de cohesión (fuerzas de Van de Walls), ejemplo de estos se encuentran los jabones y detergentes.

Muchos alimentos son coloides, como el queso, la mantequilla, las sopas, jaleas, mayonesa, leche. Entre los tipos de soluciones coloidales que se encuentran en los alimentos están, sol, dispersión de un material sólido en un líquido, normalmente son polímeros como los polisacáridos y proteínas. Ej: jugos de fruta (agua, azúcares, fibra, vitamina y minerales), espumas, dispersión de burbujas de gas suspendidas en un líquido viscoso, geles, creados por una red continua de macromoléculas interconectadas y entrelazadas en una estructura tridimensional en la que queda atrapada la fase continua del agua, emulsiones, dos líquidos invisibles en los productos, la fase dispersa se encuentra en gotas (0.1 -10 micrómetros) distribuidas en la fase continua, es inestable, y después de un tiempo las moléculas de la fase dispersa se asocian generando una capa que se precipita o migra a la superficie según la diferencia de densidades entre las fases, ejemplo, leche, mayonesa, helados, mantequilla, salsas. En estas últimas se pueden incorporar sustancias como vitaminas, colorantes o aromatizantes en la fase oleosa (Viades, 2012).

En alimentos manufacturados, existen formas coloidales tales como emulsión, espuma, gel y dispersiones, de forma que la composición de sus ingredientes y condiciones de formulación influyen las propiedades físicas relevantes de su estructura, estabilidad y reología. La estabilidad depende ante todo de la carga eléctrica y la hidratación de las partículas. Es importante entender como la naturaleza de las interacciones entre los diferentes tipos de entidades dispersadas (partículas, gotas, burbujas) y macromoléculas (proteínas y polisacáridos) afectan el comportamiento en la fase fluida entera y en las interfaces líquida y sólida.

Existen tres aproximaciones fisicoquímicas al estructuramiento coloidal denominadas, a) agrupamiento, que involucra el control de la reología y estabilización modificando el estado de agregación de la gota, b) embebida, en la cual la gota individual en la emulsión es atrapada dentro de otra fase compuesta de un material diferente (gel hidrocoloidal) y c) en capas, que involucra la construcción de capas laminares en la interfase aceite-agua por la adsorción simultánea o secuencial de biopolímeros o partículas pequeñas de carga opuesta (Dickinson, 2015).

### 3.2.1 Ingredientes de importancia tecnológica en la estabilidad coloidal

Las proteínas de alimentos son altamente efectivas como agentes estabilizantes de proteínas, debido a su habilidad de proteger gotas de emulsión contra la floculación por una combinación de mecanismos de estabilización electrostática y estérica. Aquí sobresale la hidrofobina, una proteína globular pequeña (<10kDa), anfifílica con notables propiedades de estabilización de espuma e interfaciales, formando capas adsorbidas con mayor elasticidad superficial comparado con otras proteínas de alimentos como  $\beta$ -caseína o  $\beta$ -lactoglobulina, dado que no sufre desdoblamiento en la interfase y su fuerte asociación de moléculas en dirección lateral lo cual lleva a solidificación de las capas adquiriendo un carácter interfacial tipo sólido más rápido que otras proteínas de alimentos. Estudios de elipsometría han mostrado estructuras de monocapa y tricapa en hidrofobina (Figura 5) (Dickinson, 2015; Alain-Claude, 2004).

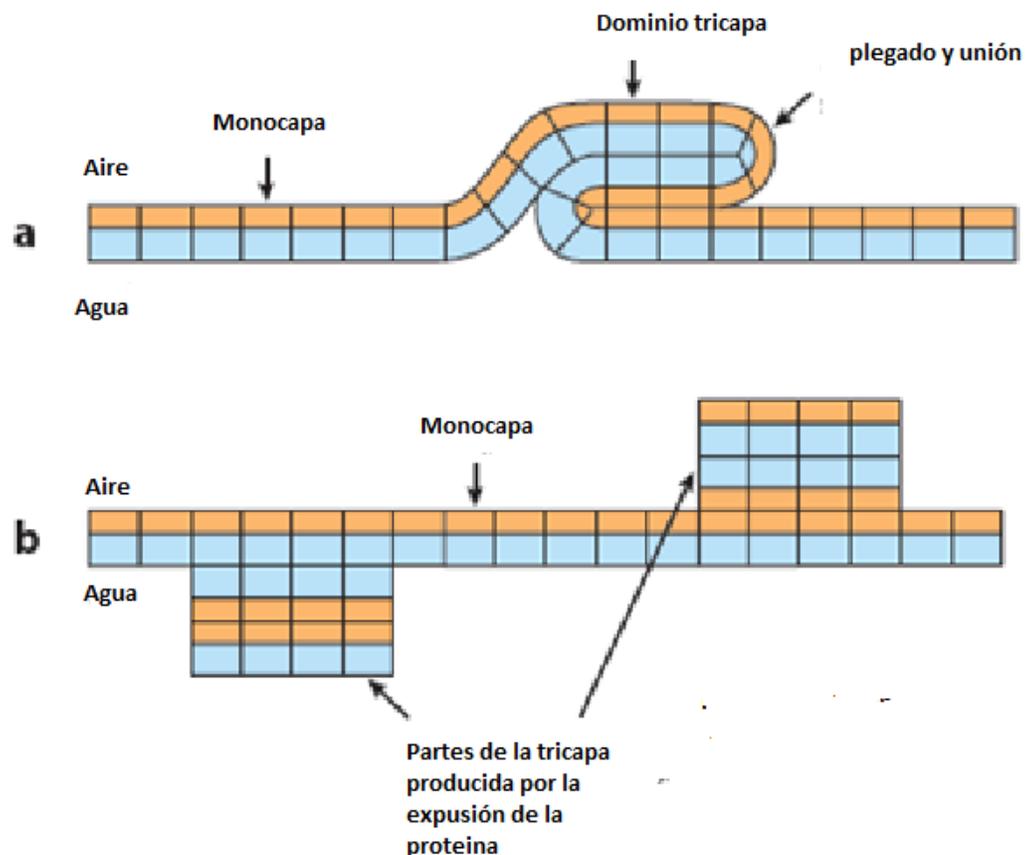


Figura 4. Ilustración de dos mecanismos diferentes (a y b) de formación de la tricapa en una monocapa de hidrofobina sujeta a compresión. Las partes hidrofílicas de la hidrofobina se muestran en azul y las partes hidrofóbicas en naranja (Dickinson, 2015).

Las agregaciones de fibrillas de proteína tales como partículas esféricas, hebras flexibles, fibrillas rígidas y agrupamientos fractales, las cuales luego de calentamiento (80 - 90°C, pH~2) tienen aplicaciones potenciales como espesante, agentes gelificantes y estabilizantes de espumas y emulsiones dada su capacidad

para generar redes que llenan espacios en fracciones bajas de volumen. Estas fibrillas recuerdan la estructura de fibrillas de amiloide. La creación de una red de fibrillas de proteína puede ser una estrategia efectiva para inhibir el comportamiento cremoso de una emulsión a través de modificación reológica de la fase continua acuosa o controlando la estabilidad de la espuma por formación de una barrera estérica alrededor de la burbuja de gas. Las fibrillas están conformadas por laminas beta (Figura 5). Las fibrillas de proteína son estructuras rígidas incluyendo doblamiento y giro con periodicidad variable (Cabrerá, 2018; Dickinson, 2015).

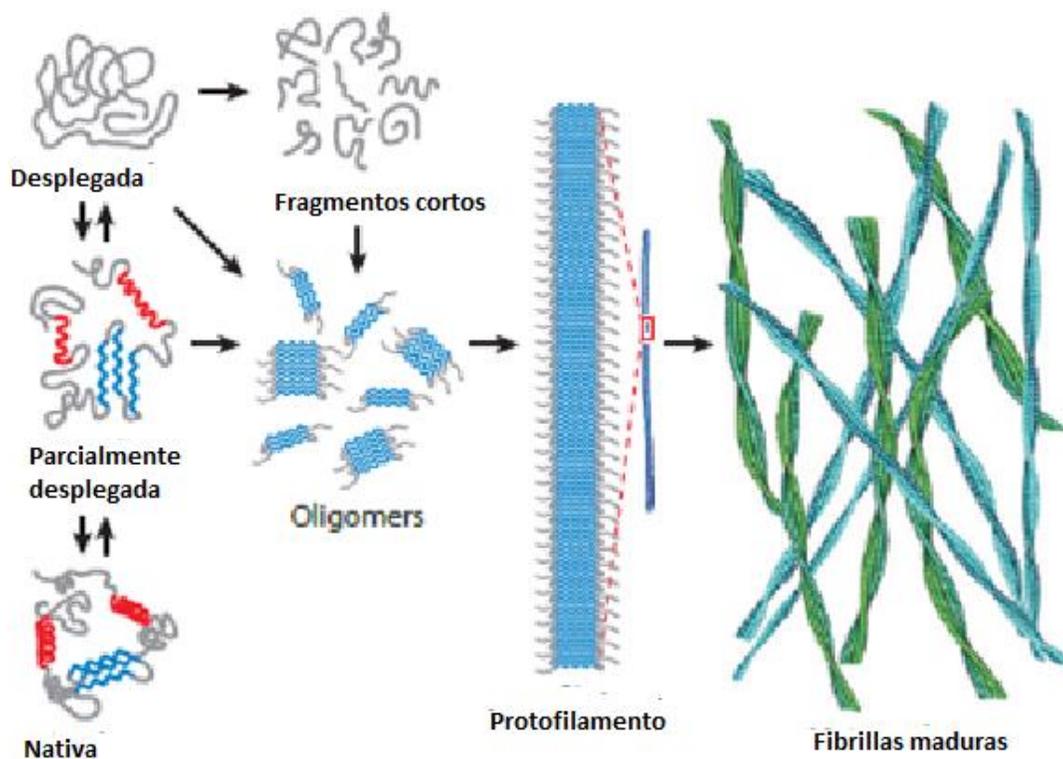


Figura 5. Etapas en la formación de fibrillas de tipo amiloide Dickinson (2015)

Las conjugaciones proteína – polisacárido, mejoran la estabilización del coloide dada por la proteína sola cuando hay alta concentración de electrolitos o un pH cercano al punto isoelectrico de la proteína. El conjugado anfifílico (dextrano, pectina) es fuertemente anclado a la interfase aceite - agua vía las regiones hidrofóbicas de la proteína con la región polisacárida no adsorbente extendiéndose más allá de la interfase para proporcionar estabilización estérica mejorada (Figura 6) (Ventureira, 2012; Dickinson, 2015).

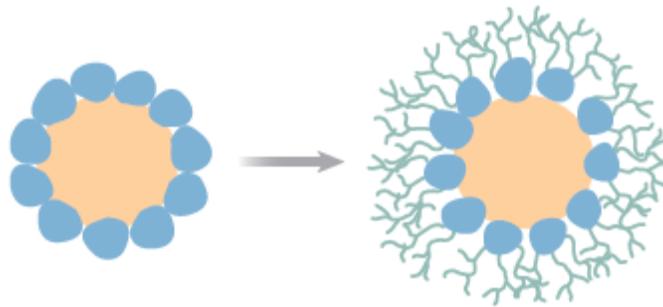


Figura 6. Una gota de aceite (color naranja) estabilizada por proteína (color azul) y por el conjugado proteína y polisacárido (color verde) (Dickinson, 2015)

Las nanopartículas (nanosferas de almidón, nanocristales de quitina) y micropartículas (celulosa, zeína, microgel) también se han considerado para la formulación y estabilización de emulsiones y espumas en alimentos, donde gotas y burbujas son protegidas contra coalescencia y encogimiento por partículas sólidas absorbidas (estabilización Pickering). Este mecanismo es efectivo dado que se requiere gran cantidad de energía para remover las partículas absorbidas de las interfaces aceite - agua y aire - agua Dickinson (2015). Las nanopartículas de caseína inducen reducción de la floculación (Dickinson, 2014; Miras, 2013).

### **Estructuramiento coloidal**

Las interfaces multicapa en coloides de alimentos consisten generalmente de capas adsorbidas de proteína (capa interna sensible, tensoactivo iónico), polisacárido (capa externa, biopolímero estabilizante estérico) o con tensoactivo, hechas de deposición secuencial o simultánea de macromoléculas con atracción electrostática de carga opuesta en la superficie de gotas de la emulsión. La integridad estructural de la multicapa depositada electrostáticamente puede ser mejorada por entrecruzamiento covalente con enzimas. El beneficio potencial de la interfase multicapa es una tendencia reducida hacia la floculación de la emulsión (Ventureira, 2012).

Las emulsiones múltiples son sistemas multicompartimentalizados conteniendo gotas pequeñas dentro de gotas más grandes. Los dos principales tipos son emulsiones agua en aceite en agua (agua dentro de gotas de aceite) y emulsiones aceite en agua en aceite (aceite dentro de gotas de agua). Estas estructuras pueden atrapar nutrientes hidrofílicos sensibles o aromas dentro de la gota acuosa interna y liberar tal compuesto a una velocidad controlada en respuesta a la digestión o procesamiento oral. Para hacer gotas pequeñas y primarias de emulsión agua/aceite que sean estables a la coalescencia, se requiere una alta concentración de emulsificante lipofílico Dickinson (2015).

El gel de emulsión describe un sistema tipo emulsión con propiedades mecánicas tipo sólido y algún tipo de estructura en red. El estructuramiento de gel de emulsión aceite/agua es debido a la formación de una red que abarca un sistema de gotas de aceite floculadas, la presencia de una red de macromoléculas entre cruzadas en el medio acuoso o una combinación de estos. Un gel de emulsión puede ser generado por la heteroagregación de gotas de aceite cubiertas con capas de biopolímero de carga opuesta (Miras, 2013).

### 3.3 PROPIEDADES DE LOS SISTEMAS COLOIDALES

Tamaño de partícula.

Del tamaño de las partículas depende la magnitud de las fuerzas (hidrodinámicas, brownianas y coloidales), su estabilidad y la reología, en el caso de partículas de tamaño intermedio la estabilidad se define por la relación de las tres fuerzas, y en las partículas grandes dominan las fuerzas hidrodinámicas (Dickinson & Bergenstahl, 1997; Genovese *et al.*, 2007). Se ha reportado para sistemas alimentarios como pulpas de frutas, polisacáridos como agentes de suspensión (Dickinson, 2001; Nighojkar, 2019).

Por otro lado, la homogenización es un factor importante en la estabilidad de los sistemas, mejorando el tamaño de partícula, más aún cuando estas son de poca rigidez.

## Potencial Z

Es la forma abreviada de denominar al potencial electrocinético de los sistemas coloidales se representa con la letra griega zeta,  $\zeta$  –potencial, es un potencial eléctrico de la doble capa, es decir es la diferencia de potencial entre el medio de dispersión y la capa estacionaria de fluido; es la relación entre la estabilidad fisicoquímica debida a las fuerzas repulsivas y la carga neta en la interfase de las partículas (Figura 14); se ha descrito por Schramm (2005) que estabilidad moderada (poca aglomeración) se encuentra cuando el valor absoluto Z, es aproximadamente 30 mV (Schramm, 2005).

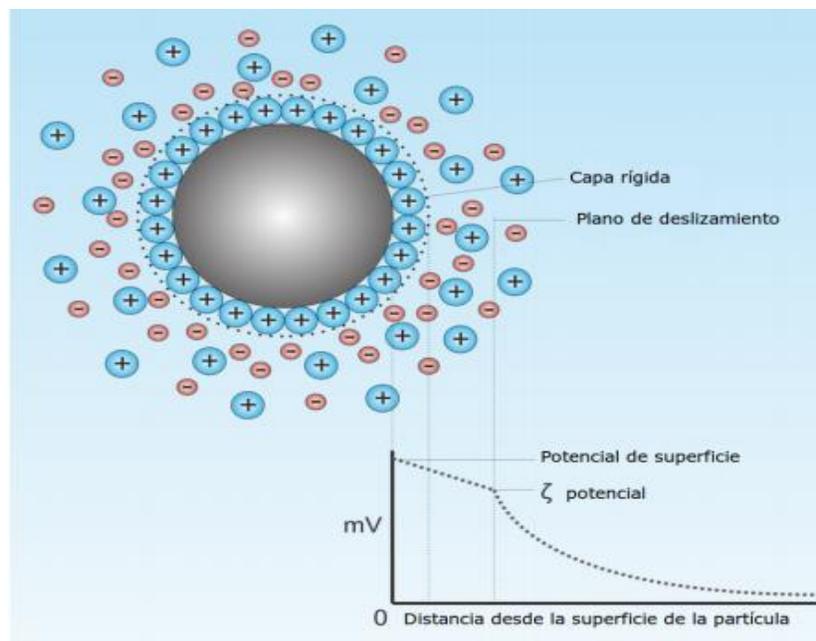


Figura 7. Diferencia de potencial como una función de la distancia desde la superficie de una partícula suspendida en un medio de dispersión.

La capa alrededor de la partícula principal es la que define las capas y la distribución de los iones circundantes. Si la partícula se mueve, bajo un movimiento browniano, el potencial Zeta es el potencial en el punto de esta capa donde se mueve, pasado el grueso principal de la solución, lo cual se le llama **plano de deslizamiento**, es decir el potencial Zeta disminuido incrementa la coagulación.

En el caso que el efecto del coloide en la solución sea de iones positivos (contra ion), en la atracción de coloide será negativo hace que algunos iones positivos formen una rígida capa adyacente alrededor de la superficie del coloide; esta capa de contra-iones es conocida como la capa de Stern o capa de coiones.

Reología en sistemas coloidales.

La reología mide la relación entre el esfuerzo y la deformación en los materiales que son capaces de fluir, puede definirse la viscosidad como el rozamiento interno que actúa dentro de un fluido, se mide en control de calidad, por su apariencia y determinación de su consistencia: por ejemplo yogurt, salsas o flanes. Algunas propiedades más importantes de la reología son: viscosidad aparente, coeficientes de esfuerzos normales, viscosidad compleja, módulo de almacenamiento y módulo de pérdidas, funciones complejas de viscosidad no lineal. Se mide en Pascales segundo, y centipoes (cps) equivalente a 1mPa s.

Los factores que afectan la viscosidad: son las características de la sustancia y la temperatura. Dentro de las características de la sustancia: los gases tienen valores más bajos; líquidos aumenta en la concentración de los solutos, aumenta la viscosidad, es importante tener en cuenta que cuando se aplican métodos como la osmosis inversa, ultrafiltración, u otro tipo de método se concentra los solutos y por consiguiente aumenta la viscosidad.

Todos los líquidos disminuyen la viscosidad cuando aumenta la temperatura, la viscosidad puede cambiar en calentamiento, homogenización y concentración

Los fluidos son sustancias que bajo la aplicación de esfuerzo se deforma continuamente, tipo de fluidos newtonianos y no newtonianos, los fluidos newtonianos, cuando la viscosidad es constante para cierta temperatura (gases, jugos, aceites, jarabes, agua, leche, fluidos simples), obedecen a la ley, el esfuerzo de corte de un fluido newtoniano es igual al producto de su viscosidad, y el gradiente negativo de su velocidad, como la velocidad cambia respecto a la posición del fluido.

Los fluidos no newtonianos son suspensiones coloidales, por ejemplo pinturas, dulce de leche, viscosidad aparente, no fluyen de igual manera, no es lineal la relación entre el esfuerzo cizalla o corte y el gradiente de velocidad.

Esfuerzo y gradiente de velocidad no son lineal. Otros comportamientos reológicos de fluidos:

Los pseudoplásticos: La viscosidad disminuye al aumentar el gradiente de velocidad.

Fluidos dilatantes: La viscosidad aumenta al aumentar el gradiente de velocidad.

Plásticos de Bingham: Es necesario superar un cierto valor o umbral de esfuerzo de corte para que el sistema comience a fluir.

A baja fuerza de cizalla se comporta como sólidos, como la mayonesa.

Fluidos tixotrópicos: La viscosidad disminuye con el tiempo de aplicación del esfuerzo es el caso del yogurt, y la salsa de tomate.

Fluidos reopécticos: La viscosidad aumenta con el tiempo de aplicación del esfuerzo.

Medición: Este emplea el fundamento en que la fuerza requerida para rotar un disco en un fluido es proporcional a la viscosidad del fluido a una velocidad conocida.

La consistencia es diferente a la viscosidad, la consistencia es la propiedad de la materia relacionada con la coherencia entre las partículas de una masa, es una dimensión sensorial en relación con la viscosidad, la evaluación de la consistencia es subjetiva. Es importante conocer la consistencia, varía a su capacidad de fluir y resistir la presión o corte.

Tipos de consistencia: líquida, semilíquida, semisólido, sólida blanda, sólida.

La consistencia líquida generalmente son soluciones en medio acuoso, no tiene forma propia, por ejemplo té, café, agua, jugos de frutos o de compotas, coladas, caldos filtrados.

En el caso de la consistencia semilíquidos no tiene forma propia, dispersión en medio acuosa que tiene mayor resistencia que los líquidos, como los COH, sopas, cremas licuadas, líquidos con espesante, aquellos que con la temperatura disminuyen su viscosidad. Cremas levemente batidas.

En líquido y semilíquidos,  $1\text{cm}^3$  no es igual a un gramo, solamente en el agua.

En relación a la consistencia semisólidos no fluyen, poseen características deformables, son cohesivos (no se disgregan), purés que combinen vegetales amiláceos enriquecidos con carnes, huevos, procesados, postres lácteos (maicena con leche), crema batida, queso untado, líquidos con espesantes comerciales (7,5 - 9%), yogurt batido.

En terapia nutricional adecuada a trastornos de deglución debe ser: homogénea y cohesiva

## Análisis por espectroscopia

La espectroscopia es un grupo de métodos empleados para estudiar las radiaciones de los cuerpos incandescentes, por medio de espectros, refiriéndose a aquellos que adquieren un color por haber sido sometidos a altas temperaturas, carbón o metales, analiza la interacción entre la radiación electromagnética y la materia, con absorción o emisión de energía radiante, es decir se basa en el conocimiento de la frecuencia o longitud de onda que una sustancia puede absorber o emitir energía; esta técnica tiene aplicaciones en muchos campos del conocimiento, con el objetivo de obtener información del cuerpo radiante, como la estructura interna o temperatura, composición o la cinética de una reacción química, y en algunos casos identificación de átomos o moléculas (Ecuación 2).

$$\Delta E = h \cdot \nu \text{ (Ecuación 2)}$$

(Ecuación básica de la espectroscopia diferencia de la energía, donde  $h$  es la constante de Planck ( $6,62607015 \times 10^{-34} \text{Kg.m}^2.\text{s}^{-1}$ ),  $\nu$  es la frecuencia del haz de luz o la onda electromagnética).

La detección de la absorción o emisión de radiación electromagnética a diferentes longitudes de onda, se le denomina espectro, y su interacción con la materia es diferente dependiendo del caso: para rayos X, difracción de electrones, difracción de neutrones, es una interacción de choque elástico. Para la espectroscopia de Raman es un choque inelástico, y para el caso de luz visible es por medio de absorción o emisión resonante de fotones. En el primer caso, es el choque entre dos cuerpos es elástico dado que se conserva la energía cinética total del sistema, el impacto no emite sonido, calor ni deformaciones permanentes en la materia. En el segundo caso, es una colisión y se produce deformaciones permanentes en uno o más de los cuerpos, sonido, calor, alguna forma de pérdida de energía, choque inelástico. Tercer caso la adsorción es la captación de la radiación por la materia, dentro del rango de absorción óptica, regularmente es la más manejada o estudiada en la espectroscopia.

Dentro de las técnicas espectroscópicas reportadas para el análisis están: resonancia magnética nuclear (RMN) (Conte, *et al.*, 2010; Bonanomi, *et al.*, 2013; Talbot, *et al.* 2011), infrarrojo (IR) (Kerr, *et al.* 2013; Joffre, *et al.* 1992), UV y espectrometría de masas (Schneider, *et al.* 2012). El análisis de los datos obtenidos por las diferentes técnicas espectroscópicas mencionadas se hace por quimiometría (Esteves da Silva, *et al.* 1996).

Resonancia magnética nuclear. Estudia de manera no destructiva y rápida las matrices alimentarias, la composición y la estructura interna por medio de imágenes, se ha utilizado para detectar el cambio de factores que determinan la

calidad interna luego de la cosecha, durante el almacenamiento y después de la poscosecha (Aristizabal, 2007). Se fundamenta en el comportamiento de ciertos núcleos atómicos con propiedades magnéticas en presencia de un campo magnético externo (Caro, 2006).

**Espectrometría de masas.** Esta técnica es destructiva y es usada para identificar compuestos desconocidos y cuantificar los conocidos; igualmente sirve para acercarse a la estructura de la molécula, mediante la ionización de la muestra, y fragmentación.

**Infrarrojo.** Espectroscopia de absorción infrarroja (IR), es nombrada así por la región del espectro electromagnético, se encuentra entre  $12800-10\text{ cm}^{-1}$ , este espectro se divide en tres, IR cercano (NIR):  $1200-4000\text{ cm}^{-1}$ , requiere una mínima preparación de la muestra, sin destruirla, aporta un análisis cuantitativo, IR medio:  $4000-400\text{ cm}^{-1}$ , normalmente los equipos contienen el método transformada de Fourier (FT- IR) de haz sencillo; y IR lejano:  $400-10\text{ cm}^{-1}$ , requiere el uso de fuentes y materiales ópticos especiales.

Un espectro IR se obtiene al pasar radiación a través de una muestra y determinar que fracción de esta radiación incidente ha sido absorbida. La energía particular a la que aparece cada pico en el espectro se relaciona con la frecuencia de vibración de una parte de la molécula.

La interacción de la radiación infrarroja con la materia provoca en ésta alteración, (estado vibracional de las moléculas), lo cual se lee como un espectro, característico de cada molécula, razón que el espectro IR es identificable para cada molécula, y se puede comparar con espectros de referencia.

## **4 ANÁLISIS SENSORIAL**

El análisis sensorial es la ciencia que estudia los alimentos y establece el grado de aceptación o rechazo por parte de los consumidores, o utilizando jueces entrenados para fines definidos o alimentos específicos (Quintana, 2016).

En caso de los alimentos específicos, se entrena los panelistas según la normatividad del caso, igualmente para los parámetros, como es el caso de color con la NTC 4604/1999, donde se señala como se debe realizar la prueba, en que instalaciones, con que patrones o tablas patrón, igualmente como cuáles son los equipos permitidos para la automatización de estas pruebas sensoriales. Actualmente existen guías de evaluación sensorial por el Ministerio de salud de tipo analíticas, y tiene disponibles los formatos para la evaluación de varios productos de consumo tradicional en Colombia (Ministerio de Salud, 2015). Dentro de las ventajas que trae el análisis sensorial es el control de calidad de materias

primas y productos finales, pruebas de mercado, desarrollo y lanzamiento de nuevos productos, comunicación a los consumidores de las características, evaluación de las preferencias del consumidor, investigación particular de cualquiera de los aspectos sensoriales pertenecientes al alimento (Torres, 2007).

Generalmente en las fábricas o empresas alimentarias, las pruebas analíticas son el objetivo a alcanzar; sin embargo, siempre es más factible iniciar por las pruebas de consumidores, mediante estudio comparativo de muestras, estudio de aceptación con consumidores, acudiendo a la importancia de las empresas donde su objetivo es estudiar el deseo de los consumidores y convertirlos en ideas concretas para crear nuevos productos que sean del gusto de los consumidores, tanto para niños como para adultos, regularmente para niños se utiliza un tamaño de muestra más grande con el fin de unificar datos (Vanegas, 2012). Es tan importante este tipo de laboratorio y quizás de los más complejos dado que el equipo o instrumento es el mismo humano y no responde de manera homogénea, resalta la importancia para el impacto en el mercado; es así como durante años trabajos relacionado en la preparación de los panelistas, como la adecuación del espacio específico para estas actividades “Laboratorio sensorial” se ha visto implementado en las universidades y en la industria (Urrego, 2009; Torres, 2007).

#### 4.1 Ensayos de evaluación sensorial

En la Figura 8, se muestran los tres tipos de ensayos sensoriales más comúnmente usados, cada uno con diferentes propósitos y realizados por evaluadores seleccionados bajo distintos criterios (Lawless, y Heymann, 2013).

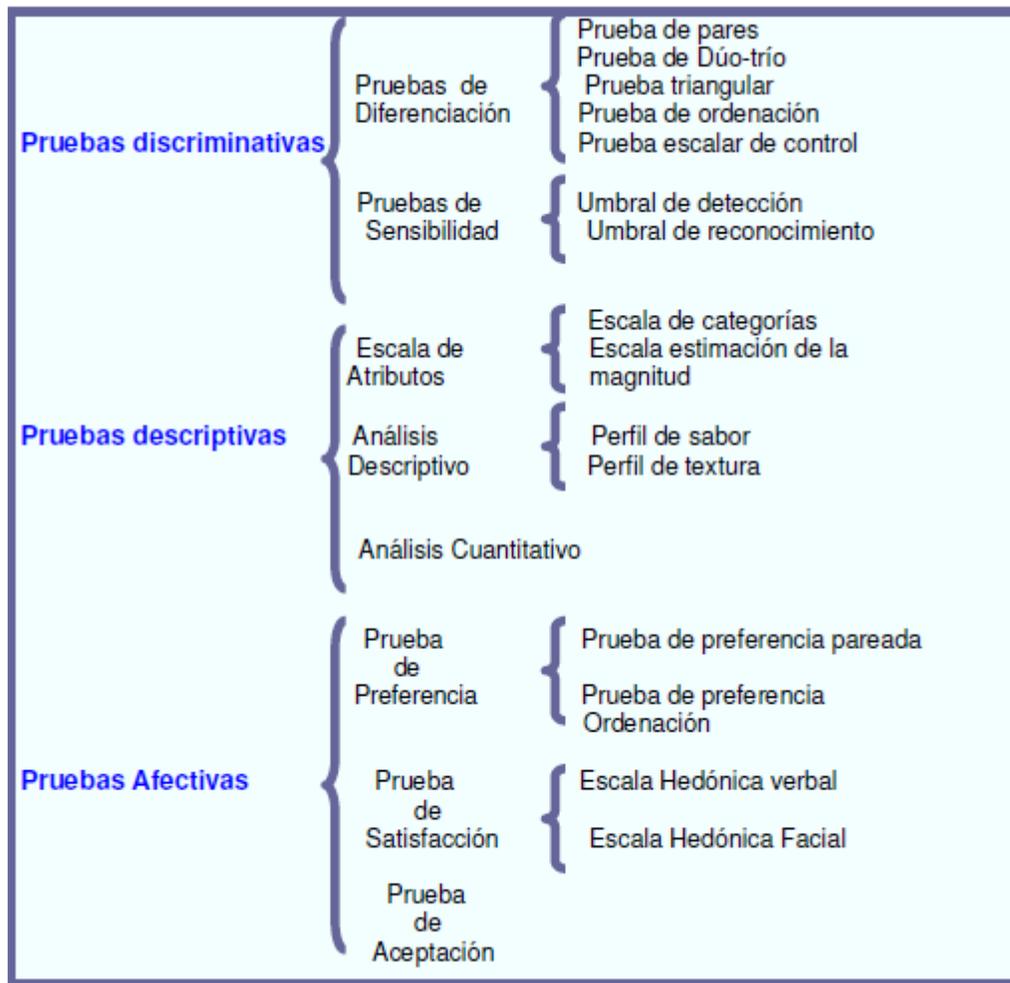


Figura 8. Diagrama de análisis sensorial  
Tomado de Alarcon (2005)

#### 4.2 PRUEBAS SUBJETIVAS O AFECTIVAS.

El análisis por consumidores permite evaluar las condiciones higiénicas acompañadas por el análisis fisicoquímico y microbiológico. Las pruebas afectivas más comúnmente utilizadas son la hedónica que proporciona una medida de cuanto gusta y la de preferencia que determina cuál producto es preferido (Stone, *et al* 2012; Stone, 2015).

Este tipo de pruebas subjetivas, son dirigidas a los consumidores, y se realiza con mínimo 30 consumidores, no exige entrenamiento, no se puede calificar, y regularmente se utiliza escalas hedónicas.

Prueba de aceptación

Las muestras deben ser mínimo una para evaluar, cuando son varias, cada una debe considerarse por separado; este tipo de pruebas no necesita de referencia o muestra patrón, ya que el consumidor utiliza su propio criterio y gusto personal para juzgar la muestra.

Dado que el cerebro tiende a manejar ordenación cuando son inferiores de 100, para este tipo de pruebas se debe enumerar por ejemplo T1: 432, T2: 502, T3: 455

Los jueces afectivos (consumidores) deben mostrar disponibilidad en participar en la actividad por lo que inicialmente se les debe preguntar su disponibilidad.

El objetivo de esta prueba mediante un criterio personal subjetivo, es definir si acepta o rechaza la muestra que se le entrega para su consumo. Se puede realizar de distintas maneras como, ¿Le gusta esta muestra (nombre supuesto de la muestra, sin detalles de ella), ¿Compraría el producto?, ¿Daría este producto a un niño?. Mediante esta prueba solo se obtendrá si es aceptada o rechazada la muestra; sin embargo, no se obtiene la razón de dicha decisión.

#### Análisis de datos

Se cuenta el número de personas que aceptaron la muestra (¿Le gusta mucho?, ¿Le gusta un poco?; contra el número de rechazos (Ni gusta ni le disgusta, le molesta), también se puede expresar por porcentaje de aceptación.

Para la determinación si es estadísticamente significativa la aceptación, se debe recurrir a las tablas estadísticas como la de estimación de significancia  $p=0.05$  de dos colas, de acuerdo con el número de ensayos, si el número de la prueba es menor que el de la Tabla se deduce que la muestra se acepta de manera significativa por esa población.

#### Prueba de preferencia

El objetivo de esta prueba es definir el grado de aceptación y preferencia de un producto, en fin se debe ordenar según la opinión de un grupo de consumidores sobre un producto o varios productos, es también subjetiva o valores de preferencia del consumidor. Se puede utilizar en esta prueba las siguientes afirmaciones, ordene de izquierda a derecha las tres muestras, desde la que tenga mayor preferencia a la menor preferencia; indique en secuencia numerada (1 al 3) el orden de mayor a menor preferencia, o de estas tres muestras cual prefiere (Pedrero, 1997). Las muestras se manejan por lo menos un par, igualmente que

la prueba de aceptación, la población debe ser coherente a los consumidores potenciales (Hernández, 2005).

Entre las pruebas de preferencia se encuentra preferencia – par y la de ordenamiento (Pedrero, 1997); en la NTC 4129/1996, señala ordenamiento y entre sus aplicaciones para preferencia.

En este caso, se puede realizar con mínimo 30 consumidores, en espacios apropiados, con buena luz, lejos de los lugares con comida, poco ruido, temperatura adecuada, se le debe entregar al juez el formato por muestra y se debe disponer de agua, o algún tipo de borrador de sabor.

Ejemplo de formato.

A. ¿Le gustaría participar en una actividad sensorial de tres productos de (nombre del producto, sin entrar en detalle de este)

1. Edad: \_\_\_\_\_ ocupación: \_\_\_\_\_  
Tiene alguna enfermedad considerable: \_\_\_\_\_

2. Instrucciones: Indique con el número correspondiente el orden de menor (=1) a mayor (=3) preferencia, por cada muestra. No se permiten empates.

<b>CÓDIGO: 432</b>	<b>CÓDIGO: 502</b>	<b>CÓDIGO: 455</b>
_____	_____	_____
¿Compraría el producto código 432?	SI _____	NO _____
¿Compraría el producto código 502?	SI _____	NO _____
¿Compraría el producto código 455?	SI _____	NO _____

### 4.3 PRUEBA ANALITICA: Discriminación

Usados para determinar si hay diferencia o similitud entre dos o más muestras que no presentan diferencias obvias y que requieren ser investigadas, en lo cual son rápidos y pueden ser realizados por asesores con o sin experiencia; sin embargo, el panel no debe estar conformado por una combinación de ambos (Kemp, *et al* 2011).

Dentro de los cuales se encuentra *Test de triángulo*, donde se enfrentan dos productos iguales y uno diferente; a los evaluadores se les pedirá seleccionar la muestra diferente de las otras (muestras son iguales). Otro ensayo de diferencia de selección múltiple es el *Duo-Trio*, en este caso una muestra de referencia es entregada junto a dos muestras para evaluar, siendo una de ellas igual a la referencia. Un tercer ensayo es el ensayo de comparación pareada, en el cual se les pide a los participantes que elijan cuál de los dos productos es más intenso para un atributo dado (Lawless y Heymann, 2013).

### 4.4 PRUEBA ANALITICA: Descriptivas

Caracteriza las propiedades sensoriales de un producto, su intensidad y ocurrencia en el tiempo, pudiendo generar una descripción más precisa de un producto, a la vez de poder cuantificar diferencias sensoriales entre muestras (Kemp, *et al.*, 2011; Stone *et al.*, 2015).

El método descriptivo de mayor aplicación es el Análisis Descriptivo Cuantitativo (QDA; *Quantitative Descriptive Analysis*) y está basado en la habilidad que tienen los evaluadores para verbalizar las percepciones de un producto en forma directa y confiable; incluye un procedimiento de entrenamiento formal, el desarrollo y uso de un lenguaje sensorial y la puntuación de productos en varias pruebas para obtener una descripción sensorial cuantitativa (Orjuela, 2017).

Un método que requiere mayor entrenamiento y es usado cuando se quiere evaluar una sola muestra es el denominado **Spectrum**; la caracterización proporciona información sobre los atributos sensoriales percibidos y las intensidades de cada uno de ellos utilizando estándares para cada atributo. (Orjuela, 2017).

El propósito de este método es que los perfiles obtenidos sean entendidos y usados universalmente; proporciona atributos estándar (vocabulario), cada uno con un conjunto de estándares que definen una escala de intensidades,

usualmente de 0 a 15, que puede ser medida con una escala lineal de 15 cm o registrando como números consecutivos (Meilgaard *et al.*, 2006).

#### 4.5 ANÁLISIS SENSORIAL MEDIANTE ATRIBUTOS

En el caso de la evaluación sensorial mediante atributos, y perfiles de panelistas, se debe escoger un tipo de entrenamiento para cualquier tipo de producto a desarrollar o evaluar, es importante conocer la población para la que está dirigido el producto, en el hipotético caso que sea para una población definida como los personas con enfermedad intestinal inflamatorio, pacientes con diabetes, el producto debe cumplir con los requisitos normativos y los parámetros de salud para sacar el producto al mercado (Congote, 2010; Alarcon, 2005).

Generalmente en las fábricas o empresas alimentarias, las pruebas analíticas son el objetivo a alcanzar; sin embargo, siempre es más factible iniciar por las pruebas de consumidores mediante estudio comparativo de muestras, estudio de aceptación con consumidores, acudiendo a la importancia de las empresas donde su objetivo es estudiar el deseo de los consumidores y convertirlos en ideas concretas para crear nuevos productos que sea del gusto de los consumidores, tanto para niños como para adultos, regularmente para niños se utiliza un tamaño de muestra más grande con el fin de unificar datos (Vanegas, 2012). Es importante este tipo de laboratorio; aunque complejos debido al equipo o instrumento utilizado (seres humanos); los cuales no responden de manera homogénea (Urrego, 2009; Torres, 2007).

Al evaluar atributos, el análisis sensorial es de pruebas objetivas, el uso de panelistas hace evaluación analítica. Por lo anterior, es una evaluación analítica mediante pruebas descriptivas.

Para las evaluaciones discriminativa y descriptiva, el panelista debe detectar entre diferencias de los productos mediante un grado de entrenamiento, evitando dispersión en los datos. Los perfiles sensoriales o análisis descriptivos, es donde se evalúan los atributos del producto, son identificados y cuantificados, para lo cual se debe entrenar jueces específicos para el producto como aroma, textura, y gusto (Flores, 2015). Los perfiles sensoriales permiten realizar como una tarjeta de identidad bastante precisa del producto alimenticio mediante el uso de un conjunto de descriptores (Claustrioux, 2001). El ser humano es convertido mediante un periodo de entrenamiento planificado y estructurado en un instrumento de medición fiel y preciso y los descriptores manejan palabras definidas para poder describir el producto y medir mediante una escala sus correspondientes intensidades (Stone *et al.*, 2008; Stone y Sidel, 1993).

#### **Descripción del proceso.**

Existe diferentes tipos de panelistas, experto, son para grupos de alimentos específicos, como cacao, café, vino, queso; entrenado, antes de su entrenamiento es seleccionado, y se debe entrenar en la mayoría de atributos del producto; semi-entrenado, es mediante entrenamiento no exhaustivo y se realizan pruebas preliminares y por último se encuentran los consumidores que son para el tipo de pruebas afectivas. Es importante para la etapa de reclutamiento contar con 30 personas mínimo para la selección de los panelistas para obtener entre 8-11 panelistas (llenar formato de inscripción) (Pedrero, 1997).

Para la generación del panel se debe escoger un líder el cual debe tener conocimiento del tema y es la persona que diseña, y analiza los resultados; es importante que los panelistas escogidos se encuentren entre 18-40 años y además debe ser cumplidor de la reglamentación al momento de la cata, no aplicar perfume, no consumir nada fuerte antes de la cata, (etapa de selección) esta actividad se debe realizar en la media mañana o en la media tarde, en cuanto al producto los empaques deben ser neutros, el número de códigos debe ser aleatorio. Es importante tener el apoyo de la institución para que las personas participantes tengan tranquilidad de asistir y disposición para trabajar el tema. Mediante diferentes test se realiza la selección como test de gustos básicos, test de umbral de reconocimiento, test de ordenamiento de color, test triangular.

El líder debe estar pendiente de minimizar los errores como, errores de tendencia central cuando un panelista no está comprometido con la actividad, errores de contraste, errores de estímulo, errores de fatiga; además de consultar su salud para un referente de sus respuestas.

Por otro lado, es muy importante el sitio de la cata, sino hay laboratorio el líder o el grupo acompañante que apoya el análisis sensorial, organiza las muestras, los formatos entre otros, debe velar por mantener estímulos al mínimo, como mecánicos, térmicos, luminosos, acústicos, químicos y eléctricos.

El entrenamiento consta en enseñar los principios elementales de las técnicas y desarrollar su aptitud para detectar, reconocer y describir los estímulos sensoriales (sabores y olores), deben conocer los conceptos de clasificación con ayuda de una escala, clasificación en categorías, escalas de intervalos y escalas proporcionales y por último, el uso de descriptores.

Se sugiere, realizar entrenamiento a los panelistas cada vez que se pretenda realizar una evaluación sensorial, con el fin de evaluar y verificar la capacidad de un panel para detectar, identificar y medir un atributo, utilizar atributos de una manera similar a otros paneles o evaluadores (Flores, 2015).

En la etapa de selección, los 30 participantes se les aplicará las pruebas generales.

**Test de gustos básicos:** El grupo que apoya el líder preparará 9 soluciones con diferentes concentraciones, 3 por cada preparación, de ácido cítrico, sacarosa y cloruro de sodio. Se buscará la forma de colocar los participantes de espaldas para no tener influencias de gestos y constantemente se pedirá silencio mediante los integrantes del grupo de apoyo.

**Test de umbral:** Se realizarán tres pruebas de determinación de umbral con el objetivo de determinar cuantitativamente el umbral de reconocimiento de los gustos salado, dulce y ácido, mediante concentraciones bajas, se utilizará 10 puntos para cada sabor, el participante deberá decir en cual de los 10 tubos dejó de detectar la solución.

**Test de ordenamiento del color:** Como su nombre lo indica, el participante debe ordenar por color del más intenso al más claro, pruebas que serán organizadas por el grupo de apoyo, y se le entregará al participante una gradilla con diferentes tubos sin organizar.

**Test triangular:** Se le pasará a los participantes un grupo de tres muestras, dos con una leve diferencia, y otra igual a una de ellas para que la reconozca el participante.

Después se deberá evaluar los resultados, desde el compromiso de los participantes como las respuestas en los test, los cuales se esperan que tengan un porcentaje mayor al 60%.

Mediante escala no estructurada Figura 10, se medirá los siguientes atributos, los cuales corresponden a productos elaborados a base de frutas. Aspecto: color, sabor: dulzor, acidez, tipicidad, textura: consistencia, olor: tipicidad. El atributo tipicidad hace referencia al sabor natural de la fruta. Cada atributo se le asignará un valor de 5 (máximo), en la escala horizontal de longitud de 12 cm.

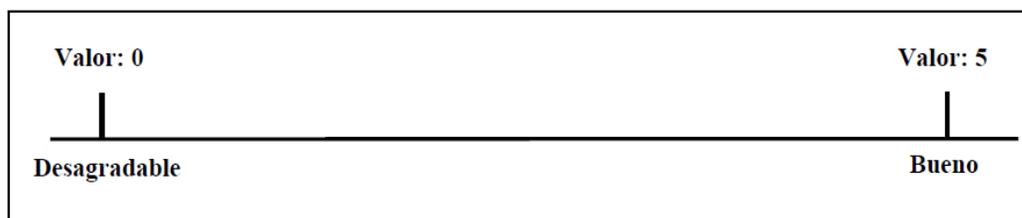


Figura 9. Escala no estructurada con valor máximo de 5

#### 4.6 ESQUEMA DE EVALUACION SENSORIAL- ATRIBUTOS A EVALUAR – PERFILES DE LOS PANELISTAS – DISEÑO ESTADÍSTICO

##### 1. Conformar el panel de evaluadores

1.1 Escoger mínimo 30 personas según encuesta (disponibilidad de tiempo, gusto por el fruto objeto de estudio, fumadores o no, consumo de bebidas alcohólicas y/o sustancias psicoactivas o no, discapacidad o no)

1.2 Seleccionar un grupo 11 personas con mejor capacidad de percibir dulzor y acidez, según prueba de ordenación de muestras variando intensidad del atributo (dulzor y acidez). Considerar diferentes funcionarios de la Institución.

1.2.3 Perfil de panelistas. Para ser juez experto o entrenado se consideraría adicionalmente del numeral 1.1 y 1.2, tener disciplina en no consumo de alimentos picantes, no fumar, no usar lociones, perfumes o similares previo a la prueba sensorial, tener puntualidad, seguir instrucciones en la degustación y tener alto grado de concentración durante la prueba sensorial.

1.3 Explicar objetivo de la prueba y fundamentación teórica de los atributos (Tabla 1) por evaluar sensorialmente, en este caso prueba sensorial descriptiva cuantitativa (Urrego, 2009)

**Tabla 1. Atributos sensoriales evaluados**

<b>Característica organoléptica</b>	<b>atributo</b>
Aspecto	Color
Sabor	Dulzor
	Acidez
	Típico*
Textura	Consistencia**
Olor	Típico

\*Afinidad de la formulación con respecto a la pulpa del fruto, \*\* grado de espesura de la formulación

1.4 Elaboración de los productos a desarrollar

1.5 definir condiciones de evaluación sensorial

Área de prueba (no interacción de jueces durante la prueba), preparación y temperatura de muestras, horario de pruebas, errores frecuentes, recipientes, cantidad de muestra para degustación, hoja de respuesta (escala no estructurada)

hasta 5 en línea de 10 cm de longitud; 0 malo y 5 excelente) y forma de responder, codificación de muestras).

