



**Universidad Tecnológica de la Mixteca**

**Estabilidad de una bebida funcional mixta adicionada  
con extracto de cáscara de *Punica granatum***

**Tesis que para obtener el título de:  
Ingeniero en Alimentos**

PRESENTA:

***Magdalena Garcia Ruiz***

Directora de tesis:

***Dra. Edith Graciela González Mondragón***

Co-Directora de tesis:

***Dra. Mirna Patricia Santiago Gómez***

Huajuapán de León, Oaxaca, México. Septiembre de 2021

Las actividades de este proyecto se realizaron en los laboratorios de Biotecnología, Ciencia y Tecnología de los Alimentos, ubicados en el Edificio de Productos Naturales y Alimentos, de la Universidad Tecnológica de la Mixteca (UTM), Huajuapán de León, Oaxaca. La actividad antiviral se realizó en el Laboratorio de Biología de Citoesqueleto y Virología ubicado en el Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad de México.

El trabajo de investigación fue financiado parcialmente por el CONACyT con el proyecto 215144, aprobado en el marco de la convocatoria de Proyecto de Desarrollo Científico para Atender Problemas Nacionales 2013.

## ACTIVIDADES ACADÉMICAS Y DE INVESTIGACIÓN

Participación con el cartel científico “Evaluación de una bebida funcional híbrida durante su almacenamiento: polifenoles totales y actividad antioxidante”. **García-Ruiz M.**, Santiago-Gómez P., Gómez-Cansino R., Tirado-Mendoza R., y González-Mondragón E. En el 4° Congreso Internacional Digital de Alimentos Funcionales y Nutraceuticos modalidad virtual, que se llevó a cabo del 10 al 12 de junio del 2020.

Asistencia al 4° Congreso Internacional Digital de Alimentos Funcionales y Nutraceuticos modalidad virtual, que se llevó a cabo del 10 al 12 de junio del 2020.

Estancia Académica en el Laboratorio de Biología de Citoesqueleto, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM, Ciudad de México. Se desarrolló el proyecto “Determinación de la actividad antiviral de una bebida funcional durante su almacenamiento a 4°C”, julio-septiembre 2019.

## AGRADECIMIENTOS

A las Autoridades y Profesores de la Universidad Tecnológica de la Mixteca, por la oportunidad de recibir una formación de calidad.

A mi directora del trabajo de tesis la Dra. Edith G. González Mondragón, por haberme guiado en este proceso, por su paciencia y todos los conocimientos que me ha brindado, gracias por todo el apoyo y orientación durante la carrera. De igual modo, agradezco a la Dra. M. Patricia Santiago Gómez, por haber aceptado ser mi codirectora y por su valioso apoyo en la parte de la evaluación sensorial, así como, en la preparación para la presentación y en la etapa final de la tesis. Gracias por sus consejos y sus palabras de apoyo.

A las integrantes del Comité Revisor: Dra. Rocío Tirado Mendoza (Facultad de Medicina, UNAM), M. en C. Alma Yadira Salazar Govea (Instituto de Agroindustrias, UTM) y Dra. Thalía I. Ramírez Reyes (Cátedra CONACyT, División de Estudios de Posgrado, UTM), por su apoyo y comentarios que permitieron mejorar el presente trabajo de tesis.

A la M. en C. Alma Yadira Salazar Govea por todo su apoyo y consejos que me permitieron mejorar profesionalmente.

A la Dra. Rocío Tirado Mendoza, por haberme brindado la oportunidad de realizar una estancia bajo su asesoría, por compartirme sus conocimientos sobre virus.

Al Dr. Javier Rolando Ambrosio Hernández†, por haberme permitido trabajar en el Laboratorio de Biología de Citoesqueleto, a su cargo, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM, Ciudad de México.

A la Dra. Rocio Gómez Cansino (Cátedra CONACyT), por su apoyo en el desarrollo de la parte experimental del presente trabajo.

A todos los participantes en la prueba sensorial de la bebida funcional mixta, que puntual e incondicionalmente me apoyaron durante los 6 meses que duró dicha evaluación, son parte importante de este proyecto.

A la Dra. Patricia Gallegos por haberme facilitado el cañón para el ensayo de mis presentaciones.

A mis compañeros I.A. Gabriel Arellanes, I.A. Leonardo Soto Rodríguez y M. en C. Erika López, Assad Bautista, Joselyn Cabrera y Miguel Hernández por apoyarme durante mi estancia en el laboratorio de Biotecnología de la UTM. De igual modo, agradezco a la Técnico de Laboratorio I.A. Yazmín Hernández García, por la capacitación para el uso de los equipos del Laboratorio Ciencia y Tecnología de los Alimentos, a cargo de la Dra. Patricia Santiago y la M. en C. Alma Salazar.

Agradezco a todos los compañeros del laboratorio de Biología de Citoesqueleto, a Uriel Cruz Meza, por enseñarme el manejo de la línea celular Hep-2, por su apoyo en los ensayos de viabilidad celular y actividad antiviral de la bebida funcional mixta, así como, a Antonio Magaña, Berenice Rodríguez y Samyr Acosta, por resolver mis dudas y orientarme cuando lo solicité.

A los técnicos de los laboratorios de ciencias de los alimentos, química general y taller de procesamiento de alimentos: Irma González, Rocío Espinoza y Tenoch Santiago por su apoyo y asesoría durante la carrera.

A mis compañeros de clase: Nallely Yadid Perez, Jesús Fabián, Darwin Guzmán y Rafael Matadamas, por motivarme y acompañarme durante este periodo, principalmente al equipo dinamita, juntos hicimos muchas cosas.

## DEDICATORIAS

A Dios, por darme el regalo de la existencia y siempre guiar mis pasos. A mis padres Gregorio Garcia y Carmen Ruiz, por su amor y todo su apoyo incondicional: gracias papá por enseñarme el camino de Dios, y brindarme los valores que me inculcaste, por motivarme a perseverar y a no rendirme jamás, gracias mamá por ser ejemplo de superación y por enseñarme a sobreponerme en la adversidad. A mis hermanos David, Manuel y Leví, por haberme motivado y apoyado cuando más lo necesité, gracias por su amor y comprensión. A mi pequeño Noe, quien siempre ha sido una de mis principales motivaciones para no rendirme y continuar: agradezco que seas parte de mi vida, gracias por tu amor. A mi compañero de vida Manuel Hernández, gracias por acompañarme durante este proceso, por amarme y apoyarme siempre. A Rafael, gracias hijo por animarme todos los días. También dedico este trabajo a mi abuelita Margarita: aunque ya estás en la morada celestial, sé que te hubiera dado gusto verme concluir esta parte de mi vida académica. A mis tíos Gregorio, Elias, Mauro y Nazario y a mis tías Anatolia y Martina, de quienes recibí siempre apoyo y comprensión.

A mis amigas Nallely Perez, Viridiana Díaz, Sandra Hernández, Janet Lupercio, Carolina Madrigal, Diana Acevedo, Erika Jiménez, Rosa Ruiz y Ariadna Pacheco. A mis amigos Christopher Rios, Jesús Fabian, Darwin Guzmán y Rafael Matadamas. Gracias por su amistad y por compartir momentos conmigo y reírnos mucho juntos.

Muchas más personas contribuyeron a este importante logro en mi vida. Les agradezco profundamente su amable generosidad e incondicional apoyo.

## RESUMEN

El presente trabajo de tesis se derivó del proyecto financiado por el CONACyT (215144) que fue aprobado en la convocatoria Proyecto de Desarrollo Científico para Atender Problemas Nacionales 2013, en el cual un objetivo fue desarrollar una bebida funcional mixta (BFM) adicionada con extracto etanólico acuoso obtenido a partir de polvo de cáscara de *Punica granatum* (EEPPG), para conferirle actividad antioxidante (AA) y contra el virus sincitial respiratorio humano (VSRh). Algunos resultados generados hasta el momento sustentan que el EEPPG posee AA, así como, actividad contra el VSRh en la etapa de unión del virus a la célula cuando se evaluó en la línea celular HEp-2. Ambas propiedades biológicas se conservan cuando dicho extracto se añade a una bebida mixta de guayabana-naranja en una concentración definida (solicitud de patente MX/a/2017/007342). Debido a que la BFM es un alimento, un aspecto importante es estudiar la calidad e inocuidad de esta durante su almacenamiento.

Por lo tanto, el presente trabajo tuvo como objetivo “Evaluar la estabilidad de una bebida funcional adicionada con extracto de la cáscara de *Punica granatum*”, almacenada a 4 °C durante 6 meses, mediante análisis fisicoquímicos (pH, °Brix, acidez titulable, sólidos y cenizas totales) y microbiológicos (mohos y levaduras, mesófilos aerobios y coliformes totales), con base a lo establecido en normas nacionales e internacionales para bebidas no alcohólicas y/o mixtas. También, se llevó a cabo una prueba sensorial de nivel de agrado utilizando una escala hedónica de 9 puntos. Desde el punto de vista de un alimento funcional, se monitoreó el contenido de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu, la AA (método del radical DPPH) y la actividad contra el virus sincitial respiratorio humano en la etapa de unión, empleando la línea celular HEp-2 y el ensayo de TCID<sub>50</sub>.

Los resultados mostraron una variación de los datos registrados a lo largo del almacenamiento, lo que es un comportamiento común en el análisis de alimentos, no obstante, los valores de los parámetros fisicoquímicos se mantuvieron dentro de los límites establecidos en las normas nacionales e internacionales, por lo tanto, la BFM cumplió con la calidad requerida para una bebida mixta durante el período de evaluación. Únicamente a\* y h° mostraron diferencia significativa durante el almacenamiento, lo que no sucedió con el resto de los parámetros del color instrumental de la BFM: L\*, b\*, C\*, cambio de color total ( $\Delta E$ ) e índice de oscurecimiento (BI, por sus siglas en inglés), lo que implica que el color no se modificó a 4 °C por 6 meses. Por otro lado, hasta el final de su almacenamiento la BFM se mantuvo inocua (<10 UFC/mL) con respecto a las pruebas microbiológicas que se realizaron. El análisis estadístico de los resultados de la evaluación sensorial mostró que no hubo diferencia significativa en los atributos de apariencia general, color, olor y sabor, lo que puso de manifiesto que la BFM se mantuvo sensorialmente estable durante los 6 meses a 4 °C. El CPT y la AA registraron una disminución del 47.0 y 45.6 % entre el tiempo cero y los 6 meses de su almacenamiento, por lo tanto, se puede decir que la BFM mantuvo su calidad con respecto a dichos parámetros porque no disminuyeron más del 50 %. Por último, se corroboró que la BFM presenta actividad contra el VSRh y que la presencia de la bebida reduce significativamente el tamaño de los sincitios, lo que posiblemente sea un mecanismo del efecto antiviral en la etapa de unión a la célula. Sin embargo, los resultados de dicha actividad biológica durante el almacenamiento de la BFM no fueron claros, por lo que es necesario realizar nuevamente estos ensayos para esclarecer dicho comportamiento, así como, su reproducibilidad.

En conclusión, la BFM almacenada a 4 °C durante 6 meses conservó su calidad e inocuidad con respecto a todos los parámetros evaluados en el presente trabajo de tesis, con excepción de la actividad contra el VSRh los resultados no permitieron generar una conclusión sólida sobre la conservación o pérdida de esta en la BFM, por lo que se recomienda evaluarla nuevamente en investigaciones posteriores.

## ABSTRACT

This thesis work was derived from the research project financed by CONACyT (215144) approved in the convocation Proyecto de Desarrollo Científico para Atender Problemas Nacionales 2013. One aim of the research work was to make a mixed functional beverage (MFB) using an aqueous ethanolic extract from *Punica granatum* peel powder (AEEPGP), with the purpose of confer biological properties on the MFB such as antioxidant activity (AA) and activity against human respiratory syncytial virus (hRSV). Some results obtained in the project 215144 showed that AEEPGP has activity antioxidant, as well as anti-hRSV at the cell-virus binding stage HEp-2 cell line. Both biological properties were retained when this extract, at a defined concentration, was added in a guava-orange mixed beverage (patent application MX/a/2017/007342). In this way, it is very important to study its safety and quality of MFB during the storing period.

Thus, the aim of this thesis work was "To evaluate the stability of a mixed functional beverage added with extract of the peel of *Punica granatum*, during its storage in refrigeration", was analyzed several parameters physicochemical (pH, °Brix, titratable acidity, total solids, and ash) and microbiological safety (molds and yeasts, aerobic mesophiles, and total coliforms), based on national and international standards for non-alcoholic and/or mixed beverages. Also, a sensory evaluation of the degree of liking was carried out with a 9-point hedonic scale. The functional properties of the MFB were also determined, the total polyphenol content (TPC) was monitored by the Folin-Ciocalteu method, the AA (DPPH<sup>•</sup> radical method) and the activity against the hRSV in the binding stage at the cell, using HEp-2 cell line and the TCID<sub>50</sub> assay.

The results of this thesis work showed a variation of the data obtained throughout storage, it is a trend normally observed in food analysis, despite this the physicochemical parameters data remained within the limits allowed in national and international standards, therefore, the MFB had quality required for a mixed beverage during the evaluation period. On other hand, a\* and h° parameters showed statistically significant difference but not the rest of the instrumental color parameters: L\*, b\*, C\*, total color change ( $\Delta E$ ) and browning index (BI). Therefore, the color of MFB did not change at 4 °C during 6 months of storage, The MFB remained innocuous (<10 CFU/mL) until the end of the evaluation. The attributes of overall appearance, color, odor, and flavor, not showed significant difference which revealed that the MFB remained sensory stable during 6 months at 4 °C. The TPC and AA decreased 47.0 and 45.6 %, respectively, between time zero and 6 months of storage, thus the MFB maintained its quality with respect to those parameters because they did not decrease more than 50 %. Finally, was confirmed that MFB has activity against hRSV in the cell-binding stage and that the beverage significantly reduces the size of the syncytia in the Hep-2 cell, a possible molecular mechanism of the antiviral effect. The results of the activity against the hRSV during storage of MFB were not clear, therefore it is necessary to carry out these analyzes again to clarify this biological property of the MFB, as well as its reproducibility.

In conclusion, the MFB stored at 4 °C for 6 months is safety and quality with respect to all parameters evaluated in this thesis work, but not for the activity against hRSV because the results so far did not support the conservation or loss of this activity in the MFB which should be studied in future research.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
2.	MARCO TEÓRICO .....	4
2.1	Residuos agroindustriales.....	4
2.1.1	<i>Punica granatum</i> .....	5
2.2	Extracción de biocompuestos .....	6
2.2.1	Extracción asistida por ultrasonido (EAU).....	7
2.3	Polifenoles.....	8
2.3.1	Contenido de polifenoles totales .....	9
2.3.2	Polifenoles en <i>Punica granatum</i> .....	10
2.3.3	Actividades biológicas de los polifenoles .....	10
2.3.3.1	Actividad antioxidante .....	11
2.3.3.2	Actividad antiviral contra el virus sincitial respiratorio humano.....	11
2.4	Bebidas funcionales.....	15
2.5	Proceso de elaboración de una bebida no alcohólica .....	17
2.5.1	Recepción y pesado de materia prima.....	20
2.5.2	Lavado y selección de la materia prima .....	20
2.5.3	Extracción y tamizado.....	21
2.5.4	Pasteurización .....	22
2.5.5	Envasado .....	22
2.5.6	Codificado, etiquetado y empaquetado.....	24
2.5.7	Almacenamiento, transporte y distribución .....	25
2.5.8	Proceso de fabricación de bebidas refrescantes a nivel industrial .....	26
2.6	Estabilidad de los alimentos .....	27
2.6.1	Tipos de pruebas de estabilidad .....	27
2.6.2	Propiedades fisicoquímicas .....	30
2.6.3	Carga microbiana .....	32

2.6.4	Color instrumental .....	34
2.6.5	Pruebas sensoriales .....	36
2.6.6	Biocompuestos .....	37
3.	ESTADO DEL ARTE .....	38
4.	JUSTIFICACIÓN.....	40
5.	OBJETIVOS .....	41
6.	METAS .....	41
7.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	42
7.1	Materiales y reactivos .....	42
7.2	Equipos .....	43
7.3	Programa de muestreo .....	43
7.4	Acondicionamiento y caracterización de las materias primas .....	44
7.4.1	Frutos de <i>Punica granatum</i> .....	44
7.4.2	Frutos de <i>Psidium guajava</i> L. y concentrado de naranja comercial.....	46
7.5	Extracto etanólico acuoso obtenido a partir de polvo de cáscara de <i>Punica granatum</i> .....	47
7.6	Contenido de polifenoles totales (CPT).....	47
7.7	Actividad antioxidante in vitro por el método del DPPH* .....	48
7.8	Elaboración de la bebida funcional mixta .....	48
7.9	Envasado, pasteurizado, etiquetado y almacenamiento .....	48
7.10	Análisis de la BFM .....	49
7.10.1	Microbiológicos .....	49
7.10.2	Fisicoquímicos .....	50
7.10.3	Evaluación sensorial .....	52
7.10.4	Contenido de polifenoles totales y actividad antioxidante.....	53
7.10.5	Actividad antiviral de la BFM contra el VSRh .....	54
7.10.5.1	Línea celular .....	54
7.10.5.2	Estudio de citotoxicidad de la BFM .....	55

7.10.5.3 Cálculo del título viral por TCID <sub>50</sub> .....	57
7.10.5.4 Actividad antiviral de la BFM en la etapa de unión del VSRh .....	58
7.11 Análisis estadístico.....	59
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	60
8.1 Materia prima.....	60
8.2 Preparación de la bebida funcional mixta .....	62
8.3 Evaluación de la bebida funcional mixta al tiempo cero .....	63
8.3.1 Parámetros fisicoquímicos.....	63
8.3.2 Efecto del proceso de pasteurización .....	67
8.4 Evaluación de la bebida funcional mixta durante su almacenamiento.....	68
8.4.1 Parámetros fisicoquímicos.....	68
8.4.2 Carga microbiana .....	73
8.4.3 Evaluación sensorial.....	75
8.4.4 Contenido de polifenoles totales y actividad antioxidante .....	78
8.4.5 Actividad contra el VSRh .....	82
9. CONCLUSIONES .....	87
10. PERSPECTIVAS .....	88
11. REFERENCIAS .....	89
12. ANEXOS.....	97

## ÍNDICE DE FIGURAS

2.1.	Partes del fruto de <i>Punica grantum</i> .	6
2.2.	Extracción sólido-líquido.	6
2.3.	Esquema del fenómeno de cavitación por ultrasonido.	7
2.4.	Ruta metabólica del ácido shiquímico.	8
2.5.	Fundamento de la reacción de los polifenoles en presencia del reactivo e Folin-Ciocalteu.	9
2.6.	Estructura del virus sincitial respiratorio.	12
2.7.	Ciclo replicativo del virus sincitial respiratorio.	13
2.8.	Formación de sincitios del VSRh.	14
2.9.	Clasificación de las bebidas no alcohólicas.	18
2.10.	Diagramas de flujo del proceso de elaboración de zumos y néctares (a) y de bebidas refrescantes no alcohólicas (b).	19
2.11.	Sistema de color CIEL*a*b* y diagrama de cromaticidad.	35
3.1.	Bebidas mixtas de guayaba-naranja de venta en tiendas departamentales en México.	38
8.1.	Límites mínimos (línea azul) y máximos (línea roja) establecidos en las normas nacionales e internacionales para bebidas no alcohólicas o mixtas.	70
8.2.	Atributos de la evaluación sensorial de la BFM durante su almacenamiento a 4 °C.	76
8.3.	Gráfico comparativo entre el CPT (■) y la AA (●) de la BFM, registrados durante 6 meses de almacenamiento a 4 °C.	79
8.4.	Gráfico comparativo entre el CPT y la AA construido a partir de los datos reportados por Castro-López et al. (2016).	81
8.5.	Correlación entre el contenido de polifenoles totales y la actividad antioxidante de la BFM.	82
8.6.	Ensayo de citotoxicidad de células HEp-2 (%) frente a la bebida funcional mixta.	83
8.7.	Efecto de la BFM determinado por ensayo de unión del VSRh a las células HEp-2.	84

8.8	Fotografías de: sincitio sin tratamiento (A) y con tratamiento (B), así como, sus múltiples núcleos (insertos).	85
A1	Formato utilizado por los evaluadores para el análisis sensorial de la bebida funcional mixta.	98
A2.1	Preparación y colocación de las muestras de la BFM en una placa de 96 pozos para obtener las diluciones para el ensayo de citotoxicidad celular.	99
A2.2	Ensayo de citotoxicidad de la BFM y sus diluciones seriadas (1:5, 1:10, 1:100 y 1:1000) en una placa de 96 pozos con células Hep-2 confluentes.	99
A2.3	Preparación de diluciones seriadas de la solución de VSRh en una placa de 96 pozos.	100
A2.4	Ensayos de unión en placa de 96 pozos con monocapa confluyente de células HEp-2 con BFM muestreada en los distintos tiempos de almacenamiento a 4 °C.	100
A3.1	Distribución de frecuencia de respuesta para la prueba de apariencia general en relación con los nueve puntos de la escala hedónica.	103
A3.2	Distribución de frecuencia de respuesta para la prueba de color en relación con los nueve puntos de la escala hedónica.	104
A3.3	Distribución de frecuencia de respuesta para la prueba de olor en relación con los nueve puntos de la escala hedónica.	105
A3.4	Distribución de frecuencia de respuesta para la prueba de sabor en relación con los nueve puntos de la escala hedónica.	106
A3.5	Ensayo de citotoxicidad de células HEp-2 (%) frente a la bebida funcional mixta.	108

## ÍNDICE DE TABLAS

2.1.	Normas nacionales e internacionales para bebidas no alcohólicas	28
2.1.	Continuación...	29
2.2.	Límites fisicoquímicos establecidos en normas para bebidas no alcohólicas o mixtas.	32
2.3.	Límites microbiológicos máximos permitidos para bebidas no alcohólicas.	33
7.1.	Calendarización de los análisis a la bebida funcional mixta durante los 6 meses de su almacenamiento a 4°C.	44
7.2	Análisis microbiológicos	50
8.1	Índice de madurez del fruto de <i>P. granatum</i>	60
8.2	CPT de las extracciones sucesivas del polvo de cáscara de granada de Oaxaca	61
8.3	Parámetros fisicoquímicos de la bebida funcional mixta al tiempo cero	64
8.4	Parámetros fisicoquímicos de bebidas mixtas o con extracto natural	65
8.5	Efecto de la adición del extracto de cáscara de granada en los parámetros de color instrumental de las bebidas mixta y funcional mixta	66
8.6	Parámetros fisicoquímicos de bebidas a base de zumos y/o extractos naturales	67
8.7	Efecto del proceso de pasteurización en los °Brix y acidez titulable, CPT y AA de la BFM	68
8.8	Valores de pH y acidez titulable de bebidas funcionales y/o mixtas durante el almacenamiento	71
8.9	Evaluación de la calidad microbiológica durante el almacenamiento de diferentes bebidas mixtas o adicionadas con un extracto natural	74
8.10	Porcentaje de los comentarios positivos y negativos obtenidos mediante la evaluación sensorial de la BFM	77
8.11	Composición de las bebidas mixtas comerciales	80
8.12	Diferencia en el tamaño de los sincitios con y sin tratamiento	86
A1	Escala hedónica utilizada en la evaluación sensorial de la bebida funcional mixta.	97
A3.1	Parámetros fisicoquímicos durante el almacenamiento a 4 °C de la bebida funcional de naranja-guayaba adicionada con extracto de cáscara de granada	101

A3.2	Atributos de la evaluación sensorial de la BFM durante su almacenamiento a 4 °C	102
A3.3	Contenido de polifenoles totales y actividad antioxidante de la BFM durante su almacenamiento a 4 °C	107
A3.4	Viabilidad celular (%). Cinéticas de incubación de diluciones seriadas de la BFM a diferentes tiempos de almacenamiento a 4 °C	109
A3.4	Continuación...	110
A3.5	Efecto de la BFM en la infectividad del VSRh expresado en porcentaje de infectividad	111

## SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético, por sus siglas en inglés.
HEPES	Ácido 4-(2-Hidroxietil)piperazin-1-etanosulfónico, por sus siglas en inglés
AA	Actividad antioxidante
AG	Ácido gálico
BFM	Bebida funcional mixta
BFMS	Bebida funcional mixta seca
BM	Bebida mixta
$\Delta E$	Cambio de color total
C*	Croma
CN	Concentrado de naranja
CPT	Contenido de polifenoles totales
TCID <sub>50</sub>	Dosis de infección en el cultivo de tejido en la mitad de la población, por sus siglas en inglés
EAG	Equivalentes de ácido gálico
ECG	Extracto de cáscara de granada
EAU	Extracción asistida por ultrasonido
EEPPG	Extracto etanólico acuoso obtenido a partir de polvo de cáscara de <i>Punica granatum</i>
P	Gramos de las cenizas
h°	Tono o matiz
HEp-2	Línea celular de epitelio respiratorio humano provenientes de carcinoma de laringe, por sus siglas en inglés
BI	Índice de oscurecimiento, por sus siglas en inglés
IM	Índice de madurez
NG	Néctar de guayaba
NR	No reportado
NMP	Número más probable
PCGO	Polvo de cáscara de granada Oaxaca
PG	Puré de guayaba
ppm	Partes por millón
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
DPPH'	Radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo
rpm	Revoluciones por minuto
ST	Sólidos totales
PBS	Solución amortiguadora de fosfato
SFB	Suero fetal bovino
UFC	Unidades formadoras de colonias
VSRh	Virus sincitial respiratorio humano

# 1. INTRODUCCIÓN

Los alimentos funcionales en México alcanzaron ventas de US\$6,716 millones en el 2017 (Énfasis alimentación on line, 2018), y a nivel internacional las bebidas funcionales tienen alta demanda en el mercado debido a sus características de calidad, practicidad, uso de materias primas frescas o poco procesadas y que suelen tener evidencia científica del beneficio en la salud del consumidor. Las categorías de estas bebidas son: 1) a base de lácteos, 2) de vegetales y frutas, 3) deportiva y energética (Corbo et al., 2014). Para el desarrollo de bebidas funcionales del tipo 2 se utilizan frutas y/o verduras como fuentes de compuestos bioactivos para conferirles las actividades biológicas a dichos productos. Por ejemplo, al fruto de *P. granatum* se le han conferido propiedades: antioxidante, anticarcinogénica, antiinflamatoria, antidiabética y cardioprotectora, asociadas a su contenido de biocompuestos (Yilmaz-Akyuz et al., 2019). Es importante resaltar que los residuos agroindustriales también son una fuente de biocompuestos de gran importancia para el desarrollo de alimentos funcionales debido a las más de 20 ton/año que se generan de residuos sólidos (Centro Mario Molina, 2016). Se ha demostrado que, aunque los compuestos bioactivos de manera individual poseen propiedades biológicas en conjunto suelen dar mejores resultados (Puiggròs et al., 2017), lo que se conoce como interacción sinérgica positiva entre este tipo de compuestos (Freeman et al., 2010).

