

DISEÑO DE UNA PULPA FUNCIONAL DE FRUTAS Y HORTALIZAS CON
PROPIEDADES ANTIOXIDANTES Y PROBIÓTICAS

JAVIER ALEXANDER MANCERA APOLINAR

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE BOGOTÁ
FACULTAD DE INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y AMBIENTAL
MAESTRÍA EN INGENIERÍA QUÍMICA
BOGOTÁ, D.C.
2010

DISEÑO DE UNA PULPA FUNCIONAL DE FRUTAS Y HORTALIZAS CON
PROPIEDADES ANTIOXIDANTES Y PROBIÓTICAS

JAVIER ALEXANDER MANCERA APOLINAR

Tesis para optar al título de M.Sc. en Ingeniería Química
Área de Bioprocesos

Directora
MARTHA CECILIA QUICAZÁN
Ingeniera Química, M.Sc.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE BOGOTÁ
FACULTAD DE INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y AMBIENTAL
MAESTRÍA EN INGENIERÍA QUÍMICA
BOGOTÁ, D.C.
2010

Nota de aceptación

Ing. M.Sc. Martha C. Quicazán
Directora del proyecto

Ing. M.Sc. Néstor Algecira
Firma del Jurado del trabajo

Ing. M. Sc María Eugenia Calderón
Firma del Jurado del trabajo

Bogotá, D.C., Julio de 2010

AGRADECIMIENTOS

El autor expresa sus agradecimientos a:

Ante todo al Ser más maravilloso, a DIOS, por contar siempre con Él en todo momento y brindarme la sabiduría y las fuerzas para la realización de esta tesis.

A mi Madre, por su muy especial amor, apoyo y cariño en cada uno de los proyectos de mi vida.

A mis amados hermanos Shewar, Sandra y Fredy por el solo hecho de ser mis hermanos, a mis tesoritos: Alanis, Mélani, Mariana, Oscar Julián, Daniel y Gabriel, y a mis cuñados Maritza, Oscar y Ángela.

A la profesora Martha Quicazán, por su dirección y sabios consejos en la ejecución de este proyecto, además de ser una excelente profesora educando, corrigiendo y apoyando a sus estudiantes.

A la empresa de Alimentos SAS por brindar su apoyo en el desarrollo de esta tesis

A todo el personal del ICTA: El profesor Carlos Novoa, la profesora Martha Holguín, la profesora Consuelo Días, Carlos Fuenmayor, Carlos Zuluaga, Margarita, Natalia, Mónica, Carito, Diego, Juliana, Luisa, Josecito, Álvaro, Edwin, Clara Nidia, Elihú, Salomón, Yeimy, Camilo, Gregorio, Jairo, Martha F y Susana.

Finalmente agradezco a la Universidad Nacional de Colombia, al Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos ICTA, a la Facultad de Ingeniería y el Departamento de Ingeniería Química y Ambiental y a la División de Investigación de la sede Bogotá DIB, por contribuir con parte de la financiación para la realización de esta tesis.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCION.....	1
OBJETIVOS.....	3
1. MARCO REFERENCIAL.....	4
1.1 ALIMENTOS FUNCIONALES.....	4
1.1.1 Panorama de los alimentos funcionales	5
1.1.2 Tipos de alimentos funcionales	6
1.1.3 Frutas y hortalizas como alimento funcional	8
1.1.3.1 Componentes funcionales de las frutas y hortalizas.....	9
1.1.4 Mercado nacional de las frutas y hortalizas	12
1.2 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	13
1.2.1 Mecanismos de reacción de los antioxidantes.....	14
1.2.2 Frutas y hortalizas como fuente de antioxidantes naturales.....	15
1.2.2.1 Fibra dietaria, minerales y enzimas antioxidantes	16
1.2.2.2 Fitoquímicos	17
1.2.3 Métodos de determinación de actividad antioxidante	25
1.2.4 Influencia del procesado sobre la actividad antioxidante	29
1.2.5 Perspectivas de los antioxidantes.....	37
1.3 BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS	37
1.3.1 Microorganismos probióticos	38
1.3.2 Especie <i>Lactobacillus acidophilus</i>	39
1.3.3 El mercado de los microorganismos probióticos	41
1.3.4 Microorganismos probióticos en productos no lácteos sin fermentación.....	41
1.4 PROCESAMIENTO INDUSTRIAL DE FRUTAS Y HORTALIZAS	44
1.4.1 Pulpa de Fruta.....	46
1.4.1.1 Higiene y sanidad en la planta	47
1.4.1.2 Recepción.....	48
1.4.1.3 Pesado.....	48
1.4.1.4 Selección	48
1.4.1.5 Clasificación	49
1.4.1.6 Limpieza y lavado.....	49
1.4.1.7 Desinfección.....	49
1.4.1.8 Enjuague.....	50
1.4.1.9 Pelado.....	51
1.4.1.10 Separación	51
1.4.1.11 Corte.....	52
1.4.1.12 Escaldado (Blanqueo).....	52
1.4.1.13 Molido	52
1.4.1.14 Macerado.....	53
1.4.1.15 Despulpado.....	53
1.4.1.16 Refinado	55
1.4.1.17 Homogeneizado	55
1.4.1.18 Desaireado.....	55
1.4.1.19 Pasterización	56
1.4.1.20 Control de calidad	57
1.4.1.21 Empacado	58

1.4.1.22 Congelación	58
2. METODOLOGIA	60
2.1 MATERIAS PRIMAS	60
2.1.1 Pulpas de Frutas	60
2.1.2 Hortalizas	60
2.1.3 Cultivo Láctico	60
2.2 MÉTODOS DE EVALUACIÓN FÍSICOQUÍMICA	61
2.2.1 Determinación de pH y acidez libre titulable	61
2.2.2 Determinación de la capacidad antioxidante por DPPH	61
2.2.3 Determinación de la capacidad antioxidante por ABTS	62
2.2.4 Determinación de los °Brix	62
2.3 MÉTODOS DE ANÁLISIS PARA EVALUAR LA CALIDAD HIGIÉNICA DE LAS PULPAS	63
2.3.1 Dilución y homogeneización de la muestra	63
2.3.2 Recuento en placa de microorganismos mesófilos aerobios	63
2.3.3 Recuento en placa de mohos y levaduras	63
2.3.4 NMP de coliformes totales y ausencia / presencia de <i>E. coli</i>	64
2.3.5 Recuento de esporas <i>Clostridium</i> sulfito reductor	64
2.4 RECUENTO EN PLACA DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS VIABLES (BAL)	65
2.5 METODOS DE ANÁLISIS SENSORIAL	66
2.6 EXPERIMENTACIÓN	66
2.6.1 Selección de dos pulpas de fruta y preselección de hortalizas	67
2.6.1.1 Selección de dos pulpas de fruta	67
2.6.1.2 Preselección de las hortalizas	69
2.6.2 Obtención de la pulpa de hortaliza	69
2.6.3 Selección de la pulpa de hortaliza	70
2.6.4 Determinación de las proporciones de pulpa de fruta y hortaliza en las diferentes mezclas	73
2.6.5 Selección de una pulpa de mezcla entre las diferentes mezclas obtenidas	73
2.6.6 Adición del probiótico a la pulpa de mezcla y a las dos pulpas de fruta seleccionadas y su seguimiento durante el tiempo de almacenamiento	75
2.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS	76
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	77
3.1 SELECCIÓN DE DOS PULPAS DE FRUTA Y PRESELECCION DE HORTALIZAS	77
3.1.1 Selección de dos pulpas de fruta	77
3.1.2 Preselección de la hortaliza	80
3.2 OBTENCIÓN DE LA PULPA DE HORTALIZA	81
3.3 SELECCIÓN DE LA PULPA DE HORTALIZA	85
3.3.1 Determinación de la capacidad antioxidante de las pulpas de hortalizas:	85
3.3.2 Mezclas pulpa de fruta y hortaliza	86
3.4 DETERMINACIÓN DE LAS PROPORCIONES DE PULPA DE FRUTA Y HORTALIZA EN LAS DIFERENTES MEZCLAS	88
3.4.1 Análisis Sensorial	89
3.4.1.1 Sensorial prueba de afectividad pulpa de Manzana-Espinaca	89
3.4.1.2 Sensorial prueba de afectividad pulpa de Uva-Remolacha	90
3.4.1.3 Sensorial prueba de afectividad pulpa de Manzana-Remolacha	91
3.4.2 Determinación de la capacidad antioxidante de las mezclas	91
3.5 SELECCIÓN DE UNA PULPA DE MEZCLA ENTRE LAS DIFERENTES MEZCLAS OBTENIDAS	93
3.5.1 Determinación de la actividad antioxidante, acidez y pH	93

3.5.2 Análisis sensorial de las mezclas seleccionadas	93
3.6 ADICIÓN DEL PROBIÓTICO A LA PULPA DE MEZCLA Y A LAS DOS PULPAS DE FRUTA SELECCIONADAS Y SU SEGUIMIENTO DURANTE EL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO	95
3.6.1 Resultados pulpa uva-remolacha 70:30.....	95
3.6.2 Resultados pulpa de mango y mora	101
4. CONCLUSIONES	107
5. RECOMENDACIONES.....	110
6. BIBLIOGRAFIA.....	111
ANEXOS.....	126

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diferentes categorías de los fitoquímicos con propiedades antioxidantes (Watson & Preedy, 2010).....	17
Figura 2. Cambio en la actividad antioxidante de un alimento que contiene polifenoles por oxidación química y enzimática. La oxidación química se muestra a dos diferentes temperaturas $T_1 < T_2$. (Nicoli et al., 1999).....	33
Figura 3. Cambios en la actividad antioxidante y en la absorbancia de un sistema modelo glucosa-fructosa-ácido glutámico debido al desarrollo de diferentes etapas de la reacción de Maillard (a, b y c). Calentamiento a temperaturas $T_3 > T_2 > T_1$. (Nicoli et al., 1999).....	35
Figura 4. Cambios en la actividad antioxidante debido a diferentes y simultaneos eventos en una matriz vegetal sujeta a calentamiento. (Nicoli et al., 1999).....	36
Figura 5. Procesamiento industrial de frutas frescas (Ministerio de Agricultura, 2005).....	44
Figura 6. Operaciones generales en la obtención de pulpas (Camacho, 1992)	47
Figura 7. Etapas para la obtención de pulpa de acelga, espinaca y lechuga	82
Figura 8. Etapas para la obtención de la pulpa de ahuyama, remolacha y zanahoria.	84
Figura 9. Diagrama triangular de medición de aceptabilidad de la mezcla manzana con espinaca en cantidades del 50%, 30% y 10% de la hortaliza.	89
Figura 10. Diagrama triangular de medición de aceptabilidad de la mezcla uva con remolacha en cantidades del 50%, 30%, y 10% de la hortaliza.....	90
Figura 11. Diagrama triangular de medición de aceptabilidad de la mezcla manzana con remolacha en cantidades del 50%, 30%, y 10% de la hortaliza	91
Figura 12. Diagrama triangular de medición de aceptabilidad de las mezclas Uva-Remolacha 70:30, Manzana-Remolacha 90:10 y Manzana-Espinaca 90:10.....	94
Figura 13. Viabilidad del microorganismo probiótico <i>Lactobacillus acidophilus</i> para la mezcla Uva-Remolacha 70:30 a las diferentes concentraciones del microorganismo probiótico.....	101

Figura 14. Viabilidad del microorganismo probiótico *Lactobacillus acidophilus* (Log₁₀ ufc/g), para las pulpas de Mango y Mora a las diferentes concentraciones del microorganismo probiótico.106

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tipos de alimento funcional (Kotilainen et al., 2006).....	6
Tabla 2. Descripción de las características más importantes de los distintos métodos de medida de actividad antioxidante (Fernández et al., 2006).....	27
Tabla 3. Valores de actividad antioxidante equivalente a vitamina C (VCEAC) de pulpa de frutos aplicando el método ABTS y DPPH (media \pm DE, n =3) (Kuskoski et al., 2005).....	28
Tabla 4. Valores de ORAC y FRAP de algunos vegetales (Ou et al., 2002).....	29
Tabla 5. Número (log10), de microorganismos probióticos en JN (jugo de naranja pH 3.65) y JP (jugo de piña pH 3.40) por 12 semanas a 4°C (Sheehan et al., 2007)	43
Tabla 6. Criterios de selección de la pulpa de fruta	67
Tabla 7. Criterios de selección para la pulpa de hortaliza.....	71
Tabla 8. Criterios de selección por tipo de mezcla de pulpas	73
Tabla 9. Criterios de selección para la escogencia de la mezcla más adecuada ..	74
Tabla 10. Pulpas de frutas de la empresa SAS S.A. Características de las Pulpas de Fruta Cruda Congelada.	77
Tabla 11. Valores de los criterios evaluados de las 20 pulpas de fruta	78
Tabla 12. Puntajes asignados por criterio evaluado en las 20 pulpas de fruta	79
Tabla 13. Las 20 hortalizas principales producidas a nivel nacional en el año 2004 (Ministerio Agricultura, 2006)	80
Tabla 14. Resultados del control microbiológico de las pulpas de hortaliza	84
Tabla 15. Valor de DPPH y ABTS para las hortalizas preseleccionadas.....	85
Tabla 16. Grupos por compatibilidad en color de las 20 pulpas de fruta y 3 hortalizas seleccionadas.....	86
Tabla 17. Pulpas de frutas compatibles por color y con menor capacidad antioxidante para cada una de las pulpas de zanahoria, espinaca y remolacha ...	87
Tabla 18. Valores de los criterios de selección para la zanahoria, espinaca y remolacha.	87

Tabla 19. Puntaje asignado por criterio para las pulpas de zanahoria, espinaca y remolacha	87
Tabla 20. Valores de actividad antioxidante método DPPH para las mezclas Uva-Remolacha, Manzana-Remolacha y Manzana-Espinaca en las diferentes proporciones	92
Tabla 21. Puntajes por criterio de selección para las mezclas Uva-Remolacha, Manzana-Remolacha y Manzana-Espinaca en las diferentes proporciones.....	92
Tabla 22. Valores de actividad antioxidante, acidez y pH para las mezclas Uva-Remolacha 70:30, Manzana-Remolacha 90:10 y Manzana-Espinaca 90:10.....	93
Tabla 23. Puntaje por criterio de selección para las mezclas Uva-Remolacha 70:30, Manzana-Remolacha 90:10 y Manzana-Espinaca 90:10.....	95
Tabla 24. Resultado de los valores del recuento de BAL, DPPH, ABTS, pH, acidez y °brix para la mezcla Uva-Remolacha 70:30 sin y con dos concentraciones diferentes del microorganismo probiótico adicionado.	96
Tabla 25. Resultados de la evaluación sensorial para la mezcla Uva-Remolacha 70:30 entre las diferentes concentraciones del probiótico para el día 0	97
Tabla 26. Resultados de la evaluación sensorial para la mezcla Uva-Remolacha 70:30 entre las diferentes concentraciones del probiótico para el día 45	97
Tabla 27. Resultados de la evaluación sensorial para la mezcla Uva-Remolacha 70:30 entre las diferentes concentraciones del probiótico para el día 90	98
Tabla 28. Valores de las propiedades DPPH, ABTS, pH, acidez y °brix para las pulpas de Uva y Remolacha.	99
Tabla 29. Valores de las propiedades recuento de BAL, DPPH, ABTS, pH, acidez y °Brix para las pulpas de mango y mora a las concentraciones diferentes del microorganismo probiótico adicionado.....	102
Tabla 30. Resultados de la evaluación sensorial para las pulpas Mango y Mora a las diferentes concentraciones del probiótico para el día 0	103
Tabla 31. Resultados de la evaluación sensorial para las pulpas Mango y Mora a las diferentes concentraciones del probiótico para el día 45	103

Tabla 32. Resultados de la evaluación sensorial para las pulpas Mango y Mora a las diferentes concentraciones del probiótico para el día 90.	104
---	-----

LISTADO DE ANEXOS

Anexo 1. Ficha Técnica Cultivo Probiótico.....	1
Anexo 2. Norma Técnica Colombiana NTC 2681. Análisis Sensorial. Metodología. Prueba Triangular	3
Anexo 3. Formatos del panel sensorial para la prueba de afectividad y prueba triangular.....	4
Anexo 4. Tratamiento Estadístico	7

INTRODUCCION

Debido al creciente interés a nivel mundial en el desarrollo de los alimentos funcionales, alimentos que ayudan a prevenir enfermedades y a mejorar el estado de salud, y a una iniciativa por aumentar el consumo y darle valor agregado a las frutas y hortalizas en Colombia, apoyando de esta forma con el programa internacional "Cinco al día" que consiste en la ración mínima de consumo diario de FRUTAS Y HORTALIZAS recomendada por la comunidad científica y médica en una dieta saludable, y teniendo en cuenta la importancia del consumo de pulpa de fruta en el país, el presente proyecto contribuyó en el diseño de una pulpa funcional de frutas y hortalizas con propiedades antioxidantes y probióticas, aprovechando los beneficios saludables de los microorganismos probióticos y de los compuestos antioxidantes de las frutas y verduras y a su fácil acceso en comparación con los productos lácteos.

En la actualidad no se cuenta con un producto alimenticio que contenga estas características, aportando de esta forma al avance en el desarrollo no solo del sector de los alimentos funcionales, sino también al sector hortifrutícola del país. Para lograr este proyecto, la Universidad Nacional de Colombia, a través del Instituto de Ciencia y Tecnología de alimentos – ICTA, la División de Investigación de Bogotá - DIB y con la colaboración de la empresa de Alimentos SAS S.A, han unido sus esfuerzos para dar soluciones a estos problemas desarrollando nuevos procesos y productos en el sector alimentario.

La solución de la Ingeniería Química en estos proyectos se ha vuelto indispensable para validar procesos y desarrollar nuevos productos, y de esta forma mejorar el estilo de vida de las personas al contribuir con el compromiso de lograr una alimentación sana y beneficiosa para todos.

La riqueza de Colombia en cuanto a la variedad y calidad de los vegetales, concordante con la ubicación geográfica del país y su diversidad climática, hasta el momento no ha sido suficientemente valorada ni aprovechada. Los reportes de pérdidas de frutas y hortalizas contrastan con las necesidades nutricionales de la

población. Adicional a esto, el mercado colombiano posee un bajo consumo per cápita de frutas y hortalizas siendo de 45,8 kg y 21,9 kg respectivamente comparado con el mínimo recomendado por la FAO que es de 59,8 kg para frutas y 101,9 kg para hortalizas (FAO, 2003). Por otro lado, para el caso de los microorganismos probióticos, la mayor parte de las investigaciones y sus aplicaciones han sido principalmente enfocadas a la industria láctea donde se han desarrollado nuevas tecnologías dejando de fortalecer otras aplicaciones en el sector de los alimentos como es el hortifrutícola.

En este contexto es necesario dar inicio a una solución para incrementar el consumo de frutas y hortalizas realizando innovación en cuanto al tipo de producto dándole un mayor valor agregado, pues no se ha valorado en toda su dimensión la riqueza nutricional de las frutas y hortalizas producidas en Colombia, ni se ha considerado la posibilidad de complementar su composición al mezclarlas con hortalizas y/o enriquecerlas con microorganismos probióticos aprovechando sus ventajas nutricionales (Rivera y Gallardo, 2008), con la posibilidad de desarrollar una “Pulpa Funcional” que traiga beneficios adicionales al consumidor y de esta forma incrementar el consumo de pulpas. Adicional a lo mencionado, actualmente no se cuenta con la ingeniería de proceso para el desarrollo y elaboración de este tipo de producto.

Por lo anterior, una buena alternativa, es poder desarrollar una pulpa funcional, afectando de manera positiva el mercado de frutas y hortalizas del país al darles valor agregado y fortaleciendo el sector hortofrutícola desde el punto de vista agroindustrial e investigativo al generar nuevo conocimiento, brindando nuevos procesos y nueva información científica, especialmente en la obtención de valores de la capacidad antioxidante de las frutas y hortalizas de nuestro país. Adicional a esto, la pulpa sería una buena fuente nutricional en lo correspondiente a la alimentación comunitaria. Por esta razón, para el diseño una pulpa funcional se plantearon unos objetivos generales y específicos para lograr su consecución.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Establecer las condiciones de proceso para producir una pulpa funcional mediante mezcla de fruta y hortaliza y utilización adecuada del microorganismo probiótico *Lactobacillus acidophilus*.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Seleccionar dos pulpas de frutas y dos hortalizas de acuerdo a unos criterios previamente establecidos.
2. Determinar las operaciones y condiciones de proceso para el tratamiento y adecuación de las hortalizas seleccionadas y de la mezcla con la pulpa de fruta.
3. Seleccionar una de las mezclas de la pulpa de fruta con la hortaliza de acuerdo a criterios de selección establecidos.
4. Determinar las etapas y condiciones para la inclusión del probiótico escogido en la mezcla de pulpa seleccionada.
5. Evaluar la condición de manejo y almacenamiento (temperatura -20°C), de la pulpa funcional en cuanto al comportamiento de sus características funcionales y viabilidad del microorganismo probiótico.

1. MARCO REFERENCIAL

El marcado interés en el cuidado de la salud, el constante incremento en la esperanza de vida y el deseo de las personas mayores para mejorar su calidad de vida son factores determinantes para la investigación y desarrollo en el campo de los “Alimentos Funcionales”, alimentos capaces de promover buena salud y prevenir o aliviar enfermedades y que han empezado a ser el objeto fundamental de enfoque de la industria de la alimentación humana.

1.1 ALIMENTOS FUNCIONALES

El concepto de alimento funcional tiene sus orígenes en Hipócrates con su lema “Permite que el alimento sea tu medicina”. Actualmente se encuentran estudios que empiezan a hacer real esta hipótesis debido a que la dieta juega un importante papel en la regulación de funciones fisiológicas en el cuerpo. El término “Alimentos Funcionales” fue primero usado en Japón en la época de los 80s, para productos fortificados con ingredientes reconocidos por sus beneficios a la salud, luego en 1984 este concepto fue promovido por los científicos japoneses quienes estudiaron la relación entre la nutrición, satisfacción sensorial, fortificación y modulación de sistemas fisiológicos; años más tarde 1991, el ministerio de salud del Japón introduce normas para este tipo de alimentos inicialmente llamados FOSHU por su abreviación en inglés (Food for Specified Health Uses). Aunque en la mayoría de los países no hay una legislación respecto al término, diversas instituciones han propuesto definiciones, dentro de éstas se encuentra la Comisión Europea de Acción Concertada sobre la Ciencia de Alimentos Funcionales en Europa (FUFOSE, abreviación en inglés), coordinado por el Instituto Internacional de Ciencias de la Vida (ILSI, abreviación en inglés), que definen el alimento funcional como sigue: “Un producto alimenticio puede solamente ser considerado funcional si, además del impacto en la base nutricional, este tiene efectos benéficos sobre uno o más funciones en el organismo humano, ya sea mejorando

las condiciones generales y físicas o disminuyendo el riesgo de enfermedades” (Siró et al., 2008).

1.1.1 Panorama de los alimentos funcionales

Este tipo de productos ha ido en constante crecimiento teniendo un mercado global estimado en el 2000 entre US\$ 33 – 47,6 billones de dólares, siendo Estados Unidos el de mayor participación seguido por Europa y Japón. Para el 2009, según estudios, el mercado de este tipo de alimentos pudo haber alcanzado los US\$ 25 billones, hablando únicamente de los E.E.U.U. Un comportamiento similar tendrían también los mercados Europeos y Japonés (Siró et al., 2008). Para el caso de América Latina, el conocimiento en este tipo de productos es relativamente reciente, solo Brasil posee una regulación para estos productos (Lajolo, 2002). En Colombia, por su parte, este mercado ha despertado un creciente interés y tanto las universidades como los centros de investigación han empezado a consolidar grupos de trabajo en el área. Legalmente no existe aún una normativa que defina y regularice la producción, verificación científica de las propiedades saludables, desarrollo tecnológico y comercialización de los alimentos funcionales, sin embargo se han establecido unas normas por parte del Ministerio de la Protección Social de Colombia que regularizan los alimentos con propiedades adicionales a la salud como son: El Decreto 1944 de 1996 que reglamenta la fortificación obligatoria de la harina de trigo con vitamina B1, vitamina B2, niacina, ácido fólico y hierro; resolución 11961 de 1989 que hace referencia a la leche cultivada con *Bifidobacterium*; resolución 11488 de 1984 que precisa las normas técnicas relacionadas con alimentos infantiles, alimentos o bebidas enriquecidas y alimentos o bebidas de uso dietético, en los cuales se permite la adición de nutrientes y la denominación de fortificados (Sarmiento, 2006); y los decretos 3863 de 2008, 4857 de 2007, 3249 de 2006 y las resoluciones 3097 de 2007 y 2009025533 de 2009, los cuales son recopilación de normas relacionadas con productos suplementos dietarios (<http://web.invima.gov.co>, 2010).

1.1.2 Tipos de alimentos funcionales

Los primeros alimentos funcionales desarrollados correspondían a aquellos fortificados con vitaminas y minerales tales como vitamina C, vitamina E, ácido fólico, zinc, hierro y calcio. Luego aparecieron los fortificados con varios micronutrientes tales como los omega 3, fitoesteroles y fibra soluble. Más recientemente las compañías de alimentos han desarrollado productos alimenticios que ofrecen múltiples beneficios a la salud en un único alimento.

Desde el punto de vista del producto, las propiedades funcionales pueden ser incluidas por diferentes medios tal y como se muestra en la tabla 1. Se aclara que esta es una de las posibles clasificaciones.

Tabla 1. Tipos de alimento funcional (Kotilainen et al., 2006)

Tipo de Alimento Funcional	Definición	Ejemplo
Producto Fortificado	Un alimento fortificado con adición de nutrientes	Jugos de fruta fortificado con vitamina C
Producto Enriquecido	Un alimento con adición de nuevos nutrientes o componentes normalmente no encontrados de manera natural en el producto	Margarina con probióticos
Producto Alterado	Un alimento en el cual un componente no beneficioso es removido, reducido o sustituido por otra sustancia con efectos benéficos.	Grasa remplazada por fibra en la carne.
Alimentos Mejorados	Un alimento en el cual uno de los componentes ha sido naturalmente mejorado a través de condiciones de crecimiento especial, nueva composición de alimentación, manipulación genética u otro medio.	Huevos con contenido de omega-3 incrementado por alteración en la alimentación de las gallinas

Un alimento o componente alimenticio funcional puede ser un macronutriente con un efecto fisiológico específico o un micronutriente esencial, pero también puede ser un componente alimenticio que aunque no tenga un alto valor nutritivo o no sea esencial, su consumo logre la modulación de alguna función en el organismo que reduzca el riesgo de enfermedad, como es el caso de la fibra y algunos

microorganismos viables (Roberfroid 2000). Los tipos de productos funcionales más comunes son:

- Los probióticos: principalmente bacterias de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, que de acuerdo a estudios realizados, dentro de sus beneficios se encuentran la reducción en la incidencia del estreñimiento, diarrea, cáncer intestinal y estimulación del sistema inmune (Vasiljevic & Shah, 2008).
- Fibras no digeribles y prebióticos: Las fibras dietéticas (celulosas, hemicelulosas y pectinas resistentes a la digestión por las enzimas endógenas del intestino humano) benefician las funciones gastrointestinales y se sugiere que previenen enfermedades como el cáncer colorectal, obesidad, diabetes mellitus y arteriosclerosis. Los prebióticos son ingredientes alimenticios no digeribles que afectan benéficamente al huésped debido a que estimulan selectivamente el crecimiento y/o actividad de bacterias benéficas en el colon. Dentro de los principales prebióticos se encuentran los fructo-oligosacáridos, inulina, isomalto-oligosacáridos, povidextrosa, lactulosa y almidón resistente (Siró et al., 2008). Debido a la sinergia entre los probióticos y prebióticos, los alimentos que contienen una combinación de ellos son frecuentemente referidos como “Simbióticos”.
- Sustancias bioactivas, y vitaminas (compuestos antioxidantes): se pueden encontrar en las frutas y vegetales; son de gran interés debido a su rol en la prevención de enfermedades causadas como resultado del estrés oxidativo, productor de numerosos desordenes incluyendo mal función cardiovascular, cataratas, cáncer, reumatismos y muchas otras enfermedades (Kaur & Kapoor, 2001). Dentro de este grupo encontramos los polifenoles, flavonoides, isómeros del ácido linoléico conjugado, isoflavonas, vitaminas A, B, C, E, tocoferoles, aceites vegetales poliinsaturados omega 3 y 6 entre otros.

- Proteínas: ejemplo de esta es la proteína de soya que reduce el riesgo de enfermedades cardiovasculares y problemas de hipertensión arterial (Manh et al., 2005; Cartagena 2005)

1.1.3 Frutas y hortalizas como alimento funcional

Las frutas y hortalizas son alimentos bajos en calorías, grasas y sodio, y son buenas fuentes de fibra, folato, potasio, vitamina A, vitamina C, y sustancias bioactivas. Se ha demostrado en diferentes estudios epidemiológicos que existe una correlación significativa entre el consumo de frutas y vegetales y la disminución en la incidencia de enfermedades coronarias, algunos tipos comunes de cáncer, diabetes, artritis y otras enfermedades degenerativas; es por esto que a las frutas y vegetales se les ha llegado a conferir el estatus de “Alimentos funcionales” debido a que promueven la buena salud y previenen o alivian enfermedades. Esto es atribuido al hecho que esos alimentos pueden proveer una optima mezcla de compuestos fitoquímicos principalmente los antioxidantes naturales, fibra y otros componentes bióticos. (Steinmentz & Potter, 1996; Garcia-Closas et al., 1999; Joseph et al., 1999; Prior & Cao, 2000; Miletic et al., 2008). Recientemente los compuestos fitoquímicos en frutas y vegetales han atraído en gran manera la atención, principalmente debido a su rol en la prevención de enfermedades causadas como resultado del estrés oxidativo el cual se relaciona con radicales de oxígeno libre en el cuerpo causantes de múltiples desordenes como la malfunción cardiovascular, cataratas, cáncer, reumatismo y envejecimiento. Estos fitoquímicos actúan como antioxidantes eliminando los radicales libres e interviniendo como salvadores de la célula (Dillard & German, 2000; Watson & Preedy, 2010).

Diversas investigaciones han mostrado que las frutas y hortalizas contienen sustancias que alteran el microambiente del colon, regulan el metabolismo hormonal, exhiben propiedades antioxidantes, inducen la actividad de enzimas detoxicantes, promueven la comunicación célula a célula, bloquean la formación de nitrosaminas, modifican la tasa de proliferación/diferenciación celular, los

mecanismos de metilación/repación del ADN y estimulan la muerte celular programada (apoptosis) de las células cancerosas. Específicamente tratándose del cáncer, las evidencias científicas han indicado que son cuatro los mecanismos por los cuales las frutas y hortalizas actúan para prevenir esta enfermedad. Brevemente, el proceso de carcinogénesis química consta de varias etapas. La iniciación o interacción entre los carcinógenos (de naturaleza electrofílica) y el ADN (de naturaleza nucleofílica) da por resultado, cuando los enlaces son estables, la formación de aductos y eventualmente la producción de mutaciones de no entrar en operación mecanismos de reparación del ADN. La promoción y progresión se caracterizan por la proliferación clonal de las células genéticamente alteradas y su eventual dispersión (metástasis) a otros órganos. Algunos compuestos antioxidantes presentes en diversas frutas y hortalizas interceptan eficientemente a las especies reactivas que actúan sobre el ADN. Otros compuestos funcionales de este grupo de alimentos, modulan el metabolismo de los carcinógenos a través de dos efectos, inhiben su producción o estimulan la actividad de enzimas para su detoxificación. Y finalmente, se conocen compuestos de las frutas y hortalizas capaces de modificar el comportamiento de las células cancerosas a través de la represión de los oncogenes *ras*, que son genes que se encuentran activos en las células cancerosas y que son responsables de la síntesis de factores que regulan el crecimiento celular. A la producción de carcinógenos también se le conoce como Fase 1, y a la eliminación de los mismos o detoxificación como Fase 2 dentro del metabolismo de los carcinógenos (Wargovich, 2000).

1.1.3.1 Componentes funcionales de las frutas y hortalizas

En general, los componentes funcionales de las frutas y hortalizas se pueden clasificar en varias categorías: Fibra dietaria, antioxidantes, compuestos organosulfurados y ácidos grasos poli-insaturados.

La *fibra dietaria* proviene de las paredes celulares y laminas medias de los tejidos que conforman las frutas y hortalizas, por lo que participan en su composición celulosa, hemicelulosas, lignina y compuestos pécticos mayoritariamente. La fibra dietaria no se absorbe pues el organismo carece de las enzimas para hidrolizar estos polímeros y tampoco exhibe una gran capacidad antioxidante. Sin embargo, los estudios *in vitro* han mostrado que sus componentes pueden atrapar carcinógenos y otras sustancias reactivas tales como ácidos biliares, por lo que su efecto benéfico se ejerce directamente en el intestino en donde no solo elimina sustancias nocivas sino también modifica el microambiente del colon (Flora bacteriana, composición de ácidos biliares y pH). Además, algunas clases de fibra dietaria se fermentan por acción de la microflora del colon produciéndose ácidos grasos de cadena corta como el butírico que ha mostrado un efecto preventivo de las neoplasias (formación de tumores por crecimiento y propagación de células malignas). La fibra dietaria por lo tanto, reduce los riesgos de cáncer de colon. También previene la diverticulosis (formación de pequeñas vesículas en el intestino) y puede ayudar a controlar la diabetes y los niveles altos de colesterol y glucosa en la sangre (Pelayo, 2003).

Los *antioxidantes* son tratados en el numeral 1.2.

Compuestos organosulfurados. Los miembros del género *Allium*, incluyendo ajo (*A. sativum L.*), cebolla (*A. cepa L.*) y cebollines (*A. schoenoprasum*) contienen compuestos organo sulfurados responsables del olor y gusto característicos de estas hortalizas. Estos compuestos son activos en la Fase 1 (limitando la activación de carcinógenos) o en la fase 2 (estimulando la actividad de enzimas detoxificantes de carcinógenos) del proceso de carcinogénesis (Wargovich, 2000). Un ejemplo de ello son los dialil disulfuros presentes en el ajo. Estas sustancias no se encuentran como tales en los bulbos de ajo, sino en forma de precursores, los que se transforman por la acción de enzimas en dialil disulfuros cuando los tejidos se dañan, cortan o maceran. En pruebas con seres humanos, estos compuestos

han demostrado acción antimicrobiana en contra de levaduras y algunas bacterias, y en experimentos con roedores su capacidad para inhibir tumores cervicales y mamarios, reducir el nivel de lípidos en el torrente sanguíneo y la formación de aductos en el ADN. Otro ejemplo de compuestos organosulfurados son los glucosinolatos que son los inductores de enzimas detoxificantes que mejor se han caracterizado. Las plantas de la familia Cruciferae, a la que pertenecen la col (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.), coles de Bruselas (*B. oleracea* var. *gemnifera*), coliflor (*B. oleracea* var. *botrytis* L.), nabos (*B. campestris* var. *rapifera*) y brócoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica* Plenck) son ricas en estos compuestos (0.5-1 g/kg en brócoli y hasta 2 g/kg en las coles de Bruselas) (Fahey and Stephenson, 1999). Las sustancias verdaderamente activas son los isotiocianatos (R - N = C = S) también conocidos como aceite de mostaza que se liberan de los glucosinolatos bajo la acción de la enzima mirosinasa (β -tioglucósido glucohidrolasa; EC 3.2.3.1) que entra en contacto con estos compuestos (sustratos) cuando los tejidos de estas hortalizas se cortan, maceran, descongelan, dañan y probablemente también en el tracto gastrointestinal cuando la hortaliza se ingiere. Subsecuentemente, la glucosa es enzimáticamente hidrolizada de la molécula y el compuesto liberado experimenta un rearrreglo para formar isotiocianatos y otros productos de degradación. Los isotiocianatos así liberados actúan como agentes quimioprotectores induciendo las llamadas enzimas detoxificantes Fase 2. Estas enzimas, como la glutatión-S-transferasa, la quinona reductasa y la epóxido hidrolasa, inactivan carcinógenos por destrucción de sus centros reactivos o al conjugarlos con ligandos endógenos, facilitando con ello su eliminación del organismo. La relación causal entre la inducción de estas enzimas y el efecto protector contra el cáncer se encuentra firmemente establecida. El isotiocianato sulforafano, el inductor natural más potente, se aisló del brócoli y su actividad anticarcinogénica fue demostrada en tumores mamarios de rata (Fahey and Stephenson, 1999).

Finalmente, los *ácidos grasos poli-insaturados* están presentes en numerosos aceites de origen vegetal. Dentro de las frutas, las nueces contienen algunos de estos compuestos. Se ha reportado por ejemplo, que el ácido α -linolénico, abundante en nuez pecanera (*Carya Illinoensis* W.) o de cascara de papel, reduce la presión sanguínea de los hipertensos, los niveles de triglicéridos y colesterol en sangre, y retarda el crecimiento de tumores (Turgut, 2001)

1.1.4 Mercado nacional de las frutas y hortalizas

De acuerdo a información del DANE, la cadena de valor de la industria hortifrutícola de Colombia fue de US\$156,5 millones para el año 2000, distribuidos en un 48% de valor agregado y 52% de consumo intermedio. Para las empresas productoras de pulpas y de jugos se reportaron, en 1999, el 60.9% de toda la demanda industrial de frutas frescas, consumiendo 35,170 toneladas por un valor de \$15,309 millones de pesos; de ese total, el 40.6% se destinó a la industria de pulpas y el 20.3% a la de jugos; en términos de volumen, en 1999 la industria productora de jugos demandó 11,700 toneladas de frutas frescas, mientras que la industria productora de pulpas demandó 23,500 toneladas. Para el año 2000, el Ministerio de Agricultura de Colombia reportó la demanda industrial de las principales frutas y hortalizas procesadas, mostrando las pulpas de frutas un porcentaje de participación en volumen del 56.9%, y para el caso de las hortalizas, en donde las principales transformaciones industriales que se realizan son la elaboración de encurtidos y salsas, la mayor demanda se vio reflejada en las pulpas de tomate, con una participación del 8.3%, seguido de las legumbres deshidratadas con un 1.5%. No obstante la demanda industrial de productos hortifrutícolas frescos muestra un crecimiento negativo de -4.4% (1993-2000); sin embargo la utilización de bienes hortifrutícolas procesados como materia prima industrial registra un crecimiento dinámico que alcanzó el 29.0% durante el mismo periodo. (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2005). Más recientemente, un estudio realizado por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural en octubre de 2008 deja ver su interés por este tipo de productos presentando las

perspectivas y oportunidades en este sector, en donde se mencionan 151 proyectos que se llevan a cabo en temas de investigación por un monto total de \$55,447 millones, encontrándose dentro de estos el desarrollo y producción industrial de alimentos enriquecidos. (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2008). En este contexto, es necesario aumentar el valor agregado en estos productos para así ampliar los actuales mercados y aprovechar nuevas oportunidades comerciales.

1.2 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

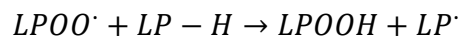
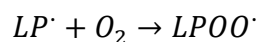
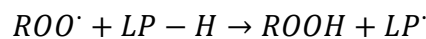
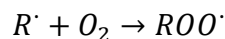
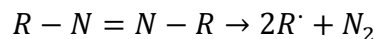
Los antioxidantes juegan un papel importante en el sistema defensivo del cuerpo contra los radicales libres entre los que se encuentran los llamados ROS (reactive oxygen species), los cuales son productos nocivos generados durante la respiración normal de las células aeróbicas. Estos radicales libres son reactivos altamente inestables y moléculas energizadas con un electrón desapareado; ejemplos de éstos son los oxido (O_2^-), hidroxil (OH^-), hidroperoxil (HOO^-), peroxil (ROO^-) y alcoxil (RO^-), oxido nítrico (NO^-) y el peroxinitrito ($ONOO^-$) (Prior & Cao, 2000). Los ROS reaccionan rápidamente con otros compuestos tratando de capturar el electrón necesario para obtener estabilidad atacando las moléculas estables más cercanas robándole su electrón y generando un nuevo radical, empezando así una reacción en cadena. Una vez el proceso ha emprendido, se inicia la peroxidación lipídica dando como resultado la desestabilización y desintegración de las membranas celulares u oxidación de otros componentes celulares como las proteínas y el ADN, obteniendo al final la alteración de las células (Halliwell et al., 1995). Para tratar estos efectos los antioxidantes neutralizan los radicales libres donando uno de sus propios electrones, finalizando de esta forma la reacción. Los antioxidantes, una vez donado el electrón, tienen la propiedad de no transformarse en un radical libre y ser estables en cualquier forma. Ellos pueden ser definidos como sustancias capaces de eliminar o estabilizar los radicales libres.

1.2.1 Mecanismos de reacción de los antioxidantes

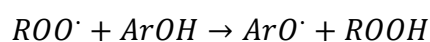
En general los antioxidantes pueden ser clasificados dentro de dos categorías respecto a su mecanismo:

1. Antioxidantes preventivos: inhiben la formación de especies de oxígeno reactivo. Dentro de estos antioxidantes se encuentran el peróxido dismutasa, catalasa, peroxidasa y transferrin.
2. Antioxidantes de rompimiento de cadena: son compuestos que eliminan el oxígeno radical y por lo tanto rompen la secuencia en cadena del radical. Ellos incluyen vitamina C, vitamina E, ácido úrico, bilirrubina y polifenoles, entre otros. Para el rompimiento de la cadena, estos antioxidantes tienen dos posibles rutas:

- a) La primera ruta envuelve una transferencia del átomo de hidrógeno (TAH), donde el radical oxigenado captura un hidrógeno del antioxidante, resultando en la formación de un radical estable del antioxidante. Las siguientes ecuaciones ilustran las etapas del proceso de TAH. Se usa un compuesto azo como un representativo generador de radical y LP-H como sustrato lípido:

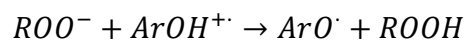
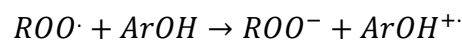


Como se ilustra una vez el radical peroxil (ROO^*) es generado, las reacciones en cadena son iniciadas y como consecuencia la molécula lipídica (LP-H) será oxidada a peróxido lípido (LP-OOH). En la presencia de un antioxidante (ArOH), la reacción en cadena de peroxidación lipídica puede ser interrumpida como sigue:



Para antioxidantes fenólicos, el radical fenoxil formado ArO^{\cdot} es relativamente estable y reacciona solamente de una manera lenta con el sustrato LPH pero rápidamente con el radical peroxil ROO^{\cdot} . Ejemplo del caso anterior es el antioxidante alfa-tocoferol, el cual reacciona con el radical peroxil a una rata de $10^6 M^{-1} s^{-1}$, el cual es mucho más veloz que la reacción del radical peroxil con el lípido que es de $10^1 M^{-1} s^{-1}$.

- b) La segunda posible ruta es la transferencia de electrones (TE) como se ilustra a continuación:



El resultado final es el mismo que el del mecanismo TAH. Sin embargo, cuando se compara con el TAH, el mecanismo TE depende más fuertemente del solvente debido a la estabilización de las especies cargadas del solvente (Ou et al., 2002).

1.2.2 Frutas y hortalizas como fuente de antioxidantes naturales

Recientemente, se ha podido atribuir el efecto de una dieta rica en frutas y hortalizas al alto poder de acción contra los radicales libres o capacidad antioxidante que éstas exhiben. En efecto, los antioxidantes naturales como las vitaminas C y E, compuestos fenólicos (que incluyen los flavonoides), carotenoides y antocianinas poseen la capacidad de contrarrestar el efecto en el organismo de los radicales libres, resultantes de las reacciones oxidativas que acompañan el metabolismo y que pueden inducir cáncer, enfermedades cardiovasculares o inmunodeficiencias, cataratas oculares, aterosclerosis, diabetes, artritis, envejecimiento y disfunciones cerebrales. Los alimentos y más específicamente las frutas y hortalizas, han asumido una nueva función, en la medida en que proveen beneficios fisiológicos adicionales como prevenir y proteger contra enfermedades, principalmente por su acción contra las reacciones oxidativas a través de los compuestos antioxidantes que poseen, además de contener una gran cantidad de fibra, que ayuda a eliminar, a través de la digestión,

sustancias que pueden ser nocivas y a reducir los niveles de colesterol. Es por esto que una de las declaraciones del Jefe del servicio de Programas de Nutrición la FAO William D. Clay es: "Consumir abundante fruta y hortaliza en el marco de una dieta diversificada contribuirá a satisfacer las necesidades de nutrición" (FAO 2003) siendo una buena opción para suplir estas necesidades el consumo regular de pulpas de frutas y hortalizas.

Algunos componentes que actúan en las frutas y hortalizas como antioxidantes son la fibra, polifenoles, flavonoides, isómeros conjugados del ácido linoleico, D.Limonene, epigallocatequina, galato, proteína de soya, isoflavonones, vitaminas A, B, C, tocoferoles, calcio, selenio, clorofilin, alifarin, sulfuros, catequina, tetrahidrocurecumina, seasaminol, glutatión, ácido úrico, indoles, tiocianatos y los inhibidores de la proteasa. Estos componentes pueden actuar independientemente o en combinación como anti-carcinogénicos o agentes protectores del sistema cardiovascular (Karakaya & Kavas, 1999).

A continuación se mencionan algunos de los más importantes antioxidantes naturales presentes en frutas y vegetales que han mostrado jugar un papel crucial en la prevención de varias enfermedades (Watson & Preedy, 2010):

1.2.2.1 Fibra dietaria, minerales y enzimas antioxidantes

Estudios epidemiológicos han demostrado un efecto positivo de la fibra, ácidos grasos insaturados, oligoelementos(minerales) y vitaminas de frutas y vegetales sobre los radicales libres y por lo tanto en la prevención de enfermedades. Los beneficios a la salud de la ingesta de fibra son asociados a la formación de una matriz gelatinosa que incrementa la masa fecal. Esto contribuye a una reducción en la concentración de ácidos biliales dañinos y otros compuestos potencialmente carcinogénicos en el excremento. Respecto a los oligoelementos, estos tienen un papel en la síntesis y estabilización estructural de proteínas y ácidos nucleicos, los más importantes de estos metales son el magnesio, cobre, zinc, manganeso y selenio, entre estos el más estudiado ha sido el selenio debido a su relación con

los riesgos de desarrollo de cáncer. El selenuro de hidrogeno, metilselenol, y selenometionina, los principales metabolitos del selenio, son capaces de regular expresiones de gen, proteger el ADN de daños, y estimular la reparación y regulación de apoptosis y ciclos celulares. Los oligoelementos también entran dentro del mecanismo de prevención en la defensa contra los radicales libres, mediante las enzimas antioxidantes. Estas enzimas trabajan de manera coordinada e integrada, centrada en la disponibilidad de oligoelementos y NADPH, el cual es el origen de equivalentes de reducción contra los radicales de oxígeno.

1.2.2.2 Fitoquímicos

Son metabolitos secundarios sintetizados por las plantas durante su desarrollo y una buena parte de ellos como respuesta a las condiciones de stress tales como infección, heridas y radiación UV, entre otras. En la siguiente figura se aprecia las diferentes categorías de fitoquímicos con propiedades antioxidantes.

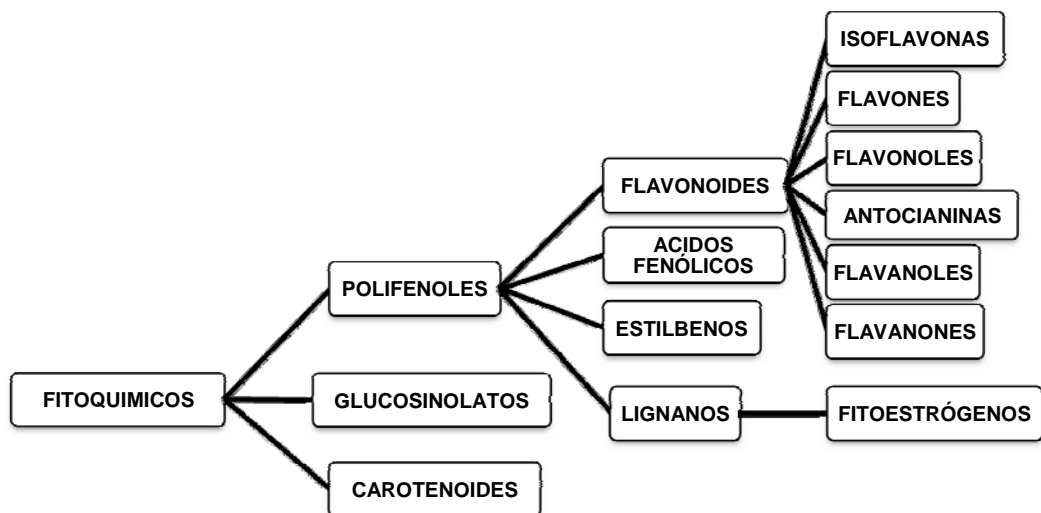


Figura 1. Diferentes categorías de los fitoquímicos con propiedades antioxidantes (Watson & Preedy, 2010)

1.2.2.2.1 Vitamina C

La estructura química de la vitamina C, también llamada ácido ascórbico (AA), es similar a la de los azúcares de hexosa, con un grupo de ene-diol con participación en los carbonos 2 y 3. Este grupo hace del AA un agente reductor fuerte, fácilmente oxidable a ácido dehidroascórbico (DHA). En las células, AA y DHA se encuentran en equilibrio químico, y ambos están dotados con actividad vitamínica. El carácter ácido de AA se debe a la facilidad del grupo -OH, enlazado a C2 para liberar un protón, ya que los iones mono-DHA que se forma se estabiliza por resonancia. La mayoría de los vegetales sintetizan AA, a partir de la glucosa, sin embargo, los primates no son capaces de hacerlo, ya que son deficientes en la enzima oxidasa gulonolactona, que participa en la síntesis de AA (Linster & Van Schaftingen, 2007). La vitamina C es por lo tanto una vitamina esencial y debe ser suplida mediante la ingesta de verduras y frutas frescas. En un nivel fisiológico, AA está implicado en diversos procesos metabólicos: las hormonas corticosteroides, los ácidos biliares, la carnitina, las prostaglandinas, histamina, el colágeno, el hierro, la tiroxina, y algunos neurotransmisores. La vitamina C también mejora la respuesta inmune y favorece la eliminación de xenobióticos y radicales. De hecho, reacciona directamente con los aniones superóxido, radicales hidroxilo y varios hidroperóxidos de lípidos (Rose & Bode, 1993).