#### 1.6 Definir medida y forma de calificación

Determinar medida como la distancia (cm) en la escala no estructurada y calificación como el valor que se obtiene de multiplicar medida por 5/10

#### 1.7 Determinar evaluación cualitativa según calificación (Tabla 2)

**Tabla 2. Evaluación cualitativa según calificación de las formulaciones del producto a desarrollar**

<b>Evaluación cualitativa</b>	<b>Calificación</b>
Excelente	4,1-5
Bueno	3,1-4,0
Aceptable	2,1-3,0
Insuficiente	1,1-2,0
Malo	<1

#### 1.8 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de las características según Urrego (2009), sugiere que los atributos sensorial sean evaluados mediante análisis de varianza (ANOVA) de una vía y prueba LSD de Fisher para estimar las diferencias significativas entre los valores promedio (con error estándar) de los atributos de las formulaciones para un 95% de confianza ( $P > 0,05$ ). Sin embargo se puede utilizar el mejor convenga para el investigador.

#### 1.9 Reporte de informe final de análisis sensorial

Entrega de reporte final y toma de decisiones deberá ser entregada al responsable de la Institución o Empresa usuaria. Se recomienda conocer *a priori* (mediante encuestas) o *a posteriori* (mediante técnicas estadísticas como Análisis de Componentes Principales, análisis de correspondencia, análisis de conglomerados, correlaciones canónicas entre otras) el grado de importancia de cada atributo sensorial evaluado por los jueces.

#### Formato de inscripción

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

¿Estaría usted dispuesto a participar en el proceso de selección y entrenamiento de jueces para formar un panel de evaluación sensorial?

SÍ \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_

Enfermedad preexistente: \_\_\_\_\_ Fuma: SI \_\_\_ NO \_\_\_ ocasionalmente: \_\_\_\_\_

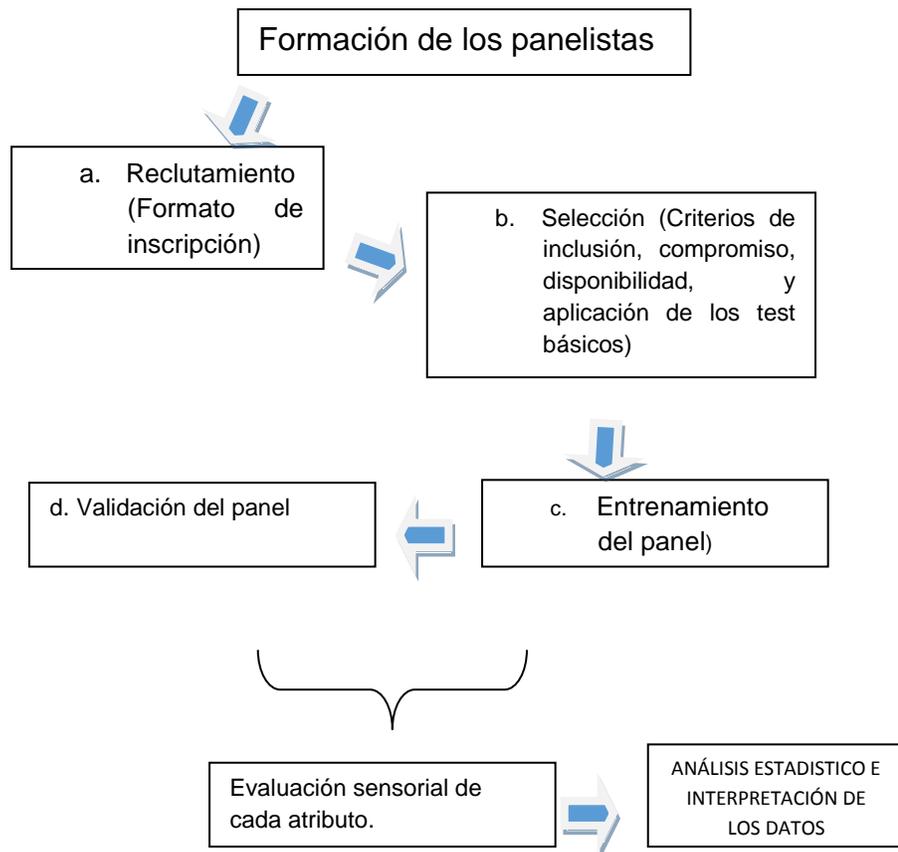
Bebe alcohol: SI \_\_\_ NO \_\_\_ ocasionalmente: \_\_\_\_\_

Toma medicamentos: \_\_\_\_\_ Sabores predilectos: \_\_\_\_\_

Olores predilectos: \_\_\_\_\_

## DIAGRAMA DE PROCEDIMIENTO DE UNA FORMACIÓN DE PANEL DE CATACIÓN

DIAGRAMA:



## 5 NORMATIVIDAD

Los alimentos funcionales a pesar de estar presente desde hace años, su legislación aún no es atendida por los Entes Gubernamentales. Japón, es el único país que ha formulado un proceso regulatorio específico para la aprobación de alimentos funcionales. Conocidos como alimentos para uso específico de salud (Foods for Specified Health Use o FOSHU), estos alimentos son elegibles para llevar un sello de aprobación del Ministerio de Salud y Bienestar, cerca de 150 productos tienen licencia.

FOSHU en el Japón. El primer alimento funcional como producto, fue aprobado en 1993 que solucionaba los problemas de salud que más incidían en su población y desde esa fecha se han creado numerosos productos (Pérez, 2006). Según datos recientes, la inclusión de los alimentos funcionales aumenta cada año en un 16% (Luengo, 2007).

Estados Unidos de Norteamérica desde el año 1993 permite alimentos con diferentes características a las cuales se les denominan alegaciones (health claims), indicando que reducen el riesgo de padecer enfermedades. La FDA estadounidense (Food and Drug Administration) autoriza la utilización de los denominados *health claims*.

Aunque existe diferentes consideraciones desde el año 1990 por NLEA (Nutritional Labelling and Education Act), estableció criterios para la rotulación de alimentos, autoriza indicaciones para alimentos solamente en una condición de relación nutriente-disfunción y cuando esté científicamente comprobado. DSHEA (Dietary Supplements Health and Education Act), reglamenta los suplementos nutricionales y sus ingredientes, acepta alegaciones generales, estructurales y de función fisiológica, determina el uso obligatorio de frases alertando que un producto no se destina a tratar, curar o prevenir enfermedades. En el otro extremo la Unión Europea creó la Comisión Europea de Acción Concertada sobre Bromatología Funcional en Europa (Functional Food Science in Europe, FUFOSSE), programa coordinado por el Instituto Internacional de Ciencias Biológicas [International Life Sciences Institute (ILSI) Europe], con el objetivo de estudiar las pruebas necesarias para dar solvencia a desarrollo de los productos alimenticios (Luego, 2007).

La globalización del aumento en la comercialización de alimentos funcionales ha conllevado al desarrollo de normatividad mundial enfocada a la protección del consumidor frente a caracteres erróneos o confusos.

Por parte de la Functional Food Science in Europe (FUFOSSE), desde 1999 ha estudiado los alimentos con beneficios adicionales para la salud, y sus criterios, seguidos por la FDA y Códex (Alvarado, 2015). Japón es precursor sobre el concepto de alimento funcional, y se ha incluido dentro de su legislación, más de

300 alimentos en la categoría FOSHU; además, todos los productos alimentarios que logren esta categoría son identificados en su etiqueta con el símbolo Foshu (Alvarado, 2015).

Para la FOSHU, éste grupo de alimentos son aquellos que han sido procesados y poseen ingredientes que favorecen las funciones metabólicas e incluyen propiedad nutritiva; a comparación de la Comunidad Europea que no determina su obligatoriedad como nutriente, pero si su efecto selectivo sobre funciones fisiológicas saludables sobre el organismo; mientras que la Academia Nacional de Ciencias en Estados Unidos los cataloga como alimentos modificados que tienen ingredientes con acciones que incrementen la salud del individuo o que minimizan los riesgos ante el padecimiento de enfermedades; en el caso entidades latinas que los referencia como alimentos procesados o no con compuestos benéficos sobre la salud dentro de esta categoría, según el Instituto de Nutrición y Tecnología de Alimentos en Chile (SERNAC, 2004).

Según la Carta Circular CL 2003/42-NFSDU del Códex, plantea la importancia de categorías funcionales para los alimentos, con ello la de alimentos funcionales enfatizando su prioridad, no considerándose en su totalidad diferente a otros alimentos, por el contrario declarándolos dentro del contexto de propiedades saludables (FAO, 2006).

La normativa “Declaraciones Nutricionales y Saludables” (CAC/GL 23-1997) del Codex. Se entiende como declaración de propiedad saludable, la representación existente entre un alimento y la salud; incluyendo las funciones de los nutrientes, propiedades de las funciones y riesgos de enfermedad. Para lograr la autorización de estas propiedades debe cumplirse con: bases científicas que establezcan el efecto a alegar (beneficioso) y la relación con la salud; aceptabilidad por los entes competentes del país; beneficio tras el consumo del alimento en una dieta saludable; mención de los nutrientes que atribuyen el beneficio; y mención de los nutrientes que tengan valores de referencia en el Codex (FAO, 1997).

Japón es un país que no cuenta con normativa específica sobre el tema, sin embargo; el gobierno japonés ha promovido el desarrollo de alimentos que beneficien la salud de las personas tras la post guerra que ocasionó el aumento de enfermedades crónicas no transmisibles. Para el año 1987 los alimentos funcionales se reconocieron legalmente por el Ministerio de Salud, Trabajo y Bienestar de Japón; años después se reglamenta el “Tokuhō” o FOSHU, estos alimentos con componentes que cumplen funciones sobre la salud, que al comercializarse protegen la seguridad del alimento y efectividad en el bienestar corporal. Todo producto dentro de esta categoría es aprobado por el Ministerio de Salud, Trabajo y Bienestar de Japón siempre y cuando cumpla con los siguientes requisitos: evidencia comprobada del efecto sobre la salud, ausencia de efectos negativos en cuanto a seguridad alimentaria, ingredientes nutricionales adecuados, indicaciones de tiempo de consumo y garantía del producto, y metodología para el análisis de control de calidad (Durán & Valenzuela, 2010).

Aunque existe diferentes consideraciones desde el año 1990 por NLEA, se estableció criterios para la rotulación de alimentos, autoriza indicaciones para alimentos solamente en una condición de relación nutriente-disfunción y cuando esté científicamente comprobado. DSHEA reglamenta los suplementos nutricionales y sus ingredientes, acepta alegaciones generales, estructurales y de función fisiológica, determina el uso obligatorio de frases alertando que un producto no se destina a tratar, curar o prevenir enfermedades. En el otro extremo la Unión Europea creó la Comisión Europea de Acción Concertada sobre Bromatología Funcional en Europa FUFOSE, programa coordinado por el Instituto Internacional de Ciencias Biológicas [International Life Sciences Institute (ILSI) Europe], con el objetivo de estudiar las pruebas necesarias para dar solvencia a desarrollo de los productos alimenticios (Bellisle *et al.*, 1998; Luengo, 2007).

En el Reglamento CE 1924 de 2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, se han dictado las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos; donde las segundas, son las declaraciones que indican la relación entre los diferentes alimentos, y sus componentes frente a la salud, que induzcan a la reducción del riesgo de enfermedades. Entre las condiciones específicas de las declaraciones de propiedades saludables están: prohibición de las declaraciones que no cumplan con los requisitos generales y específicos; permiso de las declaraciones que incluyan en el etiquetado, presentación y/o publicidad, importancia de dietas variadas y equilibradas, cantidad de consumo para obtener efecto benéfico declarado, restricciones a tipos de personas frente al consumo del producto, y advertencia ante su consumo excesivo; e indicar los beneficios generales del alimento para gozar de buena salud (BOE, 2006).

Estados Unidos es uno de los mercados más importantes en lo relacionado a alimentos funcionales puesto que cuenta con instituciones que aseguran el cumplimiento de las Normas y Leyes, acogiendo el consumo masivo del consumidor y su conciencia social. La FDA es la máxima autoridad de Regulación Alimentaria y sus responsabilidades en materia de alimentos son tomadas por el “Centro para la Seguridad Alimentaria y la Nutrición Aplicada” (CFSAM), quienes son responsables de garantizar y fomentar la protección de la salud pública, garantizando alimentos seguros y saludables. Entre las declaraciones a presenciar en las etiquetas se tendrá información sobre la descripción de los efectos y su correcto funcionamiento del organismo; e información sobre disminución de riesgos en salud, indicando la relación entre los compuestos de los alimentos y trastornos fisiológicos que hayan sido comprobados científicamente por la FDA.

Por otra parte, entre los países Latinoamericanos que cuentan con legislación relacionada sobre alimentos funcionales están Chile, México, Venezuela y Colombia. El Reglamento Sanitario de los Alimentos, Decreto 977 de 1996 para la República de Chile se encuentra contemplada la declaración de propiedades saludables de los alimentos, los cuales deben contener en el rotulado las propiedades nutritivas, prohibiendo declaraciones medicinales, señalado en el

artículo 114, las declaraciones saludables deben ser aprobadas por la ciencia y reconocidas mundialmente como dispone el Ministerio de Salud; sin hacer alusión a falsedad, ni propiedades protectoras ante enfermedades; y como se señala en el artículo 505, no deben incluir estas declaraciones en alimentos infantiles; de igual forma el artículo 536 prohíbe la promoción del consumo con fines de diagnóstico, prevención o tratamiento de enfermedades (Reglamento Sanitario de los Alimentos, 1996).

Para México, la Norma Oficial Mexicana, NOM-051-SCFI-1994 establece las especificaciones generales de etiquetado para alimentos y bebidas no alcohólicas preenvasados, con objetivo principal brindar la información comercial a contener en el etiquetado de alimentos y bebidas no alcohólicas con fabricación a nivel nacional e internacional. Mencionando en el numeral 3.9 la declaración de propiedades que indican que el alimento o bebida no alcohólica contiene valores especiales por sus nutrimentos; tal declaración nutricional deberá hacerse siempre y cuando se declare cuantitativa o cualitativamente las propiedades nutricionales (Norma Oficial Mexicana, 1994). “Proyecto de Norma Oficial Mexicana” PROY-NOM086-SSA1/SCFI-2011 establece las declaraciones de propiedades nutrimentales y saludables para alimentos y bebidas no alcohólicas con o sin modificaciones en su composición, modificaría la Norma Oficial Mexicana mencionada con anterioridad; la cual incluye las disposiciones para declaración de propiedades nutrimentales (Morán, 2016).

Venezuela, cuenta con la Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN) y su Norma NVC 2952-1:1997 sobre las directrices para la declaración de propiedades nutricionales y salud en el entorno de los alimentos envasados; cumpliendo con el objeto de establecer las directrices a cumplir frente a la declaración de propiedades nutricionales y de salud de los alimentos envasados nacionales e importados (Caldera, 2013).

Por el contrario, Colombia no cuenta con legislación específica que regule los alimentos funcionales, existen regulaciones alimentarias enfocadas a las propiedades adicionales para el bienestar corporal.

La expansión del mercado de estos alimentos conllevó al surgimiento de la Resolución 11488 de 1984 del Ministerio de Salud que brinda temática sobre el procesamiento, composición, requisitos y comercialización de alimentos infantiles, productos enriquecidos y alimentos dietéticos; años después la Resolución 11961 de 1989 involucra el tratamiento de leche con incorporación de cultivo *Bifidobacterium*; seguido del Decreto 1944 de 1996, que estipula la obligatoriedad de las harinas de trigo fortificadas con vitaminas del complejo B1 y B2, niacina, hierro y ácido fólico, y sus parámetros de comercialización, rotulado, vigilancia y control. Ahora bien, la Resolución 485 de 2005 en su capítulo 2 sobre rotulado o etiquetado de alimentos, el artículo 4 plantea que los alimentos envasados no deben declarar en el rotulado, palabras, ilustraciones y graficas que atribuyan propiedades medicinales, preventivas o curativas que desencadenen en la

falsedad de la calidad del producto (Universidad EAN, 2016). En el Decreto 3249 de 2006 se proyecta la reglamentación sobre suplementos dietarios, en su artículo 6 se actualizan las declaraciones de propiedades nutricionales o de apoyo nutricional y en salud, donde el producto: debe contar con rigor científico desde el perfil epidemiológico, hacer mención a una dieta equilibrada y saludable, brindar información clara, no inducir como única ingesta diaria, mencionar efectos adicionales que interfieran con la salud, e indica los factores que desencadenen en trastornos metabólicos (Ministerio de Protección Social, 2006). La creación de la Resolución 288 de 2008 del Ministerio de la Protección Social, establece los requisitos del etiquetado nutricional a cumplir por los alimentos envasados, implantando las condiciones para efectuar la declaración de propiedades nutricionales o de salud del alimento (IA Alimentos, 2015); y finalmente, los requisitos de rotulado nutricional se evidencia en la Resolución 333 de 2011, incluyendo aspectos como: declaraciones nutricionales y sus propiedades, y declaraciones de propiedades en salud (IA Alimentos, 2017).

La incursión de los alimentos funcionales trae consigo los productos alimentarios adicionados con probióticos, sus concentraciones varían conforme la legislación tomada por cada país. Su importancia crece considerablemente conforme a la conciencia del consumidor sobre los beneficios positivos en el organismo.

La FAO y la OMS definen a los probióticos como microorganismos vivos que al ser administrados en cantidades apropiadas en los alimentos brindan beneficios a la salud, éstos deben sobrevivir al tránsito por el sistema digestivo y proliferación en el intestino; su dosificación y duración debe realizarse bajo fundamento científico (FAO & OMS, 2006). De igual forma, la FDA los reconoce como productos biológicos vivos o bioterapéuticos vivos, que aporta beneficios ayudando a tratar y prevenir trastornos del metabolismo.

El Codex Alimentarius como ente Internacional, plantea la regulación de las leches fermentadas en la Norma CODEX STAN 243-2003, las cuales deben contar con cultivos específicos de especies *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, y *Lactococcus* para su fermentación; la composición de estos microorganismos en leche fermentada y yogur debe ser mínimo de  $10^6$  UFC/g (Codex Alimentarius, 2010).

El Reglamento (UE) 1169 de 2011 del Parlamento Europeo y del Consejo, incluye como nutriente a las vitaminas y sus porcentajes de consumo por 100g o 100ml del alimento, como también la obligatoriedad de la declaración en las etiquetas. En su anexo 13, se postulan la ingesta diaria y valores de referencia para adultos, declarando las vitaminas A, D, E, K, C, B1, B2, B3, B5, B6, B9, B12, y biotina, con concentraciones de 800 µg, 5 µg, 12 mg, 75 µg, 80 mg, 1.1 mg, 1.4 mg, 16 mg, 6 mg, 1.4 mg, 200 µg, 2.5 µg, y 50 µg respectivamente. Para considerar cantidades significativas respecto a los valores referenciados, las vitaminas cumplir con el 15 % por 100 g o 100 ml en sólidos, 7,5 % por 100ml en bebidas, y 15 % para

alimentos con una porción (BOE, 2011). Para la “Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria” (EFSA), los niveles máximos de ingesta admisible de vitaminas para adultos excluyendo gestantes son: 1 mg, 10 mg, 900 mg, 3000 µg, 25 mg, 100 µg y 300 µg en vitaminas B9, ácido nicotínico, nicotinamida, vitamina A, vitamina B6, vitamina D y vitamina E correspondientemente (EFSA, 2006). Ya bien, España indica una ingesta habitual diaria de componentes bioactivos en las cantidades: 1.3 mg, 1 mg, 0.5 mg, 0.1 mg, 25 mg y 23 mg para licopeno, β-caroteno, luteína, zeaxantina, flavonoides y quercetina en orden (Martínez & Carbajal, 2017).

Para el “Servicio Nacional del Consumidor” (SERNAC) del Gobierno de Chile, son componentes activos funcionales, y los microorganismos incluidos con tal efecto deben cumplir con ciertas condiciones: estar presentes de forma natural en la microbiota intestinal, ser resistentes al tránsito digestivo, contar con capacidad para adherirse a la mucosa intestinal, y no ser patógenos (SERNAC, 2004).

Igualmente, el Comité del Codex sobre Nutrición y Alimentos para Regímenes Especiales (CCNFSDU), en el numeral 2.5.6. del anteproyecto de directrices para alimentos terapéuticos listos para el consumo, identifican la adición de probióticos siempre y cuando sea un ingrediente opcional con previa comprobación científica de su validez y estabilidad (FAO & OMS, 2016). De igual importancia, el mismo Comité del Codex, incorporó el programa “International Probiotics Association” sobre las directrices armonizadas del uso de probióticos en alimentos y complementos alimenticios, quien autorizará las cepas probióticas para alimentos. Entre los requisitos evaluativos de las bacterias estará: microorganismo prebiótico como ingrediente alimentario: caracterización taxonómica y de la cepa (*in vivo* e *in vitro*), evidencia de las propiedades funcionales e inocuidad ante el uso; y alimentos probióticos: concentración del microorganismo de  $10^9$  UFC por porción hasta la finalización de la etapa de conservación, supervivencia durante el periodo de conservación, declaración de los beneficios fisiológicos y nutricionales de los alimentos, y combinación de varias cepas (FAO & OMS, 2018).

En Uruguay, la Normativa MERCOSUR/GMC/RES 47 de 1997 reglamenta la calidad de leches fermentadas; siendo adicionadas con cultivos de especie *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium* y otras bacterias ácido lácticas que atribuyen características al producto final. Como requisito en el recuento de estas bacterias específicas se tiene para el yogur, leche acidófila o acidofilada, kefir, y kumis una concentración mínima de  $10^7$  UFC/g; y para la leche fermentada y coajada, un recuento mínimo de  $10^6$  UFC/g; al emplearse *Bifidobacterium* la concentración será de  $10^6$  UFC/g mínimo (MERCOSUR, 1997).

En cuanto al “Código Alimentario Argentino” (CAA) toma a los probióticos como ingredientes alimentarios, y pauta en su capítulo 17 los alimentos de régimen especial o dietéticos, indicando en el artículo 1389 el protocolo para la evaluación de un probiótico como ingrediente en alimentos, y con ello el cumplimiento de los

requisitos mínimos de identificación de la cepa, caracterización y ensayos *in vitro* e *in vivo*, seguridad para la salud, pruebas complementarias (resistencia a antibióticos, actividad hemolítica y segregación de toxinas), e identificación comercial de las cepas con concentración en un tiempo mínimo de  $10^6$  y  $10^9$  UFC/g (Código Alimentario Argentino, 2018).

A nivel Colombiano, existe variedad en legislación relacionada al procesamiento de alimentos con adición de probióticos. En la Resolución 11961 de 1989 se clasifican las leches fermentadas, incluyendo la cultivada con *Bifidobacterium sp.*, la cual es higienizada coagulada por acción de *Bifidobacterium sp.*, *Lactobacillus acidophilus* y otros microorganismos ácido lácticos; éste tipo de leche debe contener como mínimo  $10^5$  UFC/g del producto (Ministerio de Salud, 1989). Seguidamente, la NTC 805 de 2005 plantea los requisitos a cumplir por las leches fermentadas con uso de bacterias probióticas, y como se define en el numeral 4.3. éstas contienen microorganismos específicos como: *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* y *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*, *Lactococcus lactis subsp. cremoris* y *Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Bifidobacterium sp.* o *Lactobacillus acidophilus*, que están presentes hasta la terminación de la vida útil del alimento; y sus concentraciones serán mínimo de  $10^6$  UFC/g para yogur, kumis y leche cultivada, y  $10^5$  UFC/g para bebidas lácteas a base de leche fermentada (ICONTEC, 2005). Posterior, en la Resolución 3096 de 2007 que enuncia en su artículo 20 las declaraciones de propiedades de otras funciones diferentes a las nutricionales; englobando a los probióticos, en el cual los *Lactobacillus* deben estar vivos y ser resistentes a las segregaciones ácidas estomacales y demás del tracto digestivo, contando con un recuento mínimo de  $10^6$  UFC/g en el producto final (Ministerio de Protección Social, 2007). Después la Resolución 288 de 2008 en el artículo 22, trata las declaraciones de propiedades de otras funciones permitidas que abarcan los probióticos en función digestiva y del sistema inmunitario, cumpliendo con el requisito de  $10^6$  UFC/g mínimo en los productos terminados (Ministerio de Protección Social, 2008). Derogado por la Resolución 333 de 2011 declara las propiedades de otras funciones en cuanto a los probióticos con acción digestiva y de concentración superior a las  $10^6$  UFC/g del alimento (Ministerio de Protección Social, 2011).

En la alimentación funcional las sustancias bioactivas son compuestos que tienen efecto sobre la actividad celular y fisiología metabólica, aportando beneficios para la salud (Martínez & Carbajal, 2017).

La normatividad Colombiana sobre sustancias bioactivas se refleja en la Resolución 4124 de 1991, Resolución 288 de 2008 y Decreto 3863 de 2008.

La Resolución 4124 de 1991 define a los antioxidantes como sustancias que retrasan o eliminan la aparición de reacciones oxidativas de los alimentos, y enuncia los usados en productos alimenticios en el artículo 2; de concentraciones exactas está el ácido ascórbico, ter-butilhidroquinona (TBHQ), butilhidroxianisal (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), citrato de isopropilo, citrato de monoglicerilo,

estereato de ascorbilo, galatos (de dodecilo, acrilo y propilo), palmitato de ascorbilo, tiodiopropianato de dilaurilo con 500 mg/kg, 200 mg/kg, 200 mg/kg, 200 mg/kg, 100 mg/kg, 100 mg/kg, 500 mg/kg, 100 mg/kg, 500 mg/kg, y 200 mg/kg respectivamente (Ministerio de Salud, 1991).

En cuanto a la Resolución 288 de 2008, se señala los valores diarios de referencia vitamínica en niños mayores a 4 años y adultos; incluyendo las vitaminas A, C, D, E, B1, B2, B3, B6, B9, B12, y K  $\mu\text{g}$  con 5000 UI, 60 mg, 10  $\mu\text{g}$ , 20 mg, 1.5 mg, 1.7 mg, 20 mg, 2 mg, 400  $\mu\text{g}$ , 6  $\mu\text{g}$ , y 80  $\mu\text{g}$  correspondientemente (Ministerio de Protección Social, 2008).

En el anexo 1 del Decreto 3863 de 2008, se dan los valores de referencia diarios de vitaminas para niños mayores a 4 años y adultos, especificando las vitaminas A, D, E, K, C, B1, B2, B3, B6, B9, B12, y biotina de concentraciones 1500  $\mu\text{g}$ , 10  $\mu\text{g}$ , 20  $\mu\text{g}$ , 80  $\mu\text{g}$ , 60 mg, 1.5 mg, 1.7 mg, 20 mg, 2 mg, 400  $\mu\text{g}$ , 6  $\mu\text{g}$ , y 300  $\mu\text{g}$ . Así mismo, en el anexo en mención se identifican los niveles máximos de consumo tolerable para adultos; de los cuales están las vitaminas A, D, E, K, C, B1, B2, B3, B6, B9, B12, biotina y  $\beta$ -caroteno de límites 3000  $\mu\text{g}$ , 50  $\mu\text{g}$ , 1000  $\mu\text{g}$ , 1000<sup>3</sup>  $\mu\text{g}$ , 1000 mg, 100<sup>4</sup> mg, 40 mg, 35 mg, 100 mg, 1000  $\mu\text{g}$ , 2000<sup>5</sup>  $\mu\text{g}$ , 900  $\mu\text{g}$ , y 7<sup>2</sup> mg (Ministerio de Protección Social, 2008).

## EDULCORANTES

El *Codex Alimentarius* reglamenta los aditivos para alimentos en la Norma CODEX STAN 192 de 1995, incluyendo la clase funcional edulcorantes y dosis máximas, que serán mencionadas en función de productos cremogenados. *Acesulfame de potasio* en confituras, jaleas y mermeladas con 1000 mg/kg; productos para untar a base de fruta con 1000 mg/kg; preparados y postres de frutas con 350 mg/kg; néctares y concentrados para néctares de frutas con 350 mg/kg. *Alitame* en confituras, jaleas y mermeladas con 100 mg/kg. *Aspartamo* en confituras, jaleas y mermeladas con 1000 mg/kg; productos para untar a base de fruta con 1000 mg/kg; preparados y postres de frutas con 1000 mg/kg; néctares y concentrados para néctares de frutas con 600 mg/kg. *Ciclamato de calcio, ciclamato de sodio y ácido ciclámico* en confituras, jaleas y mermeladas con 1000 mg/kg; productos para untar a base de fruta con 2000 mg/kg; preparados y postres de frutas con 250 mg/kg; néctares y concentrados para néctares de frutas con 400 mg/kg. *Glicósidos de esteviol*, incluyendo la de *Stevia rebaudiana* Bertoni y Rebaudiósido A; en confituras, jaleas y mermeladas con 360 mg/kg; productos para untar a base de fruta con 330 mg/kg; preparados de frutas con 330 mg/kg; postres de frutas con 350 mg/kg; y néctares de frutas con 200 mg/kg. *Neotamo* en confituras, jaleas, mermeladas, y productos para untar a base de fruta con 70 mg/kg; preparados y postres de frutas con 100 mg/kg. *Sacarinas*, y de tipo calcio, potasio y sodio; en confituras, jaleas y mermeladas, productos para untar, y preparados de frutas o a base de ellas con 200 mg/kg; postres de fruta con 100 mg/kg; néctares y concentrados para néctares de frutas con 80 mg/kg. *Sal de aspartamo* y

*acesulfamo*, en confituras, jaleas y mermeladas con 1000 mg/kg; preparados y postres de fruta con 350 mg/kg.

*Sucralosa* (triclorogalactosacarosa) en confituras, jaleas, mermeladas, productos para untar, preparados y postres de frutas con 400 mg/kg; néctares y concentrados para néctares de frutas con 300 mg/kg (FAO & OMS, 1995).

La norma general del Codex para aditivos alimentarios también abarca una serie de edulcorantes permitidos sin determinación de concentraciones máxima y con cumpliendo obligatorio de las Buenas Practicas de Fabricación (BPF); entre ellos el eritritol, isomaltol, lactitol, maltitol y sorbitol (acogiendo los jarabes de los mismos), manitol, jarabe de poliglicitol, taumatina, y xilitol (FAO & OMS, 1995).

El Anteproyecto de Especificaciones de Identidad y Pureza de los Aditivos Alimentarios informa el cambio de nombre del edulcorante glucósido de esteviol por glucósido de esteviol de *Stevia Rebaudiana* Bertoni (FAO & OMS, 2017).

Los glicosídeos de esteviol deben ser un aditivo primario para todos estos glicósidos que tengan igual ingesta diaria admisible (IDA); para ello se propone crear un aditivo producido con microorganismos, y de nombre principal glicósidos de esteviol por fermentación y microbianos, sin hacer referencia a Rebaudósido A de múltiples donantes expresado en *Yarrowia lipolytica* debido a la producción de otros glicósidos de esteviol por procesos fermentativos. En otro sentido, pensando en los consumidores al elegir edulcorantes de origen vegetal natural, se añade la palabra *Stevia* al nombre botánico para evitar inconvenientes en su selección (FAO & OMS, 1989).

En Normativa Colombiana, la Resolución 1618 de 1991 permite el uso como edulcorantes artificiales para Aspartame y Sacarina junto con sus sales de calcio, potasio y sodio; con una IDA de 0 a 15 mg/kg de peso corporal. El empleo de edulcorantes artificiales debe respetarse por uso dietario especial, al ser utilizado únicamente para alcanzar caracteres físicos deseados en el alimento que no lograría el azúcar o edulcorantes nutritivos, con ello regulando la ingesta calórica disponible (INVIMA, 2009). Los alimentos y bebidas que sean reemplazados con Aspartame por Sacarosa, sin reducción del contenido calórico en un 35 %, no se considerarán alimentos dietéticos; aclarados en el parágrafo 2 de la Resolución 1618 de 1991; así mismo el nivel máximo en bebidas dietéticas para ambos edulcorantes es de 40 y 400 mg/kg respectivamente (Ministerio de Salud, 1981). En el documento técnico de azúcares adicionados, se referencia la *Stevia* como edulcorante natural acalórico, al igual que la Taumatina, Pentadina, Monelina y Brazzaína.

## CREMOGENADO

La regulación de cremogenados es amplia a nivel mundial y dicta parámetros específicos para cada organización y país.

El *Codex Alimentarius* en la Norma CODEX STAN 17-1981 reglamenta el puré de manzanas en conservas, y lo define como el preparado de manzanas limpias y sanas del fruto *Malus domestica Borkhausen* con tratamiento térmico previo a su envasado; con sólidos solubles totales superiores o iguales a 16.5° Brix de ser endulzado, y 9.0° Brix sin endulzante. Su composición básica son manzanas con posible adición de cloruro de sodio, especias, azúcar y agua; contando con características de calidad para color, sabor y olor, normales y de textura ideal. El ácido málico, ácido cítrico, ácido áscorbico y ácido eritórico, son los acidificantes y antioxidantes permitidos como aditivos alimentarios en el puré de manzanas (*Codex Alimentarius*, 1981).

De igual forma, en el CODEX STAN 145-1985, se dictan los requisitos para las castañas y el puré de castañas en conserva; definiendo el preparado con castañas frescas y maduras de especies *Castaneacrenata*, *Sieb* y *Zucc*, *Castanea sativa Miller* con tratado térmico previo al encerrado en un recipiente, para puré de castañas. El preparado de la pulpa debe contar con 12° Brix y 10° Brix al ser endulzado o no respectivamente. Sus medios de cobertura están dados como agua ligeramente edulcorada o agua edulcorada ligeramente variando en ° Brix., y jarabes diluidos o concentrados; la sal adicionada debe ser inferior al 1 % de contenido neto total. Los aditivos permitidos son el polifosfato de sodio, ácido L-ascórbico, ascorbato de sodio, ácido (cítrico, málico y L-tartárico), dióxido de azufre, cúrcuma, azafrán, amarillo cártamo, extracto de vainilla, vainillina y peptina. El nivel de contaminantes serán plomo con 1 mg/kg y estaño con 250 mg/kg (*Codex Alimentarius*, 1985).

La Norma CODEX STAN 247-2005 estipula el reglamento general para zumos (jugos) y néctares de frutas; e indica como puré de fruta el producto no fermentado obtenido por tamizado, triturado o desmenuzado de la parte carnosa de la fruta, para lo cual su estado debe ser maduro y fresco, y como puré concentrado de fruta el derivado tras la eliminación física del agua del puré con el fin de aumentar en un 50 % los sólidos solubles totales; en ambos casos es permitido las sustancias aromáticas y aromatizantes volátiles. Con empleo de aditivos alimentarios dictados en el CODEX STAN 192-1995; y con uso de coadyudantes de función antiespumante, clarificante, enzimática y de gas envasado. Los criterios microbiológicos se cumplen según lo declarado en la Norma CAC/GL 21-1997 (*Codex Alimentarius*, 2005).

La Normativa CODEX STAN 296-2009, identifica a las pulpas y purés como ingrediente básico en la preparación de mermelada de agrios y mermelada tipo jalea; y define la pulpa como la carnosidad comestible de la fruta, y para el puré igual que la pulpa más la reducción del mismo por tamizado (*Codex Alimentarius*, 2009).

El Gobierno de España estipula el Reglamento técnico-sanitario para la elaboración y venta de zumos de frutas y sus derivados en el Real Decreto 108-1977; especificando en su artículo 12 los cremogenados de frutas naturales, siendo el producto obtenido de la molienda de la carnosidad de frutas limpias, sanas y maduras, con finado y posterior conservación. El artículo 25 precisa los requisitos a cumplir por los cremogenados; teniendo así, su elaboración a base de frutas sanas y maduras; sin presencia de trozos de corteza, piel, y semillas; de características organolépticas propias de la fruta; sin contenido de impurezas distintas a las materias primas de fabricación; sin residuos de metales pesados superiores a los mencionados en el numeral 6; y sin existencia de microorganismos patógenos en el producto (BOE, 1997).

## CAPITULO I

### BIBLIOGRAFIA

- Adeyemo, S., Agun, T., Ogunlusi, E. (2018). Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria Isolated from 'Pupuru': An African Fermented Staple against Food Borne-Pathogens. *J Mol Biol Biotech.* Vol 3 (1): 1-6p.
- Aguilar, J., Espinoza, M., Cabanillas, J., Gómez, E., Valverde, L., Benavides, D. (2014). Efecto de la concentración de albedo y sacarosa sobre las características fisicoquímicas, reológicas y aceptabilidad general en cremogenado de granadilla (*Passiflora ligularis*). Escuela de Ingeniería Agroindustrial. Universidad Nacional de Trujillo. *Agroind Sci* 4.
- Alain-Claude, R. (2004). Reología y análisis de la textura de los alimentos. Zaragoza. España. 209p.
- Alarcon, E. (2005). Evaluación sensorial. Universidad Nacional Abierta y a Distancia – UNAD. Facultad de Ciencias Básicas e Ingeniería. 128p
- Alvarado, T. (2015). *Alimentación y nutrición: fundamentos y nuevos criterios*. Lima, Perú. Editorial Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas (UPC).
- Alves, R., Artero, A., Alexandre, M., Figueriras, A. (2003). Mating system in a natural population of *Theobroma grandiflorum* (Willd. Ex Spreng.) Schum., by microsatellite markers. *Genetics and Molecular Biology*, 26(3), 373-379p.
- Alvidrez, A., Gonzales, B.E., and Jimenez, Z. (2002). Tendencias en la producción de alimentos: alimentos funcionales. *RESPYN*. Vol 3 (33). 1-6p.
- Al - sheraji, S. A., Ismail, A., Manap, M.Y., Mustafa, S., Yusof, R.M and Hassan, F.A. (2013). Probiotics as functional foods: A review. *Journal of Functional foods*. Vol 5 (4):1542-1553p.
- Álvarez, J., Fernández, J. Guarner, F. (2021). Microbiota intestinal y salud, Gastroenterología y Hepatología. 1- 17 p. <https://doi.org/10.1016/j.gastrohep.2021.01.009>
- Amorocho-Cruz, C.M. (2011). Caracterización y potencial probiótico de bacterias lácticas aisladas de leche de oveja guirra. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. Departamento de Biotecnología.
- Annunziata A., Vecchio R. (2011). Functional foods development in the European market: a consumer perspective. *Journal of Functional Foods*. Vol 3, 223-228p
- Araya, H., Lutz, M. (2003). Alimentos funcionales y saludables. *Revista chilena de nutrición*, 30 (1). 8-14p.
- Aristizábal, I. D. (2007). La resonancia magnética y sus aplicaciones en la agroindustria, una revisión. *Rev. Fac. Nac. Agron. Medellín*. Vol.60 (2) 4037-4066p.
- Atrott, J. & Henle, T. (2009). Methylglyoxal in Manuka honey-Correlation with Antibacterial Properties. *Czech J. Food Sci.* 27, S163-S165p.
- Ayala-Zavala, JF., Vega-Vega, V., Rosas-Domínguez, C., Palafox-Carlos, H., Villa - Rodríguez, JA., Wasim - Siddiqui, M., Dávila-Aviña, JE., González-Aguilar, GA. (2011). Agro-industrial potential of exotic fruit byproducts as a source of food additive. *Food Research International*, vol 44, 1866-1874p.
- Barrera, J.A., Hernández, M. S., Gelvis, J.A., Acosta, J. (1996). Prefactibilidad técnico - económica para el procesamiento del Arazá (*Eugenia stipitata* Me Vaugh) y del Copoazú (*Theobroma grandiflorum* Will. ex Spreng), en la zona de colonización de San José Del Guaviare. *Revista Agronomía Colombiana*. Volumen XIII, No. 1; 91-105p.

- Barrio, M. (2006). Probióticos, prebióticos y simbióticos. Definición, funciones y aplicación clínica en pediatría Revista Pediatría de Atención Primaria. Vol. VIII, (Suplemento 1): 99-118p
- Batista, L. (2009). Guía Técnica El Cultivo de Cacao. Guía Técnica el Cultivo de Cacao en la República Dominicana. 1 ed. Santo Domingo (República Dominicana): CEDAF.250p.
- Bellisle, F., Diplock, AT. Hornstra, G. Koletzko, B. Roberfroid, M. Salminen, S. & Saris, WHM. (1998). Scientific Concepts of Functional Foods in Europe Consensus Document. [versión electrónica]. *British Journal of Nutrition*. Vol 81(Suppl. 1). S1-S27p.
- Benbettaïeb N, Debeaufort F, Karbowiak T. (2018). Bioactive edible films for food applications: mechanisms of antimicrobial and antioxidant activities, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. doi.org/10.1080/10408398.2018.1494132
- Bernal, C.A., Diaz-Moreno, C., Gutiérrez-Cortes, C. (2017). Probióticos y prebióticos en matrices de origen vegetal: Avances en el desarrollo de bebidas de frutas. *Rev. chil. nutr.* Vol.44 (4): 384-392p.
- Bilski P., Li, M., Ehrenshaft, M., Daub, M. & Chignell, F. (2000). Vitamin B6 (Pyridoxine) and Its Derivatives Are Efficient Singlet Oxygen Quenchers and Potential Fungal Antioxidants. *Simpusium in print*. Laboratory of Pharmacology & Chemistry, NIEHS Environmental Toxicology Program, NC, USA and Department of Plant Pathology, North Carolina State University, Raleigh, NC, USA. *Photochemistry and Photobiology*. Vol 71 (2): 129–134p.
- Bigliardi B., Galati F. (2013). Innovation trends in the food industry: the case of functional foods. *Trends in Food Science and Technology*, 31, 118-129.
- Binns, N. (2013). Probiotics, prebiotics and the gut microbiota. *Ilsi Europe concise monograph series*. 28 p
- Bonat-Celli, G., Ghanem, A., Su-Ling, B. (2016). Influence of Freezing Process and Frozen Storage on the Quality of Fruits and Fruit Products. *Food Reviews International*. 32. 280-304p. Doi 10.1080/87559129.2015.1075212.
- BOE. (1977). Real Decreto 108-1997.
- BOE. (2006). Reglamento (CE) 1924/2006. Recuperado el 25 de marzo de 2019, de <https://www.boe.es/doue/2006/404/L00009-00025.pdf>
- BOE. (2011). Reglamento (UE) 1169/2011. Recuperado el 27 de marzo de 2019, de <https://www.boe.es/doue/2011/304/L00018-00063.pdf>
- Bonanomi, G., Incerti, G., Giannino, F., Mingo, A., Lanzotti, V., Mazzoleni, S. (2013). Litter quality assessed by solid state <sup>13</sup>C NMR spectroscopy predicts decay rate better than C/N and lignin/N ratios. *En: Soil Biology & Biochemistry* Vol 56: 40-48p
- Cabrera, S. (2018). Evaluación de mezclas de proteínas con hidrocoloides sobre las propiedades espumantes de emulsiones de aceite de aguacate Persea Americana. Trabajo de maestría en Ciencias Agroalimentarias. Universidad del Tolima. 120p.
- Caro, A. Modelos deformables sobre imágenes de resonancia magnética aplicados a la tecnología de los alimentos. (2006). Universidad de Extremadura. España. Tesis doctoral.
- Caldera, Y. (2013). NVC 2952-1: 1997: Directrices para el etiquetado nutricional y la declaración de propiedades nutricionales y de salud. Cuernavaca. Recuperado el 25 de marzo de 2019, de <https://es.slideshare.net/calidadyalimentum/norma-venezolana-covenin-29521-1997-directrices-para-el-etiquetado-nutricional-y-la-declaracin-de-propiedades-nutricionales-y-de-salud>

- Castro Z. (2010). Caracterización del proceso de fermentación del grano de copoazú (*Theobroma grandiflorum* Willd. ex Spreng) (Ingeniería Agrónoma. Tesis Especialización en Ciencia y Tecnología de Alimentos). Bogotá (Colombia): Universidad Nacional de Colombia, Programa de Interfacultades. 47p.
- Cardona, J., Díaz, R., Gutiérrez, R., Hernández, M.S., Fernández, J.P. (2013). Clarification effects in a functional copoazú (*Theobroma grandiflorum*) beverage. Foods. Doi: 1, 1-x man Sterling uscripts; doi: 10.3390/foods10x000x. 1-7p. Doi: [10.3390 / bpqn2013-01196](https://doi.org/10.3390/bpqn2013-01196)
- Castañeda, A., Casas, A., Gutiérrez A., Ramírez. (2001). Especies Promisorias de la Amazonia: Conservación, manejo y utilización del germoplasma. Florencia (Colombia). 112-119p.
- Congote, P. (2010). Entrenamiento del panel sensorial de la compañía de galletas Noel S.A.S. en pruebas discriminativas y descriptivas. Corporación Universitaria Lasallista. Trabajo de grado de Ingeniería de alimentos. Facultad de Ingeniería. 59p
- Criollo, J., Criollo, D., Sandoval, A. (2010). Fermentación de la almendra de Copoazú (*Theobroma grandiflorum* [Willd. ex Spreng.] Schum.): evaluación y optimización del proceso. Revista Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria. Vol 11 (2). 107 -115p.
- Chen, Mei-Fang. (2011). The mediating role of subjective health complaints on willingness to use selected functional foods. Food Quality and Preference. Vol 22 (1): 110-118p.
- Conte, P., Pasquale, D. de., Novotny, E. H., Caponetto, G., Laudicina, V. A., Ciofalo, M., Panno, M., Palazzolo, E., Badalucco, L., Alonzo, G. (2010). Cpmas 13c. Nmr characterization of leaves and litters from the reafforested area of mustigarufi in sicily (italy). En: the open magnetic resonance journal vol 3 p. 89-95
- Codex Alimentarius. (1981). CODEX STAN 17-1981, Norma del Codex para el puré de manzanas en conserva
- Codex Alimentarius. (1985). CODEX STAN 145-1985, Norma para las castañas en conserva y el puré de castañas en conserva.
- Codex Alimentarius. (2005). CODEX STAN 247-2005, Norma general del Codex para zumos (jugos) y néctares de frutas.
- Codex Alimentarius. (2009). CODE STAN 296-2009, Norma para las confituras, jaleas y mermeladas.
- Codex Alimentarius. (2010). Codex standard for fermented milks. 2nd ed. Codex standard 243–2003 in Codex Alimentarius: Milk and Milk Products. Codex Alimentarius Commission, Brussels, Belgium.
- Curo, J.J., Ybañez, S.M. (2017). Parámetros óptimos para la obtención de un néctar de copoazú (*Theobroma grandiflorum*) y maracuya (*Passiflora edulis*) y su estudio a nivel de pre-factibilidad. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Farmacia y Bioquímica. E. A.P. de Ciencia de los Alimentos. 131p.
- De las Cagigas, A., Blanco, J. (2002). Prebióticos y probióticos, una relación beneficiosa. Revista Cubana Aliment Nutr. 16 (1): 63-8p.
- De Paula, C., García, C. & Durando, A. Valor de la marca de aceptación sensorial de consumidores en cuatro tipos de pan tajado blanco. Información Tecnológica Vol. 25 Nº 1 – 2014.
- Dickinson, E; Staninsby, G. (1988). Advances in Food Emulsions and Foams. Elsevier Applied science publishers LTDA. Capítulo 1. Emulsion stability.
- Dickinson, E., & Bergenstahl, B. (1997). Food Colloids: Proteins, Lipids and Polysaccharides. Woodhead Publishing Limited

- Dickinson, E., & Miller, R. (2001). Food Colloids, fundamentals of formulation. Royal Society of Chemistry
- Dickinson, E. (2015). Colloids in Food: Ingredients, structure, and Stability. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 6, 2.1-2.23. doi: 10.1146/annurev-food-022814-015651
- Dickinson, E. (2014). Structuring of colloidal particles at interfaces and the relationship to food emulsion and foam stability. *Journal of Colloid and Interface Science* doi.org/10.1016/j.jcis.2014.09.080
- Diplock, A., Aggett, M., Ashwell, F., Borne, E. Fern and M. Roberfroid. (1999). Scientific concepts of functional foods in Europe: Consensus document. *British Journal of Nutrition*. Vol 81 (1): 1-27p.
- Durán, R., Valenzuela, A. (2010). La experiencia japonesa con los alimentos foshu ¿los verdaderos alimentos funcionales?. *Rev Chil Nutr* Vol. 37. (2): 224-233p.
- EFSA. (2006). Niveles máximos de ingesta admisible para vitaminas y minerales evaluados por EFSA. Recuperado el 27 de marzo de 2019, de [http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad\\_alimentaria/gestion\\_riesgos/UL\\_Vitaminas\\_Minerales\\_2.pdf](http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/gestion_riesgos/UL_Vitaminas_Minerales_2.pdf)
- El Sohaimy S.A. (2012). Functional foods and nutraceuticals- modern approach to food science. *World Applied Sciences Journal*, 20, 691-708.
- Esteves Da Silva, J. C.G., Ferreira, M. A., Machado, A. A. S. C., Rey, F. (1996). Classification of binding sites for Al(III) in fulvic acids extracted from leaf litters and soils by synchronous fluorescence spectroscopy and multidimensional chemometric analysis. En: *Analytica Chimica Acta* Vol 333. 71-82p
- Ezzati M., Van der Hoorn S., Lawes C.M.M., Leach R., James W.P.T., López A.D., Rodgers A., Murray C.J.L. (2005). Rethinking the “diseases of affluence” paradigm: global patterns of nutritional risks in relation to economic development. *PLoS Medicine*. Vol 2, 404-412p.
- Fadaei, V. (2012). Milk proteins-derived antibacterial peptides as novel functional food ingredients. *Annals of Biological Research*. Vol 3 (5): 2520-2526p.
- Fadzir, UA., Darnis, DS., Mustafa, BE. & Mokhtar KI. (2018). Linum usitatissimum as an antimicrobial agent and potential natural healer: A review. *Archives of orofacial Sciences*. Vol 13 (2): 55-62p.
- FAO & OMS. (1989). Anteproyecto de modificaciones al sistema internacional de numeración de aditivos alimentarios. Recuperado el 28 de marzo de 2019, de [http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FMeetings%252FCX-711-50%252FWD%252Ffa50\\_11s.pdf](http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FMeetings%252FCX-711-50%252FWD%252Ffa50_11s.pdf)
- FAO & OMS. (1995). CODEX STAN 192-1995, Norma general para los aditivos alimentarios. Recuperado el 28 de marzo de 2019, de [http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCODEX%2B2B192-1995%252FCXS\\_192s.pdf](http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCODEX%2B2B192-1995%252FCXS_192s.pdf)
- FAO. (1994). Neglectec crop 1492 from a different perspective. Serie N.26. Rome, 348p
- FAO. (1997). Directrices para el uso de declaraciones nutricionales y saludables. Recuperado el 25 de marzo de 2019, de <http://www.fao.org/ag/humannutrition/33313-033ebb12db9b719ac1c14f821f5ac8e36.pdf>
- FAO. Y OMS. (2006). Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación. Probióticos en los alimentos Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación. 85. Consulta de Expertos FAO/OMS sobre Evaluación

de las Propiedades Saludables y Nutricionales de los Probióticos en los Alimentos, incluida la Leche en Polvo con Bacterias Vivas del Ácido Láctico.