Por otro lado, para los alimentos en general es importante estudiar su estabilidad en condiciones de almacenamiento definidas para poder establecer el tiempo que permanecen seguros, conservan sus características fisicoquímicas, microbiológicas, sensoriales y funcionales deseadas, tomando como base los parámetros de calidad y valores aceptables de estos que establecen las leyes gubernamentales, los competidores y/o los consumidores (Phimolsiripol y Suppakul, 2016). Adicionalmente, los resultados permiten identificar el o los

parámetros críticos de calidad del producto en las condiciones de almacenamiento determinadas. Una prueba de estabilidad de un producto durante su almacenamiento es la del “tipo estática” en la cual las condiciones ambientales deben ser lo más cercanas o iguales a las reales, por lo que se suele requerir más tiempo para que se observen cambios en la propiedades del alimento lo que incrementa el costo del estudio de estabilidad (Phimolsiripol y Suppakul, 2016). Una vez que se definen el tipo de prueba y las condiciones de almacenamiento, se lleva a cabo un monitoreo a lo largo del período de tiempo con el registro de seis hasta ocho puntos de muestreo y con cambios en la calidad del producto entre el 30 y 50 % con respecto al tiempo cero, para que el deterioro de este sea representativo del periodo de almacenamiento (Phimolsiripol y Suppakul, 2016). Respecto a la concentración de biocompuestos se puede tomar como parámetro crítico de calidad cuando la degradación de estos sea mayor al 50 %, lo que puede resultar en una pérdida significativa en las propiedades funcionales del alimento (Khasanov y Matveeva, 2020).

El presente trabajo de tesis tiene como precedente resultados que se obtuvieron en el proyecto financiado por el CONACyT (215144) que fue aprobado en la convocatoria Proyecto de Desarrollo Científico para Atender Problemas Nacionales 2013, en el cual un objetivo fue desarrollar una bebida funcional mixta (BFM) adicionada con extracto etanólico acuoso obtenido a partir de polvo de cáscara de *Punica granatum* (EPPG), para conferirle actividad antioxidante (AA) y contra el virus sincitial respiratorio humano (VSRh) que es un agente causal de las infecciones respiratorias agudas en México principalmente en menores de cinco años (Moreno-Espinoza, 2020). Se demostró que el extracto etanólico acuoso de cáscara de granada tiene actividades antioxidante y antiviral en la etapa de unión del VSRh a las células HEp-2 (Asprón-Moncada et al., 2014), así como, que una bebida mixta presenta también estas propiedades biológicas cuando se le adiciona dicho extracto

(López-Hernández, 2017). Es importante mencionar que a la fecha la bebida funcional mixta cuenta con una solicitud de patente MX/a/2017/007342 (González Mondragón et al., 2017).

Con base a lo anterior, en el presente trabajo de tesis se evaluó la estabilidad de la bebida funcional mixta almacenada a 4 °C durante 6 meses, debido a que es muy importante tener esta información porque es un alimento. Se realizaron análisis fisicoquímicos y microbiológicos con base a lo establecido en normas nacionales e internacionales para bebidas no alcohólicas y/o mixtas; también se llevó a cabo una prueba sensorial de nivel de agrado mediante una escala hedónica de 9 puntos. Adicionalmente, se monitoreó el contenido de polifenoles totales, así como las actividades antioxidante y contra el virus sincitial respiratorio humano en la etapa de unión.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Residuos agroindustriales

La agroindustria alimentaria es la actividad económica en la cual materias primas que provienen de la agricultura o la ganadería son transformadas, o no, a un producto final mediante distintas operaciones que se llevan a cabo de forma secuencial (tratamiento post-cosecha, procesamiento y empaçado), con la finalidad de incrementar su estabilidad durante el almacenamiento y distribución principalmente de las materias primas perecederas, suscitando de este modo su disponibilidad en diferentes épocas del año (Fideicomiso de riesgo compartido [FIRCO], 2017).

Es común que durante el procesado de la materia prima se retire algún producto en una o varias etapas de este, con un menor o mayor grado de transformación de su estado inicial y, por lo tanto, ya no forma parte del producto final. Un residuo agroindustrial es entonces el producto que se retira de alguna etapa del proceso de producción y requiere un tratamiento adicional para su uso posterior, en el caso contrario (se usa tal cual se retira del proceso) se denomina subproducto.

“Por ejemplo: en la industria cervecera, tras la filtración del mosto, se genera el llamado bagazo (es decir, las maltas agotadas tras el proceso de maceración del mosto, que contienen un contenido importante de fibra, así como de proteínas y otros componentes). Un destino muy habitual de los bagazos es la alimentación animal. Si esto es así, el bagazo sería un subproducto. Si no es así, y el bagazo no tuviera una utilización inmediata después de su generación, se trataría de un residuo.” (Arozaneda, 2015).

La industria agropecuaria genera anualmente residuos sólidos (28 millones de toneladas) y líquidos o efluentes (93 millones de metros cúbicos); por ejemplo, la elaboración de conservas, vino y sidra suelen generar cáscara, semillas, corazones,

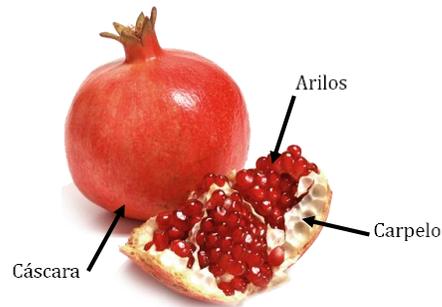
hollejos de uva, así como, cáscara, pulpa y corazones de manzana, respectivamente, y en todos los casos aguas residuales (Centro Mario Molina, 2016). Su deposición contribuye al impacto negativo del medio ambiente de manera importante. Sin embargo, la importancia que tiene este tipo de residuos radica en su alto contenido de biocompuestos (fibra, polifenoles, ácidos grasos, etc.) que puede llegar a superar la concentración presente en la pulpa (Berdeja et al., 2018), y se conservan durante el procesamiento al que son sometidas las frutas o verduras por su fuerte interacción con la fibra (Arias et al., 2018) o la pared celular como es el caso del ácido ferúlico.

Por lo tanto, dichos residuos pueden usarse como materia prima para generar un producto de interés comercial y/o social de mayor valor agregado (Mejías-Brizuela et al., 2016), contribuyendo de este modo a la disminución de la contaminación ambiental originada por estos y garantizando el suministro de materia prima de bajo o nulo costo (con base a los millones de ton/año que se generan de residuos). El uso de las cáscaras de: plátano, jícama, tuna, mango, piña, manzana, zanahoria, el albedo de toronja y hojas secas de maguey, se evaluaron como posible fuente de fibra para productos cárnicos (Chávez-Zepeda et al., 2009).

### **2.1.1 *Punica granatum***

El fruto de granada se consume en fresco y se utiliza como materia prima en la industria alimentaria (jugos, jaleas y nutraceuticos) y cosmética. En el año 2019 el estado de Oaxaca, México, ocupó el tercer lugar de producción de granada (1,298 ton) cuyo valor es 16 millones de pesos (Bastida Cañada, 2020); la producción de este fruto a nivel nacional se ha duplicado en la última década y Oaxaca siempre se ha posicionado dentro de los principales productores (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera [SIAP], 2021). Considerando que la cáscara del fruto de *P. granatum* (Figura 2.1) representa del 38-50 % del peso total del fruto (Aguilar et al., 2008, como se citó en Gómez-Castillo, 2018; Berdeja

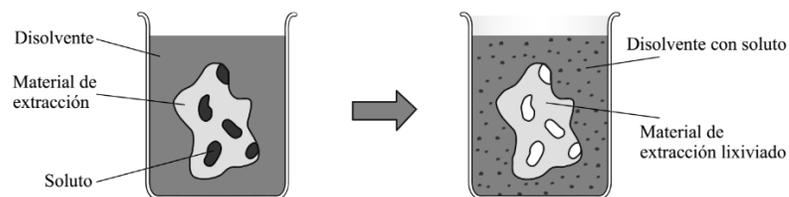
et al., 2018), se generaron 493-649 ton de dicho residuo. Lo anterior motivó al grupo de trabajo para el aprovechamiento de la cáscara (pericarpio) y carpelo de la granada para el desarrollo de un alimento.



**Figura 2.1.** Partes del fruto de *Punica granatum*.

## 2.2 Extracción de biocompuestos

El principio de la extracción sólido-líquido es la separación de uno o más solutos de interés presente en una fase sólida mediante el contacto con una fase líquida o disolvente (Figura 2.2) en la cual el soluto se distribuye hasta alcanzar el equilibrio (McCabe, 2007). Los factores que participan en este tipo de extracción son: tamaño de partícula, tipo de disolvente, proporción sólido/disolvente, tiempo, temperatura, agitación y velocidad de agitación (Geankoplis, 2009).

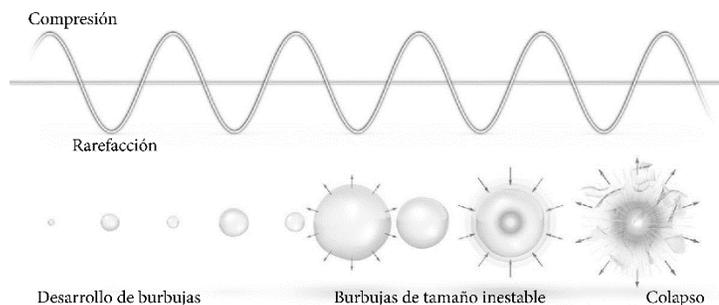


**Figura 2.2.** Extracción sólido-líquido (Modificado de Gunt Hamburg Company, 2017).

Para la recuperación de los biocompuestos a partir de material vegetal se utilizan métodos de extracción convencionales (soxhlet, hidrodestilación, maceración y lixiviación) y no convencionales como la extracción asistida por ultrasonido cuyas ventajas son que se reducen el uso de disolventes y tiempo del proceso, se incrementa el rendimiento y la calidad de los extractos (Azmir et al., 2013).

### 2.2.1 Extracción asistida por ultrasonido (EAU)

La EAU se basa en el fenómeno de cavitación donde las ondas de ultrasonido con una frecuencia entre 20-100 kHz, atraviesan el medio líquido creando ciclos fluctuantes de presión alta (compresión) y baja (expansión), dando lugar a la formación, crecimiento y colapso de burbujas (Figura 2.3).

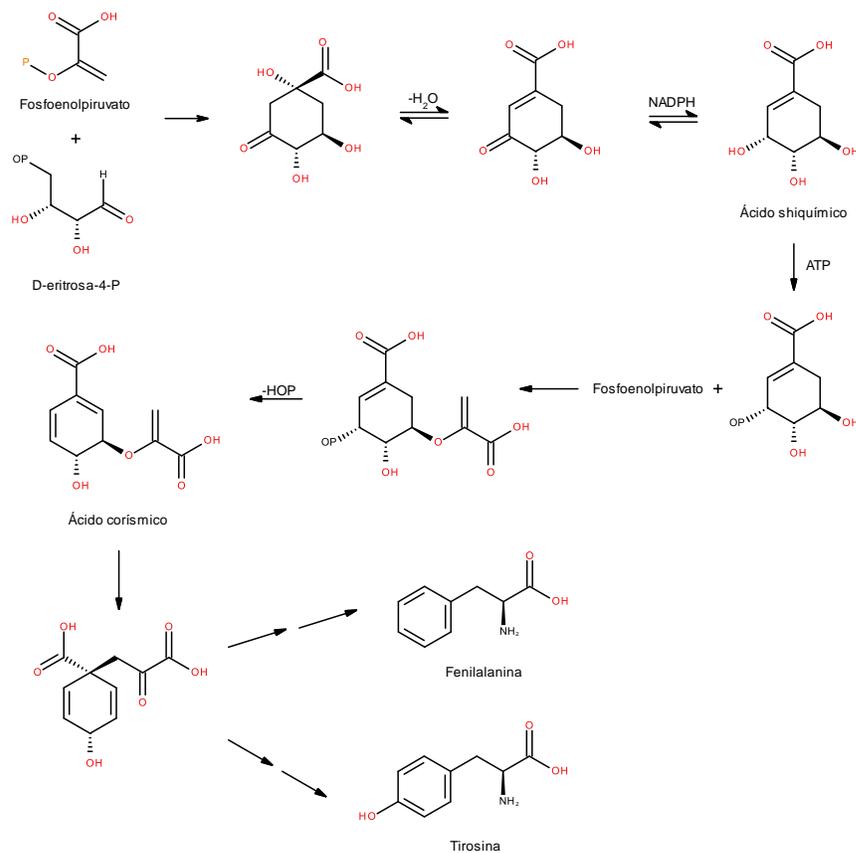


**Figura 2.3.** Esquema del fenómeno de cavitación por ultrasonido (Modificado de EcosphereTechnologies, Inc., 2017)

Se produce una gran cantidad de energía calorífica por la energía cinética del movimiento de las moléculas, lo que provoca una presión localizada capaz de romper los tejidos vegetales y de este modo se acelera la liberación de los compuestos intracelulares hacia el disolvente (Knorr et al., 2002).

## 2.3 Polifenoles

Son compuestos que poseen como estructura base un anillo aromático con uno o más hidroxilo y grupos sustituyentes como ésteres, metil ésteres, glicósidos, etc. (Balasundram et al., 2006). En las plantas (fitoquímicos) son metabolitos secundarios que se producen principalmente por la ruta del ácido shiquímico (Figura 2.4) donde se sintetizan los ácidos cinámicos y sus derivados (fenoles, ácidos fenólicos, cumarinas, lignanos y derivados del fenilpropano) a partir de compuestos que provienen de las rutas de la glucólisis (fosfoenolpiruvato) y de las pentosas fosfato (D-eritrosa-4-fosfato) (Quiñones et al., 2012).



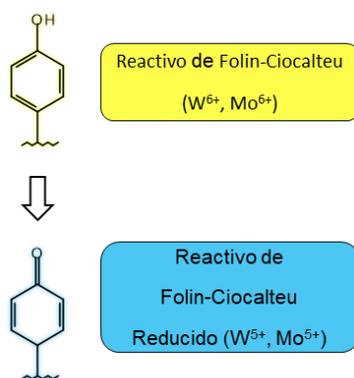
**Figura 2.4.** Ruta metabólica del ácido shiquímico (Dewick, 2002).

Los polifenoles se producen como mecanismos de defensa en situaciones de estrés hídrico, por radiación ultravioleta, ataque de microorganismos o herbívoros (Quiñones et

al., 2012), además, confieren color para atraer a insectos polinizadores (Cutrim y Sloboda-Cortez, 2018; Williamson, 2017). Con base a su estructura química se clasifican en: ácidos fenólicos, estilbenos, lignanos y flavonoides, dentro de este grupo se encuentran las antocianinas, chalconas, flavanoles, flavanonas, flavonoles, taninos condensados y otros flavonoides (Bohn, 2014).

### 2.3.1 Contenido de polifenoles totales

La cuantificación de los polifenoles presentes en los alimentos y/o residuos de estos, es importante debido a que depende de su concentración el efecto en la patología a la que están dirigidos. En este sentido, existen diversos métodos espectrofotométricos para determinar el contenido de polifenoles totales y el de Folin-Ciocalteu (mezcla de tungstato y molibdato de sodio en medio básico) es el más recurrente por su simplicidad y confiabilidad. El fundamento es que los fenoles son fácilmente oxidables en medio básico y reaccionan con el molibdato formando óxido de molibdeno ( $\text{MoO}_3$ ), entonces la solución pasa de coloración amarilla a azul (Figura 2.5) cuyo máximo de absorbancia es a 765 nm (Agbor et al., 2014) y es proporcional a la concentración de los compuestos polifenólicos presentes. El CPT se expresa en mg de equivalentes de ácido gálico (EAG).



**Figura 2.5.** Fundamento de la reacción de los polifenoles en presencia del reactivo e Folin-Ciocalteu.

### **2.3.2 Polifenoles en *Punica granatum***

La cáscara de *P. granatum* contiene compuestos polifenólicos donde predominan los taninos hidrolizables como la punicalina, pedunculagina y punicalagina, además, el 30 % aprox. de las antocianidinas presentes en la granada se concentran en esta parte del fruto (Berdeja et al., 2018; Carbonell-Barrachina y Cano-Lamadrid, 2017). Gómez-Castillo (2018) en extractos de cáscara de granada que se obtuvieron a partir de frutos de *P. granatum* cultivados en Oaxaca, México, reporta la presencia de compuestos polifenólicos del grupo de los ácidos fenólicos, flavonoides, lignanos y taninos. Utilizó un UPLCQToF e identificó 47 compuestos reportados en cáscara de granada por otros autores, además de un hexóxido de floretina que únicamente ha sido reportado en el jugo de granada (Mena et al., 2012); y tentativamente otro compuesto que no ha sido reportado en este fruto hasta el momento (Foo y Karchesy, 1989). El autor mencionó que la cáscara de *P. granatum* cultivada en Oaxaca tuvo un mayor número de compuestos polifenólicos en comparación con el fruto del estado de Guanajuato. Por otro lado, se sabe que la concentración y tipo de compuestos polifenólicos presentes en el material vegetal está determinado por el clima y suelo del origen de estos (Romeo et al., 2015).

### **2.3.3 Actividades biológicas de los polifenoles**

Diversos estudios respaldan el hecho de que los polifenoles poseen actividades biológicas tales como actividad estrogénica (isoflavonas, los lignanos y el estilbeno como el resveratrol); protectora sobre las proteínas LDL, acción quelante, acción termogénica y acción anticancerígena, dichas actividades contribuyen a la prevención o tratamiento de enfermedades como la arteriosclerosis, cáncer, algunas enfermedades neurodegenerativas y respiratorias (Salido y Fernández, 2005; Tomás-Barberán, 2003). En el presente trabajo las actividades de interés son las propiedades antioxidante y antiviral que se detallan a continuación.

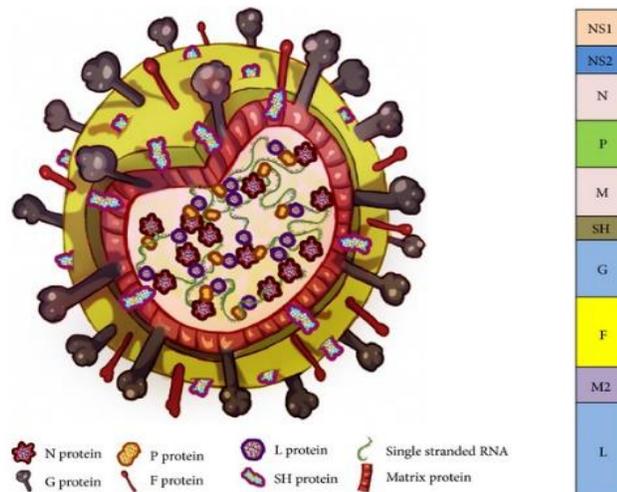
### **2.3.3.1 Actividad antioxidante**

La actividad antioxidante es una de las principales propiedades biológicas que se les confieren a los polifenoles, revierten situaciones de estrés oxidativo (desbalance entre antioxidantes y las especies oxidantes). Estas últimas se producen como respuesta a estímulos exógenos (fumar, irradiación UV, contaminación ambiental, etc.) y endógenos (respiración y óxidos de nitrógeno). Es importante contrarrestar el estrés oxidativo porque juega un papel fundamental en procesos como el envejecimiento prematuro, cáncer, enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas (Bayliak et al., 2017). La célula disminuye el efecto dañino de estos oxidantes por medio de las enzimas superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y catalasa.

Por otro lado, se tiene reportes de una correlación positiva fuerte entre el contenido de polifenoles totales de alimentos naturales o procesados y la actividad antioxidante, aunque no solo depende de estos sino también de otros factores que aún no están bien definidos (Mesa-Vanegas et al., 2021; Padilla et al., 2008; Ramírez et al., 2016; Vega et al., 2017). En el zumo de granada las punicalaginas presentan una mayor actividad antioxidante (50 % aprox.) seguida de otros taninos hidrolizables (33 %) y el 3 % al ácido elágico (García-Viguera y Pérez Vicente, 2004).

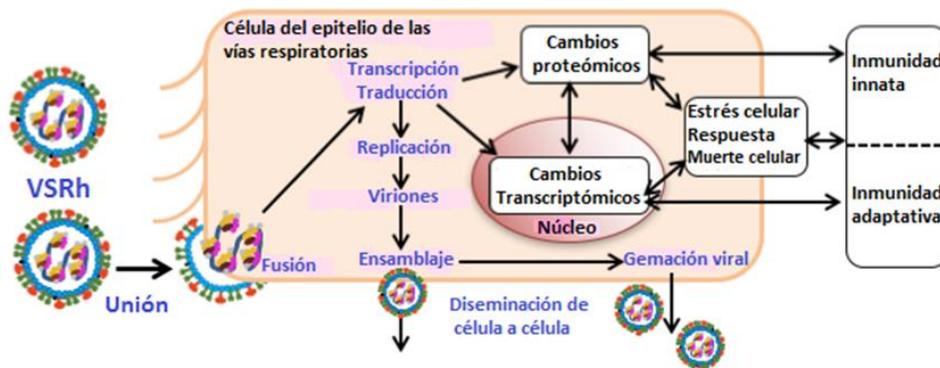
### **2.3.3.2 Actividad antiviral contra el virus sincitial respiratorio humano**

El virus sincitial respiratorio humano (VSRh) pertenece a la familia Paramyxoviridae género Pneumovirus, orden de los mononegavirales (que tienen un genoma de ARN no segmentado, de sentido negativo). Es un virus que tiene una envoltura exterior (virus envuelto) de 130-300 nm de diámetro, posee once proteínas de las cuales siete son estructurales (G, F, SH, M, P, N y L) y el resto no estructurales (NS1, NS2, M1, M2) (Figura 2.6).



**Figura 2.6.** Estructura del virus sincitial respiratorio. Tomado de Bawage et al. (2013).

El ciclo replicativo del VSRh inicia con la entrada de este al tracto respiratorio con las subsecuentes etapas descritas a continuación de manera puntual (Figura 2.7): **1)** Unión del virus a la superficie de la célula del epitelio mediante la proteína G, enseguida entra el virus por fusión mediante la proteína F e inserta su envoltura viral en la membrana de la célula huésped, en condiciones de pH neutro. **2)** Transcripción y replicación viral de un nuevo genoma de ARN (-); las copias genómicas del ARN viral sintetizadas se ensamblan progresivamente en viriones. **3)** Ensamblaje y gemación viral (salida); a través de varios mecanismos se ensamblan complejos de glicoproteínas y las proteínas de la nucleocápside fuertemente unidas al genoma del ARN, el virión maduro se separa de la membrana apical y sale de la célula. La diseminación subsiguiente de célula a célula a través de la fusión de las membranas plasmáticas vecinas da como resultado la formación de grandes sincitios y lesiones epiteliales en el tracto respiratorio superior. Esto facilita la propagación del virus a las vías respiratorias inferiores, causando eventualmente los síntomas característicos (Hu et al., 2020).



**Figura 2.7.** Ciclo replicativo del virus sincitial respiratorio. Modificado de Hu et al. (2020).

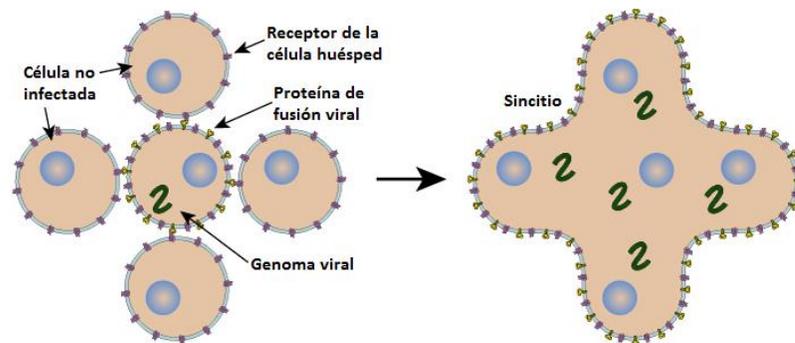
El VSRh es uno de los principales patógenos que causa infecciones del tracto respiratorio en niños pequeños, adultos de la tercera edad y en pacientes inmunocomprometidos, desde infecciones leves hasta bronquiolitis y bronconeumonía, aumentando el factor de riesgo para el desarrollo de asma infantil (García et al., 2018). Se transmite por contacto con secreciones respiratorias, se multiplica en las células epiteliales del tracto respiratorio superior y después de 1 a 3 días se propaga hacia el aparato respiratorio inferior (Corzo-López y Valdés-Ramírez, 2013).

En la inmunoprofilaxis contra este virus se utiliza el palivizumab cuya aplicación está supeditada a cierto rango de edades con ciertas características como prematurez; en México se ha recomendado este biofármaco desde el 2009 debido a la morbilidad y mortalidad asociada al VSRh en nuestro país (García et al., 2018). Por otro lado, Díaz y Avendaño (2017) mencionan que los esfuerzos para el desarrollo de vacunas han dado resultados nulos debido al desconocimiento que impera todavía respecto a los mecanismos responsables de la adquisición de inmunidad contra el VSRh.

Con base a lo anterior, es importante la propuesta de la BFM como auxiliar en la prevención de infecciones asociadas a este virus resaltando aspectos tales como la mayor

preferencia de los consumidores por una bebida en lugar de tener que administrarse un medicamento, se da un valor agregado a un residuo agroindustrial, su formulación es a base de zumos naturales de mayor demanda en bebidas y su precio aproximado sería de \$23.00/L, con base a las proyecciones de un estudio de mercado realizado por colaboradores de este grupo de trabajo (Naar, 2017).