1.2.2.2.2 Vitamina E

Las moléculas que poseen actividad de vitamina E se agrupan bajo el término «tocoferoles." Todos ellos son homólogos, derivados de la estructura 6-hidroxicromane, y se clasifican en dos grupos: 1) los tocoferoles, entre ellos el α , β , γ , δ -tocoferoles, que tienen una larga cadena lateral isoprenica saturada en el C2 y un conjunto variable de grupos metilo unidos al anillo cromanol, y 2) los tocotrienoles, dividido en los α , β , γ , δ -tocotrienoles, que tienen la misma estructura que los tocoferoles mencionados, con excepción de la cadena lateral, que no está saturado con tres dobles enlaces. Los tocoferoles proviene en su

mayoría de cereales, vegetales de hoja verde, frutas oleicas, semillas, y sus respectivos aceites. Los tocoferoles son hidrolizados en el intestino delgado, emulsificados con los ácidos biliares, transportados en la sangre por las lipoproteínas de baja densidad (LDL), almacenados en el hígado, y eliminados a través de la bilis y la orina. La vitamina E es un poderoso antioxidante liposoluble que actúa sinérgicamente con selenio para prevenir la oxidación de los ácidos grasos, fosfolípidos de la membrana, y las proteínas. En el giro dentado del hipocampo de los mamíferos, α -y β -tocoferoles tienen un papel neuroprotector mediante la prevención de la apoptosis y prolongar la vida del recién nacido neurona. Cuando la vitamina E funciona como antioxidante y dona su electrón, no puede volver a funcionar hasta que haya sido "recargado" por la vitamina C (Watson & Preedy, 2010).

1.2.2.2.3 Carotenoides

Son los pigmentos liposolubles naturales más amplios. Más de 600 diferentes carotenoides han sido identificados en las plantas, microorganismos y animales, y aproximadamente 20 de ellos se pueden identificar en el suero sanguíneo humano después de la ingesta de frutas y hortalizas. El caroteno se produce de muchas formas, designados como α -caroteno y β -caroteno seguido de γ , δ , y ϵ -caroteno. β -caroteno se compone de dos grupos retinil y se descompone en la mucosa del intestino delgado por β -caroteno dioxigenasa a retinal y se utiliza en el cuerpo como ácido retinoico y retinal, que son las formas activas de la vitamina A. La vitamina A es esencial, y su falta puede producir ceguera y otras consecuencias de salud. Los carotenoides funcionan como antioxidantes protegiendo contra la peroxidación de lípidos quelando los radicales libres, especialmente el oxígeno atómico. Las frutas cítricas y hortalizas, como zanahorias, batatas, zapallo, calabaza, papaya, mango y melón, son fuentes ricas en carotenoides. El licopeno, un carotenoide lineal con 11 dobles enlaces conjugados, es el precursor de todos los carotenoides, ya que se forma a partir de la ciclación de su estructura y la

hidroxilación posterior de carbonos específicos. Los tomates, sandía, toronja rosada, albaricoque y guayaba rosa son las fuentes más comunes de licopeno. En los seres humanos, a diferencia del β -caroteno, el licopeno no se transforma en vitamina A por falta del anillo β -ionona necesario para la conversión en retinoides. El licopeno ha sido asociado con una menor incidencia de cáncer de próstata. Las xantofilas son pigmentos carotenoides de color amarillo que participan en la fotosíntesis y se encuentran en las hojas de la mayoría de las plantas. Ante la presencia de un exceso de energía fotoquímica, contribuyen a la extinción no fotoquímica de la fluorescencia de la clorofila. La zeaxantina y la luteína son las xantofilas que son absorbidas y biodisponibles. Se encuentran en la mácula del ojo, donde se disminuye el riesgo de desarrollar degeneración macular relacionada con la edad y las cataratas (Watson & Preedy, 2010).

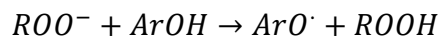
1.2.2.2.4 Glucosinolatos

Un grupo único de tioglucósidos de forma natural presente en las plantas de la orden Brassicales son los glucosinolatos (GLs). Los GLs contienen una fracción β -D-glucopiranososa, unido a un átomo de azufre y, o bien a una cadena lateral alifática, aromática o indol; GLs indólico se derivan a partir del triptófano, mientras que GLs no indólico se deriva de otros aminoácidos. Una mezcla de GLs indólico y no indólico es naturalmente hidrolizado por la enzima mirosinasa (β -tioglucoside glucohidrolase, EC. 3.2.1.147) en isotiocianatos (ITCs) e indoles. Estos son conocidos por reducir eficazmente los riesgos de cáncer y enfermedades degenerativas por la inhibición enzimática de la fase 1 y la activación de enzimas en la fase 2 (Watson & Preedy, 2010).

1.2.2.2.5 Polifenoles

Estas moléculas son metabolitos secundarios de las plantas, contribuyen a las cualidades organolépticas, color, y la defensa contra los ataques de patógenos. La estructura química de los fenoles posee uno o más anillos aromáticos, con uno o

más grupos hidroxilo. La actividad secuestrante de radicales consiste en la capacidad de inactivar las ROS directamente o enlazar iones metálicos pro-oxidante a través de sus grupos-OH. En el primer caso, los polifenoles transfieren de hidrógeno a un radical peroxilo de la siguiente manera:



El radical fenoxyl (ARO*) formado en esta reacción es relativamente estable y reacciona lentamente con otros sustratos, interrumpiendo así la cadena de reacciones de oxidación. En altas concentraciones, los polifenoles pueden actuar como un pro-oxidante, ya que la cantidad de radicales fenoxyl formados son capaces de generar reacciones de oxidación (Skibola & Smith, 2000). La figura 1 muestra las categorías de compuestos fenólicos.

Los **ácidos fenólicos** comprenden dos grupos principales: ácido benzoico y ácido cinámico. Los ácidos fenólicos naturales se producen en las frutas y hortalizas, ya sea en forma libre o conjugada, por lo general como ésteres o amidas. Los cereales integrales son especialmente ricos en ácidos fenólicos: ferúlico, p-cumárico, ácidos siríngico y vanílicico son los más comunes en el salvado, mientras que los más representados en la avena son los ácidos dihidrocafeico, sinapico y p-hidroxibenzoico.

Los **estilbenos** son compuestos fenólicos que contiene dos anillos bencénicos unidos por un puente de etano o etileno. Ellos están ampliamente distribuidos en las plantas superiores, actuando como fitoalexinas y reguladores del crecimiento. Resveratrol (3,4,5-trihidroxiestilbeno) es el miembro de esta familia química que se encuentra en las uvas y el vino, y tiene fama de ser responsable de prevenir la enfermedad cardíaca, principalmente a través del consumo de vino tinto (Vidavalur et al., 2006).

La estructura genérica de los **flavonoides** consta de dos anillos aromáticos, A y B, unidos por un anillo heterocíclico oxigenado C. Sobre la base de la estructura del anillo C, así como sobre su estado de oxidación y los grupos funcionales, los flavonoides se clasifican como flavonoles, flavonas, flavanoles (catequinas), flavanonas, antocianidinas, y isoflavonoides (Figura 1). En frutas y hortalizas, los

flavonoides se presentan con frecuencia como glucósidos, ya que la glicosilación hace la molécula menos reactiva, pero más soluble. La glucosa es el azúcar que está más frecuentemente implicada en la formación glucósida, pero también podemos encontrar a la galactosa, ramnosa, xilosa y arabinosa, y más allá sus disacáridos como rutose. Las principales fuentes de flavonoides en la dieta occidental son las frutas tales como los cítricos, albaricoques, cerezas, uvas, pasas de Corinto negro, arándanos, y las manzanas, entre los vegetales se incluyen cebolla, brócoli, tomates espinaca, hojas de remolacha, soja y hierbas aromáticas. De hecho, las hierbas aromáticas y especias tienen una concentración de flavonoides que es varias veces mayor que la de verduras comunes (Ninfali et al., 2005) . Las hierbas aromáticas también contienen antioxidantes especiales de origen fenólico. Por ejemplo, el romero contiene los diterpenos fenólicos, carnosol y rosmanol, que en conjunto con los ácidos rosmarínico y carnósico, son los más activos antioxidantes fenólicos de esta hierba; Piper nigrum contiene cinco amidas de ácidos fenólicos con propiedades antioxidantes marcada.

Los **lignan**os son básicamente dímeros del alcohol cinámico, que se cicla de diferentes maneras, generando una amplia gama de moléculas. Los lignanos son contenidos en los tejidos leñosos, cereales y verduras como zanahorias, el brócoli y las bayas. Junto con las isoflavonas, los lignanos pertenecen a la clase de fitoestrógenos, que son los factores de protección del sistema cardiovascular e inmunológico.

Los **taninos** son polímeros de ácidos fenólicos o flavonoides, presentes en la naturaleza como taninos hidrolizables y no hidrolizables (condensados). Las unidades básicas de los taninos hidrolizables son los ácidos gálico y elágico, esterificados a una molécula central, comúnmente glucosa o polifenoles como catequinas. Los taninos condensados, también llamados proantocianidinas, son principalmente polímeros flavonoides. Los taninos son antioxidantes potentes, pero son absorbidos casi por el intestino y son considerados factores antinutricionales, ya que son capaces de complicar y precipitar las proteínas e inhibir las enzimas digestivas (Watson & Preedy, 2010).

1.2.2.2.6 Acción de los antioxidantes fitoquímicos

Los antioxidantes presentes en frutas, verduras, granos exhiben diferentes propiedades beneficiosas para los seres humanos. Una serie de compuestos fenólicos, particularmente flavonoides, son eficientes agentes antiproliferativos, siendo capaces de inhibir la proliferación de las células del tumor interfiriendo con las proteínas del ciclo celular o induciendo apoptosis (Yang et al., 2001). Los extractos de manzana contienen compuestos que inhiben el crecimiento de células tumorales in vitro mediante la modulación de la expresión de genes seleccionados (Veeriah et al., 2008). Manzanas con cáscara inhiben la proliferación celular del cáncer de colon en un 43%, aunque esta inhibición se redujo al 29% cuando manzanas peladas fueron probados en un estudio (Eberhardt et al., 2000). Los mecanismos por los que los polifenoles actúan como agentes antitumorales son múltiples y se ha demostrado estar relacionada con las funciones de captadores de radicales, agentes de la desintoxicación, moduladores de señalización celular, inhibidores de las fases del ciclo celular, y activadores de la apoptosis. Algunos flavonoides son capaces de lograr este efecto mediante la inhibición de la enzima DNA topoisomerasa II, que es necesaria para la supervivencia y la proliferación de células cancerosas (Fresco et al., 2006).

Brócoli, col, col rizada y las coles de Bruselas, de la familia Brassicaceae, se consideran entre los vegetales contra el cáncer más importante. Los estudios han demostrado sus efectos anticancerosos debido a los glucosinolatos. Los vegetales Brassica también tienen un contenido notable de antioxidantes como el ácido ascórbico y carotenoides y compuestos fenólicos como la quercetina y kaempferol (Kurilich et al., 2002). Espinaca y remolacha, pertenecientes a la familia Chenopodiaceae, también son interesantes para la quimiopreención. Una marcada actividad antiproliferativa en células HepG2 humanas de cáncer de hígado se demostró en las espinacas (Chu et al., 2002). En *Beta vulgaris cicla*, se ha demostrado una fuerte actividad citostáticos hacia células tumorales MCF-7 de

mama, atribuibles a los glucósidos de la flavona apigenina (Ninfali et al., 2007). De hecho, los compuestos fenólicos presentan actividad anti-inflamatoria, que está mediada por la inhibición de la formación de factores de transcripción estrechamente vinculada a la inflamación, tales como NF- κ B y enzimas como la xantina oxidasa, citocromo oxidasa, y la lipoxigenasa, que median en el proceso inflamatorio (Chu et al., 2002; Read, M 1995). Los flavonoides de vino tinto y el té verde, especialmente la quercetina y catequina, exhiben actividad antioxidante y antiaterosclerótica través de la unión a las LDL. Este proceso de enlace reduce su sensibilidad a la oxidación y su potencia aterogénico (Hayek et al., 1997; Vinson & Dabbagh 1998). Los flavonoides también se han demostrado revertir la disfunción endotelial vascular mediante el aumento de la bioactividad del óxido nítrico derivado del endotelio (Duffy & Vita 2003; Van Ackers et al 1995). El ajo y la cebolla, ambos de la familia de las Liliáceas, son interesantes para el efecto de protección cardiovascular de alicina. El metabolismo de la alicina produce sulfuro de hidrógeno, que relaja los vasos sanguíneos, aumenta el flujo sanguíneo y aumenta la salud del corazón (Benavides et al., 2007). La alicina es considerada también responsable de la actividad anticancerígena en el extracto de ajo (Hirsch et al., 2000). Los fitoquímicos pueden tener también actividad antimicrobiana (Brandi et al., 2007; Fraternali 2007 et al., 2007). Por ejemplo, los extractos de semilla de uva o el romero pueden utilizarse como conservantes de alimentos (Ahn et al., 2007)

Las frutas no son menos importantes que las verduras en la protección de la salud. Una evaluación de las actividades anti-proliferativa de las frutas en las células HepG2 presentó el mayor efecto en los arándanos, seguido de los limones, las manzanas, las uvas rojas, plátanos, uvas y duraznos (Sun et al.,2002). Las manzanas demostraron ser capaces de prevenir el cáncer de mama en un modelo de rata de una manera dosis-dependiente (Liu et al., 2005). El polvo y jugo de arándano han sido propuestos para prevenir las infecciones del tracto urinario, debido a que las procianidinas inhiben la adherencia de *Escherichia coli* (Vinson et al., 2008; AFSSA 2004). Otra categoría de alimentos vegetales que se han

estudiado por su valor antioxidante son las coles. Las coles son una buena fuente de aminoácidos, minerales, fibra y compuestos fenólicos (Lorenzo, K. 1980); curiosamente, algunas coles de la familia Brassicaceae tienen un contenido de glucosinolatos y antioxidantes superior a la de la planta madura (Barillari et al., 2006). La lista de verduras y frutas ricas en moléculas útiles para la protección de la salud es demasiada larga para repetir en su totalidad, y sólo algunos ejemplos se han mencionado aquí. La multiplicidad de acciones expresadas por los polifenoles sugiere que es útil disponer de un número de diferentes frutas y hortalizas en la dieta humana a fin de tener una amplia gama de antioxidantes. Dado que a nivel fisiológico algunos antioxidantes funcionan mejor en condiciones hidrofílicas y otros dentro de un entorno graso, la mejor protección de la salud se logra cuando los dos tipos de antioxidantes están presentes juntos de tal manera que trabajan en sinergia y, posiblemente, se regeneran después de la oxidación. Todos estos antioxidantes se adquieren mejor a través de todo el consumo de frutas y vegetales, posiblemente mejorado a través de selección estacional (Watson & Preedy, 2010).

1.2.3 Métodos de determinación de actividad antioxidante

Existen diversos métodos para evaluar la capacidad antioxidante ya sea *in vitro* o *in vivo*, los usados con mayor frecuencia son descritos en la tabla 2. Una de las estrategias más aplicables en las medidas *in vitro* consiste en determinar la actividad antioxidante frente a sustancias cromógenas de naturaleza radical; la pérdida de color ocurre de forma proporcional con la concentración, sin embargo este tipo de determinaciones solo nos da una idea aproximada de lo que ocurre en situaciones *in vivo*. Actualmente los métodos más aplicados para frutas y verduras son ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico), DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracil), DMPD (N,N-dimetilfenilenediamina), FRAP (Poder antioxidante de reducción de hierro), TRAP (poder antioxidante radical total), y ORAC (Capacidad de absorción de radicales de oxígeno), estos métodos presentan buena estabilidad en ciertas condiciones aunque también muestran diferencias (Tabla 2).

El DPPH es un radical libre que puede obtenerse directamente sin una preparación previa, mientras que el ABTS tiene que ser generado tras una reacción química (dióxido de magnesio, persulfato potásico, ABAP), o enzimática (peroxidasa, mioglobulina), o electroquímica. Con ABTS se puede medir la actividad de compuestos de naturaleza hidrofílica y lipofílica, mientras que el DPPH solo puede disolverse en medio orgánico y el DMPD solo en medio acuoso, adicional a esto, el radical generado en el método ABTS tiene la ventaja de que su espectro presenta máximos de absorbancia a 414, 654, 754 y 815 nm en medio alcohólico, mientras que el radical del DPPH presenta un pico de absorbancia a 515 nm y el del DMPD a 505 nm (Kuskoski et al., 2005).

Los métodos ORAC y TRAP utilizan un tinte fluorescente como un objetivo para los radicales generados por descomposición térmica de diazocompuestos. Los antioxidantes de la muestra funcionan como un escudo protector entre el tinte fluorescente y de las especies radicales. La fluorescencia decae lentamente durante las fases iniciales del proceso cuando los antioxidantes están presentes en altas concentraciones, mientras que disminuye rápidamente cuando los antioxidantes están casi agotados. El área bajo la curva de caída en el ensayo ORAC, o la duración del período de inducción (fase de latencia) en el TRAP, se comparan con la de un patrón interno, y cuantitativamente en relación con la capacidad antioxidante de la muestra. El método FRAP utiliza el complejo férrico Fe-TPTZ como sonda, que se transforma a una forma de color ferrosos cuando reacciona con los antioxidantes (Watson & Preedy, 2010).

Tabla 2. Descripción de las características más importantes de los distintos métodos de medida de actividad antioxidante (Fernández et al., 2006)

Característica	Ensayos de transferencia de átomos de hidrógeno			Ensayo de transferencia de electrones			Otros ensayos			
	TRAP	ORAC	DCFHDA	Ensayo crocina	DPH	ABTS	FRAP	Volimetría cíclica	Ensayo luminescente	TOSC
Especie iniciadora	AAAP (radicales peróxido)	AAAPH ₂ O ₂ / Cu ₂ (OH) ₂ SO ₄ (peróxido)	AAAPH ₂ O ₂ (peróxido)	ABAP (radicales peróxido)	Radical DPPH	Fenil troglodina H ₂ O ₂ / S ₂ O ₈ ²⁻ → ABTS ^{•+}		Potencia eléctrica	AAAPH ₂ O ₂ /Peroxido + Lumino?	ABAP (radicales peróxido)
Medida	Oxígeno consumido	Inhibición de la fluorescencia de PEF	Inhibición de oxidación de DCFH ₂ DA	Inhibición de la oxidación de crocina	Descoloración de la crocina	Descenso de ABTS ^{•+}	Reducción TPZ/Fe ³⁺ a TPZ/Fe ²⁺	Capacidad reductora	Inhibición de quimioluminiscencia	Inhibición de oxidación de acetyl-aminoácido
Técnica	Electrodo de oxígeno	Fluorimetría	Espectrofotometría / Turbidimetría	Espectrofotometría	Espectrofotometría	Espectrofotometría	Espectrofotometría	Volimetría cíclica	Quimioluminiscencia	Cromatografía de gases
Cuantificación	Longitud de fase de retraso	Fluorescencia A.U.C	Abs: 540 nm (F.La.); 502 y 528 nm – fase de retraso	Abs: 493 nm / comparación óptica	Absorbancia a 515 nm	Absorbancia a 734 nm	Absorbancia a 695 nm / corriente	Cuna de corriente	Tiempo que dura la inhibición	A.U.C. y comparación con reacción basal
Expresión de resultados	Equivalentes de Trolox	Equivalentes de Trolox	Equivalentes de Trolox	Equivalentes de Trolox	CEU	Equivalentes de Trolox	Equivalentes de Trolox	Equivalentes de Trolox	Equivalentes de Trolox	Realtiva a concentración
Muestras	Alimentos, muestras biológicas	Fenoles, alimentos, bebidas, muestras biológicas	Muestras biológicas	Muestras biológicas	Fenoles, alimentos, bebidas	Fenoles, alimentos, bebidas, muestras biológicas	Alimentos, bebidas, muestras biológicas	Comestibles, puras, muestras biológicas	Fluidos biológicos	Comestibles, vinos, tejidos

Utilizando el método ABTS y DPPH se reportan algunos datos en la tabla 3 de actividad antioxidante de pulpas de frutas del Brasil, expresados en equivalentes de vitamina C (VCEAC), en donde las frutas que obtuvieron mayor capacidad antioxidante fueron la acerola y el mango. (Kuskoski et al., 2005). De acuerdo con lo mencionado anteriormente y a que es recomendable para la determinación de capacidad antioxidante trabajar con dos métodos, en el presente trabajo se determinó la capacidad antioxidante de las frutas y hortalizas por la aplicación de los métodos ABTS y DPPH.

Tabla 3. Valores de actividad antioxidante equivalente a vitamina C (VCEAC) de pulpa de frutos aplicando el método ABTS y DPPH (media \pm DE, n =3) (Kuskoski et al., 2005)

Pulpa de Fruta	ABTS (1 min) VCEAC (mg/100 g)	DPPH (30 min) VCEAC (mg/100 g)
Mora	125,8 \pm 3,2	82,6 \pm 2,6
Uva	161,5 \pm 3,3	105,9 \pm 0,4
Azaí	163,4 \pm 4,0	108,5 \pm 2,6
Guayaba	120,0 \pm 4,5	100,7 \pm 2,2
Fresa	202,5 \pm 0,5	132,8 \pm 0,3
Acerola	1198,9 \pm 8,1	959,1 \pm 19,0
Piña	64,8 \pm 5,2	41,1 \pm 0,8
Mango	224,7 \pm 4,6	174,3 \pm 0,5
Guanábana	76,8 \pm 4,0	57,15 \pm 1,8
Copoazú	37,0 \pm 0,0	43,18 \pm 2,3
Maracuyá	54,0 \pm 1,9	46,66 \pm 1,6

Para el caso de los vegetales se reportan unos valores de actividad antioxidante por los métodos ORAC y FRAP para las hortalizas que se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Valores de ORAC y FRAP de algunos vegetales (Ou et al., 2002)

Vegetal	ORAC ($\mu\text{mol TE/g}$)	FRAP ($\mu\text{mol TE/g}$)
Guisante	19 \pm 3	6 \pm 1
Zanahoria	60 \pm 15	31 \pm 7
Repollo blanco	61 \pm 21	39 \pm 17
Tomate	67 \pm 13	56 \pm 8
Habichuela	79 \pm 37	20 \pm 13
Cebolla blanca	85 \pm 23	17 \pm 4
Pimentón rojo	97 \pm 43	185 \pm 49
Coliflor	102 \pm 28	61 \pm 12
Remolacha	115 \pm 36	86 \pm 29
Brócoli	126 \pm 42	41 \pm 11
Cebolla morada	143 \pm 46	31 \pm 11
Espinaca	152 \pm 26	64 \pm 13
Pimentón verde	154 \pm 60	157 \pm 58

En otros análisis de medición de la actividad antioxidante por el método ORAC realizados a 27 vegetales encontraron que los tres vegetales con mayor capacidad antioxidante fueron primeramente la espinaca, seguido por la remolacha y en tercer lugar los espárragos (Song, 2010).

1.2.4 Influencia del procesado sobre la actividad antioxidante

La conservación de las propiedades nutricionales de las frutas y hortalizas depende en gran medida del proceso que se realice. Los métodos de preservación se creen que son los responsable de un decaimiento de los antioxidantes naturales en los alimentos. Frutas y hortalizas procesadas se espera que tengan una menor capacidad de protección a la salud frente a los no procesados. Esto es porque, hasta ahora, sólo se han selecciona antioxidantes estables de interés nutricional (por ejemplo, ácido ascórbico) que han sido comúnmente evaluados

como indicadores de daños por efecto del procesamiento. Sobre la base de estos supuestos efectos negativos, en los últimos años, la principal herramienta para minimizar los daños de procesamiento final fue la estrategia de «reconstitución», lograda mediante la adición o el enriquecimiento del producto con antioxidantes naturales. Varios intentos se han hecho para buscar nuevos tipos de antioxidantes naturales que se añadan a los alimentos. Sin embargo, los resultados han indicado que estos compuestos, que pueden mejorar considerablemente la vida útil del producto, no parecen ser tan eficaces como las que contiene naturalmente para protección de la salud. Además, la aplicación de la ingeniería genética para producir cultivos con un mayor contenido de compuestos bioactivos y la explotación de especies vegetales menores, representan diferentes herramientas de desarrollo de para la mejora de las propiedades saludables de las materias primas (Nicoli et al., 1999).

Es bien sabido que no siempre en el procesado de alimentos se pueden presentar pérdidas en la calidad y en las propiedades para la salud. Por ejemplo, recientemente se ha encontrado que aumenta la biodisponibilidad del beta-caroteno como consecuencia del calentamiento moderado o la alteración enzimática de la estructura vegetal de la pared celular. El escaldado también representa una herramienta útil en la prevención de las oxidaciones enzimáticas, que son la principal causa de pérdida de antioxidantes naturales en la materia prima de origen vegetal. De hecho, las frutas y hortalizas objeto de escaldado conservan la mayoría de sus propiedades antioxidantes originales. Por ejemplo un tiempo de escaldado de 1 minuto ha sido recomendado para las hojas del camote para mantener su alta actividad antioxidante (Chu et al., 2000). En términos generales, las consecuencias del procesamiento de alimentos y procedimientos de preservación de la actividad antioxidante global de los alimentos son generalmente el resultado de diversos actos, que pueden tener lugar en forma consecutiva o simultáneamente. Aunque muchos estudios tratan con la pérdida estimada de nutrientes de los alimentos a través de diferentes procesos (esterilización, deshidratación, congelación), en la mayoría de los casos, la concentración residual

fue la que se determinó en lugar de la capacidad antioxidante total del alimento (Nicoli et al., 1999). A continuación se describen los posibles efectos del procesado de alimentos sobre la capacidad antioxidante total:

1) Sin efecto

En algunos procesos el tratamiento causa pequeños o ningún cambio en el contenido y la actividad de antioxidantes naturales. Este es el caso de algunos carotenoides, como el licopeno y el β -caroteno, que resultaron ser muy estable al calor, incluso después de intensos o prolongados tratamientos térmicos, tales como procesos de esterilización o de cocción (Yen, 1985).

2) Pérdida de antioxidantes naturales

En la mayoría de los casos, la elaboración de alimentos a nivel industrial o incluso durante la preparación de comidas en el hogar, pueden ser responsables de una pérdida significativa de antioxidantes naturales. Esto se debe al hecho de que la mayoría de los compuestos son relativamente inestables. Una gran cantidad de literatura trata de la oxidación química y/o degradación térmica del ácido ascórbico como consecuencia del escaldado, cocción, pasteurización, esterilización, deshidratación y congelación (Lathrop, 1980; Van den Broeck et al., 1998). Los datos sobre los efectos adversos de la luz, el oxígeno y el calor en la oxidación de polifenoles y tocoferoles, y la pérdida de actividad de vitamina A, como consecuencia de isomerización de β -caroteno, también han sido reportadas. Otra causa del decaimiento de antioxidantes en las frutas y hortalizas tratadas térmicamente está representado por el consumo de ácido ascórbico y polifenoles como reactivos en la reacción de Maillard (Dijilas & Milic, 1994). Desafortunadamente, hay pocos datos disponibles sobre los cambios en antioxidantes naturales en frutas y hortalizas mínimamente procesadas. Cabe señalar que el consumo de estos alimentos está aumentando rápidamente en muchos países desarrollados y representa, en algunos casos, una de las principales fuentes de frutas y hortalizas en la dieta de las personas. Las

operaciones tales como pelado, corte y corte en rodajas se estima que inducen un rápido agotamiento enzimática de varios antioxidantes naturales (es decir, ácido ascórbico, polifenoles, etc)]; esta pérdida es probablemente disminuida por la adopción de nuevos procedimientos de conservación mínima, tales como el envasado en atmósfera modificada y almacenamiento en frío.

3) Mejora de las propiedades antioxidantes de antioxidantes naturales

Este evento parece estar relacionado con la presencia de polifenoles en la cual las propiedades antioxidantes pueden haber sido modificadas como consecuencia de su estado de oxidación. Se ha reportado que las propiedades antioxidantes del vino tinto aumentan o disminuyen dependiendo de las condiciones de almacenamiento (Manzocco et al., 1999). Del mismo modo, las propiedades antioxidantes de la leche pasteurizada y los extractos de té embotellado en aire se encuentra en aumento en un período de 30 días de almacenamiento (Manzocco et al., 1998). A pesar que las oxidaciones químicas o enzimáticas han sido ampliamente demostradas causar una disminución progresiva en las propiedades antioxidantes del polifenol, polifenoles con un estado de oxidación intermedio pueden presentar mayor eficiencia de barrido radical que las que no se oxidan. El aumento de la propiedad antioxidante en determinados polifenoles oxidados han sido mencionadas (Kikugava et al., 1990). También se ha observado que la catequina cuando se someten a una oxidación enzimática progresiva muestra un notable incremento en su actividad de rompimiento de cadenas en la formación de compuestos macromoleculares marrón. Una pérdida posterior de las propiedades antioxidantes se encontró para etapas de oxidación enzimática más avanzadas. Variaciones similares, con una tasa más baja, fue encontrado para la catequina que se sometió a oxidación química. Las propiedades antioxidantes más altas de los polifenoles parcialmente oxidados pueden ser atribuidos a su mayor capacidad para donar un átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo aromático a un radical libre y/o a la capacidad de sus estructuras aromáticas para soportar el electrón desapareado a través de la deslocalización alrededor del sistema π -electron. El procesado y/o tiempos de almacenamiento prolongados pueden promover o

mejorar la progresiva oxidación enzimáticas o químicas de los compuestos fenólicos; estas reacciones proceden a un ritmo diferente en función de algunas variables intrínsecas de alimentos, así como sobre las condiciones de procesamiento (a_w , pH, tiempo, temperatura, disponibilidad de oxígeno, etc.). Por lo tanto, el aumento o la disminución de las propiedades antioxidantes de polifenoles que contienen en general los productos son consecuencias de las reacciones de oxidación misma. En la figura 2, la evolución de las propiedades antioxidantes de los alimentos que contienen polifenoles debido tanto a la oxidación enzimática o química son esquematizados. En el caso de la oxidación química, los cambios en las propiedades antioxidantes a dos temperaturas diferentes se consideran. Parece evidente que el potencial antioxidante de los polifenoles de un alimento puede variar considerablemente dependiendo de su historia o, al menos, cuando se consume. Sobre la base de estas consideraciones, la falta de evidencia científica clara para el papel de los polifenoles como compuestos que protegen la salud, podría atribuirse en parte a la fluctuación de sus propiedades antioxidantes, en los productos alimenticios (Nicoli et al., 1999).

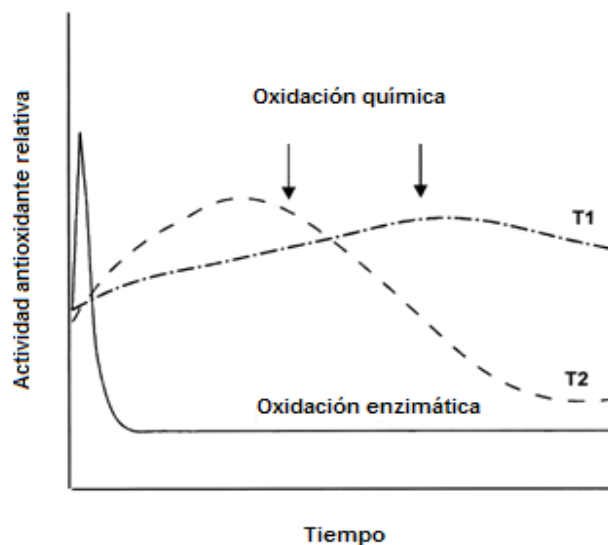


Figura 2. Cambio en la actividad antioxidante de un alimento que contiene polifenoles por oxidación química y enzimática. La oxidación química se muestra a dos diferentes temperaturas $T1 < T2$. (Nicoli et al., 1999)

4) Formación de nuevos compuestos con actividad antioxidante

Productos de la reacción de Maillard (PRM), que puede ser formado como consecuencia de un tratamiento intenso calor o periodos largos de almacenamiento, generalmente presentan fuertes propiedades antioxidantes (Eichner, K., 1981; Kim & Lee, 2009; Nicoli et al., 1997). Los datos sobre sus efectos en la salud humana son muy contradictorios. Dependiendo de la composición de los alimentos y condiciones de procesamiento, se han encontrado tener actividad mutagénica o antimutagénico. En este último se ha encontrado que está estrechamente relacionada con su actividad antioxidante (Usman & Hosono, 1997; Wagner et al., 2007). A pesar de la gran cantidad de PRM consumidos a diario en la dieta de una persona, sus efectos sobre la salud humana han sido escasamente investigados. De hecho, la mayor parte de la amplia labor realizada en las propiedades antioxidantes de los PRM se ha centrado en la mejora de la oxidación y la estabilidad microbiológica de los alimentos. De acuerdo con la literatura, la actividad antioxidante de los PRM se puede atribuir principalmente al de alto peso molecular de los compuestos pardeados, que se forman en las etapas avanzadas de la reacción [45].

5) Formación de nuevos compuestos con actividad pro-oxidante

Más allá de sus propiedades antioxidantes, los PRM también pueden exhibir propiedades pro-oxidantes (Puscasu & Birlouez, 2002). Los radicales altamente reactivos se forman en las primeras etapas de la reacción de Maillard justo antes de la reordenación de Amadori, y su desaparición va acompañada de un desarrollo gradual de pardiamiento. Una reducción en las propiedades antioxidantes iniciales a través de la formación de compuestos con propiedades pro-oxidantes parece ser de considerable interés en lo que respecta a las bajas temperaturas o tratamientos térmicos de corta duración. La figura 3 muestra los cambios en las propiedades antioxidantes de una matriz vegetal a diferentes temperaturas de calentamiento. La formación de pro-oxidantes durante las primeras fases de la reacción de Maillard pueden depender de la intensidad y

duración del tratamiento térmico: cuando el calentamiento a bajas temperaturas se aplica, las fases que contribuyen a la formación de compuestos con propiedades pro-oxidantes duran más que en el caso de los tratamientos de altas temperaturas. En todos los casos, durante la formación de pro-oxidantes no se detectaron cambios en el color (Nicoli et al., 1999).

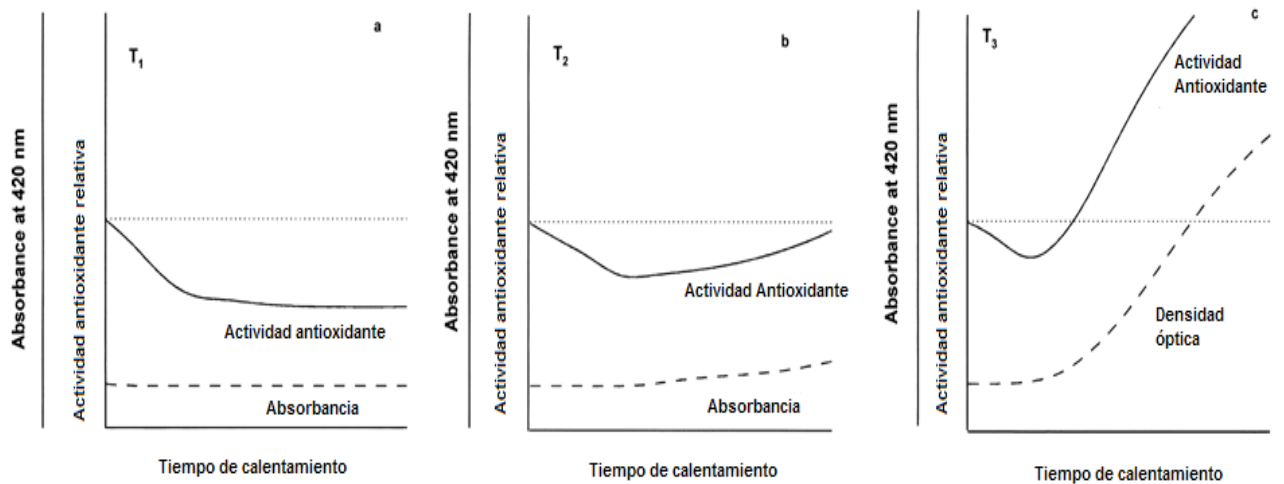


Figura 3. Cambios en la actividad antioxidante y en la absorbancia de un sistema modelo glucosa-fructosa-ácido glutámico debido al desarrollo de diferentes etapas de la reacción de Maillard (a, b y c). Calentamiento a temperaturas $T_3 > T_2 > T_1$. (Nicoli et al., 1999)

6) La interacción entre los diferentes componentes de los alimentos

Estos están representados principalmente por las reacciones redox, tales como las que ocurren entre diferentes antioxidantes naturales o antioxidantes y productos de la oxidación lipídica (Nicoli et al., 1997). Estos eventos, que tienen lugar principalmente en diferentes matrices alimentarias, se mezclan entre sí (por ejemplo, fase acuosa y fase lipídica), y tienen consecuencias impredecibles en las propiedades antioxidantes y la estabilidad del alimento. El procesamiento puede promover o mejorar estas reacciones. Se ha observado que cuando una pequeña cantidad de aceite de oliva es mezclada con puré de tomate, el contenido de ácido ascórbico disminuye después de un almacenamiento de unas pocas horas. Esto es debido a la habilidad de estos compuestos para reducir las formas radicales de

alfa-tocoferol contenidos en la matriz lipídica (Nicoli et al., 1999b). Esta hipótesis se ve confirmada por el menor valor de potencial redox estándar del radical ascorbilo en comparación a la del radical α -tocoferolxil. Además, al estudiar las propiedades antioxidantes de los alimentos complejos, hay que tener en cuenta que los antioxidantes solubles en agua puede proteger los lípidos mejor que los antioxidantes liposolubles, debido a la llamada "paradoja polar". La interacción entre la matriz vegetal y la fracción lipídica, llegan a ser más evidentes cuando se calientan; en este caso, un incremento considerable en la estabilidad de la fracción lipídica fue logrado en detrimento de las propiedades antioxidantes a nivel general. La figura 4 muestra un ejemplo de las diferentes y simultaneas reacciones que pueden ocurrir en matrices vegetales cuando son sometidas a tratamientos térmicos. Para tratamientos térmicos cortos se presenta una reducción en el total de las propiedades antioxidantes debido a la pérdida de antioxidantes naturales y/o a la formación de pro-oxidantes de la reacción de Maillard. Con tiempos de calentamiento más prolongados, esta pérdida puede ser minimizada por una recuperación o incluso una mejora de la actividad antioxidante debido a la formación de PRM (Nicoli et al., 1999).

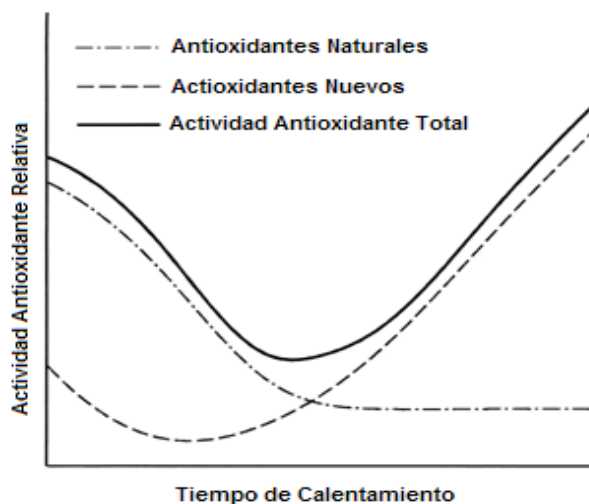


Figura 4. Cambios en la actividad antioxidante debido a diferentes y simultaneos eventos en una matriz vegetal sujeta a calentamiento. (Nicoli et al., 1999)

El impacto del procesamiento sobre la actividad antioxidante de frutas y hortalizas es un área descuidada y la información es escasa. Por lo tanto es imperativa la evaluación de la influencia del procesado en la actividad antioxidante en la optimización de las condiciones tecnológicas para aumentar o mantener su actividad y biodisponibilidad (Kaur & Kapoor, 2001).

1.2.5 Perspectivas de los antioxidantes

La industria alimentaria puede desempeñar un papel importante en la mejora de la calidad nutricional, diseñando alimentos que no sólo proporcionen los nutrientes tradicionales (proteínas, grasas e hidratos de carbono), sino también fitonutrientes. El concepto de actividad antioxidante en los alimentos procesados está cobrando fuerza y emerge como un parámetro importante para evaluar la calidad de los productos. Con la expansión del mercado mundial y la competencia entre las empresas multinacionales, el parámetro de la actividad antioxidante pronto asegurará su lugar en el etiquetado nutricional. Esto dará un nuevo impulso a la explotación de frutas y hortalizas y al desarrollo de nutracéuticos y bebidas. (Kaur & Kapoor, 2001). Para el caso de Colombia es necesario empezar a elaborar una base de datos de los valores de actividad antioxidante de las frutas y hortalizas de nuestro país y de esta manera contribuir con el fortalecimiento del sector ya que actualmente no se cuenta con unos registros de este tipo.

1.3 BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS

Gran parte de los microorganismos utilizados en la industria de alimentos están relacionados con las bacterias ácido-lácticas (BAL), empleándolas para fermentar o crear cultivos de alimentos y han despertado gran interés al ser empleadas en la industria farmacéutica y de alimentos para la obtención de ácido láctico, componentes saborizantes, espesantes y bacteriocinas, así como el considerable valor nutritivo y el bajo coste energético de su producción. Los géneros más importantes son: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*,

Pediococcus, *Leuconostoc*, y *Bifidobacterium*. Su uso más corrientes en todo el mundo se ha aplicado a los productos lácteos fermentados, como el yogurt, el queso, la mantequilla, la crema de leche, el kefir y el kumis.

Las BAL son un conjunto de bacterias Gram-positivas, no esporuladas, en forma de cocos o bastones y catalasa negativa (aunque en algunos casos pueden encontrarse una pseudo-catalasa), con un metabolismo estrictamente fermentativo produciendo ácido láctico como el mayor producto final de la fermentación de los azúcares vía Embden-Meyer –glucólisis- (homofermentación), y en otras ocasiones producen además etanol, acetato y CO₂ por la vía del ácido-6-fosfogluconico (heterofermentación), (Larpen, 1995). En términos generales estas bacterias tienen complejas necesidades de factores de crecimiento: vitamina B, aminoácidos, péptidos, bases púricas y pirimídicas. Esta es una de las razones del porqué abundan en un medio tan rico nutricionalmente como la leche. A nivel de laboratorio se deben emplear medios selectivos que posean estas características para su aislamiento (por ej., el caldo o agar MRS, agar Rogosa). Otra característica de este grupo de bacterias es su tolerancia al pH ácido (pH = 5, incluso a veces menores), pero conforme el medio se va acidificando, resultan inhibidas un mayor número de especies (Cabeza, 2006).

Durante la última década se ha incrementado el número de estudios sobre el rol que algunas cepas de BAL pudieran ser empleadas como cultivos probióticos, debido al creciente interés específicamente en la utilización de microorganismos probióticos en los alimentos por sus acreditados beneficios. La mayoría de los probióticos pertenecen a los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, sin embargo, especies pertenecientes a los géneros de *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Saccharomyces*, y *Propionibacterium* son también considerados debido a sus efectos en la promoción de la salud. (Vasiljevic & Shah, 2008).

1.3.1 Microorganismos probióticos

Los microorganismos probióticos han sido reconocidos por sus efectos benéficos en la salud. El término “probiótico” fue empleado por primera vez por Kollath

(1953) para describir la restauración de la salud de pacientes malnutridos por diferentes suplementos orgánicos e inorgánicos. Un año más tarde Vergin (1954), empleó esta palabra cuando comparaba los efectos adversos que los antibióticos (“antibiotika”), ejercían sobre la microbiota intestinal con las acciones beneficiosas (“probiotika”), ejercida por otros factores que no pudo determinar. Una década más tarde, Lilly y Stillwell (1965), se referían a los probióticos como microorganismos que promovían el crecimiento de otros microorganismos. Ya en la década de los 80s y 90s surgen diversas definiciones, destacándose las citadas por Fuller (1992), quien los definió como “aquellos suplementos alimenticios integrados por microorganismos vivos que afectan beneficiosamente al hospedador que los consume mediante la mejora de su equilibrio microbiano intestinal”. Actualmente son definidos por la FAO y la OMS como “Microorganismos vivos que cuando son administrados en cantidades adecuadas confieren al huésped beneficios para la salud” (FAO/WHO, 2002). Esos beneficios incluyen el control de los niveles de colesterol sérico e infección intestinal, beneficio en el sistema inmune, mejoramiento en la utilización de la lactosa y propiedades anti-carcinogénicas (Vasiljevic & Shah, 2008). Dentro de estos microorganismos probióticos se encuentran los *Lactobacillus acidophilus*. Sin embargo, se recomienda que para alcanzar efectos benéficos las bacterias probióticas deben estar presentes en una cantidad mayor a 10^6 unidades formadoras de colonia por gramo o por mililitro de producto (Ouweland & Salminen, 1998).

1.3.2 Especie *Lactobacillus acidophilus*

El *Lactobacillus acidophilus* es una bacteria del género *Lactobacillus*, con temperaturas óptimas de crecimiento que se mueven entre 35 a 40°C, sin embargo también pueden crecer a temperaturas tan altas como 45°C; en cuanto a su pH, ellos crecen entre 4,5 y 6,5 siendo el óptimo de 5,5 a 6,0, parando su crecimiento a pH de 3,6 a 4,0 y presentando una tolerancia a la acidez entre 0,3% y 1.9% (Shah, 2003).

Cepas específicas de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y también algunas cepas de *Propionibacterium* han sido introducidas como probióticos en productos alimenticios debido a su evidencia en el beneficio a la salud (Alvarez-Olmos y Oberhelman, 2001). El *Lactobacillus* en forma natural no se encuentra en el tracto intestinal del humano y también tienen a lo largo de la historia un uso en alimentos y productos fermentados. Es deseable que este tipo de bacterias posean un adecuado aspecto general (origen, identidad, seguridad, y resistencia a la acidez y bilis), aspectos técnicos (propiedades de crecimiento in vitro y durante el procesado), y características funcionales y benéficas (Holzapfel & Schillinger, 2002). Previos trabajos han mostrado que el *Lactobacillus* puede poseer capacidad inhibitoria hacia el crecimiento de bacterias patógenas, resistencia a acidez y bilis, adherencia a las células epiteliales intestinales y efectos positivos sobre el huésped (Finlay & Falkow, 1989; Gorbach, 1996).

La selección adecuada del probiótico es la principal base para mejorar las acciones terapéuticas y propiedades funcionales de los alimentos con probióticos y productos farmacéuticos. Las características esenciales para que el *Lactobacillus* sea usado como probiótico durante una fabricación incluyen los siguientes factores: 1. Reconocimiento como seguro, 2. Viabilidad durante el procesado y almacenamiento, 3. Efecto antagonista contra los patógenos, 4. Tolerancia al cambio de acidez y bilis y 5. Adherencia al epitelio intestinal (Lin Hwang, Chen, y Tsen, 2006)

Para sobrevivir y colonizar el tracto gastrointestinal las bacterias probióticas deberían expresar alta tolerancia a la acidez y bilis y tener la habilidad para adherirse a la pared intestinal (Kirjavainen Ouwehand, Isolauri, & Salminen, 1998). La habilidad para sobrevivir y colonizar temporalmente el tracto gastrointestinal de los humanos ha sido demostrado por algunas bacterias ácido lácticas como es el caso del *Lactobacillus acidophilus* (Xiaodong Pan et al, 2009), es por esta razón que se ha elegido esta bacteria para ser usada como probiótico en el presente proyecto y al apoyo brindado por la empresa DANISCO, fabricante de esta cepa, facilitándonos su adquisición.