- FAO. (2018). Organización para las Naciones Unidas para la agricultura y la Alimentación. Propuesta para un año Internacional de las Frutas y Verduras. Roma 3,7 de diciembre 2018. 160 periodo de sesiones CL160/10.
- FAO & OMS. (2017). Anteproyecto de especificaciones de identidad y pureza de los aditivos alimentarios formulados por el JECFA en su 82.<sup>a</sup> Reunión. Recuperado el 28 de marzo de 2019, de [http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/es/?Ink=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FMeetings%252FCX-711-49%252FWD%252Ffa49\\_04rev1s.pdf](http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/es/?Ink=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FMeetings%252FCX-711-49%252FWD%252Ffa49_04rev1s.pdf)
- FEDECACAO. 2004. El beneficio y características físicoquímicas del cacao (*Theobroma cacao* L.). Ed. Produmedios. Colombia
- Flores, N. (2015). Entrenamiento de un Panel de Evaluación Sensorial, para el Departamento de Nutrición de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Memoria para optar al título de Ingeniero de Alimentos. Santiago – Chile.
- Figueroa, L. (2019). Geles de pectina con fibra dietaria. Aplicación en la elaboración de dulces de fruta saludables. Tesis doctoral en ciencia y tecnología de los alimentos Universidad Nacional del Sur. ARGENTINA. 220p
- Fuertes, L. (2019). Prebióticos y su uso en leches infantiles. Trabajo de fin de grado. Universidad Complutense. Facultad de Farmacia. 20p
- Furtado, E., Mota, A., Silva, E., Stringheta, P., Oliviera, C. & Martins, J. (2013). Review Products of vegetable origin: A new alternative for the consumption of probiotic bacteria. *Food Research International* 51. 764–770p.
- Galeano, P., Cuellar, L., Schinella, G. (2012). Influencia del procesamiento del grano de Copoazú (*Theobroma grandiflorum*), sobre la actividad antioxidante y el contenido fenólico. *Vita* (en línea). Vol 19(1): S285-S287p, disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=169823914087>
- Genovese, D., Lozano, Rao, M. (2007). The rheology of colloidal and noncolloidal food dispersions. *Journal of Food Science*, 72 (2): 11–20p. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00253.x>
- Guillot, C. (2018). Actualización en prebióticos. *Revista Cubana de Pediatría*. 90 (4): e648
- Goetzke, B., Nitzko, S. and Spiller, A. (2014). Consumption of organic and functional food. A matter of well-being and health. *Appetite*, Vol 77(1): 96-105p.
- Gutiérrez, A y Criollo, D. (2005). El cultivo de frutales amazónicos en Agroflorestera. Corpoica C.I. Macagual y Corpoamazonia. Florencia (Colombia): Produmedios. 32p.
- Guzmán, B., Hernández, J., Ortega, S., Viruegas, R. (2009). Los nutraceuticos. Lo que es conveniente saber. Artículo de revisión. *Revista mexicana de pediatría*. Vol 76 (3). Mayo – junio. 136-145p.
- Guzmán, E., Montes, P., Monge, P. (2012). Probióticos, prebióticos y simbióticos en el síndrome de intestino irritable. *Acta Med Per*. Vol 29 (2): 92-98p.
- Gupta, S., Kapur, S., Padmavathi, DV. & Verma, A. (2015). Garlic: An effective functional food to combat the growing Antimicrobial Resistance. *Tropical Agricultural Science*. Vol 38 (2): 271-278p.
- Heldman, D.,R. (2003). Influence of freezing process parameters on frozen quality. Paper 72-2. Presented at the 2003 Institute of Food Technologists Annual Meeting in Chicago, Illinois. IFT Annual Meeting Technical Program Book of Abstracts. Chicago: Institute of Food Technologists. 175p.

- Hessissen, N., García, J-J. (2016). Prebióticos, probióticos y sistema inmune. Universidad Complutense. Facultad de Farmacia. Trabajo fin de grado. 23p.
- Hernández C, León A. (2003). Evaluación de las etapas de fermentación y secado del proceso de beneficio de semilla de Copoazú *Theobroma grandiflorum* Willd ex Spreng Schum, (tesis), Bogotá, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Colombia. pp. 70-81.
- Hernández, E. (2005). Evaluación sensorial. Facultad de ciencias básicas e ingeniería. Universidad Nacional Abierta y a Distancia – UNAD. Bogotá D.C.
- Hernández, A.S., Calderón, S.S. (2006). Obtención de una cobertura de chocolate a partir de cacao silvestre, copoazú (*Theobroma grandiflorum*), y Maraco (*Theobroma bicolor*), de la Amazonia. Facultad de Ingeniería de Alimentos. Universidad de la Salle, Bogotá DC. 179p.
- Hernández, C. (2010). Determinación del momento óptimo de cosecha de copoazú (*Theobroma grandiflorum* Willd ex Spreng Schum) en la Amazonia occidental Colombiana. (Tesis Magister en Ciencias Biología, Área de énfasis Biodiversidad y Conservación). Colombia: Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. 84p.
- Hernández, M y Barrera, J. (2000). Manejo pos cosecha y transformación de frutales nativos promisorios en la Amazonia colombiana. Bogotá (Colombia): Produmedios, 33p.
- Hernández, C., Hernández, M.S. (2012). Growth and development of the cupuaçu fruit (*Theobroma grandiflorum* [Willd. Ex Spreng.] Schum.) in the western colombian Amazon. Agron. Colomb. Vol 30 (1): 95-102p
- Herrera, Y. (2013). Microencapsulación de compuestos con poder antioxidante extraídos a partir de semillas sin fermentar de *Theobroma cacao* y *Theobroma Grandiflorum*. Tesis de maestría. Magister en Ciencia y Tecnología de Alimentos.
- Hue, C., Gunata Z., Breyse, C., Davrieux, F., Boulanger, R., Sauvage, F. (2016). Impact of fermentation on nitrogenous compounds of cocoa beans (*Theobroma cacao* L.) from various origins: Food Chemistry, 192. 958–964p.
- Hyun, TK., Ra, JH., Han, SH., Kim, JS. (2018) Antioxidant, antimicrobial, and Antidiabetic Activities of Crowberry fruits. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences. Vol 80 (3): 489-495p.
- IFIC (Consejo Internacional de Información sobre Alimentos). (2006) <http://www.foodinsight.org/spanish/articles/alimentos-funcionales>.
- Illanes, A. (2015). Alimentos funcionales y biotecnología. Rev. Colomb. Biotecnol. Vol. XVII (1): 5-8p.
- ILSI Perspectives on ILSI's International Activities on Functional Foods. (2009). Report commissioned by the ILSI Europe Functional Foods Task Force.
- IAlimentos. (2015). Mercado de alimentos funcionales. Recuperado el 25 de marzo de 2019, de <https://revistaialimentos.com/ediciones/edicion-9/mercado-de-alimentos-funcionales/>
- IAlimentos. (2017). Tenga presente las normas de etiquetado y rotulado nutricional. Recuperado el 25 de marzo de 2019, de <https://revistaialimentos.com/noticias/tenga-presente-las-normas-etiquetado-rotulado-nutricional/>
- ICONTEC. (2005). NTC 805 de 2005, leches fermentadas. Recuperado el 26 de marzo de 2019, de [https://www.academia.edu/11858788/NORMA\\_T%C3%89CNICA\\_NTC\\_COLOMBIANA\\_805](https://www.academia.edu/11858788/NORMA_T%C3%89CNICA_NTC_COLOMBIANA_805)
- INVIMA. (2009). Acta 04/09, Comisión revisora de medicamento y productos biológicos, de alimentos y bebidas alcohólicas, de insumos para la salud y productos

varios. Recuperado el 28 de marzo de 2019, de [https://www.invima.gov.co/images/pdf/salas-especializadas/bebidas-alimentos/2009/acta04alimentos\\_abril2009.pdf](https://www.invima.gov.co/images/pdf/salas-especializadas/bebidas-alimentos/2009/acta04alimentos_abril2009.pdf)

- Jiménez, C., Sánchez, F y Olmedilla, B. (2004). Estrategias tecnológicas en el desarrollo de derivados cárnicos funcionales. Fundación Española de la Nutrición. La carne y los productos cárnicos como alimentos funcionales. Editec Red, Madrid. pp. 77-90. 144p.
- Jiménez, M. (2010) Microorganismos probióticos encapsulados en polímeros microbianos. Tesis doctoral. Departamento de Microbiología. Universidad de Granada.
- Joffre, R., Gillon, D., Dardenne, P., Agneessens, R., Biston, R. The use of near-infrared reflectance spectroscopy in litter decomposition studies. (1992). En: Ann Sci For Vol 49: 481-488p
- Juárez. M. Alimentos funcionales. (2007). La evaluación de las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos. Instituto Tomás Pascuas Sanz.
- Khaneghah, AM., Hashemi, SM., Es, I., Fracassetti, D. & Limbo, S. (2018). Efficacy of antimicrobial Agents for Food Contact Applications: Biological Activity, incorporation into Packaging, and Assessment Methods: A Review. Journal of Food Protection. Vol 81 (7): 1142-1156p.
- Kellow N.J., Coughlan M.T., Reida, C.M. (2014). Metabolic benefits of dietary prebiotics in human subjects: a systematic review of randomised controlled trials. British Journal of Nutrition, 111, 1147-1161p.
- Kerr, J. I., Baldwin, D. S., Tobin, M. J., Puskar, L., Rees, G. N., Silvester, E. High spatial resolution infrared micro-spectroscopy reveals the mechanism of leaf lignin decomposition by aquatic fungi. (2013). En: PLoS ONE 8(4): e60857. doi: 10.1371/journal.pone.0060857.
- Killian, L.A (1955). El uso de cacao como moneda en la época prehispánica y supervivencia en la época colonial. *Ann Arbor*, 12. 1439 – 1450p.
- Lajolo, F.M. (2002). Functional foods: Latin American perspectives. British Journal of Nutrition. Vol 88 (S2): S145-S150p.
- Lawless, H. T., & Heymann, H. (2013). *Sensory evaluation of food: principles and practices*. Springer Science & Business Media. Recuperado de: [https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=yrlfrVgU6CsC&oi=fnd&pg=PR6&dq=Lawless,+H.+T.,+%26+Heymann,+H.+\(2013\).+Sensory+evaluation+of+food:+principles+and+practices.+Springer+Science+%26+Business+Media.&ots=htQEDsh932&sig=AWpKRE4neWAqtqoiTMcgSz3Od3M#v=onepage&q=Lawless%2C%20H.%20T.%2C%20%26%20Heymann%2C%20H.%20\(2013\).%20Sensory%20evaluation%20of%20food%3A%20principles%20and%20practices.%20Springer%20Science%20%26%20Business%20Media.&f=false](https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=yrlfrVgU6CsC&oi=fnd&pg=PR6&dq=Lawless,+H.+T.,+%26+Heymann,+H.+(2013).+Sensory+evaluation+of+food:+principles+and+practices.+Springer+Science+%26+Business+Media.&ots=htQEDsh932&sig=AWpKRE4neWAqtqoiTMcgSz3Od3M#v=onepage&q=Lawless%2C%20H.%20T.%2C%20%26%20Heymann%2C%20H.%20(2013).%20Sensory%20evaluation%20of%20food%3A%20principles%20and%20practices.%20Springer%20Science%20%26%20Business%20Media.&f=false)
- López, O. (2010). Microencapsulación de sustancias oleosas mediante secado por aspersión. En: Rev Cubana Farm vol. 44(3): 381-389p.
- Loredó, A; Ignorosa, KR; Zarate, FE; Montijo, E; Cadena, F; Ramirez, M. (2017). Prebióticos, probióticos y alergia: actualidades. *Alergia, Asma e inmunología Pediátrica*, Vol 26 (1): 21-26p.
- Luengo, E. (2007). Alimentos funcionales y nutraceuticos. Sociedad Española de Cardiología. 93p.
- Madrigal, L. (2007). La inulina y derivados como ingredientes claves en alimentos funcionales. Archivos latinoamericanos de nutricion Órgano Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición. Vol. 57 (4), 10p.

- Marreno, Y., Montoya, C., Ruiz O., Elias, A., Madera, M. (2015). Crecimiento de *Pichia guilliermondii* cepa Levica 27 en diferentes fuentes de energía y nitrógeno. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, Tomo 49 (1): 47-52p.
- Martínez, C. & Carbajal, A. (2017). Componentes bioactivos de los alimentos. Recuperado el 27 de marzo de 2019, de [https://www.kelloggs.es/content/dam/europe/kelloggs\\_es/images/nutrition/PDF/Manual\\_Nutricion\\_Kelloggs\\_Capitulo\\_02.2.pdf](https://www.kelloggs.es/content/dam/europe/kelloggs_es/images/nutrition/PDF/Manual_Nutricion_Kelloggs_Capitulo_02.2.pdf)
- McClements, D-J. (2005). *Food Emulsions. Principles, practices and techniques*. Second editions. CRC Press. Capítulo 1. Context and background
- Medrano, S. (2010). Obtención de deshidratados de Borojó y Copoazú mediante procesos térmicos de secado con aire forzado. (Tesis Ingeniería Industrial). Quito, Escuela Politécnica Nacional. 94p.
- Mensink, R.P., Aro, A., Den Hond, E., German, J.B., Griffin, B.A., Ter Meer, H. U., Mutanen, M., Panemans, D., Stahl, W. (2003). PASSCLAIM- Diet- related cardiovascular disease. *Eur. J. Nutr.* 42 (Suppl. Q), 6-27p.
- Melgarejo, L. Hernández, M., Barrera, J., Carrillo, M. (2006). Oferta y potencialidades de un banco de germoplasma del género *Theobroma* en el enriquecimiento de los sistemas productivos de la región Amazónica. 1 ed. Bogotá (Colombia): Script.224p.
- MERCOSUR. (1997). MERCOSUR/GMC/RES 47/97, Reglamento técnico MERCOSUR de identidad y calidad de leches fermentadas. Recuperado el 26 de marzo de 2019, de [http://www.puntofocal.gov.ar/doc/r\\_gmc\\_47-97.pdf](http://www.puntofocal.gov.ar/doc/r_gmc_47-97.pdf)
- Meilgaard, M. C., Carr, B. T., & Civille, G. V. (2006). *Sensory evaluation techniques*. CRC press. Recuperado de: [https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=F\\_A-YtWXF3gC&oi=fnd&pg=PA1&dq=Meilgaard,+M.+C.,+Carr,+B.+T.,+%26+Civille,+G.+V.++\(2006\).+Sensory+evaluation+techniques.+CRC+press.&ots=GMLHsasmtv&sig=42YHQs3N-VqSW89BS2ue-hLE-tc#v=onepage&q=Meilgaard%2C%20M.%20C.%20Carr%2C%20B.%20T.%20C.%20%26%20Civille%2C%20G.%20V.%20\(2006\).%20Sensory%20evaluation%20techniques.%20CRC%20press.&f=false](https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=F_A-YtWXF3gC&oi=fnd&pg=PA1&dq=Meilgaard,+M.+C.,+Carr,+B.+T.,+%26+Civille,+G.+V.++(2006).+Sensory+evaluation+techniques.+CRC+press.&ots=GMLHsasmtv&sig=42YHQs3N-VqSW89BS2ue-hLE-tc#v=onepage&q=Meilgaard%2C%20M.%20C.%20Carr%2C%20B.%20T.%20C.%20%26%20Civille%2C%20G.%20V.%20(2006).%20Sensory%20evaluation%20techniques.%20CRC%20press.&f=false)
- Mesías, M., Delgado-Andrade, C. (2017). Melanoidins as a potential functional food ingredient. *Current opinion in food science*. Vol 14: 37-42p.
- Ministerio de Salud. (1981). Modificación referente al Aspartame como edulcorante artificial. Recuperado el 28 de marzo de 2019, de [http://biblioteca.saludcapital.gov.co/img\\_upload/03d591f205ab80e521292987c313699c/resolucin-1618-de-1991.pdf](http://biblioteca.saludcapital.gov.co/img_upload/03d591f205ab80e521292987c313699c/resolucin-1618-de-1991.pdf)
- Ministerio de Salud. (1989). Resolución 11962 de 1989, clases de leche fermentada.
- Ministerio de Salud. (1991). Resolución 4124 de 1991, antioxidantes en alimentos.
- Ministerio de Salud y Protección Social. (2019). Documento técnico, azúcares adicionados. Recuperado el 28 de marzo de 2019, de <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/PP/SNA/documento-tecnico-azucare-adicionados.pdf>
- Ministerio de la Protección Social. (2006). Decreto 3249 de 2006. Recuperado el 25 de marzo de 2019, de [https://www.icbf.gov.co/cargues/avance/docs/decreto\\_3249\\_2006.htm](https://www.icbf.gov.co/cargues/avance/docs/decreto_3249_2006.htm)
- Ministerio de la Protección social (2007). Resolución 3096. Por la cual se establece el reglamento técnico sobre las condiciones y requisitos que deben cumplir los suplementos dietarios que declaren o no información nutricional, propiedades de salud o cuando su descripción produzca el mismo efecto de las declaraciones de propiedades nutricionales o de las declaraciones de propiedades en salud. 19p.

- Ministerio de la Protección social (2008). Resolución 288 de 2008. Por la cual se establece el reglamento técnico sobre requisitos de rotulado o etiquetado nutricional que deben cumplir los alimentos envasados para consumo humano. 19p.
- Ministerio de Protección Social. (2008). Decreto 3863 de 2008.
- Ministerio de la Protección social. (2011). Resolución 333 de 2011. Por la cual se establece el reglamento técnico sobre los requisitos de rotulado o etiquetado nutricional que deben cumplir los alimentos envasados para consumo humano.62p
- Ministerio de Salud y Protección Social (2015). Plan Nacional del sector gastronómico. Protocolo aplicado y resultados de análisis sensorial. Subdirección de Salud Nutricional Alimentos y Bebidas. 89 p. Recuperado de: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/PP/SNA/piloto-analisis-sector-gastronomico-analisis-sectorial.pdf>
- Miras, J. (2013). Formación y propiedades de espumas macroporosas de quitosano obtenidas a partir de emulsiones altamente concentradas. Tesis de doctorado. Universidad de Barcelona. 365p
- Mishra, V., Prasad, D. (2005). Application of in vitro methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probiotics. International Journal of food microbiology, vol 103: 109-115p. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.10.047
- Morán, J. (2016). Etiquetado y uso de declaraciones de propiedades nutricionales. España. Recuperado el 25 de 2019, de <https://www.granotec.com.mx/new/20160519165132/>
- Muñoz, M. (2011). Estudio del efecto de los fructooligosacáridos en la producción de bacteriocinas por aislados nativos de *Lactobacillus* spp. Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de Magister en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Nacional de Colombia. 85p.
- Nair, MS., Upadhyaya, I., Amalaradjou, M., Venkitanarayanan, K. (2019) Antimicrobial food additives and disinfectants: mode of action and microbial resistance mechanisms. Chapter 12. In: Foodborne pathogens and antibiotic resistance. First edition. Edited by Om V. Singh. John Wiley & Sons Inc.
- Nazaré, R., Barbosa, W., Ferreira, R. (1990). Processamento das sementes de cupuaçu para a obtenção de cupulate. Embrapa- CPATA. Brasil. 39p.
- Nighojkar, A., Patidar, M. K., & Nighojkar, S. (2019). Pectinases: Production and Applications for Fruit Juice Beverages. In Processing and Sustainability of Beverages (pp. 235–273). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-815259-1.00008-2>
- Norma técnica colombiana NTC 4604. (1999). Análisis sensorial. Directrices generales y método de ensayo para la evaluación del color en alimentos. Bogotá D.C. ICONTEC. 9 p.
- Norma Oficial Mexicana. (1994). NOM-051-SCFI-1994, especificaciones generales de etiquetado para alimentos y bebidas no alcohólicas preenvasados. Recuperado el 25 de marzo de 2019, de <http://www.colpos.mx/bancodenormas/noficiales/NOM-051-SCFI-1994.PDF>
- Nisao, O. (2007). El cacao. Conabio. Biodiversitas. Boletín bimestral de la comisión Nacional para el conocimiento y uso de la Biodiversidad, 72. p 1-5.
- Olagnero, G., Abad, A., Silvia, B., Carolina, G., Granzella, L; Montonati, M. (2007). Alimentos funcionales: fibra, prebióticos, probióticos y simbióticos. En: Dieta. Buenos Aires. Vol 25 (121): 20 – 33p.
- Olmedilla, B., Jimenez, R.O. and Sanchez, F.J. (2013). Development and assessment of healthy properties of meat and meat products designed as functional foods. Meat Science. Vol 95 (4): 919-930p.

- Orjuela Palacio, J. M. (2017). *Obtención de una bebida funcional instantánea a base de yerba mate y cassis, con alto contenido de antioxidantes y buena palatabilidad* (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de La Plata).
- Ozyurt, H. (2014). Properties of probiotics and encapsulated probiotics in food. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.* Vol 13 (4): 413-424p.
- Páez, R. (2013). Desarrollo de cultivos probióticos deshidratados por secado spray para aplicación en alimentos. *Estudios microbiológicos y tecnológicos*. Tesis doctoral. Universidad Nacional de la Plata.
- Pauter, P., Rózańska, M., Wiza, P., Dworzak, S., Grobelna, N., Sarbak, P., Kowalczewski, P. Ł. (2018). Effects of the replacement of wheat flour with cricket powder on the characteristics of muffins. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.*, 17(3), 227–233. <http://dx.doi.org/10.17306/J.AFS.2018.0570>
- Pedrero, D., Pangborn, R. (1997). Evaluación sensorial de los alimentos. *Métodos analíticos*. México.
- Pérez, L. (2006). Nutraceuticos: componente emergente para el beneficio de la salud. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*. Vol XL (3). 20-28p. Recueprado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223120665003>
- Pentrice, A., Bonjour, J. P., Branca, F., Cooper, C., Flynn, A., Garabedian, M., Muller, D., Pannemans, D., y Weber, P. (2003). PASSCLAIM- Bone healtg and osteoporosis. *Eur.J. Nutr.* Vol 42 (Supple.1). 28-49p.
- Quintana, L., Gómez, S., García, A., Martínez, N. (2016). Conformación de un panel de jueces en entrenamiento para el análisis sensorial de licores de cacao obtenidos de diferentes modelos de siembra. *Scielo Revista entramado* Vol. 12 No. 2. <http://dx.doi.org/10.18041/entramado>.
- Ramírez, J., Murcia, C. & Castro, V. (2014). Análisis de aceptación y preferencia del manjar blanco del Valle. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. Vol. 12 No. 1 (20 – 27).
- Rafter, J., Govers, M., Martel, P., Pannemans, D.; Pool Zobel, B., Rechkemmer, G., Rowland, I., Tuijtelaars, S., Vessby, B. (2004). PASSCLAIM- Diet related cancer. *Eur. J. Nutr.* Vol 43 (Suppl. 2), 47-84p.
- Real Decreto 667/1983, de 2 de marzo, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-sanitaria para la elaboración y venta de zumos de frutas y de otros vegetales y de sus derivados.
- Real Decreto 781/2013, 11 de octubre, por el cual por el que se establecen normas relativas a la elaboración, composición, etiquetado, presentación y publicidad de los zumos de frutas y otros productos similares destinados a la alimentación humana.
- Reglamento Sanitario de los Alimentos. (1996). Decreto 977 de 1996. Recuperado el 25 de marzo de 2019, de [http://www.indap.gob.cl/docs/default-source/extensionrural/alimentos-procesados/reglamento-sanitario-de-los-alimentos-decreto\\_977\\_96\\_actualizado-mayo-2017.pdf?sfvrsn=2](http://www.indap.gob.cl/docs/default-source/extensionrural/alimentos-procesados/reglamento-sanitario-de-los-alimentos-decreto_977_96_actualizado-mayo-2017.pdf?sfvrsn=2)
- Reyes, M., L. Salamanca, G. G.; Osorio, T. M.; Rocha, P. D.; Rocha, P. F.; Rodríguez, B. O. 2007. Diseño y optimización de un cremogenado lácteos a través de diseño experimental para mezclas ternarias. *Alimentos Ciencia E Ingeniería* (V16): 100-103p.
- Richardson, D. P., Affersholt, T., Asp, N. G., Bruce, A., Grossklaus, R., Howlett, J., Roges, H; Buxant, R; Mignolet, E; Souza, J; Silva, E; y Larondell, Y. (2003). Chemical composition of the pulp of tree typical Amazonian fruits: araçá (*Eugenia stipitata*), bacuri (*Platoniainsignis*) and cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*). En: *Eur Food Res Technol.* Vol. 218(1): 380-381p.

- Riccardi, G., Aggett, P. J., Brighenti, F., Delzenne, N., Frayn, K., Niewenhuizen, A., Panneamns, D., Their, S., Tuijtelaars, S., Vessby, B. (2004). PASSCLAIM- Body weight regulation, insulin sensitivity, and diabetes risk. *Eur. J. Nutr.* 43 (Supple. 2), 7-46p.
- Rodríguez, M. (2009). Aislamiento y selección de cepas del género *Lactobacillus* con capacidad probiótico e inmunomoduladora. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. 197p.
- Rodríguez, S. Montes, L. Ramírez, D. (2012). Microencapsulación de probióticos mediante secado por aspersión en presencia de prebióticos. *En: Vitae* 19 (Supl. 1): S185- S188p.
- Rojas, S., Zapata, J., Pereira, A. y Varon, E. (1996). El cultivo de Copoazú: (*Theobroma Grandiflorum*) En el piedemonte amazónico Colombiano. Florencia (Colombia). Editorial Corpoica y el Fondo Amazónico. 19p.
- Rusconi, M., Conti, A. (2010). *Theobroma cacao* L., the Food of the Gods: A scientific approach beyond myths and claims: *Pharmacological Research*, 61, 5–13p.
- Salamanca, G. G. (2008). Propiedades fisicoquímicas y estabilidad térmica de cremogenados de mora (*Rubus glaucus Benth*). *Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas*. Vol 20 (1): 68-69p.
- Sanders, M., Gibson, G., Gill, H. y Guarner, M. (2007). Probiotics: Their Potential to Impact Human Health. Council for agricultural science and technology. Vol. 36, 20p.
- Shalaby, E. & Sanaa M. M. Shanab, S. (2013). Antioxidant compounds, assays of determination and mode of action. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, Vol. 7(10): 528-539p. DOI: 10.5897/AJPP2013. 3474
- Sarmiento, A., Herrera, J. (2003). Obtención y caracterización de un banco de levaduras con potencial aplicación probiótica. (Trabajo de grado - microbiología Industrial). Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. 103p
- Sandhya, M., Yallappa, B., Varadaraj, M., Puranaik, J., Jaganmohan, L., Janardhan, P., Pushpa, S. (2016). Inoculum of the starter consortia and interactive metabolic process in enhancing quality of cocoa bean (*Theobroma cacao*) fermentation: *LWT - Food Science and Technology*, 65. 731-738p.
- Saulnier, D., Spinler, J., Gibson, G., Versalovic, J. (2009). Mechanisms of probiosis and prebiosis: considerations for enhanced functional foods. *Current Opinion in Biotechnology*. Vol 20. 135–141p.
- Ser, H. L., Tan, L. T. H., Palanisamy, U. D., Abd Malek, S. N., Yin, W. F., Chan, K. G., et al. (2016). *Streptomyces antioxidans* a novel mangrove soil actinobacterium with antioxidative and neuroprotective potentials. *Front. Microbiol.* 7: 899. doi: 10.3389/fmicb.2016.00899
- Seddon, I. (2002). El Uso de Sustancias Alimentarias Alternativas en las Dietas Porcinas. Animal Industry Branco Manitoba Food and Agriculture.
- Sernac. (2004). Alimentos funcionales. Chile. Recuperado el 25 de marzo de 2019, de <http://www.administracion.usmp.edu.pe/institutoconsumo/wp-content/uploads/2013/08/Alimentos-funcionales.-2004-SENARC.pdf>
- SPTB. Secretaria Pro Tempore Brasil. 1999. COPOASU [*Theobroma grandiflorum* (Willd. Ex Spreng.) Shum.]: Cultivo y utilización, manual técnico. Tratado de cooperación amazónica. Brasil.
- Si, M., Zhang, L.m Tausif, M., Ding, W., Xu, Y., Chen, C., Akbar, A. et. al. (2015). *Corynebacterium glutamic methionine sulfoxide reductase A* uses both mycoredoxin

- and thioredoxin for regeneration and oxidative stress resistance. *Applied and Environmental Microbiology* 81, 2781–2796p, DOI:10.1128/AEM.04221-14.
- Souza, A. Das G.C. de., SILVA, S.E.L. da., Tavares, A.M., Rodríguez, M. do R.L. A. (1999). *Cultura do cupuaçu (Theobroma grandiflorum (Willd. ex Spreng Schum.)).* Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 39p. (Embrapa Amazônia Ocidental). Circular Técnica, 2).
  - Sterling, A., Rodríguez, C., Caicedo, D., Bentancourt, B., Hernández, M.S., Carillo, M., Quintero, L., Rodríguez, O., Giraldo, E., Suarez, J.C. (2014). Selección de materiales sobresalientes del género THEOBROMA como estrategia de rescate del germoplasma local en el Departamento del Caquetá. Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas. - Sinchi. 1 ed. Bogotá (Colombia): Scripto. 230p.
  - Schmidt, I., Schewe, H., Gassel S., Jin, Ch., Buckingham, J., Hümbelin, M., Sandmann, G., & Schrader J. (2011). Biotechnological production of astaxanthin with *Phaffia rhodozyma/Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Appl Microbiol Biotechnol.* Vol 89: 555–571p, DOI 10.1007/s00253-010-2976-6.
  - Schramm, L. (2005). *Emulsions, Foams, and Suspensions. Fundamentals and Applications.* 2005 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim
  - Stone, H., Sidel, J., Oliver, S., Woolsey, A., & Singleton, R. C. (2008). Sensory evaluation by quantitative descriptive analysis. *Descriptive Sensory Analysis in Practice*, 28, 23-34.
  - Stone, H. (2015). Alternative methods of sensory testing: advantages and disadvantages. In *Rapid Sensory Profiling Techniques*. Woodhead Publishing. (27-51p).
  - Stone, H., Bleibaum, R. N., & Thomas, H. A. (2012). *Sensory evaluation practices.* Academic press. Recuperado de: [https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=ZqNcZYNUXWIC&oi=fnd&pg=PP2&dq=Stone,+H.,+Bleibaum,+R.+N.,+%26+Thomas,+H.+A.+\(2012\).+Sensory+evaluation+practices.+Academic+press.&ots=IWauBL-T9S&sig=HeO2uyvzHILTCoy3n-60zJ3Z16A](https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=ZqNcZYNUXWIC&oi=fnd&pg=PP2&dq=Stone,+H.,+Bleibaum,+R.+N.,+%26+Thomas,+H.+A.+(2012).+Sensory+evaluation+practices.+Academic+press.&ots=IWauBL-T9S&sig=HeO2uyvzHILTCoy3n-60zJ3Z16A)
  - Sidel, J. L., & Stone, H. (1993). The role of sensory evaluation in the food industry. *Food Quality and Preference*, 4(1-2), 65-73.
  - Syngai G., Gopi, R., Bharali R., Dey S., Lakshmanan G. M. A., Ahmed G. (2016). Probiotics - the versatile functional food ingredients. *Jorunal Food Science Technol.* Vol 53 (2):921–933p. DOI 10.1007/s13197-015-2011-0
  - Stibitz, S. (2019). Bacterial Vaccine Safety: Biomarkers of Virulence and Attenuation in *Bordetella Pertussis* (Whooping Cough) and Anthrax Bacteria. Recuperado el 25 de marzo de 2019, de <https://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/ScienceResearch/BiologicsResearchAreas/ucm127276.htm>
  - Torres, J. (2007). Optimización de las condiciones de operación de tratamientos osmóticos destinados al procesado mínimo de mango (*Mangifera indica* L.). Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia, Departamento de Tecnología de Alimentos, Instituto Universitario De Ingeniería De Alimentos Para El Desarrollo. 342 p.
  - Talbot, J. M., Yelle, D. J., Nowick, J., Treseder, K. K. (2011). Litter decay rates are determined by lignin chemistry. En: *Biogeochemistry*. Doi 10.1007/s10533-011-9599-6.
  - Torres, J. (2007). Optimización de las condiciones de operación de tratamientos osmóticos destinados al procesado mínimo de mango (*Mangifera indica* L.). Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia, Departamento de Tecnología de Alimentos, Instituto Universitario De Ingeniería De Alimentos Para El Desarrollo. 342 p.

- Universidad EAN. (2016). Alimentos funcionales. Recuperado el 25 de marzo de 2019, de <http://alimentosfuncionalesean.blogspot.com/2016/08/marco-legal-regulacion-de-los-alimentos.html>
- Urrego, M. (2009). Plan de mejoramiento del proceso de evaluación sensorial para la empresa comestible Ricos Ltda. Trabajo de grado. Facultad de Ingeniería de Alimentos, Universidad de la Salle. Bogotá D.C.
- Vanegas, L., Restrepo, D. & López, J. (2012). Selección de un estabilizante y comportamiento durante almacenamiento en refrigeración de un complemento nutricional líquido. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, Vol. 65 (1).
- Valenzuela, A., Valenzuela, R., Sanhueza, J., Morales, G. (2014). Alimentos funcionales, nutraceúticos y foshu: ¿Vamos hacia un nuevo concepto de alimentación?. *Rev Chil Nutr* Vol. 41 (2): 198-204p.
- Van, T., Jian, Z., Graham. (2015). The effect of lactic acid bacteria on cocoa bean fermentation: *International Journal of Food Microbiology*, 205. 54–67p.
- Velásquez, T., Giraldo., Padilla, S. (2013). Viabilidad de *Lactobacillus casei* ssp *casei* ATCC 393 cultivado en suero de leche clarificado en un proceso de fermentación discontinuo. *Vitae*, vol. 19 (1): S207-S209p.
- Velásquez, J. (2016). Fructanos como prebióticos. III Seminario Internacional de Investigación 2016 Ciencia, Innovación y Competitividad. VIII Semana Alimentaria.
- Venturieri, G. (2011). Flowering levels, harvest season and yields of cupuassu (*Theobroma grandiflorum*). Vol 41 (1): 143 – 152p.
- Ventureira, J. (2012). Propiedades estructurales y funcionales de preparados proteínicos de amaranto modificados y soja-amanrando. Tesis doctoral. Universidad Nacional de la plata. 196p.
- Viades, J. (2012). Fisicoquímica de Alimentos (1514) Unidad 4. Coloides. 14p. Recuperado de: [http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/Unidad4.Coloides%28completa%29 21745.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/Unidad4.Coloides%28completa%29%2021745.pdf)
- WGO, Organización Mundial de Gastroenterología. (2011). Probióticos y prebióticos. Guía Práctica de la Probiotics and prebiotics. RICIÓN
- Woldegiorgis, A., Abate D., Haki, G. & Ziegler, G.R. (2014). Antioxidant property of edible mushrooms collected from Ethiopia. *Food Chem*, 157: 30–36p, DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.02.014.
- Yen, G., Chang, Y., Su, S. (2003). Anti-oxidant activity and active compounds of rice Koji fermented with *Aspegillus candidus*. *Food. Chem.* Vol 83: 49–54p.
- Zhao, W., An, C., Long, D., Zhang, Z. & Han, J. (2014). Effect of copperinduced oxidative stress on sclerotial differentiation and antioxidants contents of *Penicillium thomii* Q1. *Journal of Basic Microbiology*. Vol 54: 1395-1402p.

## CAPITULO II

### EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS Y MICROBIOLÓGICAS DE PULPA DE COPOAZÚ

#### INTRODUCCIÓN

Dentro de los alimentos de alto valor nutricional para la dieta humana se encuentra las frutas y las hortalizas; se ha incrementado la inclusión en la cultura o tendencia a mejorar los hábitos alimenticios y con ello la ingesta de las frutas y verduras por sus beneficios, especialmente en Europa, y Estados Unidos, la implementación de las barras de ensaladas de frutas y verduras y la explicación de la importancia de alimentos mínimamente procesados (Berthold-Pluta, 2017).

*Theobroma grandiflorum* L. es una fruta nativa importante de la región amazónica que se encuentra en muchos países (De Nazaré Melo Ramos *et al.*, 2016); entre ellos Colombia. Tiene un alto potencial económico por sus excelentes características como aroma, sabor y textura (Fernandes., *et al.*, 2017). Esta fruta pertenece al mismo género que el cacao (*Theobroma cacao* L.); sus semillas se usan para preparar productos similares al chocolate, posee abundante pulpa con una fuerte fragancia, se consume ampliamente fresco o procesado en jugo, helado, yogur, postres, licores, dulces, mermeladas y jaleas, debido a su agradable sabor ácido y fragancia intensa (Friedman y Petkowicz, 2009). La pulpa de cacao consta de  $84 \pm 2\%$  de agua,  $12\%$  de azúcares (glucosa, fructosa y sacarosa),  $0.9 \pm 0.4\%$  de pectina,  $1.5 \pm 1.3\%$  de hemicelulosas,  $0.8 \pm 0.1\%$  de celulosa,  $0.2 \pm 0.1\%$  de lignina y  $0.7 \pm 0.5\%$  de ácido cítrico,  $0.025\text{--}0.035\%$  de vitamina C, lo que resulta en un pH bajo de 3.3-3.9 (Meersman *et al.*, 2017).

La pulpa de Copoazú tiene uno de los mejores beneficios de aplicaciones industriales debido a su alto nivel de nutrición (Faber *et al.*, 2015); es muy apreciado por su característico sabor ácido y fragancia intensa, y su potente contenido antioxidante; puede asociarse con propiedades beneficiosas para la salud, como el potencial antidiabético (Barros *et al.*, 2016); además, contiene una cantidad considerable de almidón y polisacáridos de pectina (Vriesmann *et al.*, 2009), es fuente de fibra dietética, principalmente fibra soluble y se ha utilizado como bebida funcional por su potencial probiótico y actividad antioxidante (Pereira *et al.*, 2017).

Sin embargo, muy pocos trabajos han enfatizado el uso potencial de subproductos de Copoazú en el desarrollo de nuevos ingredientes funcionales en el enriquecimiento de alimentos para proporcionar una alternativa económica en las industrias alimentarias, las familias agrícolas y la sostenibilidad para el medio ambiente (Calvacanti *et al.*, 2015).

La espectroscopía - transformada de Fourier es una técnica fácil, rápida y confiable, en la que también se ha utilizado en diferentes aplicaciones en el cacao; diferenciación de regiones en África (Oracz y Zyzelewicz, 2019), se ha evaluado compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante total en cacao en grano y chocolate (Batista *et al.*, 2016), caracterización de la fermentación de cacao en grano (Aculey *et al.*, 2010) y otras aplicaciones.

La microbiota inicial de las pulpas en general, son microorganismos inofensivos, los cuales los acompaña otros provenientes del agua, suelo, aire, regularmente las frutas poseen pH ácido, el copoazú tiene un pH 1,9 – 2,7, por lo cual la mayor parte de su biota son hongos, levaduras y bacterias ácido lácticas; su fermentación natural ocurre por la presencia de sus levaduras. En la exportación de otros frutos se ha evidenciado contaminación por *Escherichia coli*, *Salmonella* sp o *Listeria* sp, lo cual presume la importancia del control de calidad microbiológico tanto de la pulpa como del producto transformado (Jiménez, 2003). Los productos frescos a pesar de sus múltiples beneficios, deben tener evaluación de calidad, por ser transmisores de bacterias, patógenos parasitarios y virales causantes de enfermedades humanas y animales. En los reportes internacionales de alimentos se informan patógenos transmitidos por alimentos, dentro de los mayormente importante se encuentra la *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, especialmente en verduras (Petruzzelli, 2018; Graça, 2017).

La evaluación microbiológica de productos frescos varían según las directrices en cada país, como Reino Unido (PHLS, 2000), España (Real Decreto 3484/2000), Francia (Nguyen-The, 1994), Alemania (Lund, 1993), Japon (Fehd, 2002). Igualmente un reglamento dado por Comisión Europea (n.2073/2005 – Diario oficial de la Unión Europea), señalando la importancia de la seguridad alimentaria común; en Colombia los requisitos sanitarios que deben tener las pulpas de frutas está establecido en la resolución 003929 del 2013 (Ministerio de Salud y protección Social), la NTC 5468 - normatividad de los frutos en cuanto a su clasificación fisiológica, las características físicas del fruto, y el rango permisible de especies microbiológicos; estos parámetros se encargan de evaluar el procesamiento de una pulpa cuando se somete a una transformación ya sea física o química, y es una forma de evaluación de vida útil de un producto (Jiménez, 2003). Es de gran importancia la calidad de las materias primas y la aplicación de buenas prácticas de fabricación por parte del personal (Seow. 2012; Petruzzelli, 2018). Dentro de los patógenos bacterianos más conocidos se encuentra la *Salmonella* y *E.coli*, en algunos casos *S.aureus*; en virus (Norwalk, hepatitis A) y parásitos (*Cryptosporidiym*, *Cyclospora*), brotes que se han evidenciados mayormente con productos agrícolas.

Para estudiar las características de la pulpa de Copoazú de diferentes áreas de cultivo en Caquetá-Colombia, el objetivo de este apartado fue evaluar las propiedades fisicoquímicas de la pulpa de copoazú, pH, acidez titulable, actividad de agua, sólidos solubles, contenido de humedad, lipidos totales, nitrógeno y

análisis de composición mediante la aplicación del espectro infrarrojo con reflectancia total atenuada ATR-FTIR como una herramienta efectiva para obtener información química y su discriminación entre diferentes áreas de crecimiento mediante el análisis de componentes principales y evaluar la calidad microbiológica de la pulpa de copoazú fresca y congelada de Copoazú según la normatividad establecida para Colombia y la detección de patógenos bacterianos como indicadores de calidad, *Salmonella* y *Listeria*, materia prima que se vende y comercializa desde el punto de vista de la seguridad alimentaria.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio. El desarrollo de este apartado se llevó a cabo en el Laboratorio de Análisis de Alimentos, ubicado en el Centro Surcolombiano de investigación en café CESURCAFE, de la facultad de la ingeniería Universidad Surcolombiana (Oviedo *et al.*, 2018), avenida Patrana Borrero-carrera 1 Neiva- Huila, 2°56'35.4''N 75°18'03.5''W y el Laboratorio de Biotecnología Alimentaria y control de calidad de Alimentos de la Universidad de la Amazonia, ubicado en el Centro de investigaciones Macagual- Cesar Augusto Estrada a 250 m.s.n.m, localizado a 22 km al Sur de Florencia, Caquetá, a 01° 37' 00" N de latitud norte y 75° 36' 00" W de longitud oeste, en un área de suelos de tipo mesón y terraza, con una precipitación promedio anual de 3600 mm, temperatura media de 26°C y humedad relativa de 80 % (García, 2012).

2.1 Muestras. Los frutos frescos de Copoazú (*Theobroma grandiflorum* L.), se obtuvieron de diferentes zonas del centro de investigaciones, se tomaron 4 muestras de cada zona, con su respectivo triplicado para la evaluación de las características fisicoquímicas y microbiológicas (Tabla 1).

Se realizó mantenimiento de los cultivos, que constó de limpieza y desinfección de estos para obtener mejores frutos (actividades de control de maleza por medio de guadaña, regulación de sombras, control de hormigas, poda – saneamiento vegetal (sanidad)), estos cultivos se encuentran acompañados de otras plantas entre estos caucho, borjón, arazá. La cosecha se realizó buscando frutos sanos en estados de madurez fisiológica, después que el pedúnculo se desprende naturalmente.