Respecto a la línea celular HEp-2 (de epitelio humano de carcinoma de laringe), es idónea para estudiar al VSRh, porque simula a las células de las vías respiratorias. El efecto citopático que se observa es la formación de sincitios o unidades formadoras de placa (UFP) por la fusión de las membranas celulares asociadas a la infección por el VSRh. Los sincitios se observan como células gigantes multinucleadas (Figura 2.8).



**Figura 2.8.** Formación de sincitios del VSRh. Modificado de Instituto Suizo de bioinformática [SIB], (s.f.)

Existen investigaciones referentes al uso de extractos de *P. granatum* con actividad contra virus diferentes al VSRh, además, no se ha incorporado a ningún alimento. Por ejemplo, la patente WO2009/032887 A1 (Clymer & Rennie, 2009), divulga de forma explícita un método de tratamiento y prevención de una infección de las vías respiratorias administrando al sujeto de ensayo una composición de 450 a 500,000 UI de colecalciferol. Se ejemplifica la combinación de dicho compuesto con extracto de granada y excipientes, pero están ausente los zumos de naranja y de guayaba. Sin embargo, no indica la parte

que utilizaron del fruto de la granada, ni la preparación del extracto. En resumen, la patente utiliza al colecalciferol como principio activo para proporcionar alivio de los síntomas de infecciones del tracto respiratorio, el cual no se puede sustituir por algún otro agente de los que refiere como “componentes adicionales” y no divulga ni sugiere utilizar un extracto de granada como sustancia antiviral contra el virus sincitial respiratorio humano, tampoco el uso del jugo de *Citrus sinensis* y *Psidium guajava*. De igual modo, Peña Núñez (2008) expuso la actividad antiviral de un extracto hidroalcohólico liofilizado del fruto completo de *Punica granatum* L. contra el virus de la influenza. Morffi Figueroa et al. (2006) reportó también la actividad antiviral de un extracto hidroalcohólico del fruto completo de *Punica granatum* L. (BLBu), y utilizaron ratones de la línea Balb/c como modelo experimental de gripe.

#### **2.4 Bebidas funcionales**

Los alimentos funcionales surgieron en Japón a mediados de la década de los años 80s, su definición presenta algunas ambigüedades por la falta de un acuerdo a nivel internacional para este tipo de productos lo que es complicado debido a que en la mayoría de los países no existen un departamento ni una legislación específica para los alimentos funcionales, por ejemplo, en México los regula la Secretaría de Salud (SSA) y se maneja el término de alimentos fortificados/funcionales (se les agregaron biocompuestos) y naturalmente saludables.

Un alimento funcional se suele definir como un alimento natural o procesado que posee determinado tipo de biocompuestos a una concentración definida, además de nutrir tiene un efecto preventivo o correctivo dirigido hacia una patología en específico del consumidor (Valenzuela et al., 2014). En los alimentos funcionales procesados se pueden eliminar componentes dañinos para la salud, fortificarlos añadiendo componentes que de manera natural no contiene y se enriquecen cuando se agregan componentes que contiene de

manera natural pero que pueden disminuir durante el procesado industrial; otra característica es que no tienen presentación de pastillas o píldoras. Comercialmente se les nombra también como súper alimentos (superfood) y les confieren propiedades beneficiosas para la salud que no siempre están basadas en estudios científicos; un súper alimento es la chía de la que mencionan que cuentan con una gran cantidad de compuestos que le dan la propiedad de prevenir varias enfermedades.

La importancia de estos alimentos se debe a que en la actualidad los consumidores demandan productos de calidad que proporcionen placer al consumirlos (texturas y sabor (hedónico)), saludables debido a que quieren llevar una vida sana, el incremento de una población que envejece, demanda productos de conveniencia (practicidad) porque son consumidores ocupados y exigentes en su alimentación (alimentos frescos o poco procesados), aumento de la evidencia del beneficio de los alimentos funcionales en la salud, alimentos sin conservadores y/o aditivos con doble función (tecnológico y en la salud). Un beneficio económico asociado al consumo de los alimentos funcionales es la reducción del gasto en la prevención o tratamiento de enfermedades debido a que este tipo de alimentos suelen ser más baratos que un medicamento (Ferreira y Luengo, 2007).

En México del 2012 al 2017 las ventas de alimentos funcionales se incrementaron del 26.3 al 38 %, representando una derrama de US\$6,716 millones en el 2017 (Énfasis alimentación on line, 2018). Respecto a las bebidas funcionales tienen una gran demanda porque suelen estar listas para su consumo lo cual es una característica que buscan los consumidores en un alimento como ya se mencionó; en el 2014 representó el 59 % de las ventas en el mercado de los alimentos funcionales en los Estados Unidos. Las tres principales categorías de bebidas funcionales son: 1) a base de lácteos, 2) de vegetales y frutas, 3) deportiva y energética (Corbo et al., 2014). En la formulación de bebidas funcionales se pueden incluir frutas y verduras como fuentes de compuestos bioactivos, como los de la granada que han sido estudiados por sus actividades antioxidante,

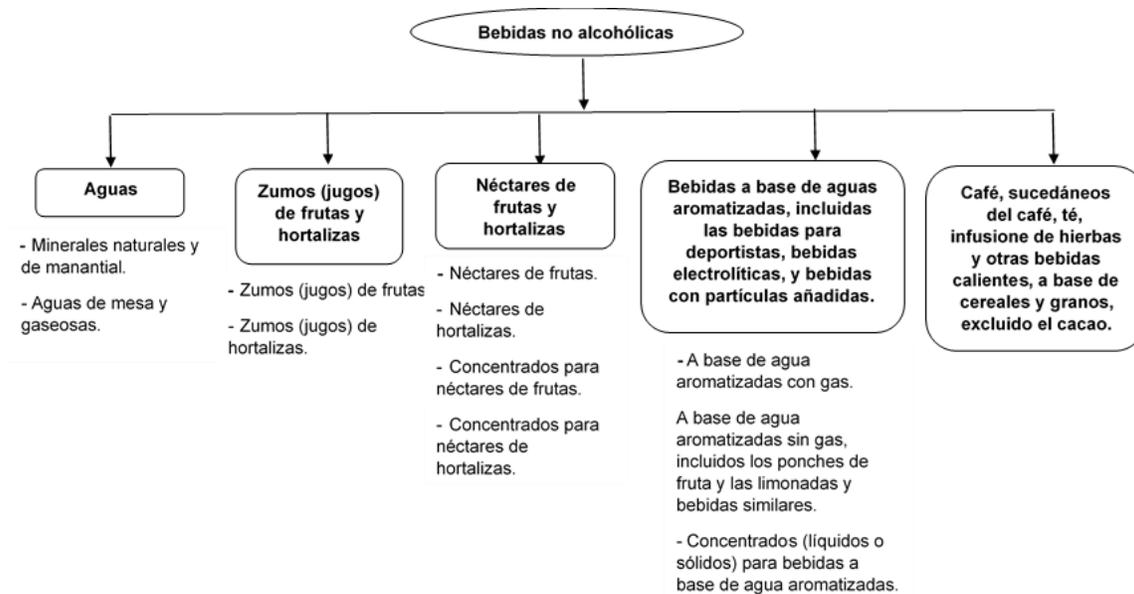
anticancerígena, antiinflamatoria, antidiabética y cardioprotectora (Yilmaz-Akyuz et al., 2019).

Empresas y grupos de investigación trabajan de manera conjunta para identificar y evaluar compuestos bioactivos con actividades biológicas en el organismo del consumidor, lo que implica la caracterización de matrices alimentarias, extracción de sus compuestos bioactivos, evaluación in vitro e in vivo de su bioactividad utilizando líneas celulares y modelos animales y, finalmente, la validación de los resultados mediante estudios en humanos (Puiggròs et al., 2017). Además, se ha demostrado que, aunque los compuestos bioactivos ejercen actividades beneficiosas por sí mismos, su combinación puede incrementarlas (Puiggròs et al., 2017).

Ogundele et al. (2016) expusieron un efecto sinérgico positivo en la actividad antioxidante de bebidas funcionales diseñadas con mezcla de dos o más jugos de frutas (naranja, piña, limón o zanahoria) y un extracto de *Hibisco sabdariffa* (rosa o flor de jamaica). Unas bebidas funcionales a base de limón y bayas de acai, maqui y espinillo negro presentaron un elevado contenido de polifenoles totales y una actividad antioxidante por arriba del 80 % (Gironés-Vilaplana et al., 2013). Como ya se mencionó, los residuos agroindustriales son una fuente de biocompuestos de gran importancia para el desarrollo de bebidas funcionales en este caso. Amofa-Diatuo et al. (2016) utilizaron residuos de la coliflor para obtener extractos que son adicionados a una bebida de zumo de manzana.

## **2.5 Proceso de elaboración de una bebida no alcohólica**

Las bebidas no alcohólicas se definen como aquellas que además de agua potable pueden contener como máximo un 2 % de alcohol etílico, edulcorantes, saborizantes, dióxido de carbono, jugos, pulpas de frutas, verduras o legumbres y otros aditivos autorizados por la SSA (NMX-F-439-1983); dependiendo de su composición, se clasifican en 5 grupos de acuerdo con lo establecido en el CODEX STAN 192-1995 (Figura 2.9).



**Figura 2.9.** Clasificación de las bebidas no alcohólicas. Elaboración propia con los conceptos del CODEX STAN 192-1995.

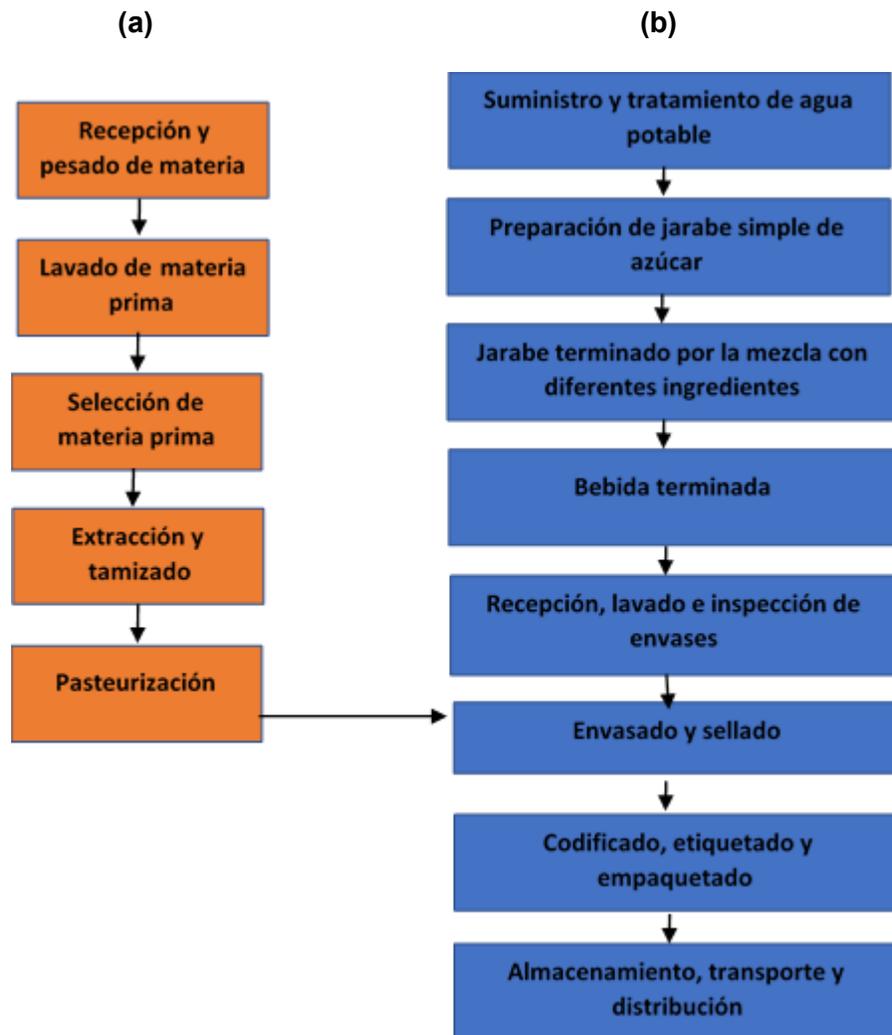
El presente trabajo de tesis concierne a las bebidas no alcohólicas a base de pulpas de fruta y al respecto en el PROY-NOM-173-SE-2020 se exponen las siguientes definiciones:

*Jugo.* Es el producto líquido sin fermentar, pero fermentable, obtenido al exprimir vegetales o frutas u hortalizas o verduras en buen estado, debidamente maduras y frescas o que se han mantenido en buen estado por procedimientos adecuados, clarificado o no, y sometido al tratamiento adecuado que asegura su conservación en el envase.

*Jugos mixtos.* Es aquel jugo que puede elaborarse a partir de la mezcla de dos o más jugos y jugos de concentrados de diferentes tipos de vegetales o frutas u hortalizas o verduras.

*Bebidas no alcohólicas con contenido de vegetal o fruta.* Líquidos naturales o transformados que proporcionan al organismo elementos para su nutrición y con menos de 2.0 % (v/v) de alcohol etílico y un porcentaje mayor o igual al 10 % en su composición final de vegetales o frutas o la combinación de estos.

En la figura 2.10 se esquematizan las etapas que integran los procesos para la elaboración de zumos y néctares, así como, de bebidas refrescantes no alcohólicas a nivel industrial.



**Figura 2.10.** Diagramas de flujo del proceso de elaboración de zumos y néctares (a) y de bebidas refrescantes no alcohólicas (b). Elaboración propia con datos de Domínguez Deras (2017).

### **2.5.1 Recepción y pesado de materia prima**

Esta etapa consiste en la adquisición de la materia prima con base a los parámetros de madurez especificados, posterior al ingreso a la planta se realiza el pesado y después se descarga en contenedores para su movilización por bandas transportadoras (Malvais Delgado, 2017). Con respecto a la madurez de las materias primas, se considera un parámetro crítico en la elaboración de bebidas a base de frutas ya que de este depende en gran medida la calidad del producto final y es también un factor muy importante a la hora de estandarizar procesos. Se puede definir de la siguiente manera.

*Madurez fisiológica o punto sazón.* Se alcanza cuando se completa el desarrollo, en este período de maduración las frutas son susceptibles, en condiciones apropiadas, de seguir transformándose y alcanzar la madurez de consumo. En este período las frutas pueden ser cosechadas, pero si el corte se efectúa antes, la maduración se vuelve muy irregular.

*Madurez de consumo.* Estado fisiológico en el cual la fruta presenta las características físicas, químicas y sensoriales apropiadas para ser consumida.

Por otro lado, algunos procesos se basan en el color para determinar la madurez de su materia prima en donde utilizan escalas visuales que indican el desarrollo o porcentaje de cubrimiento con el color deseado de la superficie del fruto o mediante la medición objetiva haciendo uso de colorímetros (NMX-FF-006-1982; Organización de la Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación [FAO], 2003). De igual modo, se suele utilizar el índice de madurez que se calcula a partir de los °Brix y la acidez titulable.

### **2.5.2 Lavado y selección de la materia prima**

La materia prima se moviliza a la línea de lavado a través de bandas transportadoras, donde se elimina la suciedad que haya adquirido en las etapas de recolección y/o transporte. La materia extraña presente se separa y la limpieza se realiza con agua a presión (Domínguez Deras, 2017). La NOM-251-SSA1-2009 y la Comisión Federal para la

Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS, s.f.) describe el proceso de limpieza y desinfección como sigue: remover piedras y tierra de los frutos, tallar la superficie con agua, jabón y estropajo, enjuagar al chorro de agua; sumergirlos durante 10 min en una solución desinfectante (10 gotas de cloro de uso doméstico, yodo o plata coloidal/L agua), enjuagar con agua purificada y escurrir. A continuación, la materia prima mediante bandas transportadoras se lleva al proceso de selección manual, en donde los frutos que presentan daños físicos son retirados y el resto pasa a una máquina seleccionadora por tamaño (Malvais Delgado, 2017). Una fruta sana es aquella que está libre de enfermedades, heridas, pudriciones, daños producidos por insectos u otras plagas, libre de insectos vivos o muertos o sus larvas (NMX-FF-006-1982). Cuando las frutas presentan pérdida de la integridad de sus tejidos, las heridas pueden ser la vía de penetración de hongos y/o bacterias que promueven la pudrición (FAO, 2003), de ahí la importancia de seleccionar frutos completamente sanos.

### **2.5.3 Extracción y tamizado**

El proceso de extracción de las frutas dependerá de las características morfológicas de éstas. Por ejemplo, durante el procesamiento de aquellas que poseen hueso primeramente se utilizan deshuesadoras y seguido se someten a un proceso de tamizado para eliminar la piel; en el proceso de frutos cítricos primero se elimina la corteza, se extrae el zumo y posteriormente se tamiza el producto para eliminar restos de pulpa, piel y corteza (Domínguez Deras, 2017). Las indicaciones descritas en el PROY-NOM-173-SE-2020 son que:

“El jugo debe prepararse mediante procedimientos que mantengan las características físicas, químicas, organolépticas y nutricionales esenciales de vegetales o frutas u hortalizas o verduras del que procede. Se pueden elaborar junto a sus pepitas, semillas y pieles que normalmente no se incorporan al jugo,

aunque pueden ser aceptables algunas partes o componentes de pepitas, semillas y pieles que no puedan eliminarse mediante los procesos físicos industriales convencionales. Este producto puede elaborarse a partir de jugo de vegetales o frutas u hortalizas o verduras congelados o de jugo de vegetales o frutas u hortalizas o verduras concentrados reconstituidos (o en conjunto)”.

#### **2.5.4 Pasteurización**

Para lograr una estabilidad biológica de los alimentos mediante la destrucción o inactivación de microorganismos patógenos y/o sus esporas, se les puede aplicar un tratamiento térmico en el cual el producto se expone a una fuente de calor por un tiempo apropiado, después se realiza un enfriamiento con agua que debe contener cloro a una concentración final de 0.5 mg/kg como mínimo, con lo que se pretende que el producto alcance una temperatura interna aprox. de 40 °C; dicho tratamiento puede realizarse antes o después de que se vierta el producto en envases sanitarios de cierre hermético (NOM-130-SSA1-1995). La pasteurización es un tratamiento térmico que se realiza por debajo de los 100 °C generalmente, y se aplica para la destrucción de microorganismos patógenos e inactivación de enzimas de algunos alimentos líquidos. Los microorganismos patógenos se eliminan de los néctares y zumos mediante un tratamiento térmico a 120 °C por un periodo de 2 s, luego se enfrían usando agua glicolada a -4 °C (Malvais Delgado, 2017), es decir, agua con anticongelante glicol para que esta baje su punto de congelación.

#### **2.5.5 Envasado**

El envase es un recipiente que contiene a un producto y que permite la conservación de sus propiedades físicas, químicas, sanitarias y sensoriales. La normatividad mexicana reglamenta que el envasado de los alimentos sea en recipientes de tipo sanitario de materiales inocuos y resistentes a las distintas etapas del proceso, así como, a las

condiciones habituales del almacenaje, de tal manera que no reaccionen con el producto y que no produzcan sustancias tóxicas ni alteren sus características físicas, químicas y organolépticas. De manera específica, se recomiendan recipientes de cierre hermético para proteger el contenido contra la entrada de microorganismos a fin de garantizar su estabilidad biológica.

Para elegir un envase es importante tomar en cuenta aspectos como el material del que está hecho, el volumen y el proceso de llenado; son factores que conforman el ambiente en el que está inmerso el alimento (Evans, 2011), pueden repercutir en la calidad del producto durante su almacenamiento o conferirle protección contra agentes externos. El uso de vidrio como material de envasado para los alimentos está justificada debido a que este material es impermeable a los gases, vapores y líquidos, es químicamente inerte respecto de los líquidos y los productos alimenticios, es un material higiénico, fácil de lavar y esterilizar, es inodoro, no transmite los gustos ni los altera, resiste presiones elevadas internas propias de ciertos líquidos y posee una resistencia mecánica suficiente para soportar los golpes en las cadenas de empaclado (Domínguez Deras, 2017).

Se permite el uso de envases retornables siempre y cuando su almacenamiento sea en condiciones higiénicas, protegidos de polvo y de materia extraña; que previo a su uso se sometan a una desinfección interna y lavado externo con soluciones desinfectantes, se enjuaguen con agua de consumo humano, se escurran de tal manera que no queden residuos de los desinfectantes que se usaron a fin de garantizar la inocuidad del producto terminado. Los tapones o tapas son nuevos, de material no tóxico y almacenados en condiciones higiénicas libres de polvo y de materia extraña; en el caso de que se lleguen a contaminar se deben lavar y desinfectar con soluciones que no modifiquen, reaccionen o alteren sus características originales (NOM-218-SSA1-2011; NOM-130-SSA1-1995; NOM-086-SSA1-1994; NMX-F-118-1984).

Durante el llenado es importante considerar el espacio libre que se deja en un envase herméticamente cerrado para que su contenido pueda dilatarse durante el tratamiento térmico y que al enfriarse alcance el vacío adecuado, también se evita la contaminación de la superficie de cierre con producto; esta acción se realiza tomando en cuenta la capacidad del envase y pueden excluirse los envases llenados asépticamente los cuales pueden o no tener espacio libre (NOM-130-SSA1-1995). Por otro lado, la masa de capacidad de llenado de un envase se calcula con la cantidad de agua destilada a 20 °C en el envase abierto hasta una distancia de 5 mm abajo del borde inferior del doble cierre, si aplica; en el caso de envases con otro tipo de cierre el contenido del agua debe considerarse hasta el borde superior del envase (NMX-F-314-1977).

El llenado a los recipientes individuales se realiza automáticamente con una máquina llenadora y se cierran mediante tapones, cápsulas o tapas dependiendo de sus características igualmente mediante una máquina de cerrado los envases. Una vez finalizado este proceso, se lleva a cabo una inspección para asegurar que el nivel de llenado es el correcto. En el caso de las bebidas con gas se atemperan para evitar condensaciones debido a que el envasado se realiza a temperatura inferior a la del ambiente, y cuando se trata de bebidas sin gas también se atemperan tras su tratamiento térmico, para evitar el deterioro sensorial del producto por altas temperaturas. En el caso de los zumos y néctares, después de la etapa de pasteurización se puede almacenar temporalmente en un tanque (producto a granel) y los envases se esterilizan para evitar la contaminación del producto.

### **2.5.6 Codificado, etiquetado y empaquetado**

Durante la etapa de etiquetado, los productos se codifican con el número de lote y la fecha de consumo preferente, colocando dicha información sobre el envase, tapa o en la etiqueta, con lo que se asegura su identificación antes de pasar a las máquinas donde se agruparán en cajas, palets u otras presentaciones para su posterior almacenamiento y

distribución (Malvais Delgado, 2017). La etiqueta es todo rótulo, imagen u otra forma descriptiva o gráfica impreso, marcado, grabado y adherido al empaque o envase del producto (NOM-130-SSA1-1995), su importancia radica en brindar protección al alimento porque los productos conservados en envases oscuros u opacos mantienen su color característico durante más tiempo que los expuestos a la luz (Evans, 2011).

### **2.5.7 Almacenamiento, transporte y distribución**

Después del envasado y etiquetado las bebidas se almacenan en la fábrica hasta su distribución evitando que sea por tiempo prolongado. En el almacén la temperatura se mantiene fresca para la mayor conservación del producto y debe estar correctamente ventilado. Normalmente, los envases se guardan en cajas o palets debidamente identificados, estibados en superficie y altura adecuados al movimiento, recepción, manipulación y expedición. Durante el almacenamiento se realizan inspecciones tanto de los productos como de las condiciones del lugar para evitar que los envases y el producto se deterioren (Domínguez Deras, 2017). El almacenamiento a bajas temperaturas puede influir en la estabilidad de los productos y se puede lograr extender el tiempo en el cual mantenga su calidad; la temperatura de refrigeración ideal para alimentos es entre 1 y 5 °C (Evans, 2011).

En el presente proyecto se pretende preparar una bebida a base de frutas con una alta concentración de compuestos polifenólicos por lo que se deberán cuidar las condiciones del proceso debido a que los ingredientes, tratamiento térmico, almacenamiento y transporte de la producción y procesamiento de bebidas antioxidantes afectan la estabilidad de los polifenoles provocando su degradación (Ananingsih, 2013). Mäkilä et al. (2017), realizaron el proceso de pasteurización en botellas de 50 mL y reportaron que el tiempo de calentamiento para alcanzar la temperatura interna de 95 °C fue de 5-10 minutos de sus jugos de fruta ricos en compuestos polifenólicos.

## **2.5.8 Proceso de fabricación de bebidas refrescantes a nivel industrial**

### **Suministro y tratamiento de agua potable**

El agua procede ya sea de la red de abastecimiento municipal o de un pozo privado, se potabiliza mediante un conjunto de procesos físicos y/o químicos con la finalidad de mejorar su calidad (libre de contaminantes químicos o agentes infecciosos) y hacerla apta para uso y consumo, de tal manera que no cause efectos nocivos en el ser humano (NOM-127-SSA1-1994). En las industrias analizan el agua de entrada a la planta y frecuentemente le dan un tratamiento adicional (filtración, desaireación, reducción de alcalinidad y desinfección) para adecuar sus características a la fabricación de bebidas (Malvais Delgado, 2017).

### **Preparación del jarabe de azúcar**

La elaboración del jarabe simple se inicia con la dilución en agua del azúcar en forma cristalina o líquida, se filtra y decolora o no lo cual depende de la calidad de azúcar y del tratamiento térmico (Domínguez Deras, 2017). Posteriormente, se puede mezclar con ingredientes como otros azúcares, preparados aromáticos, zumos, vitaminas, minerales y/o aditivos, por ejemplo, acidulantes, colorantes, conservadores y edulcorantes intensos, así como, vitaminas y minerales (Malvais Delgado, 2017); este producto recibe el nombre de jarabe terminado el cual se puede almacenar en los tanques de mezcla por 24 h como máximo, porque después de dicho tiempo se corre el riesgo de que sufra alteración microbiológica y sensorial.