1.3.3 El mercado de los microorganismos probióticos

La preferencia de los consumidores por productos que contengan microorganismos probióticos ha contribuido a una extensión de la variedad de productos probióticos disponibles en el mercado durante los últimos años. Se ha estimado que hay aproximadamente 70 productos en el mundo que tienen registrado en su contenido probióticos y la lista está en continua expansión (Shah, 2004). Uno de los mercados más explotados en el uso de los cultivos probióticos es el de la industria láctea los cuales lo usan como una herramienta para el desarrollo de productos funcionales y han sido los responsables de ventas de alrededor de US\$1.35 billones en 1999 y cerca del 56% de las ventas de alimentos funcionales en el 2004 por un total de 31.1 billones US\$ (Siró *et al.*, 2008). Los principales mercados de estos tipos de productos son Escandinavia, Holanda, Suiza, Croacia, Estonia, mientras Grecia, Francia y España son consideradas como mercado en desarrollo (Makinen-Aakula, 2006). Colombia actualmente cuenta en el mercado nacional con una reducida variedad de estos productos en comparación con los mercados mencionados anteriormente y gran parte de ellos utilizan como base productos lácticos, sin embargo se ha tenido un creciente interés en el uso de este tipo de microorganismos en productos no lácteos y en temas de investigación relacionados con ellos, en donde la Universidad Nacional en compañía con el Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos (ICTA) han contribuido con el desarrollo de estos temas como es el caso del yogurt de soya (Mendoza & Mancera, 2002) y del presente proyecto en donde uno de sus objetivos es la adición de probióticos a una mezcla de pulpa de fruta y hortaliza.

1.3.4 Microorganismos probióticos en productos no lácteos sin fermentación

Tradicionalmente los probióticos han sido utilizados principalmente en los productos lácteos sin embargo otros alimentos han sido examinados recientemente incluyendo la mayonesa, comestibles para untar, carne, queso,

jugos de frutas, helados de crema, productos a base de avena, entre otros (Rodgers, 2007). Gran parte de su aplicación es enfocada en la industria láctea, sin embargo estos tipos de productos a base de leche poseen ciertas inconvenientes por su contenido de lactosa y grasas a un porcentaje de la población (Heenan et al., 2004), por esta razón se han buscado otros tipos de alimentos como son las frutas y vegetales. Para el caso de los jugos de fruta, Tuorila y Cardello (2002), lo sugieren como un medio apropiado para fortificarlo con probióticos, debido a su ya reconocido beneficio para la salud y su frecuente consumo por un gran porcentaje de la población. Sin embargo, se ha reportado la presencia de aromas y sabores indeseable conocidos como “*off-flavours*” para el caso del *Lactobacillus plantarum* al ser adicionado a jugos de naranja, prefiriendo el consumidor las características sensoriales convencionales del jugo a su contraparte funcional, con la diferencia que si es dado a conocer la información de los efectos beneficiosos a la salud, se incrementa la preferencia al jugo funcional por encima del convencional (Luckow and Delahunty, 2004). En otro estudio se reporta que la adición de un 10% v/v de jugo de fruta tropical puede enmascarar los sabores indeseables causados por los probióticos (Luckow et al., 2006). Estudios realizados por Sheehan et al. (2007), muestran que hay una amplia diferencia respecto a la resistencia a la acidez de las *bifidobacterium* con respecto a los *lactobacillus* cuando son agregados a jugos de naranja, piña y arándano. Las cepas adicionadas al jugo de naranja y piña sobrevivieron por más tiempo comparado con el de arándano; el *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei* presentaron cantidades por encima de 7.0 log cfu/ml en jugo de naranja y por encima de 6.0 log cfu/ml en jugo de piña dentro de los primeras 12 semanas almacenadas a 4°C, la tabla 5 muestra algunos resultados obtenidos en donde se puede apreciar en forma general una mayor resistencia y viabilidad del género *Lactobacillus* frente al *bifidobacterium*. Sin embargo, después de realizar pasteurización a 76°C por 30 s y 90°C por 1 min y tratamiento a alta presión por 400 MPa por 5 min *Lb. casei*, *Lb. rhamnosus* y *Lb. Paracasei* no

resistieron los tratamientos de tal forma que no alcanzaron un nivel por encima de 6.0 log cfu/ml.

Tabla 5. Número (log₁₀), de microorganismos probióticos en JN (jugo de naranja pH 3.65) y JP (jugo de piña pH 3.40) por 12 semanas a 4°C (Sheehan et al., 2007)

Almacenamiento (semanas)	<i>L. salivarius</i> UCC118		<i>L. salivarius</i> UCC500		<i>B. lactis</i> Bb-12		<i>L. casei</i> DN-114-001		<i>L. rhamnosus</i> GG		<i>L. paracasei</i> NFBC43338	
	JN	JP	JN	JP	JN	JP	JN	JP	JN	JP	JN	JP
0	7.9 ± 0.4	7.9 ± 0.1	8.2 ± 0.2	8.3 ± 0.1	7.6 ± 0.4	7.6 ± 0.2	8.0 ± 0.2	8.2 ± 0.1	7.9 ± 0.1	7.9 ± 0.1	8.4 ± 0.1	8.4 ± 0.1
1	6.6 ± 1.0	3.3 ± 0.1	7.2 ± 0.4	3.5 ± 0.1	7.4 ± 0.3	7.6 ± 0.1	8.0 ± 0.2	8.1 ± 0.1	7.9 ± 0.1	7.7 ± 0.2	8.4 ± 0.2	8.3 ± 0.1
2	0.7 ± 1.1	n.d.	4.8 ± 0.3	n.d.	7.5 ± 0.3	7.4 ± 0.1	8.0 ± 0.1	8.0 ± 0.2	7.9 ± 0.1	7.6 ± 0.2	8.3 ± 0.1	8.2 ± 0.2
4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	7.3 ± 0.2	6.5 ± 0.1	8.0 ± 0.1	8.1 ± 0.2	8.0 ± 0.2	7.7 ± 0.2	8.2 ± 0.3	8.2 ± 0.2
6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	6.9 ± 0.1	3.0 ± 0.4	7.9 ± 0.1	8.1 ± 0.1	7.8 ± 0.2	7.6 ± 0.2	8.2 ± 0.3	8.1 ± 0.2
10	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4.8 ± 0.4	n.d.	7.8 ± 0.2	7.2 ± 0.4	7.8 ± 0.1	7.1 ± 0.3	7.6 ± 0.2	7.7 ± 0.5
12	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	7.8 ± 0.3	6.3 ± 0.3	7.9 ± 0.2	6.3 ± 0.4	7.4 ± 0.2	7.4 ± 0.5

1.4 PROCESAMIENTO INDUSTRIAL DE FRUTAS Y HORTALIZAS

En cuanto a los procesos productivos industriales que siguen las industrias del sector hortofrutícola para la elaboración de productos procesados, en la figura 5 se hace una breve descripción de las operaciones básicas asociadas al procesamiento de frutas frescas.

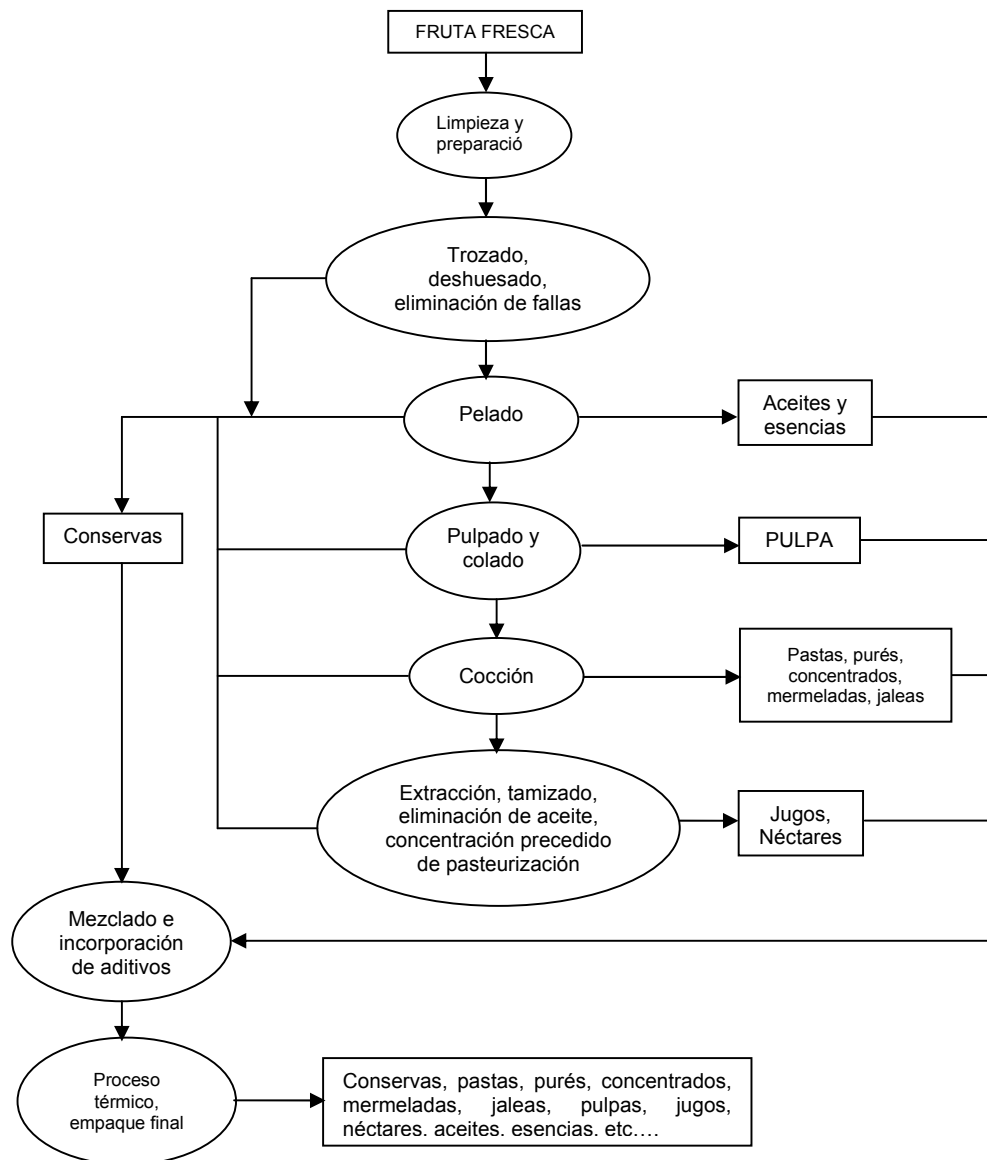


Figura 5. Procesamiento industrial de frutas frescas (Ministerio de Agricultura, 2005)

Dependiendo de su uso final, las frutas y hortalizas frescas pueden ser sometidas a diversos procesos industriales, resumidos a continuación (Ministerio de Agricultura, 2005):

- Conservería de frutas y hortalizas.
- Deshidratación de frutas y hortalizas.
- Elaboración de jugos clarificados concentrados de frutas.
- Elaboración de pulpas y mermeladas de frutas y de pastas de hortalizas.
- Congelación de frutas y hortalizas.
- Sulfitado y confitado de frutas.
- Acetificación y/o fermentación de hortalizas.

Para cada tipo de fruta y hortaliza hay uno o más procesos de industrialización. Es posible, sin embargo, identificar algunos procesos unitarios básicos, que se repiten en los diferentes procesos de industrialización y que tienen características similares, estos son (Ministerio de Agricultura, 2005):

1. Limpieza y preparación preliminares
2. Limpieza e inspección
3. Trozado, deshuesado, eliminación de fallas y corte: Algunas materias primas deben trozarse en tamaños específicos; los sobrantes pueden usarse o descartarse. Esta etapa se realiza habitualmente en forma manual. El deshuesado, eliminación de fallas y cortado, son normalmente procesos mecánicos.
4. Pelado: La remoción de la cáscara puede ser manual, física, mecánica o química. Esta última se utiliza para los productos más frágiles (por ej.: tomates y duraznos).
5. Preparación y transporte: Antes de entrar al proceso final, los productos son inspeccionados para asegurar la calidad. En la planta, el transporte se efectúa mediante bombeo, canales o cintas transportadoras.
6. Escaldado: Esta etapa consiste en exponer el producto a una alta temperatura por un período breve y posterior enfriamiento. Se utiliza agua

caliente para vegetales enlatados y vapor para hortalizas congeladas y deshidratadas. El principal propósito de este proceso es inactivar o retardar la acción de bacterias y enzimas que provocan una rápida pérdida de calidad. Efectos secundarios positivos del escaldado son la eliminación de aire y gases del producto. Después del blanqueo, el producto se enfría rápidamente para prevenir el deterioro del sabor y del color. Para el caso de la espinaca se reporta que con escaldado en agua se perdió más nitrato, riboflavina y ácido ascórbico que con el escaldado con vapor pero no afectó el contenido de carotenos (Hosotani et al., 1992). En otro estudio, en donde se realizó escaldado en agua a la zanahoria a temperatura de 80°C, se encontró que un tiempo de 6 minutos era adecuado para su tratamiento (Goncalves et al., 2010).

7. Pulpado y colado: Sólo se efectúa para algunos productos específicos (por ej.: pulpa de manzana y alimentos infantiles) y consiste en la molienda de la fruta y/o verdura.
8. Cocción: La cocción y otros métodos de calentamiento de los productos también se efectúan en casos específicos (por ej.: pasta de tomate).
9. Mezclado e incorporación de aditivos
10. Inspección final y envasado
11. Proceso térmico

Por lo tanto, y debido a que no se cuenta con un proceso ya establecido para la elaboración de pulpa de hortaliza, se tienen en cuenta estas etapas y las de la elaboración de la pulpa de fruta para su obtención y ejecución en este trabajo.

1.4.1 Pulpa de Fruta

La pulpa de fruta se define como el producto no fermentado, pero fermentable, obtenido mediante la desintegración y el tamizado de la parte comestible de frutas frescas, o preservadas adecuadamente, sanas y limpias, sin remover el jugo (Ministerio de salud, 1991). En la figura 6, se presenta un esquema de las operaciones generales para la elaboración de pulpa de fruta:

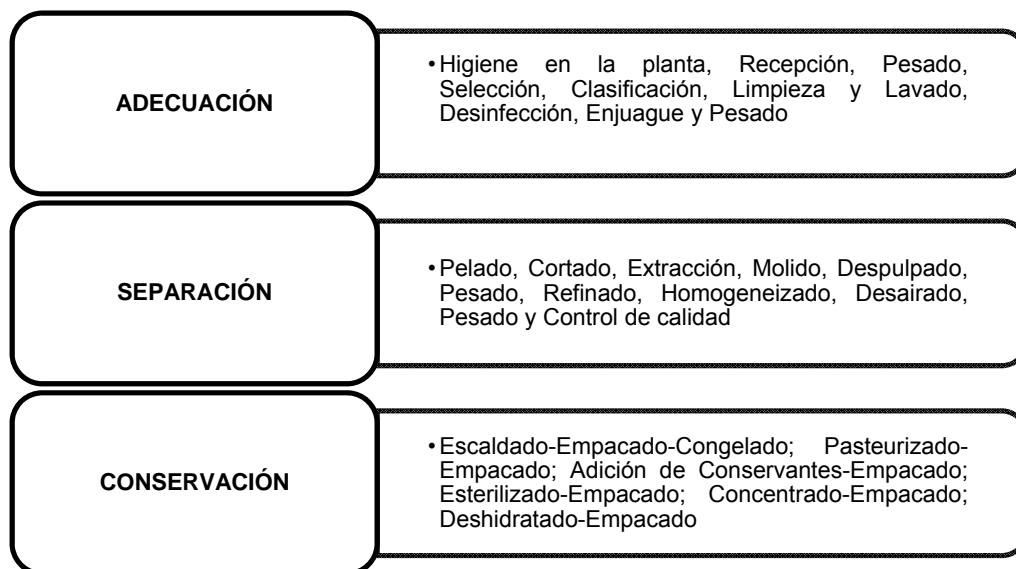


Figura 6. Operaciones generales en la obtención de pulpas (Camacho, 1992)

A continuación se describen brevemente la mayor parte de estas etapas (Camacho, 1992), teniendo en cuenta su posible aplicación en la elaboración de la pulpa de hortaliza:

1.4.1.1 Higiene y sanidad en la planta

Naturalmente el sitio donde se vaya a realizar la desinfección debe estar ordenado e higienizado. Esta limpieza del sitio se inicia con la ordenación de los elementos presentes. Sigue un barrido de toda mugre gruesa presente en el piso y áreas vecinas como techos, paredes, puertas, rejillas y sifones. Esta limpieza se realiza comenzando por las áreas altas (techo) e ir bajando hasta terminar en el piso y los sifones. Sigue un jabonado con detergentes o jabones que ablandan y retiran la mugre. Si hay resistencia se debe aplicar el refregado fuerte y en orden todas las áreas. Se termina con un enjuague a fondo. Si la operación ha sido bien hecha el aroma del ambiente debe ser a limpio. Además de las áreas, son críticos la higienización de los operarios, materiales y equipos que entraran en contacto con

la fruta. Entonces las operaciones explicadas antes se repiten con el mismo cuidado para guantes, petos y botas de operarios, equipos y materiales.

1.4.1.2 Recepción

La recepción se lleva a cabo preferiblemente en la planta de manera cuidadosa evitando posibles daños a la fruta y garantizando que se encuentre en buen estado la mayor parte.

1.4.1.3 Pesado

Permite conocer con exactitud la cantidad de materia prima que entrega el proveedor y a partir de esta cantidad se podrá conocer los porcentajes de la calidad de fruta que este suministra. Se espera que el mínimo sea fruta deteriorada o verde que no madure. También con este dato se podrá determinar el rendimiento en pulpa que esa variedad de fruta posee. Se efectúa con cualquier tipo de balanza de capacidad apropiada y de precisión a las centenas o decenas de gramo. La forma de pesar puede ser en los mismos empaques en que la fruta llega a planta o pasándola con cuidado a los empaques adecuados de la fábrica que se puedan manejar y apilar cómodamente. Debe evitarse el manejo brusco de los empaques para evitar magulladuras o roturas.

1.4.1.4 Selección

Se hace para separar las frutas sanas de las ya descompuestas. Se puede efectuar sobre mesas o bandas transportadoras y disponiendo de recipientes donde los operarios puedan colocar la fruta descartada. Los instrumentos para decidir cuáles frutas rechazar son en principio la vista y el olfato de un operario. El debe ser muy consciente de la responsabilidad de su trabajo e influencia en la calidad de la pulpa final. Hay ciertas frutas costosas que por su tamaño grande

pueden pasar la prueba pero deben ser “arregladas” retirando cuanto antes las fracciones dañadas.

1.4.1.5 Clasificación

Permite separar entre la materia prima que pasaron la selección, aquellas que están listas para proceso, según su madurez, tamaño, peso, calidad u otras características; para el caso de las frutas verdes o aún pintonas, éstas deben ser almacenadas. Aquí también los instrumentos más ágiles y económicos son los sentidos de los operarios. El color, aroma o dureza de las frutas permiten elegir las frutas adecuadas. Estas características exteriores específicas de las frutas se pueden comprobar por controles en el laboratorio, que responden a un grado de madurez adecuado para la obtención de pulpas de alta calidad. Una guayaba amarilla, sana, olorosa y ligeramente blanda le indica al operario que es adecuada para proceso.

1.4.1.6 Limpieza y lavado

Todas las frutas a ser procesadas deben ser liberadas de la tierra adherida, jugo seco, insectos y residuos químicos. Estas etapas usan tanto procesos secos como húmedos, así como operaciones mecánicas y manuales. Se pueden realizar baños de agua y aspersion a presión, mientras la materia prima se traslada en cintas transportadoras o se pasa a través de tamices agitados. El objetivo es retirar toda mugre o tierra que contamine la superficie de las frutas y así disminuir la necesidad de desinfectante en el paso siguiente

1.4.1.7 Desinfección

El propósito es disminuir al máximo la contaminación de microorganismos que naturalmente trae la materia prima, para evitar altos recuentos en la pulpa final,

con demérito de su calidad y peligro de fermentación en la cadena de distribución o en manos del consumidor final.

La desinfección se efectúa empleando materiales y sustancias compatibles con las frutas. Las sustancias desinfectantes que se pueden emplear son a base de cloro, sales de amonio cuaternario, yodo y otra serie de principios activos que cada día llegan al mercado. El hipoclorito de sodio a partir de solución al 13% es el desinfectante más empleado por su efectividad y bajo costo. En la desinfección rutinaria se puede intercalar el uso de desinfectantes para evitar que la flora contaminante cree resistencia a una sustancia.

Una vez higienizado todo, se procede a desinfectar las frutas que se hallan en cestillos. Estas se pueden sumergir en la solución desinfectante durante un tiempo adecuado que pueden ser 5 a 10 minutos, dependiendo de las características de la materia prima y estado de suciedad.

La solución de hipoclorito puede tener una concentración de 50 mg/kg. La efectividad de esta solución disminuye a medida en que se sumergen más cestillos. La rotación sugerida es de tres lotes. Es decir que si hay un tanque de hipoclorito fresco de 50 ppm, se puede sumergir un lote de cestillos con fruta u hortaliza, dejarlo el tiempo escogido y retirarlo. Introducir otro lote de cestillos y así repetir por tres lotes. El indicador de si la solución desinfectante aún sirve es determinar que posea el olor característico de cloro y que no se halle muy sucia a simple vista. Si se deja la misma solución mucho tiempo lo que se puede estar haciendo es ensuciar e infectar los últimos lotes que se sumergen en la que era una solución desinfectante.

1.4.1.8 Enjuague

A la fruta desinfectada se le debe retirar los residuos de desinfectante y microorganismos mediante lavado con agua potable. Si es posible por aspersion con agua que corra y se renueve. No es conveniente enjuagarla sumergiéndola en tanques de agua que cada vez estará más contaminada.

1.4.1.9 Pelado

A otras frutas hay necesidad de retirarles la cáscara como a la guanabana y papaya, por su incompatibilidad de color, textura o sabor al mezclarla con la pulpa. Esta operación puede efectuarse de manera manual o por métodos físicos, mecánicos o químicos. El pelado manual se puede realizar con cuchillos comunes de cocina o con otros que presentan ciertas características que se ajustan al tipo de piel de algunas frutas. Estos son similares a los que hoy se emplean para pelar papas. Permiten cortar películas de cierto grosor, evita que el operario por descuido se corte, tienen formas especiales para acceder a superficies curvas y poseen empuñaduras ergonómicas, es decir que se ajustan muy bien a la mano del operario. Los métodos físicos emplean calor y frío, por ejemplo el tomate de mesa. Los mecánicos usan máquinas especialmente diseñadas para determinadas geometrías y texturas. Los métodos químicos emplean sustancias como la soda a diferentes temperaturas y concentraciones. Cada lote de fruta es específico y necesitaría de varios ensayos para determinar las condiciones adecuadas.

1.4.1.10 Separación

Esta operación permite retirar la masa pulpa-semilla de frutas como el maracuyá, curuba o lulo. Se efectúa generalmente de forma manual con la ayuda de cucharas de tamaños adecuados. El rendimiento aumenta si se hace dentro de recipientes plásticos para evitar las pérdidas de jugos. Por eficiencia los operarios se colocan en grupos que se encargan unos de cortar la fruta y otros de separar la pulpa-semilla. Estas masas obtenidas se deben cubrir con tapas o materiales plásticos para prevenir contaminaciones u oxidaciones del medio ambiente.

1.4.1.11 Corte

Algunas frutas como el maracuyá deben ser cortadas para extraer su masa interior antes de separar la pulpa. Aunque hay máquinas que lo hacen, por lo general en las pequeñas industrias se realiza en forma manual con la ayuda de cuchillos.

1.4.1.12 Escaldado (Blanqueo)

Como se mencionó con anterioridad, consiste en someter la fruta a un calentamiento corto y posterior enfriamiento. Se realiza para ablandar un poco la fruta y con esto aumentar el rendimiento de pulpa.

En la fábrica el escaldado se puede efectuar por inmersión de las frutas en una marmita con agua caliente, o por calentamiento con vapor vivo generado también en marmita. Esta operación se puede realizar a presión atmosférica o a sobrepresión en una autoclave. Con el escaldado en agua caliente se pueden perder jugos y componentes nutricionales. Bajo vapor puede ser más costoso y demorado pero hay menos pérdidas. En autoclave es más rápido pero costoso.

En todos los casos se producen algunos cambios. Baja significativamente la carga microbiana; el color se hace más vivo, el aroma y sabor puede variar a un ligero cocido y la viscosidad de la pulpa puede aumentar.

Un escaldado frecuente se hace en marmita agregando mínima cantidad de agua, como para generar vapor y luego si se coloca la fruta. se agita con vigor, tratando de desintegrar las frutas y volver el producto una especie de “sopa”. Cuando la mezcla alcanza cerca de 70 a 75° C se suspende el calentamiento.

1.4.1.13 Molido

Permite la desintegración de las estructuras de las frutas y hortalizas que facilitan etapas como el escaldado y despulpado. Se puede efectuar en molinos como el de martillos, con el que se logra un efecto similar al de la licuadora casera o industrial. Este molido no es recomendado para frutas que poseen semillas grandes, oscuras, amargas y frágiles como el maracuyá, el mango o aún la

guanábana. Las frutas de semillas pequeñas como la guayaba, mora, lulo y tomate se desintegran muy bien sin romper las semillas. El molido tiene la desventaja de incorporar aire a la masa obtenida, con lo que se pueden acelerar procesos de oxidación entre los que se hallan el cambio de color y formación de espuma, ambos causan inconvenientes en la calidad final de la pulpa.

1.4.1.14 Macerado

Con esta operación se busca aumentar los rendimientos en pulpa. Se logra por la acción de enzimas naturales de la fruta o mediante adición de enzimas comerciales agregadas. También se emplea para disminuir la viscosidad de algunos jugos o pulpas para lograr su concentración a niveles superiores a 60 Brix, como en el caso de la mora, mango y maracuyá. En frutas como la guanabana que poseen, además de la pulpa y la semilla, los sacos donde se encuentran las semillas, que son de una textura no fluida llamada “mota” también se usa la maceración. Esta fracción está compuesta de fibras de celulosa, la cual se va disolviendo a medida que la fruta madura, con lo que se aumenta la proporción de pulpa fluida. El macerado se logra con mezclas de enzimas llamadas pectinolasas, amilasas y celulasas. Las condiciones de concentración de enzima, temperatura, pH y tiempo de acción óptimos varían de una fruta a otra. Los rendimientos aumentan en valores cercanos al 5-7% o más, dependiendo de las características de cada fruta. El costo por el empleo de enzimas puede considerarse alto, pero se recupera entre mayores sean los volúmenes tratados.

1.4.1.15 Despulpado

Es la etapa en la que se logra la separación de la pulpa de los demás residuos como las semillas, cáscaras y otros. El principio en que se basa es el de hacer pasar la pulpa-semilla a través de una malla. Esto se logra por el impulso que comunica a la masa pulpa-semilla, un conjunto de paletas (2 o 4) unidas a un eje que gira a velocidad fija o variable. La fuerza centrífuga de giro de las paletas lleva

a la masa contra la malla y allí es arrastrada logrando que el fluido pase a través de los orificios la malla. Es el mismo efecto que se logra cuando se pasa por un colador una mezcla de pulpa-semilla que antes ha sido licuada. Aquí las mallas son el colador y las paletas es la cuchara que repasa la pulpa-semilla contra la malla del colador. Se emplean diferentes tipos de despulpadoras; las hay verticales y horizontales; con cortadoras y refinadoras incorporadas; de diferentes potencias y rendimientos. Es importante que todas las piezas de la máquina que entran en contacto con la fruta sean en acero inoxidable. Las paletas son metálicas, de fibra o caucho. También se emplean cepillos de nylon. Durante el despulpado en este tipo de máquinas también se causa demasiada aireación de la pulpa, con los efectos negativos de oxidaciones, formación de espuma y favorecimiento del cambios de color y sabor en ciertas pulpas. El proceso de despulpado se inicia introduciendo la fruta entera en la despulpadora perfectamente higienizada. Solo algunas frutas, como la mora, guayaba o fresa, permiten esta adición directa. Las demás exigen una adecuación como pelado (guanabana), corte y separación de la pulpa-semilla de la cáscara (maracuyá). Ablandamiento por escaldado (tomate de árbol). La máquina arroja por un orificio los residuos como semilla, cáscaras y otros materiales duros que no pudieron pasar por entre los orificios de la malla. Los residuos pueden salir impregnados aún de pulpa, por lo que se acostumbra a repasar estos residuos. Estos se pueden mezclar con un poco de agua o de la misma pulpa que ya ha salido, para así incrementar el rendimiento en pulpa. Esto se ve cuando el nuevo residuo sale más seco y se aumenta la cantidad de pulpa. Se recomienda exponer lo menos posible la pulpa al medio ambiente. Esto se logra si inmediatamente se obtiene la pulpa, se cubre, o se la envía por tubería desde la salida de la despulpadora hasta un tanque de almacenamiento.

1.4.1.16 Refinado

Consiste en reducir el tamaño de partícula de la pulpa, cuando esta ha sido obtenida antes por el uso de una malla de mayor diámetro de sus orificios. Reducir el tamaño de partícula da una mejor apariencia a la pulpa, evita una más rápida separación de los sólidos insolubles en suspensión, le comunica una textura más fina a los productos como mermelada o bocadillos preparados a partir de esta pulpa. De otra parte refinar baja los rendimientos en pulpa por la separación de material grueso y duro que esta naturalmente presente en la pulpa inicial. El refinado se puede hacer en la misma despulpadora, solo que se le cambia la malla por otra de diámetro de orificio más fino. Generalmente la primera pasada para el despulpado se realiza con malla 0,060” y el refinado con 0,045 o menor. La malla inicial depende del diámetro de la semilla y el final de la calidad de finura que se desee tenga la pulpa.

1.4.1.17 Homogeneizado

Es otra forma de lograr el refinado de un fluido como la pulpa. En esta operación se emplean equipos que permitan igualar el tamaño de partícula como el molino coloidal. Esta máquina permite “moler” el fluido al pasarlo por entre dos conos metálicos uno de los cuales gira a un elevado número de revoluciones. La distancia entre los molinos es variable, y se ajusta según el tamaño de partícula que se necesite. La fricción entre el molino y el fluido es tan alta que la cámara de molido, necesita ser refrigerada mediante un baño interno con un fluido refrigerado como el agua. Aquí también la pulpa sometida a homogenización sufre una alta aireación como en el caso del molido y el despulpado y refinado.

1.4.1.18 Desaireado

Permite eliminar parte del aire involucrado en las operaciones anteriores. Hay diferentes técnicas que varían en su eficiencia y costo. La más sencilla y obvia es evitar operaciones que favorezcan el aireado. Si ya se ha aireado la pulpa,

mediante un calentamiento suave se puede disminuir la solubilidad de los gases y extraerlos. Otra forma es aplicar vacío a una cortina de pulpa. La cortina se logra cuando se deja caer poca pulpa por las paredes de una marmita o se logra hacer caer una lluvia de pulpa dentro de un recipiente que se halla a vacío. Entre más pronto se efectúe el desaireado, menores serán los efectos negativos del oxígeno involucrado en la pulpa. Como se mencionó antes estos efectos son la oxidación de compuestos como las vitaminas, formación de pigmentos que pardean algunas pulpas; la formación de espuma que crea inconvenientes durante las operaciones de llenado y empaçado.

1.4.1.19 Pasterización

Consiste en calentar un producto a temperaturas que provoquen la destrucción de los microorganismos patógenos. El calentamiento va seguido de un enfriamiento para evitar la sobrecocción y la sobrevivencia de los microorganismos termófilos. Existen diferentes tipos de equipos que permiten efectuar esta pasterización. Están las marmitas de doble chaqueta por donde circula el vapor o elemento calefactor. Las hay de serpentín o las simplemente calentadas con una fuente de calor exterior a la marmita. Estas fuentes pueden ser estufas a gas, a gasolina u otro combustible. Hay equipos más complejos como el pasterizador votator o de superficie raspada, el pasterizador tubular y el pasterizador a placas entre los más comunes. Estos son continuos y el elemento calefactor es vapor de agua generado en una caldera. La temperatura y el tiempo escogidos para pasterizar una pulpa dependerán de varios factores como su pH, composición, viscosidad y nivel de contaminación inicial. A menor pH, viscosidad y contaminación, se requerirá menor tiempo o temperatura de pasterización para disminuir el grado de contaminación hasta niveles en los que no se presentará rápido deterioro de la pulpa.

Es el caso de la pulpa de maracuyá que posee un pH alrededor de 2.7, que no permite el crecimiento de muchos microorganismos y el calor a este pH los afecta

mas; baja viscosidad que permite un mayor movimiento de la pulpa y por ello mejor y más rápida transmisión del calor, y por estar protegido por una cáscara tan resistente no se contamina fácilmente, claro este nivel de contaminación dependerá en gran medida en la higiene y cuidados mantenidos durante el procesamiento.

La esterilización es simplemente una pasteurización más drástica que elimina mayor número de microorganismos. Se logra empleando equipos más complejos como una autoclave, en donde por la sobrepresión que se alcanza, la temperatura puede ascender a niveles superiores a los de ebullición del agua a condiciones de medio ambiente. En el caso de las pulpas casi no se emplea esterilizarlas debido al bajo pH que caracteriza a la mayoría de las frutas.

1.4.1.20 Control de calidad

Una vez obtenidas las pulpas hay necesidad de evaluar la calidad del producto final. La calidad resultante será la que se haya logrado mantener después de haber procesado la fruta que llegó a la fábrica en determinadas condiciones. Si los procesos fueron adecuadamente aplicados, manteniendo la higiene en cada operación, la pulpa resultante poseerá niveles de contaminación aceptables y hasta satisfactorios. De acuerdo a la reglamentación nacional (Ministerio de salud, 1991), las características microbiológicas de las pulpas de fruta congelada son:

- Recuento de microorganismos mesofilicos/g. m= 20.000; M= 50.000
- NMP coliformes totales/g. m= 9; M=29
- NMP coliformes fecales/g. m= < 3; M= ---
- Recuento esporas clostridium-sulfito reductor/g. m= < 10; M= ---
- Recuento de hongos y levaduras/g. m= 1.000; M= 3.000

En donde:

m = Índice máximo permisible para Identificar nivel de buena calidad

M = Índice máximo permisible para identificar nivel aceptable de calidad

Si la fruta reunía las condiciones de madurez y sanidad necesarios, fisicoquímica y sensorialmente la pulpa poseerá las características de calidad muy similares a las recién obtenidas de la fruta fresca a nivel casero, que es el patrón empleado por el consumidor para comparar la pulpa obtenida en una fábrica.

1.4.1.21 Empacado

Las pulpas ya obtenidas deben ser aisladas del medio ambiente a fin de mantener sus características hasta el momento de su empleo. Esto se logra mediante su empaqueo con el mínimo de aire, en recipientes adecuados y compatibles con las pulpas. Las fábricas de pulpas han empleado diferentes tipos de plásticos en forma de vasos, bolsas, botellas y canecas. Se ha buscado darle vistosidad, economía y funcionalidad a estos empaques.

1.4.1.22 Congelación

Se basa en el principio de que a menor temperatura más lentas son todas las reacciones. Esto incluye las reacciones producidas por los microorganismos, los cuales no son destruidos sino retardada su actividad vital. La congelación disminuye la disponibilidad del agua debido a la solidificación del agua que caracteriza este estado de la materia. Al no estar disponible como medio líquido, muy pocas reacciones pueden ocurrir. Solo algunas como la desnaturalización de proteínas presentes en la pared celular. Esto propicia la precipitación de los sólidos insolubles con lo que se favorece el cambio en la textura y la separación de fases, sobre todo cuando con estas pulpas se preparan néctares.

Durante la congelación se favorece la formación de cristales de hielo que crecen y causan roturas de las paredes celulares y pérdida de la capacidad retenedora de los jugos dentro de las células. Se ha notado también que la congelación produce una disminución de los aromas y sabores propios de las frutas. A pesar de estos cambios, la congelación es la técnica más sencilla que permite mantener las características sensoriales y nutricionales lo más parecidas a las de las pulpas

frescas y en nuestro medio es la técnica mas empleada. Presenta la restricción de exigir mantener la cadena de frío todo el tiempo hasta llegar el momento de la utilización por el consumidor final. Además el estado sólido plantea ciertas incomodidades cuando se necesita emplear solo una parte del bloque de pulpa. Para el control microbiológico de calidad hay necesidad de descongelar la pulpa, con lo que se puede aumentar el recuento real del producto. La conservación por congelación permite mantener las pulpas por períodos cercanos a un año sin que se deteriore significativamente. Entre más tiempo y más baja sea la temperatura de almacenamiento congelado, mayor número de microorganismos perecerán. A la vez que las propiedades sensoriales de las pulpas congeladas durante demasiado tiempo irán cambiando. Así, lo mejor es tratar de consumir las pulpas lo antes posible para aprovechar más sus características sensoriales y nutricionales.

2. METODOLOGIA

Este trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Control de Calidad de Alimentos del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos – ICTA y la Planta Piloto de Vegetales, de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá con la colaboración de la empresa de alimentos SAS SA.

2.1 MATERIAS PRIMAS

2.1.1 Pulpas de Frutas

Se emplearon 20 pulpas de frutas pasteurizadas y congeladas a -20°C de la Empresa Colombiana de Alimentos SAS S.A. que correspondieron a: Banano, Curuba, Durazno, Feijoa, Fresa, Granadilla, Guanábana, Guayaba, Limón, Lulo, Mango, Manzana, Maracuyá, Mora, Naranja, Papaya, Piña, Tomate de Árbol, Uchuva y Uva.

2.1.2 Hortalizas

Inicialmente se identificaron las 20 hortalizas más preponderantes de Colombia, dentro de las cuales se preseleccionaron 6 de ellas para el desarrollo del trabajo. A continuación se mencionan las hortalizas trabajadas: Acelga, Ahuyama, Espinaca, Lechuga, Remolacha y Zanahoria. Se aclara que estas hortalizas no se adquirieron en pulpa.

2.1.3 Cultivo Láctico

Se utilizó un cultivo probiótico comercial liofilizado, correspondiente a la cepa pura La-14 10B (*Lactobacillus acidophilus*), de la compañía Danisco®, certificado por la empresa como probiótico, el cual se encontraba en su presentación comercial y conservado a -20°C hasta su utilización. La ficha técnica de este producto se presenta en el Anexo 01.

2.2 MÉTODOS DE EVALUACIÓN FÍSICOQUÍMICA

2.2.1 Determinación de pH y acidez libre titulable

La acidez y el pH se midieron usando el titulador automático Mettler Toledo ® T70 de acuerdo al método oficial A.O.A.C. 942.15. Las unidades en las que se expresó la acidez fueron meq/kg.

2.2.2 Determinación de la capacidad antioxidante por DPPH

Uno de los métodos usados para la actividad antioxidante es el DPPH, descrito por Brand-William *et al* (1995). El procedimiento se describe a continuación: Se pesa entre 1 y 3 g de muestra, dependiendo de la pulpa de fruta y hortaliza, en un vaso de precipitados de 100 ml adicionando etanol al 96% y agitando a baja velocidad por 1 hora. La solución se filtra empleando papel filtro grado 3hw Munktell® y se lleva cuantitativamente a 25 ml para obtener el extracto etanólico. Se prepara una solución del radical 2-difenil-picrilhidracil (DPPH•) en metanol de alrededor de 3 mg en 80 ml, de manera que la absorbancia de esta solución, a una longitud de onda de 515 nm, al agregar 1 ml de metanol por cada 5 ml de la solución y calentarla por 5 minutos a 40°C de un valor de entre 0,70 y 0,75 (absorbancia inicial). A 5 ml de la solución de DPPH se agregan tres alícuotas del extracto etanólico y se completan a 6 ml con metanol. Estas soluciones se calientan a 40°C por 5 min, luego se leen sus respectivas absorbancias, que deben estar en el intervalo comprendido entre el 20% al 70% del valor de la absorbancia inicial de la solución del DPPH•. Por medio de un ajuste lineal por mínimos cuadrados se calcula el volumen del extracto etanólico necesario y de esta manera la masa de muestra necesaria para reducir el valor de la absorbancia inicial del DPPH• hasta el 50% de su valor inicial (entre 0,70 y 0,75).

La masa de muestra necesaria para decolorar un volumen de DPPH• al 50% de su absorbancia inicial se denomina IC₅₀ (mg/ml) y es la forma como se expresa la capacidad antioxidante de las muestras analizadas por este método. Debe notarse

que a menor valor del IC_{50} mayor capacidad antioxidante dado que indica que se necesitaría menos muestra para inactivar la misma cantidad del radical libre.

El equipo utilizado para la medición de la absorbancia fue el espectrofotómetro “Jasco V-530 UV/VIS”.

2.2.3 Determinación de la capacidad antioxidante por ABTS

Para la determinación de la capacidad antioxidante por ABTS se siguió la metodología desarrollada por RE et al. (1999) y descrita por Kuskoski et al. (2005). El radical $ABTS^{\bullet+}$ se obtiene tras la reacción de ABTS (7 mM) con persulfato potásico (2,45 mM, concentración final) incubados a temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}C$) y en la oscuridad durante 16 h. Una vez formado el radical $ABTS^{\bullet}$ se diluye con etanol R.A. hasta obtener un valor de absorbancia comprendido entre $0,70 \pm 0,1$ a 734 nm (longitud de onda de máxima absorción). La preparación de la muestra se realiza de la siguiente forma: Se pesa entre 1 y 3 g de muestra, dependiendo de la pulpa de fruta y hortaliza, en un vaso de precipitados de 100 ml adicionando etanol al 96% agitando a baja velocidad por 1 hora y en ambiente oscuro. La solución se filtra empleando papel filtro grado 3hw Munktell® y llevando cuantitativamente a 25 ml para obtener el extracto etanólico. Una vez obtenido el extracto, a 1000 μL de dilución del radical $ABTS^{\bullet}$ se determina la absorbancia a 734 a $30^{\circ}C$, luego se añade 10 μL de la muestra (extracto etanólico) y se mide de nuevo la A_{734} pasado 6 minutos. Se prepara una curva de calibración usando el antioxidante sintético de referencia, Trolox, en concentraciones de 0-15 μM (concentración final) en etanol. Los resultados se expresan en TEAC (actividad antioxidante equivalente a Trolox).

El equipo utilizado para la medición de la absorbancia fue el espectrofotómetro “Jasco V-530 UV/VIS”.

2.2.4 Determinación de los °Brix

Se determina los grados brix de las pulpas de fruta y las hortalizas por el método refractométrico. El equipo utilizado para esta medición es un refractómetro manual Digit 5890 BYC de 0 - $32^{\circ}Brix$.

2.3 MÉTODOS DE ANÁLISIS PARA EVALUAR LA CALIDAD HIGIÉNICA DE LAS PULPAS

Para la caracterización de la calidad microbiológica de las muestras se siguió la metodología establecida en el Manual de Técnicas de Análisis para Control de Calidad Microbiológico de Alimentos para consumo humano del Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA) (1998), el cual contiene la metodología detallada de todos los análisis que se describen a continuación, excepto para el conteo de BAL.

2.3.1 Dilución y homogeneización de la muestra

Se pesan 10 g de las muestras y se agregan a frascos estériles con 90 ml de agua peptonada al 0,1%. Posteriormente se agitan manualmente hasta obtener una mezcla homogénea. Se realizan diluciones seriadas en base 10.

2.3.2 Recuento en placa de microorganismos mesófilos aerobios

Se toma una alícuota 1 ml de cada una de las diluciones en cajas de *Petri* estériles y se adicionan 15 ml de agar tipo *Agar Plate Count* fundido. Se mantiene a una temperatura de 45°C mezclando el inóculo con el medio de cultivo adicionado. Una vez solidificado el medio de cultivo se invierten las placas e incuban a una temperatura de 35°C ± 2°C durante 48 horas. Se realiza luego el recuento de las UFC/g, teniendo en cuenta el factor de dilución y el intervalo establecido para este tipo de microorganismos (INVIMA, 1998).

2.3.3 Recuento en placa de mohos y levaduras

Se toma una alícuota de 1 ml de las diluciones seriadas 10^{-1} y 10^{-3} en cajas de *Petri* estériles. Se adicionan 15 ml de agar extracto de malta-oxitetraciclina (OGY) fundido y se mantiene a una temperatura de 45°C mezclando el inóculo con el medio de cultivo adicionado; una vez solidificado el medio de cultivo se invierten

las placas y se incubaban a una temperatura de 22°C ± 2°C durante 5 a 7 días. Luego se hace el recuento de las UFC/g, teniendo en cuenta el factor de dilución y el intervalo establecido para este tipo de microorganismos (INVIMA, 1998).

2.3.4 NMP de coliformes totales y ausencia / presencia de *E. coli*

El NMP es el número más probable y corresponde a una técnica distinta al conteo en placa; esta metodología se utiliza para medir la presencia de coliformes totales. Se dosifica 1 ml de cada una de las diluciones del homogenizado de la muestra en tubos con caldo lactosado *Bilis Verde Brillante* al 2% en series de tres tubos por cada dilución. Se incuban a 35°C por 1 a 2 días, verificando la ausencia de aire. Pasado este tiempo, se registran los tubos con turbidez y producción de gas, para posteriormente hacer la prueba confirmativa de los tubos positivos. Esta prueba confirmativa se hace sembrando por estría por medio de un asa de cada uno de los tubos positivos en la superficie de una placa de agar *Eosina Azul de metileno* (EMB) o agar *Bilis Rojo Violeta* para determinar la Ausencia / Presencia de *Escherichia coli*, incubando las placas a 35°C 1 a 2 días. En caso de encontrarse colonias características de *E. coli*, es necesario realizar pruebas bioquímicas confirmatorias. Para calcular el NMP se toma el número de tubos que dan positivos y se busca el número de células correspondiente en una tabla de probabilidades para este ensayo (INVIMA, 1998).

2.3.5 Recuento de esporas *Clostridium* sulfito reductor

Se tomó una alícuota de 1 ml de las diluciones seriadas 10⁻¹ y 10⁻³ en cajas de *Petri* estériles. Se adicionaron 15 ml de agar *SPS* fundido y mantenido a una temperatura de 45°C. Una vez agregado el agar se mezcló varias veces en forma de ocho con el fin de garantizar una distribución homogénea de la muestra en el medio de cultivo, se dejó en reposo para que se solidificara el agar. Se colocaron las cajas con las tapas hacia arriba en la jarra de anaerobiosis y se incubaron a una temperatura de 37°C ± 2°C durante 48 horas. Se hizo el recuento de las

UFC/g, teniendo en cuenta el factor de dilución y el intervalo establecido para este tipo de microorganismos (INVIMA, 1998).

2.4 RECUESTO EN PLACA DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS VIABLES (BAL)

Se realizó según la metodología recomendada por la “*International Commission on Microbiological Specifications for Food*” (ICMSF, 2001).

Dilución y homogenización de la muestra: se pesan 10 gramos de las muestras y se agregan a frascos estériles con 90 ml de agua peptonada al 0,1% luego se agitan con *vortex* hasta obtener una mezcla homogénea. En el caso del conteo del cultivo puro para verificar su concentración, se pesa 1 g en lugar de 10 g. Se hacen diluciones seriadas en base 10. Es importante obtener los 10 g de muestra bajo condiciones asépticas desde una parte central de la mezcla, mediante un agitador previamente estéril (y flameado).

A partir de las diluciones, se siembra por profundidad 1 mL de cada dilución y se adicionan 15 ml de Agar *Man, Rogosa y Sharpe* (MRS) fundido y se mantiene a una temperatura de 45°C mezclado varias veces en forma de ocho con el fin de garantizar una distribución homogénea de la muestra en el medio de cultivo y dejando solidificar. Una vez solidificado el medio de cultivo se invierten las placas y se incuban a una temperatura de 35°C durante 48 a 72 horas, en condiciones de anaerobiosis.

El recuento de las UFC/g, se realiza teniendo en cuenta el intervalo establecido para este tipo de microorganismos; la presencia de la población de BAL debe ser siempre confirmada mediante la coloración Gram de un “pool” de colonias (mínimo 10) de las desarrolladas en el Agar MRS.

2.5 METODOS DE ANÁLISIS SENSORIAL

Para la selección de la proporción de fruta y hortaliza más adecuada, por clase de mezcla, se utilizaron pruebas de afectividad por medio de un método de aceptabilidad sensorial el cual consistió en dar una escala de valores entre 0 y 5 a los aspectos de sabor y aroma, en donde 0 era “me disgusta mucho” y 5 era “me gusta mucha”, y una escala de valor entre 0 y 3 para la apariencia en donde 0 era “me disgusta” y 3 “me gusta”. Ver formato de prueba Anexo 03-A. Para la selección de una de las clases de mezclas obtenidas se realizó de igual forma una prueba de afectividad tal y como se describió anteriormente. Ver formato de prueba Anexo 03-B.

Una vez seleccionada la pulpa de fruta y hortaliza, y adicionado el probiótico, se realizaron pruebas sensoriales durante el tiempo de almacenamiento por el método: Análisis sensorial. NTC 2681. Metodología Prueba Triangular (Ver Anexo 02). El formato usado para la prueba se encuentra en el Anexo 03C.

2.6 EXPERIMENTACIÓN

Para cumplir con los objetivos propuestos se plantearon seis pasos: en el primero se seleccionaron dos pulpas de fruta de acuerdo a unos criterios establecidos y se preseleccionaron seis hortalizas de las 20 propuestas, teniendo en cuenta su compatibilidad sensorial (aroma y sabor), con las frutas. En el segundo paso, se determinaron las condiciones y etapas necesarias para la obtención de la pulpa de hortaliza. En el tercer paso se seleccionó la pulpa de hortaliza y las posibles pulpas de frutas a combinar con ellas. En el cuarto paso se determinaron las proporciones más adecuadas de pulpa de fruta y pulpa de hortaliza en cada una de las diferentes pulpas de mezclas obtenidas. En el quinto paso se seleccionó una de todas las pulpas de mezclas obtenidas y por último, en el sexto paso se adicionó el microorganismo probiótico a dos distintas concentraciones, a la mezcla seleccionada y a una sola concentración a dos pulpas de fruta pura (Mango y Mora), y se realizó el seguimiento durante su tiempo de almacenamiento.