Después de la cosecha, la pulpa de Copoazú se separó manualmente de la piel y las semillas y se caracterizaron las muestras, este procedimiento se realizó en la planta piloto de frutas y hortalizas de la Universidad de la Amazonia.

**Tabla 1: Muestras de Copoazú de diferentes áreas de cultivo en la región de Caquetá en Colombia.**

Código de	Zona	Municipalidad	Latitud	Longitud
-----------	------	---------------	---------	----------

Cultivo				
Z1	1	Florencia	1° 29' 53.6" N	70° 39' 10.6" W
Z2	2	Florencia	1° 29' 55.3" N	75° 39' 45.7" W
Z3	3	Florencia	1° 30' 0.4" N	75° 39' 51.1" W

2.2 Contenido de humedad y actividad del agua. Las muestras de pulpa de Copoazú (10 g) se deshidrataron completamente en un horno a 105 ° C durante 24 h; para determinar la materia seca y el contenido de humedad. Las mediciones de la actividad del agua se realizaron con (4 a 4,5 g) de pulpa de Copoazú; se colocaron dentro del analizador de sorción de vapor (VSA Aqualab Decagon Devices, Inc. Pullman, WA), el sensor de punto de rocío se calibró usando cuatro soluciones de sal acuosa saturada proporcionadas por el fabricante del instrumento 13.41 m LiCl (0.25 ± 0.003 aw), 8.57m LiCl ( 0.50 ± 0.003 aw), 6.0 m NaCl (0.76 ± 0.003 aw) y 2.33 m NaCl (0.92 ± 0.003 aw) (Schmidt y Lee, 2012). Las muestras analizadas por triplicado.

2.3 Acidez titulable y mediciones de pH. Se mezclaron muestras (1 g) de pulpa de Copoazú con 100 ml de agua y se añadió fenolftaleína al 0,1%. La titulación se realizó con hidróxido de sodio (NaOH – 0.1 N) hasta obtener un pH = 8.2., y se calculó como un porcentaje de acidez titulable, de acuerdo con el AOAC – 942.15. Las mediciones de pH se realizaron con una mezcla de muestras (5 g) con 95 ml de agua a 25 °C; antes de las mediciones, el instrumento se calibró con soluciones tampón (4, 7 y 10 a 25 ° C), de acuerdo con AOAC O 981.12.

2.4 Índice de refracción. Las mediciones se realizaron con refractómetro digital (MA884, Milwaukee), según el AOAC – 932.12.

2.5 Lípidos totales. Los lípidos se determinaron por el método Soxhlet. Las muestras (2 g) se sometieron a reflujo con 50 ml de éter de petróleo para inmersión y lavado durante 60 minutos y se sometieron a reflujo durante 30 minutos en matraces de fondo redondo. Los extractos se evaporaron mediante un evaporador rotatorio a

45°C hasta que se evaporó todo el disolvente, y se calcularon como un porcentaje de lípidos. Las muestras analizadas por triplicado.

2.6 Proteína bruta. El contenido de proteína cruda se determinó con el método Kjeldahl; las muestras (1 g) se digirieron con 15 ml de ácido sulfúrico y tres tabletas de Kjeldahl durante 1 hora a 420 ° C. La destilación se realizó con ácido bórico al 3% y NaOH al 32%, y la valorización se realizó con un indicador T-Shiro y ácido clorhídrico 0.1 N. La proteína cruda se calculó como nitrógeno  $\times$  6.25. Las muestras analizadas por triplicado.

2.7 Mediciones ATR-FTIR. Las muestras frescas (10 g) de pulpa de Copoazú se liofilizaron por 24 horas (Equipo de mesa 01. JLG, Labotecgroup, bomba de vacío 2XZ-2), se estabilizaron en desecante durante 30 minutos, después de que las muestras se molieron y separaron hasta un tamaño de partícula fino (partículas retenidas en un tamiz estándar # 60; diámetro del agujero de 0.25 mm). Las mediciones del espectro se realizaron con un espectrómetro ATR-FTIR CARY 630 (Agilent, Santa Clara, CA, EE. UU), entre las longitudes de onda 4000-650  $\text{cm}^{-1}$ , con una resolución de 8  $\text{cm}^{-1}$  y 20 escáneres (Vriesmann, 2010). Las mediciones de ATR-FTIR se realizaron en una atmósfera seca y a temperatura ambiente ( $20 \pm 0.5$  ° C) (Bahamon *et al.*, 2018). Se colocaron aproximadamente (0,5 g) de pulpa de Copoazú seca en el accesorio de muestreo y se presionaron. Todas las mediciones se analizaron por triplicado para cada uno de los parámetros.

2.8 Control de Calidad microbiológica de la pulpa.

Se evaluó la pulpa fresca inmediatamente después de su recolección de las tres zonas anteriormente mencionadas; igualmente se evaluó la pulpa congelada pasteurizada de las tres zonas, de cada zona tres muestras con sus respectivas repeticiones. La calidad microbiológica se determinó mediante recuento de mesófilos AOAC 966.23, mohos y levaduras AOAC 997.02, coliformes totales AOAC 991.14, *S.aureus* AOAC 975.55, detección de *Salmonella* spp/25g (AOAC Int. 2003); (Saavedra *et al.*, 2014; Granados, 2013), teniendo en cuenta lo solicitado por la resolución 003929 del 2013 (Ministerio de Salud y protección Social).

Recuento de microorganismos aerobios mesófilos, agar plate count (Difco™ Stantard methods agar peptona de caseína glucosa extracto de levadura – Estados Unidos EUU), incubación 35  $\pm$  2°C 48 horas  $\pm$  2 h, inoculación en profundidad, de muestras diluidas  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ , placas duplicadas. Los resultados fueron informados como recuento de placas aerobias/g (ufc/g) (AOAC 966.23-a). Para recuento de mohos y levaduras se usó el método de petrifilm™ (AOAC 997.02), las diluciones de las muestras fueron realizadas con agua buferada de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , siguiendo las instrucciones del fabricantes para la conservación de las placa de petrifilm a  $<8^\circ\text{C}$ , se realizaron diluciones seriadas  $10^{-1}$

$10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ , se homogenizo y luego se colocó en la placa petrifilm, la cual se encontró en una superficie plana, el inóculo se realizó con 1 ml suspendido mediante pipeteado perpendicular en el centro de la base y se procedió a colocar la película superior sobre el inóculo, y presión mediante el esparcidor y se dejó reposar durante 1 minuto. Las placas fueron incubadas en posición horizontal con la cara transparente hacia arriba ( $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ ) por 5 días, en bloque no mayor de 10 unidades, según el inserto del fabricante las levaduras son colonias pequeñas, color verde azulado o blanquecino, los mohos suelen ser azules pero también puede tomar su pigmentación natural y son más grandes y difusas que las levaduras, se reporta promedio de las colonias/g. Para coliformes y *E.coli* fue usado petrifilm™ (AOAC 991.14), las muestras se prepararon como se describió anteriormente del resultado de la homogenización, con diluciones seriadas con una incubación  $35^{\circ}\text{C}$  24  $\pm$  2 h según el fabricante aparecen colonias rojas con una o más burbujas asociadas a la producción de  $\text{CO}_2$ , se realizó conteo en las placas que se encontraban entre 15-150 colonias, las colonias sin gas no son contadas para coliformes; para *E.coli*, las colonias aparecen de color azul asociadas a burbujas de gas.

Para la evaluación de microorganismos indicadores de manipulación se utilizó petrifilm™, Staph Express – recuento de *Staphylococcus aureus*; paralelo se sembró con agar Bair Parker (Condalab – España), siembra en superficie 1 ml, diluciones seriadas por triplicado, 48 h  $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$  (AOAC 975.55), su conteo se realizó entre 20-200 colonias, las colonias positivas presuntivas (colonias circulares, convexas, lisas, diámetro 2-3mm grisáceas a negro azabache con margen de color blanquecino) se evaluó para coagulasa, se reportan *S. aureus* /g del alimento evaluado.

Para los microorganismos indicadores de calidad o microorganismos de contaminación, detección de *Salmonella* por medio de cuatro etapas, pre-enriquecimiento, etapa de enriquecimiento selectivo, etapa de aislamiento en medios selectivos, pruebas bioquímicas diferenciales (AOAC Int. 2003) (Pedraza, 2014), en la primera etapa se realizó la dilución con una solución buferada a  $37^{\circ}\text{C}$  /24 horas (normalizador metabólicamente las células de *Salmonella* spp); en la siguiente etapa (estimulación y crecimiento de la *Salmonella*, inhibición de flora acompañante), se transfirió 1 ml de la etapa uno, a 10 ml de caldo selenito cistina (Condalab – España),  $43^{\circ}\text{C}$ /24 h, y 1 ml de la etapa uno, a 10 ml de caldo tetrionato suplementado (Condalab – España) (0.2 ml de solución de yodo y 0.1 ml de verde brillante al 0.1 % (Condalab – España) llevados a  $43^{\circ}\text{C}$  / 24 h. En la etapa tres (diferenciación de colonias de *Salmonella* de otras bacterias), se debe sembrar en agar XLD (agar xilosa, lisina dexocolato) (Dibico – Mexico) y agar bismuto sulfito (Condalab - España) para cada caldo de enriquecimiento  $35^{\circ}\text{C}$ /48h.

Adicionalmente como indicador de contaminación se realizó detección de *Listeria* por placa petrifilm™ para cada zona en evaluación (Jiménez, 2003), método

aceptado por la AOAC (certificado N.º 030601). El análisis se realizó para la pulpa fresca y la pulpa congelada durante 3 meses.

## 2.9 Análisis estadístico

Los resultados se procesaron a partir del análisis de varianza (ANOVA unidireccional o multifactorial) con un nivel de confianza del 95%. Se realizaron análisis de comparación de medias para identificar diferencias estadísticamente significativas  $p < 0.05$  de los parámetros evaluados entre las diferentes categorías. Los procedimientos estadísticos se realizaron con Statgraphics Centurion XVI. (Manugistics Inc., Rockville, MD, EE. UU). Los valores de la evaluación de calidad microbiológica, fue expresada mediante descripción de crecimiento de la misma y comparación entre zonas.

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la caracterización físico-química de las tres zonas colectadas para la evaluación de la pulpa de copoazu el contenido de humedad fue alto (Tabla 2), propios de los vegetales frescos, una alta actividad de agua y altos contenidos en sólidos solubles como se señala en la siguiente caracterización:  $83,06 \pm 0,33 - 85,85 \pm 0,31$  % de humedad, concordante con Cardona (2013);  $0,99 \pm 0,003 - 1,00 \pm 0,003$  de actividad de agua;  $15,38 \pm 0,12 - 15,52 \pm 0,12$  de °brix y  $3,61 \pm 0,01 - 3,72 \pm 0,01$  de pH, mayor a lo publicado 3.30 por Melgarejo (2006) y similar a lo publicado por Hernández (2004), la acidez de  $1,96 \pm 0,04 - 2,65 \pm 0,04$  % publicado como porcentaje de ácido cítrico muy similar a  $2,10 \pm 0,3$  % (Hernández, 2004, Melgarejo, *et al*, 2006). El ácido cítrico es el más representativo en la fruta, con valores de 3% del tejido sobre el peso fresco (Fisher y Martínez, 1999). En comparación con pulpas como piña y mango con valores de pH relativamente bajos (4,03 - 4,16), (4,28 – 5,28), respectivamente (Difonzo, 2018; Quintero, 2013).

Los valores de proteína y lípidos oscilan entre 3,28 a 5,33 % d. b con una diferencia significativa entre la zona uno con las otras, siendo mayor la zona dos, nitrógeno ente 6,85 a 6,92 %. En general los valores encontrados de las pulpas señalan como una buena opción alimentaria para mantener un buen estado de salud; valores de nutrientes necesarios para las funciones corporales, como es el caso de las proteínas las cuales se requiere de los alimentos para la activación de vías metabólicas, generación de aminoácidos igualmente para fortalecer los huesos, musculos y piel; igualmente son importantes para funciones celulares como catálisis, regulación, estructural, defensiva y de transporte (Wu, 2016). Por otro lado los lípidos son importante para el funcionamiento del cuerpo, por ser una fuente de energía, esencial para generación de tejido, además de tener funcionalidad antiinflamatoria (Alabdulkarim, 2012; Mesa, 2006), sin embargo en el caso de la pulpa de copoazú no proporciona alto contenido.

**Tabla 2: Parámetros fisicoquímicos de muestras de pulpa de Copoazú de diferentes áreas de cultivo.**

Parámetros	Zona		
	1	2	3
<b>pH</b>	3.72 ± 0.01 <sup>a</sup>	3.61 ± 0.01 <sup>b</sup>	3.69 ± 0.01 <sup>a</sup>
<b>Acidez titulable (Ácido Cítrico %)</b>	2.3 ± 0.04 <sup>a</sup>	2.65 ± 0.04 <sup>b</sup>	1.96 ± 0.04 <sup>c</sup>
<b>Actividad de agua (Aw)</b>	0.99 ± 0.003 <sup>ab</sup>	0.99 ± 0.003 <sup>a</sup>	1 ± 0.003 <sup>b</sup>
<b>Sólidos solubles (20 °C)</b>	12.38 ± 0.12 <sup>a</sup>	12.42 ± 0.12 <sup>a</sup>	12.52 ± 0.12 <sup>a</sup>
<b>Humedad (% b.s)</b>	6.069 ± 0.154 <sup>a</sup>	4.904 ± 0.115 <sup>b</sup>	5.338 ± 0.124 <sup>c</sup>
<b>humedad (% b. h)</b>	85,85±0,31 <sup>c</sup>	83,06±0,33 <sup>a</sup>	84,22±0,31 <sup>b</sup>
<b>Lípidos totales (% b.s)</b>	3.28 ± 0.41 <sup>a</sup>	5.33 ± 0.41 <sup>b</sup>	5.05 ± 0.41 <sup>b</sup>
<b>Nitrógeno (%)</b>	6.85 ± 0.27 <sup>a</sup>	7.03 ± 0.27 <sup>a</sup>	6.92 ± 0.27 <sup>a</sup>

Las medidas del espectro infrarrojo medio para la pulpa de Copoazú se pueden ver en la Figura 1.

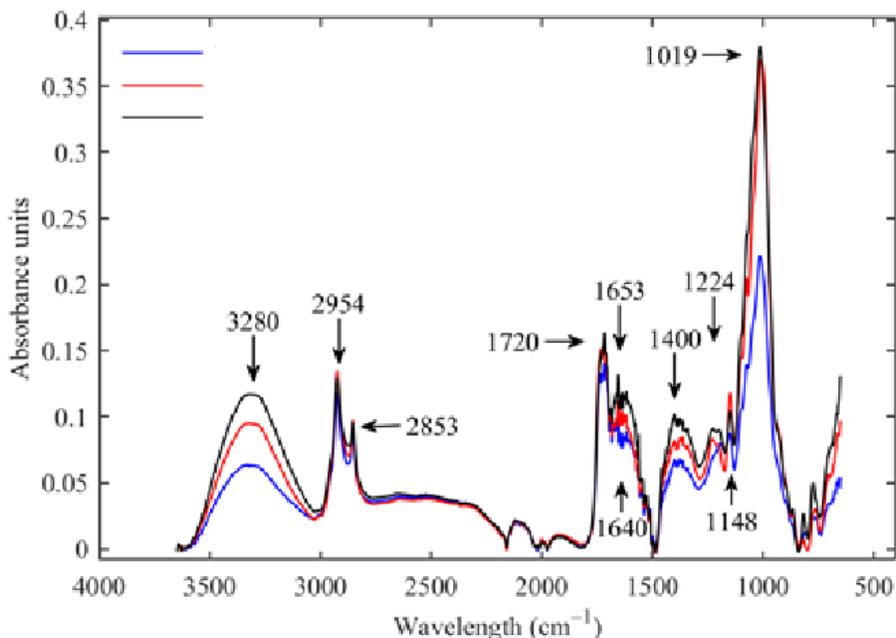


Figura 1. Promedio medio de espectros ATR-FTIR de muestras de pulpa seca de Copoazú. Color azul (zona 1), color rojo (zona 2), color negro (zona 3).

La Figura 1 muestra el espectro FTIR-ATR de la pulpa de Copoazú, se encontraron aproximadamente 214 picos en todo el espectro, de los cuales la longitud de onda con la mayor absorción es  $1012\text{ cm}^{-1}$ , donde probablemente pertenece a la interacción carbono-oxígeno (C-O), se encuentra en la "región de la huella digital". Una de las regiones más importantes es la que va de  $3500\text{ cm}^{-1}$  a  $3000\text{ cm}^{-1}$ , ya que es la región donde se encuentran las aminas (NH) y la región de  $3000\text{ cm}^{-1}$  a  $2500\text{ cm}^{-1}$  relacionada con el grupo carboxilato (OH), este grupo se puede encontrar junto con azúcares (glucosa, fructosa y sacarosa) (Ibrahim *et al.*, 2006). Finalmente, el estiramiento (C = O) se calcula a  $1718\text{ cm}^{-1}$ .

### Análisis exploratorio

El análisis de componentes principales (ACP) en la matriz compuesto con los valores de absorbancia de los picos relacionados con grupos funcionales representativos en la región de  $400$  a  $4000\text{ cm}^{-1}$  y los parámetros fisicoquímicos en la pulpa de copoazú, se muestran en la Figura 2.

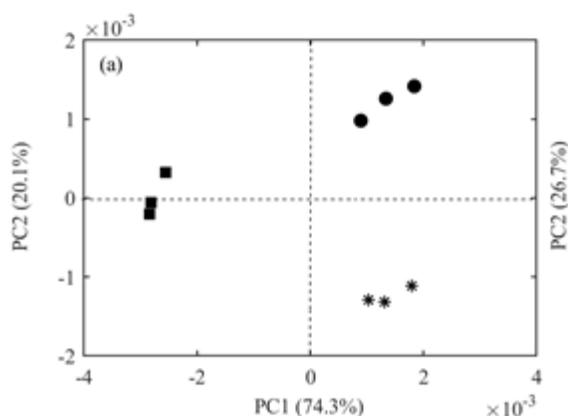


Figure 2. Diagrama de dispersión ACP de espectros ATR- FTIR, zona 1 (■), zona 2 (●) and zona 3 (\*)

Se evidencia tres grupos específicos correspondiente a las zonas de las muestras colectadas (Figura 2), esto debido a la diferenciación de las propiedades fisicoquímicas y de las diferencias espectrales ATR-FTIR. Así el análisis señala el primer componente PC1 74,3%, el segundo 20,1%, la primera zona de cultivo se ubica en el PC1 negativo, mientras que la segunda y tercera zona de cultivo se ubican en el mismo componente principal en lado positivo y con respecto al PC2, la segunda zona de cultivo se ubica en valores positivos y la tercera zona de cultivo en el lado opuesto. Con base a los mostrado en la Figura 1 y 2, se puede inferir que existe diferencias químicas en la composición de las zonas, especialmente en la fracción lipídica, igualmente la diferencia de los carbohidratos en las diferentes zonas. Los resultados fueron consistentes con lo informado por Craig *et al.*, (2018) en otra matriz alimentaria.

En la Tabla 3 se presentan los resultados de las pruebas microbiológicas de la pulpa en las tres zonas analizadas, resultados satisfactorios según la normatividad. Se realizó el recuento de *E.coli*, recuento mesófilos recuento de mohos y levaduras. De acuerdo con la norma, el recuento se encuentra dentro de los rangos permitidos para la pulpa, cuyos valores son similares a (Hernández, 2004) lo cual indica buenas prácticas de higiene durante la obtención de la pulpa, los valores de mesófilos para las tres zonas en pulpa fresca no tiene ninguna diferencia significativa (Z1=118, Z2=112, Z3=106 ufc/g), y tiene relación con lo indicado por Hernández (2004), estos valores difieren para otros frutos como guanábana, mango y maracuyá reportado por Breymann (2013), los cuales oscilan entre 12 – 14 UFC/g; que son frutos que tienen mayor manejo agronómico en Colombia; sin embargo, esto no indica que valores bajos de bacterias, no puedan aumentar durante el almacenamiento por lo que se debe realizar estudios durante el tiempo de almacenamiento como lo refiere Breyman, (2013), en jugos pasteurizados (Pastrana, 2015).

**Tabla 3. Caracterización microbiológica de la Pulpa de copoazú**

	Pulpa de copoazú		Valores
<b>Recuento <i>E.coli</i> UFC/ml</b>	Z1	0 ufc/g	<b>n= 5 m= &lt;10 M= - c= 0</b>
	Z2	3 ufc/g	
	Z3	3 ufc/g	
<b>Recuento de mohos y levaduras UFC/g o ml</b>	Z1	420	<b>n= 5 m= 1.000 M= 3.000 c= 2</b>
	Z2	113	
	Z3	246	
<b>Detección de Salmonella/25 g</b>	Z1	Ausencia	<b>n= 5 m= Ausencia M= - c= 0</b>
	Z2	Ausencia	
	Z3	Ausencia	

**Tabla 4. Caracterización microbiológica de la Pulpa de copoazú pasteurizada, congelada durante tres meses de almacenamiento.**

	Zona	Pulpa de copoazú mes 1	Pulpa de copoazú Mes 2	Pulpa de copoazú Mes 3	Valores Resolución 3929/2013
<b>Recuento de microorganismos mesófilos ufc/g o ml</b>	Z1	115	111	116	<b>n= 5 m= 1000 M= 3000 c= 1</b>
	Z2	112	107	111	
	Z3	100	100	119	
<b>Recuento <i>E.coli</i> ufc/g</b>	Z1	4	2	0	<b>n= 5 m= &lt;10 M= - c= 0</b>
	Z2	3	0	0	
	Z3	0	0	5	
<b>Recuento de mohos y levaduras UFC/g o ml</b>	Z1	46	46	53	<b>n= 5 m= 100 M= 200 c= 1</b>
	Z2	28	27	32	
	Z3	29	31	38	

n= número de unidades a examinar, m= Índice máximo permisible para identificar nivel de buena calidad, M=Índice máximo permisible para identificar nivel aceptable de calidad, c= Número máximo de muestras permisibles con resultado entre m y M, <= léase menor que

Se realizó evaluación de indicadores de calidad de la pulpa de copoazú congelada de las tres zonas, cada una de los tres replicas correspondientes del mes 1-2-3 (1-2-3 meses), con resultados satisfactorios para cada uno como se muestra en la Tabla 4, Tabla 5.

**Tabla 5. Análisis de presencia o ausencia de *Listeria* spp como indicador de contaminación.**

Número de muestras	Ausencia o presencia <i>Listeria</i> spp	Ausencia o presencia de <i>Salmonella</i> spp
Pulpa fresca	Ausencia	Ausencia
Pulpa congelada	Ausencia	Ausencia

Los valores de mohos y levaduras tienen diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre la zona uno y las otras, siendo mayor la zona uno, lo que da entender que tiene mejor manejo de higiene en la zona dos y tres.

En la Tabla 4 se señala los valores microbiológicos exigidos para las pulpas que tienen tratamientos térmicos, en el caso de nuestro apartado se encuentra congelado durante tres meses, el primer mes se presentó mayores valores de *E.coli*, en la zona uno, siendo constante estos valores aumentados en esa zona; aunque se encuentra dentro de los parámetros permitidos acorde a lo descrito para las tecnologías convencionales, se inactivan microorganismos y enzimas y prolongan la vida útil de los alimentos (Roobab, 2018), y en la misma vía se reporta mayor microorganismos cuando estas materias primas son transformadas en jugos u otro tipo de producto por lo que su higiene se debe hacer para toda la cadena desde el cultivo (Sultana, 2019).

Algunos autores reportan estos análisis para otros tipos de productos frescos como las hortalizas encontrando gran números de mesófilos, *S. aureus*, y *Salmonella*, los cuales hacen parte del mismo enfoque dentro de la seguridad alimentaria (Cruz, 2019).

El copoazú, como las frutas que tienen pH ácido, con concentración de azúcares considerables, les favorece estas características, al evitar crecimiento de algunos microorganismos mesófilos, por lo contrario lo hace más propenso al crecimiento de mohos, levaduras y bacterias ácido lácticas (Breyman, 2013).

Por otro lado, se evaluó la presencia o ausencia de *Listeria*, utilizando la técnica de petrifilm<sup>TM</sup> (Tabla 5), detectando resultados satisfactorios para ambos casos, para pulpa fresca y para pulpa congelada en el tiempo evaluado, lo que coincide con diversos autores (Jiménez, 2003; Breyman, 2013). La prueba de indicador de

calidad de *Listeria* es una prueba destacada en productos que tienen presevantes, denotando ausencia de colonias en todos los casos, siendo lo esperado de una materia prima con buenas prácticas de manipulación, parámetros evaluados regularmente en productos desarrollados en medios hipertónicos como las salsas.

Sin embargo es implícito generar esta prueba debido a los hallazgos como los brotes de listeriosis en Estados Unidos relacionados con melón, igualmente la tendencia a aumentar la vida útil de los alimentos refrigerados puede permitir el crecimiento de patógeno como *Listeria monocytogenes*, tendencia relacionadas con el envasado y con el tipo de empaque o atmosfera (Graça, 2017).

Igualmente los resultados obtenidos para la detección de *Salmonella* fueron satisfactorias, al no evidenciar presencia de colonias tipo *Salmonella* spp; en los últimos años se ha presentado brotes de *Salmonella* entérica en fruta fresca como mango, *Salmonella typhimurium* y *Salmonella Newport* en melón, papaya, sandía (Graça, 2017; Petruzzelli, 2018).

Este tipo de estudio de calidad microbiológica de frutas son relevantes para la detección de brotes alimenticios, así mismo como para aplicar técnicas en matrices alimentarias, dentro de las cuales una de las más usadas recientemente en ciencia y tecnología de alimentos para frutas, jugos es el ultrasonido (Firouz, 2019), otras tecnología no térmicas como campo eléctrico pulsado, altas presiones, irradiaciones y combinaciones en pro de la conservación y para satisfacer la demanda de los consumidores son opciones a trabajar sin comprometer propiedades nutricionales (Roobab, 2018); en general para cualquier tipo de evaluación de técnica en búsqueda del mayor rendimiento el conocimiento de la microbiota inicial y el control de calidad del producto es fundamental, incluso para incursionar en metodología como de secado en la generación de alimentos funcionales (Khiari, 2019).

La norma colombiana 3929 utilizada para la determinación de parámetros microbiológicos de jugos, concentrados o pulpas, se encuentra acorde los datos aquí suministrado para la pulpa de copoazú, igualmente se puede inferir que estos datos son aptos para otros países (COVENIN 1699 y COVENIN 1337), siendo que la norma Colombiana es similar en los valores de referencia de los parámetros microbiológicos según Pájaro (2018) y Hernandez (2006). Los análisis físicoquímicos y microbiológico permiten acercarse a la vida útil tanto de la pulpa como de un producto (Pimentel, 2017; Kaddumukasa, 2017); lo cual se puede deducir para los datos encontrados para la pulpa de copoazú son beneficiosos; este tipo de productos frescos son un vehículo para la transmisión de enfermedades transmitidas de alimentos (oliveira, 2019), que anteriormente se encontraba como enfermedades zoonóticas (Graça, 2017), lo cual hace relevante la aplicación de protocolos como los indicadores de calidad de *Listeria* y *Salmonella*.

Los análisis microbiológicos implementados fueron realizados en promedio de una semana. Ciertamente, por seguridad es conveniente conocer la calidad microbiológica de un alimento en un tiempo menor, por lo cual, se sugiere implementar métodos de detección rápida de microorganismos basados en PCR “*Polymerase Chain reaction*”.

Es necesario que las personas encargadas de la manipulación de alimentos conozcan los beneficios de una buena higiene y limpieza, así mismo como los contra mediante este tipo de estudio, y de esta manera llegar a uso de mejores tecnología para el estudio evolutivo de los microorganismos (secuenciación) que afectan la salud humana y animal, para mejorar la seguridad alimentaria como lo manifiesta Jagadeesan (2018) y se demuestra en estudios Van Luong (2021). Igualmente proporciona el enfoque para la nanotecnología como técnica de detección y seguimiento de enfermedades transmitidas por alimentos y su papel o aporte a la seguridad alimentaria (Krishna *et al.*, 2018).

#### 4. CONCLUSIÓN

La pulpa de copoazú cultivada en Macagual-Caqueta cuenta con carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos orgánicos. Es un producto con una alta actividad de agua, haciéndolo susceptible a la contaminación por microorganismos patógenos. Sin embargo, es de resaltar que al realizar buenas prácticas de higiene en su cosecha, transporte y despulpado se puede garantizar un producto libre de *E. coli*, *Salmonella*, *Listeria*, *S. aureus*. La presencia de mesófilos, mohos y levaduras al encontrarse dentro de los valores permitidos por norma permiten asegurar que el producto es seguro para el consumo.

Los resultados de este apartado impulsan el aprovechamiento del copoazú, para la obtención de bebidas, cremogenados, helados, u otras alternativas para alimentación humana y animal. Así como resaltar la importancia de mantener un control de calidad constante a los protocolos de higiene y manipulación de alimentos como el control de calidad microbiológica de productos frescos; la calidad de la fruta recién cortada es preocupante, basados en la seguridad alimentaria, como también en el deterioro relacionada a la vida útil del producto que puede generar pérdidas económicas.

## CAPITULO II

### BIBLIOGRAFIA

- Abadias, M., Usall, J., Anguera, M., Solsona, C., & Viñas, I. (2008). Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. *International journal of food microbiology*, 123(1-2), 121-129. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.12.013>
- Aculey, P., Snitkjaer, P., Owusu, M., Bassompiere, M., Takrama, J., Nørgaard, L., Nielsen, D. Ghanaian cocoa bean fermentation characterized by spectroscopic and chromatographic methods and chemometrics. *Journal of Food Science*, 2010. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01710.x>
- Alabdulkarim, B., Abdel, Z., Arzoo, S. (2012). Role of some functional lipids in preventing disease and promoting health. *Journal of King Saud University- Science*. Vol 24. 319-329p.
- AOAC official method 942.15 Acidity (valuable) of fruit products. 1965. Official Methods of Analysis of AOAC International.
- AOAC official method, 981.12. Acidified food. 1981. Official Methods of Analysis of AOAC International.
- AOAC official method 932.12 Soluble solids in fruits and fruit products. 1980. Official Methods of Analysis of AOAC International.
- AOAC official method 990.12 Aerobic Plate Count in Foods Dry Rehydratable Film (Petrifilm Aerobic Count Plate) Method. 1994. Official Methods of Analysis of AOAC International.
- AOAC official method 966.23. Aerobic Plate Count, most probable number of coliform bacteria and *Escherichia coli*, and *Staphylococcus* in products. Method. 1994. Official Methods of Analysis of AOAC International
- AOAC official method 995.21. Yeast and mold counts in foods. Hydrophobic grid membrane filter (ISO – GRID). Method using YM-11 Agar First Action 1995.
- AOAC official method 997.02. Yeast and mold counts in foods. Dry rehydratable film method (Petrifilm method) first Action 1997. Final Action 2000.
- AOAC Official Method 983.25 Total Coliforms, Fecal Coliforms, and *Escherichia coli* in Foods Hydrophobic Grid Membrane Filter Method First Action 1983 Final Action 1985.
- AOAC Official Method 991.14 Coliform and *Escherichia coli* Counts in Foods Dry Rehydratable Film (Petrifilm *E. coli* Count Plate and Petrifilm Coliform Count Plate) Methods First Action 1991 Final Action 1994
- AOAC Official Method 975.55 *Staphylococcus aureus* in Foods Surface Plating Method for Isolation and Enumeration First Action 1975 Final Action 1976.
- AOAC Official Method 967.27 *Salmonella* in Foods Identification First Action 1967 Final Action 1968.
- Bahamon, M. A. F., Parrado, L. X.; Gutiérrez-Guzmán, N. 2018. ATR-FTIR for discrimination of espresso and American coffee pods, *Coffee Science* 13 (4): 550-558 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.25186/cs.v13i4.1499>
- Barros, M., García-Villalba, R., Tomás-Barberán F. A., Genovese, M. I. (2016). Evaluation of the distribution and metabolism of polyphenols derived from

cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) in mice gastrointestinal tract by UPLC-ESI-QTOF. *Journal of Functional Foods* 22: 477–489p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2016.02.009>

- Batista, N.; Andrade, D.; Ramos, C.; Dias, D.; Schwan, R. Antioxidant capacity of cocoa beans and chocolate assessed by FTIR. (2016). *Food Research International*. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.10.028>
- Berthold-Pluta, A., Garbowska, M., Stefańska, I., & Pluta, A. (2017). Microbiological quality of selected ready-to-eat leaf vegetables, sprouts and non-pasteurized fresh fruit-vegetable juices including the presence of *Cronobacter* spp. *Food microbiology*, 65, 221-230. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.03.005>
- Breymann, V.J., Chaves, C., María Arias, L. (2013). Análisis de la calidad microbiológica y potencial presencia de *Listeria monocytogenes* en pulpas de guanábana (*Annona muricata*), mango (*Mangifera indica*) y maracuya (*Passiflora edulis*) *Costarricenses*. *Archivos Latinoamericanos de nutrición. Órgano Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición*. Vol 63 (1): 53- 57p.
- BOE-A-1983-9198 Real Decreto 667/1983, de 2 de marzo, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-sanitaria para la elaboración y venta de zumos de frutas y de otros vegetales y de sus derivados
- Presidencia del Gobierno «BOE» núm. 77, de 31 de marzo de 1983 Referencia: BOE-A-1983-9198
- Cardona, J., Díaz, R., Gutiérrez, R., Hernández, M.S., Fernández, J.P. (2013). Clarification effects in a functional copoazú (*Theobroma grandiflorum*) beverage. *Foods*. Doi: 1, 1-x manuscripts; doi: 10.3390/foods10x000x. 1-7p.
- Cavalcanti, N. R., Albuquerque, L. C., Meireles, A. M. A. (2015). Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of cupuassu butter from defatted seed residue: Experimental data, mathematical modeling and cost of manufacturing. *Food and Bioprocess Technology*. DOI: <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.fbp.2015.10.004>
- Craig, A. P.; Botelho, B. G.; Oliveira, L. S.; Franca, A. S. 2018. Mid infrared spectroscopy and chemometrics as tools for the classification of roasted coffees by cup quality. *Food Chemistry* 245: 1052-1061. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.066>
- Cruz, M. R. G. D., Leite, Y. J. B. D. S., Marques, J. D. L., Pavelquesi, S. L. S., Oliveira, L. R. D. A., Silva, I. C. R. D., & Orsi, D. C. (2019). Microbiological quality of minimally processed vegetables commercialized in Brasilia, DF, Brazil. *Food Science and Technology*, 39, 498-503. Doi: <https://doi.org/10.1590/fst.16018>
- De Nazaré Melo Ramos, S., Danzl, W., Ziegleder, G., Efraim, P. (2016). Formation of volatile compounds during Cupuassu fermentation: Influence of pulp concentration, *Food Research International*. (16), S0963-9969p. DOI: 10.1016/j.foodres.2016.06.025
- Difonzo G., Vollmer K., Caponio F., Pasqualone A., Carle R. & Steingass C.B. (2018). Characterisation and classification of pineapple (*Ananas comosus* [L.] Merr.) juice from pulp and peel. *Food Control*. Vol 96: 260-270p. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.09.015>
- Faber, A. M., Yuyama, O. L. K., 2015. Nectar Mix Functional Based on Amazonian Fruits. *Journal of Cell Science & Therapy*. DOI: 10.4172/2157-7013.1000197
- Fernandes, A., Correa, W-S., Goncalves, V-K., Lemos, T. de O., Gomes, F. W., Narain, N., Rodrigues, S. (2017). Impact of fermentation conditions on the quality and sensory properties of a probiotic cupuassu (*Theobroma grandiflorum*)

- beverage. *Food Research International*. (17). S0963-9969 30395-2p. DOI: 10.1016/j.foodres.2017.07.055
- Fisher, G. y Martínez, O. (1999). Calidad y madurez de la uchuva (*Physalis peruviana* L.) en relación con la coloración de la fruta. *Revista Agronomía colombiana*. Vol 16 (1-3): 35-39p.
  - García-Rincón, P., Rodríguez-Pérez, W., Rosas-Patiño, G., Velásquez-Restrepo, J. (2012). Caracterización física, química y microbiológica de dos tipos de suelo del piedemonte amazónico. *Revista Ingenierías & Amazonia* Vol 5 (1): 51-57p.
  - Graça, A., Esteves, E., Nunes, C., Abadias, M., & Quintas, C. (2017). Microbiological quality and safety of minimally processed fruits in the marketplace of southern Portugal. *Food control*, 73, 775-783. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.09.046>
  - Granados, C., Torrenegra, M., Acevedo, Y., Romero, P. (2013). Evaluación fisicoquímica y microbiológica del aperitivo vínico de lulo (*Solanum quitoense* L.). En: *Información Tecnológica* Vol. 24 N° 6.
  - Hernández M.S., Barrera, J. (2004). Bases técnicas para el aprovechamiento agroindustrial de especies nativas de la Amazonia. Aspectos biológicos de conservación de frutas promisorias de la amazonia colombiana Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas, SINCHI. Universidad de la Amazonia. 100 p.
  - Hernández, A.S., Calderón, S.S. (2006). Obtención de una cobertura de chocolate a partir de cacao silvestre, copoazú (*Theobroma grandiflorum*), y maraco (*Theobroma bicolor*), de la Amazonia. Facultad de Ingeniería de Alimentos, Universidad de la Salle, Bogotá DC. 179p.
  - Ibarz, A., Garvin, A., & Costa, J. (1996). Rheological behaviour of sloe (*Prunus spinosa*) fruit juices. *Journal of Food Engineering*, 27(4), 423-430
  - Ibrahim, M., Alaam, M., El-Haes, H., Jalbout, A., Leon, A. (2006). Analysis of the structure and vibrational spectra of glucose and fructose, *Eclética Química*. [Doi.org/10.1590/S0100-46702006000300002](https://doi.org/10.1590/S0100-46702006000300002)
  - Instituto Colombiano de normas técnicas Incontec, NTC 486. (2000). Masa o pasta o licor y torta de cacao para la fabricación de productos de cacao y chocolate, ratificación Noviembre 22 del 2000.
  - Jagadeesan, B., Gerner-Smidt, P., Allard, M. W., Leuillet, S., Winkler, A., Xiao, Y., & Grant, K. (2019). The use of next generation sequencing for improving food safety: translation into practice. *Food microbiology*, 79, 96-115. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.11.005>
  - Jimenez, G., Arias, M. (2003). Caracterización Microbiológica de la pulpa de piña para su pasteurización y uso industrial. Universidad de Costa Rica. <http://repositorio.sibdi.ucr.ac.cr:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/1033/22675.pdf?sequence=1>
  - Kaddumukasa, P. P., Imathiu, S. M., Mathara, J. M., & Nakavuma, J. L. (2017). Influence of physicochemical parameters on storage stability: Microbiological quality of fresh unpasteurized fruit juices. *Food science & nutrition*, 5(6), 1098-1105. Doi: <https://doi.org/10.1002/fsn3.500>
  - Khiari, R., Zemni, H., & Mihoubi, D. (2019). Raisin processing: physicochemical, nutritional and microbiological quality characteristics as affected by drying process. *Food reviews international*, 35(3), 246-298. Doi: <https://doi.org/10.1080/87559129.2018.1517264>

- Krishna, V. D., Wu, K., Su, D., Cheeran, M. C., Wang, J. P., & Perez, A. (2018). Nanotechnology: Review of concepts and potential application of sensing platforms in food safety. *Food microbiology*, 75, 47-54. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.01.025>
- Meersman, E., Struyf, N., Kyomugasho, C., Jamsazzadeh, Z., Santanina, J., Baert, E., Hemdane, S., Vrancken, G., Verstrepen, K., Courtin, C., Hendrickx, M., Steensels, J. (2017). Characterization and Degradation of Pectic Polysaccharides in Cocoa Pulp. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. DOI: 10.1021/acs.jafc.7b03854.
- Melgarejo, L. Hernández, M., Barrera, J., Carrillo, M. (2006). Oferta y potencialidades de un banco de germoplasma del genero Theobroma en el enriquecimiento de los sistemas productivos de la región Amazónica. 1 ed. Bogotá (Colombia): Script.224p.
- Mesa, M.D., Aguilera, C.M., Gil Hernandez, A. (2006). *Rev. Nutr. Hosp. Supl.2.* 30-43p.
- Ministerio de Salud y protección Social. (2013). Resolución 003929 del 2013. Requisitos sanitarios que deben cumplir las frutas y bebidas con adición de jugo (zumo) o pulpa de fruta o concentrados de fruta, clarificados o no, o la mezcla de éstos que se procesen, empaquen, transporte, importen y comercialicen.
- Ministerio de la protección Social, Colombia. (2011). Rotulado Nutricional De Alimentos – Resolución 333 De 2011.
- Muteki, K., MacGregor, J. F., & Ueda, T. (2007). Mixture designs and models for the simultaneous selection of ingredients and their ratios. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 86(1), 17-25.
- Oliveira, M., Rodrigues, C. M., & Teixeira, P. (2019). Microbiological quality of raw berries and their products: A focus on foodborne pathogens. *Heliyon*, 5(12), e02992. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02992>
- Oracz, J., Zyzewicz, D. In Vitro Antioxidant Activity and FTIR Characterization of High-Molecular Weight Melanoidin Fractions from Different Types of Cocoa Beans. (2019). *Antioxidants*. *Antioxidantes* 2019 , 8 , 560. <https://doi.org/10.3390/antiox8110560>
- Oviedo-Arbelaéz, M., Lozano-Vera, J., Amorocho-Cruz, C.M. (2018). Physicochemical and microbiological characterization of blackberry (*Rubus glaucus* Benth) wine, El Hobo (Huila). *Revista DYNA*. Vol 85 (207). 107-112p.
- Pájaro-Escobar, H., Benedetti, J., García-Zapateiro, J. (2018). Caracterización Físicoquímica y Microbiológica de un Vino de Frutas a base de Tamarindo (*Tamarindus indica* L.) y Carambola (*Averrhoa carambola* L.) *Información Tecnológica*. Vol. 29 (5): 123-130p.
- Pastrana, Y., Durango, A., de Paula, C., Acevedo, D. (2015). Caracterización Físicoquímica, Bromatológica y Microbiológica de Bebidas Autóctonas de Córdoba. *Revista Tecnológica*. Vol 26 (4): 53-62p.
- Pereira, F. A. L., Feitosa, C. W. S., Abreu, G. V. K., Lemos, T. de O., Gomes, F. W., Narain, N., Rodrigues, S. (2017). *Food Research International*. DOI: 10.1016/j.foodres.2017.07.055
- Petruzzelli, A., Osimani, A., Tavoletti, S., Clementi, F., Vetrano, V., Di Lullo, S., & Tonucci, F. (2018). Microbiological quality assessment of meals and work surfaces in a school-deferred catering system. *International Journal of Hospitality Management*, 68, 105-114. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijhm.2017.10.003>

- Pimentel, R.M., Aparecida, E., Marques, L., Ribeiro, F., Fernandes de Carvalho, A., Stringheta, P. (2017). Physicochemical and microbiological characterization and antioxidant capacity of açaí pulps marketed in the states of Minas Gerais and Pará, Brazil. *Revista Ciência Rural*, Santa Maria. Food technology. Vol 47 (1): 1- 6p.
- Pimentel, R.M., Aparecida, E., Marques, L., Ribeiro, F., Fernandes de Carvalho, A., Stringheta, P. (2017). Physicochemical and microbiological characterization and antioxidant capacity of açaí pulps marketed in the states of Minas Gerais and Pará, Brazil. *Revista Ciência Rural*, Santa Maria. Food technology. Vol 47 (1): 1- 6p.
- Quintero, V., Giraldo, G., Vasco, J. Caracterización fisicoquímica del mango común (*Mangifera indica* L.) durante su proceso de maduración. (2013). *Biología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial* Vol 11 (1): 10 – 18p.
- Rodrigues, R., Guerra, G., Soares, J., Santos, K., Rolime, R., Assisa, P., Araújo, D. *Lactobacillus rhamnosus* EM1107 in goat milk matrix modulates intestinal inflammation involving NF- $\kappa$ B p65 and SOCs-1 in an acid-induced colitis model. 2018. *Journal of Functional Foods*. Vol 50: 78–92. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.09.013>
- Roobab, U., Aadil, R. M., Madni, G. M., & Bekhit, A. E. D. (2018). The impact of nonthermal technologies on the microbiological quality of juices: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(2), 437-457. Doi: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12336>
- Saavedra, G., Rodríguez, I., Torres, P. (2014). Potencial industrial de la pulpa de *Pouteria sapota* para la preparación de nectar de calidad Industrial potential of *Pouteria sapota* pulp for preparing quality nectar. En: REBIOL. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Biológicas*. Julio - Diciembre. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú. 34 (2): 5-12p.
- Seow, J., Ágoston, R., Phua, L., & Yuk, H. G. (2012). Microbiological quality of fresh vegetables and fruits sold in Singapore. *Food Control*, 25(1), 39-44. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.10.017>
- Schmidt, S. J., Lee, W. J. (2012). Comparison between water vapor sorption isotherms obtained using the new dynamic dewpoint isotherm method and those obtained using the standard saturated salt slurry method, *International Journal of Food Properties* 15, 236-248p. DOI: 10.1080/10942911003778014
- Sultana, F., Marzan, L. W., & Mina, S. A. (2019). Microbiological quality assessment of locally vended and commercially packed fruit juices in Chittagong city of Bangladesh. *Journal of Bio-Science*, 27, 43-58. Doi: <https://doi.org/10.3329/jbs.v27i0.44670>
- Van Luong, T. S., Moir, C., Bowman, J. P., & Chandry, P. S. (2021). Heat resistance and genomics of spoilage *Alicyclobacillus* spp. Isolated from fruit juice and fruit-based beverages. *Food Microbiology*, 94, 103662. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103662>
- Vriesmann, L. C. Silveira, J. L. M., Petkowicz, C. L. de O. (2009). Chemical and rheological properties of a starch-rich fraction from the pulp of the fruit cupuassu (*Theobroma grandiflorum*). *Materials Science and Engineering C*. doi:10.1016/j.msec.2008.12.011
- Vriesmann, L.; Silveira, J.; De O. Petkowicz, C. (2010). Rheological behavior of a pectic fraction from the pulp of cupuassu (*Theobroma grandiflorum*). En: *Carbohydrate Polymers* 79: 312–317p.
- Wang, S., Ruan, C., Yi, L., Deng, L., Yao, S., & Zeng, K. (2020). Biocontrol ability and action mechanism of *Metschnikowia citriensis* against *Geotrichum citri-aurantii*

causing sour rot of postharvest citrus fruit. *Food microbiology*, 87, 103375. Doi : <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103375>

- Wu, G. (2016). Dietary protein intake and human health. *Revista Food & Function*. Vol 7. 1251-1265p. DOI: 10.1039/c5fo01530h
- Yeow, Y. L., Perona, P., & Leong, Y. K. (2002). A reliable method of extracting the rheological properties of fruit purees from flow loop data. *Journal of food science*, 67(4), 1407-1411.