### **Bebida terminada**

La bebida se prepara en un mezclador donde se combinan el jarabe terminado, el agua tratada (en las proporciones requeridas) y el gas carbónico cuando se trata de una bebida con gas. Las bebidas sin gas se pueden pasteurizar antes del envasado porque normalmente es un proceso aséptico, o se envasan y posteriormente se les realiza un tratamiento térmico en túneles denominados de pasteurización (Domínguez Deras, 2017).

## **Recepción, lavado e inspección de envases**

Las botellas de vidrio reutilizables que se utilizan para envasar bebidas, en la planta embotelladora se seleccionan y seguidamente se someten al proceso de lavado y desinfección. Esto se realiza mediante un sistema de remojo y aspersion con detergentes y desinfectantes, a altas temperaturas o ambiente y mediante un cepillado se eliminan las etiquetas. Mediante inspectores electrónicos o por personal entrenado, cada botella se examina para asegurar de que no existen ningún tipo de defecto y comprobar que se eliminó en su totalidad líquidos residuales y/o cuerpos extraños de la misma. En el caso de envases nuevos, se enjuagan con agua potable para eliminar cualquier sustancia o cuerpo extraño antes de su uso y también se someten a inspección como ya se señaló (Malvais Delgado, 2017).

## **2.6 Estabilidad de los alimentos**

Los estudios de estabilidad permiten evaluar bajo condiciones de almacenamiento definidas (tiempo, temperatura, envase, humedad y/o luz), el comportamiento de los diferentes componentes presentes en un alimento mediante pruebas fisicoquímicas y microbiológicas, cuyos resultados permiten establecer si cumple o no con los criterios de calidad establecidos en la normatividad correspondiente; la información generada sentará las bases para un estudio posterior de vida útil (Nicoli, 2012).

### **2.6.1 Tipos de pruebas de estabilidad**

Las pruebas de almacenamiento de un producto pueden ser de tres tipos (Phimolsiripol y Suppakul, 2016): 1) Acelerada. Se aplica bajo un intervalo de condiciones de temperatura, humedad relativa o presión parcial de oxígeno, por lo general (Giraldo, 1999), bajo la premisa de que el proceso de deterioro acelerado será el mismo bajo las condiciones reales de almacenamiento del alimento (Kilcast y Subramaniam, 2000). En la práctica este tipo de

prueba acorta considerablemente el tiempo para tener resultados (Kilcast y Subramaniam, 2000). 2) De uso/abuso. Se basa en el uso de un ciclo de variables ambientales y se suele utilizar para evaluar tanto al producto como al empaque como una unidad, también se suele aplicar para determinar el efecto del proceso del transporte en el alimento. 3) Estática. El producto debe estar a las condiciones lo más reales de almacenamiento por lo que requiere más tiempo para que se observen cambios y suele ser costosa. En el presente trabajo, se aplicó este tipo de prueba para evaluar la estabilidad a 4 °C de la BFM, envasada en frasco de vidrio de 128 mL de capacidad con tapa metálica de cierre hermético; se realizaron pruebas fisicoquímicas y microbiológicas considerando lo establecido en las normas para bebidas no alcohólicas y mixtas (Tabla 2.1), debido a que no existe una específica para alimentos como la BFM.

**Tabla 2.1.** Normas nacionales e internacionales para bebidas no alcohólicas y mixtas

<b>Norma</b>	<b>Información</b>
NMX-F-439-1983	Definición y clasificación de bebidas.
CODEX STAN 192-1995	Definición y clasificación de bebidas.
NOM-251-SSA1-2009	Buenas prácticas de higiene desde la recepción de la materia prima hasta el almacenamiento del producto terminado.
NOM-127-SSA1-1994	Definición: agua para uso y consumo humano, potabilización.
PROY-NOM-173-SE-2020	Definición: néctar, pulpa, puré, bebidas no alcohólicas a base de vegetales o frutas, jugo, jugo mixto de vegetales, frutas, hortalizas o verduras. °Brix y el límite mínimo para jugos de frutas múltiples.
NMX-FF-006-1982	Características sensoriales del néctar de guayaba. Definición: madurez fisiológica y madurez de consumo.
NMX-FF-040-2002	Especificaciones generales para el fruto de la guayaba. Madurez fisiológica mínima de los frutos. Cálculo del índice de madurez.
NMX-F-078-S-1980	Especificaciones del néctar de guayaba: °Brix, acidez titulable, pH, número de malla del tamiz. Porcentaje de llenado del envase.
NMX-F-464-1984	Especificaciones del jugo de naranja concentrado: acidez titulable y °Brix.

**Tabla 2.1.** Continuación...

<b>Norma</b>	<b>Información</b>
NTP 203.110 2009	Límites fisicoquímicos para bebidas de frutas no alcohólicas (pH y °Brix).
CODEX STAN 247-2005	Nivel mínimo de °Brix para bebidas de naranja con un 50 % de jugo y sus características sensoriales.
NMX-F-103-1982	Determinación de °Brix.
NMX-F-317-S-1978	Determinación del pH.
PROY-NOM-211-SSA1-2002	Determinación de sólidos totales.
NMX-F-066-S-1978	Determinación de cenizas totales.
NMX-F-102-S-1978	Determinación de acidez titulable del jugo de granada y puré de guayaba.
NOM-218-SSA1-2011	Pruebas microbiológicas (mesofílicos aerobios y coliformes totales) y los límites permitidos para bebidas no alcohólicas.
NMX-F-466-1984	Pruebas microbiológicas (mesofílicos aerobios y mohos y levaduras) y los límites permitidos para bebidas no alcohólicas. Parámetros fisicoquímicos (°Brix, pH, % cenizas totales, acidez titulable) y los límites permitidos para bebidas de naranja. Características sensoriales.
NOM-092-SSA1-1994	Cuantificación de mesofílicos aerobios.
NOM-110-SSA1-1994	Preparación de diluciones para los análisis microbiológicos.
NOM-111-SSA1-1994	Cuantificación de mohos y levaduras.
NOM-113-SSA1-1994	Cuantificación de coliformes totales.
NOM-130-SSA1-1995	Definición: envase, envases herméticamente cerrados, espacio libre, etiqueta, tratamiento térmico, pasteurización. Límites microbiológicos para bebidas no alcohólicas (mesófilos aerobios, mohos y levaduras). Clasifica a los jugos y néctares como alimentos ácidos (pH≤4.6).
NMX-F-314-1977	Definición: masa de la capacidad de llenado de envases de productos alimenticios.
COGUANOR NGO 34 003 h3	Determinación del porcentaje del volumen ocupado por el producto.
COVENIN 1051-82	Determinación del espacio libre en alimentos envasados.

Una vez que se definen tanto el tipo de prueba como las condiciones de almacenamiento, se lleva a cabo un monitoreo de los parámetros considerados para la evaluación de la estabilidad a lo largo del período de tiempo establecido. El muestreo para 1 año de almacenamiento (por ejemplo, algunos cereales para el desayuno), puede programarse cada mes o a los 0, 1, 2, 3, 6 y 12 meses (Phimolsiripol y Suppakul, 2016).

### **2.6.2 Propiedades fisicoquímicas**

La naturaleza compleja y heterogénea de los alimentos promueve cambios en sus componentes durante su almacenamiento y los análisis fisicoquímicos son una herramienta importante para determinar la estabilidad de estos y por ende la del producto, como ya se mencionó anteriormente. A continuación se detallan los parámetros fisicoquímicos considerados en el presente trabajo.

La NOM-173-SCFI-2009 define a los °Brix como “el porcentaje de sólidos disueltos en un producto derivado de las frutas o de un líquido azucarado”, por lo que dicho parámetro se suele asociar con el contenido de sacarosa (%) en jugo o bebidas a base de frutas (Jijón, 2017). Por otro lado, los sólidos totales (ST) en la norma PROY-NOM-211-SSA1-2002 se definen como “el residuo que se obtiene al evaporar el agua contenida en un producto”; también se suelen definir como los compuestos en solución diferentes a la sacarosa como otros azúcares y ácidos orgánicos, existen diferentes métodos para su determinación (Schwab et al., 2013). Debido a que en las frutas o sus productos los componentes mayoritarios son los azúcares, se suelen tomar como equivalentes °Brix y ST. Algunos productos poseen un alto contenido de ácidos orgánicos (cítrico, ascórbico, etc.) y la acidez titulable (acidez libre) determina dichos compuestos por medio de su neutralización con una base fuerte como el NaOH, determinando el punto final por el vire de algún indicador de pH o usando un potenciómetro. Las cenizas de un alimento representan los residuos inorgánicos que quedan después del proceso de calcinación se considera un método sencillo para determinar la calidad de ciertos alimentos asociada al porcentaje de cenizas que se obtienen (Universidad Nacional Autónoma de México [UNAM], 2008).

De acuerdo con García y Retana (2007), “Los °Brix es un índice de suma importancia en la evaluación de bebidas porque son indicadores de fermentación, que causa la pérdida del producto cuando el tratamiento térmico o el envasado se realizan de una forma incorrecta” p.41. Por otro lado, los alimentos de baja acidez se consideran que son menos susceptibles

a la contaminación microbiana y además contribuyen a la estabilidad del sabor. Diversos autores (Dionisio et al., 2016; Kausar et al., 2012; Sampedro et al., 2009) reportaron que una disminución en el pH y el incremento de la acidez de sus bebidas se debe a la producción de ácidos asociada a la degradación de carbohidratos por la acción de microorganismos; por otro lado, Kausar et al. (2012), señalan que “la alta acidez y el bajo pH pueden deberse a la producción de ácido acético y ácido láctico durante el almacenamiento” (p. 243). Por su parte, en la NOM-130-SSA1-1995 los jugos y néctares se clasifican como alimentos ácidos ( $\text{pH} \leq 4.6$ ).

Según Schvab et al. (2013), los sólidos totales y la acidez titulable son los parámetros químicos más frecuentemente evaluados en los jugos de fruta, debido a su estrecha relación con su calidad sensorial, si bien es cierto, en la literatura se encuentran reportes de estabilidad de bebidas de fruta donde se evalúan los °Brix, pH y acidez titulable como indicadores de la calidad durante el almacenamiento (Porto et al., 2017; Dionisio et al., 2016; Kausar et al., 2012; Gironés-Vilaplana et al., 2013) también otras evaluaciones incluyeron los sólidos y cenizas totales (García y Retana, 2007; Estrada, 2017). El contenido de humedad o sólidos totales y cenizas pertenecen al análisis proximal de alimentos y tienen como principales propósitos caracterizar nutricionalmente a los alimentos, así como, garantizar la calidad de productos formulados comercialmente (Vano et al., 2009).

Los valores obtenidos en cada uno de los análisis fisicoquímicos evaluados garantizan la calidad del alimento siempre y cuando se encuentren dentro de los límites establecidos en la normatividad nacional e internacional correspondiente, para este trabajo de tesis se consideraron los indicados en la tabla 2.2. Cuando las normas no incluyen dichos límites para los parámetros fisicoquímicos evaluados, los resultados se suelen comparar con aquellos reportados en la literatura para productos iguales o similares; de igual forma, se puede considerar como un deterioro de la calidad cuando esta disminuye entre el 30 y el

50 % con respecto al tiempo cero, como se sugiere para pruebas de vida acelerada (Phimolsiripol y Suppakul, 2016).

**Tabla 2.2.** Límites fisicoquímicos establecidos en normas para bebidas no alcohólicas o mixtas.

Parámetro	Límite		Ref.
	Mínimo	Máximo	
Acidez titulable (g ácido cítrico/100 mL)	NR	0.55	NMX-F-466-1984
°Brix	10.0	NR	CODEX STAN 247-2005
	10.5	13.0	NMX-F-466-1984
	10.0	NR	NOM-173-SCFI-2009
	10.0	NR	NTP 203.110 2009
Cenizas totales (%)	0.12	NR	NMX-F-466-1984
pH	3.0	4.0	NMX-F-466-1984
	NR	4.6	NOM-130-SSA1-1995
	NR	4.5	NTP 203.110 2009
Sólidos totales (%)	NR	NR	PROY-NOM-211-SSA1-2002

NR: No reportado.

### 2.6.3 Carga microbiana

Las infecciones son causadas por la invasión y multiplicación directa de bacterias, virus o parásitos dentro de un organismo superior; las intoxicaciones también pueden originarse por toxinas de microorganismos (FAO, 2005). Por lo anterior, es importante asegurar la inocuidad de un alimento antes de que se oferte al consumidor. En la tabla 2.3 se muestran los límites microbiológicos permitidos para bebidas no alcohólicas.

**Tabla 2.3.** Límites microbiológicos máximos permitidos para bebidas no alcohólicas.

<b>Microorganismos</b>	<b>NMX-F-466-1984</b>	<b>NOM-130-SSA1-1995</b>	<b>NOM-218-SSA1-2011</b>
Coliformes totales (NMP/mL)	NE	NE	10
Mesófilos aerobios (UFC/mL)	50	100	50
Mohos y levaduras (UFC/mL)	10	25	NE

NE: No especificado; NMP: Número más probable; UFC: Unidades formadoras de colonias.

El grupo de los microorganismos coliformes es el que más ampliamente se utiliza en la microbiología de los alimentos como un indicador de la calidad microbiológica de un producto (aunque su presencia no necesariamente implica un riesgo sanitario), de la eficiencia de prácticas sanitarias e higiénicas del equipo y la calidad sanitaria del hielo y agua utilizados durante el procesamiento de alimentos (NOM-113-SSA1-1994). La presencia de bacterias coliformes es un indicador de contaminación fecal y de otros patógenos como virus, bacterias, protozoos y fases enquistadas de metazoarios. Como resultado de la contaminación fecal pueden encontrarse las bacterias entéricas como *E. coli*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Providencia* y *Serratia*, algunas de ellas conforman la flora intestinal. Por otro lado, el género *Salmonella* incluye serovariedades que son causantes de enfermedades severas en humanos que se agrupan con el nombre de salmonelosis e incluyen a la fiebre tifoidea y la paratifoidea. Por otro lado, existen cepas de *Shigella* que provocan enfermedades diarreicas leves y severas (Baker y The, 2018).

Con respecto a los mohos y levaduras en los alimentos, también pueden utilizarse como un indicador de prácticas sanitarias inadecuadas durante la producción y el almacenamiento de los productos, así como, del uso de materia prima impropia. Este grupo de microorganismos están ampliamente distribuidos en la naturaleza y pueden formar parte de la flora normal de un alimento o como agentes contaminantes y hasta en los equipos sanitizados inadecuadamente. Debido a su capacidad de metabolizar carbohidratos, ácidos

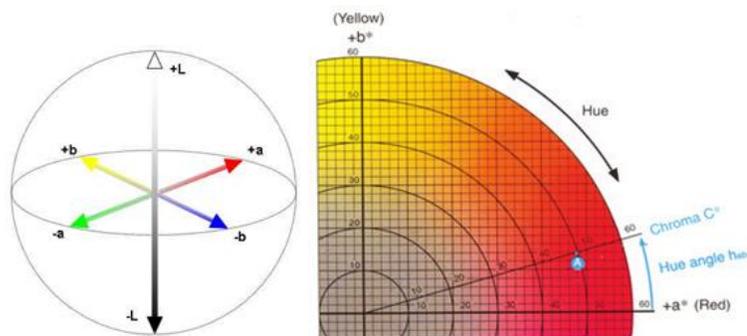
orgánicos, proteínas y lípidos, su presencia se asocia con la presencia de malos olores, alteración del sabor y el color en la superficie de los productos. Los mohos y levaduras pueden sintetizar metabolitos tóxicos resistentes al calor, a algunas sustancias químicas, así como a la irradiación, además de capacidad para alterar sustratos desfavorables, lo que permite su crecimiento y reproducción (NOM-111-SSA1-1994).

La técnica de cuenta en placa se utiliza para la estimación de microorganismos viables en un alimento, aunque no pone en evidencia todos los microorganismos presentes. El recuento de termofílicos, psicofílicos y psicotróficos es importante para predecir la estabilidad del producto bajo diferentes condiciones de almacenamiento (NOM-092-SSA1-1994).

Cabe señalar que las normas no incluyen aspectos que son importantes para el consumidor, tales como el color instrumental, calidad sensorial, tipo y concentración de compuestos bioactivos a los que se les ha conferido actividades biológicas. A continuación se amplía la información de este tipo de pruebas debido a la importancia que representan como un criterio adicional de calidad aceptable del producto.

#### **2.6.4 Color instrumental**

Diferentes compuestos de naturaleza orgánica e inorgánica son los responsables del color de los alimentos (Mathias-Retting y Ah-Hen, 2014) y su evaluación es importante debido a que es el primer atributo que los consumidores asocian con la calidad de un producto; se ha comprobado que un cambio en el color del alimento a pesar de que no se haya alterado su forma, aroma u otros atributos de textura, puede ser motivo de rechazo por parte de los consumidores o incluso de los catadores entrenados (Badui, 2006). El color instrumental se puede medir empleando diferentes tipos de equipos y escalas, por ejemplo, un método espectrofotométrico en el sistema de color CIEL \*a\*b\* (Figura 2.11).



**Figura 2.11.** Sistema de color CIEL\*a\*b\* y diagrama de cromaticidad. Tomado de Konica Minolta Sensing Americas.

La luminosidad o grado de claridad ( $L^*$ ) va de blanco al negro cuyos valores son de 100 a 0, respectivamente, por lo tanto, conforme  $L^*$  aumenta el color tiende a colores más claros y viceversa;  $a^*$  puede tomar valores positivos (rojo) y negativos (verde); en el caso de  $b^*$  los valores positivos corresponden al amarillo y los negativos al azul. Por otro lado, el ángulo hue y  $C^*$  se calculan a partir de los valores de  $b^*$  y  $a^*$ . Croma ( $C^*$ ) corresponde a la saturación del color y se representa como la distancia al eje de  $L^*$  con valores que van del 0 al 100 %; a este parámetro también se le suele llamar pureza de color, cuanto menor sea la saturación de un color mayor tonalidad grisácea habrá y más decolorado estará. El ángulo hue ( $h^\circ$ ) es el tono o matiz con valores de 0 a  $360^\circ$ , es la cualidad que distingue un color de otro, por ejemplo, el amarillo del rojo.

Finalmente, el índice de oscurecimiento es otro parámetro de color que se suele medir en alimentos como las bebidas a base de frutas y verduras; este proceso se origina por reacciones de Maillard u oscurecimiento no enzimático, el cual se puede retardar con diferentes compuestos anti-oscurecimiento entre los que se encuentran extractos obtenidos de residuos agroindustriales (Moon et al., 2020).

Se ha reportado el efecto que algunos extractos vegetales tienen en el color de las bebidas donde se adicionaron. Akponah et al. (2013), observaron un cambio de color de amarillo pálido a café en jugo de naranja; el color café varió con base al tipo y concentración

del extracto usado (ajo>jengibre>romero). Kopjar et al. (2011), midieron el color de jugo de mora antes y después de la adición de extractos que obtuvieron a partir de hojas de olivo, corteza de pino, té verde, así como, con vino tinto; reportando un incremento del color entre 32.76 y 38.42 %.

### **2.6.5 Pruebas sensoriales**

La evaluación sensorial se ocupa de la medición y cuantificación de las características de un producto o ingrediente, mediante la percepción con los sentidos humanos. Un tipo de prueba que se utiliza en el análisis sensorial es la de nivel de agrado la cual permite determinar, como su nombre lo dice, el nivel de agrado que una muestra tiene para una población en particular. Su aplicación es sencilla y no requiere jueces entrenados o con experiencia, los descriptores del nivel de agrado están contenidos en una escala denominada hedónica estructurada donde los extremos corresponden a los niveles de agrado y desagrado, así como, un indicador del punto medio que corresponde a la indiferencia por la muestra (Pedrero y Pangborn, 1997).

Porto et al. (2017), evaluaron el color, aroma, sabor y aceptación general de una bebida mixta de naranja con remolacha mediante una escala hedónica de 9 puntos. En el caso de unas bebidas de limón con mostaza café y amarilla, almacenadas a  $4\pm 1$  °C, después de 240 y 360 días, Chakraborty y Bhattacharjee (2018), realizaron una prueba sensorial con 15 hombres y 15 mujeres de entre 20-45 años de edad, quienes evaluaron la apariencia general, color, aroma, gusto, consistencia y resabio mediante una escala hedónica de 9 puntos; las bebidas fueron codificadas utilizando cifras de tres números, posteriormente expresaron sus resultados en una gráfica de telaraña. Baba et al. (2016), también emplearon una escala hedónica verbal de 9 puntos para la evaluación de sus bebidas de jugo de piña con suero de queso, por lo que en el presente proyecto se utilizará también una escala hedónica verbal de 9 puntos para la evaluación sensorial.

### **2.6.6 Biocompuestos**

La calidad de un alimento funcional se evalúa con respecto a la concentración de biocompuestos presentes en este, cuya disminución se verá reflejada en la conservación de las actividades biológicas que se le confieren a dicho alimento, las cuales también deben monitorearse durante el periodo de almacenamiento. Khasanov y Matveeva (2020), refieren que en una bebida se puede tomar como punto crítico de calidad la degradación mayor al 50 % de biocompuestos porque impactará de manera importante en la pérdida de sus propiedades funcionales. Por otro lado, Santander-M et al. (2017), asociaron la disminución significativa de la capacidad antioxidante con la reducción del CPT durante el almacenamiento de una bebida a base de tomate de árbol y leche descremada. En el presente trabajo de tesis se evaluó la estabilidad de la BFM durante su almacenamiento con respecto al CPT, así como sus actividades antioxidante y antiviral contra el VSRh.

### 3. ESTADO DEL ARTE

A la fecha no existen reportes del desarrollo de una bebida funcional mixta guayaba-naranja adicionada con extracto de cáscara de *P. granatum*, con actividades antioxidante y antiviral contra el VSRh y, por consiguiente, tampoco del efecto de la temperatura y el tiempo de almacenamiento sobre su estabilidad.

En el marco del presente proyecto de tesis, se hizo una investigación de la disponibilidad de bebidas mixtas de guayaba y naranja en el mercado mexicano; en algunas tiendas departamentales se compraron las que se muestran en la figura 3.1. Es importante señalar que la fecha de consumo preferente de dichas bebidas varió de 6, 12 y 24 meses a partir de la fecha de su elaboración (información contenida en el número de lote).



**Figura 3.1.** Bebidas mixtas de guayaba-naranja de venta en tiendas departamentales en México.

A continuación, se detalla información relevante de las bebidas mixtas guayaba-naranja comerciales: **1)** Frutos de Vida en envase de plástico, jugo 100 % natural de frutas mixtas; los ingredientes son jugo y pulpa de guayaba (55 %), jugo de naranja (45 %), vitaminas A, C y E, 100 % libre de conservadores y sin azúcar. **2)** Sin secretos en envase de Tetra Pak, jugo 100 % natural: naranja 47 % y 53 % de guayaba reconstituidos, sin azúcar añadido ni conservadores. Del Valle también comercializa un Néctar mixto de guayaba-naranja en envase de vidrio, sin embargo, no se encontró disponible a la venta. **3)** Marketside en envase de plástico, jugo de naranja y guayaba 100 % natural; sus ingredientes son jugo de naranja 84 % mínimo, pulpa de guayaba 15 % mínimo, sorbato de potasio y como conservadores naturales adicionaron extractos cítricos específicamente de las semillas de limón, naranja y toronja. Las indicaciones son “Agítese antes de beber. Consérvese en refrigeración”. **4)** Único fresco Vita C de Jumex, envasada en tetra Pak, adicionada con miel y extracto de jengibre. Sin conservadores ni azúcar añadida. Presentación de 1 L. Menciona que es 100 % jugo, sin embargo, no menciona en qué proporciones se encuentran cada uno de los componentes. Para todas las bebidas las recomendaciones son agitar bien antes de abrir y refrigerarse si no se consume en su totalidad.

Es importante señalar que en ninguna de las bebidas mixtas mostradas se especifica alguna actividad biológica; en el caso de la bebida Frutos de Vida en la parte frontal de la etiqueta solamente se resalta la leyenda “El inmuno-fuerza”.

## 4. JUSTIFICACIÓN

En un trabajo previo del grupo de investigación de la Universidad Tecnológica de la Mixteca se elaboró una bebida funcional a base zumos de naranja y guayaba, adicionada con extracto de la cáscara de granada (*P. granatum*), la cual presentó tanto actividad antioxidante como antiviral contra el VSRh, esta última en la etapa de unión del virus a la célula observándose una reducción en la carga viral y una disminución del tamaño del sincitio. Cabe resaltar que la composición y actividades biológicas de la bebida se encuentran en proceso de solicitud de patente MX/a/2017/007342 (González-Mondragón et al., 2017), lo que pone de manifiesto la importancia de proponer una alternativa que no sea un medicamento para la prevención de la infección de las vías respiratorias por el VSRh y que puedan ingerir consumidores de cualquier edad, principalmente menores de 5 años y adultos mayores (población de mayor riesgo de contagio), así como, el interés de una transferencia de tecnología a escala industrial para su futura comercialización.

Debido a que se trata de un alimento es necesario tener información de la calidad de la BFM durante su almacenamiento considerando la normativa para bebidas no alcohólicas y mixtas. De igual modo, es importante establecer el tiempo que conserva las actividades biológicas que se le están confiriendo (antioxidante y antiviral específicamente contra el virus sincitial respiratorio humano). El almacenamiento de la bebida funcional mixta en refrigeración se precisó considerando que los componentes de la bebida son 100 % naturales aunado a que los polifenoles son termosensibles y estos son los responsables de conferirle las actividades biológicas a esta bebida. Con base a lo anterior, en el presente trabajo de tesis se evaluará la estabilidad de la BFM a 4 °C durante 6 meses, tiempo en el que se han evaluado bebidas funcionales.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 General**

Evaluar la estabilidad de una bebida funcional mixta adicionada con extracto de la cáscara de *Punica granatum*, durante su almacenamiento en refrigeración.

### **5.2 Específicos**

**5.2.1** Establecer el acondicionamiento de las materias primas para la elaboración de una bebida funcional mixta con características similares a las reportadas en la solicitud de patente MX/a/2017/007342 (González Mondragón et al., 2017).