2.6.1 Selección de dos pulpas de fruta y preselección de hortalizas

Con el propósito de facilitar la ejecución de esta etapa, se dividió en dos partes: la primera, la selección de dos pulpas de frutas de las 20 escogidas, y la segunda correspondiente a la preselección de las hortalizas más adecuadas, a partir de 20 hortalizas iniciales, para combinar con frutas.

2.6.1.1 Selección de dos pulpas de fruta

La selección de la pulpa de fruta se hizo a partir de 20 pulpas suministradas por la empresa “Alimentos SAS SA”, de acuerdo a los siguientes criterios de selección: Actividad antioxidante, acidez, pH, % de rendimiento (cantidad producto final/cantidad de materia prima a procesar) y ventas mensuales. A cada una de estas propiedades se le dio un puntaje de acuerdo a su importancia e influencia en la elaboración de la pulpa como se observa en la tabla 6. La elección de estos criterios se debe a que los tres primeros determinarían las propiedades funcionales del producto final en lo referente a sus características antioxidantes y probióticas, y los dos últimos a su carácter comercial.

Tabla 6. Criterios de selección de la pulpa de fruta

CRITERIO	PUNTAJE
Actividad Antioxidante	30
Acidez	10
pH	20
Rendimiento	15
Ventas mes en Ton (Empresa SAS)	25
TOTAL	100

Justificación Puntaje

Actividad Antioxidante: Se le da el mayor puntaje debido a la importancia de esta propiedad dentro del proyecto y a su fuerte relación con las propiedades

funcionales del alimento. Este puntaje se divide en dos, 15 para el método DPPH y los otros 15 para el método ABTS. La distribución de este puntaje se realizó de manera matemática mediante un comportamiento lineal dando el puntaje más alto (15 por método) a la pulpa de fruta con mayor actividad antioxidante y un puntaje de 0 para la pulpa de fruta con la menor actividad antioxidante. Se aclara que para el método DPPH, entre más bajo el valor obtenido indica una mayor capacidad antioxidante.

Acidez: Se da un puntaje de 10 debido a su importante efecto en la supervivencia de los microorganismos probióticos. La distribución de este puntaje se realizó de manera matemática mediante un comportamiento lineal dando el mayor puntaje (10 puntos), a la fruta con el menor valor de acidez, ya que un menor valor de acidez representa una mayor viabilidad de los microorganismos, y un puntaje de 0 para la fruta con mayor valor de acidez.

pH: Se da un máximo puntaje de 20. Este criterio es tenido en cuenta para la selección de la fruta debido a que el objetivo final es obtener una pulpa con microorganismos probióticos y el pH ejerce una fuerte influencia en la viabilidad de estos microorganismos en el sustrato. A valores de pH bajos se va incrementando la mortandad de los probióticos, por esta razón la distribución del puntaje se realizó de manera matemática mediante un comportamiento lineal dando el mayor puntaje (20 puntos) al pH más alto, y un puntaje de 0 al más bajo; los valores intermedios tendrán un puntaje obtenido de manera lineal.

% Rendimiento: se define como la cantidad de pulpa obtenida por kilogramo de fruta inicial. Es importante tener en cuenta el rendimiento de la fruta debido a su influencia en los costos de producción, rentabilidad, aprovechamiento, efectividad y el precio final de la pulpa, ya que un rendimiento muy bajo afecta significativamente los costos de elaboración de la pulpa funcional y al final obtener un producto poco competitivo. La distribución de este puntaje se realizó de manera

matemática mediante un comportamiento lineal dando el mayor puntaje (15 puntos) a la fruta con mayor rendimiento y un puntaje de 0 para la fruta con el menor rendimiento.

Ventas (empresa SAS): Su alto puntaje (25 puntos), se debe a que estos datos reflejan el comportamiento de las pulpas en el mercado nacional. El mayor puntaje se le dará a las pulpas más vendidas debido a su escogencia y observación por parte del consumidor y a que probablemente haya una mayor posibilidad de venta una vez elaborada la pulpa funcional. Esta distribución del puntaje se realizará de igual forma que las anteriores.

2.6.1.2 Preselección de las hortalizas

Para preseleccionar las seis hortalizas se tomaron como base las 20 hortalizas más producidas a nivel nacional partiendo de los datos suministrados por el Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE), La Asociación Hortifrutícola de Colombia (ASOHOFRUCOL) y el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. La preselección se realizó desde el punto de vista sensorial teniendo en cuenta la compatibilidad sensorial en aroma y sabor entre las frutas y las hortalizas.

2.6.2 Obtención de la pulpa de hortaliza

Para la determinación de las condiciones y etapas necesarias para la obtención de las pulpas de hortalizas seleccionadas se tuvieron en cuenta las operaciones de adecuación, separación y conservación que se utilizan para la obtención de la pulpa de fruta.

- En la adecuación se tuvieron en cuenta las siguientes etapas: higiene y sanidad de la planta, recepción, pesado, selección, clasificación, lavado, desinfección y enjuague.

- Para el caso de la operación de separación las etapas estimadas fueron: Pelado, cortado, molido, pesado, homogeneizado, pesado y control de calidad. El control de calidad consistió en medir la calidad microbiológica de la pulpa final obtenida de tal manera que cumpliera con los requisitos normativos.
- Por último para la operación de conservación se contó con las siguientes etapas: escaldado, pasteurizado (opcional en caso que el solo escaldado no sea suficiente para la calidad microbiológica), empaque y congelación. Para la etapa de escaldado se trabajaron dos tiempos: 3 minutos para las hortalizas de hojas y 5 minutos para las otras hortalizas, de acuerdo a los reportes de la bibliografía (Ramaswamy, 2006 y Salunkhe, 2004) y a la experiencia adquirida en el ICTA en el procesado de estos tipos de alimentos. Para la etapa de congelación se estableció una sola condición de temperatura, correspondiente a -20°C , debido a que como esta investigación hace parte de un trabajo conjunto entre la empresa de Alimentos SAS S.A y el ICTA, el interés de la empresa está enfocado en fortalecer uno de sus productos que son las pulpas de fruta congeladas a esta temperatura.

2.6.3 Selección de la pulpa de hortaliza

La selección de las pulpas de hortalizas se realizó de acuerdo a los siguientes criterios de selección: Actividad antioxidante, pH, compatibilidad sensorial, costo en el mercado y producción nacional. A cada una de estas propiedades se le dio un puntaje de acuerdo a su importancia e influencia en la elaboración de la pulpa como se muestra en la tabla 7. La elección de estos criterios se debe a la influencia en las propiedades funcionales (características antioxidantes y probióticas), y aspecto sensorial del producto final para los 3 primeros criterios, y a su relación en el sector comercial para los 2 últimos.

Como se mostrará más adelante en los resultados, debido a que las dos pulpas de fruta seleccionadas presentaron mayor capacidad antioxidante que las pulpas de

hortalizas fue necesario establecer posibles grupos de combinación de las pulpas de fruta con las seis pulpas de hortaliza de acuerdo a su compatibilidad por color, teniendo en cuenta que dicha combinación aumentara la capacidad antioxidante de la pulpa final. Con el fin de seleccionar la pulpa de hortaliza adecuada, éstas se separaron por tipo de color y luego se obtuvieron los valores de los criterios escogidos. Para evaluar el criterio de compatibilidad sensorial, esta propiedad se evaluó teniendo en cuenta las pulpas de fruta cuyo color fuera más similar o compatible con la hortaliza.

Tabla 7. Criterios de selección para la pulpa de hortaliza

CRITERIO	PUNTAJE
Actividad Antioxidante	30
pH	20
Compatibilidad Sensorial	30
Costo en el mercado	10
Producción en Toneladas	10
TOTAL	100

Justificación Puntaje

Actividad Antioxidante: Se le da el mayor puntaje debido a la importancia de esta propiedad dentro del proyecto y a su fuerte relación con las propiedades funcionales del alimento. Este puntaje se divide en dos, 15 para el método DPPH y los otros 15 para el método ABTS. La distribución de este puntaje se realizó de manera matemática mediante un comportamiento lineal dando el puntaje más alto (15 por método) a la fruta con mayor actividad antioxidante y un puntaje de 0 para la fruta con la menor actividad antioxidante. Se aclara que para el método DPPH, entre más bajo el valor obtenido indica una mayor capacidad antioxidante.

pH: Se da un máximo puntaje de 20. Este criterio es tenido en cuenta para la selección de la hortaliza debido a que el objetivo final es obtener una pulpa con

microorganismos probióticos y el pH ejerce una fuerte influencia en la viabilidad de estos microorganismos en el sustrato. Debido a que los *Lactobacillus acidophilus* manejan un pH óptimo entre 5.5 y 6 (Rivera y Gallardo, 2008), la distribución del puntaje se realizó de la siguiente manera dando el mayor puntaje (20 puntos) a pH que se encuentren dentro de este rango y disminuyendo de a 5 puntos por cada 0.5 unidades de pH tanto por arriba de 6 como por debajo de 5.5.

Compatibilidad Sensorial (color): Es importante que el color de la hortaliza sea compatible con la fruta a mezclar, adicional a esto su aroma y sabor no deben afectar de manera significativa el aroma y sabor de la fruta debido a que son mucho más deseables los aromas y sabores frutales. La distribución del puntaje se realizó dándole mayor puntaje a la hortaliza más compatible con diversas frutas.

Costo en el mercado: Es importante tener en cuenta el costo por kg de la hortaliza debido a su influencia en la inversión y el precio final de la pulpa, ya que un costo demasiado alto podría incrementar significativamente los costos de elaboración de la pulpa funcional y al final obtener un producto poco competitivo. La distribución de este puntaje se realizó de manera matemática mediante un comportamiento lineal dando el mayor puntaje (10 puntos), a la hortaliza con el menor costo y un puntaje de 0 para la de mayor costo.

Producción: Es importante tener en cuenta este criterio debido a su relación con la facilidad de adquisición de la hortaliza ya que tentativamente entre más cantidad producida su adquisición y posiblemente costo sean mucho más asequibles. La distribución de este puntaje se realizó de manera matemática mediante un comportamiento lineal dando el mayor puntaje (10 puntos), a la hortaliza con el mayor producción y un puntaje de 0 para la de menor producción.

2.6.4 Determinación de las proporciones de pulpa de fruta y hortaliza en las diferentes mezclas

Para determinar la proporción de pulpa de fruta y hortaliza más adecuada, por clase de mezcla obtenida, se tuvieron en cuenta sus resultados de análisis sensorial (prueba de afectividad), y actividad antioxidante dándole a cada una de estas propiedades un puntaje como se muestra en la tabla 8. Se partió de tres proporciones sugeridas para cada combinación fruta y hortaliza: 50%-50%, 70%-30% y 90%-10%.

Tabla 8. Criterios de selección por tipo de mezcla de pulpas

CRITERIO	PUNTAJE
Actividad Antioxidante	50
Análisis Sensorial	50
TOTAL	100

La distribución del puntaje para la actividad antioxidante se efectúa de la siguiente manera: a la mezcla, dentro de cada grupo, con mayor capacidad antioxidante (menor valor de DPPH), se le da un puntaje de 50, al segundo un puntaje de 30 y al tercero uno de 20. Para el caso del análisis sensorial se le da un puntaje de 50 a la mezcla seleccionada, de 25 a la mezcla que obtuvo segundo lugar y de 10 puntos a última.

2.6.5 Selección de una pulpa de mezcla entre las diferentes mezclas obtenidas

Para la elección de una de las mezclas seleccionadas, se tuvieron en cuenta los siguientes criterios: Actividad antioxidante, acidez, pH y análisis sensorial, dándole a cada una un puntaje como se muestra en la tabla 9. La elección de estos criterios se debe a que, como se mencionó con anterioridad, los tres primeros determinarían las propiedades funcionales del producto final en lo referente a sus características antioxidantes y probióticas, y el último a su aceptabilidad por parte del consumidor.

Tabla 9. Criterios de selección para la escogencia de la mezcla más adecuada

CRITERIO	PUNTAJE
Actividad Antioxidante	35
Acidez	10
pH	20
Sensorial	35
TOTAL	100

Justificación Puntaje

Actividad Antioxidante: Una vez más se le da un puntaje alto debido a la importancia de esta propiedad dentro del proyecto. Para la distribución de este puntaje se le concedió el valor más alto (35), a la mezcla con mayor capacidad antioxidante por el método DPPH, seguida de un valor de 20 para la segunda y para terminar un valor de 10 a la de menor capacidad.

Acidez: Se da un puntaje de 10 debido a la importancia mencionada en párrafos anteriores y que tienen que ver con su efecto en la supervivencia de los microorganismos probióticos. La distribución de este puntaje se realizó de la siguiente manera: 10 puntos a la mezcla de menor acidez; 6 puntos para la de valor intermedio y 3 puntos para la mezcla que presentó mayor acidez.

pH: Se da un máximo puntaje de 20 y su justificación es debido a su efecto sobre la viabilidad de los microorganismos en el sustrato como se ha venido mencionando en las anteriores justificaciones de los criterios. La distribución del puntaje se llevó a cabo de la siguiente manera: 20 puntos a la mezcla con el pH más alto, 14 para la de pH intermedio y 7 puntos para la mezcla con más bajo pH.

Sensorial: se le da el puntaje más alto debido a su implicación directa sobre el consumidor. Para la distribución de este puntaje se le dio un valor de 35 a la mezcla seleccionada, de 20 a la mezcla que obtuvo segundo lugar y de 10 puntos a última.

2.6.6 Adición del probiótico a la pulpa de mezcla y a las dos pulpas de fruta seleccionadas y su seguimiento durante el tiempo de almacenamiento

El microorganismo probiótico con el que se trabajó fue el *Lactobacillus acidophilus*. Se evaluaron dos diferentes concentraciones de cultivo para adicionar a la pulpa de mezcla de fruta y hortaliza seleccionada:

- 9.52 unidades logarítmicas de ufc/gramo de pulpa
- 8.52 unidades logarítmicas de ufc/gramo de pulpa

Se trabajaron con estas dos concentraciones con el fin de observar su comportamiento y asegurar una cantidad, al final del tiempo de almacenamiento, de mínimo 6 unidades logarítmicas de ufc/g pulpa, ya que según la bibliografía estos microorganismos pueden disminuir de 2 a 3 unidades logarítmicas de ufc/g en el almacenamiento.

Para el caso de las pulpas de fruta solo se trabajó con una concentración del cultivo correspondiente a 9.52 unidades logarítmicas de ufc/gramo de pulpa.

Se realizó el recuento de microorganismos probióticos viables para cada pulpa funcional por un periodo de 90 días a temperatura de almacenamiento de -20 °C cada 15 días. Adicional se determinaron cada 15 días durante 90 días, para cada pulpa, las siguientes propiedades: Actividad antioxidante método DPPH, actividad antioxidante método ABTS, pH, acidez y grados brix. Se realizó la evaluación sensorial de diferenciación, para cada pulpa sin probiótico con su respectiva pulpa con probiótico, mediante prueba triangular durante los días 0, 45 y 90.

2.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

En los ensayos definitivos con adición del *Lactobacillus acidophilus* se empleó el Análisis de Varianza ANOVA, para poder comparar los datos obtenidos así como la significancia de los efectos de las variables y las diferencias encontradas. En este caso las variables dependientes (los parámetros fisicoquímicos: DPPH, ABTS, Acidez Libre, pH, y °Brix; y el parámetro microbiológico: Recuento de bacterias acidolácticas) están relacionadas linealmente con variables independientes (concentración del probiótico y tiempo de almacenamiento). Su relación funcional puede describirse como una generalización de la función de regresión muestral con el siguiente modelo: Parámetro $y_{jk} = \mu + A_i + E_j + AE_{ij} + \varepsilon_{ij}$

Donde:

μ = media general de las variables respuestas

A_i = efecto del nivel i de la concentración del probiótico (*L. acidophilus*: 0, 8.52, 9.52)

E_j = efecto del nivel j de cada tiempo evaluado (0, 8, 15, 30, 45, 60, 75 y 90 días)

AE_{ij} = efecto del nivel i de la concentración del probiótico y del nivel j de cada tiempo evaluado combinados.

ε_{ijk} = error ; $i = 1:3$; $j = 1:8$

Los datos del experimento se trataron conforme al diseño experimental completamente regido al azar, mediante un diseño factorial 3x8 (concentración del probiótico y tiempo de almacenamiento) con dos repeticiones. Este diseño permitió comparar el tratamiento con *L. acidophilus* y el blanco a través del tiempo combinando estas dos variables. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el paquete Minitab 15 (©2007 Minitab Inc.), para realizar comparación de diferencias estadísticas ANOVA. Las diferencias entre los tratamientos individuales se estudiaron mediante una Prueba de Comparaciones Factoriales y el análisis se hizo teniendo en cuenta los gráficos de efectos principales y de interacción para cada parámetro. Ver Anexo 04.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 SELECCIÓN DE DOS PULPAS DE FRUTA Y PRESELECCIÓN DE HORTALIZAS

Para mayor claridad se dividen los resultados de este punto en dos partes: Selección de dos pulpas de fruta y preselección de las hortalizas.

3.1.1 Selección de dos pulpas de fruta

Para la selección de las pulpas de frutas se tuvieron en cuenta las pulpas que se muestran en la tabla 10 y que son actualmente elaboradas por la empresa Alimentos SAS S.A., luego se tomaron 5 criterios de selección con el fin de escoger dos de ellas

Tabla 10. Pulpas de frutas de la empresa SAS S.A. Características de las Pulpas de Fruta Cruda Congelada.

Pulpa de fruta	Sólidos solubles-°BRIX	Acidez % ácido cítrico	pH
Banano	16,0 - 19,0	0,45 - 0,65	4,2 - 4,4
Curuba	8 - 9	1.12 - 1.2	2.8 - 3.0
Durazno	13,0 - 16,5	0,56 - 0,95	3,5 - 4,1
Feijoa	9 - 11	1.76 - 1.92	2.9 - 3.1
Fresa	6.5 - 7.0	0.7 - 0.96	3.4 - 3.5
Granadilla	10,5 - 12,7	0,5 - 0,8	4,1 - 4,5
Guanábana	14 - 17	0.9 - 1.2	3.7 - 3.9
Guayaba	8 - 9	0.5 - 0.75	3.8 - 4.2
Limón	6 - 7	4.5 - 5.7	2.3 - 2.5
Lulo	6 - 7	1.0 - 2.5	3.0 - 3.2
Mango	13 - 17	0.32 - 0.40	3.8 - 4.2
Manzana	10 - 13	0,38 - 0,65	3,2 - 3,6
Maracuyá	12 - 14	4.0 - 4.7	2.8 - 3.3
Mora	6 - 7	2.5 - 2.8	3.0 - 3.5
Naranja	40	2,75 - 3,9	3,28 - 3,91
Papaya	8,3 - 11,5	0,19 - 0,26	4,45 - 5,05
Piña	10.0 - 10.5	0.5 - 0.8	3.3 - 3.6
Tomate de árbol	10.0 - 10.5	1.6 - 1.8	3.4 - 3.8
Uchuva	11,8 - 14,1	1,47 - 1,98	3,7 - 3,96
Uva	12,8 - 18,5	0,7 - 1,3	2,95 - 3,5

Fuente: Datos Empresa Alimentos SAS S.A.

En la tabla 11 se muestran los valores de los criterios tomadas para la selección de la pulpa de fruta.

Tabla 11. Valores de los criterios evaluados de las 20 pulpas de fruta

Pulpa de Fruta	Act. Antioxidante DPPH IC50 mg pulpa/ml sln	Act. Antioxidante ABTS micromol TE/g	Acidez expresada como % de ácido cítrico	pH	Ventas mensual (Ton)	% Rendimiento
Banano	0.87 ± 0.01	23.23 ± 1.73	0.55 ± 0.1	4.3 ± 0.1	0.4	52
Curuba	13.33 ± 0.53	3.23 ± 0.12	1.16 ± 0.06	2.9 ± 0.14	1.5	75
Durazno	8.36 ± 0.31	7.08 ± 0.22	0.76 ± 0.28	3.8 ± 0.42	5	75
Feijoa	0.64 ± 0.01	44.8 ± 0.08	1.84 ± 0.11	3 ± 0.14	8	80
Fresa	3.39 ± 0.04	15.74 ± 0.15	0.83 ± 0.18	3.45 ± 0.07	8	95
Granadilla	17.06 ± 1.46	4.11 ± 0.6	0.65 ± 0.21	4.3 ± 0.28	0.5	50
Guanábana	4.79 ± 0.11	11.34 ± 0.98	1.05 ± 0.21	3.8 ± 0.14	8	95
Guayaba	2.01 ± 0.25	18.04 ± 2.03	0.63 ± 0.18	4 ± 0.28	5	75
Limón	8.54 ± 0.11	4.15 ± 0.35	5.1 ± 0.85	2.4 ± 0.14	3.5	50
Lulo	1.08 ± 0.003	21.77 ± 1.47	1.75 ± 1.06	3.1 ± 0.14	8	75
Mango	0.65 ± 0.05	34.87 ± 6.09	0.36 ± 0.06	4 ± 0.28	14	65
Manzana	63.14 ± 5.44	0.92 ± 0.07	0.52 ± 0.19	3.4 ± 0.28	5	80
Maracuyá	15.25 ± 0.39	2.84 ± 0.45	4.4 ± 0.5	3.1 ± 0.35	8	35
Mora	1.44 ± 0.098	25.44 ± 1.82	2.65 ± 0.21	3.25 ± 0.35	14	80
Naranja	1.80 ± 0.02	17.98 ± 0.24	3.33 ± 0.81	3.6 ± 0.45	1.5	50
Papaya	2.89 ± 0.06	9.98 ± 0.1	0.23 ± 0.05	4.75 ± 0.42	5	70
Piña	11.89 ± 0.03	4.58	0.65 ± 0.21	3.45 ± 0.21	5	60
Tomate Árbol	2.30 ± 0.02	14.73 ± 0.79	1.7 ± 0.14	3.6 ± 0.28	5	70
Uchuva	9.66 ± 0.2	4.73 ± 0.19	1.73 ± 0.36	3.83 ± 0.18	0.3	75
Uva	20.28 ± 2.43	3.01 ± 0.24	1 ± 0.42	3.23 ± 0.39	5	95

Como se observa en la tabla anterior una de las pulpas que da mayor capacidad antioxidante, tanto por el método DPPH como por el ABTS, es el mango corroborándose con la literatura consultada.

De acuerdo a los puntajes de los criterios mencionados en la metodología para la selección de la pulpa de fruta, en la tabla 12 se muestran los resultados de estos puntajes por criterio y el puntaje total para cada pulpa de fruta.

Tabla 12. Puntajes asignados por criterio evaluado en las 20 pulpas de fruta

Pulpa de Fruta	Puntaje A.A. DPPH	Puntaje A.A. ABTS	Puntaje Acidez	Puntaje pH	Puntaje Ventas	Puntaje Rendimiento	TOTAL
Banano	14.94	7.63	9.34	16.17	0.18	4.25	52.52
Curuba	11.95	0.79	8.09	4.26	2.19	10.00	37.28
Durazno	13.15	2.11	8.91	11.91	8.58	10.00	54.66
Feijoa	15.00	15.00	6.69	5.11	14.05	11.25	67.10
Fresa	14.34	5.07	8.77	8.94	14.05	15.00	66.16
Granadilla	11.06	1.09	9.14	16.17	0.36	3.75	41.57
Guanábana	14.00	3.56	8.32	11.91	14.05	15.00	66.85
Guayaba	14.67	5.85	9.18	13.62	8.58	10.00	61.90
Limón	13.10	1.10	0.00	0.00	5.84	3.75	23.80
Lulo	14.89	7.13	6.88	5.96	14.05	10.00	58.91
Mango	15.00	11.61	9.73	13.62	25.00	7.50	82.45
Manzana	0.00	0.00	9.40	8.51	8.58	11.25	37.74
Maracuyá	11.49	0.66	1.44	5.96	14.05	0.00	33.60
Mora	14.81	8.38	5.03	7.23	25.00	11.25	71.70
Naranja	14.72	5.83	3.63	10.21	2.19	3.75	40.34
Papaya	14.46	3.10	10.00	20.00	8.58	8.75	64.88
Piña	12.30	1.25	9.14	8.94	8.58	6.25	46.45
Tomate Árbol	14.60	4.72	6.98	10.21	8.58	8.75	53.84
Uchuva	12.84	1.30	6.92	12.17	0.00	10.00	43.23
Uva	10.29	0.71	8.42	7.06	8.58	15.00	50.06

De acuerdo a la anterior tabla se puede observar que las dos pulpas que presentaron los mayores puntajes totales fueron la pulpa de **Mango** y **Mora**. Por lo tanto, inicialmente se escogieron estas dos pulpas para continuar con los ensayos, sin embargo, como se verá más adelante, debido a que estas pulpas poseen una capacidad antioxidante mucho mayor que las hortalizas que se seleccionaron y a que uno de los objetivos del proyecto es obtener una pulpa funcional con alta capacidad antioxidante, fue necesario seleccionar otras pulpas de fruta de tal forma que al combinarlas con la hortaliza fueran compatibles sensorialmente y aumentaran su capacidad antioxidante.

3.1.2 Preselección de la hortaliza

Para el caso de la selección de las hortalizas se tuvieron en cuenta las principales 20 hortalizas producidas en el territorio nacional que se muestran en la tabla 13.

Tabla 13. Las 20 hortalizas principales producidas a nivel nacional en el año 2004 (Ministerio Agricultura, 2006)

HORTALIZA	PRODUCCION TON
Tomate	384.732
Cebolla Cabezona	262.430
Cebolla Junca	194.164
Zanahoria	184.641
Repollo	134.877
Arracacha	93.014
Ahuyama	55.985
Habichuela	42.431
Arveja	31.806
Pimentón	31.015
Ají	17.679
Lechuga	15.173
Cilantro	14.118
Remolacha	12.743
Haba	10.734
Espinaca	2.270
Apio	1.539,6
Coliflor	1.020,76
Brócoli	867,25
Acelga	683,02

De la lista anterior se preseleccionaron 6 hortalizas y se descartaron las restantes 14 hortalizas (tomate, cebolla cabezona, cebolla junca, repollo, arracacha, habichuela, arveja, pimentón, ají, cilantro, haba, apio, coliflor y brócoli) por razones de sabor y aroma incompatibles y posiblemente desagradables al mezclarlas con las pulpas de frutas. Por lo tanto las hortalizas preseleccionadas fueron: Zanahoria, Ahuyama, Lechuga, Remolacha, Espinaca y Acelga.

3.2 OBTENCIÓN DE LA PULPA DE HORTALIZA

Una vez preseleccionadas las hortalizas, se realizó con cada una la elaboración de la pulpa de hortaliza en donde se determinaron las etapas necesarias para su adecuación, basándose en las etapas de la elaboración de la pulpa de fruta descritas en el marco teórico, con el fin de mezclarla al final con la pulpa de fruta. Las etapas de macerado, despulpado, refinado, desairado y pasteurizado no se tuvieron en cuenta en este proyecto; las cuatro primeras debido a que son más específicas y sería conveniente en futuros trabajos mirar su efecto en las características funcionales de la pulpa final, y la última, ya que como se mostrará más adelante, el escaldado fue suficiente para mantener unas adecuadas características microbiológicas en la pulpa obtenida. Para la elaboración de la pulpa, las hortalizas preseleccionadas se dividieron en dos clases:

1. Hortalizas de hojas: Acelga, Espinaca y Lechuga.
2. Hortalizas de textura consistente: Ahuyama, Remolacha y Zanahoria.

Para la primera clase se aplicaron las etapas en el siguiente orden (Ver figura 7):

1. Recepción y Pesado: Se pesó para poder determinar más adelante el rendimiento de la hortaliza
2. Selección: Se separaron las hortalizas sanas de las dañadas mediante inspección visual.
3. Clasificación: para el caso de la acelga y espinaca se escogieron las hojas que tuvieran similar tamaño y grado de madurez. No se utilizaron las hojas demasiado pequeñas.
4. Corte o deshoje: el corte para el caso de la espinaca y acelga consistió en separar la hoja del tallo. El deshoje se aplicó a la lechuga
5. Limpieza y Lavado: El lavado se realizó con aspersion de agua potable con el fin de retirar la mugre, tierra u otras sustancias presentes indeseadas.

6. Desinfección: Se utilizó hipoclorito de sodio en concentración de 50 ppm a razón de 1 de hortaliza por 3 de desinfectante ya diluido. Se sumergió la hortaliza en el desinfectante por tiempo de 10 minutos.
7. Enjuague: Se realizó por aspersión de agua potable con el fin de retirar los residuos de desinfectante.
8. Pesado: Se pesó para determinar el rendimiento de la hortaliza.
9. Escaldado: El tiempo de escaldado fue de 3 min basado en los reportes presentados en la bibliografía (Ramaswamy, 2006) y en la experiencia del ICTA en procesos similares de este tipo de hortalizas.
10. Molido: tiempo de molienda de 3 min.
11. Homogeneizado
12. Pesado: Se pesó para determinar la pérdida de pulpa en el procesado.
13. Control de calidad: en esta etapa se evaluó la calidad microbiológica de la pulpa obtenida.
14. Empaque
15. Congelación: a temperatura de -20°C

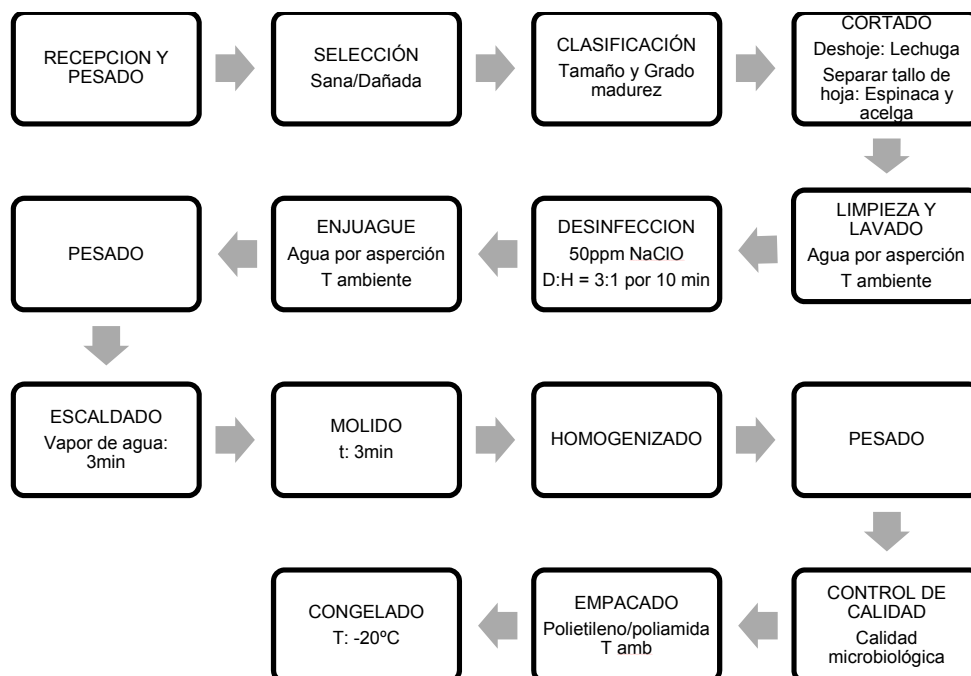


Figura 7. Etapas para la obtención de pulpa de acelga, espinaca y lechuga

Para la segunda clase se aplicaron las siguientes etapas (Ver figura 8), en orden:

1. Recepción y Pesado: Una vez recibida la hortaliza, se pesó para poder determinar más adelante el rendimiento de la hortaliza.
2. Selección: Se separaron las hortalizas sanas de las dañadas mediante inspección visual.
3. Clasificación: Se escogieron las hortalizas que tuvieran similar tamaño y grado de madurez por cada clase de hortaliza.
4. Pelado y despulpado: Esta etapa solo se aplicó a la ahuyama con el propósito de retirar la cascara y la semilla
5. Corte: Se cortaron la zanahoria, remolacha y ahuyama en rodajas entre 3 a 5 mm para facilitar el escaldado y la molienda.
6. Limpieza y Lavado: El lavado se realizó con aspersion de agua potable con el fin de retirar la mugre, tierra u otras sustancias presentes indeseadas.
7. Desinfección: Se utilizó hipoclorito de sodio en concentración de 50 ppm a razón de 1 de hortaliza por 3 de desinfectante ya diluido. Se sumergió la hortaliza en el desinfectante por tiempo de 10 minutos.
8. Enjuague: Se realizó por aspersion de agua potable.
9. Pesado: Se pesó para determinar el rendimiento de la hortaliza.
10. Escaldado: El tiempo de escaldado fue de 5 min basado en los reportes presentados en la bibliografía (Salunkhe, 2004) y en la experiencia del ICTA en procesos similares de este tipo de hortalizas.
11. Molido: tiempo de molienda de 7 min.
12. Homogeneizado
13. Pesado
14. Control de calidad: en esta etapa se evaluó la calidad microbiológica de la pulpa obtenida.
15. Empaque
16. Congelación: a temperatura de -20°C

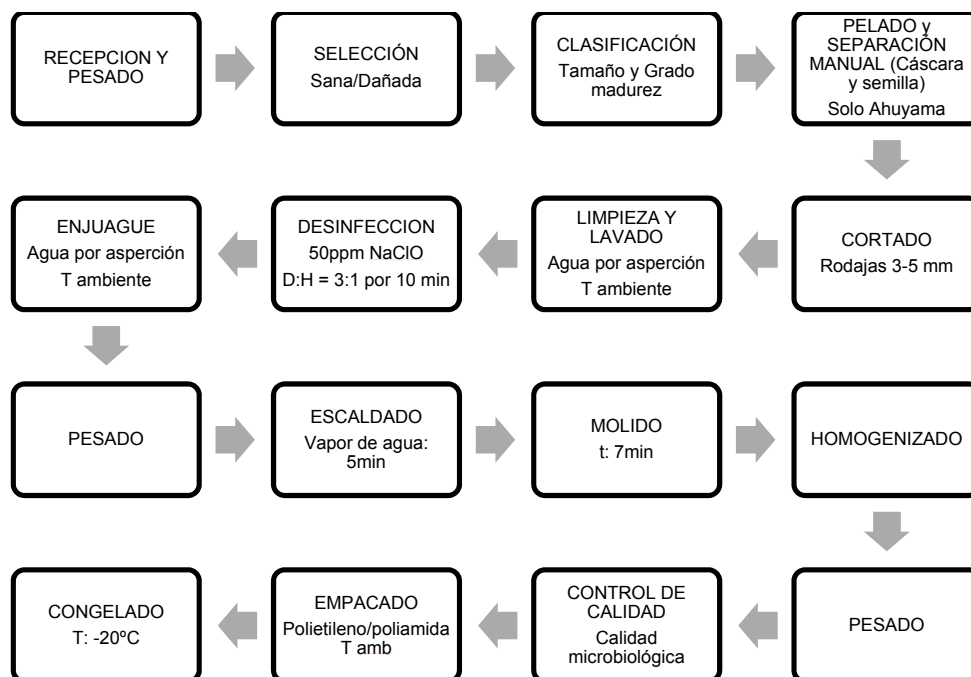


Figura 8. Etapas para la obtención de la pulpa de ahuyama, remolacha y zanahoria.

Se aclara que el escaldado se realizó con vapor debido a que la bibliografía reporta que se presenta menor pérdida de vitaminas, minerales y azúcar por este tipo de escaldado que con el de agua (Ramaswamy, 2006).

A estas pulpas se les realizó el respectivo control microbiológico dando los siguientes resultados, similares para todas, que se muestran en la tabla 14:

Tabla 14. Resultados del control microbiológico de las pulpas de hortaliza

ANÁLISIS	MÉTODO	VALOR REFERENCIA	RESULTADOS
Coliformes Totales ufc/g o ml	N.M.P. INVIMA N° 13	<3	<3
Coliformes Fecales ufc/g o ml	N.M.P. INVIMA N° 14	<3	<3
Recuento de hongos y levaduras ufc/g o ml	Recuento en placa INVIMA N° 7	<10	<10
Recuento esporas clostridium sp sulfito reductor ufc/g o ml	INVIMA N° 10	<10	<10

3.3 SELECCIÓN DE LA PULPA DE HORTALIZA

3.3.1 Determinación de la capacidad antioxidante de las pulpas de hortalizas:

La capacidad antioxidante de las 6 pulpas de hortalizas preseleccionadas se determinó por los métodos DPPH y ABTS. Se dividieron estas hortalizas en grupos por tipo de color. A continuación se presentan en la tabla 15 los valores de la capacidad antioxidante separadas por color de hortaliza.

Tabla 15. Valor de DPPH y ABTS para las hortalizas preseleccionadas

GRUPO	HORTALIZA	Método DPPH	Método ABTS
AMARILLO-NARANJA	Ahuyama	73.93 ± 5.3	1.75 ± 0.39
	Zanahoria	25.68 ± 1.1	2.46 ± 0.38
VERDE	Lechuga	26.5 ± 2.3	2.04 ± 0.25
	Acelga	21.5 ± 1.5	5.97 ± 0.55
	Espinaca	18.71 ± 3.02	6.33 ± 0.52
ROJO	Remolacha	5.90 ± 0.1	5.74 ± 0.17

De cada grupo establecido se escogió la pulpa de hortaliza que presentaba mayor poder antioxidante (para el caso de DPPH el de menor valor); para el primer grupo se seleccionó la zanahoria, para el segundo la espinaca, y para el tercer grupo, debido a que solo está una hortaliza, se escoge la remolacha.

Como se observa en la tabla anterior, los valores de DPPH de estas hortalizas son mayores que el de las pulpas de frutas seleccionadas inicialmente (Mango y Mora), y los valores de ABTS son menores que los de estas pulpas, lo que indica que poseen menor capacidad antioxidante y no sería adecuado realizar una mezcla, cualquiera que sea, entre estas frutas y hortalizas ya que disminuirían la capacidad de las frutas, por lo tanto es necesario buscar otras pulpas de frutas que realmente al mezclarlas con las hortalizas me aumenten su capacidad antioxidante.

3.3.2 Mezclas pulpa de fruta y hortaliza

Una vez escogidas estas tres pulpas de hortalizas y debido a que uno de los criterios de selección es la compatibilidad sensorial con la pulpa de fruta y la actividad antioxidante, se continuó manejando los grupos por color anteriormente mencionados pero esta vez tanto para las tres hortalizas como para las pulpas de frutas. En la tabla 16 se muestran los diferentes grupos establecidos.

Es de resaltar que con el fin de conseguir la mezcla de fruta y hortaliza más adecuada, se tiene en cuenta que la pulpa de hortaliza debe poseer mayor capacidad antioxidante que la pulpa de fruta.

Tabla 16. Grupos por compatibilidad en color de las 20 pulpas de fruta y 3 hortalizas seleccionadas

GRUPO	HORTALIZA	FRUTA
Grupo 1 (Amarillo-Naranja)	Zanahoria	Banano, Curuba, Durazno, Guanábana, Granadilla, Mango, Maracuyá, Naranja, Papaya, Piña y Uchuva.
Grupo 2 (Verde)	Espinaca	Feijoa, Limón, Lulo, Manzana y Guanábana
Grupo 3 (Rojo)	Remolacha	Fresa, Guanábana, Guayaba, Manzana, Mora, Tomate de árbol y Uva.

Partiendo de los grupos generados en la tabla anterior, se comparan, dentro de cada grupo, los valores de la actividad antioxidante por el método DPPH y ABTS de las pulpas de fruta respecto a la hortaliza, seleccionando aquellas pulpas que posean menor capacidad antioxidante que la pulpa de hortaliza y de esta forma garantizar un mayor poder antioxidante en la pulpa funcional. (Para los valores de la actividad antioxidante de las pulpas de frutas y hortalizas ver las tablas 11 y 15) Una vez realizada esta comparación se seleccionaron las siguientes pulpas de fruta dentro de cada grupo las cuales se muestran en la tabla 17.

Tabla 17. Pulpas de frutas compatibles por color y con menor capacidad antioxidante para cada una de las pulpas de zanahoria, espinaca y remolacha

GRUPO	HORTALIZA	FRUTA COMPATIBLE
Amarillo – Naranja	Zanahoria	Ninguna
Verde	Espinaca	Manzana, Limón
Rojo	Remolacha	Manzana y Uva

Establecidos estos grupos se seleccionan las dos hortalizas de acuerdo a los criterios mencionados con anterioridad. La tabla 18 resume los valores de los criterios de selección para las tres hortalizas.

Tabla 18. Valores de los criterios de selección para la zanahoria, espinaca y remolacha.

HORTALIZA	Actividad Antioxidante (DPPH)	Actividad Antioxidante (ABTS)	pH	Sensorial (Nº Frutas Compatibles)	costo mercado (USD)	PRODUCCION TON 2004
Zanahoria	25.68 ± 1.1	2.46 ± 0.38	6.19 ± 0.08	0	0.32	184641
Espinaca	18.71 ± 3.02	6.33 ± 0.52	6.65 ± 0.06	2	0.43	2270
Remolacha	5.9 ± 0.1	5.74 ± 0.17	5.9 ± 0.06	2	0.43	12743

De acuerdo a los puntajes señalados para cada propiedad, expuestos en la tabla 7, se construye la tabla 19 en donde se muestran los resultados de los puntajes por propiedad y totales para cada hortaliza.

Tabla 19. Puntaje asignado por criterio para las pulpas de zanahoria, espinaca y remolacha

Hortaliza	Puntaje A. A. DPPH	Puntaje A. A. ABTS	Puntaje pH	Puntaje sensorial	Puntaje costo	Puntaje producción	TOTAL
Zanahoria	0.00	0.00	15	0.00	10.00	10.00	35.00
Espinaca	5.29	15.00	10.00	30.00	0.00	0.00	60.29
Remolacha	15.00	12.71	20.00	30.00	0.00	0.57	78.28

De la tabla anterior se escogen, de acuerdo a los objetivos propuestos, las dos hortalizas que dan mayor puntaje que para este caso son: Espinaca y Remolacha. Para trabajar con estas dos hortalizas es necesario mezclarlas con las pulpas de frutas compatibles con ellas, como muestra en la tabla 17, que son de manera general el limón, la manzana y la uva, debido a que el mango y la mora (que se habían seleccionado con anterioridad), poseen una actividad antioxidante mucho mayor. Sin embargo el objetivo es obtener dos pulpas de fruta, por esta razón se descarta la pulpa de limón, ya que ésta es de menor capacidad antioxidante que la hortaliza compatible (espinaca), solo en el ABTS y no en el DPPH, a diferencia de la manzana y uva que presentan menor capacidad antioxidante en ambos métodos frente a sus respectivas hortalizas compatibles (espinaca y remolacha). De esta manera y para concluir esta etapa, las hortalizas y frutas a trabajar para continuar con el desarrollo de la pulpa funcional son:

- Frutas: Manzana y Uva
- Hortalizas: Espinaca y Remolacha

Y las posibles combinaciones serían:

- Uva – Remolacha
- Manzana – Remolacha
- Manzana – Espinaca

3.4 DETERMINACIÓN DE LAS PROPORCIONES DE PULPA DE FRUTA Y HORTALIZA EN LAS DIFERENTES MEZCLAS

Con el fin de determinar la proporción adecuada de la pulpa de hortaliza en la pulpa de fruta para las combinaciones sugeridas, se analizaron tres diferentes concentraciones: 10%, 30% y 50%. En resumen, se trabajaron las siguientes combinaciones:

- Grupo 1: Uva – Remolacha al 10, 30 y 50% de remolacha
- Grupo 2: Manzana – Remolacha al 10, 30 y 50% de remolacha
- Grupo 3: Manzana – Espinaca al 10, 30 y 50% de espinaca

Para un total de 3 muestras por grupo de mezcla y de 9 muestras a nivel general.

3.4.1 Análisis Sensorial

Dentro de cada grupo de muestras se realizó una prueba de afectividad utilizada para el análisis sensorial con 20 evaluadores, analizando aspectos como aroma, sabor y apariencia, con el fin de elegir la más aceptable (ver anexo 03-A). Se utilizó el método de Kruskal-Wallis para el tratamiento de los datos. A continuación se muestran los resultados obtenidos para cada grupo de muestras en donde se escogió la mezcla que da mayor puntaje total de acuerdo a los aspectos evaluados:

3.4.1.1 Sensorial prueba de afectividad pulpa de Manzana-Espinaca

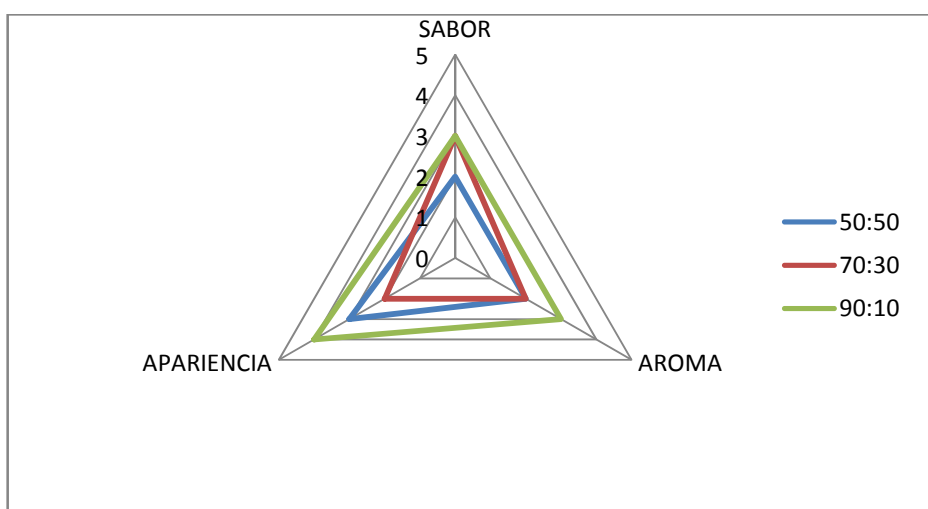


Figura 9. Diagrama triangular de medición de aceptabilidad de la mezcla manzana con espinaca en cantidades del 50%, 30% y 10% de la hortaliza.

De acuerdo a la figura 9, la mezcla con 10% de pulpa de espinaca presentó mejores condiciones de aceptabilidad, en los tres aspectos evaluados, por parte de los panelistas, con referencia a las otras dos mezclas, obteniendo puntajes de 4, 3 y 3 para los aspectos de apariencia, sabor y aroma respectivamente, los cuales corresponden a las descripciones de “Me gusta” para el caso de la apariencia, “Ni me gusta ni me disgusta” para el sabor y de “Me gusta” para el del

aroma. Por lo anteriormente mencionado la mezcla seleccionada correspondió a la de 90% de manzana y 10% de espinaca, seguida por la de 70%-30% y por último la de 50%-50%.

3.4.1.2 Sensorial prueba de afectividad pulpa de Uva-Remolacha

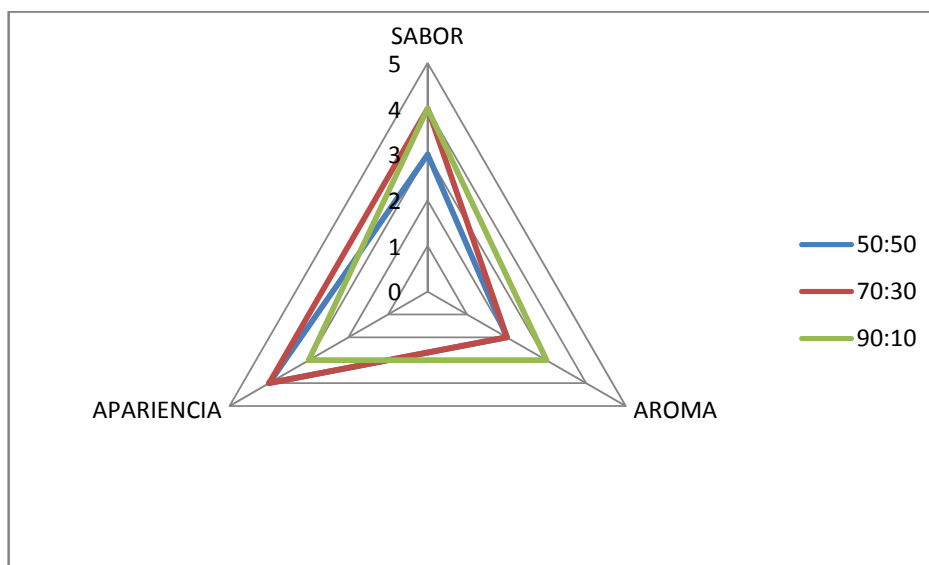


Figura 10. Diagrama triangular de medición de aceptabilidad de la mezcla uva con remolacha en cantidades del 50%, 30%, y 10% de la hortaliza.

De acuerdo a la figura 10, las mezclas de 30% y 10% de la pulpa de hortaliza presentan igual calificación en el sabor (puntaje de 4 que corresponde a la descripción de “Me gusta”), y mayores que el de la mezcla con el 50% que alcanzó un valor de 3; por otro lado, en el aspecto evaluado de apariencia, la mezcla del 30% obtuvo el mayor puntaje de las tres con un valor de 4, sin embargo en el aroma alcanzó un valor de 2, igual que la mezcla del 50%, siendo el de mayor puntaje en este aspecto la mezcla con el 10% de la pulpa de remolacha con un valor de 3. Por lo tanto la mezcla seleccionada correspondió a la pulpa con un 70% de pulpa de uva y 30% de pulpa de remolacha, seguida por la de 90%-10% y por último la de 50%-50%.