## CAPITULO III

### OPTIMIZACIÓN EXPERIMENTAL DE LA FORMULACIÓN Y EL PROCESO DE OBTENCIÓN DE UN CREMOGENADO DE COPOAZÚ ADICIONADO CON PROBIÓTICO Y PREBIÓTICO

#### INTRODUCCIÓN

Los alimentos funcionales son una propuesta en la historia que inicia con la búsqueda de la longevidad y el buen vivir (Boggia, 2020; Butnariu, 2019), la industria que se enfoca en el desarrollo de productos a base de frutas y hortalizas ha aumentado en los últimos años, por mantener lo natural y disminuir los conservantes en la ingesta, además de la importancia de elegir alimentos saludables que reduzcan el riesgo de generar enfermedades (Márquez & Márquez, 2019; Cure *et al.*, 2017) y siendo que la cultura latina es basada en jugos y néctares es necesario buscar otras alternativas diferentes para aumentar el consumo de frutas de habitante por año.

Como alternativa de desarrollo tecnológico se encuentran los cremogenados de fruta, que se obtienen por mezclas o pulpas puras, por medio de molturación, tamizado o ultrahomogenización, utilizando la fracción acuosa propia de la materia prima y manteniendo las propiedades químicas de ella (Salamanca, 2011). Una opción diferente para el consumidor o poblaciones específicas de consumidores, el uso de este producto evidencia ventajas frente al método tradicional de utilizar la fruta como materia (Aguilar, 2014). Sin embargo, el mercado mundial tiene la mirada hacia salud y con ello los alimentos funcionales, que aportan nutrientes pertenecientes de la matriz y contienen componentes con actividad fisiológica que contribuyan a la prevención o terapia de algunas enfermedades y más aún de aquellos productos que de forma natural se conserven durante el tiempo.

La Amazonia ofrece diferentes frutos para ser utilizados en tecnología como la mencionada, *Theobroma* es un importante género en la Amazonia Colombiana, del cual hace parte el Copoazú (*Theobroma grandiflorum*), fruto nativo de la Amazonia Brasileira, y distribuido en la Amazonia Colombiana, su potencial económico es basado en sabor y en ingredientes de importancia (Costa, 2015; Cardona, 2013), es un fruto que aporta a la industria alimentaria moderna, como respuesta a cambios para agradar al consumidor. El copoazú es una fuente de fibra dietaria (fibra soluble), su composición química reporta almidón y polisacáridos de pectina y diferentes componentes de actividad fisiológica propicio para elaboración de producto con finalidad de beneficio al consumidor (Barros *et al.*, 2016; Batista, 2016).

Dentro de los alimentos funcionales se encuentra los probióticos; el uso de probióticos y prebióticos en matrices vegetales es una alternativa que aportan al

producto beneficios saludables para diferentes situaciones, este tipo de productos propenden a la prevención de diarreas, aporte a enfermedades como colon irritable, y modulación de la microbiota intestinal con el fortalecimiento de sistema inmunológico (Oliveira, 2016; Santos *et al.*, 2019); esto depende de la concentración y el tipo de cepa (Yang, 2018). Los probióticos son microorganismos vivos que en cantidades tales tienen beneficios como las anteriormente mencionadas, *Lactobacillus casei* es microaerófilo, de ecología microbiana de frutas, verduras, leche, mucosa intestinal y vaginales, reporta algunos beneficios específicos, disminuye el colesterol, reduce el riesgo de osteoporosis, aporta a la homeostasis de la microbiota intestinal. Dentro de los prebióticos más estudiados se encuentra la inulina, con ventajas tecnológicas y nutricionales, que de manera individual o en conjunción con los microorganismos tiene beneficios ante enfermedades gastrointestinales.

Para que un alimento contenga un probiótico debe acotar la normatividad exigida, entre los parámetros se encuentra la cantidad de microorganismos para ser considerado alimento funcional, como es el caso del presente estudio, el cual debe contener un mínimo de  $1 \times 10^6$  UFC / g o mL hasta el final de su vida útil (Resolución 333/2011; Liao, 2017). Las cepas de *Lactobacillus casei* y *L. plantarum* son microorganismos auxótrofos, hacen parte de la microbiota de la leche, carne, vegetales, frutas, vinos, mucosas intestinales y vaginales, es resistente a jugos gástricos, regula la biota intestinal, disminuye porcentaje alto de lípidos en sangre, ayuda a la digestión debido a los ácidos que produce y regula el sistema inmunológico.

Para generar un producto de cremogenado se requiere de algunos procesos de modelación. Los procesos de optimización experimental, representan una herramienta efectiva para el mejoramiento de la calidad de los productos, contribuyendo en la diversificación de productos en la cadena alimentaria, permitiendo que se vuelvan promisorios de exportación (Cortés *et al.*, 2015); igualmente es la mejor opción que favorece las ganancias o exista mayor producción según el objetivo principal planteado (García, 2019). En el diseño de productos y procesos agroalimentarios, es frecuente acudir a las herramientas estadísticas de diseño robusto y experimental para la valoración y optimización de mezclas de varios componentes o ingredientes (Kumar, *et al.*, 2010). Esta tarea corresponde, fundamentalmente, a los departamentos de Investigación y Desarrollo (I+D), donde se toman decisiones de carácter interdisciplinar, ajustadas a las políticas de las compañías procesadoras y generadoras de nuevos productos. Para la elaboración de jugos, néctares, conservas, compotas, mermeladas, cremogenados o yogures, se requiere una mezcla óptima de ingredientes que permitan generar las mejores características organolépticas, físicas, reológicas o químicas, aún más económica, cuando alguno de los ingredientes es muy costoso (Branco y Gaspáreto, 2003).

La optimización, también denominada programación matemática, sirve para encontrar la respuesta que proporciona el mejor resultado, logra mayores ganancias, mayor producción o la obtención del menor costo, desperdicio o malestar (García, 2019), una de las técnicas de optimización más usada es la metodología de superficie de respuesta (MSR) (Makebe *et al.*, 2017). En el desarrollo de productos en la industria alimentaria se hace uso de herramientas de optimización en diferentes enfoques, como características nutricionales, sensoriales, bajas calorías o en los ingredientes para encontrar la combinación de factores más favorables (Schiassi, 2020; Curi *et al.*, 2017)

El objetivo de esta investigación fue optimizar experimentalmente la formulación y el proceso de obtención de un cremogenado a base de Copoazú adicionado con probiótico y prebiótico.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio de estudio. El desarrollo de esta investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Control de Calidad, Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín y entre los Laboratorios de Análisis de Alimentos de la Universidad Surcolombiana (Neiva- Huila) y el Laboratorio de Biotecnología y Control de Calidad de Alimentos. Universidad de la Amazonia.

2.1 Materiales. Se utilizaron frutos frescos de Copoazú (*Theobroma grandiflorum* L.) en estado de madurez fisiológica #2 (pedúnculo con desprendimiento natural (Hernández y Barrera, 2009), frutos colectados del Centro de investigaciones Macagual- Cesar Augusto Estrada ubicado a 250 m.s.n.m, localizado a 22 km al Sur de Florencia, cultivo denominado como zona dos, latitud 1° 29' 55.3" N, longitud 75° 39' 45.7" W, Florencia – Caquetá (García,2012). Por otro lado se utilizó como agente prebiótico S20 inulina (Cosucra, Groupe Warcoinnng SA-Brasil), y endulzante stevia (Taeq® Colombia).

2.1.1 Cultivo Láctico. Se utilizó un cultivo probiótico comercial liofilizado, correspondiente a la cepa pura *Lactobacillus casei* ATCC 393. La preparación del inóculo se realizó mediante suspensión en caldo MRS (Man Rogosa Sugar-Conda -España), fue centrifugado a 4000 rpm por 10 minutos a 25°C en tubos falcon de 50 mL, la recuperación de la biomasa se realizó en cabina de flujo laminar, mediante uso de balanza analítica.

### 2.2 Elaboración y formulación del cremogenado

#### 2.2.1 Higiene y manipulación de la pulpa

Los frutos de copoazú fueron lavados y desinfectados con una solución de hipoclorito de sodio a 50ppm, posteriormente se realizó despulpado mecánico en

despulpadora de acero inoxidable 300 Kg/hora ref 01200515, (tamices n. 2, marca JARINOX).

Para el procesamiento en la obtención de la pulpa, se realizó en la planta piloto de frutas y hortalizas de la Universidad de la Amazonia, teniendo en cuenta tres fases de operación: Fase de adecuación (higiene en la planta, recepción, selección, pesado, clasificación, limpieza, lavado, desinfección, enjuague). Fase de separación (pelado, cortado, extracción, despulpado, pesado) y fase de conservación (empacado – congelado), teniendo en cuentas las normas de bioseguridad, el uso adecuado de indumentaria. La calidad microbiológica y fisicoquímica de la pulpa fue descrita en el capítulo II.

### **2.2.2 Preparación del cremogenado**

La pulpa se homogenizó en Ultraturrax T 18 marca IKA 115V (China), durante 2 minutos (posición 4) (15600-15500rpm), se adicionó el endulzante en 3 %, posteriormente se incorporó el prebiótico según el diseño experimental y se homogeniza según tiempo de diseño experimental, por último con el objetivo de evitar el daño mecánico a las células vivas del microorganismo se incluyó el inóculo de probiótico (Biomasa g); y se realizó una homogenización primero manual de la mezcla con un instrumento estéril, posteriormente mecánica (posición 1) (3500-3600rpm), durante 1 minuto; el cremogenado fue llevado a almacenamiento a 4°C.

2.3. Diseño experimental del Cremogenado. Para el diseño experimental de los cremogenados se usó la metodología de superficie de respuesta con un diseño central compuesto, de cara centrada  $\alpha=1$ , con 20 experimentos mediante Design – Expert 11, donde se evaluaron las variables independientes, inulina (2 - 4%), biomasa (2 - 2.5%), tiempo de homogenización (5 - 10minutos), y las variables dependientes, actividad de agua ( $a_w$ ), humedad ( $X_w$ ), pH, sólidos solubles, potencial Z (ZP), tamaño de partícula ( $D_{10}$ ,  $D_{50}$ ,  $D_{90}$ ), viscosidad ( $\mu$ ) y Log UFC/g.

2.4 Caracterización del cremogenado. Humedad (AOAC 930.15/1990), pH (AOAC 942.15/970.21),  $A_w$  (AOAC 978.18), acidez titulación (AOAC 942.15) se expresó como porcentaje de ácido cítrico, sólidos solubles (AOAC 932.12) Refractómetro MA884 Milwaukee, viscosity ( $\mu$ ) Reómetro Brodfield, husillo RV4, velocidad de 0-100 rpm, (20 mediciones cada 10 segundos), potencial zeta ( $\zeta$ ) zetasizer (nano ZS90), Malvern Instruments Ltda, UK) usando una celda de electroforesis capilar con una dilución de la muestra en agua destilada de 1/50, tamaño de partícula, Mastersizer 3000 (Malvern Instruments Ltda, Worcestershire, UK), ( $D_{10}$ ,  $D_{50}$ ,  $D_{90}$ ) y viabilidad del probiótico UFC/g mediante diluciones seriadas, en siembra en profundidad con agar MRS en condiciones de microaerofilia. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

2.5 Análisis estadístico. La optimización se obtuvo por el análisis por software Statgraphics Centurion XVI®, mediante análisis de múltiples respuestas y el análisis de varianza (ANOVA) a un nivel de confianza del 95%  $\alpha=0.05$ .

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Diseño de formulaciones del cremogenado.

El diseño estadístico experimental de elaboración del cremogenado a base de Copoazú con adición de probiótico se presenta en la Tabla 1, con las variables independientes (%Biomasa, %prebiótico, tiempo de homogenización), y en la Tabla 2, se muestra las variables dependientes, viscosidad, sólidos solubles, pH, aw, humedad, potencial Z, tamaño de partícula, viabilidad de probiótico UFC/g, y valores medios con la desviación estándar; la Tabla 3 presenta ANOVA, con el efecto estadístico de las variables dependientes en función con las independientes y de las interacciones lineales y cuadráticas y en la Figura 1, se presentan los gráficos de volúmenes de respuesta de las variables dependientes.

En el análisis del desarrollo de este producto, al adicionarle los demás componentes además de la pulpa se buscó que los sólidos solubles se encontraran entre  $13 \pm 0.5$  -  $15 \pm 0.2$ .

**Tabla 1. Diseño de elaboración del cremogenado a base de Copoazú con adición de probiótico.**

Experimento	Biomasa (%)	Inulina (%)	Tiempo (minutos)
1	2,0	4,0	10,0
2	2,0	3,0	7,5
3	2,25	3,0	10,0
4	2,0	2,0	10,0
5	2,25	3,0	7,5
6	2,25	3,0	7,5
7	2,25	3,0	5,0
8	2,25	3,0	7,5
9	2,5	3,0	7,5
10	2,0	4,0	5,0
11	2,25	2,0	7,5
12	2,0	2,0	5,0
13	2,5	4,0	10,0
14	2,25	3,0	7,5
15	2,25	3,0	7,5

16	2,25	4,0	7,5
17	2,25	3,0	7,5
18	2,5	2,0	5,0
19	2,5	4,0	5,0
20	2,5	2,0	10,0

El copoazú ha sido utilizado para elaboración de jugos y néctares, cada diseño tiene su función y su propósito, en el caso de los resultados del diseño del cremogenado del presente estudio son muy similares a lo reportado para néctares y jugos (Curi *et al.*, 2017) difiere con reportes de pures a base de copoazú en otros países con valores altos de 60+/-1 % de sólidos solubles, esto debido a que utilizan conservantes y azúcares (Freire *et al.*, 2016). En el comportamiento de los sólidos solubles en función de las variables independientes consideradas se evidenció que este parámetro durante el diseño mostro afectación por la inulina; a mayor inulina aumentó este parámetro, esto a causa de los sólidos solubles presentes en el prebiótico y así mismo obtuvo una interacción negativa con los microorganismos, entre mayor biomasa menos sólidos solubles Tabla 2, esto por el aporte de nutrientes de azúcares que el microorganismo tiene la capacidad de fermentar, metabolismo acorde a las bacterias ácido lácticas.

Se presenta las evaluaciones de las variables dependientes en la Tabla 2, algunos parámetros con pocos cambios, como el rango para  $a_w$  (0.983-0.99), lo cual es acorde a la naturaleza del producto, o a la matriz alimentaria, pulpa de copoazú; presentó influencia principalmente por la inulina y por la biomasa, de manera positiva por la inulina con un valor  $p=0.0005$ , y de manera negativa por la biomasa  $p=0.0368$ , coherente por la cantidad de solutos que aporta la biomasa a la mezcla; igualmente la humedad fue uno de los parámetros de poca variabilidad, con un rango bajo de  $X_w$  (84.4% - 87.87%), característico de matrices con mayor riesgo de contaminación, lo que pueda estar medianamente controlada por valores bajos de pH; esta variable no se vió influenciado por los factores (Tabla 3), lo que indica que es independiente de estos, en general todos los valores presentados se encontraron dentro de los esperados para cremogenados (Fuquene *et al.*, 2018).

Los atributos de alta calidad microbiológica de un producto son requeridos con durabilidad, y las propiedad inherentes de la matriz alimentaria aportan condiciones favorables o desfavorables de estabilidad en los alimentos; en el caso de estudio del cremogenados el rango de pH detectado fue 3.37-3.53, valores relativamente estables lo cual permite un microambiente adecuado para el probiótico, y adverso para flora acompañante o contaminante; estos datos son coherente con lo reportado para otros productos con copoazú (Nunes, 2019; Duarte, 2010). El pH se vió afectado por la biomasa, por la interacción de la biomasa de manera positiva, es decir estos aumentan y la inulina de manera negativa, mediante aumenta la biomasa la inulina disminuye aunque estas

reacciones ocurren, con bajas fluctuaciones, tanto que cuando se analiza la gráfica los valores de pH mantiene constantes.

**Tabla 2. Resultados del diseño experimental con las variables dependientes.**

<u>Ttos</u>	<u>Xw</u>	<u>aw</u>	<u>viscosidad cP</u>	<u>pH</u>	<u>°Brix</u>	<u>D10 (µm)</u>	<u>D50 (µm)</u>	<u>D90 (µm)</u>	<u>Potencial Z</u>	<u>conteo de colonias (Log UFC/g)</u>
1	87,88± 0,499	0,984± 0	1400,6± 9,8	3,49± 0,052	15,3± 0,1	25,3± 0	130± 0	563± 0	15,3± 1,7	8,6± 0,57
2	85,237± 0,065	0,984± 0,001	1358± 8,7	3,53± 0,030	14,3± 0,2	19,5± 0	115± 0	502± 0	15,7± 2,3	7,6± 0,5
3	86,336± 0,106	0,985± 0,005	948± 10,5	3,43± 0,011	12,3± 0,3	8,57± 0	86,6± 0	326± 0	16,8± 0,6	7,6± 0,57
4	85,726± 0,093	0,983± 0,001	846,6± 0,8	3,40± 0,020	14,07± 0,1	7,74± 0	89,4± 0	338± 0	14,9± 1,4	9±
5	86,799± 0,179	0,986± 0,001	669,3± 0,0	3,483± 0,092	13,3± 0,0	11,1± 0	81,6± 0	351± 0	15,0± 0,4	9,3± 0,57
6	85,381± 0,093	0,983± 0,001	1027,3± 1,1	3,49± 0,01	14,5± 0,3	36± 0	327± 0	1140± 0	17,2± 0,5	7,6± 0,57
7	85,719± 0,010	0,985± 0,000	1017,3± 15,1	3,47± 0,005	14,1± 0,1	35,9± 0	226± 0	849± 0	16,1± 1,1	8± 0
8	85,636± 0,036	0,985± 0,001	962± 4	3,47± 0,011	14,7± 0,3	34,2± 0	203± 0	830± 0	16,2± 2,0	8,6± 0,57
9	85,642± 0,042	0,984± 0,003	953,3± 8,0	3,48± 0,011	14,5± 0,1	32,2± 0	194± 0	811± 0	14,5± 0,0	8± 0
10	84,643± 0,089	0,985± 0,001	1012± 5,2	3,50± 0,040	15,3± 0,1	36,6± 0	220± 0	921± 0	15,6± 1,0	12± 1
11	86,127± 0,043	0,995± 0,009	1038,6± 5,3	3,48± 0,055	14,5± 0,0	28,4± 0	158± 0	608± 0	13,6± 0,8	8± 0
12	86,600± 0,637	0,990± 0,002	1088,6± 13,5	3,393± 0,005	13,9± 0,98	34,2± 0	196± 0	715± 0	14,4± 1,3	9± 1
13	84,285± 0,104	0,985± 0,007	1228± 6,91	3,39± 0	15,4± 0,1	24,5± 0	144± 0	597± 0	13,01± 0,7	7± 1
14	84,882± 0,041	0,990± 0,005	1326± 9,2	3,40± 0,005	15,3± 0,1	26,2± 0	144± 0	568± 0	13,1± 0,3	7,3± 0,57
15	84,436± 0,949	0,987± 0,003	1236± 5,2	3,34± 0,028	15± 0,3	26,9± 0	142± 0	557± 0	16,1± 2,3	7,3± 0,57
16	84,419± 0,065	0,989± 0,001	1012± 8,3	3,37± 0,01	15,3± 0	25,1± 0	137± 0	548± 0	17,9± 2,9	8± 0
17	85,269± 0,062	0,986± 0,005	1154± 6,3	3,37± 0	14,9± 0,4	26,4± 0	139± 0	555± 0	15,9± 2,1	13,3± 0,57
18	86,762± 0,088	0,986± 0	966± 14	3,37± 0,0115	13,1± 0,2	27,5± 0	145± 0	549± 0	17,0± 0,5	8,6± 0,57
19	85,982± 1,634	0,989± 0	942± 11,1	3,37± 0,0230	14,9± 0,4	26,6± 0	142± 0	565± 0	18,2± 1,8	7,3± 0,57
20	86,850± 0,151	0,988± 0,000	933,3± 7,0	3,39± 0,01	13,1± 0,1	23,7± 0	133± 0	517± 0	16,5± 0,3	8,3± 0,57

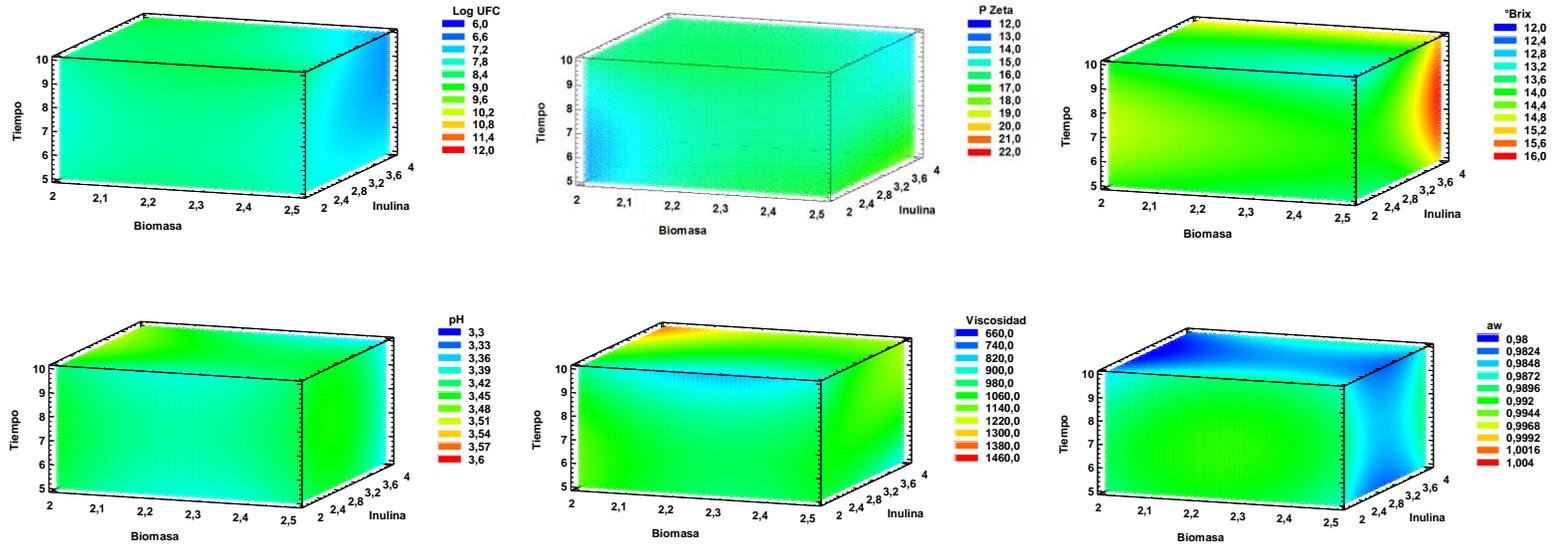
**Tabla 3.** Efecto estadístico de las variables dependientes en función con los factores.

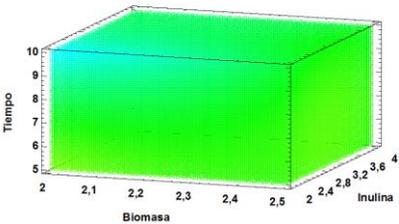
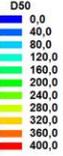
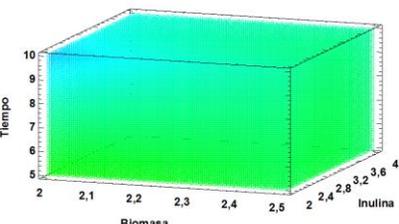
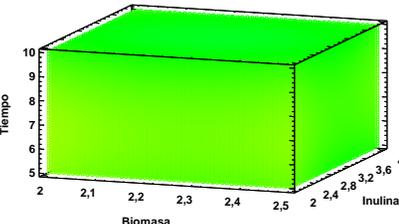
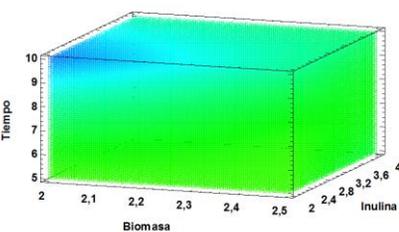
Variable	Efectos principales			Efectos cuadráticos			Efectos de interacción		
	A	B	C	AA	BB	CC	AB	AC	BC
Xw	0,6201	0,2145	0,1679	0,3502	0,1013	0,0618	0,9787	0,6521	0,4434
AW	0,4099	0,0892	0,1482	0,0322*	0,0004*	0,0792	0,5592	0,2336	0,9566
viscosidad	0,0108*	0,0066*	0,2105	0,0935	0,5139	0,1333	0,3022	0,7318	0,0002*
pH	0,0006*	0,2717	0,8024	0,0638	0,0088*	0,3263	0,0043*	0,7078	0,7604
Brix	0,4071	0*	0,7228	0,7827	0,0196*	0,0022*	0,0629	0,6448	0,3544
D10	0,4327	0,2182	0*	0,9431	0,7474	0,182	0,0981	0,0256*	0,1879
D50	0,9326	0,5438	0,0003*	0,7894	0,4938	0,8631	0,4375	0,0369*	0,7036
D90	1	0,1043	0,0001*	0,6114	0,3763	0,4733	0,1705	0,0128*	0,7524
Pzeta	0,2602	0,1986	0,1171	0,2809	0,9425	0,2216	0,2386	0,0406*	0,0443*
Log UFC/g	0,0129*	0,5341	0,478	0,3597	0,806	0,4876	0,0184*	0,572	0,1832

A: Biomasa B: Prebiótico C: Tiempo de homogenización.



Figura 1. Volúmenes de respuesta de las variables dependientes en función de las independientes para la optimización de cremogenado a base de copozú con adición de probiótico.







El producto aquí formulado es considerado cremogenado según la normatividad (BOE – A-1983-9198), elaborado con frutas, sanas y en una mezcla, el cual no debe contener semillas, ni piel, albedo o corteza, con características sensoriales similares a la de la matriz de base. Las propiedades anteriormente nombradas son características de un cremogenado, y aportan a la evaluación de la estabilidad del mismo; igualmente los parámetros como el potencial Z, para este producto osciló entre (-15.03, -17.93mV), valores relativamente bajos en comparación con reportes como Schramm (2005); sin embargo, para productos relacionados con frutas como jugos, néctares, o bebidas a base de puré oscilan entre -14mV a -18mV (De los Rios, 2019).

Los tamaños de partícula oscilaron entre  $D_{10}$ : (7.74 -36.6  $\mu\text{m}$ ),  $D_{50}$  (81.6-327  $\mu\text{m}$ ),  $D_{90}$  (517-1140  $\mu\text{m}$ ). Para tamaños de partícula pequeños, los movimientos brownianos son mayormente estables, en cuanto a valores intermedios el comportamiento se refiere a las combinaciones de las tres fuerzas, (brownianas, hidrodinámicas, y coloidales), cuando las partículas son consideradas de gran tamaño se rige por medio de fuerzas hidrodinámicas. En todos los casos los rangos son amplios, muy representativo de matrices alimentarias, es decir que para el cremogenado el tipo de partícula en su gran mayoría es macroscópica similar a lo realizado con mezclas de frutales (De los Ríos, 2019), lo que es una propiedad de alimentos con mayores densidades por lo que hace muy propicio la homogenización mecánica para un mejoramiento de la mezcla y teniendo en cuenta que los polisacáridos funcionan como agentes de suspensión para sistemas coloidales a base de pulpas de frutas lo que podría favorecer o atribuir a la inhibición de separación o sedimentación de solutos. Para  $D_{10}$ ,  $D_{50}$ ,  $D_{90}$ , se evidenció la acción del tiempo de homogenización en el tamaño, a mayor tiempo menor tamaño, como se espera de un proceso mecánico que existe una reducción del tamaño de partícula (Tabla 3).

La viscosidad se encontró entre (662- 1400cP), se vio afectada por la interacción entre inulina – tiempo, de manera positiva es decir a mayor inulina y mayor tiempo aumentó la viscosidad, acorde con lo publicado por Passephol (2008) y Sadat (2012), la inulina puede afectar la estructura y la textura del producto, afectando propiedades reológicas; diferente sucedió con la biomasa, entre mayor es la biomasa menor la viscosidad, evidencia que el punto mayor de viscosidad, es el más alto para la inulina y más bajo de biomasa, esta disminución de la viscosidad en aumento de la biomasa es debido a la fermentación de azúcares y producción de ácidos orgánicos. Finalmente, los valores Log UFC/g estuvieron entre 7.3-13.3, para los microorganismos de estudio los cuales cumplen los parámetros de la normatividad donde menciona el valor mínimos de  $10^6$  UFC/g correspondiente a log UFC/g 6; esta variable se afectó de manera negativa cuando mayor fue la inulina (Ministerio de Protección Social, 2011).

### Optimización del cremogenado de copoazú con adición de probiótico y prebiótico

Según el análisis de las formulaciones obtenidos mediante el diseño, la determinación del modelo más apropiado se obtuvo mediante la optimización de múltiples respuestas, en primer lugar, para la variable dependiente considerada de mayor importancia conteo de colonias Log UFC/g de microorganismos probióticos entre los factores, los valores obtenidos fueron Biomasa de 2%, Inulina 4%, y tiempo de homogenización 5 minutos, al cual denominamos Optimización A (TA), con una deseabilidad de 0.884384, y un impacto de 5 (Cortes *et al.*, 2019).

Mediante el análisis de las formulaciones y el ANOVA, y en iguales condiciones utilizando impactos entre 3 - 5 y peso de 1 - 3, por optimización de múltiple respuesta, para las diez variables dependientes con una deseabilidad de 0.645776; los valores hallados optimizados bajo las anteriores indicaciones fueron Biomasa 2%, Inulina 4% y tiempo de homogenización 10 minutos, denominado Optimización B (TB), estos serían los mejores atributos de calidad del cremogenado, los cuales se acercaron a valores experimentales, ensayos realizados por triplicado, ver Tabla 4, donde en la mayoría tiene diferencias bajas, lo cual hace predecible un modelo más confiable y se encuentran dentro de los parámetros permitidos por la normatividad.

**Tabla 4.** Resultados de optimización y experimentales del cremogenado a base de copoazú con adición de probiótico.

#### Optimización A

Variable dependiente	Valor experimental	Valor teórico	Diferencia	EMR
Log UFC/g	10.1±1.732	10.02	0.08	0.798

#### Optimización B

Variable dependiente	Valor experimental	Valor teórico	Diferencia	EMR
aw	0.98 ± 0.00	0.98	0	0
μ (cP)	1194 ± 3.46	1364.44	170.44	12,49157163
pH	3.37 ± 0.00	3.48	0.11	3,16091954
°Brix	14.9 ± 0.43	14.97	0.07	0,46760187
D10 (μm)	24.5 ± 0	19.7653	-4.73	2,393082827
D50 (μm)	133 ± 0	107.376	-25.624	23,86380569
D90 (μm)	444 ± 7.8	480.418	36.418	7580,481997
/PZ/	15.467 ± 1.24	15.6654	0.1984	0,126648538
Log UFC/g	9.667 ± 2.081	8.69761	-0.969	0,111409916

EMR: Error medio relativo.

En otros productos desarrollados a base de copoazú se ha encontrado diferencias entre los sólidos solubles, y esto debe sugerirse a la zona de recolección de la pulpa, y la formulación del producto como lo menciona Freire (2016), con sólidos

solubles que oscilan entre 8-8.5 aproximadamente; los valores aquí presentados para nuestro producto denotan un buen control para el desarrollo del mismo, además que es beneficioso para el microorganismo insertado. En el caso del pH, y la actividad de agua, fueron muy similares para ambos casos.

La optimización fue realizada de acuerdo a diferentes autores utilizando diseño del modelo basados en tres variables independientes por medio del software Design Expert, donde se diseñaron 20 corridas y posteriormente su evaluación mediante análisis de superficie de respuesta, con la tabla ANOVA se demostró las variables significativas para la optimización del modelo (Mendonçaa, 2019; Hernández, 2018); sin embargo, este tipo de diseño también se pueden establecer estadísticamente mediante diseño experimental de mezclas (Salamanca, 2015); así mismo se presenta relación con numerosas variables dependientes como también la de mayor importancia (Jeirani, 2012; Plata, 2012).

La metodología de superficie de respuesta (MSR) direcciona a la optimización de un proceso, señala la región con rendimiento más óptimo; fue profundizada por parte de George Box y Wilson, después de la aplicación del diseño en ambientes industriales, químicas y de proceso en el año de 1930, regularmente representada por una gráfica tridimensional, es un plano que tiene líneas rectas paralelas; permite la relación o la predicción de la variable respuesta con el factor.

#### 4. CONCLUSIONES

El cremogenado es una opción de producto agroindustrial, mediante el estudio de las variables que lo afectan en su almacenamiento, y es una gran oportunidad para iniciar el desarrollo de otros productos mediante el uso de frutos Amazónico, utilizando tecnologías alimentarias, y basados en los alimentos funcionales, es así como se demuestra en este estudio que es una excelente matriz alimentaria para la sobrevivencia de microorganismos probióticos.

En la optimización estadística, las mejores opciones encontradas para el desarrollo de producto de cremogenado a base de copoazú con adición de probiótico fueron dos formulaciones, la primera denominada optimización A, Biomasa de 2%, Inulina 4%, y tiempo de homogenización 5 minutos, la cual se halló entre la mayor interacción entre los factores y la variable de mayor importancia, la variable dependiente viabilidad del probiótico; la segunda denominado optimización B, Biomasa 2%, Inulina 4% y tiempo de homogenización 10 minutos, la cual se halló mediante la interacción de los factores con diez variables respuestas.

Los valores del diseño fueron muy cercanos con los valores experimentales. Sin embargo los microorganismos como seres vivos son predecibles hasta el 60% por lo cual se realizó una optimización con solo la variable de mayor importancia.

Los resultados de este estudio apoyan el fortalecimiento de cadenas productivas regionales especialmente la cadena cacaotera a la que pertenece el copoazú, así como también aporta a la implementación de desarrollo mediante análisis estadístico para la creación tecnológica sostenible de productos agroindustriales, abre paso al uso de alternativas de conservantes que se consideren dentro de los alimentos funcionales sin dañar o desmejorar las características nutricionales y organolépticas de matriz alimentaria aquí presentada.

## BIBLIOGRAFIA

### CAPITULO III

- Aguilar, J., Espinoza, M., Cabanillas, J., Gómez, E., Valverde, L., Benavides, D. (2014). Efecto de la concentración de albedo y sacarosa sobre las características fisicoquímicas, reológicas y aceptabilidad general en cremogenado de granadilla (*Passiflora ligularis*). Escuela de Ingeniería Agroindustrial. Universidad Nacional de Trujillo. Agroind Sci 4.
- AOAC official method 942.15 Acidity (valuable) of fruit products. 1965. Official Methods of Analysis of AOAC International.
- AOAC official method, 981.12. Acidified food. 1981. Official Methods of Analysis of AOAC International.
- AOAC official method 932.12 Soluble solids in fruits and fruit products. 1980. Official Methods of Analysis of AOAC International.
- Boggia, R., Zunin, P., & Turrini, F. (2020). Functional Foods and Food Supplements. *Applied Sciences*, 10(23), 8538. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/app10238538>
- Barros, M., García-Villalba, R., Tomás-Barberán F. A., Genovese, M. I. (2016). Evaluation of the distribution and metabolism of polyphenols derived from cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) in mice gastrointestinal tract by UPLC-ESI-QTOF. *Journal of Functional Foods* 22: 477–489. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2016.02.009>
- Batista, N.; Andrade, D.; Ramos, C.; Dias, D.; Schwan, R. Antioxidant capacity of cocoa beans and chocolate assessed by FTIR. *Food Research International*. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.10.028>
- Branco, I. G., & Gasparetto, C. A. (2003). Aplicação da metodologia de superfície de resposta para o estudo do efeito da temperatura sobre o comportamento reológico de misturas ternárias de polpa de manga e sucos de laranja e cenoura. *Food Science and Technology*, 23, 166-171
- BOE-A-1983-9198 Real Decreto 667/1983, de 2 de marzo, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-sanitaria para la elaboración y venta de zumos de frutas y de otros vegetales y de sus derivados. Presidencia del Gobierno «BOE» núm. 77, de 31 de marzo de 1983 Referencia: BOE-A-1983-919

- Butnariu, M., & Sarac, I. (2019). Functional food. *International Journal of Nutrition*, 3(3), 7. Retrieved from <https://doi.org/10.14302/issn.2379-7835.ijn-19-2615>
- Cardona, J., Díaz, R., Gutiérrez, R., Hernández, M.S., Fernández, J.P. (2013). Clarification effects in a functional copoazú (*Theobroma grandiflorum*) beverage. *Foods*. Doi: 1, 1-x manuscripts; doi: 10.3390/foods10x000x. 1-7p.
- Costa, M; Frasao, B; Silva, A; Freitas, M; Franco, M; Conte-Junior, C. (2015). Cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) pulp, probiotic, and prebiotic: Influence on color, apparent viscosity, and texture of goat milk yogurts. *J. Dairy Sci.* 98 :5995–6003. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-9738>
- Cortés, M., Herrera, E., & Rodríguez, E. (2015). Optimización experimental del proceso de liofilización de uchuva adicionada con componentes activos por impregnación al vacío. *Vitae*, 22 (1): 47-56
- Cortés-Rodríguez, M., Macías, R.A., Cardona-Velásquez, L., Arango-Tobón, J.C. (2019). Recubrimientos en mora Influencia de un recubrimiento comestible adicionado con calcio sobre la calidad de la mora de Castilla. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica* 22 (1): 1-11p. <https://doi.org/10.31910/rudca.v22.n1.2019.1212>
- Curi, P. N., Almeida, A. B. D., Tavares, B. D. S., Nunes, C. A., Pio, R., Pasqual, M., & SOUZA, V. R. D. (2017). Optimization of tropical fruit juice based on sensory and nutritional characteristics. *Food Science and technology*, 37(2), 308-314. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/1678-457x.24716>
- De los Rios, C., Cortes, M., Gil, J. 2019. Desarrollo de una bebida funcional de mango y piña adicionada con proteína de sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.). Tesis de maestría. Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Nacional. Medellín.
- Duarte, W., Dias, D., Oliveira, J. (2010). Characterization of different fruit wines made from cacao, cupuassu, gabioba, jaboticaba and umbu. *LWT - Food Science and Technology* 43 (2010) 1564e1572. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.03.010>
- Freire A, Petrus, R., Gatti, J., Leite, M., Kunitake, M., Freire, C. (2016). Food-packaging interaction on the stability of canned sweetened cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum.) Puree. *Rev. Caatinga, Mossoró*, Vol 29 (4): 1006 – 1014p. <http://dx.doi.org/10.1590/1983-21252016v29n426rc>
- Fuquene Munar, J. P., & Arenas Portilla, N. (2018). Desarrollo de una bebida fermentada y saborizada a base de soya con adición de inulina y de cultivos probióticos. Retrieved from [https://ciencia.lasalle.edu.co/ing\\_alimentos/179](https://ciencia.lasalle.edu.co/ing_alimentos/179)
- García-Rincón, P., Rodríguez-Pérez, W., Rosas-Patiño, G., Velásquez-Restrepo, J. (2012). Caracterización física, química y microbiológica de dos tipos de suelo del piedemonte amazónico. *Revista Ingenierías & Amazonia* Vol 5 (1): 51-57p.
- García, D. (2019). Optimización de parámetros de hilado y rendimiento de queso mozzarella en una marmita semiautomática. Tesis de grado en Ingeniero de industrias alimentarias. Universidad Nacional del centro de Perú. Lima Perú.
- Hernández, M.; Barrera, J. (2009). Frutas amazónicas competitividad e innovación. Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas SINCHI. Primera edición, p102. ISBN 978-958-8317-45-8
- Hernandez, J., Martinez, H., Andrade, M. (2019). Potencial Agroindustrial del Epicarpio de Maracuyá como Ingrediente Alimenticio Activo. Información

Tecnológica Vol. 30 (2), 245-256p. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642019000200245>

- Hernández M., Díaz, R., Gutiérrez-Bravo R., Fernández-Trujillo, J. 2018. Use of a response surface method for the enzymatic treatment of copoazú pulp (*Theobroma grandiflorum*). Acta Hort. 1205. ISHS 2018. DOI 10.17660/ActaHortic.2018.1205.65
- Jeirani, Z., Mohamed, B., Brahim, J., Mohd, I., Hwa, N., Saphanuchart. W. (2012). The optimal mixture design of experiments: Alternative method in optimizing the aqueous phase composition of a microemulsion. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems 112: 1–7. doi:10.1016/j.chemolab.2011.10.008
- Kumar, S. B., Ravi, R., & Saraswathi, G. (2010). Optimization of fruit punch using mixture design. *Journal of food science*, 75(1), S1-S
- Liao, L. K., Wei, X. Y., Gong, X., Li, J. H., Huang, T., & Xiong, T. Microencapsulation of *Lactobacillus casei* LK-1 by spray drying related to its stability and in vitro digestión. (2017). LWT - Food Science and Technology, 82: 82–89p
- Makebe, C. W., Desobgo, Z. S. C., & Nso, E. J. (2017). Optimization of the juice extraction process and investigation on must fermentation of overripe giant horn plantains. Beverages, 3(2), 19. Doi: <https://doi.org/10.3390/beverages3020019>
- Mendonça, I., Machado, F., Silveira, C., Junior, S., Takenob, M., Maiac, P., Manzatob, L., Freitas, F. 2019. Application of calcined waste cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) seeds as a low-cost solid catalyst in soybean oil ethanolysis: Statistical optimization. Energy Conversion and Management 200: 1120952. doi.org/10.1016/j.enconman.2019.112095
- Ministerio de la Protección social. (2011). Resolución 333 de 2011. Por la cual se establece el reglamento técnico sobre los requisitos de rotulado o etiquetado nutricional que deben cumplir los alimentos envasados para consumo humano. 62p
- Ministerio de Salud y protección Social. 2013. Resolución 003929 del 2013. Requisitos sanitarios que deben cumplir las frutas y bebidas con adición de jugo (zumo) o pulpa de fruta o concentrados de fruta, clarificados o no, o la mezcla de éstos que se procesen, empaquen, transporte, importen y comercialicen.
- Nunes, G., Lima, M., Crispin, A., Hunaldo, U., Ribamar, L., Barros, P. (2019). Influence of the Use of Sucralose in Cupuassu Candy Preparation. Journal of Food and Nutrition Research, Vol. 7 (9) 674-678p. DOI:10.12691/jfnr-7-9-
- Olveira, G.; González, I. (2016). An update on probiotics, prebiotics and symbiotics in clinical nutrition. Endocrinol Nutr. Vol 63 (9):482- 494
- Passephol, T., Small, D. M., & Sherkat, F. (2008). Rheology and texture of set yogurt as affected by inulin addition. Journal of Texture Studies, 39, 617–634
- Plata, A., Ramírez, S., Riaño, C. 2012. Método de superficie de respuesta para optimizar las condiciones de producción de ácido láctico a partir de subproductos lácteos: SLC. Nova - Publicación Científica en Ciencias Biomédicas - Issn: 1794-2470 - Vol. 10 No. 18 Julio - Diciembre de 2012: 135 – 250
- Sadat, M., Khdayyan, F., Amin, M., Mohammad, S. (2012). Application of Response Surface Methodology to Improve Fermentation Time and Rheological Properties of Probiotic Yogurt Containing *Lactobacillus reuteri*. Food Bioprocess Technol (2012) 5:1394–1401 DOI 10.1007/s11947-010-0433-
- Salamanca, G., Osorio, T., Nelson, R., Abril, R. (2011). Propiedades Físicoquímicas Termofísicas Y Reológicas de Cremogenados de Frutas

Tropicales. Physicochemical Thermophysicals And Rheologic Properties In Puree Of Tropical Fruits. Grupo de Investigaciones Mellitopolinológicas y Propiedades Físicoquímicas de Alimentos. Facultad de Ciencias. Departamento de Química. Universidad del Tolima.

- Salamanca, G., Reyes, L., Osorio, M., Arias, N. (2015). Diseño experimental de mezclas como herramienta para la optimización de cremolácteos de mango. *Revista Colombiana de Investigaciones Agroindustriales*. Volumen 2, (1): 16 – 24p. <https://doi.org/10.23850/24220582.166>
- Santos, S, Freitas, H; Rodrigues, S; Abreu, V; Lemos, T; Gomes, W; ,Naraind, N; Pereira, A. (2019). Production and stability of probiotic cocoa juice with sucralose as sugar substitute during refrigerated storage. *LWT - Food Science and Technology* 99:371–378. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.10.007>
- Schiassi, M. C. E. V., Carvalho, C. D. S., Lago, A. M. T., Curi, P. N., Pio, R., Queiroz, F., & Souza, V. R. D. (2020). Optimization for sensory and nutritional quality of a mixed berry fruit juice elaborated with coconut water. *Food Science and Technology*, 40(4), 985-992. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/fst.28919>
- Schramm., L. 2005. Emulsions, foams and suspensions. Fundamentals and Applications. <https://doi.org/10.1002/3527606750.ch5>
- Yang, B, Haiqin, C, Gao, H; Wang, J; Stanton, C; Ross, P; Zhang, H; Chen, W. (2018). Bifidobacterium breve CCFM683 could ameliorate DSS-induced colitis in mice primarily via conjugated linoleic acid production and gut microbiota modulation. *Journal of Functional Foods*. Vol 49: 61–72. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.08.014>

## CAPITULO IV

### ESTABILIDAD DE UN CREMOGENADO A BASE DE COPOAZÚ Y VIABILIDAD DEL PROBIÓTICO INSERTADO EN EL PRODUCTO DESARROLLADO DURANTE EL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO

#### INTRODUCCIÓN

La industria de frutas ha aumentado como resultado al conocimiento de los alimentos saludables y de alimentos funcionales; Colombia es un país exportador de frutas, para el año 2018 obtuvo un incremento en su porcentaje de exportación, superior al 5.64%, frutas como aguacates, maracuyá, mangos, piña, papaya, fresas entre otros (Colombia Productiva, 2019); en los reportes se evidencia una baja actividad de exportación de los frutos Amazónicos, los cuales son de poca adquisición en Europa y América del Norte. En general el consumo se ha visto incrementado hacia alimentos funcionales, alimentos que sensorialmente satisfagan a la mayoría de los grupos poblacionales, siendo importante desarrollar productos a base de frutos Amazónicos para aumentar su comercio. Copoazú (*Theobroma grandiflorum*) es un fruto nativo de la Amazonia Brasileira, y distribuido en la Amazonia Colombiana (Costa *et al.*, 2015; Bernal *et al.*, 2017), el interés de investigación de este fruto ha aumentado desde el año 2010 por sus predominantes componentes bioactivos, especialmente en Caquetá y Guaviare (Fantinelli, 2017; Hernández, 2012); fragancia por la presencia de compuestos volátiles como ésteres, (etil acetato, butanoato de etilo, propanoato de etilo, hexanoato de etilo) (Ramos *et al.*, 2019). La pulpa del copoazú es usada para jugos, mermeladas, néctares, confiterías, entre otros, es aromática y cremosa, amarilla – blanca (Hernández, 2010), a pesar de su utilidad las pérdidas poscosechas son entre el 15 -50% por la poca trazabilidad, y el poco control de calidad agronómico (De Alvarenga *et al.*, 2016; De Oliveira, 2019).