**5.2.2** Evaluar la calidad de una bebida funcional adicionada con extracto de cáscara de *Punica granatum*, durante su almacenamiento a 4 °C durante 6 meses, mediante pruebas fisicoquímicas, microbiológicas y un análisis sensorial.

**5.2.3** Establecer la estabilidad de una bebida funcional adicionada con extracto de cáscara de *Punica granatum*, almacenada a 4 °C durante 6 meses, con respecto a su contenido de polifenoles, actividad antioxidante y actividad antiviral contra el virus sincitial respiratorio humano (VSRh).

## **6. METAS**

**6.1** Tener una bebida funcional mixta para la cual se conoce el parámetro crítico de calidad y el tiempo definido en el que conserva su calidad cumpliendo con lo establecido en la norma nacional e internacional para bebidas no alcohólica.

**6.2** Identificar el tiempo límite en el que la bebida funcional mixta conserva sus propiedades biológicas (actividad antioxidante y antiviral).

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

En este apartado se describen los materiales y métodos que se utilizaron para la evaluación durante 6 meses del efecto del almacenamiento en refrigeración en la bebida funcional mixta adicionada con extracto de cáscara de granada.

### 7.1 Materiales y reactivos

Jugo de naranja concentrado comercial, azúcar morena, agua embotellada (apta para el consumo humano), aditivos alimentarios previamente adquiridos en VIC-PAC S.A. de C.V., Puebla, México. Soluciones amortiguadoras estándar para calibración de electrodo de pH 4, 7 y 10, hidróxido de sodio (NaOH) 0.1 N, etanol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH), metanol (CH<sub>3</sub>OH), cloruro de sodio (NaCl), ácido etilendiaminotetraacético (C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>), cloruro de potasio (KCl) (J.T.Baker). Peptona, agar cuenta estándar, agar papa dextrosa (Bioxon). L-glutamina (C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), bicarbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>), sal sódica del ácido 4-(2-Hidroxietil) piperazin-1-etanosulfónico ≥99.5 % (C<sub>8</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S), ácido gálico (C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>5</sub>), reactivo de Folin-Ciocalteu 2N, 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>) (Sigma-Aldrich). Ácido tartárico (C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O<sub>6</sub>) (CTR). Suero fetal bovino inactivado, alamarBlue™ (Thermo Fisher Scientific). Ácido 4-[(2Z)-2-[4-formil-6-metil-5-oxo-3-(fosfonometil)piridin-2-ilideno]hidrazinil] benzoico (C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>P), medio esencial mínimo de Dulbecco (DMEM, por sus siglas en inglés) (Gibco). Fosfato ácido de sodio (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (Reactivos y productos químicos finos S.A. de C.V.). Fosfato ácido de potasio (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (Productos químicos Monterrey S.A.). Carbonato de sodio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) (Reasol). Agar rojo violeta bilis (Difco™). Células HEP-2 que son células de epitelio respiratorio humano provenientes de carcinoma de laringe (ATCC CCL-23). Virus sincitial respiratorio humano (VSRh). Tubos para centrifuga de 50 mL (Falcon™). Membranas de nylon 0.2 μm estériles y no estériles, membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF, por sus siglas en inglés) de 0.45 μm las cuales son de baja absorción

de compuestos químicos (Whatman™). Cloro (Cloralex®). Vasos desechables de polipropileno transparentes de 50 mL de capacidad (REYMA®). Agua desionizada, agua Milli-Q®, cajas Petri desechables y placas de 96 pozos.

## **7.2 Equipos**

Autoclave (sin marca), balanza analítica (Ohaus, 203028), baño de recirculación de agua con control de temperatura (Thomas Scientific, MX07H135-G11B), baño con control de temperatura y recirculación (Techne TE-10A), baño ultrasónico (Branson, CPX8800), bomba de vacío (Vacuubrand, ME4NT), cabina de seguridad biológica Clase II Tipo A2 (Labculture®, ESCO), centrífuga refrigerada (Eppendorf, 5810 R), congelador (Torrey, CHTC9), espectrofotómetro (Hinotek, UV765), espectrofotómetro uv-vis (Jenway, 7305), espectrofotómetro colorímetro (Hunter lab, Ultra Scan VIS), horno (Felisa, F292-DA), incubadora (Felisa, FE-1220), incubadora de CO<sub>2</sub> (Forma Scientific, 3110), lector de microplacas (BioTek, ELx808), licuadora (Osterizer, 6640-13), microscopio (Nikon T1-SM), molino (Hamilton Beach, 80393), mufla (Felisa, FE-360), parrilla de calentamiento con agitación (IKA®, C-MAG HS 4), parrilla de calentamiento con agitación (IKA®, C-MAGHS7), placa de agitación orbital (Bellco), potenciómetro (Hanna, HI2210), potenciómetro (Hanna, pH213), procesador de alimentos (Kitchen aid, KHB2351CU), refractómetro (Hanna, HI96801), refrigerador (Nieto, RB), refrigerador (Torrey, VRD18), rotaevaporador (IKA, RV10 basic), tamices de número de malla 20, 40 y 80 (Montinox), ultracongelador (Thermo Electron Corporation, Forma 86-C ULT Freezer), vórtex (IKA, Vortex3).

## **7.3 Programa de muestreo**

La BFM que se utilizó para la evaluación de la calidad se tomó de acuerdo con el plan de muestreo presentado en la tabla 7.1, de frascos recién abiertos. Los análisis fisicoquímicos y microbiológicos inicialmente se realizaron cada mes hasta el mes 2, y

posteriormente se hizo cada 2 meses hasta finalizar el tiempo de la evaluación. Es importante mencionar, que el muestreo de un producto a tiempos diferentes durante todo el almacenamiento es una práctica común en el análisis de alimentos (Dionisio et al., 2016; Phimolsiripol y Suppakul, 2016; Porto et al., 2017).

**Tabla 7.1.** Calendarización de los análisis a la bebida funcional mixta durante los 6 meses de su almacenamiento a 4°C.

Análisis	Tiempo (meses)											
	0	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0
Mohos y levaduras	X	X		X				X				X
Coliformes totales	X	X		X				X				X
Mesófilos aerobios	X	X		X				X				X
Acidez titulable	X	X		X				X				X
pH	X	X		X				X				X
Sólidos totales (%)	X	X		X				X				X
Cenizas totales (%)	X	X		X				X				X
Color instrumental	X	X		X				X				X
°Brix	X	X		X				X				X
Evaluación sensorial	X	X		X		X		X		X		X
Contenido de Polifenoles Totales	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Actividad Antioxidante	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Actividad antiviral	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

La X indican el tiempo (meses) en los que se realizaron los ensayos correspondientes, a lo largo de los 6 meses de almacenamiento de la BFM a 4 °C.

## 7.4 Acondicionamiento y caracterización de las materias primas

### 7.4.1 Frutos de *Punica granatum*

Se colectaron frutos de granada (*Punica granatum*) con buen aspecto, sin daños por impacto, insectos o microorganismos en dos municipios de Oaxaca: H. Cd. de Ejutla de Crespo (entre los paralelos 16°28' y 16°44' de latitud norte; los meridianos 96°35' y 96°52' de longitud oeste; altitud entre 1,300 y 3,100 m) y H. Cd. de Huajuapán de León (entre los paralelos 17°43' y 18°03' de latitud norte; los meridianos 97°42' y 97°55' de longitud oeste;

altitud entre 1,400 y 2,300 m) (Instituto Nacional de Estadística y Geografía [INEGI], 2008). Se lavaron de acuerdo con lo establecido en la NOM-251-SSA1-2009 y la COFEPRIS (s.f.): se removieron piedras y tierra de los frutos, se talló su superficie con agua, jabón y estropajo; se enjuagaron al chorro de agua. Se sumergieron durante 10 min en una solución desinfectante (10 gotas de cloro de uso doméstico/L), se enjuagaron con agua purificada y se dejaron escurriendo.

Por otra parte, de manera manual se separó la cáscara y a partir de los arilos se obtuvo un jugo homogéneo de granada el cual se usó para calcular el índice de madurez (IM) de los frutos de granada con la ecuación 7.1.

$$IM = \frac{^{\circ}Brix}{Acidez\ titulable\ (\%)} \quad (\text{Ec. 7.1})$$

Los °Brix se determinaron colocando unas gotas del jugo de granada en un refractómetro que fue previamente calibrado con agua desionizada a 20 °C (NMX-F-103-1982). Para determinar la acidez titulable, 10 mL de jugo de granada se aforaron hasta 50 mL con agua desionizada, previamente hervida y atemperada; esta solución se utilizó para la titulación potenciométrica con NaOH 0.1 N hasta que se alcanzó un valor de pH igual a 8.2, se anotó el volumen gastado de la solución de NaOH. La acidez titulable se calculó en porcentaje, considerando que 1 mL de NaOH 0.1 N gastado equivale a 0.006404 g de ácido cítrico anhidro (NMX-F-102-S-1978).

Por otro lado, puesto que se pretende dar un valor agregado a la cáscara de *P. granatum* que se cultiva en el estado de Oaxaca, se combinaron el epicarpio y carpelo de los frutos que se colectaron en los dos municipios que se mencionaron al inicio de este apartado, se secaron, pulverizaron y tamizó el polvo siguiendo el procedimiento reportado por Gómez-

Castillo (2018). Se registró el peso del polvo (PCGO) que se obtuvo y se guardó hasta su uso en un frasco ámbar con tapa de cierre hermético a 4 °C.

#### **7.4.2 Frutos de *Psidium guajava* L. y concentrado de naranja comercial**

Los frutos de guayaba se compraron en un mercado local de Huajuapán de León, Oaxaca. Se seleccionaron aquellos que se consideraron visualmente aceptables con madurez de consumo. Se lavaron y desinfectaron con una solución de cloro a una concentración de 500 ppm (NOM-251-SSA1-2009). Con un cuchillo se eliminaron los extremos del fruto, se partieron por la mitad y se eliminaron las semillas, se molieron sin agua en una licuadora manual sin la adición de agua, el puré de guayaba (PG) se homogeneizó pasándolo a través de un tamiz de número malla 20 (NMX-FF-040-2002). Se envasó en varios recipientes de plástico de boca ancha con tapa de cierre hermético y se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

Se determinaron los °Brix al PG, por triplicado, utilizando el procedimiento antes descrito. Para el ensayo de acidez titulable siempre se usó agua desionizada hervida y atemperada previamente de acuerdo con lo que establece la norma NMX-F-102-S-1978. Primero, se pesaron 7.5 g de PG y se disolvieron en 20 mL de agua, la solución resultante se filtró a través de algodón el cual se enjuagó con agua varias veces; el filtrado y el agua de los lavados se juntaron y la solución que se obtuvo se aforó a 50 mL y de esta solución resultante se tomaron 25 mL los cuales se aforaron nuevamente hasta 50 mL y se homogeneizó. Se llevó a cabo una titulación potenciométrica con NaOH 0.1 N y agitación constante, hasta que se alcanzó un pH de 8.3 y se anotó el gasto volumétrico de la base. La determinación se realizó por duplicado. Finalmente, el índice de madurez se calculó con la ecuación 7.1.

El concentrado de naranja comercial (CN) se tamizó empleando un número de malla 20 y se midieron los °Brix; se envasó en varios recipientes de plástico de boca ancha con tapa de cierre hermético y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

### **7.5 Extracto etanólico acuoso obtenido a partir de polvo de cáscara de *Punica granatum***

El extracto del PCGO se obtuvo de acuerdo con la metodología establecida por Gómez-Castillo en el 2018. Por último, los extractos se llevaron a sequedad total a 45 °C en un rotaevaporador, el ECG seco se guardó a 4 °C sin exposición a la luz hasta su uso.

### **7.6 Contenido de polifenoles totales (CPT)**

*Preparación de disoluciones.* Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 20 %: Se pesaron 2 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, se disolvieron y aforaron hasta 10 mL con agua desionizada. Soluciones del estándar de ácido gálico (AG) a concentraciones de 100, 300, 500, 700 y 900 µg/mL: a partir de una solución de 1000 µg/mL de AG (0.01 g de AG disuelto en etanol al 70 % y se aforó hasta 10 mL) se prepararon las soluciones de las concentraciones mencionadas. Solución de Folin-Ciocalteu 1 N: a partir del reactivo comercial 2 N se realizó una dilución 1:1 (v/v) con agua desionizada.

*Cuantificación.* El ECG se solubilizó en agua embotellada, se tomaron 50 µL y se mezclaron con 3 mL de agua desionizada y 250 µL del reactivo de Folin Ciocalteu 1 N. La mezcla se agitó en un vórtex por 10 s y se dejó reposar durante 5 min, se adicionaron 750 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 20 % y 950 µL de agua desionizada. Se homogeneizó la mezcla y se dejó reposar por 40 min. Pasado este tiempo, se leyó la absorbancia a 765 nm empleando un espectrofotómetro uv-vis. Para la curva de calibración se siguió el mismo procedimiento con 50 µL de cada solución de las diferentes concentraciones de AG. Los resultados se expresaron en µg de Equivalente de Ácido Gálico por mililitro (µg EAG/mL).

### **7.7 Actividad antioxidante in vitro por el método del DPPH'**

Solución del radical DPPH' 0.1 mM: Se disolvieron 0.004 g del reactivo en metanol al 100 % y se aforó a 100 mL, se homogeneizó la mezcla y se trasvasó a un frasco color ámbar con tapa de cierre hermético, se conservó en refrigeración hasta su uso.

Se mezclaron a homogeneidad empleando un vórtex 50 µL de solución en agua embotellada del ECG con 2 mL de disolución DPPH' 0.1 mM, se dejó reposar 30 min sin agitación ni exposición a la luz. Transcurrido este tiempo, se registró la absorbancia a 517 nm empleando un espectrofotómetro uv-vis. Mediante la ecuación 7.2 se calculó el porcentaje de Inhibición del DPPH'.

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{BFM}}}{A_{\text{control}}} * 100 \quad (\text{Ec. 7.2})$$

Donde  $A_{\text{control}}$  es la absorbancia de la disolución del DPPH' 0.1 mM (control negativo) y  $A_{\text{BFM}}$  es la absorbancia de la mezcla de las disoluciones del ECG y el radical del DPPH'.

### **7.8 Elaboración de la bebida funcional mixta**

La bebida funcional mixta se preparó con la formulación que forma parte de la solicitud de patente MX/a/2017/007342 (González Mondragón et al., 2017). Siempre se aplicaron las prácticas de higiene descritas en la NOM-251-SSA1-2009.

### **7.9 Envasado, pasteurizado, etiquetado y almacenamiento**

Se usaron frascos de vidrio con tapa metálica, previamente esterilizados, de 128 mL de volumen total. Se adicionaron 118 mL de bebida lo cual representa el 92 % del volumen total. La pasteurización se llevó a cabo a 92-95 °C durante 5 minutos, pasado este tiempo, los envases se enfriaron en un baño de agua clorada fría (4-6 °C aprox.) de acuerdo con lo

establecido en la NOM-130-SSA1-1995. Posteriormente, los frascos se secaron, etiquetaron y se colocaron en un refrigerador a 4 °C hasta que fueron requeridos de acuerdo con los tiempos de análisis que fueron programados (Tabla 7.1). Es importante mencionar que se usaron frascos de BFM recién abiertos para los ensayos y la bebida sobrante se desechó.

Adicionalmente, se evaluó en la BFM el efecto del proceso de pasteurización en los parámetros siguientes: °Brix, acidez titulable, CPT y AA, para lo cual se preparó bebida mixta con y sin ECG las cuales se pasteurizaron y enfriaron como ya se describió; el ECG se adicionó a la bebida mixta pasteurizada en una campana de flujo laminar. Ambas bebidas se guardaron en refrigeración (4 °C) por 24 h y pasado este tiempo, se realizaron los análisis de los parámetros que se mencionaron.

## **7.10 Análisis de la BFM**

### **7.10.1 Microbiológicos**

*Preparación de disoluciones.* Ácido tartárico al 10 % estéril: Se disolvió 1 g de ácido tartárico en 10 mL de agua desionizada y se esterilizó en autoclave a 121 °C por 15 min. El agua peptonada, los agares para cuenta estándar, papa dextrosa y rojo violeta bilis, se prepararon y esterilizaron con base a lo establecido por el proveedor; el pH del agar papa dextrosa se ajustó a  $3.5 \pm 0.1$  con la solución de ácido tartárico al 10 % estéril. En el caso del agua peptonada se colocaron 9 mL en tubos de ensaye con tapa y se esterilizaron en autoclave a 121 °C por 15 min.

*Análisis microbiológico.* Para la preparación de diluciones seriadas ( $1 \times 10^{-1}$  hasta  $1 \times 10^{-3}$ ) en una campana de flujo laminar primeramente la BFM se homogenizó por agitación vigorosa en su envase, se tomó 1 mL de la bebida y se adicionó a un tubo con 9 mL de agua peptonada (NOM-110-SSA1-1994), se homogeneizó nuevamente; para la segunda y

tercera dilución se tomó 1 mL de la primera y segunda dilución, respectivamente, y se colocó en otro tubo con agua también peptonada estéril.

En una caja Petri se colocó 1 mL de la bebida sin diluir o de cada dilución y se adicionaron aprox. 20 mL del medio de cultivo correspondiente para cada análisis (Tabla 7.1) y se homogeneizó, el control de esterilidad o negativo fue una caja Petri únicamente con medio de cultivo. Cuando el agar gelificó las cajas se incubaron a la temperatura y el tiempo indicado para cada prueba microbiológica (Tabla 7.2) con revisiones cada 24 h. Posteriormente, se realizó el conteo de colonias y dicho número se multiplicó por el inverso de la dilución correspondiente. Los resultados se reportaron como Unidades Formadoras de Colonias por mL (UFC/mL) de mohos, levaduras, coliformes totales o mesofílicos aerobios. Los ensayos se realizaron por duplicado.

**Tabla 7.2.** Análisis microbiológicos

<b>Método</b>	<b>Medio de cultivo</b>	<b>Incubación Temperatura (°C) y tiempo (h)</b>		<b>Ref.</b>
Mesofílicos aerobios	Agar para cuenta estándar	35±2	48	NOM-092-SSA1-1994
Mohos y levaduras	Agar papa-dextrosa	25±1	120	NOM-111-SSA1-1994
Coliformes totales	Agar rojo violeta bilis	35	48	NOM-113-SSA1-1994

### **7.10.2 Físicoquímicos**

Es importante mencionar que todos los parámetros se evaluaron con base a los métodos establecidos en la norma correspondiente para cada una de las determinaciones. Previo al análisis, la bebida se atemperó cuando así se requirió. Todas las pruebas se realizarán por triplicado.

Acidez titulable (NMX-F-102-1978). Se homogeneizó la BFM en el envase, se tomaron 10 mL y se aforaron a 50 mL con agua desionizada previamente hervida y atemperada.

Para la titulación potenciométrica se usó NaOH 0.1 N y se detuvo cuando se registró un pH de 8.2. El cálculo de la acidez titulable (%) se realizó como ya fue descrito anteriormente. Para determinar el pH se colocaron 10 mL de la BFM en un vaso de precipitados y se usó un potenciómetro previamente calibrado (NMX-F-317-S-1978). La medición de °Brix se realizó como previamente fue descrito (NMX-F-103-1982). Sólidos totales (PROY-NOM-211-SSA1-2002). En un crisol tarado se colocaron 10 mL de BFM atemperada, como lo marca la norma, y se registró el peso que es el dato que se utiliza para efectos del cálculo, enseguida se introdujo a una estufa de secado a  $100.0 \pm 0.2$  °C. Se monitoreó el peso del crisol con la muestra de la BFM hasta que se obtuvo un peso constante, cada vez se retiró de la estufa, se colocó en un desecador para que se atemperara y se pesó. A partir de estos datos se calculó el % humedad y el % de sólidos totales (ecuaciones 7.3 y 7.4, respectivamente).

$$\% \text{ Humedad} = \frac{M2-M3}{M2-M1} * 100 \quad (\text{Ec. 7.3})$$

$$\% \text{ Sólidos totales} = 100 - \% \text{ Humedad} \quad (\text{Ec. 7.4})$$

Donde M1, M2 y M3 corresponden a los pesos del crisol tarado vacío, con BFM y con BFM seca, respectivamente. Cenizas totales (NMX-F-066-S-1978). Los crisoles con la BFM seca (BFMS) del análisis de porcentaje de sólidos totales se colocaron en una parrilla de calentamiento y se incineró la muestra hasta que ya no se observó la emisión de humo; en seguida, se colocaron en una mufla a 610 °C por 3 h para su calcinación completa. Los crisoles se atemperaron en la misma mufla una vez que se apagó y posteriormente se transfirieron a un desecador. Finalmente, se calculó el porcentaje de cenizas (Ecuación 7.5) a partir del peso (P) de las cenizas y de la BFM (M), en gramos.

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{P}{M} * 100 \quad (\text{Ec. 7.5})$$

Color instrumental. Se utilizó un espectrofotómetro en modo de transmitancia óptica y el programa ESY MATCH, se utilizó el iluminante D65, un ángulo de 10° y un diámetro de observación de 1.25 cm. Las mediciones se realizaron en el sistema CIEL\*a\*b\* y se usaron las ecuaciones 7.6 a 7.10 para calcular los valores de los parámetros de matiz o tono (h°), croma (C\*), el cambio de color total (ΔE) e índice de oscurecimiento (BI) (Maskan, 2001), respectivamente.

$$h^{\circ} = \tan^{-1} \left( \frac{b^*}{a^*} \right) \quad (\text{Ec. 7.6})$$

$$C^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad (\text{Ec. 7.7})$$

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (\text{Ec. 7.8})$$

$$BI = \frac{100 * (X - 0.31)}{0.17} \quad (\text{Ec. 7.9})$$

$$\text{Donde: } X = \frac{a^* + 1.75L^*}{5.645L^* + a^* - 3.012b^*} \quad (\text{Ec. 7.10})$$

### 7.10.3 Evaluación sensorial

La evaluación sensorial de la BFM se realizó desde el tiempo cero, es decir, la bebida recién preparada. Se aplicó una prueba afectiva de nivel de agrado mediante una escala hedónica verbal de nueve puntos (Tabla A1, Anexo I), donde me disgusta muchísimo, ni me

gusta ni me disgusta y me gusta muchísimo, fueron los puntos inicial, intermedio y final, respectivamente. Los atributos que se evaluaron por duplicado fueron: la apariencia general, el color, el olor y el sabor, siempre en ese orden, con un total de 32 evaluaciones por sesión. Los panelistas tuvieron un receso de 15 min entre la evaluación de una muestra de bebida y otra (Anzaldúa-Morales, 1994; Espinosa, 2007; Pedrero y Pangborn, 1997).

*Selección de los evaluadores.* El panel de evaluadores se conformó por estudiantes y empleados de la Universidad Tecnológica de la Mixteca, Institución donde se llevó a cabo el presente proyecto de tesis. Se seleccionaron 16 personas completamente sanas (8 hombres y 8 mujeres) entre 18 y 42 años, con conocimientos previos de evaluación sensorial.

*Preparación de las cabinas.* En el lado izquierdo del evaluador se dispuso un vaso con agua embotellada y una servilleta desechable, en el centro se colocó una charola donde se colocó un vaso de plástico transparente con BFM que se sirvió hasta que el evaluador estuvo presente; en el lado derecho se ubicaron un lapicero y una hoja del formato de la evaluación sensorial (Figura A1, Anexo I).

*Prueba sensorial.* La BFM almacenada a 4 °C se trasladó en un baño de hielo al área de evaluación sensorial y de este modo se aseguró que no varió su temperatura (Espinosa, 2007). A cada evaluador se le sirvió 25 mL de la BFM en vasos etiquetados previamente con números aleatorios de tres cifras, los cuales se colocaron en una charola de plástico como ya se detalló. Finalmente, a cada evaluador se le dieron las indicaciones del orden de los atributos que evaluó en la BFM.

#### **7.10.4 Contenido de polifenoles totales y actividad antioxidante**

Primeramente, la BFM se acondicionó del siguiente modo: 15 mL de la bebida se colocaron en un tubo Falcon y se dejó atemperar (25 °C aprox.); posteriormente, se colocó en un baño ultrasónico a 20±3 °C durante 10 min y a continuación se centrifugó a 4 °C,

10,000 rpm durante 15 min. seguido, el sobrenadante se filtró a través de membranas de PVDF de 0.45  $\mu\text{m}$ . El filtrado que se obtuvo se utilizó en los ensayos de CPT, AA y actividad antiviral contra el virus sincitial respiratorio humano (VSRh), en el caso de éste último ensayo las muestras se guardaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

Para el análisis del CPT se tomaron 50  $\mu\text{L}$  del filtrado anterior y se realizó el procedimiento anteriormente descrito. Para la curva estándar de calibración, el ácido gálico se disolvió en agua embotellada la cual también se usó como blanco. Por otro lado, la AA se realizó con el procedimiento ya descrito y se utilizó agua embotellada como control negativo (no hay inhibición del radical DPPH').

### **7.10.5 Actividad antiviral de la BFM contra el VSRh**

Los métodos y procedimientos que se utilizaron son los que reportó López-Hernández en el 2017, con algunas modificaciones. Todas las soluciones y material fueron estériles; la BFH se filtró adicionalmente a través de membrana estéril de 0.2  $\mu\text{m}$ . Siempre se trabajó en una cabina de seguridad biológica Clase II Tipo A2, las condiciones de incubación fueron a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  y atmósfera de  $\text{CO}_2$  al 5 %, el agua que se utilizó fue ultrapura de calidad Milli-Q®.

#### **7.10.5.1 Línea celular**

*Preparación de disoluciones y medios de cultivo.* Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, por sus siglas en inglés) al 0.02 %: se disolvieron 0.2 g de EDTA y 8 g de NaCl en agua y se aforó a 1 L. Solución amortiguadora de fosfatos (PBS, por sus siglas en inglés): se pesaron 8 g de NaCl, 0.2 g de KCl, 0.96 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  anhidro, 0.2 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , se disolvieron y aforaron con agua a 1 L. Medio esencial mínimo modificado (DMEM, por sus siglas en inglés) complementado al 5 % con suero fetal bovino (SFB) inactivado, 1 % de L-glutamina, 0.22 % de  $\text{NaHCO}_3$  y 0.22 % de ácido 4-(2-hidroxiethyl)piperazin-1-etanosulfónico

(HEPES, por sus siglas en inglés), se preparó de acuerdo a las recomendaciones del proveedor.