3.4.1.3 Sensorial prueba de afectividad pulpa de Manzana-Remolacha

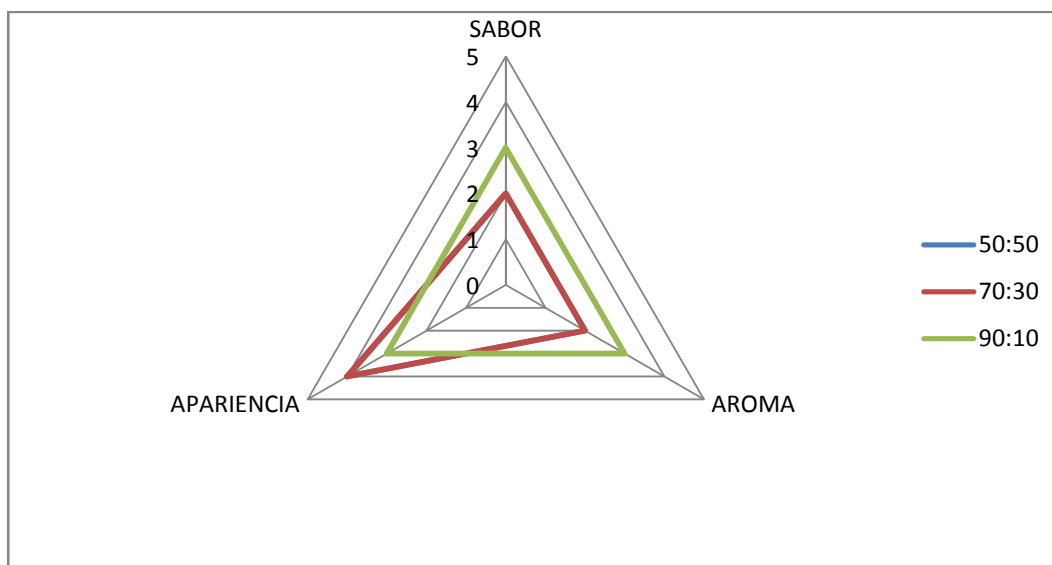


Figura 11. Diagrama triangular de medición de aceptabilidad de la mezcla manzana con remolacha en cantidades del 50%, 30%, y 10% de la hortaliza

Como se aprecia en la figura 11, las mezclas con 50% y 10% de la pulpa de hortaliza presentaron iguales valores para los tres aspectos evaluados, teniendo puntajes de 4, 2 y 2 para la apariencia, sabor y aroma respectivamente. Por otro lado la mezcla con el 10% de pulpa de remolacha, presentó valores de 3 para todos los tres aspectos evaluados, estando por encima de las otras dos mezclas en los aspectos de sabor y aroma. Por lo tanto la mezcla seleccionada fue la de 90% de Manzana y 10% de remolacha, seguida por la mezcla de 70%-30% y por último la de 50%-50%.

3.4.2 Determinación de la capacidad antioxidante de las mezclas

A continuación en la tabla 20 se muestran los valores de actividad antioxidante para cada mezcla:

Tabla 20. Valores de actividad antioxidante método DPPH para las mezclas Uva-Remolacha, Manzana-Remolacha y Manzana-Espinaca en las diferentes proporciones

MEZCLA	ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE MÉTODO DPPH. IC50 mg pulpa/ml sln		
	50-50	70-30	90-10
Uva-Remolacha	10.84 ± 0.3	13.87 ± 0.87	18.94 ± 2.02
Manzana-Remolacha	30.91 ± 2.17	41.37 ± 3.6	51.84 ± 2.04
Manzana-Espinaca	38.93 ± 2.66	47.78 ± 1.37	55.22 ± 4.9

En la tabla 21 se muestran los resultados de los puntajes por criterio de selección y el puntaje total para cada mezcla:

Tabla 21. Puntajes por criterio de selección para las mezclas Uva-Remolacha, Manzana-Remolacha y Manzana-Espinaca en las diferentes proporciones

MEZCLA	Puntaje Actividad Antioxidante	Puntaje Análisis Sensorial	TOTAL
Uva-Remolacha. 50-50	50	10	60
Uva-Remolacha. 70-30	30	50	80
Uva-Remolacha. 90-10	20	25	45
Manzana-Espinaca. 50-50	50	10	60
Manzana-Espinaca. 70-30	30	25	55
Manzana-Espinaca. 90-10	20	50	70
Manzana-Remolacha. 50-50	50	10	60
Manzana-Remolacha. 70-30	30	25	55
Manzana-Remolacha. 90-10	20	50	70

Por lo tanto las mezclas seleccionadas son:

- Uva-Remolacha: 70-30.
- Manzana-Espinaca: 90-10.
- Manzana-Remolacha: 90-10.

3.5 SELECCIÓN DE UNA PULPA DE MEZCLA ENTRE LAS DIFERENTES MEZCLAS OBTENIDAS

A continuación se presentan los resultados obtenidos tanto para los análisis fisicoquímicos establecidos como para el análisis sensorial

3.5.1 Determinación de la actividad antioxidante, acidez y pH

En la tabla 22 se muestran los valores de las propiedades de actividad antioxidante por el método DPPH, acidez y pH. Para la distribución del puntaje de actividad antioxidante se tomaron como referencia los valores del método de DPPH.

Tabla 22. Valores de actividad antioxidante, acidez y pH para las mezclas Uva-Remolacha 70:30, Manzana-Remolacha 90:10 y Manzana-Espinaca 90:10

MEZCLA	Actividad Antioxidante DPPH	Acidez (meq/kg)	pH
Uva-Remolacha 70-30	13.87 ± 0.87	86.55 ± 1.56	3.92 ± 0.02
Manzana-Espinaca 90-10	55.22 ± 4.9	28.25 ± 0.35	4.22 ± 0.03
Manzana-Remolacha 90-10	51.84 ± 2.04	32.52 ± 1.37	4.12 ± 0.03

3.5.2 Análisis sensorial de las mezclas seleccionadas

Se trató de la misma forma que para la selección de la proporción en la mezcla dentro de cada grupo de mezclas. Como se mencionó en la metodología se realizó una prueba de afectividad utilizada para el análisis sensorial con 20 evaluadores, analizando aspectos como aroma, sabor y apariencia, con el fin de elegir la más

aceptable (ver anexo 03-B). Se utilizó el método de Kruskal-Wallis para el tratamiento de los datos. Se muestra a continuación el resultado obtenido en donde se escogió la mezcla que da mayor puntaje total de acuerdo a los aspectos evaluados:

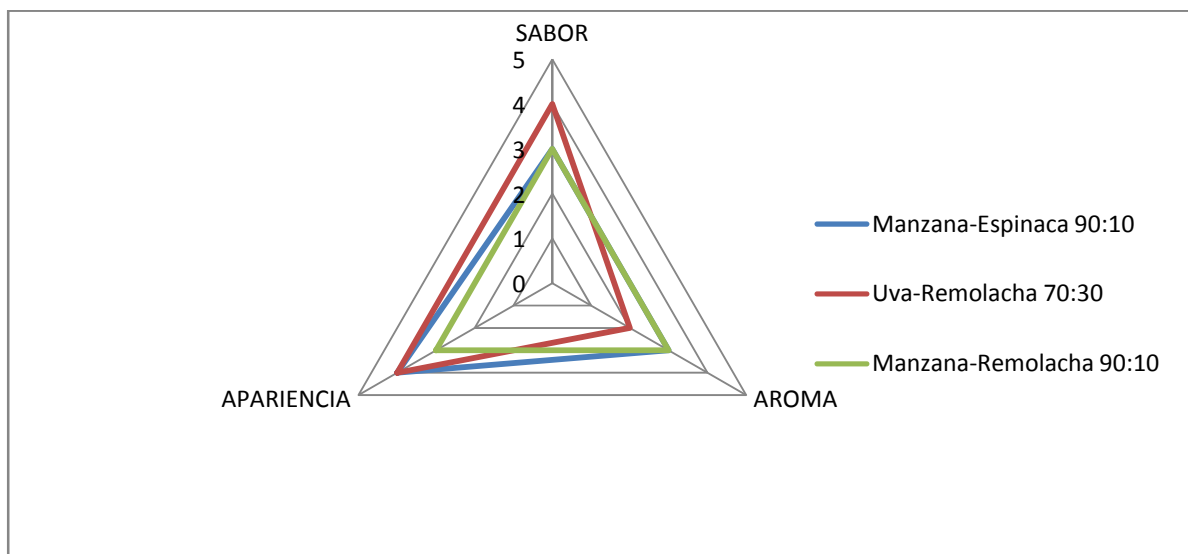


Figura 12. Diagrama triangular de medición de aceptabilidad de las mezclas Uva-Remolacha 70:30, Manzana-Remolacha 90:10 y Manzana-Espinaca 90:10.

Como se aprecia en la figura 12, la pulpa de uva-remolacha 70:30 presentó el mayor valor en sabor que las otras dos pulpas, en la apariencia obtuvo una calificación igual que la pulpa manzana-espínaca 90:10, pero mayor que la de la pulpa de manzana-remolacha 90:10. Sin embargo en el aspecto de aroma consiguió la menor calificación de las tres pulpas evaluadas. Por esta razón de estas tres muestras se seleccionó la mezcla uva-remolacha 70:30, que corresponde a 70% de uva y 30% remolacha debido a que poseía los mayores puntajes dentro de los parámetros evaluados.

La tabla 23 muestra los puntajes por propiedad y el puntaje total para las mezclas de pulpas:

Tabla 23. Puntaje por criterio de selección para las mezclas Uva-Remolacha 70:30, Manzana-Remolacha 90:10 y Manzana-Espinaca 90:10

MEZCLA	Puntaje Actividad Antioxidante DPPH	Puntaje Acidez	Puntaje Sensorial	Puntaje pH	TOTAL
Uva-Remolacha 70-30	35	3	35	7	79
Manzana-Espinaca 90-10	20	10	20	20	70
Manzana-Remolacha 90-10	10	6	10	14	40

De lo anterior se concluye que la pulpa seleccionada es:

- Uva-Remolacha 70-30: 70% Uva y 30 % de Remolacha

3.6 ADICIÓN DEL PROBIÓTICO A LA PULPA DE MEZCLA Y A LAS DOS PULPAS DE FRUTA SELECCIONADAS Y SU SEGUIMIENTO DURANTE EL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO

Una vez adicionado el microorganismo probiótico en las concentraciones respectivas, a las pulpas de mango, mora y uva-remolacha 70:30, se almacenaron las muestras a -20°C durante 90 días haciendo un seguimiento cada 15 días de las propiedades mencionadas a continuación:

- Conteo de Bacterias acidolácticas
- Actividad Antioxidante: Método DPPH y ABTS
- pH
- Acidez
- Brix
- Análisis Sensorial: este análisis sensorial no se realizó cada 15 días sino los días 0, 45 y 90 de almacenamiento.

3.6.1 Resultados pulpa uva-remolacha 70:30

En la tabla 24 se resumen los resultados obtenidos de la mezcla uva-remolacha 70-30 a dos diferentes concentraciones de probióticos teniendo como blanco la mezcla sin el probiótico:

Tabla 24. Resultado de los valores del recuento de BAL, DPPH, ABTS, pH, acidez y °brix para la mezcla Uva-Remolacha 70:30 sin y con dos concentraciones diferentes del microorganismo probiótico adicionado.

MEZCLA	PROPIEDAD	DIA							
		0	8	15	30	45	60	75	90
Uva-Remolacha sin probiótico	Recuento BAL Log ₁₀ ufc/g	0	0	0	0	0	0	0	0
	DPPH	12.11	12.10	12.71	12.51	12.52	12.18	12.10	12.24
	ABTS	3.30	3.38	3.17	3.85	3.43	3.91	3.49	3.90
	pH	3.90	3.92	3.85	3.87	3.95	3.93	3.87	3.93
	Acidez	85.55	84.48	84.55	95.69	90.07	89.80	84.50	83.80
	°Brix	15.5	14.5	14.5	14	14	14.5	14	14.5
Uva-Remolacha con adición de 8.52 unidades log de ufc/g pulpa	Recuento BAL Log ₁₀ ufc/g	8.52	7.83	7.60	7.45	7.50	7.45	7.30	7.45
	DPPH	12.12	12.34	12.61	12.70	12.71	12.26	12.36	12.30
	ABTS	3.32	3.32	4.38	3.81	3.38	3.81	3.56	3.87
	pH	3.89	3.88	3.87	3.90	3.94	3.91	3.89	3.91
	Acidez	87.68	89.74	91.32	81.58	94.67	84.79	83.92	84.74
	°Brix	15.0	14.3	14.3	14.8	14.5	14.5	14.3	14.5
Uva-Remolacha con adición de 9.52 unidades log de ufc/g pulpa	Recuento BAL Log ₁₀ ufc/g	9.52	8.65	8.59	8.76	8.58	8.48	8.61	8.55
	DPPH	12.43	12.45	12.65	12.63	12.49	12.29	12.61	12.19
	ABTS	3.27	3.74	3.96	3.82	3.76	3.68	3.79	3.65
	pH	3.94	3.95	3.96	3.94	4.02	3.96	3.94	3.95
	Acidez	85.59	89.27	93.64	92.71	91.70	90.58	88.82	91.36
	°Brix	15.5	15.5	14.25	14.25	15.5	14.5	14.5	14.5

Respecto a los resultados del análisis sensorial, y como se mencionó con anterioridad, se realizó el método de prueba triangular (NTC 2681), durante los días 0, 45 y 90, para comparar las mezclas de Uva-remolacha sin adición de probiótico con la de adición de 8.52 unidades logarítmicas de ufc/gramo pulpa. También se comparó las mezclas de sin adición de probiótico con la de adición de 9.52 unidades logarítmicas de ufc/gramo pulpa, con el fin de observar si había diferencia entre las muestras con el probiótico y sin el probiótico (ver anexo 03-C). Los resultados se muestran en las tablas 25 a 27:

Tabla 25. Resultados de la evaluación sensorial para la mezcla Uva-Remolacha 70:30 entre las diferentes concentraciones del probiótico para el día 0

COMPARACIONES Día 0	Evaluadores que detectaron la diferencia	Evaluadores que NO detectaron la diferencia	TOTAL DE EVALUADORES
Entre las mezclas sin probiótico y con $10^{8.52}$ ufc/g pulpa	4	16	20
Entre las mezclas sin probiótico y con $10^{9.52}$ ufc/g pulpa	3	17	20

Tabla 26. Resultados de la evaluación sensorial para la mezcla Uva-Remolacha 70:30 entre las diferentes concentraciones del probiótico para el día 45

COMPARACIONES Día 45	Evaluadores que detectaron la diferencia	Evaluadores que NO detectaron la diferencia	TOTAL DE EVALUADORES
Entre las mezclas sin probiótico y con $10^{8.52}$ ufc/g pulpa	4	16	20
Entre las mezclas sin probiótico y con $10^{9.52}$ ufc/g pulpa	4	16	20

Tabla 27. Resultados de la evaluación sensorial para la mezcla Uva-Remolacha 70:30 entre las diferentes concentraciones del probiótico para el día 90

COMPARACIONES Día 90	Evaluadores que detectaron la diferencia	Evaluadores que NO detectaron la diferencia	TOTAL DE EVALUADORES
Entre las mezclas sin probiótico y con $10^{8.52}$ ufc/g pulpa	4	16	20
Entre las mezclas sin probiótico y con $10^{9.52}$ ufc/g pulpa	5	15	20

Siguiendo el procedimiento de la norma NTC 2681 se concluye, que para un $\alpha=0.05$ y $n= 20$ (ver norma la NTC Anexo 02) no hay ninguna diferencia significativa entre las mezclas analizadas durante los tres días seleccionados.

Con el fin de tener una comparación más amplia de estas mezclas, se determinaron las propiedades fisicoquímicas trabajadas a las pulpas de Uva y Remolacha de manera individual, exceptuando el conteo de microorganismos y el análisis sensorial, ya que no se realizaron. A continuación se muestra la tabla 28 que resume los resultados de estas pulpas, para el mismo tiempo de almacenamiento.

Tabla 28. Valores de las propiedades DPPH, ABTS, pH, acidez y °brix para las pulpas de Uva y Remolacha.

MEZCLA	PROPIEDAD	DIA							
		0	8	15	30	45	60	75	90
Remolacha	DPPH	7.30	7.40	7.54	7.53	7.48	7.48	7.58	7.47
	ABTS	5.59	5.59	4.84	5.89	5.85	5.91	5.77	5.77
	pH	6.04	6.06	6.06	6.06	6.05	6.03	6.05	6.02
	Acidez	23.90	24.47	24.34	23.55	24.22	23.82	24.52	24.49
	°Brix	10	10.5	12	10	11	12.5	11	10.5
Uva	DPPH	20.30	20.30	20.20	21.84	21.83	21.82	21.71	21.90
	ABTS	3.06	2.95	3.12	3.31	3.00	3.38	3.63	3.02
	pH	3.67	3.67	3.71	3.72	3.76	3.66	3.69	3.65
	Acidez	109.52	106.33	113.16	115.10	116.31	108.12	97.91	102.40
	°Brix	16	16.25	17	17	16.9	17	16.25	17

Como se observa en las tablas 24 y 28 anteriores, la actividad antioxidante por el método DPPH no presenta ninguna diferencia significativa entre las 3 mezclas de la pulpa uva-remolacha a las diferentes concentraciones del probiótico, razón por la cual se puede concluir que la adición del probiótico no surte ningún efecto significativo sobre esta propiedad. También se puede concluir que para ninguna de las pulpas individuales evaluadas (uva y remolacha), se encontró una diferencia significativa en el cambio de la actividad antioxidante por el método DPPH en el tiempo. Adicional a esto, se observar que al mezclar la uva con la remolacha ésta incrementó su actividad antioxidante (menor valor de DPPH IC50) al compararla con la pulpa de fruta pura.

Para el caso de la actividad antioxidante por el método ABTS, aunque su comportamiento es menos estable comparado con el DPPH, estadísticamente no presenta ninguna diferencia significativa para las 3 mezclas de la pulpa uva-remolacha a las diferentes concentraciones del probiótico ni para esta propiedad en el tiempo para cada una de las pulpas (ver anexo 4). También se puede observar que al mezclar la uva con la remolacha ésta incrementó su valor de ABTS al compararla con la pulpa de fruta pura.

En la acidez libre se observa una tendencia semejante al de actividad antioxidante método DPPH, teniendo la pulpa de uva pura la mayor acidez seguida por la mezcla y por último la remolacha. La variación de la acidez a través del tiempo no presenta un significativo cambio para estas tres pulpas. En esta figura también se puede observar que no hay un incremento en la acidez en las pulpas mezcladas que contenían el microorganismo probiótico concluyendo que a la temperatura de almacenamiento estos microorganismos no realizan ninguna actividad.

Respecto al pH, no se observa ningún cambio significativo en el tiempo para cada una de las pulpas estudiadas, ni para las que contienen probióticos ni para las que no contienen el probiótico, presentándose una tendencia casi constante en esta propiedad, mostrando que en las mezclas que contienen el probiótico no hay ninguna actividad por parte de ellos.

Para el caso de los °Brix, estadísticamente no hay una diferencia significativa respecto al tiempo para cada una de las pulpas. De manera general se aprecia una vez más que esta propiedad en la mezcla evaluada se encuentra en medio de las pulpas individuales.

La siguiente figura, figura 13, es de gran importancia debido a que presenta la cinética de la viabilidad de los microorganismos probióticos en el tiempo para la pulpa funcional a las dos diferentes concentraciones del microorganismo adicionado. Como se observa tanto para la concentración de 8.52 como para la de 9.52 unidades logarítmicas de ufc/g de pulpa, hay un decaimiento notorio entre el día 0 y día 15 de la viabilidad de los microorganismos debido posiblemente a su adaptación al medio, razón por la cual puede haber muerte de ellos, hasta alcanzar casi una estabilidad después de los 15 días hasta el tiempo evaluado (90 días). También se puede apreciar que al final del tiempo de almacenamiento, ambas mezclas que contienen el probiótico presentan más de 6 unidades logarítmicas de ufc/g cumpliendo con una de las recomendaciones para este tipo de productos.

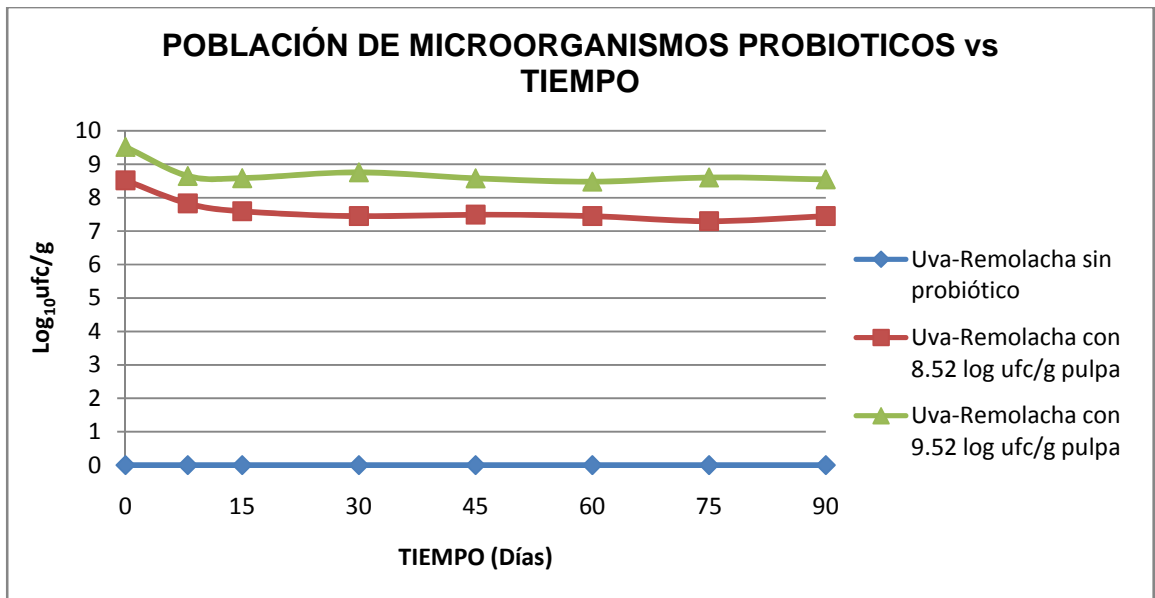


Figura 13. Viabilidad del microorganismo probiótico *Lactobacillus acidophilus* para la mezcla Uva-Remolacha 70:30 a las diferentes concentraciones del microorganismo probiótico.

3.6.2 Resultados pulpa de mango y mora

De acuerdo al propósito del proyecto, el fin era diseñar una pulpa funcional de frutas y hortalizas con adición de probióticos, sin embargo por razones de investigación también se analizó el efecto sobre las propiedades trabajadas de la inclusión del microorganismo probiótico en las pulpas de fruta pura que primeramente quedaron seleccionadas dentro de las 20 pulpas iniciales de fruta, que por motivos de poseer una capacidad antioxidante mayor a la de las hortalizas que se preseleccionaron no se mezclaron con éstas. Estas pulpas fueron:

- Mango
- Mora

En la tabla 29 se resumen los resultados obtenidos de las pulpas de mango y mora sin adición del probiótico y con adición del probiótico a concentración de 9.52 Log₁₀ ufc/g :

Tabla 29. Valores de las propiedades recuento de BAL, DPPH, ABTS, pH, acidez y °Brix para las pulpas de mango y mora a las concentraciones diferentes del microorganismo probiótico adicionado.

MEZCLA	PROPIEDAD	DIA							
		0	8	15	30	45	60	75	90
Mango sin adición de probiótico	Recuento BAL Log ₁₀ ufc/g	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	DPPH	0.79	0.75	0.76	0.73	0.78	0.76	0.75	0.75
	ABTS	25.84	23.29	23.90	23.06	22.29	24.29	21.28	22.07
	pH	3.97	3.96	3.97	3.99	3.96	3.97	3.98	3.96
	Acidez	110.12	110.07	111.12	110.40	111.12	112.23	110.42	110.65
	°Brix	15.75	16.25	15.50	16.00	16.25	16.00	15.50	15.50
Mango con adición de 9.52 unidades log de ufc/g pulpa	Recuento BAL Log ₁₀ ufc/g	9.52	9.21	9.11	8.76	9.78	9.01	9.10	8.70
	DPPH	0.78	0.78	0.81	0.75	0.74	0.73	0.76	0.76
	ABTS	27.47	27.47	20.86	24.87	22.33	21.64	25.29	24.92
	pH	3.98	3.99	3.99	3.97	4.04	3.99	3.98	3.98
	Acidez	111.42	110.10	109.96	111.88	111.72	112.59	112.92	111.07
	°Brix	16.75	16.50	15.75	16.00	16.50	16.25	15.50	15.75
Mora sin adición de probiótico	Recuento BAL Log ₁₀ ufc/g	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	DPPH	1.92	1.93	1.91	1.92	1.93	1.88	1.91	1.89
	ABTS	18.79	19.46	20.73	19.33	18.93	21.07	19.76	19.84
	pH	3.61	3.59	3.58	3.60	3.54	3.51	3.53	3.58
	Acidez	284.22	293.05	282.56	285.12	291.69	289.46	283.54	291.70
	°Brix	8.50	8.75	8.50	8.50	8.75	9.00	9.00	9.00
Mora con adición de 9.52 unidades log de ufc/g pulpa	Recuento BAL Log ₁₀ ufc/g	9.52	8.43	5.92	7.00	6.65	6.15	5.65	5.10
	DPPH	2.02	1.96	2.02	2.02	1.88	1.89	1.96	1.90
	ABTS	19.45	19.23	19.49	21.07	19.84	21.11	20.69	19.58
	pH	3.54	3.54	3.52	3.54	3.58	3.55	3.54	3.55
	Acidez	290.56	299.65	281.01	291.72	285.86	292.23	275.31	291.74
	°Brix	8.75	9.00	8.25	8.75	9.50	8.50	8.50	8.50

Respecto a los resultados del análisis sensorial, y como se mencionó con anterioridad, se realizó el método de prueba triangular (NTC 2681), durante los días 0, 45 y 90, para comparar las pulpas de mango sin y con adición del probiótico y también comparar las pulpas de mora sin y con adición del probiótico, con el fin de observar si había diferencia entre las pulpas con y sin el probiótico. Los resultados se muestran en las tablas del 30 al 32:

Tabla 30. Resultados de la evaluación sensorial para las pulpas Mango y Mora a las diferentes concentraciones del probiótico para el día 0

COMPARACIONES Día 0	Evaluadores que detectaron la diferencia	Evaluadores que NO detectaron la diferencia	TOTAL DE EVALUADORES
Entre pulpa de mango sin probiótico y con $10^{9.52}$ ufc/g pulpa	3	17	20
Entre pulpa de mora sin probiótico y con $10^{9.52}$ ufc/g pulpa	4	16	20

Tabla 31. Resultados de la evaluación sensorial para las pulpas Mango y Mora a las diferentes concentraciones del probiótico para el día 45

COMPARACIONES Día 45	Evaluadores que detectaron la diferencia	Evaluadores que NO detectaron la diferencia	TOTAL DE EVALUADORES
Entre pulpa de mango sin probiótico y con $10^{9.52}$ ufc/g pulpa	2	18	20
Entre pulpa de mora sin probiótico y con $10^{9.52}$ ufc/g pulpa	3	17	20

Tabla 32. Resultados de la evaluación sensorial para las pulpas Mango y Mora a las diferentes concentraciones del probiótico para el día 90.

COMPARACIONES Día 90	Evaluadores que detectaron la diferencia	Evaluadores que NO detectaron la diferencia	TOTAL DE EVALUADORES
Entre pulpa de mango sin probiótico y con $10^{9.52}$ ufc/g pulpa	3	17	20
Entre pulpa de mora sin probiótico y con $10^{9.52}$ ufc/g pulpa	2	18	20

Siguiendo el procedimiento de la norma NTC 2681 se concluye, que para un $\alpha=0.05$ y $n=20$ (ver norma la NTC Anexo 02) no hay ninguna diferencia significativa entre ninguna de las pulpas analizadas durante los tres días seleccionados.

De acuerdo a los resultados encontrados, como se aprecia en la tabla 29, no se encuentra una diferencia marcada en la capacidad antioxidante, medida por el método DPPH, para la pulpa de mango sin probióticos con la que contiene probióticos. De igual manera se presenta un comportamiento similar para la mora la cual posee una capacidad antioxidante menor que la del mango (valor mayor de DPPH). También se observa que no hay una variación significativa en el tiempo de la actividad antioxidante para ninguna de las pulpas evaluadas.

De igual forma, la capacidad antioxidante por el método ABTS para la pulpa de mango es mayor que para la pulpa de mora. También se concluye, de acuerdo al tratamiento de los datos, que no hay diferencia significativa entre la pulpa de mango con y sin probióticos, y de forma similar para la pulpa de mora. Tampoco se presenta una diferencia significativa respecto al tiempo para cada pulpa.

Para el caso del pH, no se encuentra ninguna diferencia significativa entre la pulpa con probiótico y sin probiótico para ambos casos: Pulpa de mango y pulpa de

mora. Este posible efecto es debido principalmente a las bajas condiciones de temperatura de almacenamiento que inhiben el crecimiento o desarrollo de las bacterias y por ende su efecto sobre el pH. Tampoco se aprecia un cambio significativo a través del tiempo para cada una de las pulpas evaluadas.

De igual forma que en para el pH, la acidez presenta un comportamiento similar, demostrándose que la adición de los probióticos no altera la acidez en ninguna de las pulpas siempre y cuando se conserven las condiciones de almacenamiento temperatura -20°C .

Respecto a los grados brix, éstos presentan un comportamiento similar a los descritos con las anteriores propiedades no presentando diferencia significativa respecto al tiempo dentro de cada pulpa ni diferencia entre la misma pulpa con y sin probiótico.

Para el caso del comportamiento de los microorganismos probióticos, la figura 14, muestra la viabilidad de los microorganismos en el tiempo de 90 días de almacenamiento a -20°C , observándose claramente una disminución del contenido de probióticos en ambas pulpas (mango y mora), pero siendo más notoria en la pulpa de mora, esto debido al efecto de su pH y acidez, ya que la mora presenta una mayor acidez y un menor pH que el mango generando más mortalidad de los microorganismos probióticos en el tiempo.

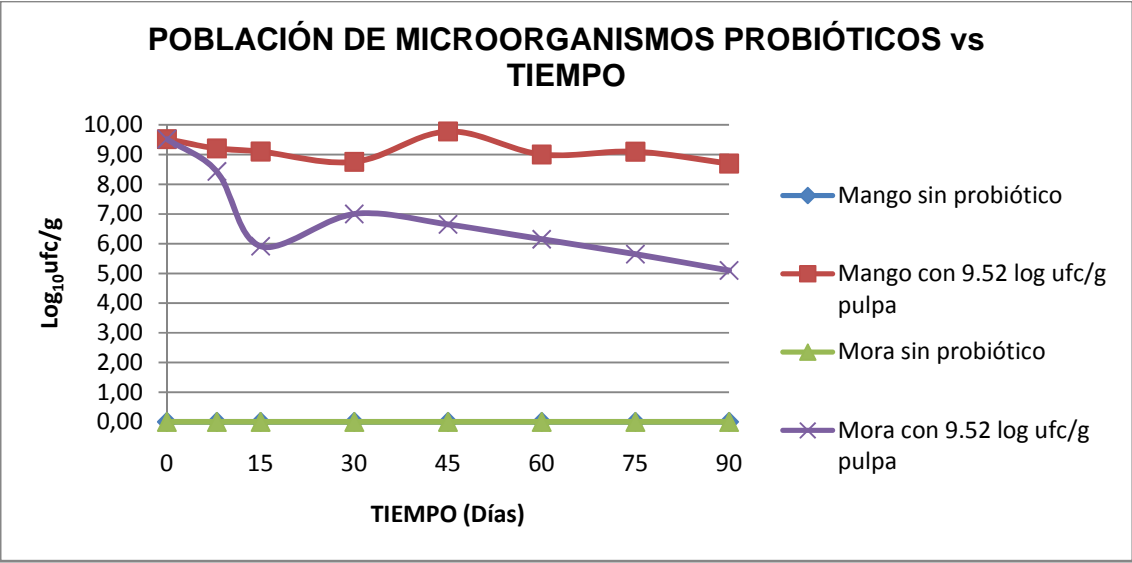


Figura 14. Viabilidad del microorganismo probiótico *Lactobacillus acidophilus* (Log_{10} ufc/g), para las pulpas de Mango y Mora a las diferentes concentraciones del microorganismo probiótico.

4. CONCLUSIONES

- Las dos pulpas de fruta con mayor puntaje de acuerdo con los criterios establecidos fueron: Mango y Mora
- Las dos pulpas de hortaliza seleccionadas para mezclar fueron: Espinaca y Remolacha.
- Las pulpas de Mango y Mora poseen mayor capacidad antioxidante que las pulpas de Espinaca y Remolacha obtenidas, razón por la cual no se realizaron mezclas entre ellas.
- Las pulpas de hortaliza de hoja como la espinaca, acelga y lechuga, cumpliendo con la calidad microbiológica, se pueden obtener mediante las siguientes etapas y condiciones: recepción, pesado, selección, clasificación, corte o deshoje (el corte para el caso de la espinaca y acelga consiste en separar la hoja del tallo y deshoje para la lechuga), lavado, desinfección, enjuague, escaldado con vapor (tiempo de escaldado de 3 min), molido (tiempo de molienda de 3 min), homogeneizado, pesado, empaque y congelación a -20°C.
- Las pulpas de hortaliza como la remolacha, ahuyama y zanahoria, cumpliendo con la calidad microbiológica, se pueden obtener mediante las siguientes etapas y condiciones: recepción, pesado, selección, clasificación, lavado, pelado y despulpado (solo se aplicó a la ahuyama con el propósito de retirar la cascara y la semilla), corte, lavado, desinfección, enjuague, escaldado con vapor (tiempo de escaldado de 5 min), molido (tiempo de molienda de 7 min), pesado, empaque y congelación a -20°C.
- Las dos pulpas de fruta seleccionadas para mezclar con las pulpas de Espinaca y Remolacha fueron: Manzana y Uva.
- Las pulpas de Espinaca y Remolacha obtenidas poseen mayor capacidad antioxidante que las pulpas de Manzana y Uva.
- La pulpa de mezcla fruta y hortaliza seleccionada fue la de Uva-Remolacha en porcentaje de 70 de Uva por 30 de Remolacha.

- Las 2 pulpas de hortaliza que presentaron mayor capacidad antioxidante por el método DPPH, de las 6 pulpas evaluadas, fueron la Remolacha y la Espinaca.
- Las 2 pulpas de hortaliza que presentaron mayor capacidad antioxidante por el método ABTS, de las 6 pulpas evaluadas, fueron la Remolacha y la Espinaca.
- Un criterio importante para mezclar pulpas de frutas y hortalizas es la capacidad antioxidante.
- Las 2 pulpas de fruta que presentaron mayor capacidad antioxidante por el método DPPH de las 20 pulpas de fruta trabajadas fueron la Feijoa y el Mango.
- Las 2 pulpas de fruta que presentaron mayor capacidad antioxidante por el método ABTS de las 20 pulpas de fruta trabajadas fueron la Feijoa y el Mango.
- Las pulpas de Mango y Mora son una buena fuente para la inclusión de microorganismos probióticos.
- La pulpa de Mango presenta mejor viabilidad de microorganismos probióticos que la de Mora debido principalmente a su menor acidez y pH más alto.
- Es posible obtener alimentos probióticos de las pulpas de Mango y Mora.
- La adición del probiótico *Lactobacillus acidophilus* a las pulpas de Mango, Mora y Uva-Remolacha en proporción de 70-30 no afectan la capacidad antioxidante en condiciones de almacenamiento de -20°C por 90 días.
- No hay cambio a través del tiempo de las propiedades de capacidad antioxidante, pH, acidez y °brix para las pulpas de uva-remolacha, mango y mora en sus diversas concentraciones de probióticos a temperatura de almacenamiento de -20°C.
- Agregarle pulpa de Remolacha a la pulpa de Uva aumenta su capacidad antioxidante.

- La pulpa de Uva-Remolacha en porcentaje de 70% de Uva y 30% de Remolacha son una buena matriz para la inclusión de microorganismos probióticos.
- La pulpa de Uva-Remolacha en porcentaje de 70% de Uva y 30% de Remolacha presenta una buena viabilidad del microorganismo probiótico *Lactobacillus acidophilus* durante un tiempo de almacenamiento de 90 días a -20°C.
- Este trabajo tiene una aplicación inmediata en la industria.
- Se pueden aplicar los criterios de selección de frutas y hortalizas trabajados en este proyecto a otros tipos de frutas y hortalizas con el fin de mezclarlas y enriquecerlas con probióticos.
- Se estableció una metodología para desarrollar mezclas adecuadas de pulpas de fruta y hortaliza con adición de microorganismos probióticos

5. RECOMENDACIONES

- Realizar mezclas entre pulpas de frutas de tal forma que se potencialice la capacidad antioxidante.
- Evaluar las distintas formas de preparación a nivel hogar de las pulpas funcionales.
- Estudiar la adición de edulcorantes y sus efectos sobre la pulpa funcional.
- Adicionar *bifidobacterium*, individual y en mezcla con el *lactobacillus*, a las pulpas funcionales y evaluar su comportamiento en las propiedades estudiadas en este proyecto.
- Realizar un estudio *in vivo* del consumo de las pulpas funcionales obtenidas en este trabajo.
- Estudiar el efecto de la pasteurización de la pulpa de hortaliza sobre la actividad antioxidante y sobre la viabilidad del microorganismo probiótico en la pulpa funcional.
- Estudiar el efecto de cada una de las etapas en la elaboración de la pulpa de fruta sobre la actividad antioxidante.

6. BIBLIOGRAFIA

Agence Francaise de Securitoe des Aliments (AFSSA). (April 6, 2004). Notification 2003-SA-0352.

Ahn, J., Grün, I. U., & Mustapha, A. (2007). Effects of plant extracts on microbial growth, color change, and lipid oxidation in cooked beef. *Food Microbiology*, 24, 7–14.

Alvarez-Olmos, M. I., & Oberhelman, R. A. (2001). Probiotic agents and infectious diseases: A modern perspective on a traditional therapy. *Clinical Infectious Diseases*, 32, 1567–1575.

Association of Official Analytical Chemists, AOAC. (1998). *Official Method of Analysis of AOAC International*. Edition 16th, Revision 4th.

Barillari, J., Cervellati, R., Costa, S., Guerra, M. C., Speroni, E., Utan, A., & Iori, R. (2006). Antioxidant and choleric properties of *Raphanus sativus* L. sprout (Kaiware Daikon) extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 9773–9778.

Barylko-Pikielna, N., Matuszewska, I., Jeruszka, M., Kozłowska, K., Brzozwska, A., & Roszkowski, W. (2004). Discriminability and appropriateness of category scaling versus ranking methods to study sensory preferences in elderly. *Food Quality and Preference*, 15, 167–175.

Benavides, G. A., Squadrito, G. L., Mills, R. W., Patel, H. D., Isbell, T. S., Patel, R. P., Darley-USmar, V. M., Doeller, J. E., & Kraus, D. W. (2007). Hydrogen sulfide mediates the vasoactivity of garlic. *PNAS*, 104, 17977– 17982.

Brandi, G., Amagliani, G., Sisti, M., Fraternali, D., Ninfali, P., & Scoccianti, V. (2007). Antibacterial activity of a stable standardized in vitro culture of *Rubus ulmifolius* Schott against food-borne pathogenic bacteria. *Italian Journal of Food Science*, 19, 471–476.

Brand-William. W, M.E. Cuvelier, C. Berset, *Lebensm. Wiss. U-Technol.* 28, 25, 1995

Cabeza, E.A. 2006. Conferencia dada en: Simposio Regional de Microbiología “Microorganismos Eficientes en el Sector Productivo”, Universidad Libre, Barranquilla – Colombia. 15 y 16 de septiembre de 2006.

Camacho G. y col. 1992 “Obtención y conservación de pulpas de frutas” Memorias del curso de extensión. ICTA - Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá.

Cartagena, A. M. 2005. Soy protein: The next antihypertensive agent? *CMAJ* 173:486.

Chu, Y.H., Chang, C.L. & Hsu, H.F. 2000. Flavonoid content of several vegetables and their antioxidant activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 561-566.

Chu, Y. F., Sun, J., Wu, X., & Liu, R. H. (2002). Antioxidant and antiproliferative activities of common vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6910–6916.

Djilas, S.M. and Milic, B.Lj. (1994). Naturally Occurring Phenolic Compounds as Inhibitors of Free Radical Formation in the Maillard Reaction' in *Maillard Reactions in Chemistry, Food and Health*, (Labuza, T.P., Reineccius, G.A., Monnier, V.M.,

O'Brien, J., Baynes, J.W., eds), pp. 75±80, The Royal Society of Chemistry, Cambridge.

Dillard, C.J. & German, J.B. 2000. Phytochemicals: nutraceuticals and human health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1744-1756.

Drenowski, A., Ahlstrom Henderson, S., Hann, C. S., Barratt-Fornell, A., & Ruffin, M. (2002). Age and food preferences influence dietary intakes of breast care patients. *Health Psychology*, 18(6), 570–578.

Duffy, S. J., & Vita, J. A. (2003). Effects of phenolics on vascular endothelial function. *Current Opinion in Lipidology*, 14,21–27.

Eberhardt, M. V., Lee, C. Y., & Liu, R. H. (2000). Antioxidant activity of fresh apples. *Nature*, 405,903–904.

Eichner, K. (1981) 'Antioxidative Effect of Maillard Reaction Intermediates' in *Progr. Food Nutr. Sci* 5, 441±451.

Fahey, W. J. and Stephenson, K. K., 1999. Cancer chemoprotective effects of cruciferous vegetables. *HortScience*, 34(7), 1159-1163.

FAO/WHO. 2002. Guidelines for the evaluation of probiotics in food.

FAO 2003. Prioridad mundial al consumo de fruta y hortalizas: Muy pocas personas consumen suficientes frutas y hortalizas.

FAO 2003. Monitoreo de mercados N° 5 Abril-Junio del 2003 Mercado Nacional de Frutas y Hortalizas.

Fernández-Pachón, M., Villaño, D., Troncoso, A. M., García-Parrilla, M. C. (2006). Revisión de los métodos de evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* del vino y valoración de sus efectos *in vivo*. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. Vol 56 N° 2.

Finlay, B. B., & Falkow, S. (1989). Common themes in microbial pathogenicity. Microbiology Review, 53, 210–230.

Forde, C. G., & Delahunty, C. M. (2004). Understanding the role crossmodal sensory interactions play in food acceptability in younger and older consumers. Food Quality and Preference, 15(7–8), 715–727.

Fraternale, D., Bacchiocca, M., Giamperi, L., Ricci, D., Scoccianti, V., & Ninfali, P. (2007). Control of isolates of Fusarium species by using extracts of Rubus ulmifolius micropropagated plantlets. Journal of the Food Agricultural Environmental, 5, 442–445.

Fresco, P., Borges, F., Diniz, C., & Marques, M. P. M. (2006). New insights on the anticancer properties of dietary polyphenols. Medicinal Research Reviews, 26, 747–766

Fuller, R. (1992). History and development of probiotics. R. Fuller (Ed.), Probiotics, the scientific basis (pp. 1–8). London, UK: Chapman & Hall.

Garcia-Closas, R., Gonzalez, C.A., Agudo, A. & Riboli, E. 1999. Intake of specific carotenoids and flavonoids and the risk of gastric cancer in Spain. Cancer Causes and Control, 10, 71-75.

Gonçalves, E.M., Pinheiro, J., Abreu, M., Brandão, T.R.S., Silva, C.L.M. (2010) Carrot (*Daucus carota L.*) peroxidase inactivation, phenolic content and physical

changes kinetics due to blanching. *Journal of Food Engineering*, Volume 97, Issue 4, Pages 574-581

Gorbach, S. L. (1996). The discovery of *Lactobacillus GG*. *Nutrition Today*, 31, 2–4.

Halliwel, B., Murcia, M.A., Chirico, S. & Auroma, O.I. 1995. Free radicals and antioxidants in food and in vivo: what they do and how they work?. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, 35, 7-20.

Hayek, T., Fuhrman, B., Vaya, J., Rosenblat, M., Belinky, P., Coleman, R., Elis, A., & Aviram, M. (1997). Reduced progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice following consumption of red wine, or its polyphenols quercetin or catechin, is associated with reduced susceptibility of LDL to oxidation and aggregation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 17, 2744–2752.

Heenan, C.N., Adams, M.C., Hosken, R.W., Fleet, G.H., 2004. Survival and sensory acceptability of probiotic microorganisms in a nonfermented frozen vegetarian dessert. *Lebensm.-Wiss. U. Technol.* 37, 461-466.

Hirsch, K., Danilenko, M., Giat, J., Miron, T., Rabinkov, A., Wilchek, M., Mirelman, D., Levy, J., & Sharoni, Y. (2000). Effect of purified allicin, the major ingredient of freshly crushed garlic, on cancer cell proliferation. *Nutrition and Cancer*, 38, 245–254.

Holzapfel, W. H., & Schillinger, U. (2002). Introduction to pre- and probiotics. *Food Research International*, 35, 109–116.

Hosotani, K., and N. Kuratomi. (1992). Effect of blanching and thawing process on the content of b-carotene and L-ascorbic acid in raw and frozen spinach. Wakayama Daigaku Kyoikugakubu Kiyo, Shizen Kagaku 41:95.

<http://web.invima.gov.co/portal/faces/index.jsp?id=1171>. Fecha de acceso: Marzo 20 de 2010.

ICMSF, International Commission on Microbiological Specifications for Food. Microorganisms in foods. (2001), 6 ed. Edit. Aspen Publisher Inc. Meryland. 615

Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación ICONTEC. NTC 2681. Análisis sensorial: metodología, prueba triangular. Bogotá, 2006.

INVIMA (1998): Holguín M, higuera M, Rubio B, Vargas M, Muñoz A, Diaz G. Manual de técnicas de análisis para el control de calidad microbiológico de alimentos para consumo humano. Bogotá (Colombia): INVIMA.

Joseph, J.A., Shukit-Hale, B., Denisova, N.A. et al. 1999. Reversal of age-related declines in neuronal signal transduction, cognitive, and motor behavioural deficits with blue berry, spinach, or strawberry dietary supplementation. Journal of Neuroscience, 19, 8114-8812.

Karakaya, S. & Kavas, A. 1999. Antimutagenic activities of some foods. Journal of Agricultural Food Chemistry, 79, 237-242.

Kaur, C. & Kapoor, H.C. 2001. Review: Antioxidants in fruit and vegetables – the millennium's health. International journal of Food science and technology, 36: 703-725.

Kikugava, K., Kunugi, A. and Kurechi, T. (1990) 'Chemistry and Implications of Degradation of Phenolic Antioxidants' in Food Antioxidants (Hudson, B.J.F., ed.) pp. 65±98, Elsevier Applied Science, London and New York

Kim, J. S. & Lee, Y. S., (2009). Antioxidant activity of Maillard reaction products derived from aqueous glucose/glycine, diglycine, and triglycine model systems as a function of heating time. Food Chemistry 116 (1), pp. 227-232.

Kirjavainen, P. V., Ouwehand, A. C., Isolauri, E., & Salminen, S. J. (1998). The ability of probiotic bacteria to bind to human intestinal mucus. FEMS Microbiology Letters, 167, 185–189.

Kollath, W. (1953). Nutrition and the tooth system; general review with special reference to vitamins. Deutsche zahnärztliche Zeitschrift, 8, 7–16.

Koskinen, S., Kalviainen, N., & Tuorila, H. (2003). Perception of chemosensory stimuli and related responses to flavoured yogurts in the young and elderly. Food Quality and Preference, 14, 623–635.

Kotilainen, L., Rajalahti, R., Ragasa, C., & Pehu, E. (2006). Health enhancing foods: Opportunities for strengthening the sector in developing countries. Agriculture and Rural Development Discussion Paper 30.

Kozłowska, K., Jeruszka, M., Matuszewska, I., Roszkowski, W., Barylko-Pikielna, N., & Brzozowska, A. (2003). Hedonic tests in different locations as predictors of apple juice consumption at home in elderly and young subjects. Food Quality and Preference, 14, 653–661.

Kurilich, A. C., Jeffery, E. H., Juvik, J. A., Wallig, M. A., & Klein, B. P. (2002). Antioxidant capacity of different broccoli (*Brassica oleracea*) genotypes using the

oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 28, 5053–5057.

Kuskoski, E. M.; Asuero, A.G.; Troncoso, A.M.; Mancini-Filho J.; Fett, R. 2005. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Rev. Bras. Ciênc. Tecnol. Alim.*, v. 25, n.4, 726-732.

Lajolo, F.M. 2002. Functional Foods: Latin America Perspectives. *Br J Nutr* 88 Suppl2: S145-S150.