La pulpa de Copoazú tiene un pH entre 2 - 4, presenta principalmente sacarosa como el carbohidrato en mayor proporción (34.6% materia seca), contiene ácido palmítico, linoleico y  $\alpha$ - linolénico, K, Mg, P (34.27; 13.07; 15.73g /100 g respectivamente), presenta pectina (390 - 850 mg), indicado para mermeladas y jaleas. Contiene proteínas entre 1.55 – 1.92g (peso seco), aminoácidos 21,9 mg (%N), extracto etéreo 0,48 -16 g; almidón 0,96 g; azúcares reductores 2,8 – 3,03 g; fibra 0,5 – 1,89, brix 10,5 – 12, pH 3,2 -3,6, vitamina C 18,3 – 33 mg, entre sus características (Hernández, 2010), lo que lo hace atractivo a generar alternativas, tales como tratamientos térmicos para la pulpa logrando ofrecerla durante el año, sin presentar desarrollo de productos a base de copoazú por lo que autores como Ramos (2019) presentan la importancia de adaptar tecnologías a las condiciones locales para implementar programa agrícolas involucrando dicho fruto.

Los subproductos de copoazú han mostrado relevancia en la persistencia de los componentes, según Roncancio (2018), como la matenca del copoazú, es un emoliente, lubricante, con capacidad de absorción de agua, (240%), lo que ayuda a la estabilidad y como co-emulsionante en emulsiones, adicionalmente los ácidos grasos de cadena larga ayuda a una mayor hidratación. Dentro de las presentaciones ofertadas existe pulpa pasteurizada empacada, se usa para disminuir la microbiota de la pulpa, y a pesar de su considerable reducción los costos de congelación son altos, igualmente las tendencias a la modernidad de la presentación y al cuidado de la salud hace importante generar nuevos desarrollos de productos. La vida útil de un alimento se relaciona con la determinación de la estabilidad de atributos de calidad en un periodo de tiempo de almacenamiento, para el caso del cremogenado a base de Copoazú con inserción de *L. casei*, se evaluó la aceptabilidad durante seis meses de almacenamiento a partir de análisis sensorial mediante prueba subjetiva versus la comparación de calidad microbiológica y viabilidad del probiótico (Rodríguez, 2019). El objetivo de este capítulo fue determinar la estabilidad fisicoquímica del cremogenado con inserción de probiótico durante el almacenamiento de 0 a 6 meses.

Para estudiar las características del cremogenado a base de copoazú con inserción de *L.casei* ATCC 393 durante el tiempo de almacenamiento se planteó como propósito evaluar las propiedades fisicoquímicas del cremogenado, y la aceptación de este por análisis sensorial durante el tiempo de almacenamiento; y mediante la aplicación del espectro infrarrojo con reflectancia total atenuada ATR-FTIR como herramienta se realizó análisis de la información química aportada.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Recolección de frutos y pulpa

Los frutos de Copoazú (*Theobroma grandiflorum*), fueron obtenidos en el centro de investigación Amazónicas Macagual – Cesar Augusto Estrada, (altitud de 242 msnm, (HR 87% y una temperatura 28°C, precipitación anual de 3650 mm H<sub>2</sub>O) N 01°29'55.3" W 075°39'45.7"), los frutos fueron individuos cosechados al azar, con grado madurez fisiológica, después del que pedúnculo se desprende naturalmente (Hernández, 2010). Se realizó desinfección del fruto, lavado con solución de hipoclorito de sodio a 50 ppm. El despulpado se realizó de forma mecánica (despulpadora de acero inoxidable 300 K/hora ref 01200515 (tamices n. 2, marca JARINOX), se empaco en bolsas de polietileno con cierre hermético y se llevó a almacenamiento a -18°C hasta su uso.

#### Activación cepa

Se utilizó la cepa comercial *Lactobacillus casei* ATCC393, se activó según las indicaciones del fabricante, y se obtuvo biomasa después de su activación, en 200

mL de caldo MRS (Man, Rogosa y Sharpe) (Conda), a 37°C por 72 horas, en condiciones anaeróbicas (Marín *et al.*, 2019).

## 2.2 Preparación del cremogenado.

Se realizaron dos tratamientos de cremogenados TA y TB, para evaluar de manera individual durante los 6 meses. Se utilizó pulpa pasteurizada, homogenizada durante 2 minutos (Ultraturrax T 18 marca IKA - posición 4 (15600-15500rpm), se incorporó el endulzante con estevia en 3% (Taeq) (extracto de estevia al 5%).

Se adicionó prebiótico, inulina, para TA 4% y TB 3%, se homogenizó para TA durante 5 minutos, y para TB 10 minutos, (Ultraturrax, posición 3 (11000-11200rpm), y con la finalidad de proteger las células del probiótico fue inoculado al final del proceso, TA – Biomasa 2%, TB Biomasa 2.25%, homogenizada de manera manual y posteriormente mecánica por 1 minuto (posición 1 – (3500-3600rpm), el cremogenado fue llevado a almacenamiento en refrigeración (Tabla 1).

**Tabla 1. Ingredientes de los cremogenados de tratamientos TA y TB**

	Biomasa (%)	Inulina (%)	Tiempo de homogenización (min)
TA	2	4	5
TB	2.25	3	10

**Conservación de cepa.** La cepa de cultivos fue conservados a -20°C, durante el periodo de estudio (6 meses) y al finalizar se conservaron a -70°C según condiciones óptimas de microorganismos probióticos con caldo MRS, adicionando glicerol 20% y otros con *skim milk* 20% (Sánchez,2020).

## 2.3 Almacenamiento

El producto, es decir el cremogenado después de desarrollado fue almacenado en refrigeración (4 - 6°C) (refrigerador Haceb – Colombia) en recipientes de vidrio con capacidad de 120 mL y tapas plásticas, y evaluado durante 6 meses (180 días).

Cada tratamiento TA y TB, se usó diferentes recipientes para ser evaluados en el periodo de estudio. Cada tratamiento se realizó por triplicado.

2.4 Caracterización del cremogenado. Cada una de las siguientes pruebas se realizaron mensualmente durante 6 meses.

#### 2.4.1 Propiedades de estabilidad.

Para la evaluación de la estabilidad del cremogenado se tuvo en cuenta las variables independientes: tratamiento A (TA), tratamiento (TB), tiempo de almacenamiento (0 – 6 meses) y como variables dependientes: cenizas (AOAC 942.05), actividad de agua ( $a_w$ ) (AOAC 978.18/1978) por medio de equipo marca Aqualab 4TE Decagon Devices, Inc. Pullman, WA (4 - 4,5g del cremogenado) cuyo sensor fue calibrado con soluciones de sal acuosa saturada 13.41 m LiCl ( $0.25 \pm 0.003 a_w$ ), 8.57m LiCl ( $0.50 \pm 0.003 a_w$ ), 6.0 m NaCl ( $0.76 \pm 0.003 a_w$ ) y 2.33 m NaCl ( $0.92 \pm 0.003 a_w$ ) (Schmidt y Lee, 2012), humedad ( $x_w$ ) (AOAC 934.01/1935), sólidos solubles (AOAC – 932.12) (refractómetro marca MA884, Milwaukee, expresados °Brix, 20°C), pH (AOAC 981.12) (muestra 5g con 95 ml de agua a 25°C, antes de las mediciones el instrumento se calibró con soluciones tampón (pH 4, 7 y 10 a 25°C), acidez total (AOAC 942.15/1988) expresado como ácido cítrico (%), potencial zeta (mV) usando equipo marca Zetasizer (Nano ZS90, Malvern Instruments Ltda, UK) con una celda de electroforesis capilar con una dilución de la muestra en agua destilada (1/50) y tamaño de partícula ( $D_{10}$ ,  $D_{50}$ , y  $D_{90}$ ) con equipo marca Mastersizer 3000 (Malvern Instruments Ltda, worcestershire, UK).

Determinación de índice de estabilidad (R) en el cremogenado. Para la evaluación de índice de estabilidad (R), se realizó una dilución 1/100, de cada muestra, se leyó en 400nm y 800nm (Multiskan go) siendo  $R = A_{800}/A_{400}$  comparados con los valores del blanco (Peña *et al.*, 2015).

#### 2.4.2 Características de viscosidad.

Se utilizó mediciones de los cremogenados anteriormente planteados, mediante un viscosímetro marca Boeco ( $\mu$ ) husillo RV4, a una velocidad de 100 rpm y una temperatura constante de la muestra en su temperatura de almacenamiento entre ( $10 \pm 2^\circ\text{C}$ ). Se hicieron lecturas en los meses 1, 2 y 3.

#### 2.4.3 Evaluación del contenido total de compuestos fenólicos, flavonoides y Vitamina C.

Se determinó el contenido de compuestos fenólicos, flavonoides y Vitamina C en cada tratamiento (A y B) de cremogenado a base de copoazú con inserción de *L. casei* ATCC 393, en cada mes durante 6 meses.

#### Determinación de fenoles totales

La determinación del contenido de fenoles totales se realizó usando el método de Folin-Ciocalteu. Para ello se preparó una mezcla de reacción, utilizando el extracto, agua desionizada y el reactivo de Folin-Ciocalteu, se dejó reaccionar

por 5 minutos y se agregó carbonato de sodio 7.1%, después de 1 hora de reacción en la oscuridad, se leyó la absorbancia a 760 nm. Los resultados se expresan como miligramos de ácido gálico (AG) por gramo de muestra empleando como referencia ácido gálico (Barros *et al.*, 2016).

#### Evaluación del contenido de Flavonoides

Para realizar la evaluación del contenido de flavonoides se utilizó el método de Zhishen, Mengcheng (1999) empleando una mezcla de agua desionizada, extracto, NaNO<sub>2</sub> 5% y AlCl<sub>3</sub> al 10% después de 5 min, se adicionó NaOH 1M, se dejó reaccionar 15 min, y por último se adicionó agua desionizada. Esta mezcla se guardó en la oscuridad por media hora y se procedió a leer la absorbancia a una longitud de 510 nm. Los resultados se expresan como miligramos de catequina por gramo de muestra; usando catequina como referencia (Dae-Ok *et al.*, 2003).

#### Contenido de vitamina C

Para analizar el contenido de ácido ascórbico o vitamina C, se adicionó ácido oxálico 0,15% al extracto de muestra. Luego se preparó una mezcla de reacción con extracto, 2-nitroanilina al 0,16%, nitrito de sodio al 0,08%, etanol al 96%, después de 5 minutos de reacción, se agregó hidróxido de sodio al 10% y agua destilada. Por último, se leyó la absorbancia a 540 nm. El contenido de ácido ascórbico se reportó en unidades de mg de ácido ascórbico (A.A) por gramo de muestra, usando ácido ascórbico como estándar (Nováková *et al.*, 2008).

#### 2.4.4 Determinación de la capacidad antioxidante por métodos hidrófilicos, ABTS, DPPH.

Se determinó la capacidad antioxidante a cada tratamiento (A y B) en el cremogenado de Copoazú durante cada mes por 6 meses empleando métodos como ABTS, DPPH.

#### Actividad atrapadora del radical libre DPPH.

Para realizar la actividad atrapadora del radical libre DPPH (1,1 difenil -2 picrilhidrazil), se utilizó una solución madre de DPPH (9,9 mg de DPPH en 100 ml de metanol) junto con el extracto. Esta mezcla de reacción se agitó en vortex y se almacenó en la oscuridad por 30 minutos, la absorbancia se leyó a una longitud de onda de 517 nm y los resultados se expresaron en  $\mu$ mol de trolox por gramo de muestra, usando TROLOX como antioxidante de referencia (Dudonne, 2009).

## Reducción del radical Cation ABTS<sup>•+</sup>

El desarrollo de esta actividad se lleva a cabo haciendo reaccionar el extracto y una solución de ABTS (*ácido 2,2' - azino - bis- 3 - etilbenzotiazolin - 6 - sulfónico*), la cual consiste en mezclar el reactivo ABTS y persulfato de potasio en agua durante 48 h utilizando el extracto, se preparó una mezcla de reacción y se guardó en la oscuridad por 7 min, finalmente se leyó la absorbancia a 734 nm, utilizando trolox 5mM como patrón de referencia; los resultados se expresan en  $\mu\text{mol}$  de TROLOX (*6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid*) por gramo de muestra (Thaipong *et al.*, 2006).

### 2.4.5 Espectroscopia FT-IR

**Preparación de la muestra.** Luego de cumplido cada periodo mensual, se pesaron 50 g de cada tratamiento y se adicionaron en recipientes de vidrio para su posterior liofilización usando un Liofilizador de mesa, modelo 0.1 JLG marca LABOTECGROUP-China (laboratorio de productos naturales- Universidad de la Amazonia). La muestra seca obtenida fue pasada por tamiz estándar #60 (diámetro del agujero de 0.25 mm) en bolsas herméticas rotuladas además con un empaque secundario con sílica como agente desecante, para posterior envío a la ciudad de Neiva para análisis infrarrojo al laboratorio CESURCAFE de la Universidad Surcolombiana.

**Análisis de FTIR.** Esta medición se realizó por medio de un equipo marca Agilent technologies Cary 630 FTIR Santa Clara, CA, EE. UU, con un rango de frecuencia entre  $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ , región infrarrojo media (Vriesmann, 2010).

Se utilizó 0.5 g de muestra de cada tratamiento (A y B) para la lectura en el espectrómetro de infrarrojo con transformador de Fourier con reflectancia total atenuada (ATR-FTIR), en el rango de  $4000 - 650 \text{ cm}^{-1}$ , con una resolución de  $8 \text{ cm}^{-1}$  y 20 escáneres (resolución 4). Se usó modo *Apodization: Happ-Genzel*. Las mediciones de ATR-FTIR se realizaron en una atmósfera seca y a temperatura ambiente ( $20 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ ) (Bahamon *et al.*, 2018).

### 2.4.6 Viabilidad del *L.casei* ATCC 393.

Se midió la viabilidad del probiótico mediante recuento en placa, con agar MRS, siembra en profundidad, se realizaron diluciones seriadas con peptona universal (Merck Alemania) ( $10^{-5} - 10^{-9}$ ), se inició con 10 g de muestra con 90 ml de peptona 0.1% (pH 7.2), realizando homogenización mediante vortex (Boeco 300 1/min) por dos minutos, se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  en condiciones de anaerobiosis (Gas Pack system, OXOID) (Obando *et al.*, 2010; Costa, 2015).

Cabe aclarar que en esta investigación se realizaron estudios previos de viabilidad del microorganismo con la pulpa con y sin inulina, con y sin edulcorante y en temperaturas de refrigeración (6-10°C) y temperaturas de congelación (-8°, -25°C), evaluación que se realizó a 6 días y a los 15 días, el cual no mostró ninguna afectación en conteo de colonias del probiótico, permitiendo iniciar con la adición del microorganismo en producto desarrollado.

#### 2.4.7 Control de Calidad microbiológica del cremogenado a base de Copoazú con probiótico.

Se evaluó los cremogenados de los tratamientos (A y B) durante los 6 meses de almacenamiento evaluado. La calidad microbiológica se determinó mediante recuento de mesófilos (AOAC 966.23), mohos y levaduras (AOAC 997.02), coliformes totales (AOAC 991.14), *S.aureus* (AOAC 975.55). Detección de *Salmonella* spp/25g (AOAC int 2003) (Saavedra *et al.*, 2014) según lo requerido por la resolución 003929 del 2013 (Ministerio de Salud y protección Social). Se realizó muestras de cremogenado con y sin inclusión de probiótico con las mismas condiciones de higiene para el conteo de mesófilos para evitar interferencia por parte de los probiótico incluidos.

Recuento de microorganismos aerobios mesófilos, agar plate count (Difco <sup>TM</sup> *Stantard methods* agar peptona de caseína glucosa extracto de levadura), incubación 35 +/- 2°C 48 horas +/- 2 h, inoculación en profundidad, de muestras diluidas 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup>, placas duplicadas. Los resultados fueron informados como recuento de placas aerobias/g (ufc/g) (AOAC 966.23-a). Para recuento de mohos y levaduras se usó el método de petrifilm<sup>TM</sup> (AOAC 997.02), las diluciones de las muestras fueron realizadas con agua buferada de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, siguiendo las instrucciones del fabricantes para la conservación de las placa de petrifilm a <8°C, se realizaron diluciones seriadas 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup>, se homogenizo y luego se colocó en la placa petrifilm, la cual se encontró en una superficie plana, el inóculo se realizó con 1 ml suspendido mediante pipeteado perpendicular en el centro de la base y se procedió a colocar la película superior sobre el inóculo, y presión mediante el esparcidor y se dejó reposar durante 1 minuto. Las placas fueron incubadas en posición horizontal con la cara trasparente hacia arriba (25°C± 2) por 5 días, en bloque no mayor de 10 unidades, según el inserto del fabricante las levaduras son colonias pequeñas, color verde azulado o blanquecino, los mohos suelen ser azules pero también puede tomar su pigmentación natural y son más grandes y difusas que las levaduras, se reporta promedio de las colonias/g. Para coliformes y *E.coli* fue usado petrifilm<sup>TM</sup> (AOAC 991.14), las muestras se prepararon como se describió anteriormente del resultado de la homogenización, con diluciones seriadas con una incubación 35°C 24 +/- 2 h según el fabricante aparecen colonias rojas con una o más burbujas asociadas a la producción de CO<sub>2</sub>, se realizó conteo en las placas que se encontraban entre 15-150 colonias,

las colonias sin gas no son contadas para coliformes; para *E.coli*, las colonias aparecen de color azul asociadas a burbujas de gas.

Para la evaluación de microorganismos indicadores de manipulación se utilizó petrifilm™, Staph Express – recuento de *Staphylococcus aureus*; paralelo se sembró con agar Bair Parker, siembra en superficie 1 ml, diluciones seriadas por triplicado, 48 h 37 +/-2°C (AOAC 975.55), su conteo se realizó entre 20-200 colonias, las colonias positivas presuntivas (colonias circulares, convexas, lisas, diámetro 2-3mm grisáceas a negro azabache con margen de color blanquecino).

Para los microorganismos indicadores de calidad o microorganismos de contaminación, se realizó detección de *Salmonella* por medio de cuatro etapas, pre-enriquecimiento, etapa de enriquecimiento selectivo, etapa de aislamiento en medios selectivos, pruebas bioquímicas diferenciales (AOAC Int. 2003).

Adicionalmente como indicador de contaminación se realizó detección de *Listeria* por placa petrifilm™ para cada zona en evaluación (Jiménez, 2003), método aceptado por la AOAC (certificado N.º 030601).

#### 2.4.8 Análisis sensorial

Se realizó mediante sesenta (60) jueces no entrenados (consumidores) en edades de 19 a 60 años, se evaluaron parámetros globales de sabor y apariencia del cremogenado desde el tiempo 0 hasta 180 días. Se suministró formato con escala de agrado para los tratamientos evaluados, 1: le molesta, 2: ni le gusta ni le disgusta, 3: le gusta poco, 4: le gusta mucho; a su vez, 1: acepta, 0: rechaza, 1: compra, 0: no compra. Las muestras se presentaron al consumidor en recipientes plásticos de 10 ml previamente identificados con un número de tres dígitos asignado aleatoriamente y a una temperatura de 12°C. No se aportó a los consumidores información acerca del producto para evitar que influyera en las notas afectivas sobre el mismo (Hui, 2006). Esta prueba afectiva fue realizada en el laboratorio de Biotecnología y Control de Calidad de Alimentos de la Universidad de la Amazonia.

#### 2.8 Análisis estadístico

Los datos del cremogenados para ambos tratamientos A y B, durante el tiempo de almacenamiento (6 meses), se procesaron con análisis de varianza ANOVA, con nivel de confianza del 95%. Se realizaron comparaciones de medias, las diferencias significativas fueron halladas mediante Statgraphics Centurion XVI (Manugistics Inc., Rockville, MD, EE. UU). Los valores de la evaluación de calidad microbiológica, fue expresada mediante descripción de crecimiento de la misma.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el análisis de las variables respuestas en función de la variable independiente (tiempo de almacenamiento) se evidencia un efecto estadístico significativo ( $p < 0.05$ ) de todas las variables respuesta en correlación Tabla 2. La comparación de las variables respuestas mostró un efecto estadístico entre ellas para el mismo tratamiento durante el tiempo de almacenamiento, excepto para el parámetro de potencial Z  $p = 0.0913$  y vitamina C  $p = 0.5648$ , lo cual es un buen indicativo de estabilidad de la muestra durante el tiempo dado que no mostro separación de fases; a diferencia del tratamiento B que todos los parámetros presentaron una diferencia estadística en comparación con el tiempo de almacenamiento, el cual se mantuvo cercano a su valor inicial hasta los 3 meses (valor promedio  $-9,413\text{mV}$ ) Tabla 3.

**Tabla 2. ANOVA de los atributos de calidad en el almacenamiento del cremogenado tratamiento A**

Propiedad	P valor	Propiedad	P valor
Cenizas (%)	0.0001	D10 ( $\mu\text{m}$ )	0.000
Viscosidad $\mu$ (cP)	0.0001	D50 ( $\mu\text{m}$ )	0.0002
Xw	0.0001	D90 ( $\mu\text{m}$ )	0.0000
Sólidos solubles totales ( $^{\circ}\text{Brix}$ )	0.000	Potencial Z mV	0.0913
pH	0.000	R Índice de estabilidad	0.0022
aw	0.000	Flavonoides (mgCat/100g muestra bh)	0.0057
Acidez (%)	0.000	FENOLES mg AG/100 g muestra bh	0.0000
DPPH (umol trolox/100g muestra bh)	0.000	VIT.C (mg A.A/100g muestra bh)	0.5648
ABTS (umol Trolox/100g muestra bh)	0.000		

**Tabla 3. ANOVA de los atributos de calidad en el almacenamiento del cremogenado tratamiento B**

Propiedad	P valor	Propiedad	P valor
Cenizas (%)	0.0000	D10 ( $\mu\text{m}$ )	0.0000
Viscosidad $\mu$ (cP)	0.0000	D50 ( $\mu\text{m}$ )	0.0000
Xw	0.0000	D90 ( $\mu\text{m}$ )	0.0000
Sólidos solubles totales ( $^{\circ}\text{Brix}$ )	0.0000	Potencial Z mV	0.0000
pH	0.0000	R Índice de estabilidad	0.0000
aw	0.0038	Flavonoides (mgCat/100g muestra bh)	0.0022

Acidez (%)	0.0000	Fenoles mg AG/100 g muestra bh	0.035
DPPH (umol trolox/100g muestra bh)	0.0000	VIT.C (mg A.A/100g muestra bh)	0.0103
ABTS (umol Trolox/100g muestra bh)	0.0000		

En la Figura 1 se presenta la evolución de los valores medios y desviación estándar de los cremogenados tratamientos (A y B) durante el tiempo de almacenamiento 6 meses, de cenizas, aw, Xw, sólidos solubles, pH, y acidez del cremogenado a base de copoazú adicionado con probiótico y prebiótico, durante el almacenamiento de  $6 \pm 2^\circ\text{C}$ .

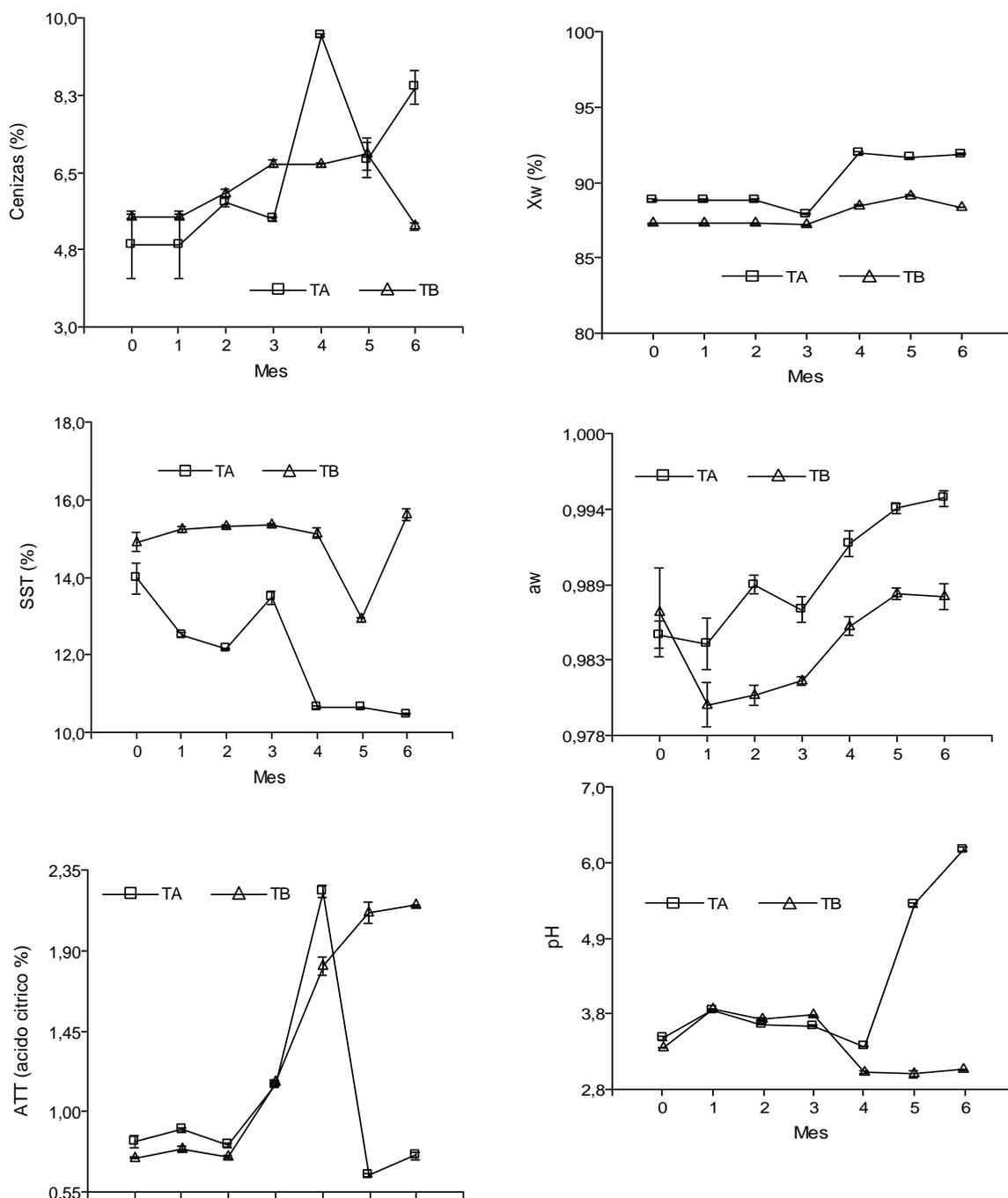


Figura 1. Promedio medio de cenizas, aw, Xw, sólidos solubles (SST) y acidez titulable del cremogenado a base de Copoazú con inserción del probiótico, durante el almacenamiento de  $6 \pm 2^\circ\text{C}$ .

En la producción de bebidas de frutas con probióticos son relevantes algunos parámetros como el pH del producto final, que permita la supervivencia de los microorganismos; la temperatura de almacenamiento (refrigeración  $4^\circ\text{C}$ ), para buscar una estabilidad microbiológica, fisicoquímica y sensorial del producto, evitando la producción de metabolitos que impacten en la viabilidad de los probióticos. Los valores de pH para los cremogenados para el tratamiento TA (3,5 - 6,13), TB (3,3 - 3,1), para TA sólidos solubles (13,9-10,47 °Brix), cenizas (4,86 - 8,42%), acidez (0,834-0,751%), TB sólidos solubles (14,9-15,6 °Brix), cenizas (5,5 - 5,2%) acidez titulable total (0,741-2,14,5 % de ácido cítrico), estos valores debido a la distribución de los ingredientes del cremogenado, en el TB tiene un 4% del prebiótico que ayuda a mantener el pH, lo cual no afectó su relación con el microorganismo. En el TA disminuyó en principio el pH y posteriormente aumento, diferente al TB que se mantuvo estable, lo cual es similar a lo reportado por Costa (2015) en muestras de yogurt, aduce que el contenido bacteriano mediante su actividad metabólica consume azúcares, y produce ácido láctico, lo cual en principio disminuye el pH, y posteriormente cuando se agota los nutrientes los microorganismos utilizan las proteínas y producen otros metabolitos, que aumentan el pH, lo cual se mostró en el TA o se sugiere que la aparición del consumo de ácidos grasos después del azúcar como fuente de carbono y la degradación de pectinas a ácidos urónicos, adicionalmente de la producción de ácidos orgánicos por parte del microorganismo podrían también explicar la reducción del pH, evidenciado en el TB (Costa, 2015; Espiritu, 2011).

La humedad para TA (88,8 -91,8 %) TB (87,2 – 88,351 %), se encuentra dentro de los parámetros permitidos para cremogenados según el (Boe – A-1983-9198), aw (0,985 -0,995) para TA y TB se mantuvo en 0,987 hasta los seis meses de almacenamiento con fluctuaciones en el tiempo, las cuales son bastantes altas representativo de este tipo de productos de purés de fruta. Los valores de sólidos solubles, de ambos experimentos se encuentran relacionados con pH, lo cual se evidenció para TB se mantuvo hasta el tercer mes y disminuyo en el cuarto mes, para TA, se mostró un comportamiento diferente aumento en el tercer mes, y para el cuarto disminuyo, esto debido al consumo de azúcares y posteriormente a la utilización de proteínas para su metabolismo, lo cual se refleja en el aumento de solidos solubles totales por los metabolitos producidos, es decir que los valores de sólidos solubles, pH, acidez correspondieron a lo esperado por la degradación de

los nutrientes o componentes solubles presentes en la fase acuosa evidencia de la existencia en el producto de un microorganismo inoculado.

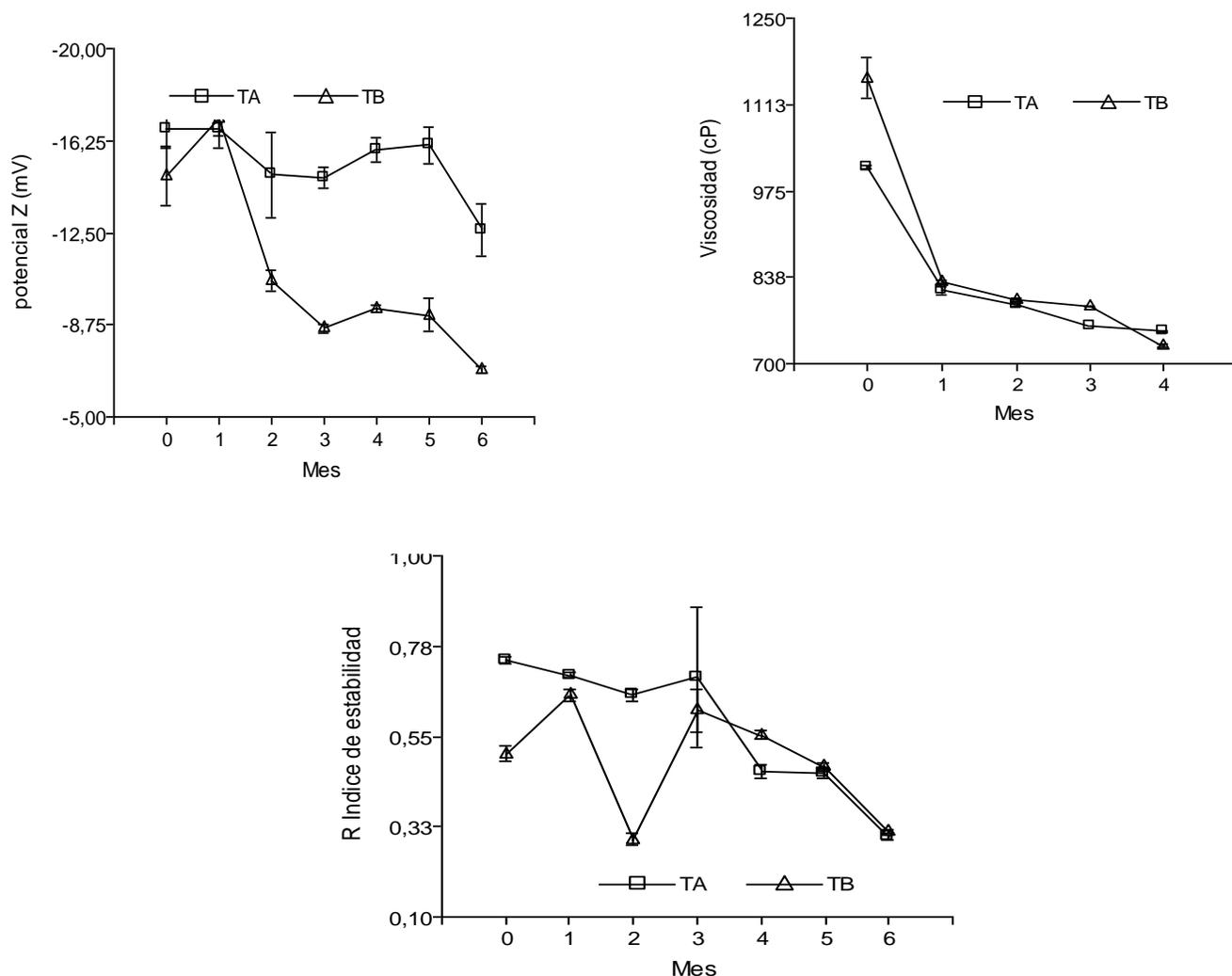
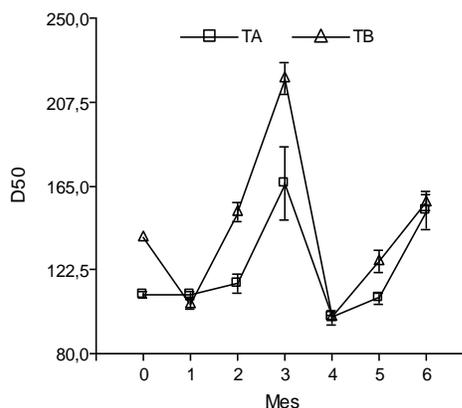
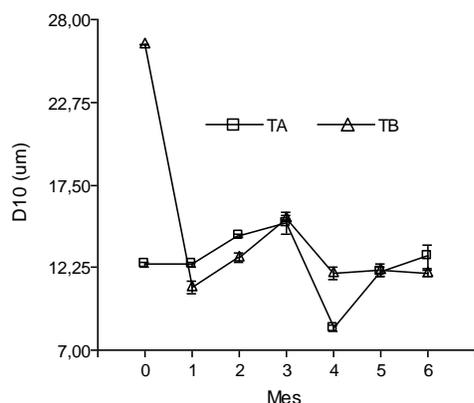


Fig 2. Promedio de los valores de viscosidad ( $\mu$ ), PZ, índice de estabilidad del cremogenado a base de copozú con inserción del probiótico, durante el almacenamiento de  $6 \pm 2^\circ\text{C}$ .

Las variaciones durante el tiempo para los dos tratamientos (A y B) para potencial Z (PZ), viscosidad (cP), y R como índice de estabilidad son mostrados en la Figura 2, sus valores iniciales y finales de PZ (-16,73, -12,6 mV),  $\mu$  (1012 - 751cP), índice R ( $0,74 \pm 0,01$  -  $0,38 \pm 0,01$ ) para el tratamiento A, y para el tratamiento B, PZ (-14,8, -6,93 mV),  $\mu$  (1154 - 727cP), índice R ( $0,507 \pm 0,03$  -  $0,313 \pm 0,00$ ) (Figura 2).

El producto desarrollado tiene poca cantidad de lípidos y en el estudio de sus componentes nutritivos se evidenció que ayudan a la estabilidad natural de la misma dispersión (Curo *et al.*, 2017) las proteínas presentes en la pulpa ayudan a su vez a potencializarlas mediante las posibles uniones que existen entre proteína – carbohidratos, además de tener en cuenta los componentes del cremogenado como la inulina que genera un poder de agente estabilizador, al realizar mediciones de los cremogenados del potencial Z, se encontraron valores -16 a -14, valores reportados para purés y cremas (-20mV), lo cual difiere con lo reportado Schramm (2005), que señala estabilidad moderada con valores -30mV, incluso estudios para detectar los mejores componentes en algunas soluciones han buscado que se acerque a ese valor (Mirhosseini *et al.*, 2008); sin embargo, los reportes se asemejan a soluciones o emulsiones con propiedades lipídicas altas. Se observó disminución de la viscosidad para TA y TB; el PZ para el TA mostró un comportamiento asintomático con una disminución notable desde el mes cinco, fue más estable, al poseer mayores fuerzas repulsivas en el sistema en comparación el TB (Figura 2), sin embargo, teniendo en cuenta que la viscosidad disminuye a través del tiempo, esto provoca una mayor movilidad de las partículas en la fase continua y mayor probabilidad de interacción de choques de partícula, que podría inestabilizar el sistema e inducir una posible separación de fases en TB a tiempo mayores de 6 meses, posiblemente por su tamaño de partícula, siendo que la concentración de iones de esta mezcla proviene exclusivamente de la matriz ya que no existe ningún tipo de agente adiconado.

Se determinó índice de estabilidad por absorción espectral, mide las distribuciones de tamaño de partícula a partir de la variación angular de la intensidad de la luz dispersa cuando existe el paso de un rayo a través de la muestra de partículas dispersas, para los tratamientos A y B, se obtuvo un valor constante durante el tiempo de almacenamiento con disminución desde el mes 4, con mayor influencia en el tratamiento B que en el A (Figura 2). Los valores de viscosidad fueron medidos durante tres meses de almacenamiento evidenciando un leve descenso con valor  $n < 1$ , siendo el mismo comportamiento que para la pulpa de copoazú, pseudoplástico, coherente con lo reportado por Costa (2015), esto debido a la alta concentración de partículas sólidas en suspensión como pectinas, hemicelulosa, almidón, pectinas (Vriesman, 2009; Revelo *et al.*, 2016), por lo que evidencia una alta viscosidad según Vrisman, (2010).



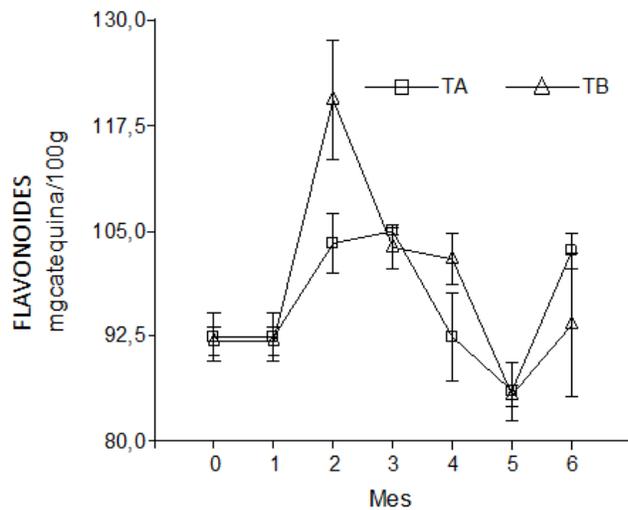
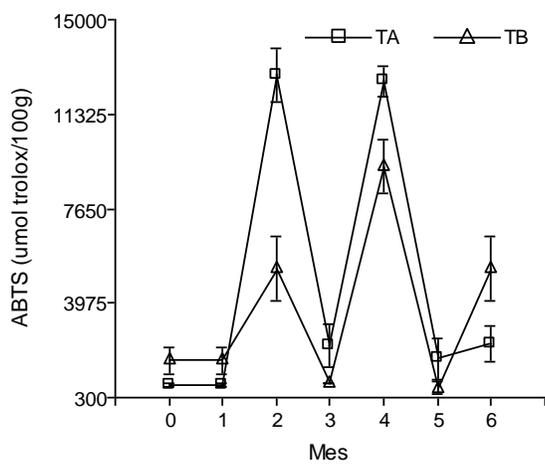
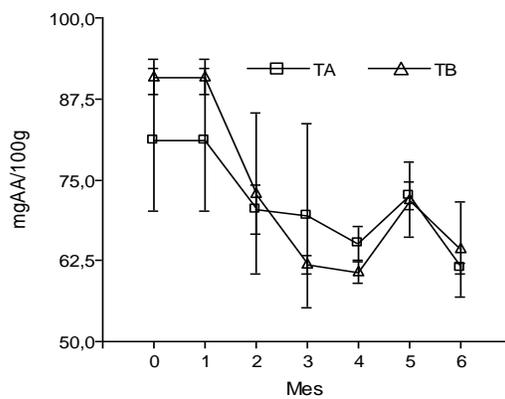
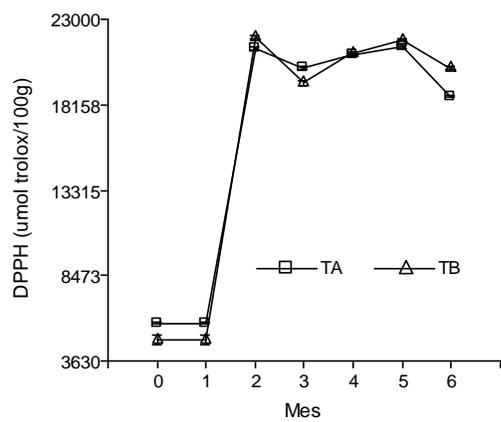
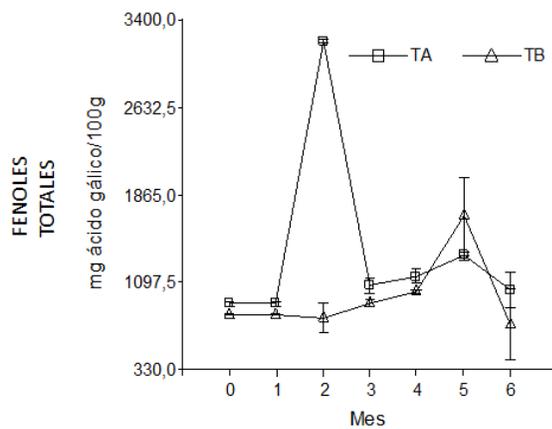
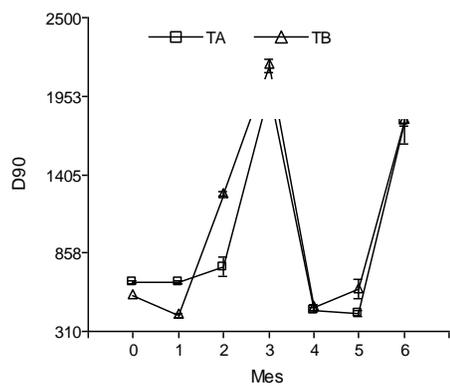


Fig 3. Promedio de los valores de tamaño de partícula ( $D_{10}$ ,  $D_{50}$ ,  $D_{90}$ ), flavonoides, fenoles totales, vitamina C, ABTS, DPPH de los tratamientos (A y B) del cremogenado a base de copoazú durante el tiempo de almacenamiento.

Los valores para TA para  $D_{10}$  (12,46 - 12,9  $\mu\text{m}$ ),  $D_{50}$  (109,6-152,6  $\mu\text{m}$ ),  $D_{90}$  (651,6 – 1770  $\mu\text{m}$ ), fenoles totales (905,9 - 1027,4 mg AG/100 g muestra bh), vitamina C (81 -61,3 mg A.A/100g muestra bh), ABTS (808,4 - 2404,2  $\mu\text{mol}$  Trolox/100g muestra bh), DPPH (5766,8 - 18621,6  $\mu\text{mol}$  trolox/100g muestra bh), flavonoides (92,315 - 102,5 mgCat/100g muestra bh) se encuentra en la Fig 3 en comparación con el TB. TB  $D_{10}$  (26,4 – 11,86  $\mu\text{m}$ ),  $D_{50}$  (139,6-156,6  $\mu\text{m}$ ),  $D_{90}$  (555 –1780  $\mu\text{m}$ ) fenoles totales (816,263 - 726,6 mg AG/100 g muestra bh), vitamina C (90.86 - 64,15 mg A.A/100g muestra bh), ABTS (1728,6 - 5297,5 $\mu\text{mol}$  Trolox/100g muestra bh) DPPH (4797,820 - 20251,938  $\mu\text{mol}$  trolox/100g muestra bh), flavonoides (91,852- 93,7 mgCat/100g muestra bh).

Entre los factores que afectan la estabilidad de los cremogenados como una suspensión, es la temperatura, los sólidos solubles totales, y el tamaño de partícula según Aguilar (2013), normalmente en una suspensión las partículas son grandes entre 0.6 a  $2 \times 10^{-4}$  cm, coherente con los datos del cremogenado de copoazú, esta mezcla es caracterizada como puré de fruta (Figura 3), y deben ser agitadas fuertemente para su consumo, debido a la probabilidad de separación; sin embargo, para el cremogenado de copoazú no presentó división de fases visual durante el tiempo de almacenamiento, esto debido al correcto tiempo de homogenización y manejo de la pulpa antes de adicionar el microorganismo, entre mayor sea el tiempo de agitación, más tiempo tardará en separarse sus fases según Schramm (2006), debido a la tracción mecánica realizada para consecución de partículas pequeñas en principio por el proceso de despulpado el cual se realizó paso de pulpa por malla del equipo, posteriormente en desarrollo del producto por medio del instrumento de dispersión, evidenciando una buena homogenización del producto manteniendo la estabilidad de la dispersión (Schramm, 2006). El tamaño de partícula representa, los valores 10%, 50%, y 90% de los tamaños que corresponda según cada porcentaje, es así que se mostró una leve disminución del  $D_{10}$  durante el tiempo, lo cual presume aumento de  $D_{50}$ , caso más pronunciado para el tratamiento B, similar a lo publicado por Castagnini, (2014).

Observando el comportamiento del contenido de fenoles totales (Figura 3) para los dos tratamientos del cremogenado de copoazú en el tiempo, se evidencia que presentan un comportamiento similar durante el almacenamiento evaluado, para

TA el contenido de fenoles aumentó de manera significativa en el mes 2, TB en el mes 5, mientras que en los otros meses el contenido de estos metabolitos no presenta variación significativa.

El aumento observado de contenido de fenoles totales durante el almacenamiento pueden ser debido a las reacciones enzimáticas y no enzimáticas que producen los compuestos fenólicos en respuesta al estrés provocado en el producto durante su almacenamiento (Muñoz, 2015; Ginzberg *et al.*, 2009) o en contraste cuando hay disminución de concentración se puede asimilar a la degradación de los metabolitos por oxidación y polimerización con proteínas que estos pueden enfrentar después de un largo tiempo de conservación (Santander *et al.*, 2017), por ello, al aumentar o disminuir la concentración de estos metabolitos se estarán alterando las propiedades del producto.

La variación del contenido de fenoles totales durante el almacenamiento del cremogenado de copoazú es similar a lo reportado Morales y Vivas (2015), evaluaron tres bebidas con diferente porcentaje de pulpa de curuba; igualmente Sánchez *et al.*, (2013) en el desarrollo de una bebida a base láctea con extracto de curuba, publicaron resultados similares donde el comportamiento de los compuestos fenólicos tiende a ser constante, pero con algunos aumentos o descensos durante el tiempo de almacenamiento. Para los cremogenados de copoazú, el alto contenido de fenoles totales permite que sean considerados como un producto funcional, con propiedad antioxidante (Rodríguez *et al.*, 2014; Curimbaba, 2020)

Para los flavonoides del cremogenado a base de copoazú (Figura 3), varió la concentración de estos metabolitos durante su almacenamiento, con un comportamiento similar para los dos tratamientos, en el primer mes no hay diferencia significativa ( $p > 0.05$ ), su contenido es constante, y aumenta en el mes 2 para ambos tratamientos, presentando diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en el tratamiento B donde se encontró el mayor contenido, en los meses posteriores la concentración fluctuó, sin diferencia estadística durante el tiempo de almacenamiento, esta fluctuación o inestabilidad del componente es debido a las numerosas reacciones enzimáticas y químicas durante el almacenamiento y procesamiento de los alimentos, donde las transformaciones que sufren los polifenoles son causadas por reacciones oxidativas catalizadas por polifenoles oxidasas como lacasas, catecol oxidasas, tirosinasas y por peroxidasas, alterando así el contenido de los flavonoides (Adetuyi *et al.*, 2014).