*Propagación de células HEp-2 y obtención de cultivos de monocapa confluyente en placas de 96 pozos.* Primeramente, un criotubo con células de epitelio respiratorio humano provenientes de carcinoma de laringe (Hep-2) conservado a -72 °C se descongeló colocándolo en un refrigerador. Estas células se incubaron, aprox. por 24 h, en una caja Petri con DMEM al 5 % de SFB hasta la formación de una monocapa de células Hep-2 al 95-100 % de confluencia (cultivo celular confluyente). Posteriormente, se eliminó el medio de cultivo y las células se lavaron dos veces con 3 mL de PBS, se desprendió (tripsinizó) la monocapa con 50 µL de tripsina y 750 µL de EDTA incubando durante 5 min. Pasado este tiempo, se adicionaron 5 mL de DMEM al 5 % de SFB para neutralizar la tripsina, se homogeneizó y se colocó en otra caja Petri la mitad del volumen total de esta solución celular. En ambas cajas se adicionó 5 mL de DMEM al 5 % de SFB y se incubaron en las condiciones mencionadas, hasta obtener una monocapa confluyente de la línea celular. Los cultivos se tripsinizaron siguiendo el procedimiento descrito, las soluciones celulares se juntaron en un tubo estéril. En una placa de 96 pozos se adicionaron 100 µL/pozo de dicha suspensión celular más 50 µL de DMEM sin SFB y se incubó hasta que se observó una monocapa confluyente de células Hep-2 en cada pozo.

#### **7.10.5.2 Estudio de citotoxicidad de la BFM**

Se utilizó la BFM de cada muestreo que se hizo a lo largo de los 6 meses de almacenamiento (Tabla 7.1); cuando se consideró necesario el pH se ajustó a un valor entre 7-8, requerido en el ensayo. Las diluciones seriadas (1:5, 1:10, 1:100 y 1:1000) de la BFM se realizaron en DMEM sin SFB, como control negativo se usó el mismo medio de cultivo sin el tratamiento (bebida). En la figura A2.1 del anexo II, se esquematizó la distribución de las muestras en la placa de 96 pozos.

Los ensayos de citotoxicidad tanto de la BFM como de sus diluciones (Figura A2.2, Anexo II) se realizaron por un método espectrofotométrico con alamarBlue, que es un colorante vital y se realizó de acuerdo con lo especificado por el proveedor. Es importante mencionar que este ensayo tiene como fundamento que el alamarBlue contiene resazurina que es un colorante azul en su forma oxidada, y que debido al metabolismo mitocondrial se reduce y se transforma en la resorufina que es de color rosa; el alamarBlue permite evaluar la viabilidad celular debido a que la absorbancia es proporcional al número de células vivas (hoja técnica proporcionada por el proveedor).

*Procedimiento.* Se retiró el medio de cultivo de cada pozo con células Hep-2 confluentes, luego se añadió 90 µL de la bebida concentrada y de sus diluciones, en el control solamente se adicionó DMEM sin SFB; se incubó por 2 h y después se añadió 10 µL de alamarBlue, se homogeneizó durante 5 min en una placa de agitación, seguido se incubó nuevamente por 72 h. En un lector de microplacas se registró cada 24 h la absorbancia a 570 y 600 nm (se usó para corregir los datos experimentales). El porcentaje de viabilidad (o supervivencia) de las células expuestas o no a la BFH se calculó con la ecuación 7.11 (tomada de la hoja técnica del reactivo de alamarBlue).

$$\%Viabilidad = \frac{(O2*A1)-(O1*A2)}{(O2*P1)-(O1*P2)} * 100 \quad (\text{Ec. 7.11})$$

Donde 1 y 2 son las longitudes de onda a 570 y 600 nm, respectivamente; O es el coeficiente de extinción molar del alamarBlue a estas longitudes de onda (80586 y 117216, respectivamente); A es la absorbancia en los pozos que contienen la BFM y P es la absorbancia del control negativo.

### 7.10.5.3 Cálculo del título viral por TCID<sub>50</sub>

El título viral se determinó por el ensayo de Dosis Infecciosa del 50 % del Cultivo de Tejido por mililitro (TCID<sub>50</sub>/mL, por sus siglas en inglés) como se detalla a continuación. En la figura A2.3 (Anexo II) se esquematizó la preparación de cuatro diluciones consecutivas (1:3, v/v) del VSRh: en el primer carril se pusieron 100 µL de la solución concentrada del virus y en el resto de los carriles 75 µL de DMEM sin SFB; posteriormente se colocaron 35 µL de la solución concentrada del VSRh en el segundo carril y así sucesivamente, el último carril se dejó como un control de células. En seguida, a los cultivos confluentes de una placa de 96 pozos se les retiró el medio de cultivo y por carril se añadió 50 µL de cada una de las concentraciones de VSRh que se prepararon previamente y se incubó durante 2 h. Se retiró la solución viral, se agregó 150 µL de DMEM sin SFB y se incubó por 72 h. Pasado este tiempo, se eliminó el medio de cultivo y se adicionó 50 µL de metanol para fijar las células, se incubaron a temperatura ambiente (25±2 °C) durante 3 min con agitación constante en una placa de agitación. Se eliminó el metanol y se tiñeron las células con 50 µL de solución de cristal violeta, nuevamente se incubó a temperatura ambiente durante 5 min en una placa de agitación. Seguido, se retiró la solución de tinción y se enjugó con agua corriente. Cada pozo se observó al microscopio y se inició con el de mayor dilución, se contabilizó el número de pozos con presencia de infectividad (sincitios) y el título viral se calculó con la ecuación 7.12. Es importante mencionar, que el ensayo se realizó solamente en una placa.

$$TCID_{50} = 10^{-(-\log \Delta + [-\log \delta (S - \frac{1}{2})])} \quad (\text{Ec. 7.12})$$

Donde  $\Delta$  corresponde a la última dilución en la que todas las filas presentan sincitios,  $\delta$  es el factor de dilución (3) y  $S$  igual al número total de pozos con presencia de sincitios entre el número de filas utilizadas en el ensayo.

#### 7.10.5.4 Actividad antiviral de la BFM en la etapa de unión del VSRh

La evaluación de la actividad anti-VSRh de la BFM en la etapa de unión del virus se llevó a cabo con el ensayo de  $TCID_{50}$ , para poder observar la disminución o no del título viral, siguiendo el procedimiento antes expuesto con algunas variantes. El título viral que se usó fue  $10.2 \times 10^4$  y a partir de esta solución de VSRh en una placa de 96 pozos se prepararon diluciones siguiendo el procedimiento de la figura A2.2 (Anexo II). En otra placa de 96 pozos se preparó la dilución no toxica (1:100) de la BFM de cada uno de los tiempos que se muestreó durante su almacenamiento a 4 °C (Tabla 7.1).

A cada pozo con monocapa confluyente de células HEp-2 se adicionó 50  $\mu$ L de la dilución 1:100 de la muestra de BFM en turno más de 50  $\mu$ L de cada una de las diluciones de la solución viral (Figura A2.4, Anexo II). Se incubó durante 4 h a 4 °C y posteriormente a 37°C durante 2 h. Se retiró la mezcla que no se absorbió y se añadió 150  $\mu$ L de DMEM sin FBS e incubó nuevamente por 72 h. A partir de aquí, se siguió el procedimiento descrito en el apartado 7.9.5.3, para la tinción de células y el cálculo de  $TCID_{50}/mL$ . Por último, el porcentaje de infectividad se calculó con la ecuación 7.13.

$$\% \text{ Infectividad} = \frac{TCID_{50}BFM}{TCID_{50}C} * 100 \quad (\text{Ec. 7.13})$$

Donde  $TCID_{50}BFM$  es el número de  $TCID_{50}$  para las células expuestas a la BFM y  $TCID_{50}C$  para control positivo. El resultado se reportó como un valor promedio del porcentaje de infectividad de todos los ensayos que se realizaron para la BFM de cada tiempo de almacenamiento a 4 °C.

### **7.11 Análisis estadístico**

El análisis estadístico de los parámetros que se evaluaron se realizó con el software Minitab 16.1 por la prueba de Tukey para un  $\alpha = 0.05$ . Los gráficos se elaboraron con el software Origin<sup>®</sup>Pro8.

## 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 8.1 Materia prima

#### Índice de madurez de los frutos de guayaba y granada

El puré que se obtuvo a partir del fruto de guayaba tuvo un valor de acidez titulable del 0.68 % referido como ácido cítrico y 13.9 °Brix, por lo tanto, cumplió con lo que establece la NMX-FF-040-1993 para este producto “los °Brix no deben ser menor a 12”. El índice de madurez de los frutos de guayaba tuvo un valor intermedio (20) con respecto a los reportados para guayaba que se cultiva en México (Padilla et al., 2014) y en Colombia (Rodríguez et al., 2010). Además, se constató que los frutos de granada colectados en el presente trabajo de tesis (Tabla 8.1) tuvieron un índice de madurez de consumo, cuyos valores fueron comparables con los reportados en literatura (Munera et al., 2019); es importante recordar que no existe una norma que especifique este parámetro para el fruto de *P. granatum*.

**Tabla 8.1.** Índice de madurez del fruto de *P. granatum*

Origen Estado de Oaxaca	°Brix	Acidez titulable (g ácido cítrico/L <sub>JUGO</sub> )	Índice de madurez
H. Cd. de Ejutla de Crespo	15.5	1.8	8.9
H. Cd. de Huajuapán de León	14.8	2.1	7.1

#### Concentrado de naranja comercial y puré de guayaba natural

El concentrado de naranja comercial (CN) tuvo 63.7±0.4 °Brix y a partir de este se estableció la cantidad de producto necesaria para tener valores de °Brix y pH similares a los del concentrado comercial utilizado en la formulación de la bebida mixta de la solicitud de patente MX/a/2017/007342 (González Mondragón et al., 2017). En el caso del puré de

guayaba (PG), previo a su incorporación con el resto de los componentes de la bebida, se estableció la cantidad de agua embotellada requerida para ajustar los °Brix y el pH a los del concentrado de guayaba comercial que se utilizó en el desarrollo de la bebida de la solicitud de patente MX/a/2017/007342 (González Mondragón et al., 2017).

### **Cáscara de *P. granatum***

El porcentaje de humedad fue del 28 y 21 % para la cáscara del fruto de granada colectado en H. Cd. de Ejutla de Crespo y H. Cd. de Huajuapán de León, respectivamente, similares a los valores que se obtuvieron previamente en el grupo de trabajo (Gómez-Castillo, 2018; López-Hernández, 2017) para cáscara de granada cultivada en el estado de Oaxaca. En la tabla 8.2 se muestran los valores del CPT de cada una de las tres etapas sucesivas de extracción de la mezcla de polvos de cáscara de granada colectados en el estado de Oaxaca (PCGO) con etanol al 70 % (1:50, p/v). De igual modo, se presenta el CPT de la mezcla de los tres extractos, la cual previamente se llevó a sequedad total (2,415.9 mg de extracto seco) y se disolvió en 5 mL de agua embotellada.

**Tabla 8.2.** CPT de las extracciones sucesivas del polvo de cáscara de granada de Oaxaca

<b>No. de extracción</b>	<b>CPT (µg EAG/mL de extracto)</b>
1	3,606.51
2	1,737.78
3	250.44
Mezcla	35,011.00

CPT: Contenido de Polifenoles Totales. Mezcla: los extractos de las tres etapas de extracción consecutivas se mezclaron a homogeneidad y se llevaron a sequedad total en un rotoevaporador a 45 °C.

El CPT en la mezcla de PCGO fue menor 1.8 veces comparado con el rendimiento del ECG que reportó Gómez-Castillo en el 2018, lo cual puede deberse a que los frutos fueron

colectados en el municipio de San Juan Bautista Cuicatlán, Oaxaca. Se ha comprobado que el CPT puede variar con respecto al lugar de origen del cultivo de los frutos y hortalizas (como se menciona en Gómez-Castillo, 2018).

## **8.2 Preparación de la bebida funcional mixta**

Cuando se preparó la bebida mixta y se adicionó el PG tamizado (con malla número 40 o 20) y sin tamizar, se observó una apariencia más homogénea de esta con el puré tamizado con el #20. Es importante mencionar también que se tuvieron excelentes resultados cuando se utilizó una licuadora manual con respecto al uso de un extractor de jugos. Por lo tanto, el PG se obtuvo utilizando la licuadora y con un tamizado posterior empleando una malla número 20.

Otro problema que se tuvo fue un color menos amarillo de la BFM comparado con el de la bebida de la solicitud de patente MX/a/2017/007342 (González Mondragón et al., 2017), motivo por el cual, se realizaron diferentes pruebas con el objetivo de identificar el componente responsable del oscurecimiento de la BFM en el presente trabajo. La bebida funcional mixta se preparó con base a la formulación y el procedimiento establecidos en la solicitud de patente MX/a/2017/007342 (González Mondragón et al., 2017). Se prepararon jugo de naranja y de guayaba, por separado, disolviéndolos en agua embotellada hasta una apariencia homogénea los concentrados respectivos, en las cantidades establecidas en la formulación de la BFM. También, se elaboraron bebidas tanto de naranja como de guayaba, utilizando los concentrados respectivos disueltos en agua embotellada con la adición de azúcar hasta alcanzar los °Brix de la BFM, así como, del resto de los componentes de la formulación y se mezclaron hasta una apariencia homogénea. El oscurecimiento del color amarillo únicamente se observó en la BFM.

Con base a lo anterior, se evaluó el posible efecto de la concentración del ECG y el origen del fruto de granada en el color de la bebida, para lo cual se preparó la BFM con 5

diferentes concentraciones de ECG obtenido en el presente trabajo, y a la par se utilizó un extracto que se obtuvo a partir de polvo de cáscara de granada que se colectó en Cuicatlán, Oaxaca; se usó como control la BM, es decir sin ECG. El color de la BFM con la menor concentración del ECG fue igual al de la BM y se fue incrementando el oscurecimiento de su color amarillo conforme se aumentó la concentración del extracto (datos no mostrados). Este efecto se observó independientemente del origen del fruto a partir del que se obtuvo la cáscara para obtener el extracto etanólico acuoso. Por lo tanto, se pudo concluir que la concentración del ECG que se usó en la BFM fue el factor responsable del oscurecimiento de su color. A pesar de esta evidencia, no se modificó el CPT que se adicionó en la bebida mixta debido a que en el presente trabajo de tesis se tomó la formulación de la BFM que presentó mayor actividad antiviral contra el VSRh (González Mondragón et al., 2017).

### **8.3 Evaluación de la bebida funcional mixta al tiempo cero**

#### **8.3.1 Parámetros fisicoquímicos**

Los °Brix, pH y cenizas totales de la BFM (Tabla 8.3) cumplieron con lo que especifican las normas nacionales e internacionales (Tabla 2.2 del marco teórico). Respecto a los sólidos totales (Tabla 8.3), las normas para bebidas no alcohólicas o mixtas no establecen límites mínimos ni máximos permisibles (Tabla 2.2 del marco teórico), sin embargo, los valores obtenidos fueron comparables con los reportados en literatura (García y Retana, 2007; Estrada, 2017). Es importante mencionar, que las investigaciones de bebidas mixtas frescas (recién preparadas o tiempo cero), con o sin extracto de una fuente natural (Tabla 8.4) no evaluaron todos los parámetros fisicoquímicos que se analizaron en el presente trabajo.

**Tabla 8.3.** Parámetros fisicoquímicos de la bebida funcional mixta al tiempo cero

Parámetro	Tiempo cero
°Brix	10.60±0.00
pH	3.75±0.01
Sólidos totales (%)	9.76±0.05
Cenizas totales (%)	0.15±0.00
Acidez titulable (g ác. cítrico/100 mL)	0.30±0.00
<b>Color instrumental</b>	
L*	54.11±0.31
a*	4.64±0.02
b*	50.31±0.20
C*	50.52±0.20
h°	84.72±0.02

L\*: luminosidad o claridad, de 0 (oscuros) a 100 (claros); a\* (luminosidad): rojo (+a) a verde (-a); b\*: amarillo (+b) a el azul (-b); C\*: cromaticidad; h° tono o matiz, 0-360°.

La acidez titulable de una bebida prebiótica (García y Retana, 2007) es igual al de la BFM y con valores similares de pH, sólidos solubles y cenizas totales. Los °Brix de la bebida funcional reportada por Lee y colaboradores en el 2006 son menores que los de la BFM, el pH y la acidez titulable son similares. También, los °Brix de la bebida del presente trabajo son similares al de una bebida mixta a base de frutos tropicales y yacón (Dionisio et al., 2016) pero no para otras bebidas para las cuales este parámetro es menor hasta 5 veces. Se sabe que el pH puede variar por los ingredientes del producto, sin embargo, la BFM y las bebidas de la tabla 8.4 tienen un pH ácido, a pesar de las diferencias en su composición. Finalmente, el porcentaje de cenizas menor de la BFM en comparación con algunas bebidas de la tabla 8.4 puede indicar que estas poseen mayor cantidad de materia inorgánica (García y Retana, 2007).

**Tabla 8.4.** Parámetros fisicoquímicos de bebidas mixtas o con extracto natural

Bebida	°Brix	pH	Acidez titulable (% ác. cítrico)	Cenizas totales (%)	Sólidos totales (%)	Ref.
Limón+extracto de semillas de mostaza: café amarilla	NR	NR	NR	0.25±0.01 0.50±0.01	NR	Chakraborty y Bhattacharjee (2018)
Jugo de remolacha+naranja 1:1 1:2	NR	4.17±0.01 4.03±0.00	0.43±0.01 0.59±0.01	NR	NR	Porto et al. (2017)
Frutas tropicales+yacón	9.40±0.10	3.38±0.01	0.69±0.00	NR	NR	Dionisio et al. (2016)
Jugo de piña+suero de queso indio: 10 % 20 % 30 %	15.0±0.01 14.7±0.01 14.9±0.02	4.32±0.01 4.89±0.02 5.47±0.01	1.48±0.02 1.40±0.01 1.32±0.01	0.22±0.01 0.27±0.01 0.30±0.01	NR	Baba et al. (2016)
Jugo de piña+suero de queso: 10 % 20 % 30 %	13.80±0.01 13.00±0.02 11.00±0.01	4.25±0.02 4.75±0.01 5.21±0.01	1.56±0.01 1.45±0.01 1.39±0.02	0.27±0.01 0.31±0.02 0.37±0.01		
Jugo de naranja+leche	14.83±0.06	4.39±0.01	NR	NR	NR	Sampedro et al. (2009)
Bebida probiótica: Base agua sabor naranja + fructooligosacáridos (prebiótico)	15.0	3	0.32	0.125	9.7	García y Retana (2007)
Bebida funcional	7.0	3.5	0.55	NR	NR	Lee et al. (2006)

NR: No reportado

Por otro lado, la adición del ECG en la bebida mixta (Tabla 8.5) provocó una disminución de 5 unidades aprox. en L\* con respecto a la BM, lo cual indicó una tendencia hacia el negro, lo que puede asociarse al oscurecimiento que se observó en dicha bebida; a\* aumentó en 2 unidades aprox. lo que significa una mayor tendencia hacia el rojo; h°

disminuyó aprox. en 2 unidades lo que indica un oscurecimiento en el color amarillo lo que también explica el color oscuro de la BFM y C\* permaneció constante. Por otro lado, el  $\Delta E$  entre la BM y la BFM fue de 6.09 por lo que se puede decir que fue evidente un cambio de color entre ambas bebidas, con base a lo que mencionan Amofa-Diatuo y colaboradores en el 2016 que “cuando el cambio de color total es superior a 3 hay una diferencia significativa pronunciada entre las muestras de alimentos”.

**Tabla 8.5.** Efecto de la adición del extracto de cáscara de granada en los parámetros de color instrumental de las bebidas mixta y funcional mixta

Parámetro	BM	BFM
L*	59.59±0.35 <sup>a</sup>	54.03±1.06 <sup>b</sup>
a*	2.21±0.01 <sup>b</sup>	4.38±0.03 <sup>a</sup>
b*	51.46±0.16 <sup>a</sup>	50.57±0.87 <sup>a</sup>
C*	51.50±0.16 <sup>a</sup>	50.75±0.87 <sup>a</sup>
h°	87.53±0.01 <sup>a</sup>	85.04±0.05 <sup>b</sup>
$\Delta E$	--	6.09±1.34

BM: bebida mixta. BFM: bebida funcional mixta. L\*: luminosidad o claridad, de 0 (oscuros) a 100 (claros); a\* (luminosidad): rojo (+a) a verde (-a); b\*: amarillo (+b) a el azul (-b); C\*: cromaticidad; h° tono o matiz, 0-360°.  $\Delta E$ : cambio de color total. Letras minúsculas iguales: no hubo diferencia entre valores de un mismo renglón a un nivel de significancia de 0.05.

El oscurecimiento de la BM al adicionar el ECG concuerda con lo reportado por Chakraborty y Bhattacharjee (2018), cuando adicionaron extractos de semillas de mostaza café o amarilla a una bebida de limón (Tabla 8.6). Por su parte, Amofa-Diatuo et al. (2016), mencionan que la adición de extractos de tallo de coliflor influye fuertemente en el color del jugo de manzana observando colores oscuros, verdosos y amarillentos según la concentración del extracto que utilizaron (Tabla 8.6).

**Tabla 8.6.** Parámetros fisicoquímicos de bebidas a base de zumos y/o extractos naturales

Parámetro	Bebida de limón			Jugo de manzana	
	SE	ESMC	ESMA	SE	40 % ETC
L*	15.41±0.5	26.35±0.40	21.59±0.40	-	-
a*	-0.77±0.0	-0.03±0.00	-1.26±0.00	-	-
b*	-3.41±0.03	9.15±0.09	4.47±0.09	-	-
C*	3.50±0.03	9.40±0.09	4.28±0.07	2.25±0.10	2.34±0.06
h°	257.23±2.50	90.21±2.50	105.25±2.5	49.69±0.75	58.39±0.35
Ref.	Chakraborty y Bhattacharjee (2018)			Amofa-Diatuo et al. (2016)	

SE: Sin extracto. ETC: Extractos de tallo de coliflor. ESMC: Extracto de semilla de mostaza café. ESMA: Extracto de semilla de mostaza amarilla. C\*: cromaticidad; h° tono o matiz: 0°-360.

### 8.3.2 Efecto del proceso de pasteurización

La BFM no registró carga microbiana por lo que puede decirse que las condiciones de pasteurización fueron adecuadas. Los resultados son comparables con los reportados para la bebida mixta elaborada a base de frutos tropicales y yacón sometida a 85°C por 90 s (Dionisio et al., 2016). Por otro lado, no tuvo efecto en los °Brix, acidez titulable, CPT y AA (Tabla 8.8), por lo que se decidió que la adición de la solución de extracto de cáscara de granada fuera antes del proceso de pasteurización. Estos resultados son importantes desde el punto de vista de un proceso industrial para la elaboración de la BFM, debido a que primero se hará la mezcla de todos los ingredientes, incluyendo el extracto, y posteriormente el envasado y la pasteurización (Figura 2.8, Marco teórico).

**Tabla 8.7.** Efecto del proceso de pasteurización en los °Brix y acidez titulable, CPT y AA de la BFM

Adición del ECG a la bebida mixta	°Brix	Acidez titulable (g ác. cítrico/100 mL <sub>bebida</sub> )	CPT (mg EAG/mL <sub>bebida</sub> )	AA <sup>1</sup> (% Inhibición DPPH')	AA <sup>2</sup>
Antes del proceso de pasteurización	10.7±0.1 <sup>a</sup>	0.315±0.007 <sup>a</sup>	718.65±9.97 <sup>a</sup>	97.69±0 <sup>aA</sup>	96.21±0.21 <sup>aA</sup>
Después del proceso de pasteurización	10.6±0.0 <sup>a</sup>	0.310±0.000 <sup>a</sup>	736.15±62.16 <sup>a</sup>	97.19±0.76 <sup>aA</sup>	96.17±0.17 <sup>aA</sup>

ECG: Extracto etanólico al 70 % de cáscara de granada. CPT: Contenido de polifenoles totales. AA: Actividad antioxidante. 1. Agua embotellada para preparar el control negativo. 2. Agua destilada para preparar el control negativo. Letras minúsculas iguales: no hubo diferencia entre valores de la misma columna a un nivel de significancia de 0.05. Letras mayúsculas iguales: no hubo diferencia entre valores de un mismo renglón a un nivel de significancia de 0.05.