Larpent, J.P. (1995). Las bacterias lácticas. En ICMSF, *Microbiología Alimentaria Vol. 2., Las fermentaciones alimentarias.* (pp. 3-17). Editorial Acribia S.A. Zaragoza. España.

Lathrop, P.J. and Leung, H.K. (1980). Rate of Ascorbic Acid: Degradation during Thermal Processing of Canned Peas. *J.Food Sci.* 45, 152±153

Lilly, D. M., & Stillwell, R. H. (1965). Probiotics: Growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science*, 147, 747–748.

Lin, W., Hwang, C., Chen, L., & Tsen, H. (2006). Viable counts, characteristic evaluation for commercial lactic acid bacteria products. *Food Microbiology*, 23, 74–81.

Linster, C. L., & Van Schaftingen, E. (2007). Vitamin C. Biosynthesis, recycling and degradation in mammals. *FEBS Journal*, 274,1–22

Liu, R. H., Liu, J., & Chen, B. (2005). Apples prevent mammary tumors in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2341–2343.

Lorenz, K. (1980). Cereal sprouts: Composition, nutritive value, food applications. *Critical Reviews in Food Science*, 13, 353–385.

Luckow, T., Delahunty, C., 2004. Which juice is healthier? A consumer study of probiotic non–dairy juice drinks. *Food Qual. Prefer.* 15, 751–759.

Luckow, T., Sheehan, V., Fitzgerald, G., Delahunty, C., 2006. Exposure, health information and flavor – masking strategies for improving the sensory quality of probiotic juice. *Apetite*. 47, 315–325.

Makinen-Aakula, M. 2006. Trends in functional Foods Dairy Market. In *Proceedings of the Third Functional Food Net Meeting*.

Mahn, K., Borrás, C., Knock, G. A., Taylor, P., Khan, I. Y., Sugden, D., Poston, L., Ward, J. P., Sharpe, R. M., Vina, J., Aaronson, P. I., & Mann, G. E. 2005. Dietary soy isoflavone-induced increases in antioxidant and eNOS gene expression lead to improved endothelial function and reduced blood pressure in vivo. *FASEB J.* 05-4008fje

Manzocco, L., Mastrocola, D. and Nicoli, M.C. (1999). Chain breaking and Oxygen Scavenging Properties of Wine as Affected by Some Technological Procedures. *Food Res.*

Manzocco, L., Anese, M. and Nicoli, M.C. (1998). Antioxidant Properties of Tea Extracts as Affected by Processing. *Lebensm.-Wiss. u-Technol.* 31, 694±698

Mendoza, D. & Mancera, J. 2002. Contribución al estudio del proceso fermentativo en bebida de soya utilizando microorganismos probióticos. Trabajo de grado (Ingeniero Químico). Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ingeniería. 145 p.

Miletić, I., Šobajić, S., Dordević, B. 2008. Functional foods and their role in the improvement of health status. *Journal of Medical Biochemistry* 27 (3), pp. 367-370

Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Octubre de 2005. Observatorio Agrocadenas Colombia. La Industria Procesadora de frutas y Hortalizas en Colombia. Documento de Trabajo N° 82.

Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Octubre de 2008. Perspectivas y Oportunidades del Sector Agropecuario en Colombia.

Ministerio de salud. Resolución 7992 de 1991. Por la cual se reglamenta parcialmente el Título V de la Ley 09 de 1979 en lo relacionado con la elaboración, conservación y comercialización de Jugos. Concentrados, Néctares, Pulpas, Pulpas Azucaradas y Refrescos de Frutas.

Nicoli, M.C., Anese, M., Parpinel, M.T., Franceschi, S. and Lericci, C.R. (1997) 'Study on Loss and/or Formation of Antioxidants during Processing and Storage' in *Cancer Letters* 114, 71±74.

Nicoli, M.C., Anese, M. & Parpinel, M. (1999). Influence of processing on the antioxidant properties of fruits and vegetables. *Trends in Food Science Technology*, 10, 94±100.

Nicoli, M.C., Anese, M. and Manzocco, L. (1999b) 'Oil Stability and Antioxidant Properties of an Oil-Tomato Food System as Affected by Processing' in *Adv. Food Sci.* 21(1/2), 10±14

Ninfali, P., Mea, G., Giorgini, S., Rocchi, M., & Bacchiocca, M. (2005). Antioxidant capacity of vegetables, spices and dressings relevant to nutrition. *The British Journal of Nutrition*, 93, 257–266

Ninfali, P., Bacchiocca, M., Antonelli, A., Biagiotti, E., Di Gioacchino, A., Piccoli, G., Stocchi, V., & Brandi, G. (2007). Characterization and biological activity of the main flavonoids from *Beta vulgaris* (subsp. *Cycla*). *Phytomedicine*, 14, 216–221.

Ou, B.; Huang, D.; Hampsch-Woodill, M.; Flanagan, J.; Deemer, E. 2002. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study.

Ouwehand AC, Salminen SJ. 1998. The health effects of cultured milk products with viable and non viable bacteria. *International Dairy Journal* Vol 8.

Pelayo C. 2003. Las frutas y hortalizas como alimentos funcionales. Departamento de biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana. México. Consultado en: <http://www.izt.uam.mx/contactos/n47ne/frutas.pdf>. Fecha de consulta: 01 junio de 2010.

Prior, R.L. & Cao, G. 2000. Antioxidant phytochemicals in fruits and vegetables: diet and health implications. *Horticulture Science*, 35, 588-592.

Puscasu, C., Birlouez-Aragon, I. 2002. Intermediary and/or advanced Maillard products exhibit prooxidant activity on Trp: In vitro study on α -lactalbumin. *Food Chemistry*, 78 (4), pp. 399-406

Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A; Panala, A; Yang, M; Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.*, 26, 9/10, 1231-1237.

Read, M. A. (1995). Flavonoids: Naturally occurring anti-inflammatory agents. *The American Journal of Pathology*, 147, 235–237.

Rivera, Y. & Gallardo Y. 2008. Non-Dairy Probiotic Products. *Food Microbiology*.

Rodgers, S. 2007. Incorporation of probiotics in food service products: an exploratory study. *Journal of Foodservice*, 18, 108e118.

Roberfroid, M. B. 2000. Concepts and strategy of functional food science: the European perspective. *Am J Clin Nutr* 71: 1660S-1664.

Rose, R. C., & Bode, A. M. (1993). Biology of free radical scavengers: An evaluation of ascorbate. *FASEB Journal*, 7, 1135–1142

Sarmiento R. L. A.2006. Alimentos funcionales: Una Nueva Alternativa de Alimentación. *Revista Orinoquía Universidad de los Llanos Vol 10 – N° 1*. 16-23.

Shah, N P. 2004. Probiotics and prebiotics. *Agro-Food Industry Hi-tech*, 15, 13–16.

Shah, N.P., 2003. Yogurth: The product and its manufacture. In Trugo, L., Finglas, P., Caballero, B. (Eds.), *Enciclopedia of food sciences and nutrition* (2nd ed. pp6252-6260). London, UK: Academic Press.

Sheehan, V. M., Ross, P., Fitzgerald, G. F. 2007. Assessing the acid tolerance and the technological robustness of probiotic cultures for fortification in fruit juices. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 8. 279-284.

Singleton, V. L., & Rossi, J. A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16:3, 144-158.

Siró I., Kápolna E., Kápolna B., Lugasi A. 2008. Functional Food. Product development, marketing and consumer acceptance – A review. *Appetite* 51 456-467.

Skibola, C. F., & Smith, M. T. (2000). Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Free Radical Biology and Medicine*, 29, 375–383

Song W., Demetrio C. M., Liu K. M., He X., Dong M., and LIU R. H. 2010. Cellular Antioxidant Activity of Common Vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Proximamente a publicar

Steinmetz, K.A. & Potter, J.D. 1996. Vegetable, fruit and cancer epidemiology. *Cancer Causes and Control*, 2, 325-351

Sullivan, D.M. and Carpenter D.E. 1993. Methods of analysis for nutrition labeling. AOAC International Arlington, Va. pp: 207-214.

Sun, J., Chu, Y. F., Wu, X., & Liu, R. H. (2002). Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 7449–7454.

Tuorila, H., & Cardello, A. V. 2002. Consumer Response to an Flavour in Juice in the Presence of Specific Health Claims. *Food Quality and Preference*, 13, 561-569.

Turgut, D. N.,. 2001. Health benefits and processing of lipid-based nutritionals. *Food Technology*, 55(11), 38-44.

Usman, A. and Hosono, A. (1997) 'Antimutagenic Activity of Maillard Reaction Products Against Mutagenic Heated Tauco' in *It. J. Food Sci.* 9, 267±276.

Van Ackers, S. A., Tromp, M. N., Haenen, G. R., van der Vijgh, W. J., & Bast, A. (1995). Flavonoids as scavengers of nitric oxide radical. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 214, 755–759.

Van den Broeck, L., Ludikhuyze, L., Weemaes, C. & Van Loey, M. (1998). Kinetics for isobaric-isothermal degradation of L-ascorbic acid. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 46, 2001±2006.

Vasiljevic, T. & Shah, N.P. 2008. Probiotics-From Metchnikoff to bioactives. *International Dairy Journal* Vol 18.

Veeriah, S., Miene, C., Habermann, N., Hofmann, T., Klenow, S., Sauer, J., B€olf, S., & Pool ohmer, F., W€ Zobel, B. L. (2008). Apple polyphenols modulate expression of selected genes related to toxicological defence and stress response in human colon adenoma cells. *International Journal of Cancer*, 22, 2647–2655

Vergin, F. (1954). Anti- und Probiotika. *Hippokrates*, 25, 116–119.

Vidavalur, R., Otani, H., Singal, P. K., & Maulik, N. (2006). Significance of wine and resveratrol in cardiovascular disease: French paradox revisited. *Experimental and Clinical Cardiology*, 11, 217–225.

Vinson, J. A., & Dabbagh, Y. A. (1998). Effect of green and black tea supplementation on lipids, lipid oxidation and fibrinogen in the hamster: mechanisms for the epidemiological benefits of tea drinking. *FEBS Letters*, 433,44–46.

Vinson, J. A., Bose, P., Proch, J., Al Kharrat, H., & Samman, N. (2008). Cranberries and cranberry products: Powerful in vitro, ex vivo, and in vivo sources of antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 5884–5891.

Wagner, K.-H., Reichhold, S., Koschutnig, K., Chériot, S., Billaud, C. (2007). The potential antimutagenic and antioxidant effects of Maillard reaction products used as "natural antibrowning" agents *Molecular Nutrition and Food Research*, 51 (4), pp. 496-504.

Wargovich, M.J. 2000. Anticancer properties of fruits and vegetables. *Horticulture Science*, 35, 573-575.

Watson, R. & Preedy, V. 2010. *Bioactive Foods in Promoting Health: Fruits and vegetables*. Academic Press. Pp. 37 - 58

Xiaodong Pan a,b, Fenqin Chen c, Tianxing Wu*, Honggang Tang a, Zhanyu Zhao. 2009. The acid, bile tolerance and antimicrobial property of *Lactobacillus acidophilus* NIT. *Food Control*, 20, 598-602.

Yang, C. S., Landau, J. M., Huang, M. T., & Newmark, H. L. (2001). Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annual Review of Nutrition*, 21, 381–406.

Yen, G.C. and Hwang, L.S. (1985). Lycopene from Seeds of Ripe Bitter Melon as a Potential Red Food Colorant. II. Storage Stability, Preparation of Powdered Lycopene and Food Applications. *J. Chinese Agric. Chem. Soc.* 23, 151±161.

ANEXOS

Anexo 1. Ficha Técnica Cultivo Probiótico

CULTURES DIVISION
cultures@danisco.com
www.danisco.com

Page 1 / 2

DANISCO

First you add knowledge...

PRODUCT DESCRIPTION - PD 204258-2.1EN

Material no. M85026B

La-14 10B - 5 KG

FloraFIT™ Probiotics

Description

Freeze-dried probiotic powder. White to cream-color in appearance.

Directions for use

See Danisco Probiotic Usage & Handling Guide

Composition

Lactobacillus acidophilus
Rice maltodextrin

Microbiological specifications

Cell count	> 1.00E+10 / g
Non-Lactic Count	< 5000 / g
Enterococci	< 100 / g
Coliforms	< 10 / g
E. coli	neg. by test (< 0.3 / g)
Staphylococcus (coag. pos.)	neg. by test < 10 / g
Salmonella	neg. (40 g enrichment)
Listeria	neg. (25 g enrichment)

Storage

Shelf life is 18 months when stored in the original, sealed package at or below 4°C. Frozen storage will extend shelf life.

Packaging

High barrier foil laminate (OTR and MVTR < 0.001 g / 100 in(2) at 100 F and 90 % RH).

Quantity

5 kg

Purity and legal status

Local regulations should always be consulted concerning the status of this product, as legislation regarding its intended use may vary from country to country.

Safety and handling

MSDS is available on request.

Kosher status

Circle K certification

Halal status

IFANCA certification

The information contained in this publication is based on our own research and development work and is to the best of our knowledge reliable. Users should, however, conduct their own tests to determine the suitability of our products for their own specific purposes and the legal status for their intended use of the product. Statements contained herein should not be considered as a warranty of any kind, expressed or implied, and no liability is accepted for the infringement of any patents.

PRODUCT DESCRIPTION - PD 204258-2.1EN

Material no. M85026B

La-14 10B - 5 KG

FloraFIT™ Probiotics

Allergens

Below table indicates the presence of the following allergens and products thereof:

Yes	No	Allergens	Description of components
	X	wheat	
	X	other cereals containing gluten	
	X	crustacean shellfish	
	X	eggs	
	X	fish	
	X	peanuts	
	X	soybeans	
X		milk (including lactose)	used as fermentation nutrient*
	X	nuts	
	X	celery	
	X	mustard	
	X	sesame seeds	
	X	sulphur dioxide and sulphites (> 10 mg/kg)	
	X	lupin	
	X	molluscs	

* used as fermentation nutrient. Danisco has determined that fermentation nutrients are outside the scope of US and EU food allergen labelling requirements. Local regulation has always to be consulted as allergen labelling requirements may vary from country to country.

GMO status

La-14 10B - 5 KG does not consist of, nor contains, nor is produced from genetically modified organisms according to the definitions of Regulation (EC) 1829/2003 and Regulation (EC) 1830/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003.

**Anexo 2. Norma Técnica Colombiana NTC 2681. Análisis Sensorial.
Metodología. Prueba Triangular**

Ver Archivo adjunto PDF

Anexo 3. Formatos del panel sensorial para la prueba de afectividad y prueba triangular.

**A) PRUEBA SENSORIAL PARA LA SELECCIÓN DE LA PROPORCIÓN DE
PULPA DE FRUTA Y HORTALIZA
PRUEBAS AFECTIVAS**

A continuación se presenta una mezcla de una fruta y una hortaliza previamente seleccionada en concentraciones conocidas. Por favor califique según las convenciones la siguiente muestra de mezcla de pulpa de fruta y hortaliza:

1. SABOR:

CONVENCIONES:

5 = ME GUSTA MUCHO, 4 = ME GUSTA, 3 = NI ME GUSTA NI ME DISGUSTA, 2 = ME DISGUSTA, 1 = ME DISGUSTA MUCHO

MEZCLA	Concentración 1	Concentración 2	Concentración 3

2. AROMA:

CONVENCIONES:

5 = ME GUSTA MUCHO, 4 = ME GUSTA, 3 = NI ME GUSTA NI ME DISGUSTA, 2 = ME DISGUSTA, 1 = ME DISGUSTA MUCHO

MEZCLA	Concentración 1	Concentración 2	Concentración 3

3. APARIENCIA:

CONVENCIONES:

3 = ME GUSTA, 2 = NI ME GUSTA NI ME DISGUSTA, 1 = ME DISGUSTA,

MEZCLA	Concentración 1	Concentración 2	Concentración 3

B) PRUEBA SENSORIAL PARA SELECCIÓN DE LA MEZCLA MAS ADECUADA DE PULPA DE FRUTA Y HORTALIZA. PRUEBAS AFECTIVAS

A continuación se presentan tres mezclas diferentes de frutas y hortalizas previamente seleccionadas en concentraciones conocidas. Por favor califique según las convenciones las siguientes muestras de mezclas de pulpa de fruta y hortaliza:

1. SABOR:

CONVENCIONES:

5 = ME GUSTA MUCHO, 4 = ME GUSTA, 3 = NI ME GUSTA NI ME DISGUSTA, 2 = ME DISGUSTA, 1 = ME DISGUSTA MUCHO

MEZCLA	Calificación
Uva-Remolacha	
Manzana-Espinaca	
Manzana-Remolacha	

2. AROMA:

CONVENCIONES:

5 = ME GUSTA MUCHO, 4 = ME GUSTA, 3 = NI ME GUSTA NI ME DISGUSTA, 2 = ME DISGUSTA, 1 = ME DISGUSTA MUCHO

MEZCLA	Calificación
Uva-Remolacha	
Manzana-Espinaca	
Manzana-Remolacha	

3. APARIENCIA:

CONVENCIONES:

3 = ME GUSTA, 2 = NI ME GUSTA NI ME DISGUSTA, 1 = ME DISGUSTA,

MEZCLA	Calificación
Uva-Remolacha	
Manzana-Espinaca	
Manzana-Remolacha	

C) PRUEBA TRIANGULAR PARA SABER SI HAY DIFERENCIA ENTRE DOS CLASES DE PULPAS

Nombre: _____ Fecha: _____

Tipo de Muestra: _____

Instrucciones: Pruebe las muestras de izquierda a derecha. Dos muestras son semejantes. Una muestra es diferente. Seleccione la muestra diferente y márquela. Si usted desea colocar la razón por la cual eligió la muestra, puede hacerlo en las observaciones.

Muestra N°

Muestra N°

Muestra N°

Observaciones: _____

Anexo 4. Tratamiento Estadístico

Informe del proyecto de Minitab PULPA UVA-REMOLACHA 70-30

Modelo lineal general: Recuento BAL, DPPH IC50 mg, ... vs. Concentración, Día

Factor	Tipo	Niveles	Valores
Concentración Probiótico	fijo	3	0.00, 8.52, 9.52
Día	fijo	8	0, 8, 15, 30, 45, 60, 75, 90

Análisis de varianza para Recuento BAL Log10 ufc/g, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F
Concentración Probiótico	2	721.691	721.691	360.846	32081.11
Día	7	2.364	2.364	0.338	30.02
Concentración Probiótico*Día	14	1.348	1.348	0.096	8.56
Error	24	0.270	0.270	0.011	
Total	47	725.674			

Fuente	P
Concentración Probiótico	0.000
Día	0.000
Concentración Probiótico*Día	0.000
Error	
Total	

S = 0.106056 R-cuad. = 99.96% R-cuad.(ajustado) = 99.93%

Observaciones inusuales de Recuento BAL Log10 ufc/g

Obs	Recuento BAL Log10 ufc/g	Ajuste	Ajuste SE	Residuo	Residuo estándar
23	7.70000	7.45000	0.07499	0.25000	3.33 R
24	7.20000	7.45000	0.07499	-0.25000	-3.33 R
25	7.30000	7.49500	0.07499	-0.19500	-2.60 R
26	7.69000	7.49500	0.07499	0.19500	2.60 R

R denota una observación con un residuo estandarizado grande.

Análisis de varianza para DPPH IC50 mg/ml, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Concentración Probiótico	2	0.2156	0.2156	0.1078	0.81	0.456
Día	7	1.4184	1.4184	0.2026	1.53	0.206
Concentración Probiótico*Día	14	0.4358	0.4358	0.0311	0.23	0.997
Error	24	3.1841	3.1841	0.1327		
Total	47	5.2538				

S = 0.364237 R-cuad. = 39.40% R-cuad.(ajustado) = 0.00%

Análisis de varianza para ABTS micromol TE/g muestra, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Concentración Probiótico	2	0.2178	0.2178	0.1089	0.51	0.605
Día	7	1.6923	1.6923	0.2418	1.14	0.372
Concentración Probiótico*Día	14	1.9083	1.9083	0.1363	0.64	0.803
Error	24	5.0872	5.0872	0.2120		
Total	47	8.9056				

S = 0.460398 R-cuad. = 42.88% R-cuad.(ajustado) = 0.00%

Observaciones inusuales de ABTS micromol TE/g muestra

Obs	muestra	ABTS micromol TE/g	Ajuste	Ajuste SE	Residuo	Residuo estándar
33	2.46000	3.27000	0.32555	-0.81000	-2.49	R
34	4.08000	3.27000	0.32555	0.81000	2.49	R
45	4.55000	3.79000	0.32555	0.76000	2.33	R
46	3.03000	3.79000	0.32555	-0.76000	-2.33	R

R denota una observación con un residuo estandarizado grande.

Análisis de varianza para pH, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Concentración Probiótico	2	0.0347325	0.0347325	0.0173663	25.57	0.000
Día	7	0.0249041	0.0249041	0.0035577	5.24	0.001
Concentración Probiótico*Día	14	0.0087998	0.0087998	0.0006286	0.93	0.547
Error	24	0.0163005	0.0163005	0.0006792		
Total	47	0.0847370				

S = 0.0260612 R-cuad. = 80.76% R-cuad.(ajustado) = 62.33%

Observaciones inusuales de pH

Obs	pH	Ajuste	Ajuste SE	Residuo	Residuo estándar	
27	3.95200	3.91350	0.01843	0.03850	2.09	R
28	3.87500	3.91350	0.01843	-0.03850	-2.09	R
31	3.95200	3.91350	0.01843	0.03850	2.09	R
32	3.87500	3.91350	0.01843	-0.03850	-2.09	R
43	3.91500	3.96000	0.01843	-0.04500	-2.44	R
44	4.00500	3.96000	0.01843	0.04500	2.44	R
47	3.91500	3.95400	0.01843	-0.03900	-2.12	R
48	3.99300	3.95400	0.01843	0.03900	2.12	R

R denota una observación con un residuo estandarizado grande.

Análisis de varianza para ACIDEZ LIBRE meq/kg, utilizando SC ajustada para

pruebas

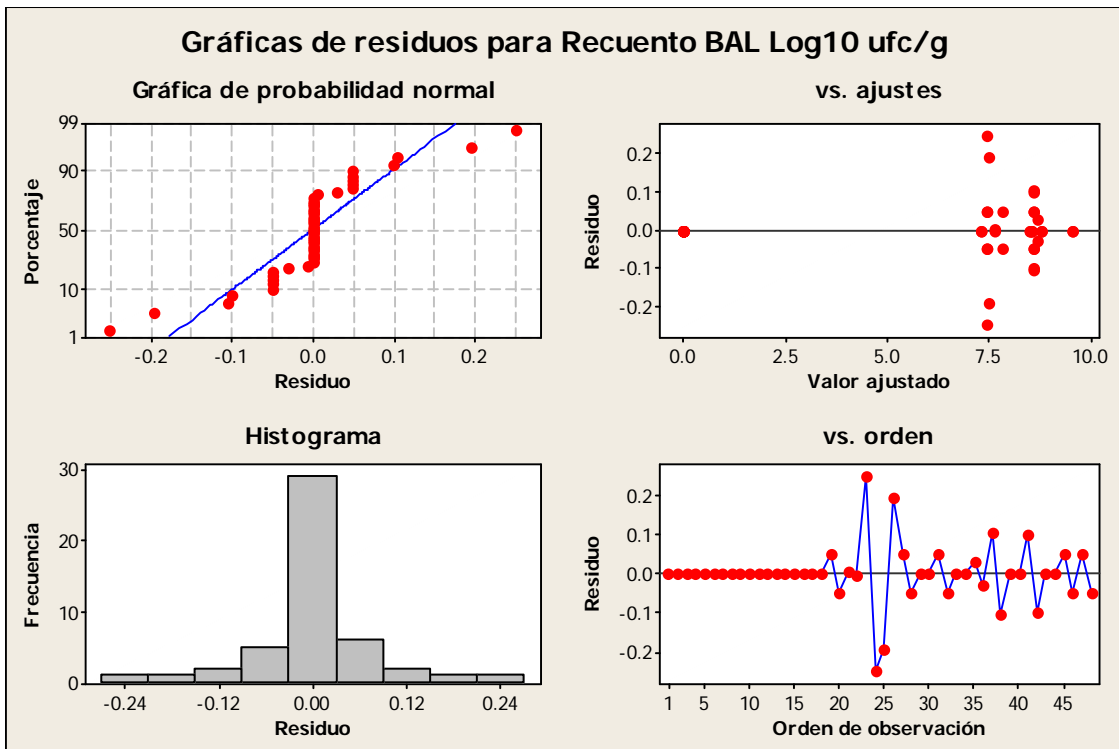
Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Concentración Probiótico	2	106.12	106.12	53.06	3.07	0.065
Día	7	202.03	202.03	28.86	1.67	0.164
Concentración Probiótico*Día	14	402.16	402.16	28.73	1.66	0.132
Error	24	414.14	414.14	17.26		
Total	47	1124.45				

S = 4.15403 R-cuad. = 63.17% R-cuad.(ajustado) = 27.87%

Análisis de varianza para %BRIX, utilizando SC ajustada para pruebas

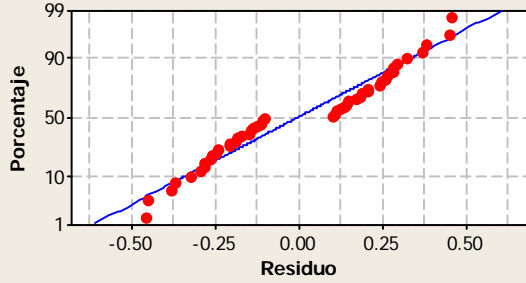
Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Concentración Probiótico	2	1.2917	1.2917	0.6458	1.77	0.192
Día	7	5.0833	5.0833	0.7262	1.99	0.099
Concentración Probiótico*Día	14	4.0417	4.0417	0.2887	0.79	0.669
Error	24	8.7500	8.7500	0.3646		
Total	47	19.1667				

S = 0.603807 R-cuad. = 54.35% R-cuad.(ajustado) = 10.60%

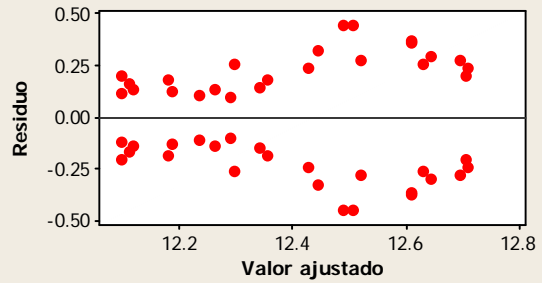


Gráficas de residuos para DPPH IC50 mg/ml

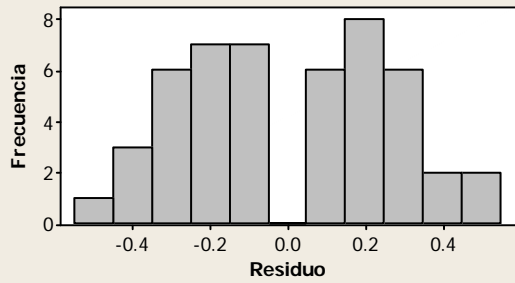
Gráfica de probabilidad normal



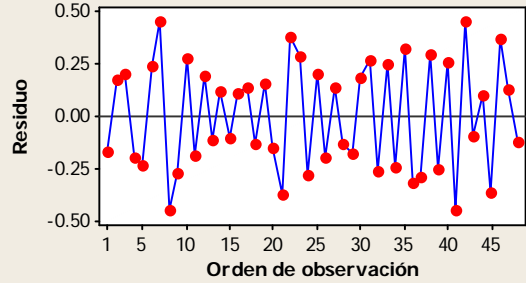
vs. ajustes



Histograma

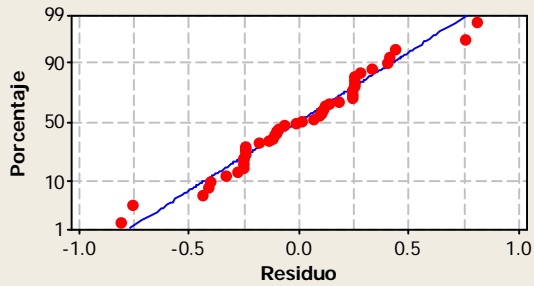


vs. orden

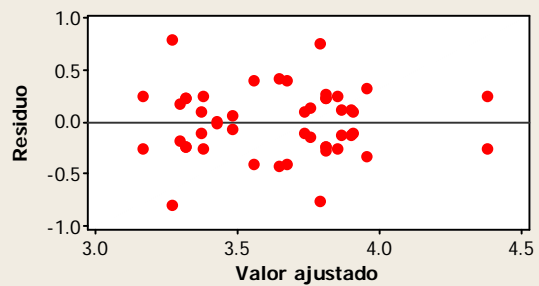


Gráficas de residuos para ABTS micromol TE/g muestra

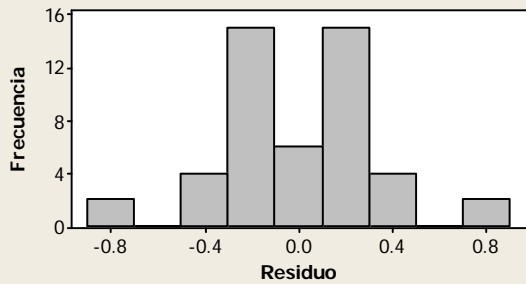
Gráfica de probabilidad normal



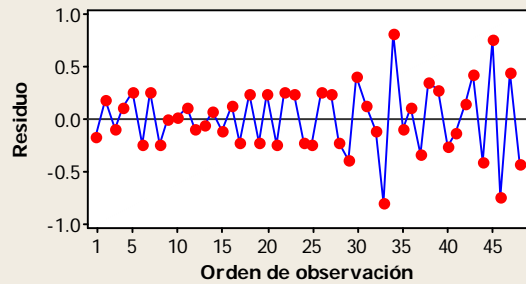
vs. ajustes



Histograma

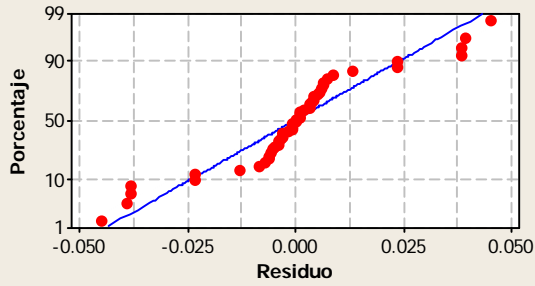


vs. orden

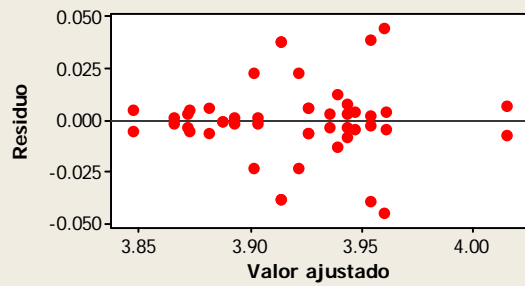


Gráficas de residuos para pH

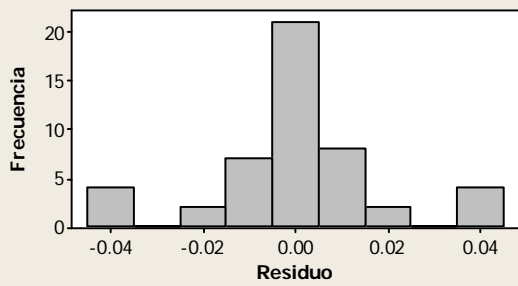
Gráfica de probabilidad normal



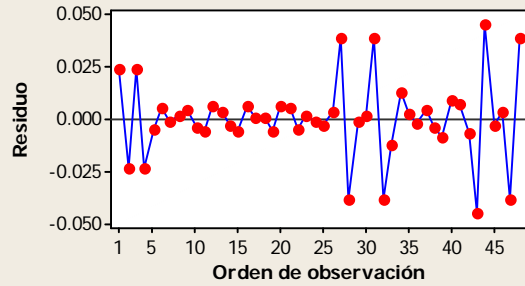
vs. ajustes



Histograma

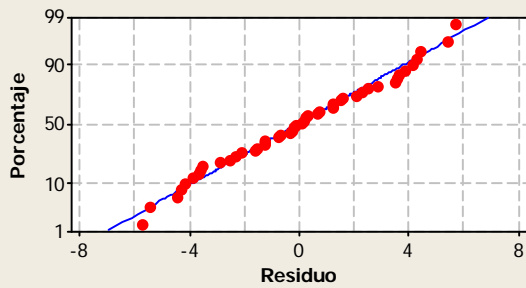


vs. orden

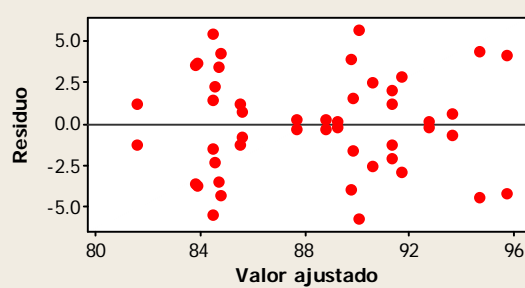


Gráficas de residuos para ACIDEZ LIBRE meq/kg

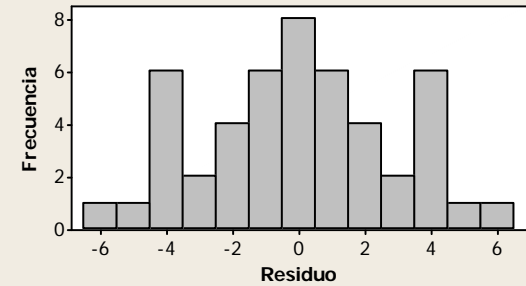
Gráfica de probabilidad normal



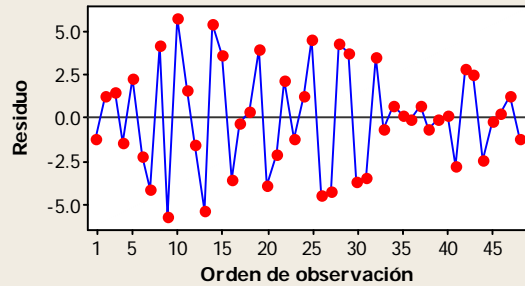
vs. ajustes



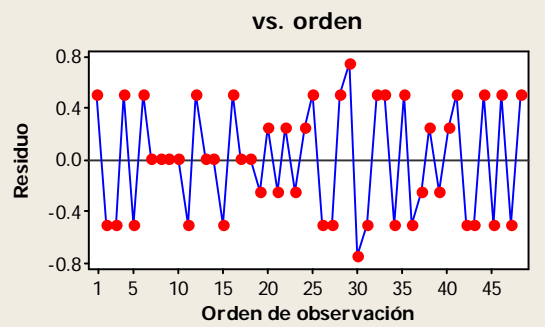
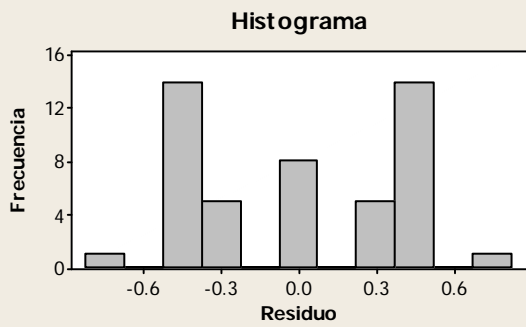
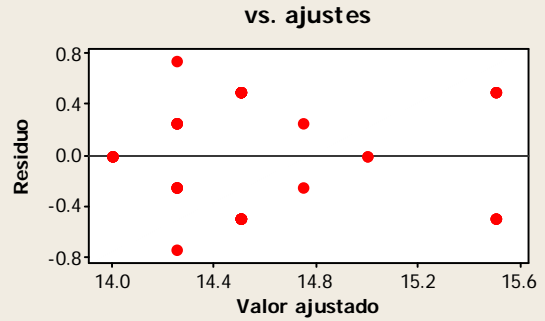
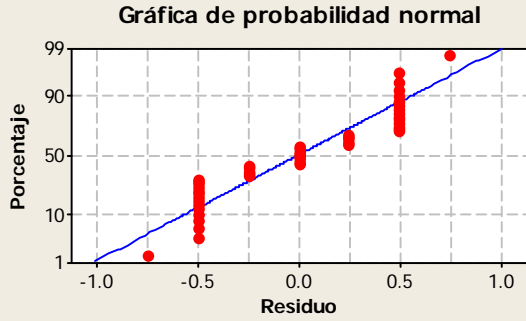
Histograma



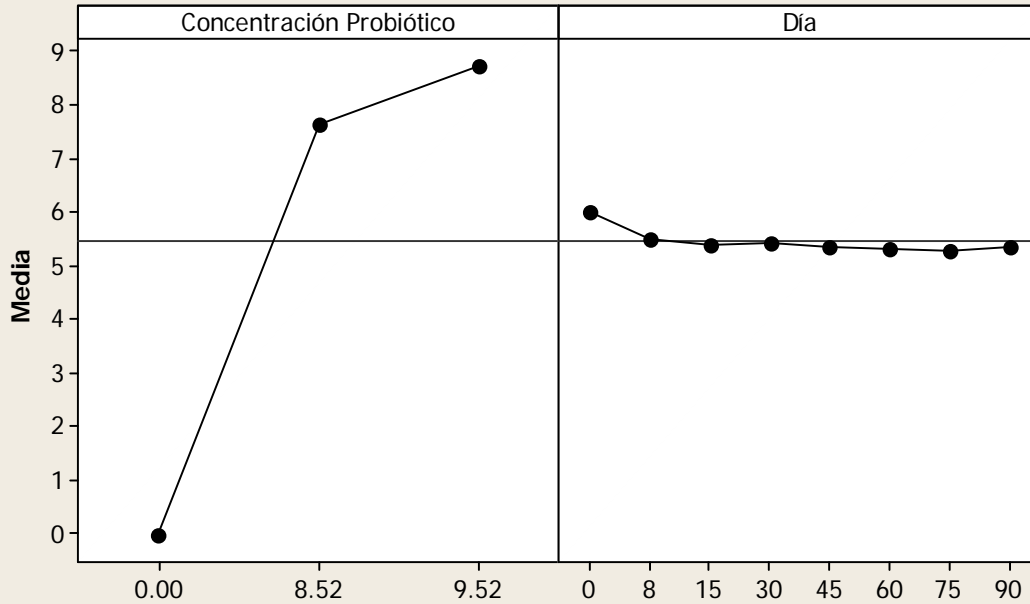
vs. orden



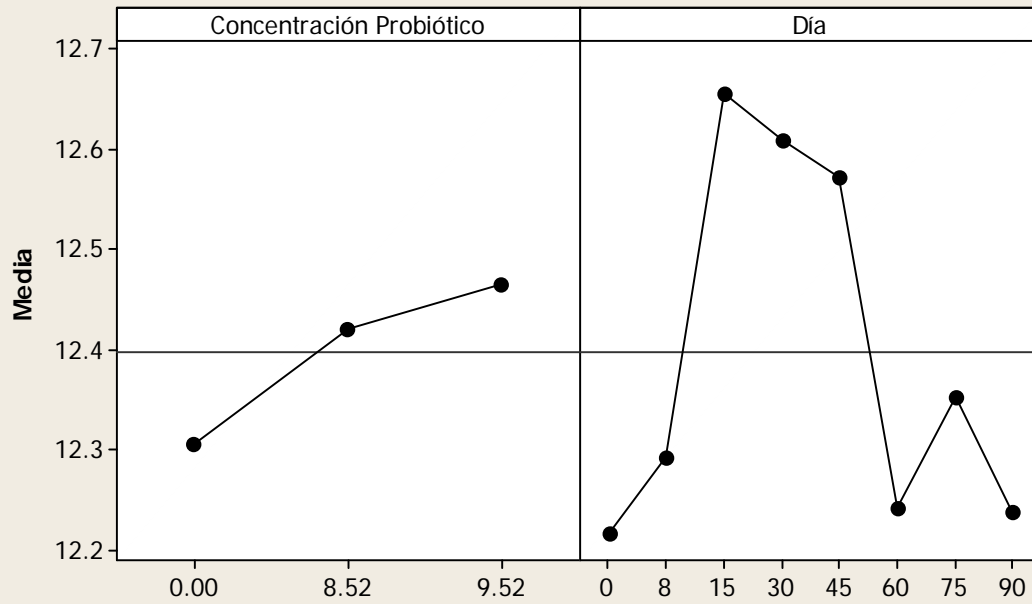
Gráficas de residuos para °BRIX



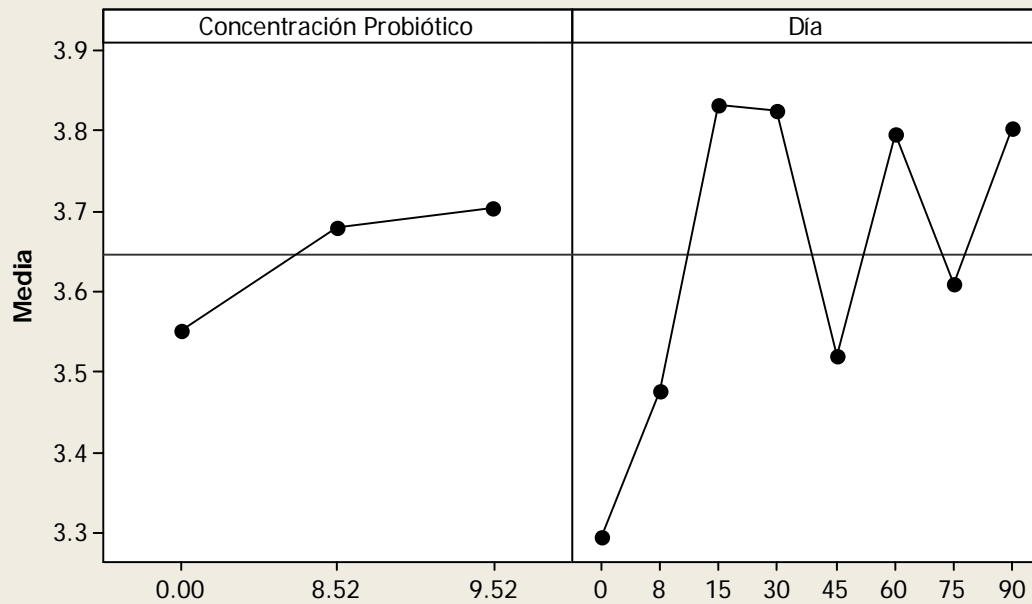
Gráfica de efectos principales para Recuento BAL Log10 ufc/g Medias ajustadas



Gráfica de efectos principales para DPPH IC50 mg/ml
Medias ajustadas

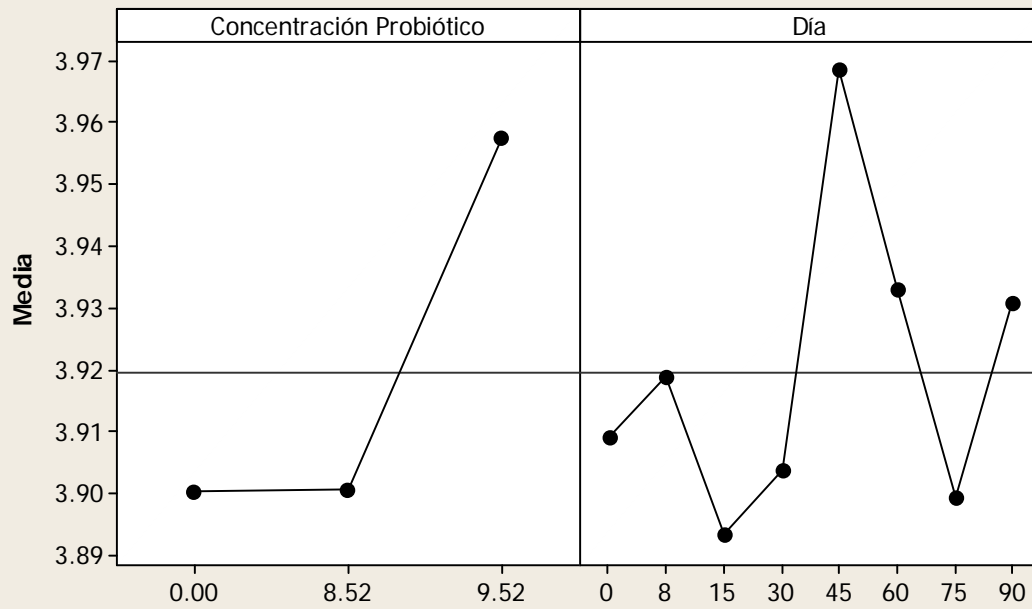


Gráfica de efectos principales para ABTS micromol TE/g muestra
Medias ajustadas



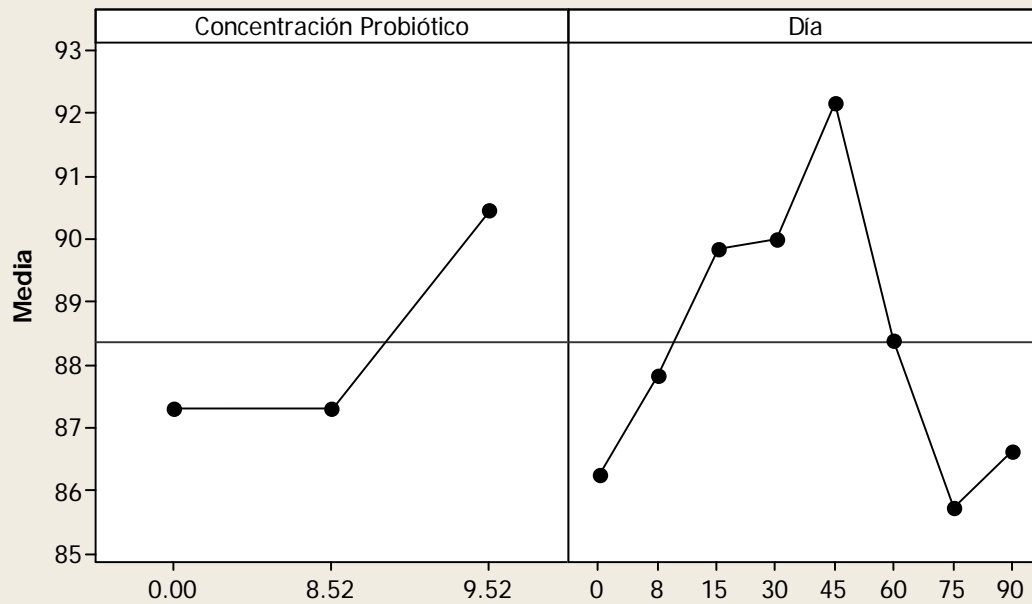
Gráfica de efectos principales para pH

Medias ajustadas

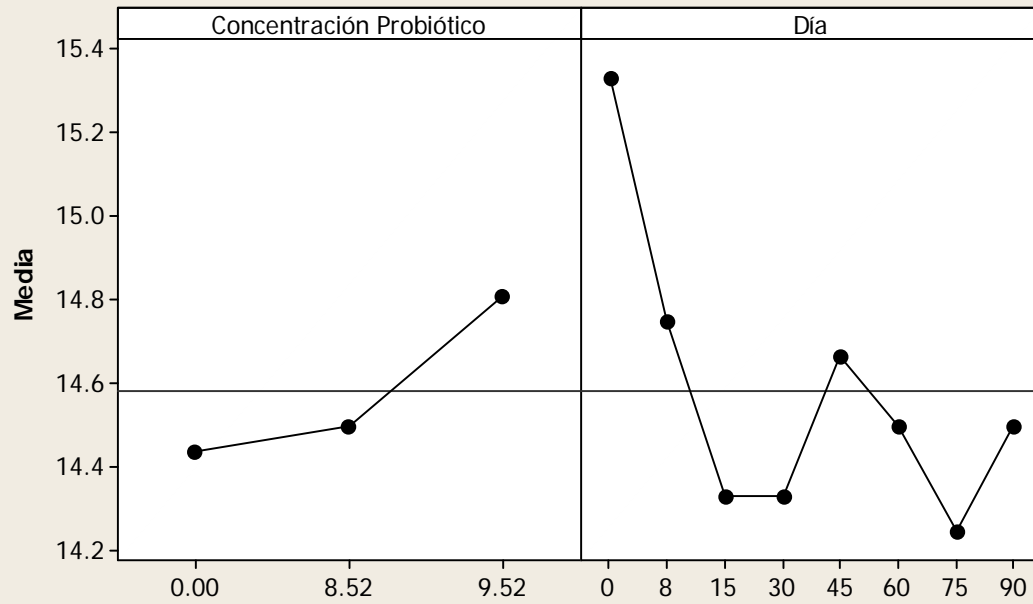


Gráfica de efectos principales para ACIDEZ LIBRE meq/kg

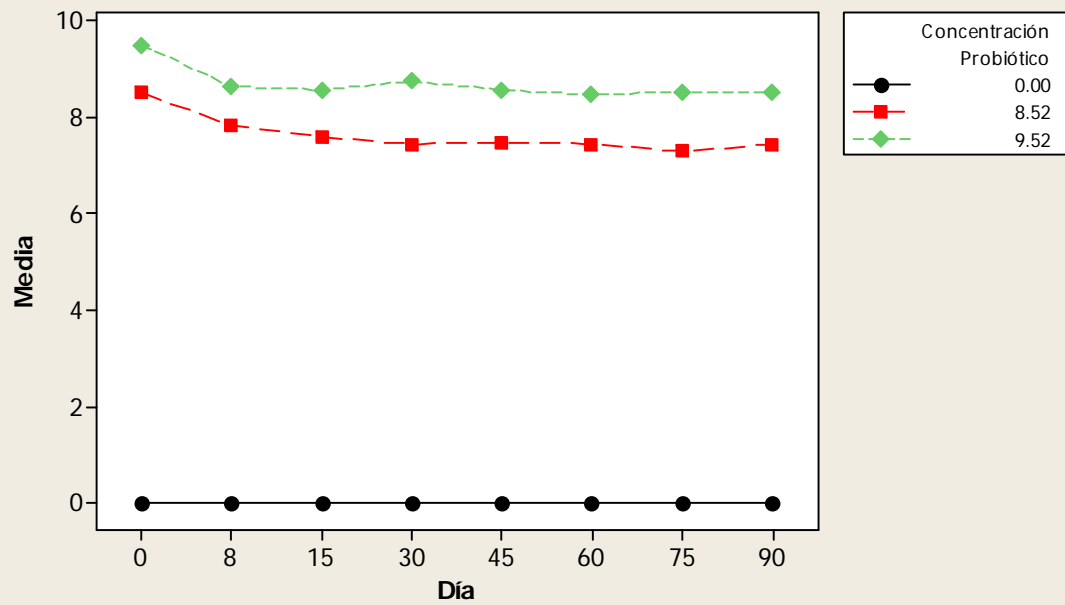
Medias ajustadas



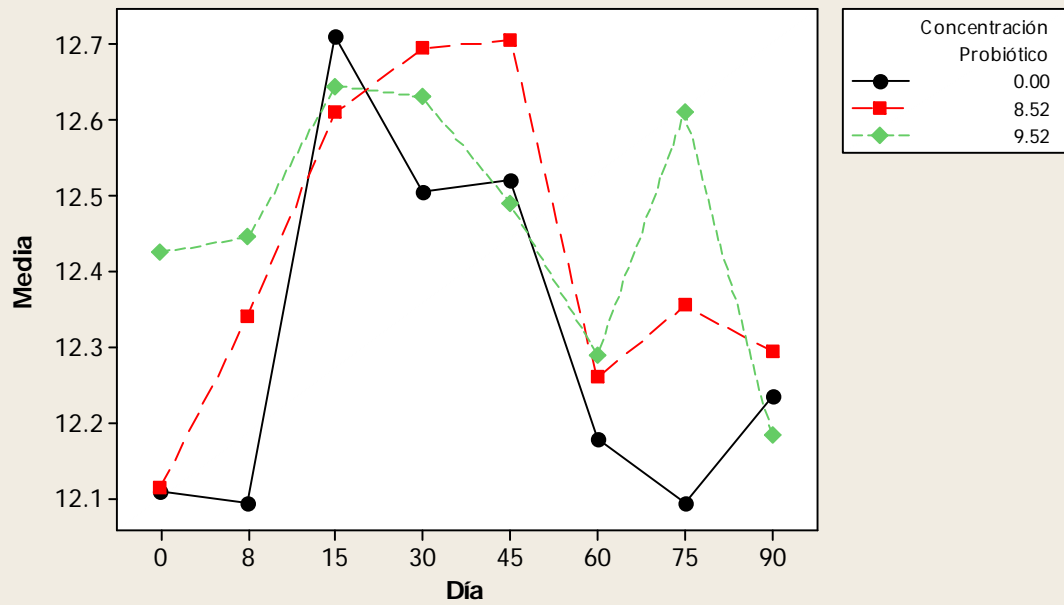
Gráfica de efectos principales para °BRIX
Medias ajustadas