Los valores aquí presentados para flavonoides son similares a los publicados por Raga *et al.*, (2014) en su estudio sobre el efecto de las condiciones de almacenamiento sobre la capacidad antioxidante del mesocarpio homogeneizado y troceado de lechosa (*Carica papaya* L.), donde concluyen que, bajo un periodo de almacenamiento, dichos compuestos fenólicos aumentan debido al estrés que son sometidos, luego decrecen hasta un punto donde se estabilizan.

Así mismo, se evaluó el contenido de ácido ascórbico (A.A) también conocido como vitamina C, el cual es un componente nutricional con alto potencial antioxidante, los resultados obtenidos para los dos tratamientos se encuentran resumidos en la Figura 3.

Durante el tiempo de almacenamiento del producto se pudo notar que los dos tratamientos presentan un comportamiento similar; a pesar de no mostrar diferencias estadísticamente significativas en el contenido de vitamina C, se aprecia una leve disminución de concentración durante el tiempo de estudio, lo cual se da debido a que la vitamina C es demasiado lábil e inestable, razón por la que se produce degradación a través del tiempo; factores como la temperatura, luz, oxígeno, pH, enzimas, metales y concentración de sal y azúcar, son los responsables de influir en el mecanismo de degradación cuando se procesa o almacena los alimentos (Sánchez *et al.*, 2015). De acuerdo con Santander, *et al.*, (2017) expresa que un producto a base frutas llega al final de su vida útil en el punto en que la concentración de vitamina C llega al 50 % del valor inicial, podemos confirmar que este cremogenado frente a esta evaluación es estable durante los 6 meses de almacenamiento ya que su contenido en el mes 6 es mayor al 50 % del contenido inicial.

Resultados similares presenta Páez *et al.*, (2007) donde estudia la cinética de degradación del ácido ascórbico en el jugo de parchita; y Mendoza-Corvis *et al.* (2017) en su estudio degradación de vitamina C en un producto de mango (*Mangifera indica* L.) y lactosuero, donde al evaluar la cinética de degradación, vieron como disminuía la concentración de ácido ascórbico durante el tiempo, aunque a bajas temperaturas tienen una mejor estabilidad de estos compuestos.

De igual manera, los valores de ácido ascórbico iniciales obtenidos en este trabajo (Figura 3) son mayores que los obtenidos por Ferrel y Mamani (2014) en el néctar de copoazú (0,93 mg/g muestra), igualmente que en el estudio realizado por Tecse (2017) evaluando el porcentaje de retención de vitamina C en pulpa de copoazú enlatada, donde obtuvieron valores de 14,62 mg A.G/100 g de muestra para el producto final.

Para DPPH (eliminación del radical 2,2-difenil-1- picrilhidrazilo) mostró un comportamiento similar de la actividad antioxidante en los 2 tratamientos durante su almacenamiento. En el mes 0 y 1 la actividad antioxidante es baja, pero crece de manera significativa para el mes 2 y en los siguientes meses varía con algunos cortos descensos intermedios, presentando diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) solo en los 2 primeros meses de almacenamiento. Este aumento de actividad observado durante el almacenamiento se puede atribuir a la formación de pardeamiento de Maillard, reacción que produce efecto negativo en productos alimenticios a base de leche, frutas y hortalizas alterando su valor nutritivo, ya que en su formación se degrada proteínas y carbohidratos, además la reacción de

Maillard puede alterar las propiedades organolépticas al verse alterado los compuestos como las vitaminas y los aminoácidos esenciales (Michalczyk, 2010).

Para los cremogenados de copoazú, la capacidad de eliminar el radical DPPH durante su almacenamiento ha sido similar a lo encontrado por Sánchez *et al.*, (2013) en el desarrollo de una bebida láctea con extractos de curuba, donde observaron disminución de la actividad antioxidante en los primeros 8 días y un aumento después de los 15 días de estudio. Sin embargo, son diferentes a los reportado por Won-Young *et al.*, (2017) donde evalúa la actividad antioxidante y calidad durante el almacenamiento de un yogur al cual se le ha adicionado polvo de aceituna, disminuyendo linealmente la actividad antioxidante durante el tiempo de almacenamiento. De igual manera con Thanajiruschaya *et al.*, (2010) quien reporta disminución de la actividad antioxidante en muestras de arroz molido durante 7 meses de almacenamiento.

Por otra parte, el ensayo ácido 2,2'-azinobis- (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) se observó un comportamiento similar para ambos tratamientos con respecto a la variación de la actividad en el tiempo, estos tratamientos no presentaron un comportamiento específico, ya que mostraron aumentos con diferencia significativa en los meses 2 y 4, y disminuyeron la actividad en los meses 3 y 5 los cuales no muestran diferencia significativa respecto a la actividad inicial. Este comportamiento, donde la actividad aumenta y disminuye, posiblemente es debido a la regeneración de los compuestos responsables de estas reacciones a través de los efectos sinérgicos entre los compuestos antioxidantes presentes en el producto (Izasa, *et al.*, 2011).

Este comportamiento para ABTS presentado para los tratamientos en el cremogenado de copoazú, es diferente a lo reportado para otros productos durante el almacenamiento, en el caso de Zapata *et al.*, (2019) evaluó compuestos bioactivos y actividad antioxidante en un jugo de mango almacenado a 4°C y reportó un aumento significativo en los primeros 16 días de almacenamiento, posteriormente la actividad disminuyó hasta el día 64 de almacenamiento. Por otro lado, Xu *et al.*, (2019) quien evaluó el efecto del tiempo de almacenamiento sobre la actividad antioxidante del té blanco, ha reportado de la actividad antioxidante disminuye de manera significativa a medida que aumenta el tiempo de almacenamiento diferente a Sanlıdere (2011) muestran que la actividad antioxidante aumenta durante 4 semanas en el yogur tradicional y comercial.

Los resultados obtenidos al evaluar actividad antioxidante tanto por métodos basado en transferencia de átomos de hidrogeno (DPPH, ABTS) muestra que el producto mantiene estable sus propiedades antioxidantes durante el primer mes de almacenamiento, a partir del segundo mes las variaciones no son constantes y esto se asimila al efecto que provocan las reacciones enzimáticas en la producción de azúcares reductores durante el almacenamiento (Zapata *et al.*, 2015).

### 3.5 Análisis de espectroscopia FT-IR

#### Análisis ATR-FTIR de cremogenado de copoazú en tratamiento A- mes 4

En el análisis del espectro FTIR del cremogenado tratamiento A para el mes 4 (M4), (Figura 4) mostró una región de carbohidratos entre  $900-1200\text{ cm}^{-1}$ , una región de proteínas entre  $1550-1700\text{ cm}^{-1}$  y una región de lípidos entre  $2800-3000\text{ cm}^{-1}$  (Reuter *et al.*, 2020). El perfil del espectro ATR-FTIR de la Figura 4 fue similar al espectro FTIR obtenido para polisacáridos solubles en agua extraídos de *Opuntia stricta* (Koubaa *et al.*, 2015), obtenido para alimentos ricos en carbohidratos (Mondragón *et al.*, 2017) y similar al obtenido para pulpa de *Cucurbita moschata* (Quintana *et al.*, 2018) indicando alto contenido de carbohidratos en el cremogenado de copoazú de muestra M4. Es de notar que la muestra en la Figura 4 contenía gran cantidad de carbohidratos propio de las pulpa de copoazú, además de una cantidad de maltodextrina (polisacárido) como agente diluyente sólido de la estevia y cuyo espectro de infrarrojo (Santiago-Adame *et al.*, 2015) fue similar al del cremogenado de copoazú (Figura 4) y otra cierta cantidad de inulina (polisacárido) como agente prebiótico (Tabla 4) cuyo espectro de FTIR (Melanie *et al.*, 2015) también fue similar al obtenido en la Figura 4.

En el caso de proteínas, las señales de amida I y amida II en  $1661\text{ cm}^{-1}$  y  $1541\text{ cm}^{-1}$  respectivamente de proteínas se ubica en una región de gran sobrelapamiento de bandas y son más anchas comparadas con las señales adyacentes (Reuter *et al.*, 2020). La banda amida I se debe a tensiones C=O y la banda amida II se debe a deformaciones de  $\text{NH}_2$  en amidas primarias principalmente y en menor grado por flexiones N-H y tensiones C-H de amidas secundarias. La presencia de bandas intensas cuyas frecuencias en  $1653\text{ cm}^{-1}$  (C=O, amida I) y  $1547\text{ cm}^{-1}$  (N-H flexión en plano, C-N extensión, amida II), indican la presencia de proteína en la pulpa de fruta. Las vibraciones características C-O-P, C-O-C y C-C de los ácidos nucleicos, lípidos y proteínas. Vibraciones de extensión en fosfatos de ADN/ARN y fosfolípidos se encuentran en este rango espectral. En particular, los principales componentes en esta región surgen del grupo amida III, el cual incluye extensiones C-N y flexiones en plano N-H ( $\sim 1300\text{ cm}^{-1}$ ), además de las extensiones asimétricas ( $1237\text{ cm}^{-1}$ ) y simétricas ( $1080\text{ cm}^{-1}$ ) del grupo fosfato ( $\text{PO}_2$ ). La observación de bandas del grupo fosfato se debe a la presencia de ácidos nucleicos, así como a sales inorgánicas de fosfatos, comúnmente presentes en tejidos biológicos (Castorena-García *et al.*, 2011).

En el caso de ácidos nucleicos, las bandas fosfodiéster antisimétrica  $\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$  en  $1220\text{ cm}^{-1}$  y simétrica en  $\nu_{\text{s}}(\text{PO}_2^-)$  en  $1090\text{ cm}^{-1}$  asociadas a ADN no son evidentes en el espectro dado, debido a que la cantidad de ADN de la pulpa de copoazú o de *Lactobacillus casei* es muy pequeña y estas bandas son sobrelapadas por bandas más intensas de los carbohidratos (Reuter *et al.*, 2020), lo cual ocurre para el tratamiento (A y B).

En el caso de carbohidratos, la señal en el rango  $3600\text{-}3100\text{cm}^{-1}$  está asociada con la presencia de tensión O-H relacionada con puentes de hidrogeno de carbohidratos. La señal entre  $1336\text{-}1314\text{ cm}^{-1}$  se asocia a presencia de celulosa cristalina tipo II. La banda en  $1157\text{cm}^{-1}$  indica presencia de grupo C-O-C sugiriendo la presencia de grupo éter saturado que caracteriza la celulosa amorfa. Un pequeño hombro en  $896\text{ cm}^{-1}$  está asociada con la vibración C-O-C de carbono anomérico de carbohidratos presentes en pulpa de copoazú, inulina y *L. casei* (Ramos *et al.*, 2014). Sin embargo, junto a las tensiones simétricas y antisimétricas de los enlaces H-O-H ubicadas en el intervalo  $3400\text{-}3280\text{cm}^{-1}$  están las bandas de en  $3300\text{cm}^{-1}$  y  $3080\text{ cm}^{-1}$  asignadas a tensiones N-H (amida A y B) conformando la banda ancha entre  $3000\text{-}3600\text{cm}^{-1}$  observada (Castorena-García *et al.*, 2011). La muestra evaluada tiene gran contenido de carbohidratos, propio de las pulpas de frutas, dadas las bandas de absorción intensas entre  $900 - 1400\text{ cm}^{-1}$ . La región entre  $900\text{-}1150\text{cm}^{-1}$  representa tensiones de C-O y C-C y los picos entre  $1190$  y  $1400\text{cm}^{-1}$  corresponden a flexiones O-C-H, C-C-H y C-O-H de carbohidratos, la banda en  $1000\text{cm}^{-1}$  es característica de sacarosa. La banda entre  $3100$  y  $3400\text{ cm}^{-1}$  es tensión OH y entre  $2800$  y  $3000\text{cm}^{-1}$  es de tensión C-H de carbohidratos simples y complejos. El grupo OH de humedad residual y del ambiente pudieron contribuir a esta banda ancha (Cholassery *et al.*, 2019). Las bandas en  $1150$ ,  $1100$  y  $1020\text{ cm}^{-1}$  caracterizan ácido galacturónico de polisacáridos pécticos (Coimbra *et al.*, 2002). Las señales en  $1740\text{cm}^{-1}$  y  $1250\text{cm}^{-1}$  se deben a los grupos carbonilo de hemicelulosa. También se observaron vibraciones del anillo aromático de lignina en  $1600$  y  $1500\text{ cm}^{-1}$ . Se han atribuido los picos en  $1340\text{cm}^{-1}$  (OH en plano de flexión),  $1160\text{cm}^{-1}$  (tensión asimétrica C-O-C) y  $900\text{cm}^{-1}$  (deformación C1-H) con la celulosa (Draman *et al* 2016).

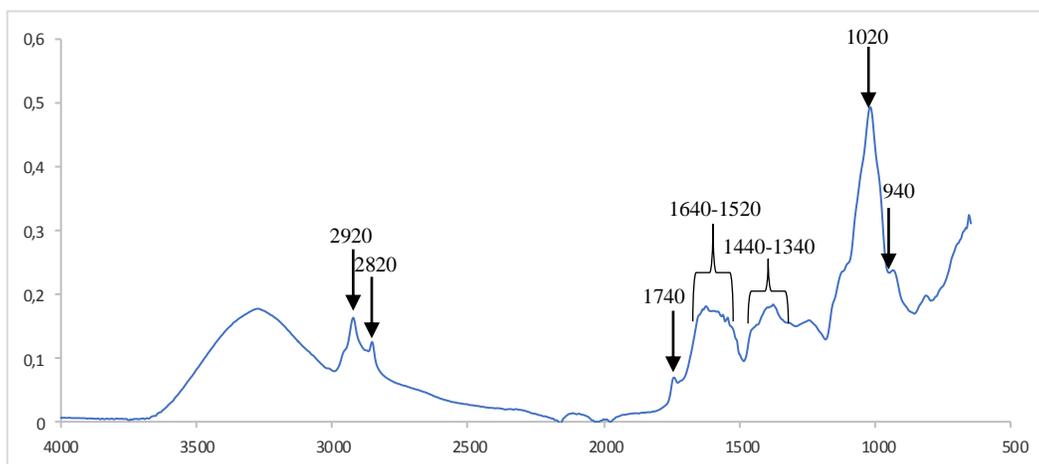


Figura 4. Espectro ATR-FTIR de cremogenado tratamiento A mes 4 (M4). Curva promedio de tres determinaciones.

Con respecto a lípidos, la señal en  $2950\text{cm}^{-1}$  corresponde a tensión de grupos C-H en anillo fenólico. La señal en  $1594\text{cm}^{-1}$  es característica de elongación de enlace C=C en el anillo aromático de lignina. Las señales en  $820-855\text{cm}^{-1}$  y  $750-780\text{cm}^{-1}$  se relacionan con sustituciones de los grupos en posiciones *orto* y *para* del anillo aromático presente en la pulpa de copoazú (Ramos *et al.*, 2014). Las bandas entre  $2950\text{cm}^{-1}$  y  $2850\text{cm}^{-1}$  se asignaron a vibraciones asimétricas y simétricas de tensión C-H de lípidos (Castorena-García *et al.*, 2011). La banda intensa en  $1720\text{cm}^{-1}$  se asocia a éster carbonilo C=O de los triglicéridos o fosfolípidos (Castorena-García *et al.*, 2011).

En la Tabla 4 se presentan las señales más intensas encontradas en el espectro infrarrojo, con referencias similares a lo encontrado para el análisis de nuestro estudio.

**Tabla 4. Señales de mayor absorción observadas en espectro ATR-FTIR de cremogenado a base de copoazú con adición de probiótico, tratamiento A mes 4 (M4).**

Región (cm-1)	Grupo funcional <sup>2</sup>	Referencia
1661	Amida I (proteína)	Reuter et al 2020, Song et al 2018
3300	Amida A, N-H	Castorena García et al 2011
1541	Amida II (proteína)	Reuter et al 2020, Song et al 2018
3080	Amida B, N-H tensión	Castorena García et al 2011
3100-3600	Carbohidrato	Ramos Casellis et al 2014
3490-3300	Tensión H-O-H	Castorena García et al 2011
2960	Tensión CH3 asimétrica	Castorena García et al 2011
2930	Tensión CH2 asimétrica	Castorena García et al 2011
2880	Tensión simétrica CH3	Castorena García et al 2011
2850	Tensión simétrica CH2	Castorena García et al 2011
1744	Tensión C=O éster	Castorena García et al 2011

## Tratamiento B, mes 1

El análisis del espectro FTIR de cambios en la composición del cremogenado B mes 1 (Figura 5) mostró una región de carbohidratos entre  $900\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ , una región de proteínas entre  $1550\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$  y una región de lípidos entre  $2800\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$  (Reuter *et al.*, 2020). El espectro ATR-FTIR de cremogenado del tratamiento B presentó una absorción diferente en la región entre  $1100\text{-}1750\text{ cm}^{-1}$  comparado con el cremogenado A.

En el caso de proteínas, las señales de amida I y amida II en  $1661\text{ cm}^{-1}$  y  $1541\text{ cm}^{-1}$  respectivamente de proteínas se ubica en una región de gran solapamiento de bandas y son más anchas comparadas con las señales adyacentes (Reuter *et al.*, 2020). La banda en  $1661\text{ cm}^{-1}$  fue más intensa en cremogenado B respecto de cremogenado A. La banda amida I se debe a tensiones  $\text{C}=\text{O}$  y la banda amida II se debe a deformaciones de  $\text{NH}_2$  en amidas primarias principalmente y en menor grado por flexiones  $\text{N-H}$  y tensiones  $\text{C-H}$  de amidas secundarias. La presencia de bandas intensas cuyas frecuencias en  $1653\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{C}=\text{O}$ , amida I) y  $1547\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{N-H}$  flexión en plano,  $\text{C-N}$  extensión, amida II, indican la presencia de proteína en la pulpa de fruta. Las vibraciones características  $\text{C-O-P}$ ,  $\text{C-O-C}$  y  $\text{C-C}$  de los ácidos nucleicos, lípidos y proteínas. Vibraciones de extensión en fosfatos de ADN/ARN y fosfolípidos se encuentran en este rango espectral. En particular, las principales componentes en esta región surgen del grupo amida III, el cual incluye extensiones  $\text{C-N}$  y flexiones en plano  $\text{N-H}$  ( $\sim 1300\text{ cm}^{-1}$ ), además de las extensiones asimétricas ( $1237\text{ cm}^{-1}$ ) y simétricas ( $1080\text{ cm}^{-1}$ ) del grupo fosfato ( $\text{PO}_2$ ). En el cremogenado B las dos señales antes mencionadas presentaron mayor solapamiento respecto al cremogenado A (Figura 4). La observación de bandas del grupo fosfato se debe a la presencia de ácidos nucleicos, así como a sales inorgánicas de fosfatos, comúnmente presentes en tejidos biológicos (Castorena-García *et al.*, 2011).

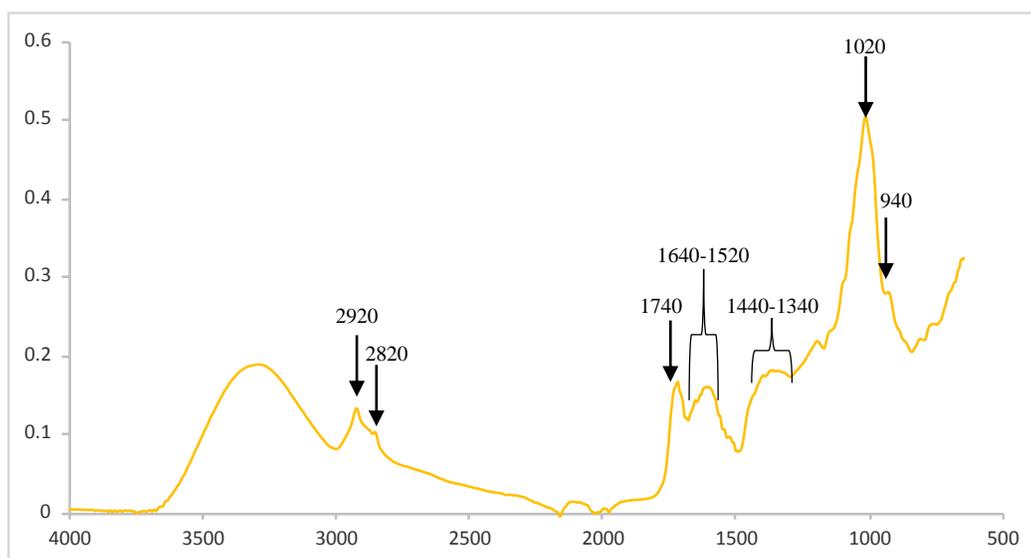


Figura 5. Espectro ATR-FTIR de cremogenado tratamiento B mes 1 (M1). Curva promedio de tres determinaciones

Las señales de lípidos fueron similares para los dos tratamiento (A y B), señal en  $2950\text{cm}^{-1}$  corresponde a tensión de grupos C-H en anillo fenólico, la señal en  $1594\text{cm}^{-1}$  es característica de elongación de enlace C=C en el anillo aromático de lignina. Igualmente para el tratamiento B, las señales en  $820\text{-}855\text{cm}^{-1}$  y  $750\text{-}780\text{cm}^{-1}$  se relacionan con sustituciones de los grupos en posiciones *orto* y *para* del anillo aromático presente en la pulpa de copoazú similar a lo reportado por Ramos Casselis *et al.*, 2014. Las bandas entre  $2950\text{cm}^{-1}$  y  $2850\text{cm}^{-1}$  se asignaron a vibraciones asimétricas y simétricas de tensión C-H de lípidos (Castorena-García *et al.*, 2011) siendo más intensas en cremogenado A comparado con cremogenado B. La banda intensa en  $1720\text{cm}^{-1}$  se asocia a éster carbonilo C=O de los triglicéridos o fosfolípidos (Castorena García *et al.*, 2011).

En la Tabla 3 se presentan las señales más intensas encontradas en el espectro infrarrojo con autores que reportan valores similares en estudios con productos relacionados con pulpas de difentes frutas.

**Tabla 5. Señales de mayor absorción observadas en espectro ATR-FTIR de cremogenado A (M4)**

Región (cm-1)	Grupo funcional <sup>2</sup>	Referencia
1661	Amida I (proteína)	Reuter et al 2020, Song et al 2018
3300	Amida A, N-H	Castorena Garcia et al 2011
1541	Amida II (proteína)	Reuter et al 2020, Song et al 2018
3080	Amida B, N-H tensión	Castorena García et al 2011
3100-3600	Carbohidrato	Ramos Casellis et al 2014
3490-3300	Tensión H-O-H	Castorena García et al 2011
2960	Tensión asimétrica CH3	Castorena García et al 2011
2930	Tensión asimétrica CH2	Castorena García et al 2011
2880	Tensión simétrica CH3	Castorena García et al 2011
2850	Tensión simétrica	Castorena García et al 2011

	CH2	
1744	Tensión C=O éster	Castorena García et al 2011

### Variación mensual de la absorción del espectro ATR-FTIR de cremogenado A durante los seis meses de almacenamiento.

Al evaluar los cambios en la absorción de las señales en el espectro ATR-FTIR del tratamiento A, durante seis meses de almacenamiento entre 4-6 °C se observó, en general, un aumento aproximadamente uniforme de la absorción en todas las regiones del espectro ATR-FTIR en el orden M3<M1<M2<M4<M5<M6. Este aumento en la absorción al pasar el tiempo fue mayor en la región de lípidos 2800-3000  $\text{cm}^{-1}$ , en la región de carbohidratos 900-1300  $\text{cm}^{-1}$  y de proteínas de 1500-1700 $\text{cm}^{-1}$  según la Figura 6, observándose dos grupos de absorción IR. Las muestras M1 y M3 presentaron una baja absorción muy similar entre sí conformando un primer grupo y la alta absorción de M2, M4, M5 y M6 fue relativamente similar entre sí conformando un segundo grupo.

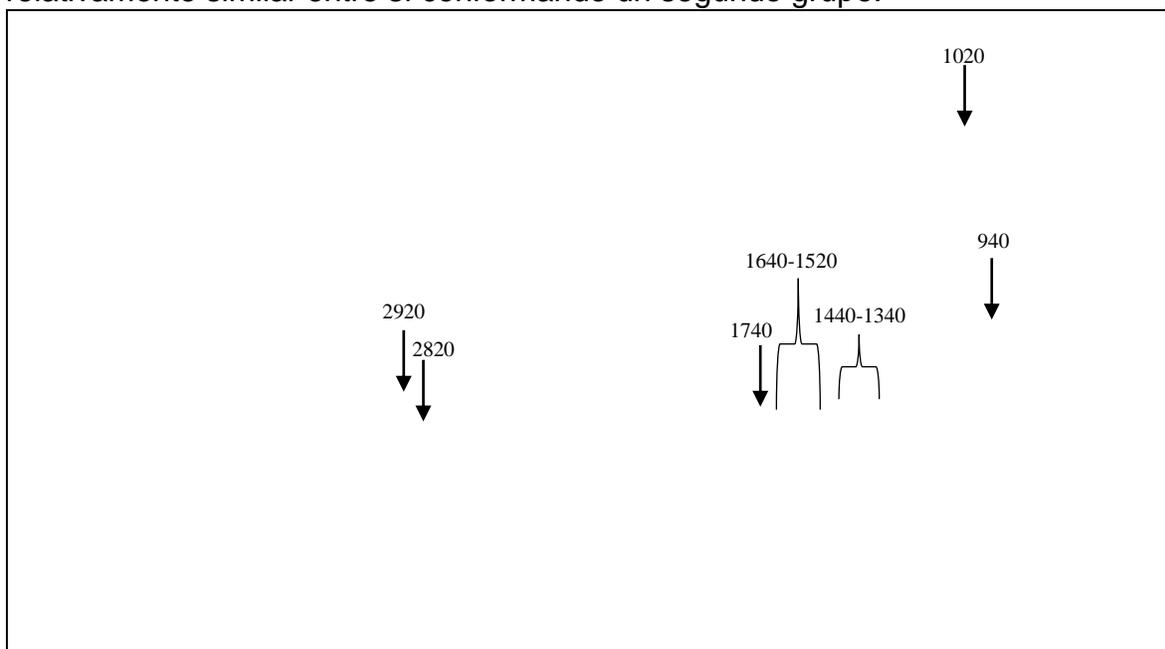


Figura 6 Variación mensual de las señales del espectro ATR-FTIR de cremogenado A de copoazú. Cada curva es el promedio de tres determinaciones.

Se ha demostrado que productos a base de pulpas conservadas a 6°C, disminuyen componentes bioquímicos del producto, en algunos casos generando daños por frío (Mortuza, *et al.*, 2014; Serna *et al.*, 2013). Los cambios antes mencionados probablemente sucedieron en el cremogenado A, en el cual se observó un ligero pardeamiento al final del periodo de almacenamiento a baja temperatura similar a lo observado por Patel *et al* (2016). La bacteria probiótica

*Lactobacillus casei* ATCC393 tiene actividad amilasa extracelular y produce ácido láctico entre otras actividades, generando una leve actividad fermentativa en la superficie del cremogenado de forma que el ácido láctico que se va formando puede aumentar la absorción de algunas bandas del espectro infrarrojo del cremogenado A como el caso de la banda de tensión C=O en  $1730\text{ cm}^{-1}$ , la cual es característica de grupos carboxilo. La señal varió entre  $2500\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$  es debida a la tensión O–H del componente ácido, mientras que las bandas en la región  $1200\text{--}950\text{ cm}^{-1}$  son explicadas por modos de tensión de grupos funcionales C–C y C–O. El intervalo más bajo de la región debajo de  $1200\text{ cm}^{-1}$  generalmente representa diferentes tipos de vibraciones C-H, C-O y CH<sub>3</sub> (Páucean *et al.*, 2017).

### **Variación mensual en la absorción del espectro ATR-FTIR de cremogenado B**

Al evaluar los cambios en la absorción de las señales en el espectro ATR-FTIR del cremogenado B durante seis meses de almacenamiento entre  $4\text{--}6\text{ }^{\circ}\text{C}$ , se observó un aumento aproximadamente uniforme de la absorción en todas las regiones del espectro ATR-FTIR en el orden  $M3 < M5 < M2 < M4 < M6 < M1$ . Lo anterior implicaría que durante el almacenamiento de cremogenado B hubo disminución fuerte de absorción infrarroja luego del mes 1 seguido de una leve disminución de absorción de infrarrojo en los siguientes meses. Esta disminución en la absorción fue mayor en la región de lípidos  $2800\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$ , en la región de carbohidratos  $900\text{--}1300\text{ cm}^{-1}$  y de proteínas de  $1500\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$  según la figura 5 observándose dos grupos de absorción IR. La muestra en el mes M1 presentó una absorción alta conformando un primer grupo y la absorción de M2, M3, M4, M5 y M6 fue relativamente menor y similar entre sí conformando un segundo grupo. Estos resultados muestran que la absorción infrarroja de los cremogenados estudiados depende fuertemente de las proporciones de los ingredientes de su formulación. A bajas temperaturas de almacenamiento tales como  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  se han registrado cambios bioquímicos en zumos de pulpas de frutos de *Artocarpus heterophyllus* tales como disminución gradual del contenido de carotenos y vitamina C, aumento en el contenido de sólidos solubles totales y contenido relativamente estable de azúcares reductores, no reductores y totales durante 270 días de almacenamiento (Mortuza *et al.*, 2014). Los registros de los cambios y daño por frío en frutos acercan a lo que pudo suceder durante el almacenamiento de cremogenado B (Serna *et al.*, 2013).

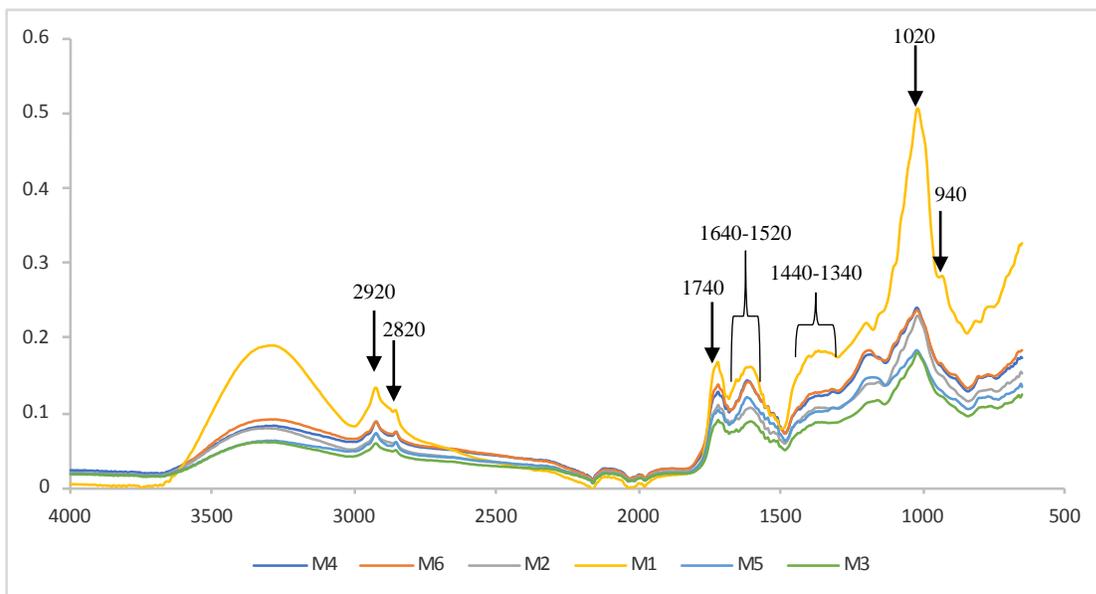


Figura 7. Variación mensual de las señales del espectro ATR-FTIR de cremogenado B de copozú. Cada curva es el promedio de tres determinaciones.

### 3. 6 Viabilidad del *L.casei* ATCC 393

La tendencia a mejorar la calidad de vida, mediante la alimentación es cada día más alta, igualmente la presencia de personas con intolerancia a la lactosa, dislipidemias, alergias a las proteínas lácteas hacen centrar mayor la atención a los alimentos como otras matrices para los microorganismos probióticos (Castillo, 2019), y es aquí donde centramos nuestra atención en la inserción del *L. casei* en una matriz alimentaria de fruto amazónico.

Los resultados de viabilidad del probiótico en el cremogenado estudiado en esta investigación se presentan en la Figura 8.

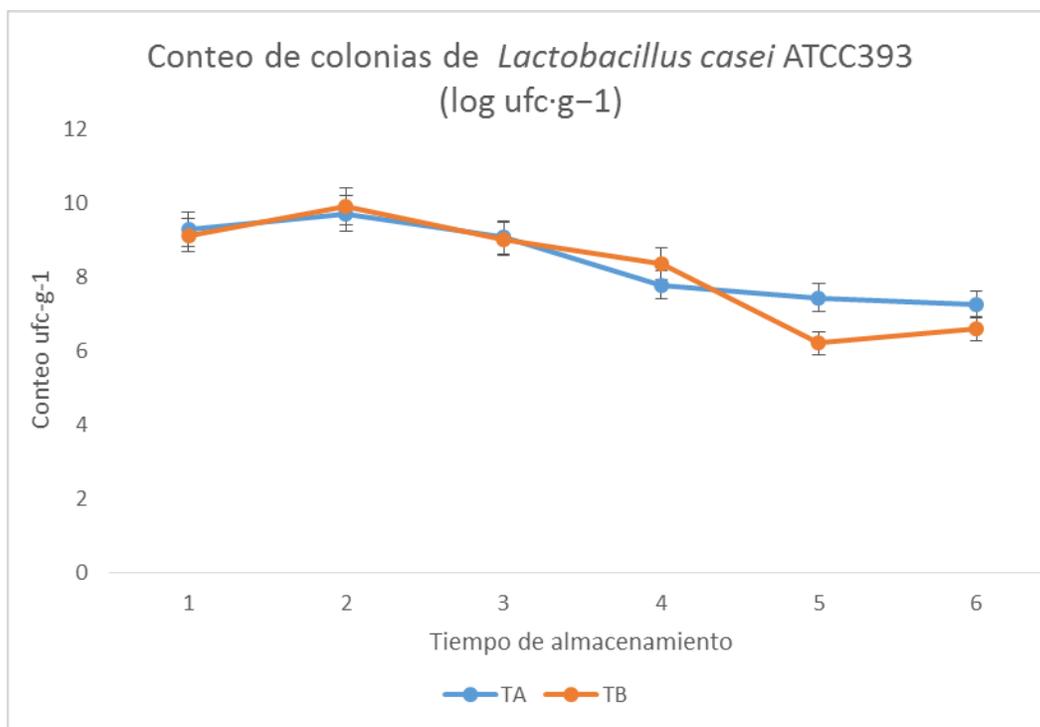


Figura 8. Conteo de *Lactobacillus casei* ATCC 393 en el tiempo de almacenamiento (6 meses) del cremogenado a base de copoazú.

Existe diferentes intensiones o alternativas de trabajar con la pulpa de copoazú con la inclusión de azúcar dietéticas, o bajas en calorías para agrandar al consumidor (Vallejo *et al.*, 2017). Muchos de los productos desarrollados en copoazú son interesantes y para incluir probióticos se debe garantizar la viabilidad de ellos, a pesar de la existencia de las diferentes técnicas de conservación se debe evaluar sin capsula para luego buscar mejoras en el producto.

El microorganismo *L.casei* ATCC 393 presentó una adaptabilidad en suspensiones a base de Copoazú con inulina que garantizan su viabilidad. El uso de este tipo de microorganismos es concordante con diferentes estudios como Marin (2019), quien enuncia los beneficios del *L.casei* y Obando (2010), señala la viabilidad de este dentro de una matriz láctea en comparación con otros probióticos durante 21 días siendo el de mayor población el *L.casei*, así mismo el uso de este microorganismo para elaboración y producción de alimento animal es reportado por Jurado (2020); igualmente el tiempo de inoculación fue el adecuado ( $t_0$ ), teniendo en cuenta el fundamento de la curva de crecimiento microbiano, lo cual dio resultados positivos, debido al complemento que ejerce la inulina, según reportes del buen crecimiento microbiano en comparación con otros prebióticos (Bernal, 2017) y el éxito regular

que tiene con otros probióticos a temperaturas de refrigeración (Bedani, 2013). Adicionalmente el endulzante, aspectos tecnológicos a tener en cuenta como ensayos prototipo (Castillo, 2019; Dharmasena, 2012).

Para ambos tratamientos (A y B) el microorganismo superó  $10^6$  UFC, hasta el mes 4 con conteos de viabilidad de probiótico alrededor de  $\text{Log}8$  UFC/g; para el mes 5 de igual manera se observó una disminución del microorganismos, el cual aún se encuentra entre los parámetros permitidos para caracterizarlo como alimento con probiótico. En cuanto al prebiótico usado no influyo en la viabilidad probiótica, el cual se ha encontrado diferentes publicaciones de conceptos de su ayuda en la viabilidad, como Costa (2015) que evidenció una disminución del probiótico en el tratamiento que contenía mayor inulina, por lo que sugirió en su conclusión una posible interferencia por parte de prebiótico; diferente a lo presentado por Bedani (2013) quien señala el aporte del prebiótico para el crecimiento y viabilidad del probiótico.

La viabilidad del probiótico en los primeros 15 días disminuyo significativamente ( $p < 0.05$ ) para los dos tratamientos lo cual es similar a lo ocurrido en otras evaluaciones, esto es debido al agotamiento de algunos nutrientes, el probiótico puede alterar la relación indicada en el medio, adicionalmente el microorganismo puede haber producido componentes antimicrobianos como bacteriocinas y  $\text{H}_2\text{O}_2$  o ácidos orgánicos que eventualmente pueden haber inhibido el mismo microorganismo. Posteriormente el microorganismo se mantiene más estable en ambos tratamientos obteniendo conteos favorables según la normatividad hasta el mes evaluado (Costa, 2015).

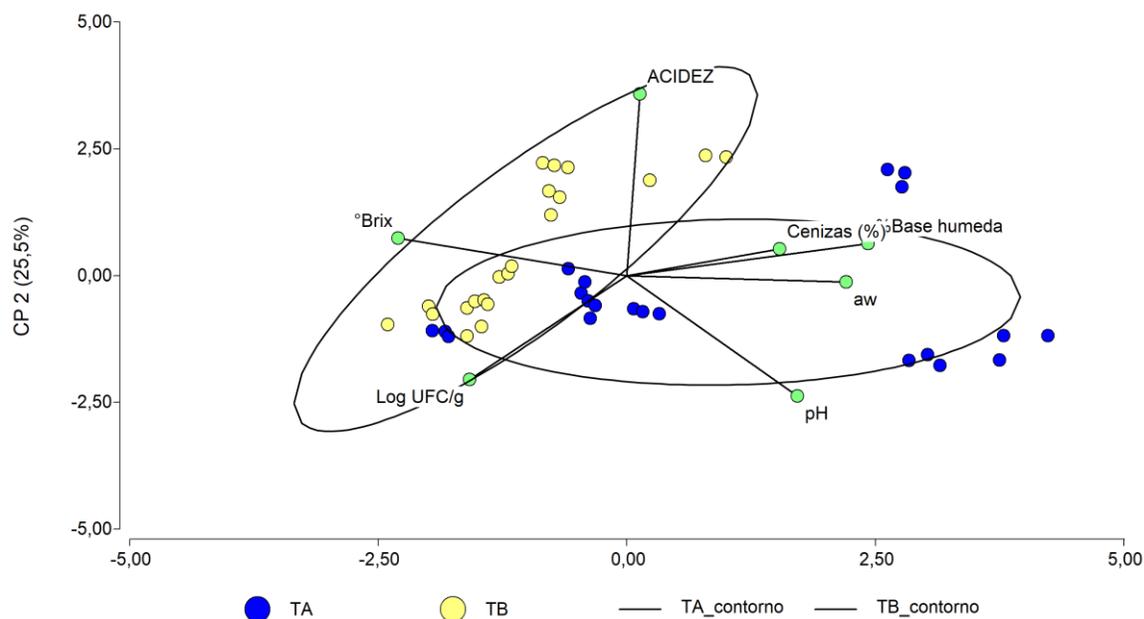


Figura 9. Análisis de componentes principales del cremogenado con inserción de probiótico.

El análisis de correlación por componentes principales, muestra un efecto significativo, el tiempo sobre las variables, en menor proporción para el mes 1, 2 y 3, con mayor proporción dado que se muestran más lejos del cero los meses 4, 5 y 6, para TB es de igual manera pero menos afectada, como era de esperarse el tiempo almacenamiento afecta las variables dependientes (Figura 8). Los valores de sólidos solubles, no se ve afectada ni por  $X_w$ , ni por cenizas, tiene diferencias estadísticas entre pH y  $a_w$ ,  $X_w$ , acidez, y con una relación negativa sólidos solubles, acidez, con valor de  $p < 0.05$ ,  $a_w$  tiene una relación estadísticamente negativa con sólidos solubles, y UFC/g, lo cual es congruente con los fundamentos de actividad de agua es disminuida si aumenta los sólidos solubles y si estos a su vez disminuyen, presume que los microorganismos o el conteo de colonias es mayor.

De manera general, la vida útil en productos de frutas con probióticos existe varios métodos, entre artificiales y naturales, las fuentes no lácteas contienen acidulantes naturales, que aumentan la vida útil del producto creando un ambiente anaeróbico, óptimo para microorganismos tipo probióticos por la disminución del oxígeno disponible, lo cual favorece el crecimiento, al igual que los azúcares naturales que ayudan al crecimiento del mismo (Aguilar, 2014). Es así como numerosos factores ayudan a la vida útil de un alimento, en el caso de productos que contienen probióticos favorecen al objetivo de durabilidad como el mantener los microorganismos en buenas condiciones, factores como concentración de oxígeno, acidez, pH, tipo de empaque, temperatura de producción y de almacenamiento, fuera de las tecnologías de conservación como secado y congelación (Aguilar, 2014).

### 3.7 Calidad microbiológica del cremogenado a base de Copoazú con probiótico.

Los cremogenados fueron evaluados durante el tiempo almacenado (1-6 meses), en la Tabla 6 se puede apreciar el control de calidad microbiológico o evolución microbiano durante el tiempo de almacenamiento mediante recuento de mesófilos, mohos y levaduras, coliformes totales, *S. aureus* y como indicador de contaminación se realizó detección de *Listeria*, y *Salmonella* para los dos tratamientos.

**Tabla 6. Caracterización microbiológica del cremogenado a base de copozú con inserción de *L. casei* ATCC 393 (Tratamiento A).**

Tratamiento A	Tiempo de almacenamiento Cremogenado de copoazú (mes)	Valores Resolución 3929/2013 pulpa azucarada
------------------	--	--

Meses	0	1	2	3	4	5	6	
Recuento <i>E.coli</i> UFC/g	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	n= 5 m= <10 M= - c= 0
Recuento de mohos y levaduras UFC/g o ml	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	n= 5 m= <100 M= 200 c= 1
<b>Recuento de mesófilos en el cremogenado sin inserción del probiótico</b>								
Recuento de microorganismos mesófilos ufc/g o ml	<100	<100	<100	53	53	64	49	n= 5 m= 500 M= 800 c= 1

n= número de unidades a examinar, m= Índice máximo permisible para identificar nivel de buena calidad, M=Índice máximo permisible para identificar nivel aceptable de calidad, c= Número máximo de muestras permisibles con resultado entre m y M, <= léase menor que

**Tabla 7. Caracterización microbiológica del cremogenado a base de Copoazú con inserción de *L. casei* ATCC 393, (Tratamiento B)**

Tratamiento B	Tiempo de almacenamiento Cremogenado de copoazú (mes)							Valores Resolución 3929/2013 pulpa azucarada
	0	1	2	3	4	5	6	
Meses								
Recuento <i>E.coli</i> UFC/g	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	n= 5 m= <10 M= - c= 0
Recuento de mohos y levaduras UFC/g o ml	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	n= 5 m= <100 M= 200 c= 1
<b>Recuento de mesófilos en el cremogenado sin inserción del probiótico</b>								
Recuento de microorganismos mesófilos ufc/g o ml	<100	<100	<100	69	68	61	76	n= 5 m= 500 M= 800 c= 1

n= número de unidades a examinar, m= Índice máximo permisible para identificar nivel de buena calidad, M=Índice máximo permisible para identificar nivel aceptable de calidad, c= Número máximo de muestras permisibles con resultado entre m y M, <= léase menor que

Para el recuento de enterobacterias, coliformes totales, coliformes fecales en nuestro caso *E.coli* UFC/g se obtuvieron valores negativos, para los dos tratamientos, los cuales al inicio de la elaboración del cremogenado se tuvo mucho cuidado con este valor, después del almacenamiento se conoce reportes que disminuyen debido a la acidez y pH de la misma matriz alimentaria debido a la baja tolerancia de estas bacterias gram negativas (Bruno, 2019; Obando, 2010). Aunque es un valor relacionado con microorganismos patógenos se debe tener en cuenta que su reporte negativo no indica la ausencia de patógenos entéricos (Breyman, 2013). El recuento de mohos y levaduras son representación del deterioro del producto, estos regularmente se incrementan en el almacenamiento, en nuestro caso existió un buen manejo del alimento, esto reflejado en el conteo de mohos, para TA, se mantuvo negativo durante el tiempo evaluado y para TB, se incrementó en el mes 4, 5 mostrando una reducción para el mes 6 esto debido al agotamiento de los nutrientes en el medio (mes 4=15, mes 5=25, mes 6=12ufc/g), valores concordante con autores como Bernal (2017), en el empleo de la inserción de *L. casei* en bebidas de frutos rojos, mostrando la importancia de la evaluación el control de calidad microbiológico para cada producto o tratamiento.

Los valores para *Staphylococcus aureus* fueron concordantes para mostrar una buena higiene y manipulación, aunque para la normatividad Colombiana no es exigida se evidenció valores menores de 10 ufc/g hasta el mes 4, posteriormente para ambos tratamientos, aumento su número en el 5 mes, y el 6 pero con valores aceptables según higiene y manipulación de alimentos <100 ufc /g (n=3, m=<100, M= (-), c=0, para calidad microbiológica en salsas); estos valores acordes a otros productos a base de copoazú como caramelos con sucralosa, con análisis microbiológico con ausencia de coliformes (<3 NMP ml<sup>-1</sup>), mohos y levaduras (<10 Ufc ml<sup>-1</sup>) (Nunes *et al.*, 2019). Igualmente para esta investigación se realizó *Salmonella* y *Listeria* obteniendo excelentes resultados en todo el almacenamiento en refrigeración acorde a lo reportado por Breymann (2013), por lo que microbiológicamente se deduce como un producto microbiológicamente seguro para el consumo humano, en este caso beneficioso dado que el bacilo ácido láctico (BAL) se mantuvo por encima de 10<sup>6</sup> UFC/g, durante los 90 días de evaluación iniciales. Estos parámetros de microorganismos indicadores son importantes de mantener porque corresponden al desarrollo de productos sin ningún tipo de conservantes (Breymann, 2013).