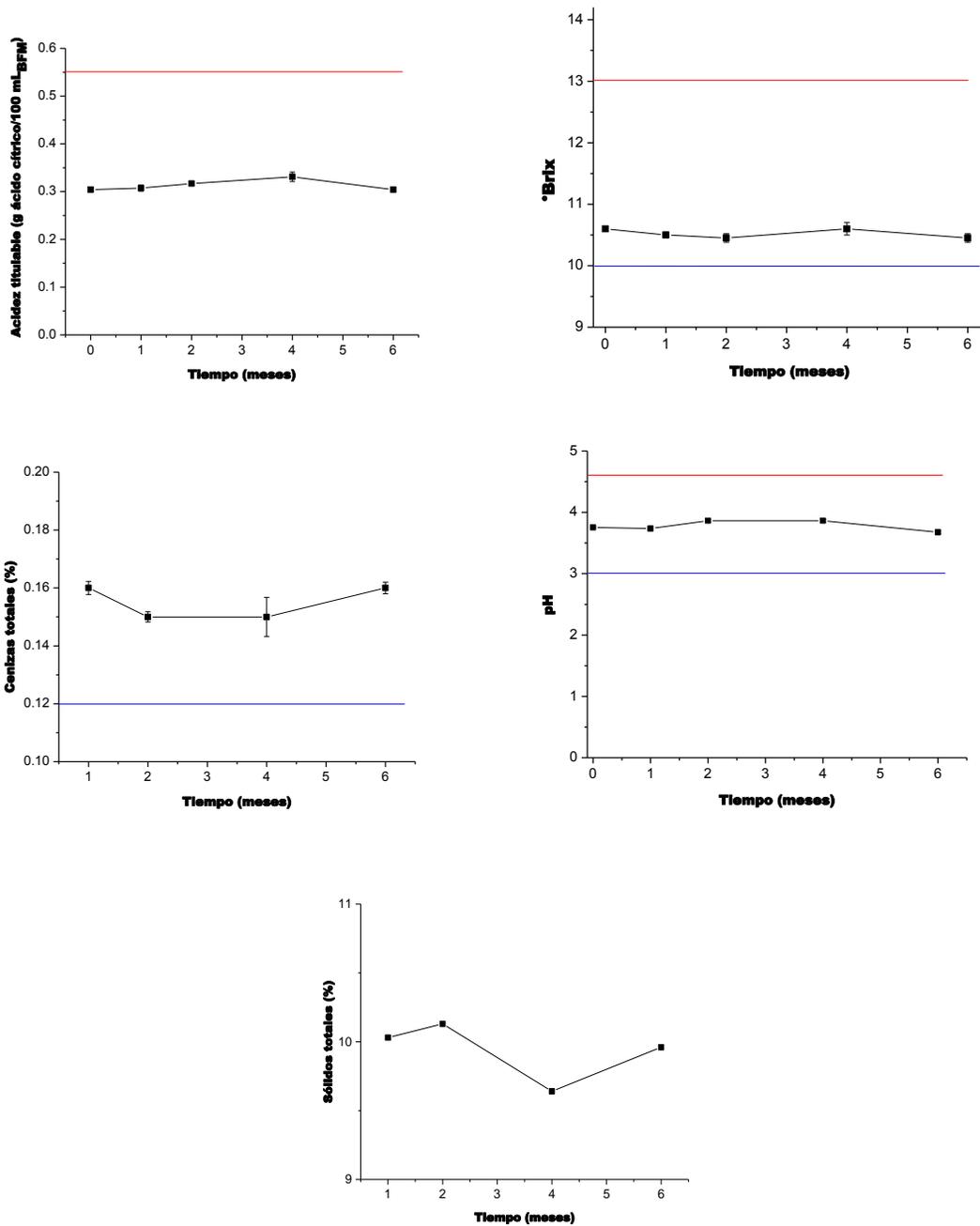
Por último, en una primera evaluación sensorial exploratoria entre la BM y la BFM con 6 personas no entrenadas, resultó que el olor y sabor que más agrado fue la de la BFM; los comentarios fueron que para dicha bebida el olor que se percibió fue de guayaba y el sabor fue de naranja (caso contrario para la BM). El color con mayor preferencia fue el del BM porque su color más amarillo se asoció a una bebida a base de naranja. Por lo tanto, se puede decir que el ECG influyó en las propiedades organolépticas de la BFM.

## 8.4 Evaluación de la bebida funcional mixta durante su almacenamiento

### 8.4.1 Parámetros fisicoquímicos

En la figura 8.1 se muestra la tendencia de los valores de acidez titulable (g ácido cítrico/100 mL), °Brix, cenizas totales (%), pH y sólidos totales (%). Para el caso de los cuatro primeros parámetros se indicaron, cuando fue el caso, con líneas continuas el límite mínimo (azul) y máximo (rojo) establecidos en normas nacionales e internacionales consideradas en el presente trabajo (Tabla 2.2, Marco teórico).

En todos los casos se observó variación en los valores lo que es un comportamiento común para alimentos y ha sido reportado por algunos autores para bebidas mixtas (Dionisio et al., 2016; Porto et al., 2017), no obstante, se mantuvieron dentro de los límites permitidos, lo que implica que con respecto a dichos parámetros fisicoquímicos la BFM cumplió con la calidad establecida en normas nacionales e internacionales para bebidas mixtas y no alcohólicas. Por otro lado, el análisis estadístico (Tabla A3.1, Anexo III) dejó ver que durante los 6 meses de almacenamiento a 4°C de la BFM, no hubo diferencia significativa entre los datos de los °Brix, porcentaje de cenizas totales (a pesar de que en el mes 4 mostró una mayor desviación estándar, posiblemente debido a la manipulación de la muestra), mientras que el pH, sólidos totales (%) y acidez titulable (g ácido cítrico/100 mL) sí fueron diferentes en algunos meses del período de almacenamiento (Tabla A3.1, Anexo III) pero no entre el valor inicial y el final como fue el caso de la acidez titulable, por lo tanto, las variaciones observadas pueden deberse a complejidad de la matriz alimenticia. La oscilación de los valores de los parámetros fisicoquímicos durante el almacenamiento concuerda con lo que reportaron algunos autores para bebidas mixtas almacenadas a temperatura de refrigeración (Tabla 8.8); cabe señalar que solamente evaluaron dos o tres de los parámetros de lo que se analizaron en el presente trabajo de tesis.



**Figura 8.1.** Límites mínimos (línea azul) y máximos (línea roja) establecidos en las normas nacionales e internacionales para bebidas no alcohólicas o mixtas. No todas las normas consideradas tienen ambos límites establecidos.

**Tabla 8.8.** Valores de pH y acidez titulable de bebidas funcionales y/o mixtas durante el almacenamiento

Bebida	Temperatura (°C)	pH	Acidez titulable (% ác. cítrico)	°Brix	Tiempo de almacenamiento (meses)	Observaciones durante el almacenamiento	Ref.
Jugo de remolacha+naranja 1:1 1:2	4	4.17-4.16 4.03-4.03	0.43-0.41 0.59-0.54	NR	1.0 Monitoreo cada 5 días	Se observan fluctuaciones en los valores de la acidez titulable de ambas formulaciones.	Porto et al. (2017)
Frutas tropicales+yacón	5	3.38-3.10	0.69-0.73	9.40-9.07	7.5 Monitoreo cada 45 días	Se tienen fluctuaciones en los tres parámetros evaluados.	Dionisio et al. (2016)

Nota: El tiempo se puso en meses para efecto comparativo con los resultados del presente trabajo. NR. No reportado. Cada par de números corresponde a los valores inicial (izquierdo) y final (derecho) registrado para el parámetro correspondiente.

La acidez titulable de una bebida de limón adicionada con extracto de mostaza café mostró fluctuaciones durante su almacenamiento a 4 °C por 365 días y la disminución en este parámetro se relacionó con el aumento del pH a partir del día 120 (Chakraborty y Bhattacharjee, 2018). Este comportamiento no aplica para la BFM la cual, a pesar de la diferencia significativa en la acidez titulable durante su almacenamiento, los valores de los meses 1 y 6 fueron iguales estadísticamente. Chim et al. (2013) mencionan que la acidez es un parámetro de calidad importante en un producto porque su aumento puede relacionarse con algunos procesos de descomposición (hidrólisis, oxidación y fermentación), mediante los cuales se producen compuestos ácidos, en el caso de la BFM cumple con lo establecido en norma a pesar de las oscilaciones que se registraron.

### **Color instrumental**

Los parámetros  $L^*$ ,  $b^*$ ,  $C^*$  y  $\Delta E$  de la BFM fueron estadísticamente iguales (Tabla A3.1, Anexo III), durante los 6 meses de almacenamiento a 4 °C y fue el caso contrario para  $a^*$  y  $h^\circ$ . De acuerdo con el diagrama de cromaticidad (Figura 2.9) se puede decir que la BFM se ubicó en los colores claros ( $L^*$ ), en el amarillo ( $b^*$ ), en los tonos rojos ( $C^*$ ) y que no hubo  $\Delta E$  durante el período evaluado, por lo tanto, la variación de  $a^*$  y  $h^\circ$  no influyó de manera importante en la estabilidad del color de la BFM.

Los parámetros  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C^*$  y  $h^\circ$  de unas bebidas de limón adicionadas con extracto de mostaza café o amarilla, fueron constantes hasta los 180 días (6 meses) de almacenamiento a 4 °C. Sin embargo, a los 365 días (12 meses) en ambas bebidas aumentó  $L^*$  y disminuyó  $b^*$  presentando un tono más claro debido posiblemente a la degradación de carotenoides por su almacenamiento prolongado (Chakraborty y Bhattacharjee, 2018). La estabilidad de la BFM en cuanto a los parámetros de color instrumental es parecida al de ambas bebidas de limón con extracto de mostaza café o amarilla a los 6 meses de su almacenamiento. Por otro lado,  $L^*$  disminuyó,  $b^*$  aumentó y  $a^*$  se mantuvo constante en el caso de una bebida a base de jugo de

naranja y leche a las 4 semanas (1 mes) de almacenamiento a 8-10 °C (Sampedro et al., 2009), la BFM a diferencia de este reporte no presentó diferencia significativa en los parámetros  $L^*$  y  $b^*$ . Porto et al. (2017) exponen que una bebida de jugo de remolacha con naranja a los 30 días (1 mes) de almacenamiento en refrigeración (4 °C), aumentaron  $L^*$ ,  $a^*$  y  $C^*$ ;  $b^*$  disminuyó, y los zumos fueron rojos más claros. La BFM fue más estable comparada con la bebida de jugo de remolacha con naranja. Finalmente, no hubo diferencia estadística significativa para el parámetro BI por lo tanto se puede decir que la BFM no presentó oscurecimiento durante el período de almacenamiento, lo que se sustenta con el hecho de que  $L^*$  y  $\Delta E$  no cambiaron.

#### **8.4.2 Carga microbiana**

Hasta el final de su almacenamiento la BFM se mantuvo inocua (< 10 UFC/mL) para todas las pruebas microbiológicas realizadas; es un resultado importante debido a que la carga microbiana es un parámetro crítico para cualquier alimento y se debe cumplir con el objetivo de brindar alimentos seguros al consumidor. La inocuidad de la bebida funcional puede deberse principalmente al tratamiento térmico que fue efectivo.

La disminución en los °Brix en bebidas pueden estar asociado a procesos fermentativos causados por un tratamiento térmico o envasado incorrectos (García y Retana, 2007), dicho parámetro en el caso de la BFM no cambió significativamente durante el almacenamiento lo que se puede relacionar con el hecho de que no hubo presencia de levaduras. Tanto la acidez titulable (Kausar et al., 2012) como el pH < 4 (García y Retana, 2007), son parámetros importantes para evitar el crecimiento microbiano en alimentos durante su almacenamiento, y en caso de la BFM ambos parámetros cumplieron con lo que especifica la norma.

En la tabla 8.9 se presentan datos de publicaciones respecto al análisis microbiológico de diferentes bebidas mixtas o adicionadas con un extracto natural, además, se detallan las condiciones de los procesos de su pasteurización y almacenamiento.

**Tabla 8.9.** Evaluación de la calidad microbiológica durante el almacenamiento de diferentes bebidas mixtas o adicionadas con un extracto natural

Bebida	Condiciones de pasteurización	Temperatura de almacenamiento (°C)	Tiempo de almacenamiento con calidad microbiana (días)	Ref.
Limón+extracto de semillas de mostaza: café amarilla	NR	4	8.0 12.0	Chakraborty y Bhattacharjee (2018)
Frutas tropicales+yacón	85°C, 90 s	5	3.0	Dionisio et al. (2016)
Jugo de piña+suero de queso indio: 10 % 20 % 30 %	SP	Refrigeración	1.3	Baba et al. (2016)
Jugo de piña+suero de queso: 10 % 20 % 30 %	SP	Refrigeración	1.3	
Jugo de naranja+leche	85°C, 66 s	8-10	0.5	Sampedro et al. (2009)
Naranja prebiótica	60°C, 1800 s	4	1.0	García y Retana (2007)

Nota: El tiempo se puso en meses para efecto comparativo con los resultados del presente trabajo. NR: No reportadas. SP: Sin pasteurización.

Como se puede observar la mayoría de las bebidas conservan su calidad microbiológica por menor tiempo con respecto a la BFM (6 meses), a excepción de las bebidas de limón-mostaza

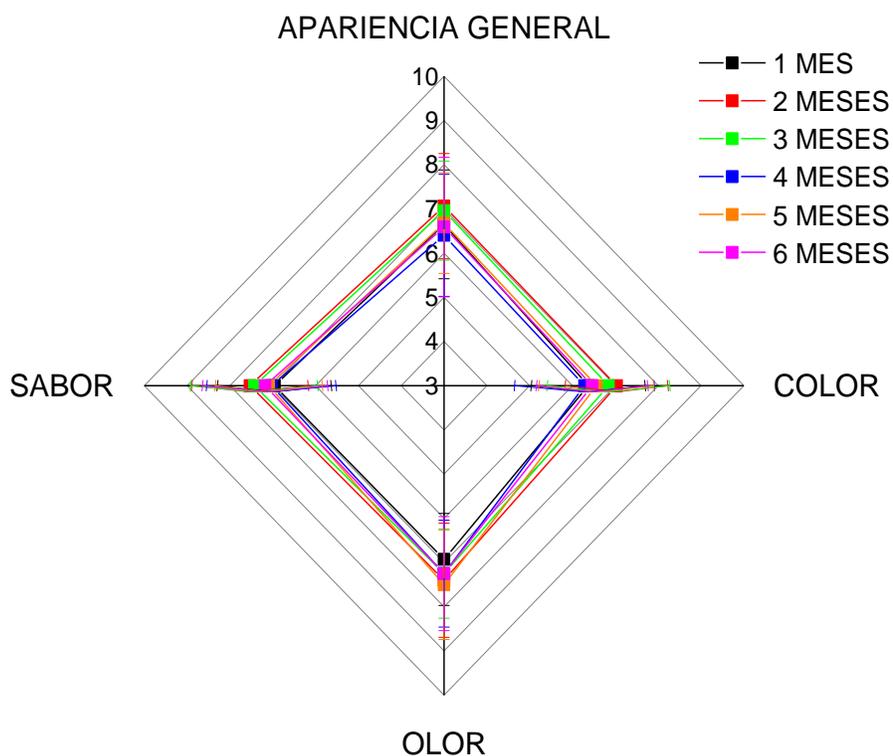
para las que fue mayor. También se puede resaltar la importancia del proceso de pasteurización además de la temperatura de almacenamiento como se evidencia para las bebidas que desarrollaron Baba et al. (2016).

La bebida a base de frutas tropicales y yacón estuvo libre de coliformes fecales, *E. coli* y *Salmonella* durante 225 días (7.5 meses) de almacenamiento, sin embargo, se presentó crecimiento de hongos filamentosos y levaduras a partir de los 45 días (1.5 meses), se mantuvo dentro del límite permitido hasta los 90 días (3 meses) (Dionisio et al., 2016). Sampedro y colaboradores (2009) reportaron para su bebida un exceso en la carga microbiana después de dos semanas de almacenamiento, el incremento fue de alrededor de 6 logaritmos para bacterias y levaduras, a pesar de que las condiciones de pasteurización y almacenamiento fueron similares a las de la BFM. Se puede mencionar que la BFM tiene mejor calidad microbiana a pesar de que el proceso de pasteurización y temperatura de almacenamiento fueron similares.

Por otra parte, se dice que la disminución del pH e incremento de la acidez en las bebidas se puede deber a la producción de ácidos como acético y láctico (Kausar et al., 2012) por la acción de microorganismos que degradan carbohidratos durante el almacenamiento (Dionisio et al., 2016; Sampedro et al., 2009). La disminución del pH que se observó durante el almacenamiento de la BFM no se puede asociar con el crecimiento microbiano debido a que fue nulo, lo que sustenta que la variación en los valores de dicho parámetro puede deberse a la naturaleza compleja de la misma.

#### **8.4.3 Evaluación sensorial**

Los resultados que se obtuvieron de la evaluación del nivel de agrado de la BFM para cada parámetro se muestran en la tabla A3.2 (Anexo III) y en la figura 8.2.



**Figura 8.2.** Atributos de la evaluación sensorial de la BFM durante su almacenamiento a 4 °C.

Se observó al segundo mes de almacenamiento que tanto la apariencia general ( $7.06 \pm 1.19$ ) y el color ( $7.03 \pm 1.20$ ) tuvieron un nivel de agrado mayor, y que fue menor para estos mismos atributos al cuarto mes ( $6.4 \pm 1.38$  y  $6.28 \pm 1.63$ , respectivamente). El olor tuvo un nivel de agrado menor en el primer mes de su almacenamiento ( $6.93 \pm 1.04$ ) e incrementó siendo mayor al mes 5 ( $7.5 \pm 1.24$ ). Por último, el sabor obtuvo un nivel de agrado mayor en el mes 2 ( $7.53 \pm 1.36$ ) y menor al primer mes ( $6.96 \pm 1.33$ ). Adicionalmente, el coeficiente de Pearson mostró una fuerte correlación entre el color y la apariencia general (0.97), ambos atributos con menor grado de aceptación.

Sin embargo, el análisis estadístico mostró que no hubo diferencia significativa en cada uno de los atributos sensoriales a lo largo del período de tiempo que se evaluó. Lo anterior reflejó que

la BFM se mantuvo sensorialmente estable durante los 6 meses a la temperatura de su almacenamiento.

Respecto a la distribución de frecuencia (%) de la respuesta (Figuras A3.1 a A3.4, Anexo III), para la BFM al tiempo cero, los cuatro parámetros evaluados registraron un porcentaje máximo de 7 (olor, sabor) y 8 (apariencia general, color) de acuerdo con la escala hedónica que se usó en el presente trabajo de tesis. A partir del primer mes de almacenamiento la apariencia general y color de la BFM tuvieron la mejor distribución con un porcentaje de frecuencia máximo ubicado en 7 de la escala hedónica, con 8 y 6 igual o muy cercanos, a excepción del mes 3 donde 9 fue la escala donde se tuvo el máximo valor de frecuencia. En el caso del olor, la mayor frecuencia de distribución (%) fue para 8 de la escala hedónica, con valores cercanos en 7 y 9, a partir del segundo mes y hasta el final del almacenamiento alcanzó un valor por arriba del 40 %. El parámetro del sabor registró porcentajes de frecuencia de distribución mayores para 8 (meses 1, 4, 5 y 6) y 9 (meses 2 y 3) de la escala hedónica.

Los panelistas emitieron comentarios positivos y negativos de la BFM (Tabla 8.10), algunos expresaron en el formato de evaluación que detectaron olores y sabores característicos de la naranja y la guayaba, ambos frutos utilizados en el desarrollo de la BFM.

**Tabla. 8.10.** Porcentaje de los comentarios positivos y negativos obtenidos mediante la evaluación sensorial de la BFM

<b>Atributo</b>	<b>Comentarios positivos %</b>	<b>Comentarios negativos %</b>
Apariencia general	57	42
Color	35	65
Olor	76	24
Sabor	68	32

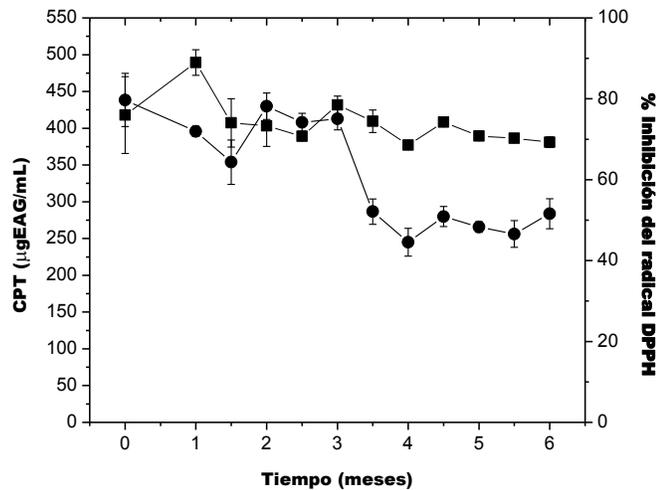
Kausar et al. (2012), mencionan que el cambio en el color en una bebida puede deberse a las reacciones de Maillard, sin embargo, en el caso de la BFM se tiene la evidencia que la adición del extracto influyó en su color desde su preparación y no se tuvo un cambio significativo durante su almacenamiento en refrigeración. Porto et al. (2017), le confirieron al jugo de naranja presente en su bebida mixta con remolacha, la aceptación sensorial que esta tuvo (color, aroma, sabor y aceptación general). En el caso de las bebidas de limón con mostaza café y amarilla, almacenadas a  $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ , presentaron crecimiento microbiano inaceptable después 240 y 360 días, respectivamente y, a pesar de ello, conservaron un aroma dulce agradable (Chakraborty y Bhattacharjee, 2018).

Dos bebidas mixtas recién preparadas, evaluadas mediante una escala hedónica de 9 puntos con puntuaciones iguales a las que se utilizaron en este trabajo de tesis (Tabla A1, Anexo I), reportan valores de 6.58 a 7.75 para las de jugo de piña con suero de queso (Baba et al., 2016), así como, puntuaciones entre 6.3 y 8.0 para las bebidas de jugos de naranja-remolacha (Porto et al., 2017); estos valores son cercanos a las puntuaciones de la BFM de este estudio los cuales se encontraron entre 6 (me gusta ligeramente) y 8 (me gusta mucho).

#### **8.4.4 Contenido de polifenoles totales y actividad antioxidante**

El tiempo de almacenamiento de la BFM influyó en la estabilidad tanto del CPT como de la AA (Figura 8.3). En el caso del primer parámetro, los valores oscilaron entre 489.3 y 376.86 mg EAG/mL, sin embargo, solamente hubo diferencia estadísticamente significativa entre los meses 1 y 3 con respecto al resto de los tiempos analizados (Tabla A3.3, Anexo III), registrándose una disminución del 47.0 % entre el tiempo cero ( $718.65\pm 9.97$  mg EAG/mL) y los 6 meses ( $380.96\pm 7.09$  mg EAG/mL). La AA mostró mayor variación en comparación con el CPT (Figura 8.3); los valores oscilaron entre 78.18 y 44.54 % de inhibición del radical DPPH<sup>\*</sup>, al final del almacenamiento la BFM también tuvo una disminución del 45.6 % entre el tiempo cero

(97.19±0.76 %) y los 6 meses (51.58±3.70 %). Los valores de AA fueron estadísticamente iguales a partir de los 3.5 meses y hasta que concluyó el período total de evaluación (Tabla A3.3, Anexo III). Por lo tanto, se puede decir que la BFH fue estable con respecto al CPT y la AA debido a que dichos parámetros no registraron una disminución mayor al 50 %.



**Figura 8.3.** Gráfico comparativo entre el CPT (■) y la AA (●) de la BFM, registrados durante 6 meses de almacenamiento a 4 ° C. CPT: Contenido de polifenoles totales. AA: Actividad antioxidante.

Ananingsih et al. (2013) mencionan que a pH de 3.0 los polifenoles disminuyen su degradación; la BFM tiene un pH ácido, aunque es mayor a 3.0, no obstante, tal vez sí pudo influir en la estabilidad de los compuestos polifenólicos presentes lográndose conservar más del 70 % de su concentración original. Por otro lado, Chakraborty y Bhattacharjee (2018) atribuyen la calidad de sus bebidas de limón a la actividad antimicrobiana del extracto de semillas de mostaza café y amarilla adicionadas en dichas bebidas; Pagliarulo et al. (2016 como se citó en Carbonell-Barrachina y Cano-Lamadrid, 2017) demostraron que los polifenoles presentes en los extractos de zumo y la piel de granada (*Punica granatum*) poseen actividad antimicrobiana eficaz. Con base a lo anterior, la nula carga microbiana que se observa a lo largo de los 6 meses de

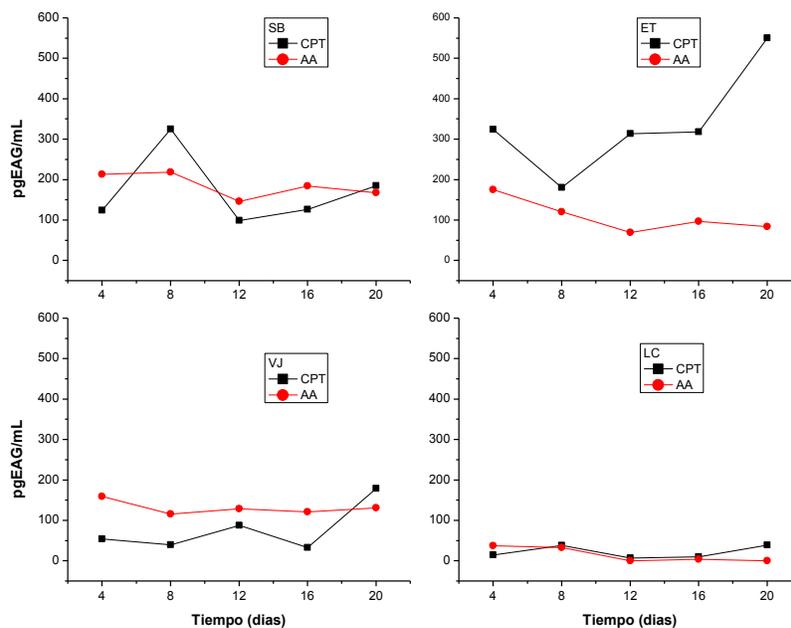
almacenamiento de la BFM también puede deberse en parte al CPT, así como, al tipo y concentración de compuestos polifenólicos presentes en esta (González Mondragón et al., 2017).

La bebida de frutas tropicales con yacón de Dionisio et al. (2016) no tuvo alteraciones significativas con respecto al CPT (mg EAG/100g) ni a la AA (g de jugo/g DPPH') a los 0, 45, 90, 135, 180 y 225 días de almacenamiento a 5°C. Gironés-Vilaplana et al. (2013), reportan que la actividad antioxidante (% inhibición del radical superóxido) se mantuvo por arriba del 80 % durante los 70 días del almacenamiento de su bebida de limón, bayas de acai, maqui y espino negro. Sin embargo, este comportamiento no concuerda con la publicación de Castro-López et al. (2016), quienes evaluaron la estabilidad a 4 °C (0, 8, 12, 16 y 20 días) de varias bebidas mixtas comerciales a base de frutas, vegetales y/o extractos naturales (Tabla 8.11), con respecto al CPT (pg EAG/mL) y AA (pg EAG/mL).

Los valores iniciales de dichos parámetros fueron diferentes para cada bebida, lo que era de esperarse por la composición diferente de estas. Los gráficos comparativos del CPT y la AA para sus bebidas (Figura 8.4, construida con datos tomados de Castro-López et al., 2016) muestran variaciones a lo largo del período de evaluación, lo que concuerda con el comportamiento que presenta la BFM tanto para los mismos parámetros.