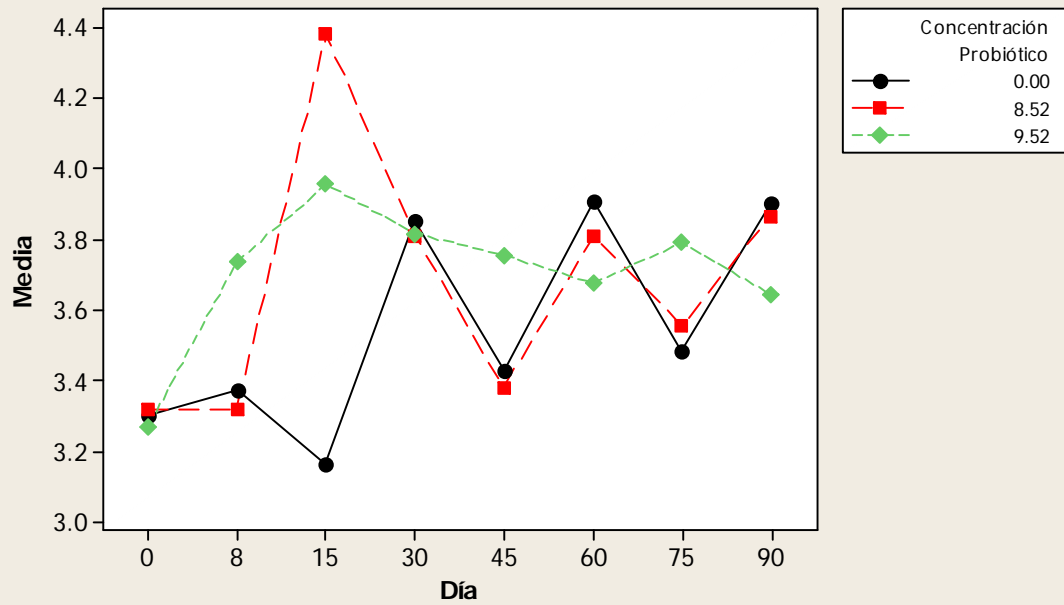
Gráfica de interacción para Recuento BAL Log10 ufc/g
Medias ajustadas



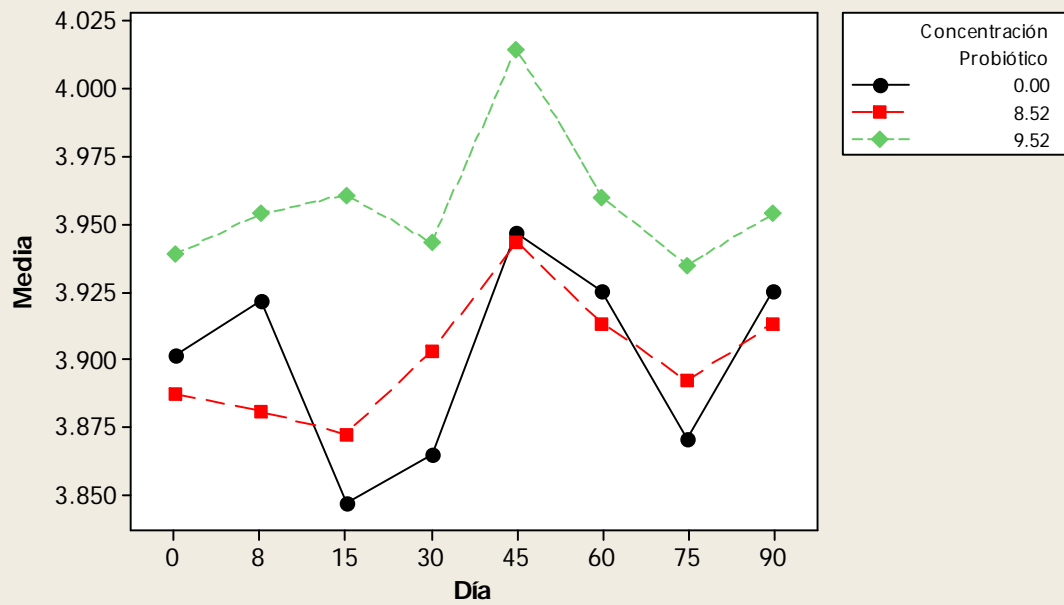
Gráfica de interacción para DPPH IC50 mg/ml
Medias ajustadas



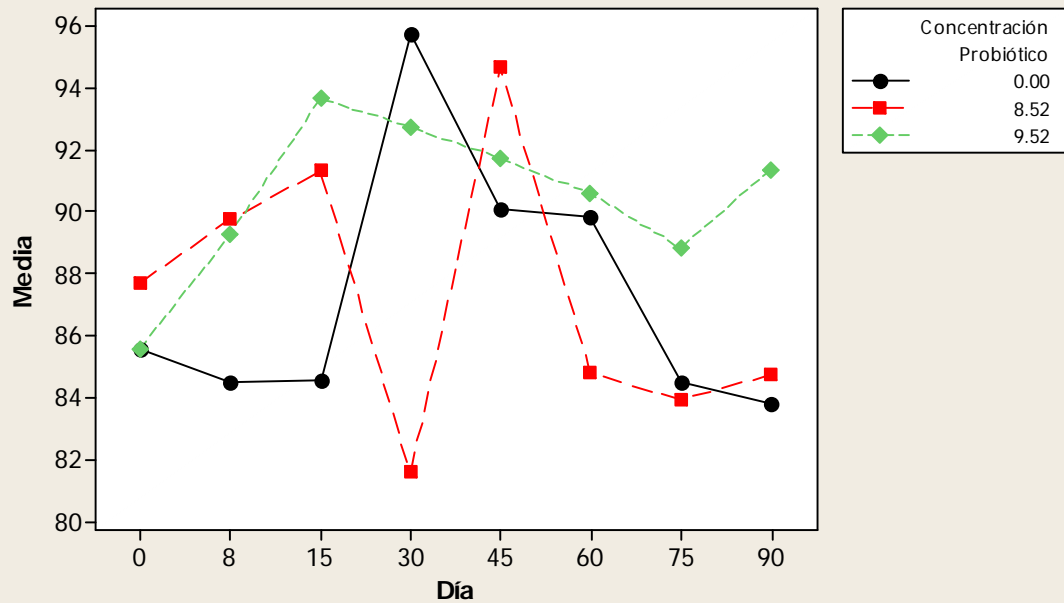
Gráfica de interacción para ABTS micromol TE/g muestra
Medias ajustadas

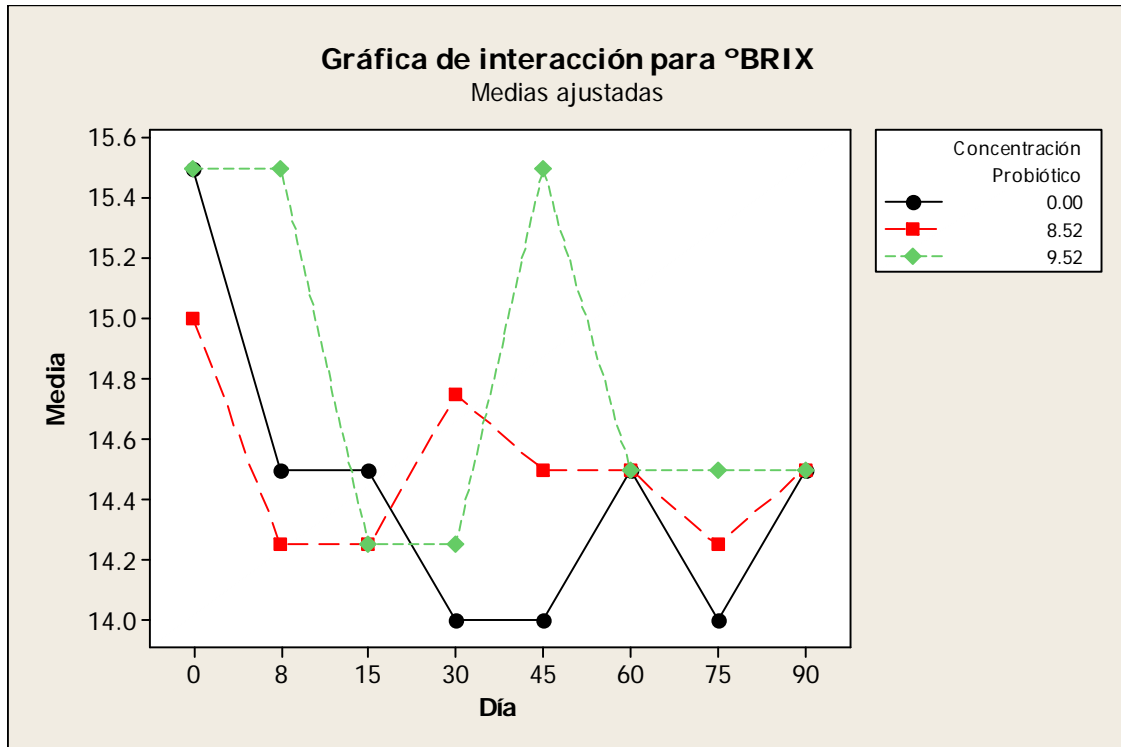


Gráfica de interacción para pH
Medias ajustadas



Gráfica de interacción para ACIDEZ LIBRE meq/kg
Medias ajustadas





Informe del proyecto de Minitab PULPA DE MANGO

Modelo lineal general: Recuento BAL, DPPH IC50 mg, ... vs. Concentración, Día

Factor	Tipo	Niveles	Valores
Concentración Probiótico	fijo	2	0.00, 9.52
Día	fijo	8	0, 8, 15, 30, 45, 60, 75, 90

Análisis de varianza para Recuento BAL Log10 ufc/g, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F
Concentración Probiótico	1	669.323	669.323	669.323	736024.83
Día	7	0.921	0.921	0.132	144.75
Concentración Probiótico*Día	7	0.921	0.921	0.132	144.75
Error	16	0.015	0.015	0.001	
Total	31	671.180			

Fuente	P
Concentración Probiótico	0.000
Día	0.000
Concentración Probiótico*Día	0.000
Error	
Total	

S = 0.0301558 R-cuad. = 100.00% R-cuad.(ajustado) = 100.00%

Observaciones inusuales de Recuento BAL Log10 ufc/g

Obs	Recuento BAL Log10			Residuo		
	ufc/g	Ajuste	Ajuste SE	Residuo	estándar	
21	9.19000	9.10500	0.02132	0.08500	3.99	R
22	9.02000	9.10500	0.02132	-0.08500	-3.99	R

R denota una observación con un residuo estandarizado grande.

Análisis de varianza para DPPH IC50 mg/ml, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Concentración Probiótico	1	0.0001125	0.0001125	0.0001125	0.17	0.690
Día	7	0.0081875	0.0081875	0.0011696	1.72	0.175
Concentración Probiótico*Día	7	0.0054875	0.0054875	0.0007839	1.15	0.382
Error	16	0.0109000	0.0109000	0.0006813		
Total	31	0.0246875				

S = 0.0261008 R-cuad. = 55.85% R-cuad.(ajustado) = 14.46%

Análisis de varianza para ABTS micromol TE/g muestra, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Concentración Probiótico	1	9.78	9.78	9.78	0.61	0.447
Día	7	63.97	63.97	9.14	0.57	0.772
Concentración Probiótico*Día	7	54.18	54.18	7.74	0.48	0.835
Error	16	257.54	257.54	16.10		
Total	31	385.47				

S = 4.01200 R-cuad. = 33.19% R-cuad.(ajustado) = 0.00%

Observaciones inusuales de ABTS micromol TE/g muestra

Obs	ABTS micromol TE/g			Residuo		
	muestra	Ajuste	Ajuste SE	Residuo	estándar	
17	21.3000	27.4700	2.8369	-6.1700	-2.17	R
18	33.6400	27.4700	2.8369	6.1700	2.17	R
19	21.3000	27.4700	2.8369	-6.1700	-2.17	R
20	33.6400	27.4700	2.8369	6.1700	2.17	R

R denota una observación con un residuo estandarizado grande.

Análisis de varianza para pH, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Concentración Probiótico	1	0.0026645	0.0026645	0.0026645	20.10	0.000

Día	7	0.0018079	0.0018079	0.0002583	1.95	0.128
Concentración Probiótico*Día	7	0.0061925	0.0061925	0.0008846	6.67	0.001
Error	16	0.0021210	0.0021210	0.0001326		
Total	31	0.0127859				

S = 0.0115136 R-cuad. = 83.41% R-cuad.(ajustado) = 67.86%

Análisis de varianza para ACIDEZ LIBRE meq/kg, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Concentración Probiótico	1	3.819	3.819	3.819	1.81	0.198
Día	7	14.609	14.609	2.087	0.99	0.475
Concentración Probiótico*Día	7	8.333	8.333	1.190	0.56	0.775
Error	16	33.851	33.851	2.116		
Total	31	60.612				

S = 1.45454 R-cuad. = 44.15% R-cuad.(ajustado) = 0.00%

Observaciones inusuales de ACIDEZ LIBRE meq/kg

ACIDEZ LIBRE		Residuo			
Obs	meq/kg	Ajuste	Ajuste SE	Residuo	estándar
25	109.426	111.717	1.029	-2.291	-2.23 R
26	114.009	111.717	1.029	2.292	2.23 R

R denota una observación con un residuo estandarizado grande.

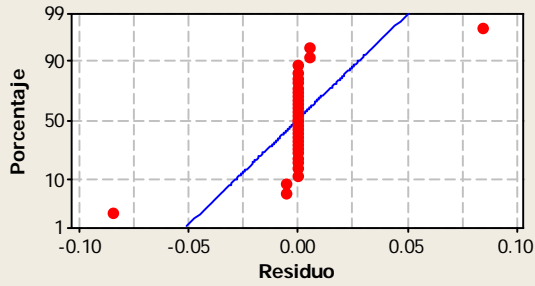
Análisis de varianza para °BRIX, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Concentración Probiótico	1	0.6328	0.6328	0.6328	1.72	0.208
Día	7	3.5547	3.5547	0.5078	1.38	0.278
Concentración Probiótico*Día	7	0.6797	0.6797	0.0971	0.26	0.959
Error	16	5.8750	5.8750	0.3672		
Total	31	10.7422				

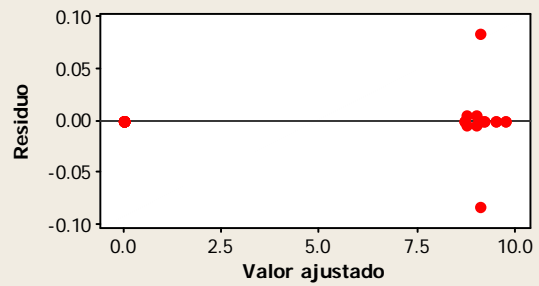
S = 0.605960 R-cuad. = 45.31% R-cuad.(ajustado) = 0.00%

Gráficas de residuos para Recuento BAL Log10 ufc/g

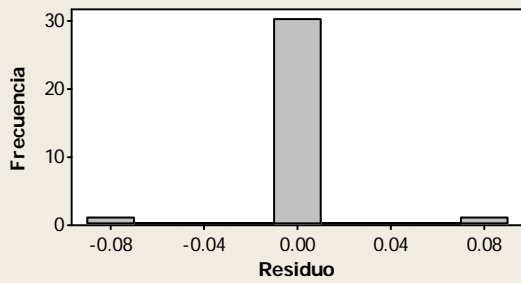
Gráfica de probabilidad normal



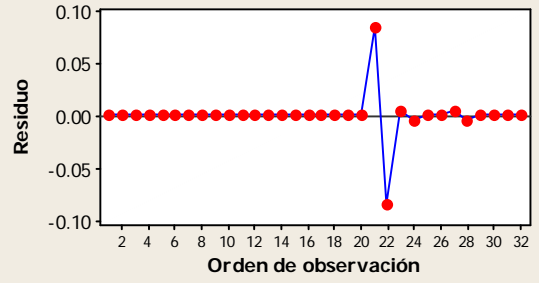
vs. ajustes



Histograma

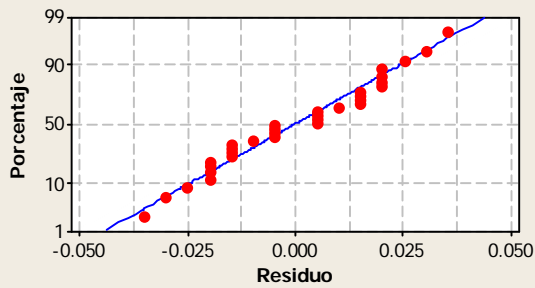


vs. orden

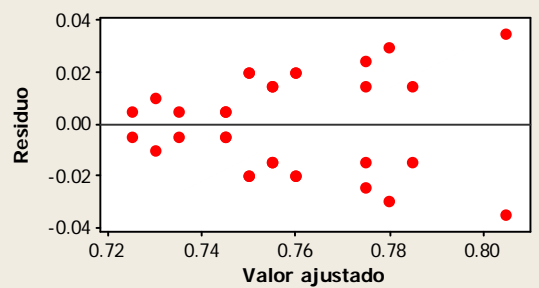


Gráficas de residuos para DPPH IC50 mg/ml

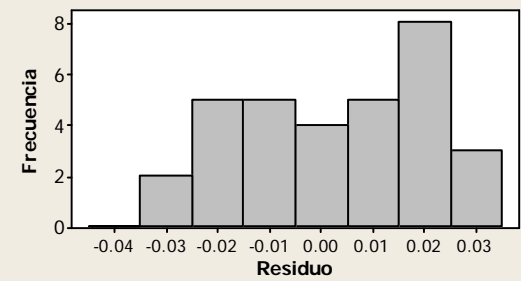
Gráfica de probabilidad normal



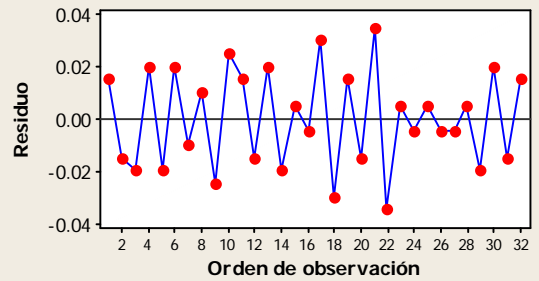
vs. ajustes



Histograma

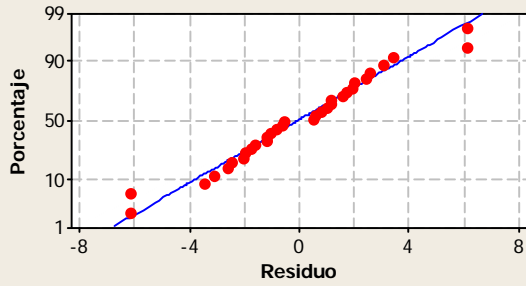


vs. orden

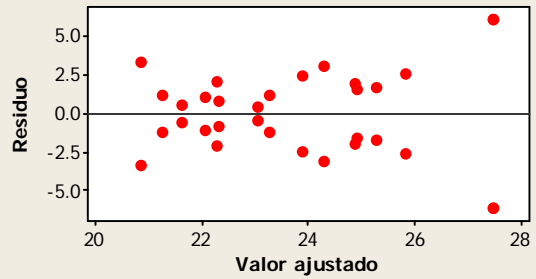


Gráficas de residuos para ABTS micromol TE/g muestra

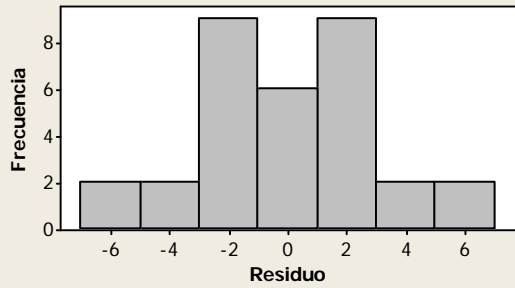
Gráfica de probabilidad normal



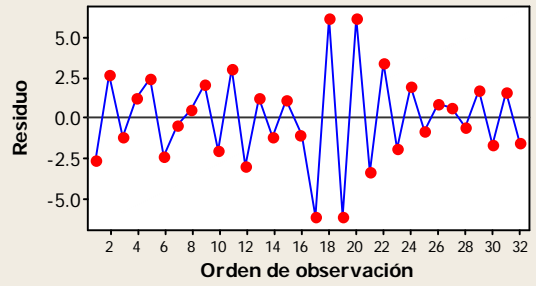
vs. ajustes



Histograma

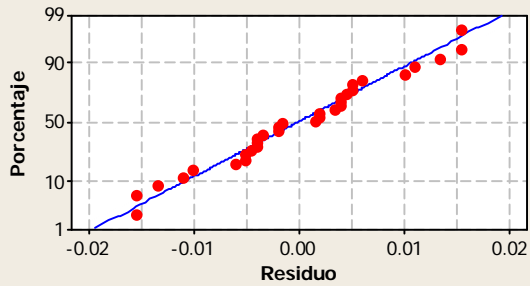


vs. orden

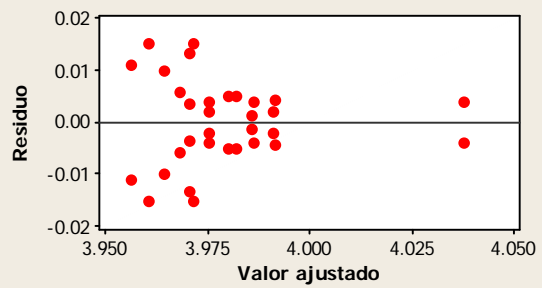


Gráficas de residuos para pH

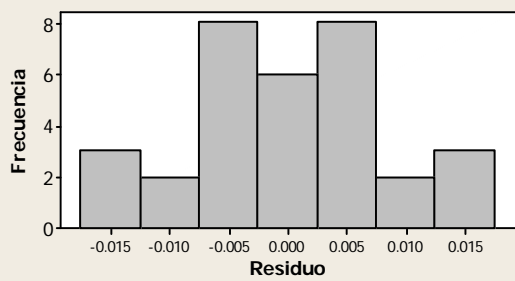
Gráfica de probabilidad normal



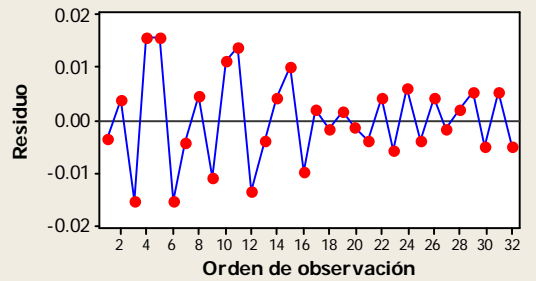
vs. ajustes



Histograma

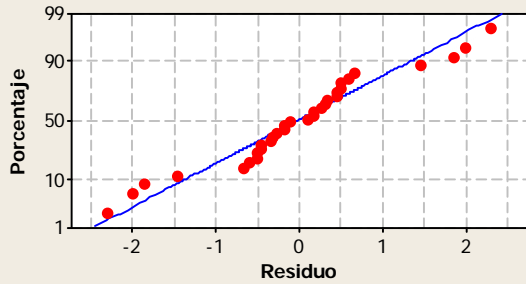


vs. orden

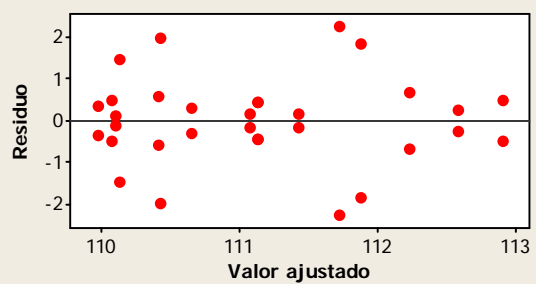


Gráficas de residuos para ACIDEZ LIBRE meq/kg

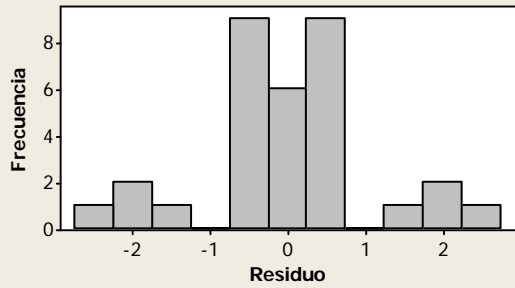
Gráfica de probabilidad normal



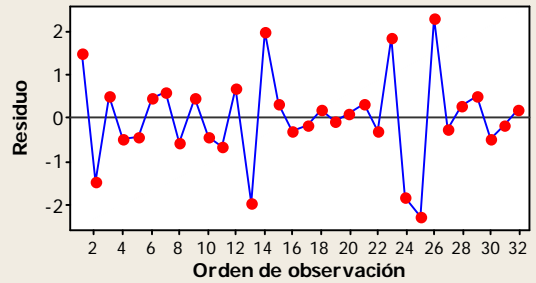
vs. ajustes



Histograma

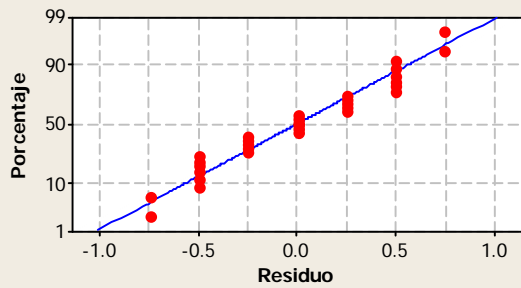


vs. orden

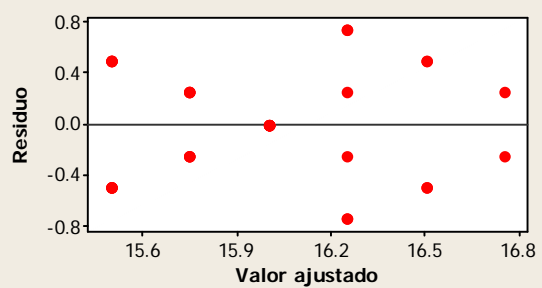


Gráficas de residuos para °BRIX

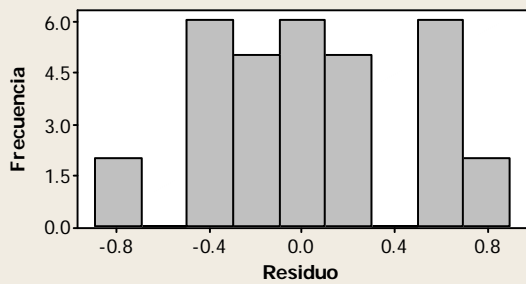
Gráfica de probabilidad normal



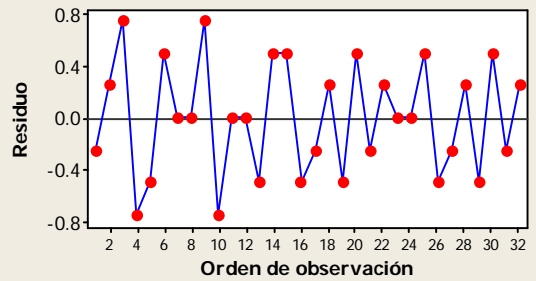
vs. ajustes



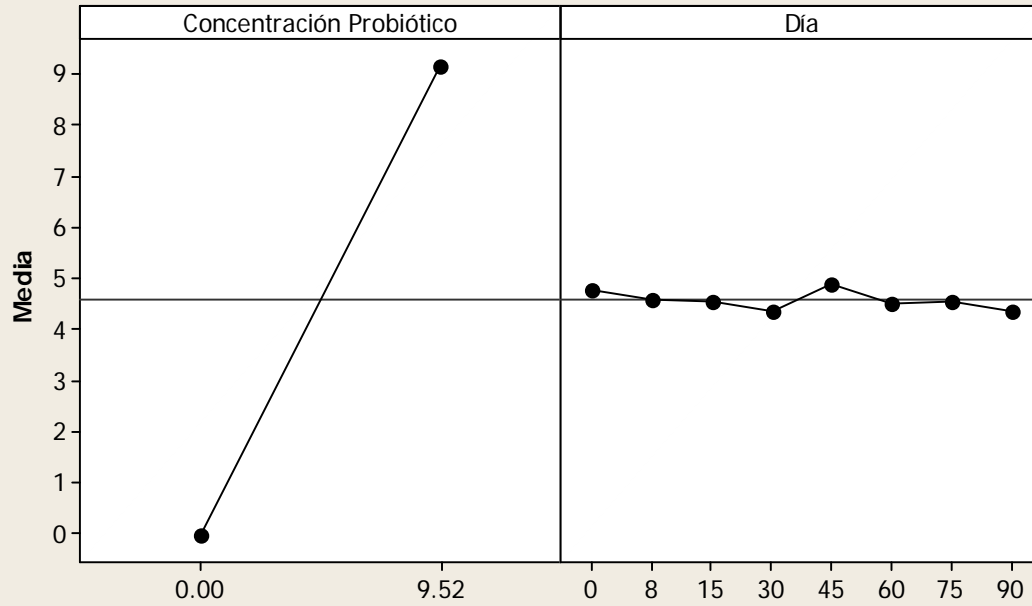
Histograma



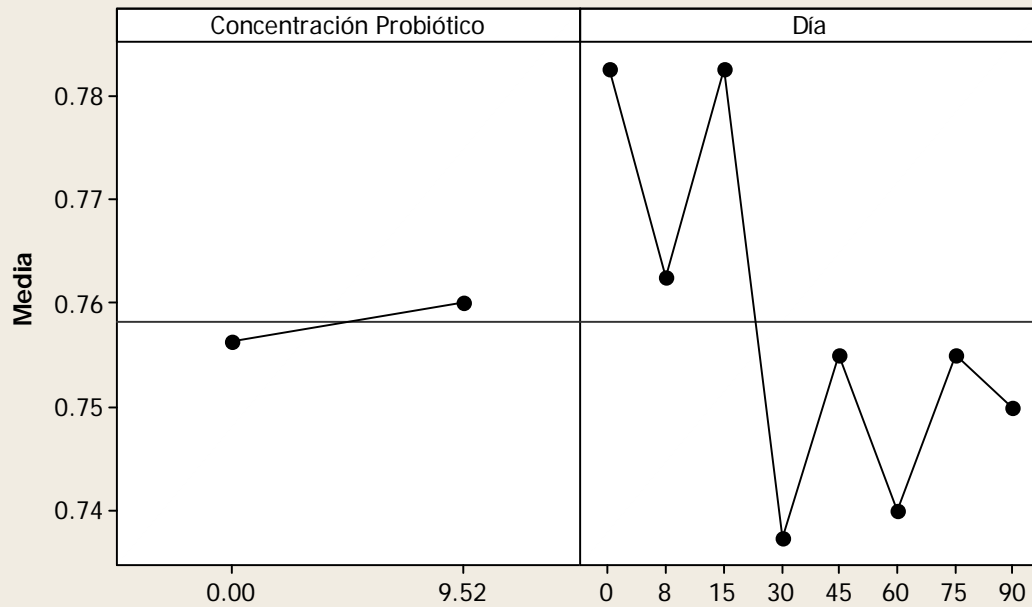
vs. orden



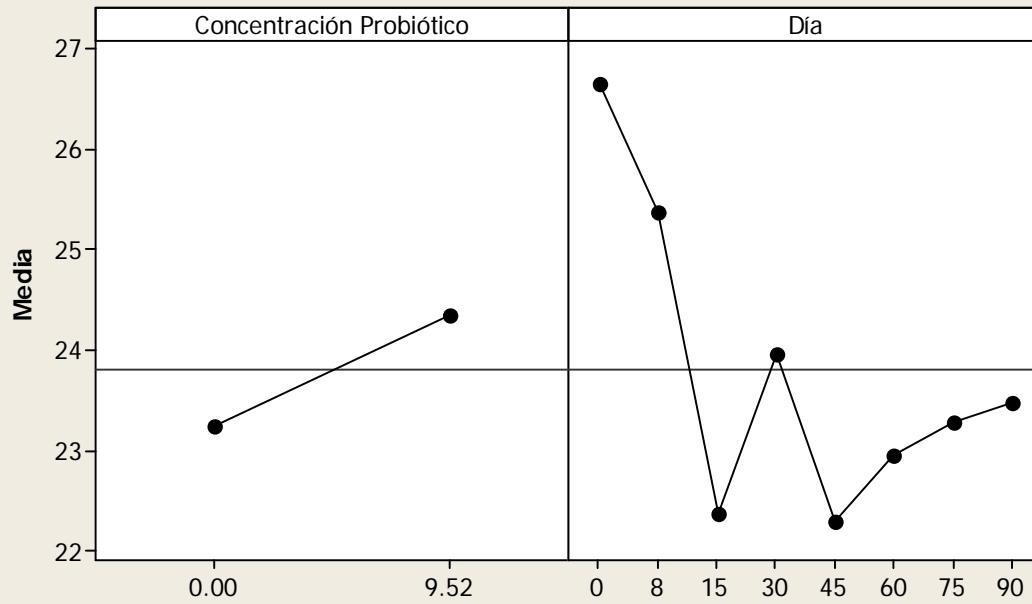
Gráfica de efectos principales para Recuento BAL Log10 ufc/g
Medias ajustadas



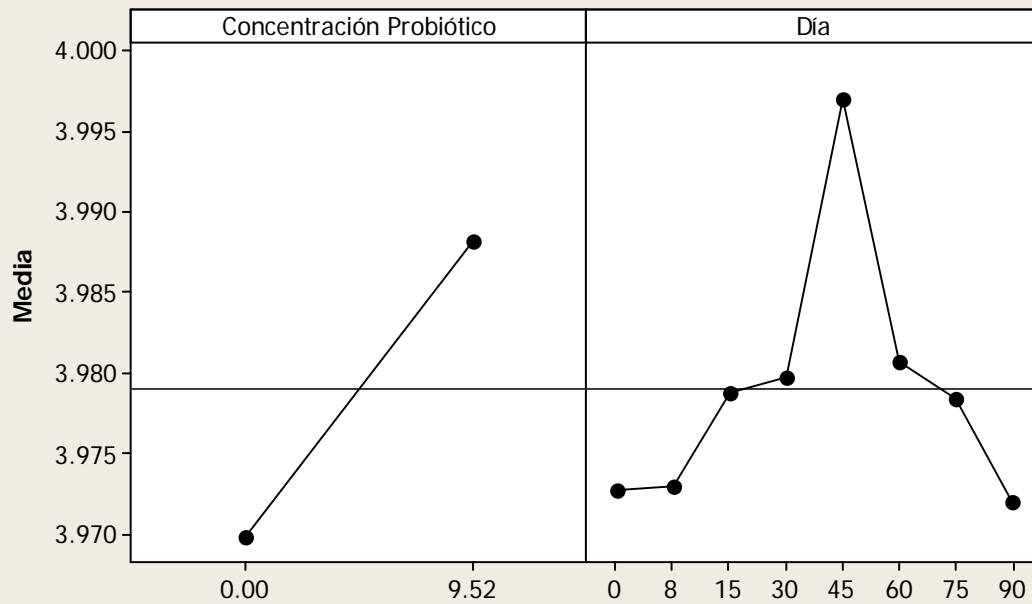
Gráfica de efectos principales para DPPH IC50 mg/ml
Medias ajustadas



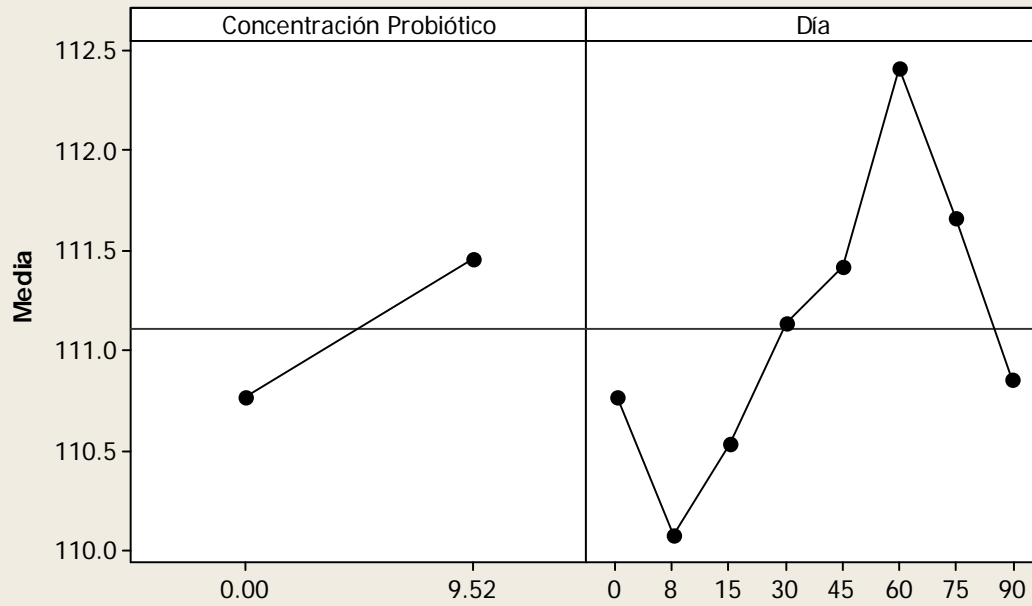
Gráfica de efectos principales para ABTS micromol TE/g muestra
Medias ajustadas



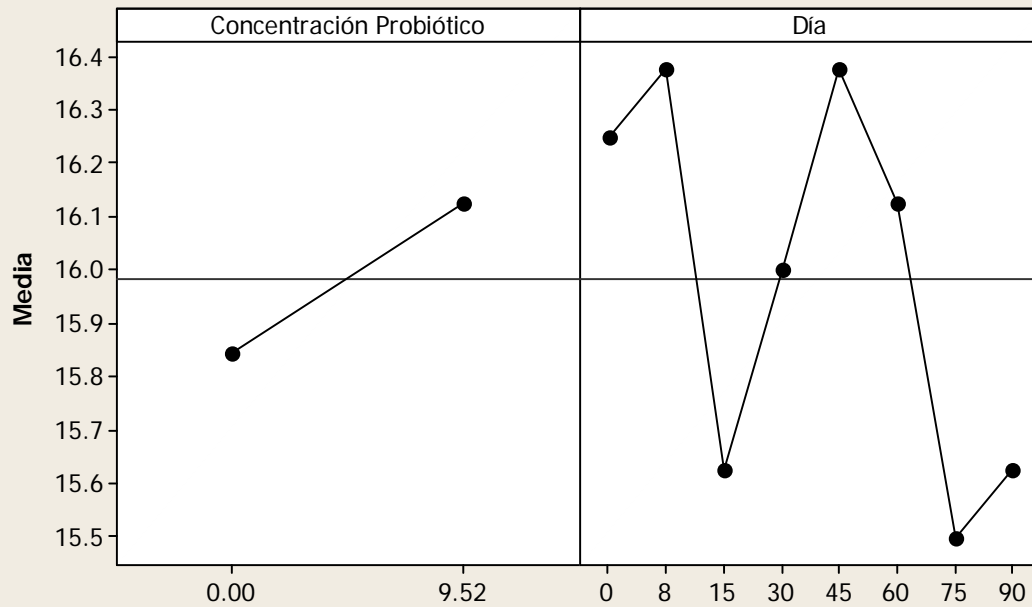
Gráfica de efectos principales para pH
Medias ajustadas



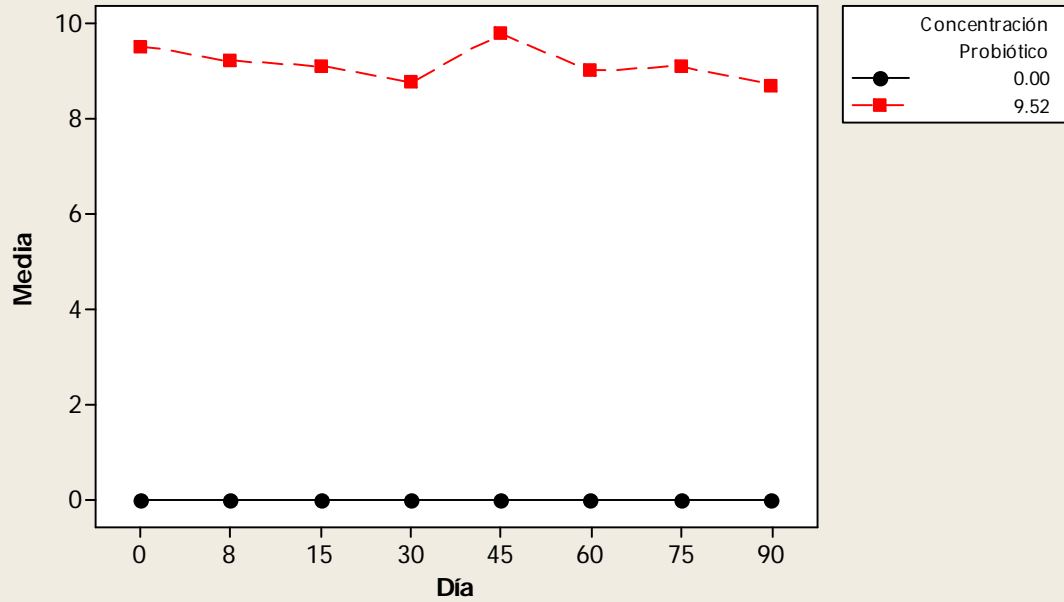
Gráfica de efectos principales para ACIDEZ LIBRE meq/kg
Medias ajustadas



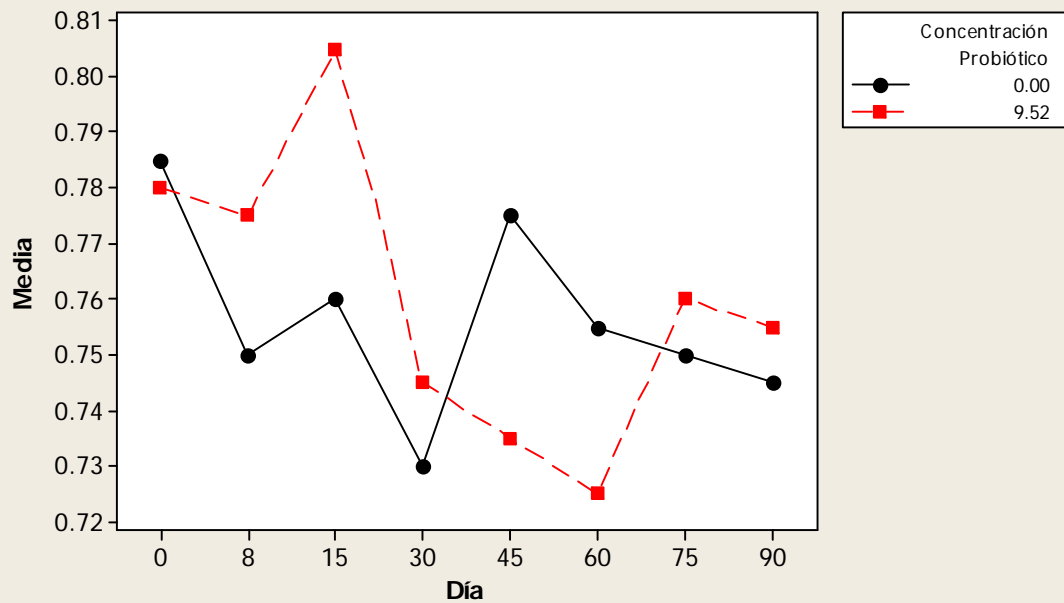
Gráfica de efectos principales para °BRIX
Medias ajustadas



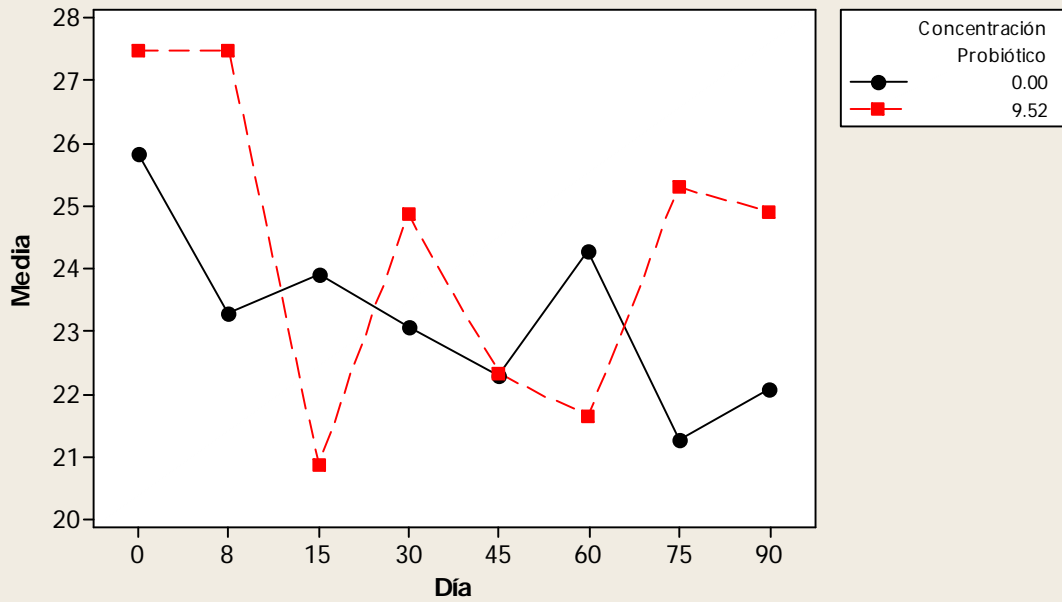
Gráfica de interacción para Recuento BAL Log10 ufc/g
Medias ajustadas



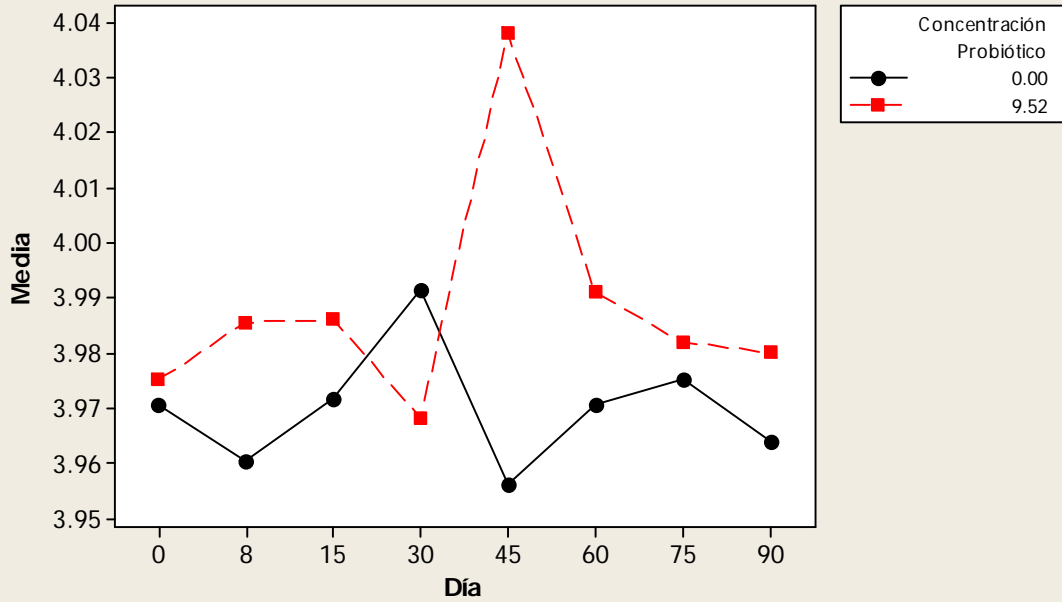
Gráfica de interacción para DPPH IC50 mg/ml
Medias ajustadas



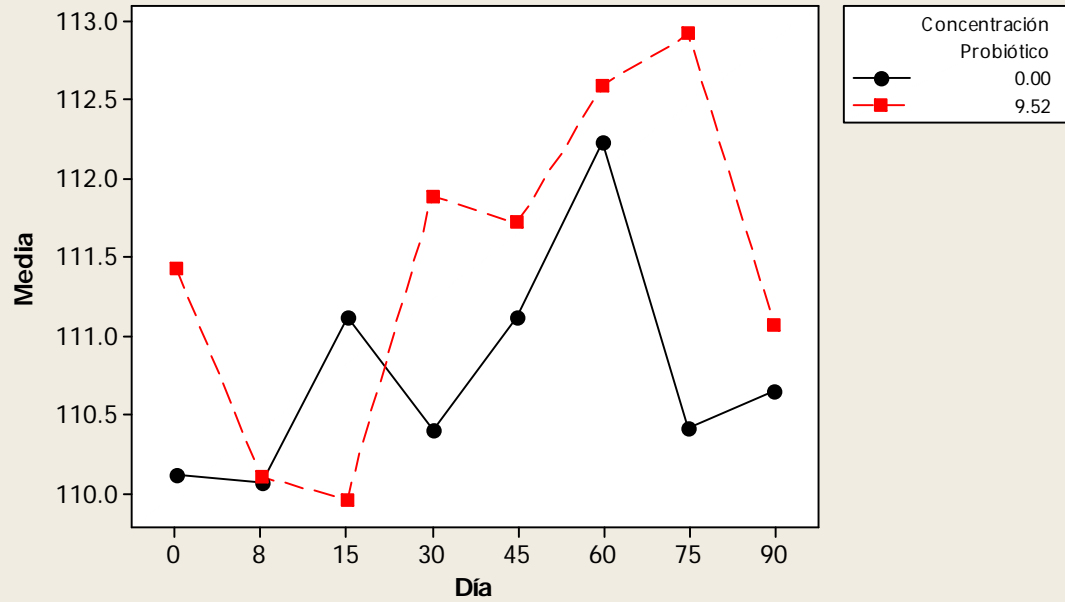
Gráfica de interacción para ABTS micromol TE/g muestra
Medias ajustadas



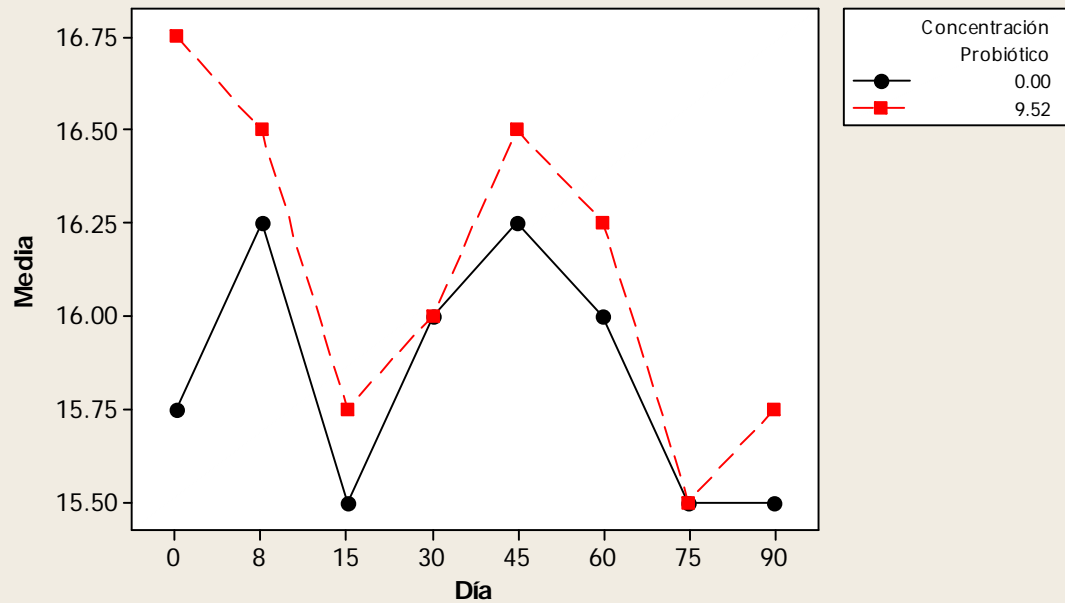
Gráfica de interacción para pH
Medias ajustadas



Gráfica de interacción para ACIDEZ LIBRE meq/kg
Medias ajustadas



Gráfica de interacción para °BRIX
Medias ajustadas



Informe del proyecto de Minitab PULPA DE MORA

Modelo lineal general: Recuento BAL, DPPH IC50 mg, ... vs. Concentració, Día

Factor	Tipo	Niveles	Valores
Concentración Probiótico	fijo	2	0.00, 9.52
Día	fijo	8	0, 8, 15, 30, 45, 60, 75, 90

Análisis de varianza para Recuento BAL Log10 ufc/g, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F
Concentración Probiótico	1	370.124	370.124	370.124	16567.31
Día	7	15.536	15.536	2.219	99.34
Concentración Probiótico*Día	7	15.536	15.536	2.219	99.34
Error	16	0.357	0.357	0.022	
Total	31	401.553			

Fuente	P
Concentración Probiótico	0.000
Día	0.000
Concentración Probiótico*Día	0.000
Error	
Total	

S = 0.149468 R-cuad. = 99.91% R-cuad.(ajustado) = 99.83%

Observaciones inusuales de Recuento BAL Log10 ufc/g

Obs	Recuento BAL Log10 ufc/g	Ajuste	Ajuste SE	Residuo	Residuo estándar
25	7.00000	6.65000	0.10569	0.35000	3.31 R
26	6.30000	6.65000	0.10569	-0.35000	-3.31 R

R denota una observación con un residuo estandarizado grande.