Aunque es difícil de evitar la contaminación por *Listeria*, en la industria alimentaria es necesario mediante los protocolos de buena manipulación ya que esta se encuentra de manera natural en nuestro entorno, tiene la capacidad de generar consorcios microbianos, biopelículas, por ello la trazabilidad de estos tipos de microorganismos deben realizarse en cada paso del proceso, especialmente para

frutas, ya que se ha reportado su capacidad para sobrevivir en matrices alimentarias con pH bajos, acidez alta y temperaturas bajas (Breyman, 2013), por su condiciones favorables en los alimentos, es un microorganismo de importancia en Salud Pública.

**Tabla 8. Presencia o ausencia de *Listeria spp* como indicador de contaminación de cremogenado con inserción de *L.casei* ATCC 393 TA, TB.**

<b>Muestras</b>	<b>Ausencia o presencia <i>Listeria spp</i></b>
Tratamiento A	Ausencia
Tratamiento B	Ausencia

**Tabla 9. Presencia o ausencia de *Salmonella spp* como indicador de contaminación.**

<b>Número de muestras</b>	<b>Ausencia o presencia</b>	<b>Valores</b>
<b>Detección de <i>Salmonella</i>/25 g</b>	Ausencia	n= 5 m= Ausencia
<b>Detección de <i>Salmonella</i>/25 g</b>	Ausencia	M= - c= 0

Los análisis microbiológicos en conjunto con los fisicoquímicos de un producto, permiten tener una idea de la vida útil del producto, los cuales de acuerdo con los parámetros permiten que sean aptos para el consumo humano (Pimentel, 2017).

En el estudio de la inocuidad de los alimentos ha sido reconocido la inclusión de antimicrobianos para disminuir el deterioro a causa de microorganismos, como benzoatos de sodio ya que no es volátil, y tiene un amplio rango de inhibición microbiano tanto bacteriano como micótico, ácido cítrico que tiene amplio espectro específicamente se reporta inhibición con microorganismos patógenos, sorbato de potasio que puede ser utilizado incluso en alimentos ácidos, sin embargo para conocer qué tipo de antimicrobiano es necesario conocer el comportamiento de la matriz sin ellos, adicionalmente se busca una conservación de manera natural para evitar daños en el organismo por algún tipo de sustancia añadida, además de la tendencia a nivel mundial a priorizar los alimentos naturales, libres de cualquier sustancia conservante químico y de procesamiento térmico (Breyman, 2013).

### **3.8 Análisis sensorial**

Las pruebas de aceptación mediante escalas hedónicas son una herramienta útil en la evaluación sensorial de un alimento (Ramírez, 2014), son muestras simples de preferencia que permiten conocer la aceptación del producto y a su vez, la intención de compra (De Paula, 2013; Pauter, 2018)

### Análisis de aceptación.

No hay diferencias estadísticas entre la aceptación de los tratamientos (A y B), es decir son iguales para los consumidores. No hay diferencias en la aceptación por género, ni por edad.

Los datos indican diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) para la aceptación del producto entre los meses 0, 1, 2, 3, 4, 5 con una aceptación promedio del 91,38% respecto al mes 6 donde disminuye al 23,3%, posiblemente dado al deterioro del producto y cambio de sus características fisicoquímicas que le confieren una textura, sabor y aroma diferente.

El análisis microbiológico es indicativo del deterioro del producto, según la Tabla 6 y 7 se evidencia un incremento de microorganismos en el mes 4 que a pesar que se encuentra entre los rangos permitidos para no afectar la salud humana se evidenció una disminución de la aceptación desde el mes 5, lo que se relacionaría a la presencia de la calidad microbiana del producto.

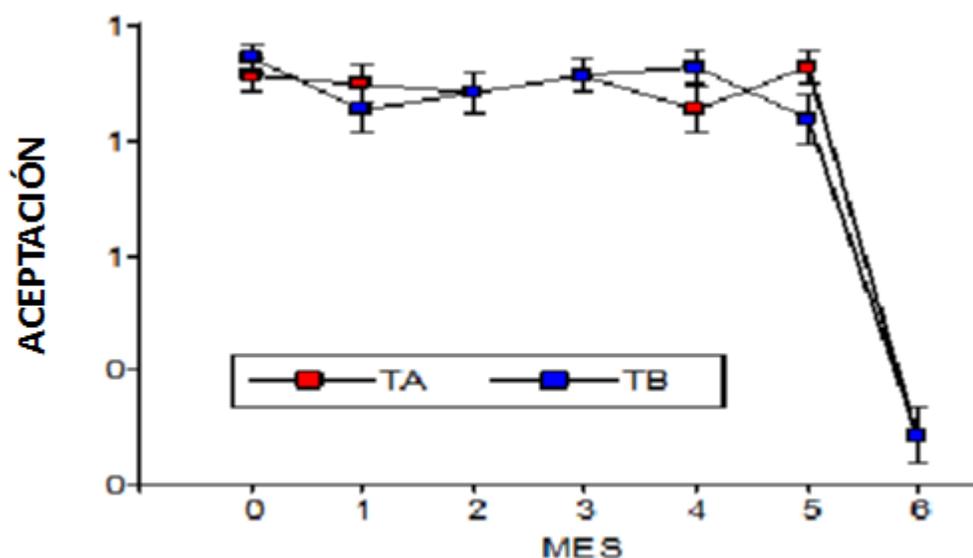


Figura 10. Promedio de la aceptación del cremogenado a base de copoazú con *L.casei* ATCC 393, para los tratamientos (A y B) durante el tiempo de almacenamiento (6 mes)

**Análisis de compra.** No hay diferencias significativas para la compra según el tratamiento y no hay diferencias de compra según el género. Existe diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) en la compra del producto respecto al mes, es decir que en los meses: 0,1, 2, 3, 4, 5 presentan un promedio de compra del 85,97% frente al 18,33% en el mes 6, esta disminución de compra se puede atribuir a la baja aceptabilidad del producto debido o relacionada al cambio y/o alteraciones de sus características fisicoquímicas.

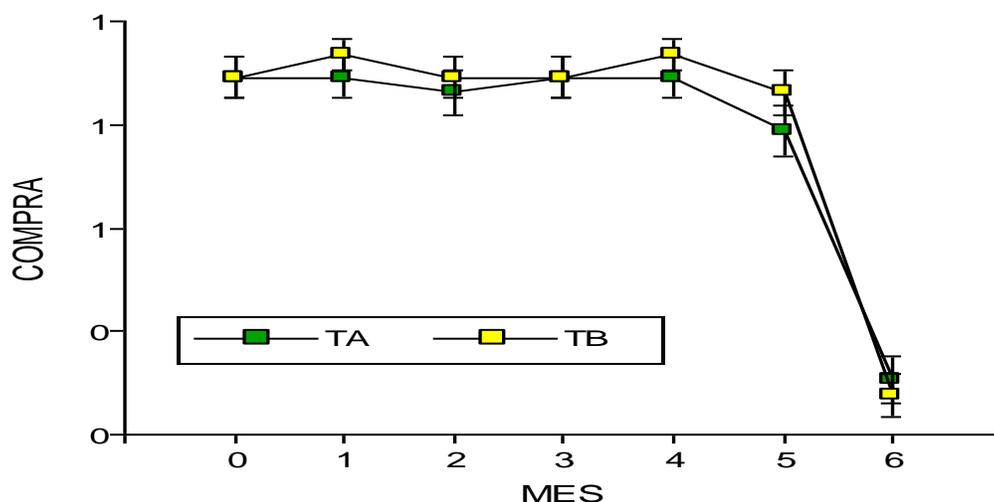


Figura 11. Promedios de compra del cremogenado a base de copozú con *L.casei* ATCC 393, para TA y TB durante el tiempo de almacenamiento.

**Escala de agrado.** No existe diferencia significativa en la escala de agrado según los tratamientos, es decir que los tratamientos (A y B) son iguales.

Existe en la escala de agrado me gusta mucho (4) diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre los meses 0,1, 2, 3, 4, y 5 con un promedio de 50,21% respecto al 0% en el último mes 6, esta disminución puede ser atribuida a los cambios físicoquímicos del producto a través del tiempo, evidenciada también con la disminución del PZ, desde el cuarto mes (Figura 12).

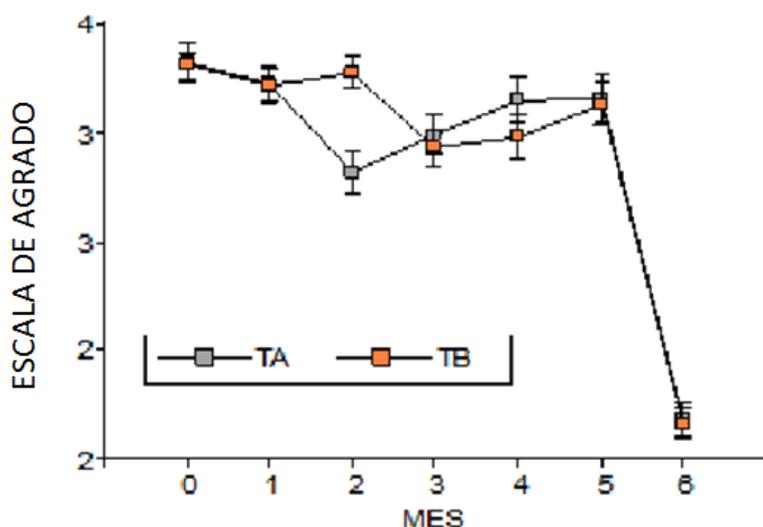


Figura 12. Análisis de escala de agrado del cremogenado a base de copoazú con *L.casei* ATCC 393, para TA y TB

Tabla 10. Frecuencias relativas por columnas (expresadas como porcentajes)

ESCALA AGRADO	F	M	TOTAL
1	6,97	6,35	6,667
2	14,61	13,71	14,18
3	40,00	31,73	36,11
4	38,43	48,22	43,03
TOTAL	100,00	100,00	100,00

**F: Femenino, M: Masculino**

En la relación de la escala de agrado según el género (masculino-femenino) se encuentra diferencia significativa ( $p < 0.05$ ), dónde el masculino dio mayor aceptación al producto (me gusta mucho) frente al género femenino.

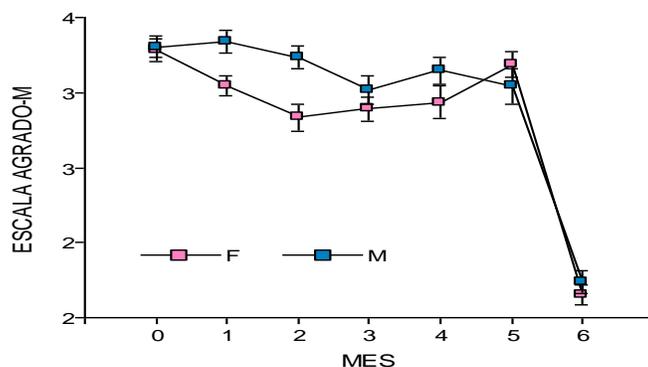


Figura 13. Análisis de escala de agrado con género, vs mes del almacenamiento.

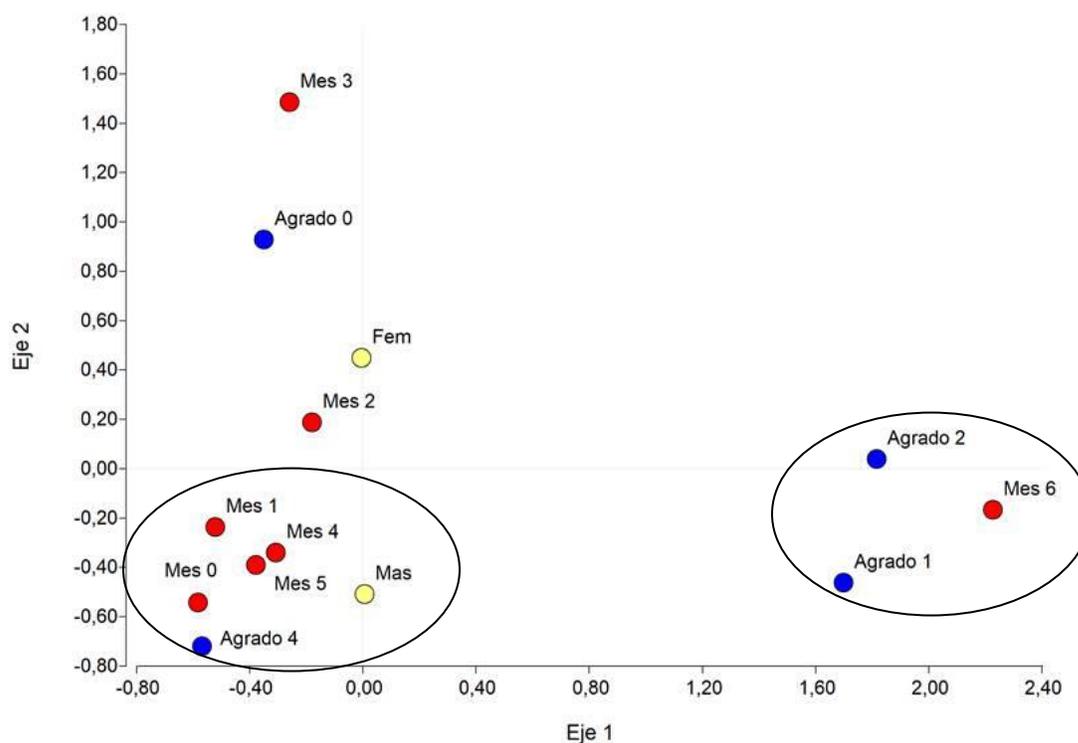


Figura 14. Análisis multivariado sensorial de los dos tratamientos TA y TB, entre mujeres (Fem), hombres (mas) y la escala de agrado durante el tiempo de almacenamiento 6 meses.

Para la evaluación del cremogenado se observaron ligeros cambios de pH desde el mes 0 hasta el 4 de almacenamiento, y no afectó la aceptación sensorial, igual sucedido en la investigación de Bruno (2019), con inserción de probiótico en una matriz láctea; igualmente se refleja en el deseo de compra, lo cual indica que no existe inferencia entre el análisis sensorial con los cambios de pH y acidez hasta el mes 4.

Acu *et al* (2020) mencionan un incremento en la viscosidad del helado de cabra con probiótico en 120 días de almacenamiento, este fenómeno puede deberse a la composición de carbohidratos que presenta el producto, lo cual hace que se realice una mayor absorción de agua y por ende se genera una mayor viscosidad, a su vez, la consistencia, estructura y olor se incrementó respecto al tiempo de almacenamiento (Quintana, *et al.*, 2016).

Las características sensoriales de un producto determinan la aceptabilidad de los consumidores, por tanto, la evaluación de sus propiedades son importantes en el desarrollo de nuevos productos alimentarios (Acu *et al.*, 2020).

Estudios de aceptación general realizados por Aguilar *et al* (2014) en cremogenado de granadilla indican que no hay diferencias significativas entre los tratamientos evaluados en los cuales se empleó diversas concentraciones de sacarosa y extracto de albedo con un porcentaje de pulpa del 63% aproximadamente.

Alvarenga *et al.* (2016) indican que la aceptación general de puré de copoazú empacado en latas de tinned no presentó diferencias significativas durante 240 días del almacenamiento con resultados que variaron entre “me gusta mucho y me gusta moderadamente”. En Brasil las exportaciones de copoazú crecieron en un 240% desde el año 2000-2010. La aceptabilidad sensorial y la intención de compra indican una correlación para el cremogenado evaluado, similar a lo publicado por Aparecida *et al.*, (2020).

Estudios realizados por Arancibia *et al.*, (2014) indican el efecto del contenido graso de la leche y agentes espesantes sobre las características reológicas y mecanismos de percepción sensorial de diversas formulaciones de postres y su textura para alcanzar una mejor calidad sensorial.

Es prudente iniciar estudios de diferentes formas de mantener el microorganismos con el objetivo de disminuir la relación o alteración por el metabolismo microbiano y para que el recuento del microorganismo benéfico para salud tenga mayor duración en el producto, por lo cual el conocimiento la estabilidad del microorganismos en el tiempo se pueden iniciar con procesos tradicionales para inclusión de estos en la matriz alimentaria estudiada.

## **CONCLUSIÓN**

Para el desarrollo de productos alimentarios es prominente la contaminación por operaciones como cortar, despulpar, lavar, siendo el agua el mayor transportador de microorganismo desde los utensilios hacia las materias primas, propiciando la formación de biopelículas, por lo que hace indispensable el control de calidad mediante el proceso de conteo de colonias, y microorganismos alterantes, el

protocolo de higiene y desinfección de la fruta, el despulpado y el manejo de la pulpa para la elaboración fue el adecuado según los datos arrojados de estabilidad microbiológica, fisicoquímica y sensorial.

A pesar que los procesos térmicos y los componentes de conservación hacen parte de la seguridad alimentaria, cada día avanzamos hacia la conservación por el manejo para generar productos más naturales; estos deben ser evaluados hasta el análisis sensorial para contemplar el mayor tiempo de vida útil sin ninguna incorporación adicional. El metabolismo del probiótico en el producto desarrollado, aumenta los ácidos orgánicos, los cuales afectan directamente las propiedades sensoriales del cremogenado, y las características de la matriz alimentaria, la pulpa de copoazú le aporta el medio adecuado para sobrevivir durante el tiempo de almacenamiento.

Se concluye que las variables independientes que más afecta la viabilidad de los microorganismos en general son la matriz alimentaria, en este caso el copoazú y la cantidad del inóculo. El recuento obtenido del probiótico durante el tiempo de almacenamiento se puede identificar el desarrollo del producto como un alimento funcional.

El microorganismo usado como probiótico, *L.casei* ATCC393, es un microorganismo con excelente comportamiento en la matriz vegetal, pulpa de copoazú ya que se mantiene estable durante el tiempo evaluado, la calidad microbiológica del producto desarrollado cremogenado con inserción de probiótico, evaluada mediante recuento de mesófilos, mohos y levaduras, recuento de *E.coli*, Listeria, Salmonella, *S.aureus*, se encontró dentro de las exigencias que establece la reglamentación sanitaria colombiana.

La evaluación del cremogenado durante el tiempo de almacenamiento presentó características óptimas para el consumidor en el tercer mes llegando al límite de aceptación sensorial entre 4 y 5 mes, sin denotar ningún tipo de riesgo microbiológico en el producto hasta el 6 mes.

Por último, la biopreservación definida como una tecnología de barrera que siendo combinada con métodos de temperatura como refrigeración o congelación y ligado a las buenas prácticas de manipulación de alimentos, puede ser una opción interesante para reducir la adición de preservantes químicos fortaleciendo las cadenas productivas generando alimentos seguros, preservados naturalmente.

## BIBLIOGRAFÍA

### CAPITULO IV

- Acu, M., Kinik, O., Yerlicaya, O. (2020) Probiotic viability, viscosity, hardness properties and sensorial quality of synbiotic ice creams produced from goat's milk. Food Science and Technology. DOI: <https://doi.org/10.1590/fst.39419>
- Adetuyi, F., Ibrahim, T. (2014). Effect of Fermentation Time on the Phenolic, Flavonoid and Vitamin C Contents and Antioxidant Activities of Okra (*Abelmoschus esculentus*) Seeds. Nigerian Food Journal. Vol 32(2): 128–137p. Doi:10.1016/s0189-7241(15)30128-4
- Aguilar, J., Espinoza, M., Cabanillas, J., Gómez, E., Valverde, J., Benavides, D. (2014). Effect of the concentration of albedo and sucrose in physicochemical, rheological properties and general acceptability in puree of granadilla (*Passiflora ligularis*). Agroindustrial Science, Vol 4:7-18p.
- Alvarenga, M., Rodrigues, R., Barbutti, J., Barbosa, M., Kunitake, M., Alvarenga, C. (2016). food-packaging interaction on the stability of canned sweetened cupuaçu (*theobroma grandiflorum* schum.) puree. Rev. Caatinga, Mossoró Vol 29, (4): 1006 – 1014p. <http://dx.doi.org/10.1590/1983-21252016v29n426rc>
- Aparecida, L., Machado, J., Aparecida, I., Oliveira, J., DaT., Freitas, E., Novello, D. (2020). Addition of chayote pell flour in cookie: physico-chemical characterization and sensory analysis among children. Res., Soc. Dev. Vol 9(1):e52911588. DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v9i1.1588>.
- Arancibia, C. (2014). Colour, rheology, flavour release and sensory perception of dairy desserts. Influence of thickener and fat content, LWT - Food Science and Technology. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2014.08.024>
- Bahamon, M. A., Parrado, L. X., Gutiérrez-Guzmán, N. (2018). ATR-FTIR for discrimination of espresso and American coffee pods, Coffee Science. Vol 13(4):550-558p. DOI: <http://dx.doi.org/10.25186/cs.v13i4.1499>
- Barros, H. R. de M. García-Villalba, R. Tomás-Barberán, F. A. y Genovese, M. I. (2016). Evaluation of the distribution and metabolism of polyphenols derived from cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) in mice gastrointestinal tract by UPLC-ESI-QTOF. Journal of Functional Foods, 22, 477–489. doi:10.1016/j.jff.2016.02.009
- Bedani, R., E. A. Rossi, and S. M. Isay Saad. 2013. Impact of inulin and okara on *Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium animalis* Bb-12 viability in a fermented soy product and probiotic survival under in vitro simulated gastrointestinal conditions. Food Microbiology 34: 382 – 389p. DOI: 10.1016 / j.fm.2013.01.012
- Bernal, C., Díaz, C., Gutiérrez, C. 2017. Probiotics and prebiotics in vegetable matrices: Advances in the development of fruit drinks. Rev Chil Nutr Vol. 44, N° 4. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182017000400383>.
- (Boe – A-1983-9198). Reglamentación técnico-sanitaria para la elaboración y venta de zumos de frutas y de otros vegetales y de sus derivados
- Breyman, V.J., Chaves, C., María Arias, L. (2013). Análisis de la calidad microbiológica y potencial presencia de *Listeria monocytogenes* en pulpas de

- guanábana (*Annona muricata*), mango (*Mangifera indica*) y maracuya (*Passiflora edulis*) *Costarricensis*. Archivos Latinoamericanos de nutrición. Órgano Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición. Vol. 63 (1): 53- 57p.
- Bruno, L., Ribeiro, J., Nédio, J., Wurlitzer, W., Rodrigues, T. (2020). Non-dairy cashew nut milk as a matrix to deliver probiotic bacteria. Food Science and Technology. Food Sci. Technol, Campinas. Vol 40 (3): 604-607p, DOI: Dhttps://doi.org/10.1590/fst.14219
  - Castagnini, J. Estudio del proceso de obtención de zumo de arándanos y su utilización como ingrediente para la obtención de un alimento funcional por impregnación a vacío. (2014). Univesidad Politécnica de Valencia. Tesis doctoral. 201p.
  - Castillo, V., Fernandez, S., Cueto, M., Ramos, G. 2019. Criterios y estrategias tecnológicas para la incorporación y supervivencia de probióticos en frutas, cereales y sus derivados. Rev.Esp.Cienc.Quím.Biol. TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas. Vol 22: 1-17p. DOI: 10.22201/fesz.23958723e.2019.0.173
  - Castorena-García, JH., Rojas-López, M., Delgado-Macuil, R., Robles de la Torre, RR. (2011). Análisis de Pulpa y Aceite de Aguacate con Espectroscopia Infrarroja. Conciencia Tecnológica No. 42: 5 – 10p.
  - Cholassery, S., Krishna, V., Sethuraj, SV., Rehina, SS., Ranganathan, V., Dileep, LC., Sabu, KR., Rajesh, BR., Chandran, RP. (2019). Analysis of physicochemical and sensory parameters of wine produced from *Carica papaya*. Journal of Applied . Biology & Biotechnology. Vol 7 (05) 74 – 78p.
  - Coimbra, MA., Alves, FG., Barros, AS., Delgadillo, C. (2002). Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Chemometric Analysis of White Wine Polysaccharide Extracts. J. Agric. Food Chem. Vol 50: 3405 – 3411p.
  - Colombia productiva. (2019). Programa de transformación productiva – PTP, X Congreso Nacional Hortofrutícola. Mincomercio.
  - Costa, M.P., Frasao, B., Silva, A., Freitas, M., Franco, R., Conte-Junior, C. (2015). Cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) pulp, probiotic, and prebiotic: Influence on color, apparent viscosity, and texture of goat milk yogurts. Journal of Dairy Science Vol 98 (9): 5995- 6003p. [http://dx.doi.org/ 10.3168/jds.2015-9738](http://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-9738).
  - Curimbaba T., Almeida-Junior L., Chagas A., Quaglio A.E.V., Herculano A., Di Stasi L. (2020). Prebiotic, antioxidant and anti-inflammatory properties of edible Amazon fruits, Food Bioscience. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100599>.
  - Contreras-Lozano., K.P., Ciro-Velásquez, H.J., Arango-Tobón, J. Hidrocoloides como estabilizantes en bebidas de maíz dulce (*Zea mays var. saccharata*) y gel de aloe vera (*Aloe barbadensis Miller*). Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient. Vol 22(2): e1090p. Doi.org/10.31910/rudca.v22.n2.2019.1090
  - Costa, M.P., Frasao, B., Silva, A., Freitas, M., Franco, R., Conte-Junior, C. (2015). Cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) pulp, probiotic, and prebiotic: Influence on color, apparent viscosity, and texture of goat milk yogurts. Journal of Dairy Science Vol 98 (9): 5995- 6003. [http://dx.doi.org/ 10.3168/jds.2015-9738](http://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-9738).
  - Curo, J.J., Ybañez, S.M. (2017). Parámetros óptimos para la obtención de un néctar de copoazú (*Theobroma grandiflorum*) y maracuya (*Passiflora edulis*) y su estudio a nivel de pre-factibilidad. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Farmacio y Bioquímica. E. A.P. de Ciencia de los Alimentos. 131p.

- Dae-Ok, K., Seung, W. J., Chang Y.L. (2003) Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. Food Chemistry. Vol 81, 321-326p. doi: 10.1016/S0308-8146(02)00423-5
- De Alvarenga, M., Rodrigues, R., Aparecida, Barbosa, M., Tomie, M., Kunitake, De Alvarenga, C. (2016). Food-packaging interaction on the stability of canned sweetened cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum.) PUREE. Rev. Caatinga, Mossoró. Vol. 29 (4): 1006- 1014p. <http://dx.doi.org/10.1590/1983-21252016v29n426rc>
- De Paula, C., García, C., Durango, A. (2014). Valor de la Marca en la Aceptación Sensorial de Consumidores en Cuatro Tipos de Pan Tajado Blanco. Información tecnológica. Vol. 25 (1): 127-132p. Doi.org/10.4067/S071807642014000100013
- Dharmasena, M. (2012). Assessment of viability of probiotic bacteria in non dairy food matrices under refrigeration storage. Follow this and additional works at: [https://tigerprints.clemson.edu/all\\_theses](https://tigerprints.clemson.edu/all_theses) Part of the Food Science Commons
- De Oliveira, T., Maria Inés Genovese. 2019. Chemical composition of cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) and cocoa (*Theobroma cacao*) liquors and their effects on streptozotocin-induced diabetic rats. Food Research International 51, 929-935. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2013.02.019>.
- Dudonné, S., Vitrac, X., Coutière, P., Woillez, M., Mérillon, J. M. (2009). Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol 57(5), 1768–1774p. Doi:10.1021/jf803011r
- Draman, SFS., Daik, R., Mohd, N. (2016). Eco-friendly extraction and characterization of cellulose from lignocellulosoic fiber. ARPN Journal of Engineering and Applied Sciences. Vol 11 (16): 9591 – 9595p.
- Espirito Santo, A. P., P. Perego, A. Converti, and M. N. Oliveira. (2012). Influence of milk type and addition of passion fruit peel poder on fermentation kinetics, texture profile and bacterial viability in probiotic yoghurts. LWT Food Sci. Technol. (Campinas.) 47:393–399. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2012.01.038>.
- Fantinelli, J., Cuéllar, L., González, L., Ciocci, A., Galeano, P., Schinella, P., Mosca, G. (2017). Acute treatment with copoazú fermented extract ameliorates myocardial ischemia-reperfusion injury via eNOS activation. Journal of Functional Foods. Vol 34: 470–477p. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2017.05.010> 1756-4646/2017 Elsevier Ltd. All rights reserved
- Ferrel, J., Mamani, P. (2014). Evaluación de la capacidad antioxidante del copoazú (*Theobroma grandiflorum*) y ungurahú (*Oenocarpus bataua*) en el proceso de la elaboración del néctar. Universidad Nacional Amazonica madre de Dios. Puerto Maldonado, Peru.
- Ginzberg, I., Tokuhisa, J., Veilleux, RE. (2009). Glicoalcaloides esteroides de papa: biosíntesis y manipulación genética. Potato Res. Vol 52, 1-15p. <https://doi.org/10.1007/s11540-008-9103-4>
- Hernández, C. (2010). Determinación del momento óptimo de cosecha de copoazú (*Theobroma grandiflorum* widd ex spreng schum) en la amazonia occidental colombiana. [Tesis Magíster en Ciencias Biología, Área de énfasis Biodiversidad y Conservación]. Colombia: Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. 84p

- Hernández, C; Hernández, MS. (2012). Growth and development of the cupuaçu fruit (*Theobroma grandiflorum* [Willd. Ex Spreng.] Schum.) in the western colombian Amazon. Agron. Colomb. Vol 30 (1): 95-102p
- Hui, Y., Handbook of food science, technology, and engineering. 2006. En H. S. Flanagan, Sensory Science: Measuring Consumer Acceptance, CRC Press. (26): 1-23.
- Izaza Y., Restrepo, D., López, J.H., Ochoa O.A. & Cabrera K. (2011). Evolution of the antioxidant capacity of frankfurter sausage model systems with added cherry extract (*prunus avium* l.) during refrigerated storage. Vitae. Revista de la facultad de química farmacéutica. Vol 8 (3): 251-260p.
- Jiménez, G., Arias, M. 2003. Caracterización microbiológica de la pulpa de piña para su pasteurización y uso industrial. Universidad de Costa Rica. Departamento de Microbiología de aguas y alimentos. Universidad de Costa Rica. <http://repositorio.sibdi.ucr.ac.cr:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/1033/22675.pdf?sequence=1>
- Jurado, H., Zambrano, E., Chávez, C. 2020. Efecto del suministro in vivo de *Lactobacillus casei* en la alimentación de *Cavia porcellus*. Revista Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial. Vol 18 (2): 156-165p. DOI:[http://dx.doi.org/10.18684/BSAA\(18\)156-165](http://dx.doi.org/10.18684/BSAA(18)156-165)
- Koubaa, M., Ktata, A., Barba, F.J., Grimi, N., Mhemdi, H., Bouaziz, F., Driss, D, Chaabouni, SE. (2015) Water-soluble polysaccharides from *Opuntia stricta* Haw. fruit peels: recovery, identification and evaluation of their antioxidant activities. Int. Agrophys. Vol 29, 299 – 306p.
- Marín, Z., Cortes, M., Montoya, O., Arango, J. (2019). Viability of *Lactobacillus casei* ATCC 393 and properties in Andean blackberry suspensions with probiotic and prebiotic characteristics. Revista DYNA. Vol 86 (210): 179-186p. DOI: <http://doi.org/10.15446/dyna.v86n210.72929>
- Melanie, H., Susilowati, A., Iskandar, YM., Lotulung, PD., Andayani, DGS. (2015). Characterization of inulin from local red dhalia (*Dhalia* sp L) tubers by infrared spectroscopy. Procedia chemistry. Vol 16: 78-84p.
- Mendoza, A., Arteaga, M., Pérez, O. (2017). Degradación de la vitamina C en un producto de mango (*Mangifera indica* L.) y lactosuero. Corpoica Cienc Tecnol Agropecuria. Vol 18(1):125-137p. DOI: [http://dx.doi.org/10.21930/rcta.vol18\\_num1\\_art:563](http://dx.doi.org/10.21930/rcta.vol18_num1_art:563)
- Michalczyk, M., Macura, R. (2010). Effect of Processing and Storage on The Antioxidant Activity of Frozen and Pasteurized Shadblow Serviceberry (*Amelanchier canadensis*). International Journal of Food Properties. Vol 13(6): 1225–1233p. Doi:10.1080/10942910903013407
- Mirhosseini, H., Ping, CH., Hamid, N., Yusof, S. (2008). Effect of Arabic gum, xanthan gum and orange oil contents on  $\zeta$ -potential, conductivity, stability, size index and pH of orange beverage emulsion. Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects. Vol 315: 47–56p. Doi:10.1016/j.colsurfa.2007.07.007
- Ministerio de Salud y protección Social. (2013). Resolución 003929 del 2013. Requisitos sanitarios que deben cumplir las frutas y bebidas con adición de jugo (zumo) o pulpa de fruta o concentrados de fruta, clarificados o no, o la mezcla de éstos que se procesen, empaquen, transporte, importen y comercialicen.

- Mondragón, PC. (2017). Espectroscopia de infrarrojo para todos y 51 espectros de alimentos consumidos en México. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A. C. Primera edición. 187 p.
- Morales, A., Vivas, Y. (2015). Evaluación de la actividad antioxidante de una bebida refrescante a base de lactosuero adicionada con pulpa de curuba (*Passiflora Mollissima Bailey*), durante su almacenamiento. [https://ciencia.lasalle.edu.co/ing\\_alimentos/12](https://ciencia.lasalle.edu.co/ing_alimentos/12)
- Muñoz, W., Chávez, W., Pabón, L., Rendón, F., Chaparro, M., Otálvaro, A. (2015). Extracción de compuestos fenólicos con actividad antioxidante a partir de Champa. (*Campomanesia lineatifolia*). Revista CENIC. Ciencias Químicas. Vol 46: 38-46p.
- Mortuza, MG., Talukder, SU., Haque, MR. (2014). Biochemical Changes in Jackfruit Pulp as Affected by Cold Temperature. J. Environ. Sci. & Natural Resources. Vol 7(2): 93-97p.
- Nováková, L., Solichová, D., Pavlovičová, S., Solich, P. (2008). Hydrophilic interaction liquid chromatography method for the determination of ascorbic acid. Journal of Separation Science. Vol 31(9), 1634–1644p. Doi:10.1002/jssc.200700570
- Nunes, G., Lima, M., Kelly, V., Crispin, A., Lima, L., Hunaldo, L., Alves, M., Ribamar, J., Roberto, P. (2019). Influence of the Use of Sucralose in Cupuassu Candy Preparation. Journal of Food and Nutrition Research. Vol. 7 (9): 674-678p. Doi: 10.12691/jfnr-7-9-9.
- Pereira, A.; Abreu, V.; Rodrigues, S. 2018. Cupuassu—*Theobroma grandiflorum*. Exotic Fruits Reference Guide.pp 159.162. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-803138-4.00021-6>
- Quintana, L., Gómez, S., García, A., Martínez, N. (2016). Conformación de un panel de jueces en entrenamiento para el análisis sensorial de licores de cacao obtenidos de diferentes modelos de siembra. Scielo Revista entramado Vol. 12 No. 2. <http://dx.doi.org/10.18041/entramado>.
- Quintana, SE., Marsiglia, RM., Machacon, D., Torregroza, E., García-Zapateiro, LA. (2018). Chemical Composition and Physicochemical Properties of Squash (*Cucurbita moschata*) Cultivated in Bolivar Department (Colombia). Contemporary Engineering Sciences. Vol 11, (21):1003 – 1012p.
- Santiago-Adame, R., Medina-Torres, L., Gallegos-Infante, JA., Calderas, F., González-Laredo, RF., Rocha-Guzmán, NE., Ochoa-Martínez, LA., Bernad-Bernad, MJ. (2015). Spray drying-microencapsulation of cinnamon infusions (*Cinnamomum zeylanicum*) with maltodextrin. LWT - Food Science and Technology. Vol 64 (2): 571-57p.
- Shah, P., Modi H. A. (2015). Comparative study of DPPH, ABTS and FRAP Assays for determination of antioxidant activity. International Journal for research in applied science & engineering technology. Vol 3 (VI): 633-641p.
- Obando, M., Brito, C., Schöbitz, R., Báez, L., Horzella, M. (2010). Viabilidad de los microorganismos probióticos *Lactobacillus casei* 01, *Lactobacillus acidophilus* La-5, *Bifidobacterium* BB12 durante el almacenamiento de queso cottagevitae, revista de la facultad de química farmacéutica. Vol 17 (2): 141- 148p.
- Pauter, P., Róžańska, M., Wiza, P., Dworzak, S., Grobelna, N. Sarbak, P. (2018). Effects of the replacement of wheat flour with cricket powder on the characteristics of muffins. (2018). Acta Sci. Pol. Technol. Aliment. Vol17 (3): 227–233p. Doi.org/10.17306/J.AFS.2018.0570

- Peña, F., Cortez-Rodriguez, M., Gil-Gonzales, J. H. (2015). Uchuva mínimamente procesada impregnada al vacío con calcio y vitaminas B<sub>9</sub>, D y E. *Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial*. Vol 13 (1), 110-119p.
- Páez, G., Freay, J., Moreno, M., Marmol, Z., Araujo, k., Rincón, M. (2007) Cinética de la degradación del ácido ascórbico en jugo de parchita. Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela. Apartado 526. Maracaibo 1001-A
- Păucean, A., Vodnar, DC., Mureșan, V., Fetea, F., Ranga, F., Man, SM., Muste, S., Socaciu, C. (2017). Monitoring lactic acid concentrations by infrared spectroscopy: a new developed method for lactobacillus fermenting media with potential food applications. *Acta Alimentaria*. DOI: 10.1556/066.2017.0003
- Patel, B., Tandel, YN., Patel, AH., Patel, BL. (2016). Chilling injury in tropical and subtropical fruits: a cold storage problem and its remedies: a review. *International Journal of Science, Environment and Technology*. Vol 5 (4): 1882 – 1887p.
- Pimentel, R.M., Aparecida, E., Marques, L., Ribeiro, F., Fernandes de Carvalho, A., Stringheta, P. (2017). Physicochemical and microbiological characterization and antioxidant capacity of açai pulps marketed in the states of Minas Gerais and Pará, Brazil. *Revista Ciência Rural, Santa Maria. Food technology*. Vol 47 (1): 1- 6.
- Quintana, L., Gómez, S., García, A., Martínez, N. (2016). Conformación de un panel de jueces en entrenamiento para el análisis sensorial de licores de cacao obtenidos de diferentes modelos de siembra. *SciELO Revista entramado* Vol. 12 No. 2. <http://dx.doi.org/10.18041/entramado>.
- Raga, J., Ettiene, G., Pérez, E., Sandoval, L., Casas, J. (2014) efecto de las condiciones de almacenamiento sobre la capacidad antioxidante del mesocarpio homogeneizado y troceado de lechosa (carica papaya l.) *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*. Vol 15 ( 2): 135-144p
- Ramírez-Navas, J.S., Murcia, C. L., Castro, V. (2014). Analysis of acceptance and preference of manjar blanco del valle. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. Vol 12 (1): 20-27p
- Ramos, S., Salazar, M., Nascimento, L. (2019). Influence of pulp on the microbial diversity during cupuassu fermentation, *International Journal of Food Microbiology* <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108465>
- Ramos- Cassellis, ME., Sánchez-Pardo, ME., Rojas-López, M., Mora-Escobedo, R. (2014). Structural, physicochemical and functional properties of industrial residues of pineapple (*Ananas comosus*). *Cellulose Chem. Technol*. Vol 48 (7-8): 633 – 641p.
- Reuter, H., Gensel, J., Elvert, M., Zak, D. (2020). Evidence for preferential protein depolymerization in wetland soils in response to external nitrogen availability provided by a novel FTIR routine. *Biogeosciences*. Vol 17: 499–514p.
- Revelo, D., Díaz, O., Hernández, M., Gutiérrez-Bravo, R., Fernández-Trujillo, J.P. (2016). Obtención de jugo clarificado de copoazú (*Theobroma grandiflorum*) por microfiltración tangencial a escala de laboratorio. *Agronomía Colombiana Suplemento* Vol. 1, S310-S313p. DOI: 10.15446/agron.colomb.sup.2016n1.58612
- Rodríguez, F., Pedreschia, R., Fuentealba, C., Kartzowa, A., Olaeta, J., Alvaroa, J. (2019). The increase in electrical conductivity of nutrient solution enhances compositional and sensory properties of tomato fruit cv. Patrón. *Scientia Horticulturae* 244: 388–398p
- Rodríguez, M., Rojas, M., Elez-Martínez, P., Martín-Belloso, O. (2014). In vitro bioaccessibility of health-related compounds as affected by the formulation of fruit

- juice- and milk-based beverages. Food Research International. Vol 62: 771–778p. Doi: [dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2014.04.037](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.04.037).
- Roncancio Sánchez, A. (2018). Ventajas competitivas de los alimentos funcionales en el marco internacional y nacional. Boletín Semillas Ambientales. Vol 12(1), 113-220p. Recuperado a partir de <https://revistas.udistrital.edu.co/ojs/index.php/bsa/article/view/12872>
  - Saavedra, G., Rodríguez, I., Torres, P. (2014). Potencial industrial de la pulpa de Pouteria sapota para la preparación de nectar de calidad Industrial potential of Pouteria sapota pulp for preparing quality nectar. En: REBIOL. Revista Científica de la Facultad de Ciencias Biológicas. Julio - Diciembre. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú. 34 (2): 5-12p.
  - Sánchez, E., Heredia J., Buitrago, S., Medina, J. (2020). Aislamiento e identificación de microorganismos potencialmente amilolíticos y celulolíticos de suelos de humedales de Bogotá. Rev. Colomb. Biotecnol. Vol. XXII No. 1 Enero - Junio 2020, 36 – 44. DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v22n1.71278
  - Sánchez, N., Sepulveda, J., Rojano, B. (2013). Desarrollo de una bebida láctea con extracto de curuba (*Passiflora mollissima Bailey*) Como antioxidante natural. Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial. Vol 11 (1): 164-173p.
  - Sánchez-Chávez, W., Cortez-Arredondo, J., Solano-Cornejo, M. & Vidaurre-Ruiz, J. (2015) Cinética de degradación térmica de betacianinas, betaxantinas y vitamina C en una bebida a base de jugo de remolacha (*Bet vulgaris L.*) y miel de abeja. Scientia Agropecuaria. Vol. 6 (2): 111-118p. DOI: 10.17268/sci.agropecu.2015.02.03
  - Santander, M., Osorio, O., Mejia-España, D. (2017). Evaluación de propiedades antioxidantes y fisicoquímicas de una bebida mixta durante almacenamiento refrigerado. Rev. Cienc. Agr. Vol 34 (1): 84-97. doi: <http://dx.doi.org/10.22267/rcia.173401.65>.
  - Schmidt, S. J.; Lee, W. J. Comparison between water vapor sorption isotherms obtained using the new dynamic dewpoint isotherm method and those obtained using the standard saturated salt slurry method. (2012). International Journal of Food Properties 15, 236-248p. DOI: 10.1080/10942911003778014
  - Tecse, R. (2017) Efecto del procesamiento de pulpa de copoazú (*Theobroma grandiflorum*) enlatada, sobre la retención de vitamina c (ácido ascórbico) universidad nacional amazónica de madre de dios. Puerto Maldonado
  - Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K. Cisneros-Zevallos, L., Hawkins Byrne, D. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. Journal of Food Composition and Analysis. Vol 19(6-7): 669–675. Doi:10.1016/j.jfca.2006.01.003
  - Vallejo, P., Hernández, M. S., Lares, M., Herrera, A., Fernández, J. (2017). Nutraceutical potential of fruit bars obtained from asaí (*Euterpe precatoria*) and copoazú (*Theobroma grandiflorum*). Acta Hort. 1178. ISHS. DOI 10.17660/ActaHortic.2017.1178.24
  - Vriesmann, L., Silveira, J., De Oliveira, C.L., Petkowicz, C. (2010). Rheological behavior of a pectic fraction from the pulp of cupuassu (*Theobroma grandiflorum*). En: Carbohydrate Polymers. Vol 79: 312–317p.
  - Vriesmann, L., De Oliveira, C.L., Petkowicz, C. (2009). Polysaccharides from the pulp of cupuassu (*Theobroma grandiflorum*): Structural characterization of a pectic

fraction. Carbohydrate Polymers. Vol 77: 72–79p.  
doi:10.1016/j.carbpol.2008.12.007

- Şanlıdere Aloğlu, H., Öner, Z. (2011). Determination of antioxidant activity of bioactive peptide fractions obtained from yogurt. *Journal of Dairy Science*. Vol 94(11): 5305–5314p. Doi:10.3168/jds.2011-4285
- Serna, CL., Torres, VLS., Ayala, AA. (2013). Physical, chemical and sensory changes of refrigerated yellow pitahaya treated preharvest with 1-MCP. *Dyna No. 178*: 11-20p.
- Thanajiruschaya, P., Doksaku, W., Rattanachaisit, P., & Kongkiattikajorn, J. (2010). Effect of storage time and temperature on antioxidant components and properties of milled rice. *KKU Res J*, 15(9):843-851p.
- Won-Young, C., Su-Jung, Y., Go-Eun H., Ji-Han, K., Tsend-Ayush, C., Chi-Ho L. (2017) Antioxidant Activity and Quality Characteristics of Yogurt Added Green Olive Powder during Storage. *Korean J Food Sci Anim Resour*. Vol 37(6): 865–872
- Xu, P., Chen, L., Wang, Y. (2019). Effect of storage time on antioxidant activity and inhibition on  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase of white tea. *Food Science & Nutrition*. Vol 7(2): 636–644p. DOI: 10.1002 / fsn3.899
- Zapata, M., Ramos, A., Alzate A., Rojano, B., Maldonado E. (2019) Behavior of bioactive compounds and antioxidant activity of mango (Azucar cultivar) juice during storage at 4 °C. *Rev. facultada nacional de agronomía*. Vol 72(1): 8743-8750p. Doi: 10.15446/rfnam.v72n1.72628

## ANEXO 1

### Formato de toma de datos análisis sensorial

B. ¿Le gustaría participar en una actividad sensorial de un productos de cremogenado, elaborado en el programa de Ingeniería de Alimentos de la Universidad de la Amazonia?.

Nota: Se seguirá con consumidores que mostraron disponibilidad para dicha evaluación de los tres productos.

1. Edad: \_\_\_\_\_ ocupación: \_\_\_\_\_  
Tiene alguna enfermedad considerable: \_\_\_\_\_
2. Instrucciones: Indique con una X su aceptación al probar cada muestra de cremogenado de copoazu.

<b>CODIGO DE MUESTRA: 450</b>	
La muestra que acaba de probar	
La acepta	
La rechaza	

<b>CODIGO DE MUESTRA: 450</b>	
La muestra que acaba de probar	
¿Le gusta mucho?	
¿Le gusta un poco?	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ni gusta ni le disgusta</li> </ul>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• ¿Le molesta?</li> </ul>	
¿Compraría el producto?	SI      NO