Análisis de varianza para DPPH IC50 mg/ml, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Concentración Probiótico	1	0.017112	0.017112	0.017112	3.56	0.078
Día	7	0.035050	0.035050	0.005007	1.04	0.442
Concentración Probiótico*Día	7	0.022987	0.022987	0.003284	0.68	0.685
Error	16	0.077000	0.077000	0.004813		
Total	31	0.152150				

S = 0.0693722 R-cuad. = 49.39% R-cuad.(ajustado) = 1.95%

Observaciones inusuales de DPPH IC50 mg/ml

Obs	DPPH IC50 mg/ml	Ajuste	Ajuste SE	Residuo	Residuo estándar
-----	--------------------	--------	-----------	---------	------------------

7	2.02000	1.92000	0.04905	0.10000	2.04	R
8	1.82000	1.92000	0.04905	-0.10000	-2.04	R

R denota una observación con un residuo estandarizado grande.

Análisis de varianza para ABTS micromol TE/g muestra, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Concentración Probiótico	1	0.810	0.810	0.810	0.68	0.422
Día	7	11.470	11.470	1.639	1.37	0.282
Concentración Probiótico*Día	7	6.025	6.025	0.861	0.72	0.656
Error	16	19.086	19.086	1.193		
Total	31	37.391				

S = 1.09220 R-cuad. = 48.95% R-cuad.(ajustado) = 1.10%

Observaciones inusuales de ABTS micromol TE/g muestra

Obs	muestra	Ajuste	Ajuste SE	Residuo	Residuo estándar
13	18.2100	19.7600	0.7723	-1.5500	-2.01 R
14	21.3100	19.7600	0.7723	1.5500	2.01 R

R denota una observación con un residuo estandarizado grande.

Análisis de varianza para pH, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Concentración Probiótico	1	0.0043945	0.0043945	0.0043945	49.43	0.000
Día	7	0.0066400	0.0066400	0.0009486	10.67	0.000
Concentración Probiótico*Día	7	0.0140472	0.0140472	0.0020067	22.57	0.000
Error	16	0.0014225	0.0014225	0.0000889		
Total	31	0.0265042				

S = 0.00942901 R-cuad. = 94.63% R-cuad.(ajustado) = 89.60%

Análisis de varianza para ACIDEZ LIBRE meq/kg, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Concentración Probiótico	1	5.69	5.69	5.69	0.08	0.775
Día	7	819.34	819.34	117.05	1.73	0.171
Concentración Probiótico*Día	7	233.46	233.46	33.35	0.49	0.826
Error	16	1080.93	1080.93	67.56		
Total	31	2139.42				

S = 8.21938 R-cuad. = 49.48% R-cuad.(ajustado) = 2.11%

Observaciones inusuales de ACIDEZ LIBRE meq/kg

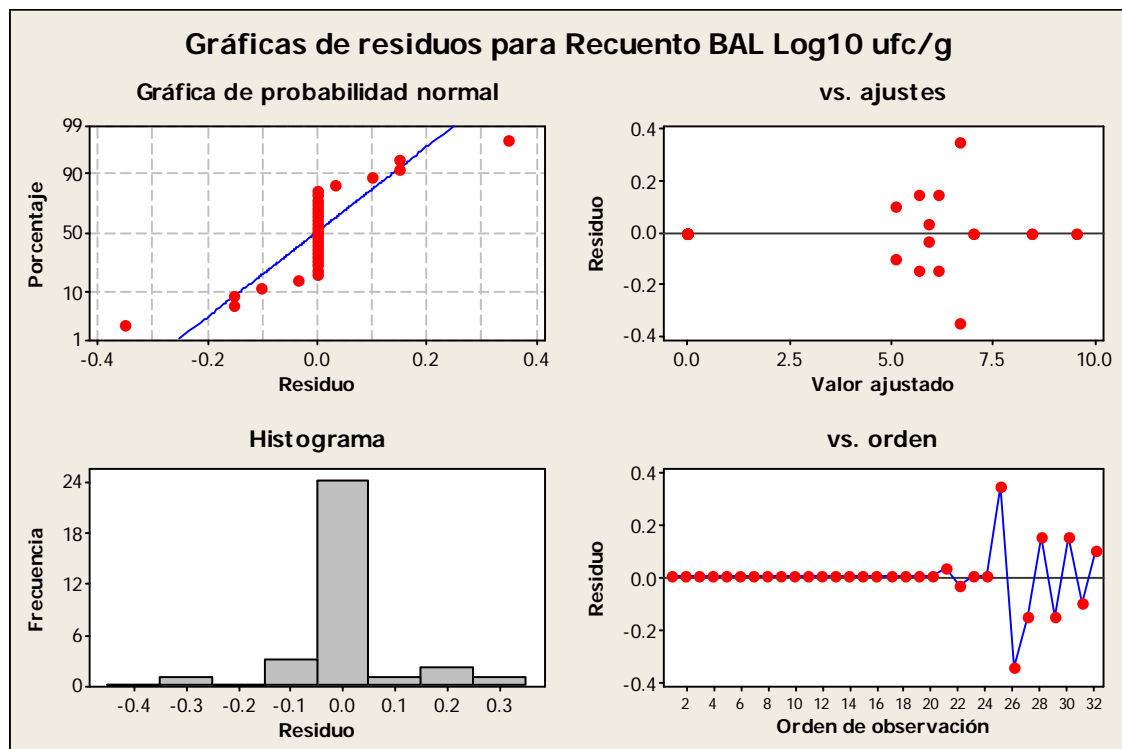
Obs	meq/kg	Ajuste	Ajuste SE	Residuo	Residuo estándar
7	299.563	285.117	5.812	14.446	2.49 R
8	270.672	285.117	5.812	-14.445	-2.49 R

R denota una observación con un residuo estandarizado grande.

Análisis de varianza para BRIX, utilizando SC ajustada para pruebas

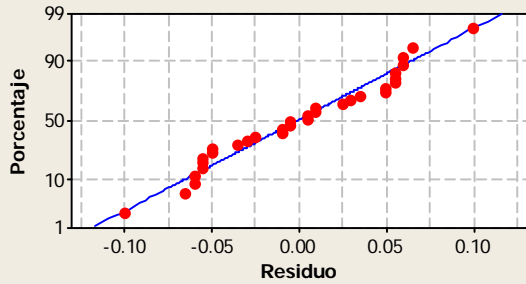
Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Concentración Probiótico	1	0.0078	0.0078	0.0078	0.03	0.864
Día	7	1.3047	1.3047	0.1864	0.72	0.655
Concentración Probiótico*Día	7	1.5547	1.5547	0.2221	0.86	0.556
Error	16	4.1250	4.1250	0.2578		
Total	31	6.9922				

S = 0.507752 R-cuad. = 41.01% R-cuad.(ajustado) = 0.00%

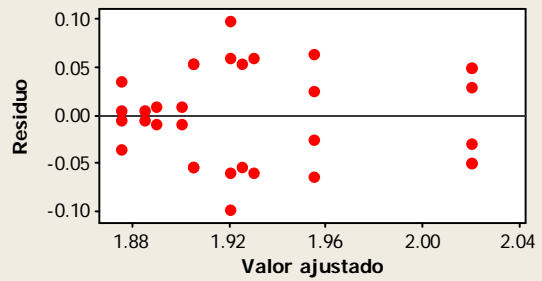


Gráficas de residuos para DPPH IC50 mg/ml

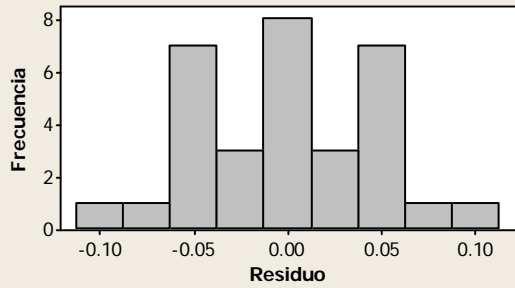
Gráfica de probabilidad normal



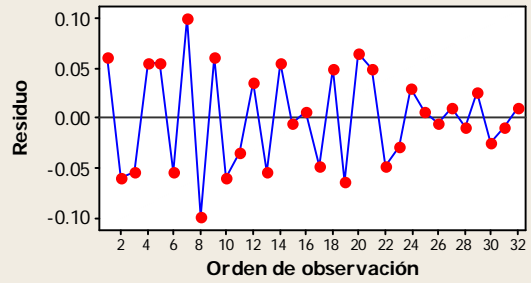
vs. ajustes



Histograma

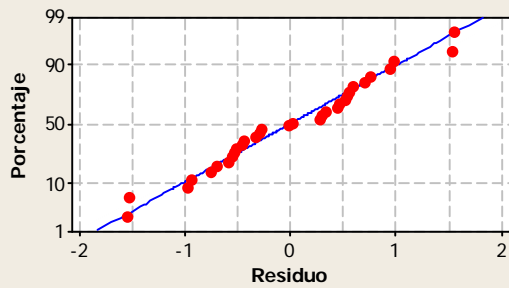


vs. orden

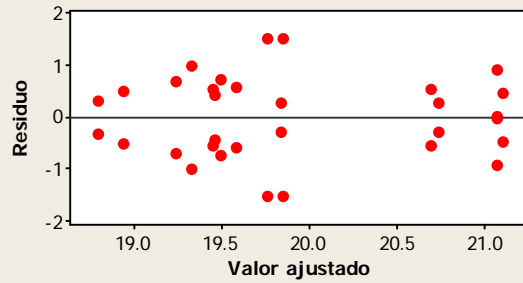


Gráficas de residuos para ABTS micromol TE/g muestra

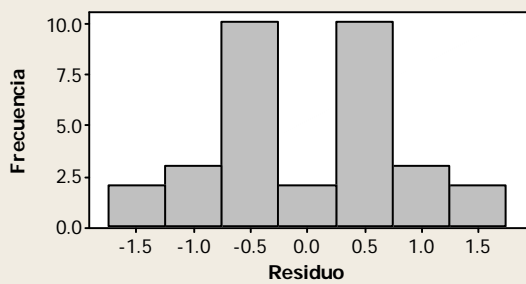
Gráfica de probabilidad normal



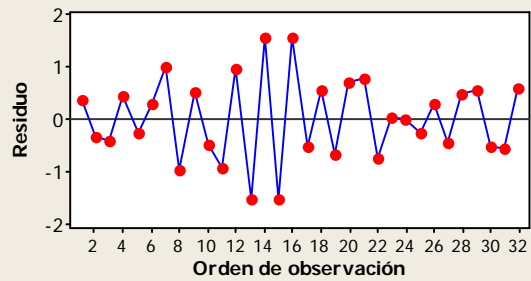
vs. ajustes



Histograma

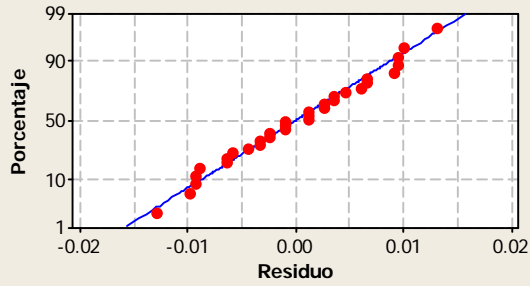


vs. orden

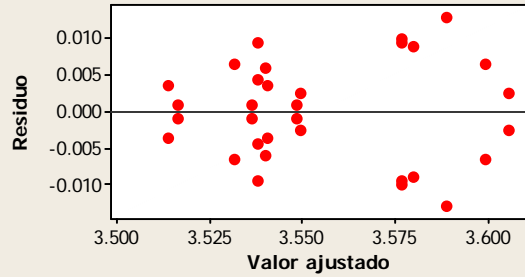


Gráficas de residuos para pH

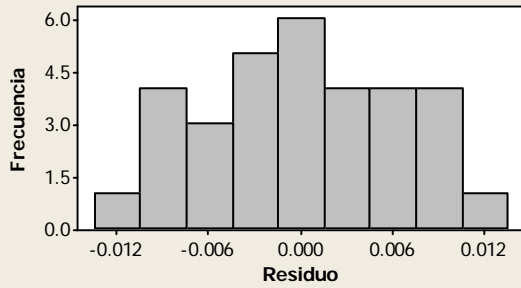
Gráfica de probabilidad normal



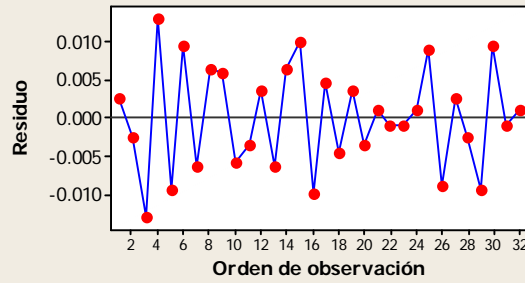
vs. ajustes



Histograma

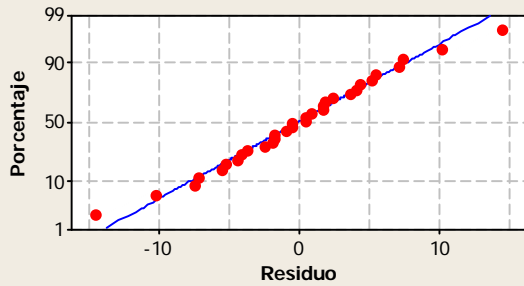


vs. orden

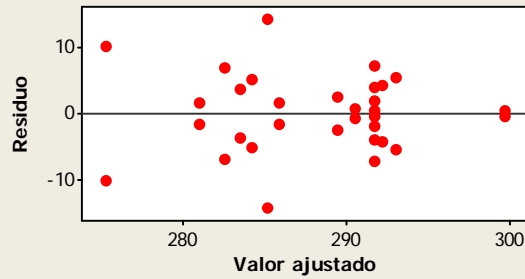


Gráficas de residuos para ACIDEZ LIBRE meq/kg

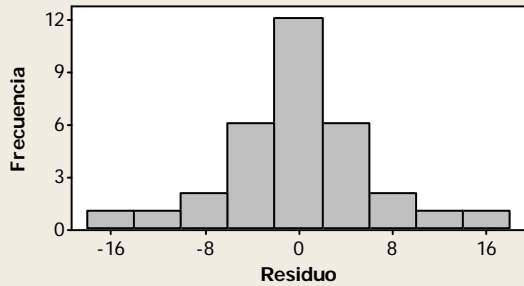
Gráfica de probabilidad normal



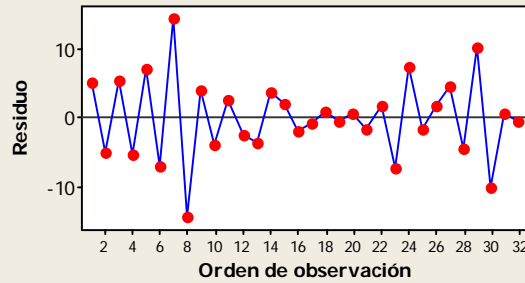
vs. ajustes

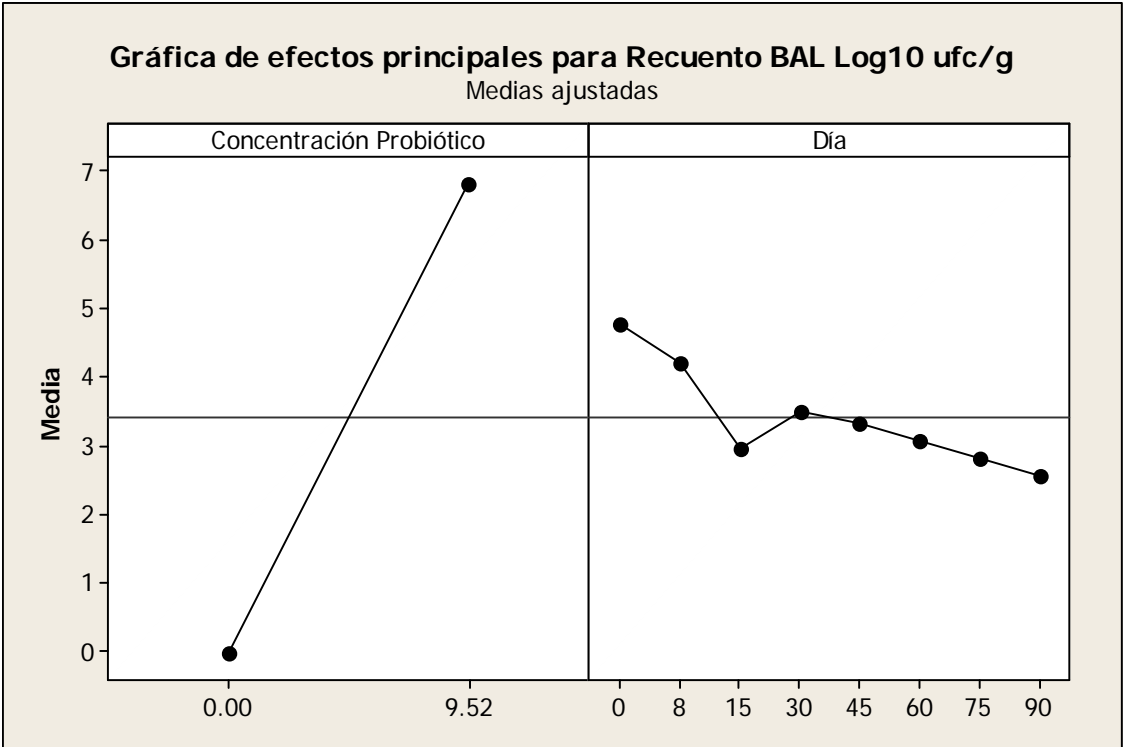
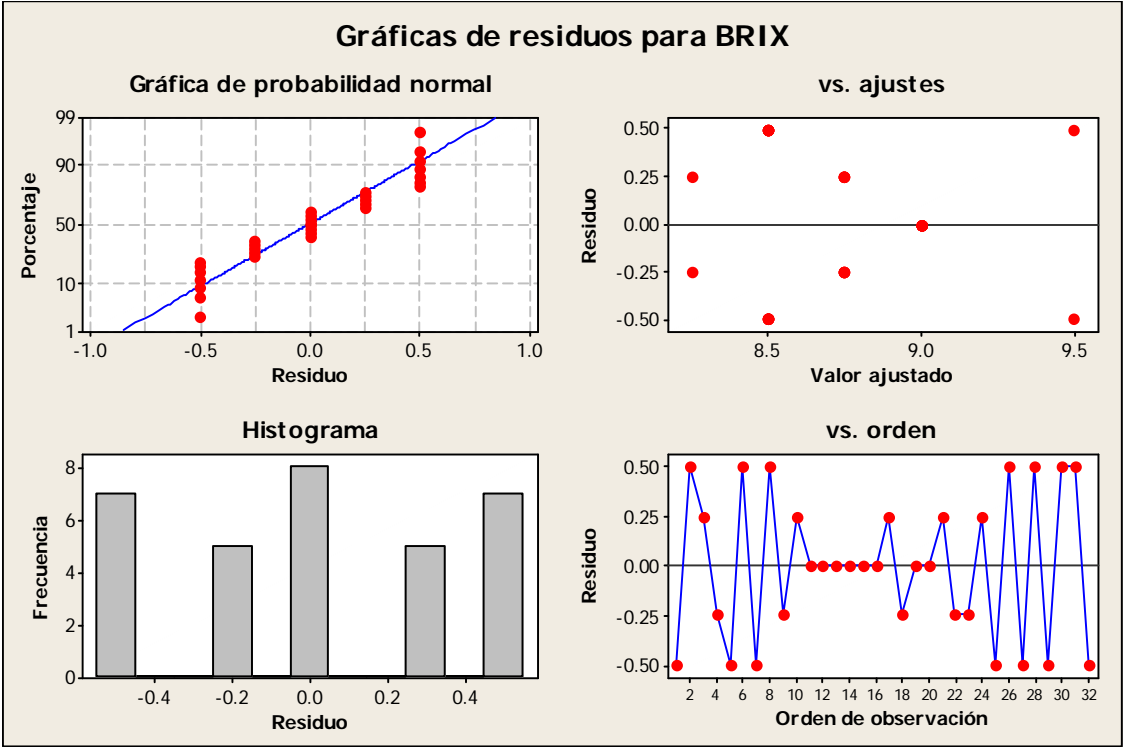


Histograma

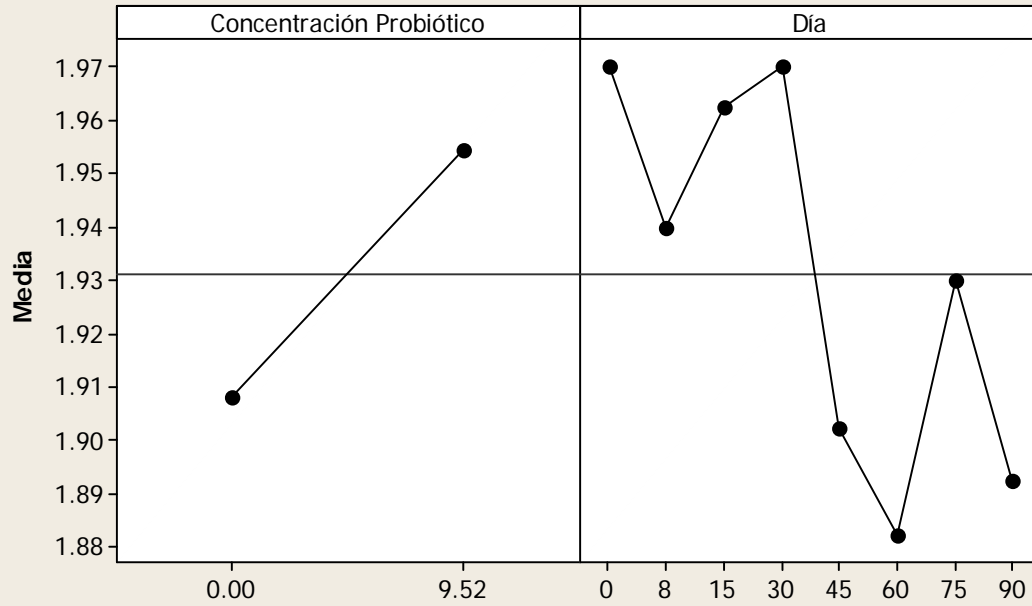


vs. orden

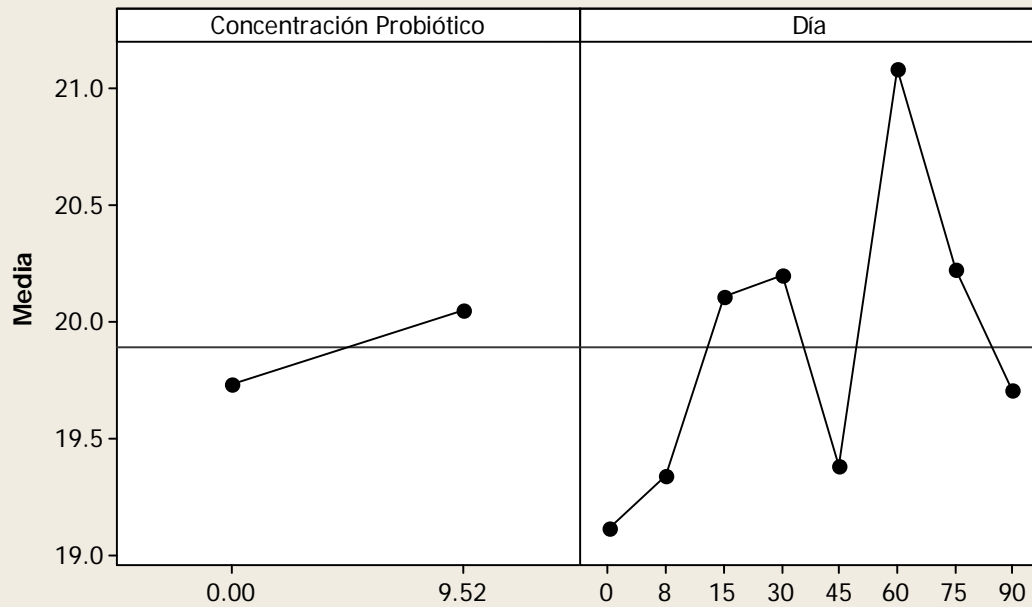




Gráfica de efectos principales para DPPH IC50 mg/ml
Medias ajustadas

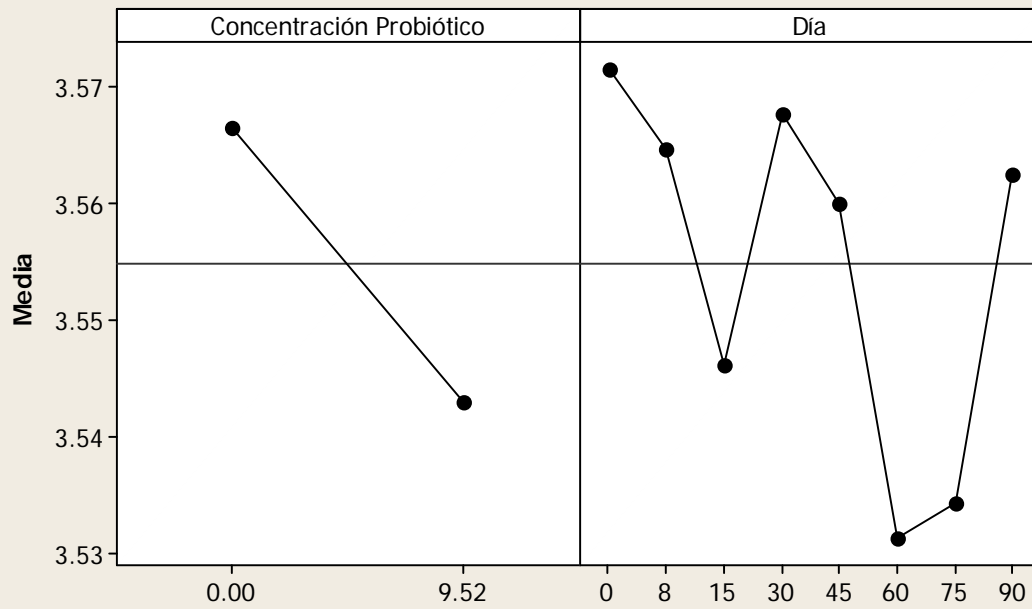


Gráfica de efectos principales para ABTS micromol TE/g muestra
Medias ajustadas



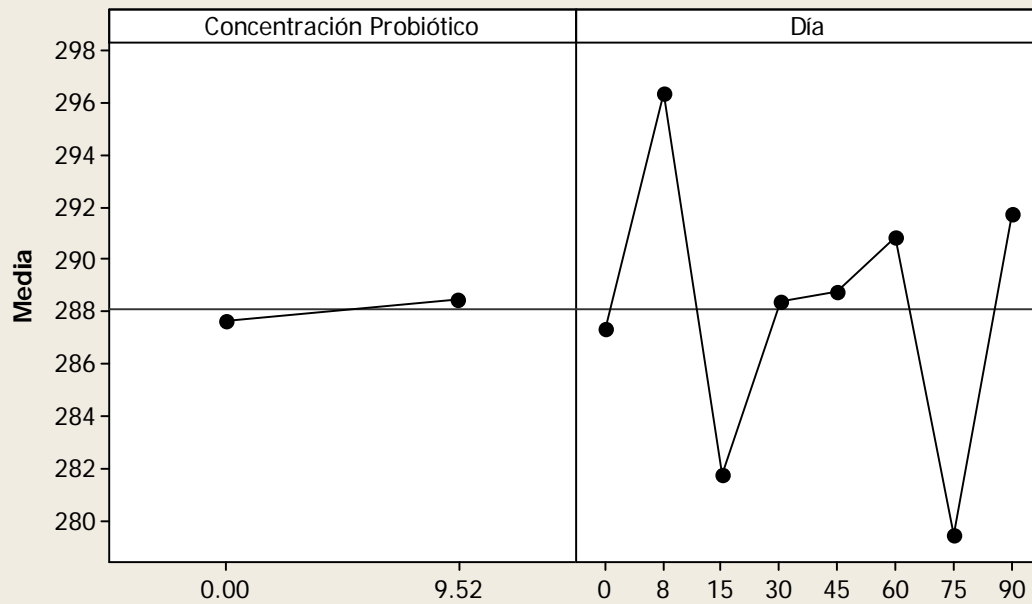
Gráfica de efectos principales para pH

Medias ajustadas



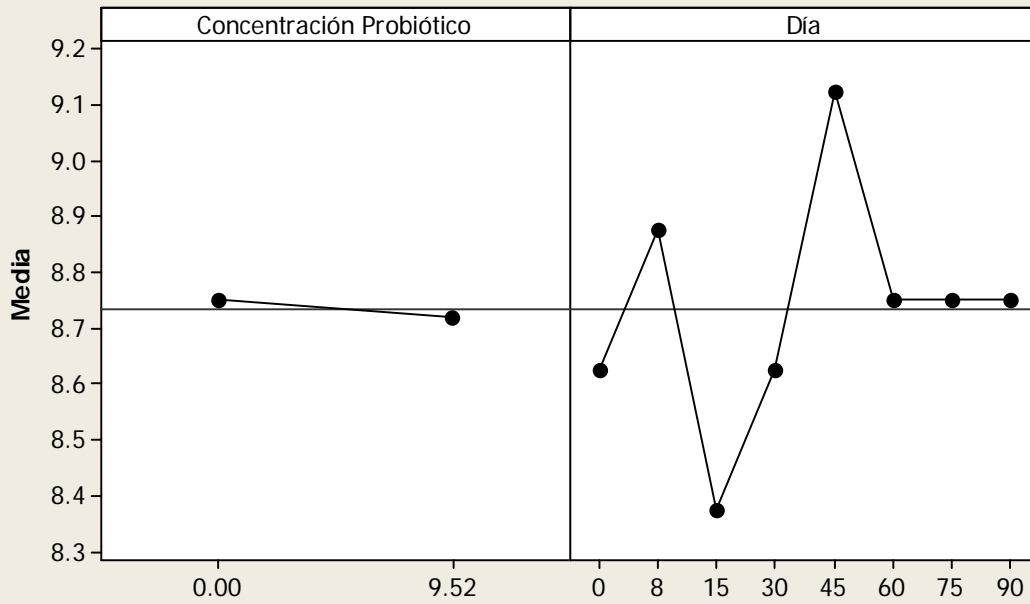
Gráfica de efectos principales para ACIDEZ LIBRE meq/kg

Medias ajustadas



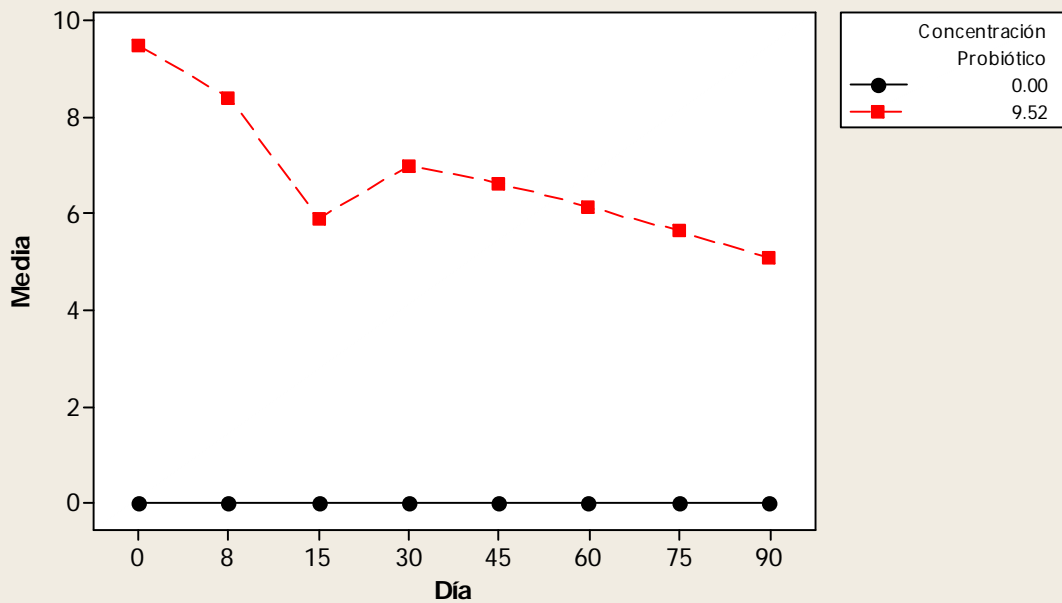
Gráfica de efectos principales para BRIX

Medias ajustadas



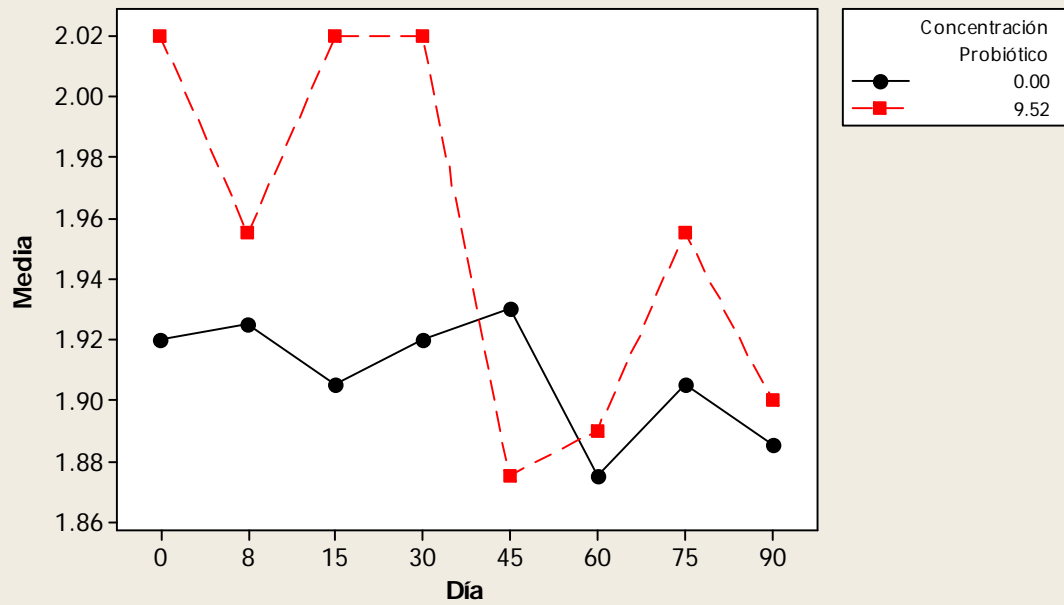
Gráfica de interacción para Recuento BAL Log10 ufc/g

Medias ajustadas



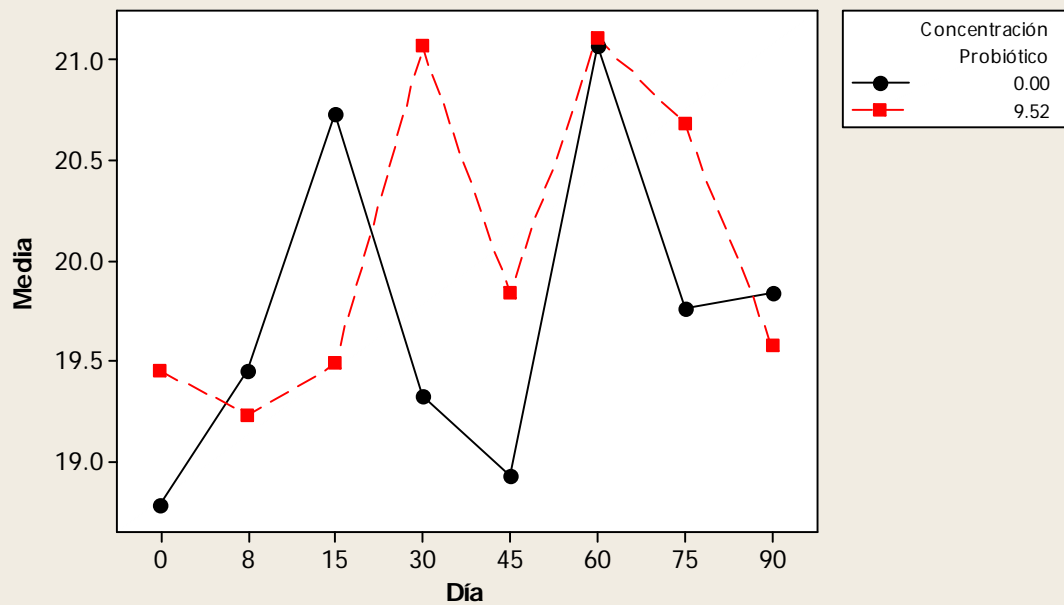
Gráfica de interacción para DPPH IC50 mg/ml

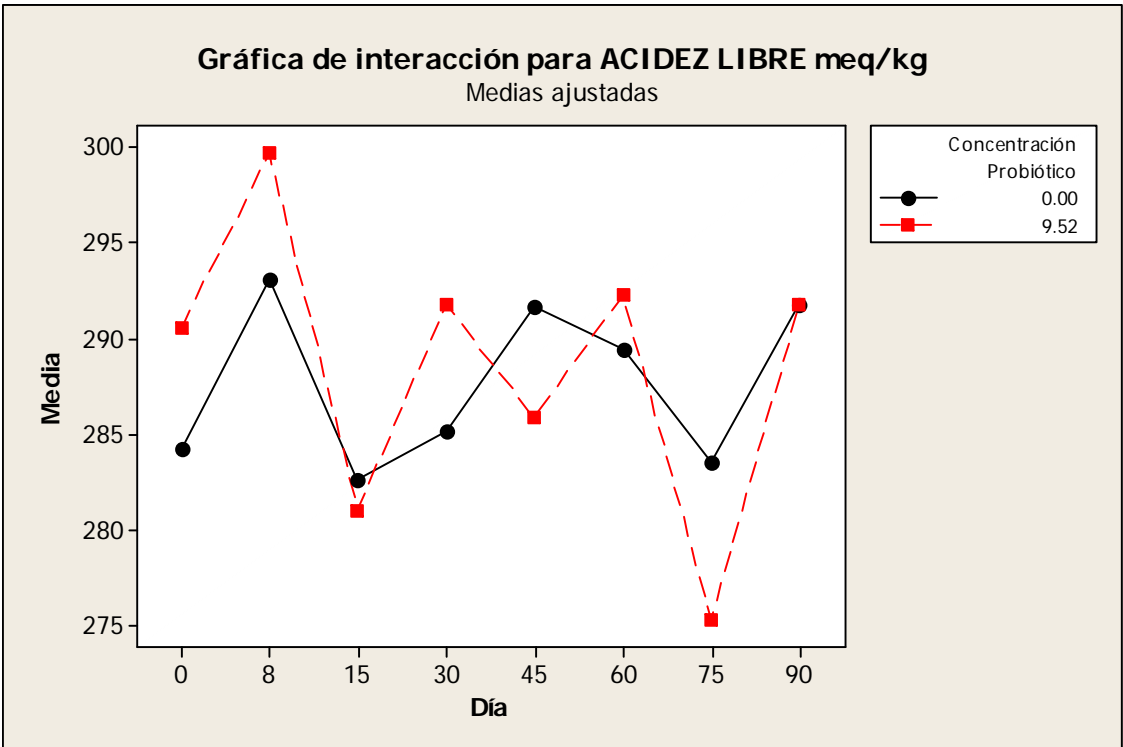
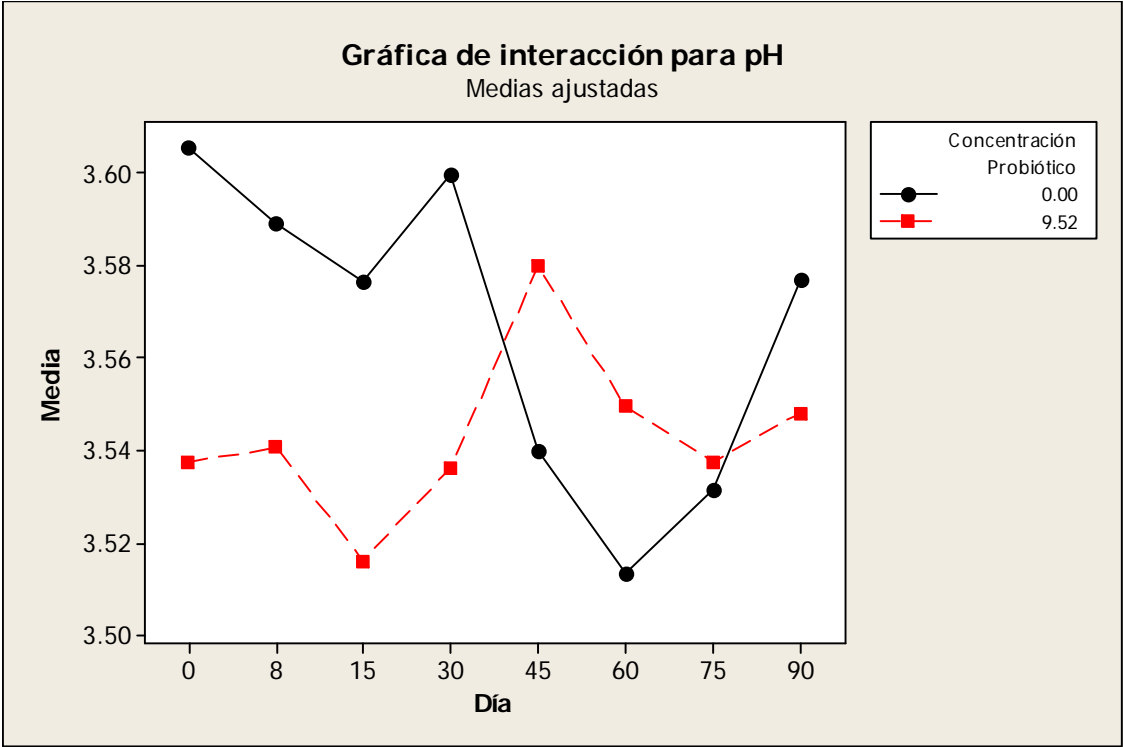
Medias ajustadas



Gráfica de interacción para ABTS micromol TE/g muestra

Medias ajustadas





Gráfica de interacción para BRIX

Medias ajustadas