**Tabla 8.11.** Composición de las bebidas mixtas comerciales

Nombre de la bebida y su composición
Vital Joy (VJ): jugo de naranja, jugo de zanahoria, puré de manzana, puré de mango y jugo de limón
Splash Blend (SB): agua de coco, jugo de naranja, salsa de durazno, puré de manzana, puré de mango y puré de guayaba
Energy-T (ET): agua, azúcar, jugo de limón y extracto de té negro
Limonada con pepino (LC): agua, azúcar, jugo de limón y pulpa de pepino



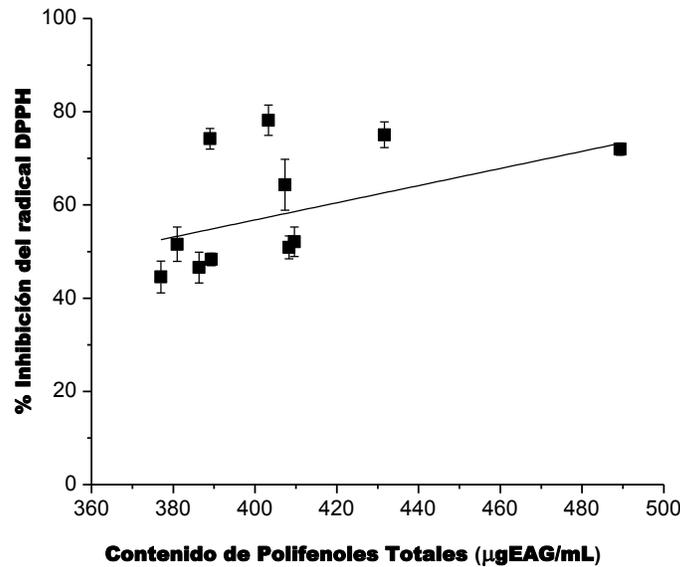
**Figura 8.4.** Gráfico comparativo entre el CPT y la AA construido a partir de los datos reportados por Castro-López et al. (2016). CPT: Contenido de polifenoles totales. AA: Actividad antioxidante. VJ: Vital Joy. SB: Splash Blend. ET: Energy-T. LC: Limonada de pepino.

En todos los casos la AA tiende a disminuir al final del almacenamiento en un 22, 48, 18 y 100 % para SB, ET, VJ y LC, respectivamente; la BFM fue similar a SB y VJ. Sin embargo, es el caso contrario con el CPT el cual se incrementa a los 20 días de manera considerable para ET y VJ, lo que no sucedió con la BFM.

Porto et al. (2017) también observó oscilación cada 5 días en el CPT para bebidas elaboradas con jugo de remolacha-naranja, almacenadas 30 días a 4 °C; el valor final del parámetro para dichas bebidas ( $485 \pm 65$  a  $459 \pm 59$   $\mu\text{g EAG/mL}$ ) es similar con el de la BFM al primer mes de su almacenamiento. En el caso de una bebida de tomate de árbol y leche descremada tanto la AA y el CPT disminuyeron durante su almacenamiento a 4 °C por 28 días (Santander-M et al., 2017),

un comportamiento similar al que presentaron estos parámetros en la BFM, pero en menor tiempo.

La gráfica de CPT vs AA de la BFM no mostró de forma clara una relación directa entre ambos (Figura 8.5) lo que se corroboró con el valor del coeficiente de correlación de Pearson (0.53). Se puede decir que sí existe una relación entre el CPT y la AA pero no es fuerte ( $<0.8$ ), por lo tanto la AA no depende únicamente del CPT sino de otros componentes presentes en la BFM (González Mondragón et al., 2017) como la vitamina C.

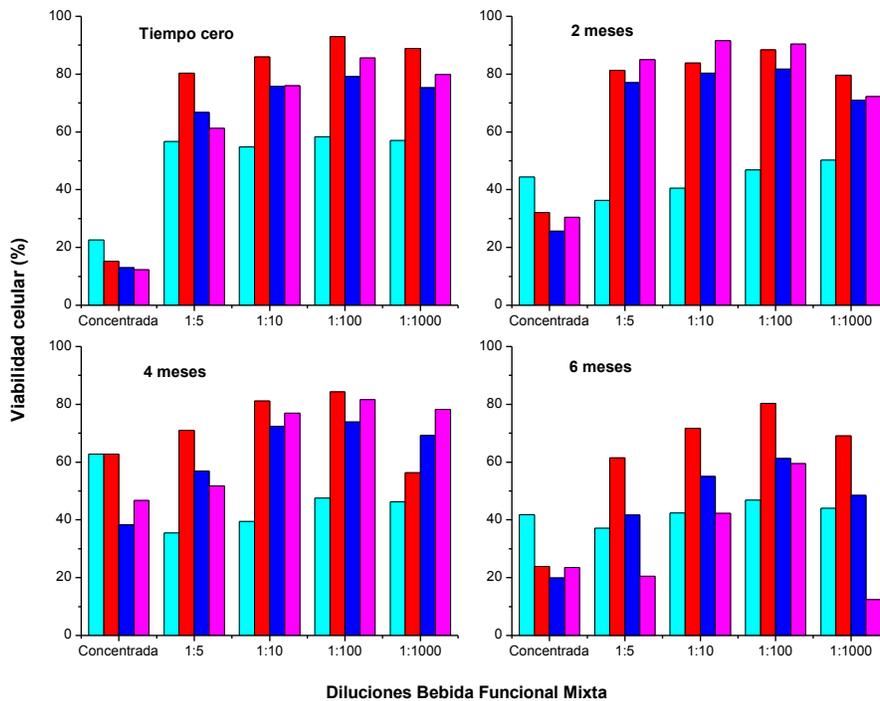


**Figura 8.5.** Correlación entre el contenido de polifenoles totales y la actividad antioxidante de la BFM.

#### 8.4.5 Actividad contra el VSRh

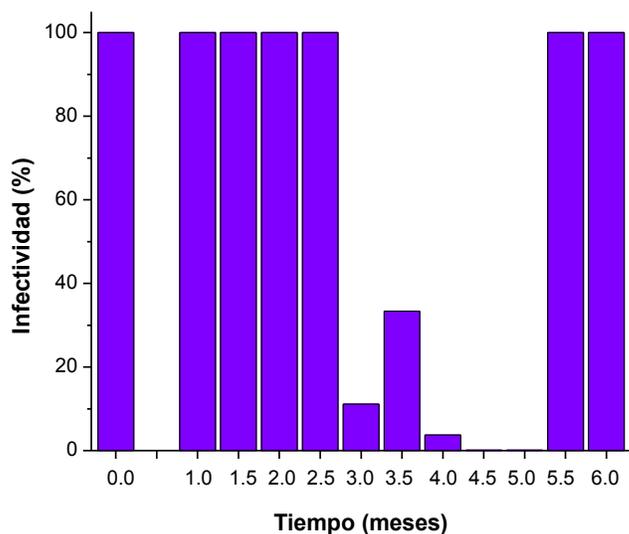
Se pudo observar que hasta el final de la cinética (72 h) la dilución 1:100 de la BFM siempre registró valores mayores al 50 % de viabilidad celular con respecto al resto de las diluciones que

se evaluaron (Figura 8.6); en la figura A3.5 y en la tabla A3.4 del anexo III se presentan los resultados completos. Con base a lo anterior, se decidió utilizar la dilución 1:100 en los experimentos del efecto de la BFM en la etapa de unión del VSRh a las células HEp-2.



**Figura 8.6.** Ensayo de citotoxicidad de células HEp-2 (%) frente a la bebida funcional mixta. Se realizaron cinéticas de 72 h empleando cultivos confluentes de células Hep-2 incubados con diferentes diluciones (1:5, 1:10, 1:100 y 1:1000) de la BFM y sin diluir, a diferentes tiempos (0, 2, 4, y 6 meses) de almacenamiento a 4 °C. Se hicieron muestreos cada 24 h: 0 h (barras color cian), 24 h (barras color rojo), 48 h (barras color azul) y 72 h (barras color magenta).

Por otro lado, el título viral disminuyó en presencia únicamente de los tratamientos de los meses 3.0, 3.5, 4.0, 4.5 y 5.0, lo que correspondió al 11.1, 33.3, 3.7, 0.1 y 0.1 de porcentaje de infectividad del VSRh, respectivamente (Figura 8.7, Tabla A3.5, Anexo III).

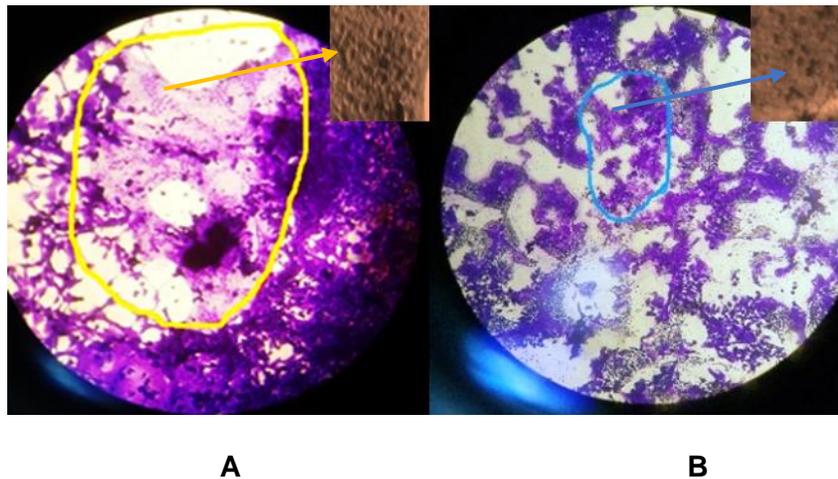


**Figura 8.7.** Efecto de la BFM determinado por ensayo de unión del VSRh a las células HEp-2. La BFM a una dilución de 1:100 se incubó con el virus sincitial respiratorio con un título viral de  $10.2 \times 10^4$ .

Se pudo constatar que la BFM sí posee actividad anti-VSRh a pesar del comportamiento atípico de los datos del porcentaje de infectividad del virus, obtenidos cuando las células se expusieron con la bebida de diferentes tiempos de almacenamiento (Tabla A3.5, Anexo III). Se esperaba un mayor efecto antiviral para la BFM de los primeros tiempos de almacenamiento a 4 °C, para tratar de explicar esta tendencia inesperada y con base a la evidencia previa de que la BFM disminuye el tamaño de los sincitios lo que posiblemente es uno de los mecanismos de su actividad contra el VSRh (González Mondragón et al., 2017), se decidió medir el tamaño de los sincitios solamente en las muestras de 2.5, 3.0, 5.0 y 5.5 meses de almacenamiento, debido a que se tuvo el 100, 11.1, 0.1 y 100 % de infectividad del virus, respectivamente (Tabla A3.5, Anexo III). Dicho análisis se realizó como se describe a continuación: se tomaron tres fotografías a los pozos de la última dilución del virus (apartado 7.9.5, Materiales y métodos), donde todos

presentaron sincitios, y de tres donde no se puso la bebida (sin tratamiento); estas se cargaron al programa GIMP 2.10.24 donde cada fotografía se hizo coincidir con un micrómetro del microscopio. A continuación, se seleccionaron y midieron ( $\mu\text{m}$ ) tres sincitios por fotografía.

En las figuras 8.8 A y B se señalan con un círculo uno de los sincitios que se observaron al microscopio en cada caso, así como, los múltiples núcleos (insertos en cada una de las figuras) lo que es una característica propia de los sincitios, los cuales se formaron independientemente de la exposición o no al tratamiento. Fue evidente el tamaño menor de los sincitios cuando las células fueron expuestas a la BFM.



**Figura 8.8.** Fotografías de: sincitio sin tratamiento (A) y con tratamiento (B), así como, sus múltiples núcleos (insertos en las figuras). El tratamiento fue la dilución 1:100 de la BFM de cada uno de los tiempos de almacenamiento. Los sincitios se midieron utilizando el programa GIMP 2.10.24.

La exposición de las células HEp-2 a la BFM provocó una disminución significativa del tamaño del sincitio con respecto a los observados en aquellas sin el tratamiento (Tabla 8.12). Por otro lado, el análisis estadístico demostró que entre los meses 2.5 y 3.0 no hubo diferencia significativa en el tamaño de los sincitios a pesar de la diferencia en la disminución en la carga viral (0 y 88.9

%, respectivamente), sin embargo, para los meses 5.0 y 5.5 sí hubo diferencia significativa con una disminución del 99.1 y 0 %, respectivamente (Tabla 8.12). Por lo tanto, no fue posible relacionar una menor carga viral con la disminución significativa del tamaño del sincitio.

**Tabla 8.12.** Diferencia en el tamaño de los sincitios con y sin tratamiento

Tiempo (meses)	Tamaño del sincitio ( $\mu\text{m}$ )		Diferencia ( $\mu\text{m}$ )
	Con tratamiento	Sin Tratamiento	
2.5	19 $\pm$ 4 <sup>Bab</sup>	37 $\pm$ 11 <sup>A</sup>	18
3.0	15 $\pm$ 4 <sup>Bb</sup>	34 $\pm$ 6 <sup>A</sup>	19
5.0	16 $\pm$ 5 <sup>Bb</sup>	42 $\pm$ 22 <sup>A</sup>	26
5.5	22 $\pm$ 5 <sup>Ba</sup>	37 $\pm$ 11 <sup>A</sup>	15

Tratamiento: bebida funcional mixta de los distintos meses de almacenamiento 4 °C. Letras mayúsculas iguales: no hubo diferencia entre valores de un mismo renglón a un nivel de significancia de 0.05. Letras minúsculas iguales: no hubo diferencia entre valores de la misma columna a un nivel de significancia de 0.05.

Con base a lo anterior, los resultados de la actividad contra el VSRh obtenidos no permitieron generar una conclusión sobre la conservación o pérdida de esta en la BFM durante su almacenamiento. Es recomendable que se realice nuevamente este ensayo usando la BFM inmediatamente después que haya sido muestreada, con lo que se evitará someterla a los procesos de congelamiento-descongelamiento, lo que pudo influir en el comportamiento observado en la figura 8.7., debido tal vez a que se modificó el tipo y/o concentración de polifenoles presentes en la BFM, y se vio afectada la sinergia positiva entre ellos. Lo anterior es importante porque a este grupo de compuestos se les ha conferido la actividad anti-VSRh.

## 9. CONCLUSIONES

Las siguientes conclusiones se generan del presente trabajo de tesis:

- 1) Se estableció el procedimiento del acondicionamiento y mezclado del puré de guayaba, jugo concentrado de naranja y extracto etanólico acuoso a partir de la cáscara de frutos de granada cultivada en el estado de Oaxaca. Se constató su reproductibilidad.
- 2) Se determinó que la adición del extracto etanólico de la cáscara de *P. granatum* se realice previo a la pasteurización debido a que dicho proceso no afecta el CPT y la AA de este.
- 3) Se constató el efecto que tiene la adición del extracto etanólico de la cáscara de granada en el oscurecimiento de la BFM, atributo que tuvo menor nivel de agrado durante la evaluación sensorial.
- 4) Los resultados fisicoquímicos, microbiológicos y de la prueba sensorial demostraron que la BFM conservó su calidad hasta los 6 meses de su almacenamiento a 4°C.
- 5) La BFM mantuvo su calidad con respecto al CPT y AA porque no disminuyeron más del 50 % y se evidenció que la correlación entre ambos parámetros en la BFM no es fuerte ( $<0.8$ ).
- 6) Se corroboró que la BFM redujo el tamaño de los sincitios y fueron diferentes significativamente con respecto a los que presentaron las células HEp-2 sin tratamiento.
- 7) Los resultados de la actividad contra el VSRh que se obtuvieron no permitieron generar una conclusión sólida sobre la conservación o pérdida de esta en la BFM.

## 10. PERSPECTIVAS

- 1) Se recomienda establecer el tipo de envase que será utilizado en la presentación final de la BFM porque que los frascos empleados en el presente trabajo de tesis fueron de una bebida comercial para niños.
- 2) En el presente trabajo no se analizaron todos los parámetros establecidos en la norma para el etiquetado de bebidas por lo que se recomienda en futuros trabajos evaluar: proteínas, fibra dietética, vitaminas, nutrimentos inorgánicos (minerales), grasas totales, saturadas y trans, carbohidratos, azúcares totales y reductores, sodio, así como, el contenido energético.
- 3) Se propone realizar un análisis de los compuestos del grupo de los polifenoles presentes en la BFM durante su almacenamiento a 4 °C, lo que permita posiblemente establecer una correlación entre los compuestos identificados y su variación durante el periodo evaluado con las actividades biológicas de la BFM.
- 4) Respecto a la actividad antiviral de la BFM contra el VSRh, es importante realizar la evaluación en la línea celular HEp-2 nuevamente, debido a que es trascendental establecer el tiempo de almacenamiento que dicha bebida conserva esta propiedad biológica por tratarse de un alimento funcional.
- 5) Se propone en una siguiente etapa de investigación utilizar un modelo de infección animal para la evaluación de la actividad antiviral de la BFM, al que se le suministre la bebida sin darle un acondicionamiento previo, y con ello establecer el período del almacenamiento que dicha actividad biológica se conserva en la bebida.

## 11. REFERENCIAS

- Agbor, G. A., Vinson, J. A. y Donnelly, P. E. (2014). Folin-Ciocalteu Reagent for polyphenolic assay. *International Journal of Food Science, Nutrition and Dietetics*, 3(8), 147-156. DOI: 10.19070/2326-3350-1400028
- Akponah, E., Bokoro, I. O., Ubogu, M. y Ejukonemu, F. E. (2013). Effects of ethanolic extracts of garlic, ginger and rosemary on the shelf-life of orange juice. *International Journal of Agricultural Policy and Research*, 1(7), 197-204.
- Amofa-Diatuo, T., Anang, D. M., Barba, F. J. y Tiwari, B. K. (2016). Development of new apple beverages rich in isothiocyanates by using extracts obtained from ultrasound-treated cauliflower by-products: Evaluation of physical properties and consumer acceptance. *Journal of Food Composition and Analysis*, 100(61), 73-81. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2016.10.001>
- Ananingsih, V. K., Sharma, A. y Zhou, W. (2013). Green tea catechins during food processing and storage: A review on stability and detection. *Food Research International*, 50(2), 469-479.
- Anzaldúa-Morales, A. (1993). *La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y en la práctica*. Acribia, S. A.
- Arias L. D., Montañó D. L. N., Velasco S. M.A. y Martínez G. J. (2018). Alimentos funcionales: avances de aplicación en agroindustria. *Tecnura*, 22(57), 55-68. [https://doi.org/10.14483/22487638\\_](https://doi.org/10.14483/22487638_)
- Asprón-Moncada V., Morales-Jiménez M., Tirado R., Robles-González V. y González-Mondragón E. (2014, June 21 to 25). Punica granatum has an antiviral response over respiratory syncytial virus infectivity. *33<sup>rd</sup> Annual meeting of the American society for virology*, Fort Collins, Colorado, United States.
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M., Ghafoor, K., Norulaini, N. y Omar, A. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426-436. DOI:10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014
- Baba, W. N., Din, S., Punoo, H. A., Wani, T. A., Ahmad, M. y Masoodi, F. A. (2016). Comparison of cheese and paneer whey for production of a functional pineapple beverage: Nutraceutical properties and Shelf life. *Journal of food science and technology*, 53(6), 2558–2568. <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2218-8>
- Badui, S. (2006). *Química de los Alimentos* (4 ed.). Pearson Educación.
- Balasundram, N., Sundram, K. y Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99(1), 191-203.
- Baker, S. y The, H. Ch. (2018). Review Recent insights into Shigella a major contributor to the global diarrheal disease burden. *Curr Opin Infect Dis*, 31, 449-454. DOI:10.1097/QCO.0000000000000475.
- Bawage, S. S., Tiwari, P. M., Pillai, S., Dennis, V. y Singh, S. R. (2013). Recent advances in diagnosis, prevention, and treatment of human respiratory syncytial virus. *Advances in virology 2013*, 1-26. <https://doi.org/10.1155/2013/595768>
- Bayliak, M., Burdyluk, N. y Lushchak, V. (2017). Growth on Alpha-Ketoglutarate Increases Oxidative Stress Resistance in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Microbiology*, 2017, 1-9. <https://www.hindawi.com/journals/ijmicro/2017/5792192/>
- Berdeja, K. V. M., Ponce-Alquicira, E. y Bermúdez, B. S. S. (2018). Cáscara de granada (*Punica granatum L.*): Potencial uso como fuente de ingredientes funcionales en productos cárnicos emulsionados cocidos. *Nacameh*, 12(2), 30-41.
- Bohn, T. (2014). Dietary factors affecting polyphenol bioavailability. *Nutrition Reviews*, 72(7), 429-452. <https://academic.oup.com/nutritionreviews/article/72/7/429/1825007?login=true>

- Carbonell-Barrachina, A. y Cano-Lamadrid, M. (2017). *Punicalagina antioxidante natural de la granada*. Universitas.
- Castro-López, C., Sánchez-Alejo, E. J., Saucedo-Pompa, S., Rojas, R., Aranda-Ruiz, J. y Martínez-Avila, G. C. G. (2016). Fluctuations in phenolic content, ascorbic acid and total carotenoids and antioxidant activity of fruit beverages during storage. *Heliyon*, 2(9), 2-16.
- Chakraborty, S. y Bhattacharjee, P. (2018). Design of lemon–mustard nutraceutical beverages based on synergism among antioxidants and in vitro antioxidative, hypoglycaemic and hypocholesterolemic activities: characterization and shelf life studies. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12(3), 2110-2120.
- Chávez-Zepeda, L. P., Cruz-Méndez, G., Gracia de Caza, L., Díaz-Vela, J. y Pérez- Chabela, M. L. (2009). Utilización de subproductos agroindustriales como fuente de fibra para productos cárnicos. *NACAMEH*, 3(2), 71-82.
- Chim, J. F., Zambiasi, R. C. y Rodrigues, R. S. (2013). Estabilidade da vitamina C em néctar de acerola sob diferentes condições de armazenamento. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, 15(4), 321-7.
- Comisión Guatemalteca de Normas COGUANOR NGO 34 003 h3. Productos elaborados a partir de frutas y hortalizas. Determinación del volumen ocupado por el producto. (1981).
- Corbo, M. R., Bevilacqua, A., Petruzzi, L., Casanova, F. P. y Sinigaglia, M. (2014). Functional beverages: the emerging side of functional foods: commercial trends, research, and health implications. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 13(6), 1192-1206.
- Corzo-López, M. y Valdés-Ramírez, O. (2013). El virus sincitial respiratorio humano: una panorámica. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 44(2), 1-20. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181227534005>
- Cutrim, C. S. y Cortez, M. A. S. (2018). A review on polyphenols: Classification, beneficial effects and their application in dairy products. *International Journal of Dairy Technology*, 71(3), 564-578.
- Dewick, P. M. (2002). The Shikimate Pathway: Aromatic Amino Acids and Phenylpropanoids. In Dewick, P. M., *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach* (137-186). John Wiley & Sons, Ltd.
- Díaz, P. V., y Avendaño, L. F. (2017). El virus respiratorio sincicial: patógeno de niños... y de grandes. *Revista chilena de enfermedades respiratorias*, 33(4), 293-302.
- Dionisio, A. P., Wurlitzer, N. J., Souza Goes, T., Borges, M. F., Garruti, D. y da Silva Araújo, I. M. (2016). Estabilidade de uma bebida funcional de frutas tropicais e yacón (*Smallanthus sonchifolius*) durante o armazenamento sob refrigeração. *Archivos latinoamericanos de nutrición*, 66(2), 148-155.
- Domínguez Deras, A. Y. (2017). *Formulación y métodos de conservación de una bebida a partir de la hoja de teberinto (Moringa oleífera)* [Tesis de Licenciatura, Universidad de El Salvador]. Archivo digital. <http://ri.ues.edu.sv>
- Espinosa Manfugás, J. (2007). *Evaluación Sensorial de los Alimentos*. Editorial Universitaria.
- Estrada, A. J. A. (2017). *Obtención de una bebida nutracéutica de jícama smallanthus sonchifolius y evaluación de su vida útil* [Tesis de licenciatura, Universidad Técnica del Norte]. Repositorio Digital Universidad Técnica del Norte. <http://repositorio.utn.edu.ec/handle/123456789/6538>
- Evans, J. (2011). Effects of food and beverage storage, distribution, display, and consumer handling on shelf life. In Kilcast, D., & Subramaniam, P. (Eds.). *Food and beverage stability and shelf life* (273-302). Woodhead Publishing.
- FAO-WHO Codex Alimentarius CODEX STAN 192-1995. Norma general para los aditivos alimentarios. (1995).
- FAO-WHO Codex Alimentarius. CODEX STAN 247-2005. Norma general del CODEX para zumos (jugos) y néctares de frutas. (2005). [http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https %253A %252F %252Fworkspace.fao.org %252Fsites %252Fcodex %252Fstandards %252FCXS %252B247-2005 %252FCXS\\_247](http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCXS%252B247-2005%252FCXS_247)

- Ferreira, M. J. y Luengo, F. E. (2007). La dieta como concepto terapéutico. Conceptos de alimento funcional y de nutraceutico. Situación actual de los alimentos funcionales y nutraceuticos. Aspectos legales. En Luengo, F. E. (Cordinador), *Alimentos funcionales y nutraceuticos*. (1-11) Sociedad Española de cardiología.
- Foo, L. Y. y Karchesy, J. (1989). Pseudotsuganol, a biphenyl-linked pinoresinol-dihydroquercetin from Douglas-fir bark: isolation of the first true flavonolignan. *Journal of the Chemical Society. Chemical communications*. 1989(4), 217-219.
- Freeman B. L., Eggett D. L., Parker T. L. (2010). Synergistic and antagonistic interactions of phenolic compounds found in navel oranges. *J Food Sci*. 75(6), C570-6. doi: 10.1111/j.1750-3841.2010.01717.x. PMID: 20722912.
- García, C. H. y Retana, T. G. I. (2007). *Elaboración de bebidas no convencionales* [Tesis de licenciatura, Instituto Politécnico Nacional]. Repositorio Dspace. <https://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/15904/PROYECTO%20INVESTIGACIÓN.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Garcia, C. A., Tirado, M. R. y Ambrosio, J. R. (2018). ¿Es la patogenia del virus sincitial respiratorio humano un factor de riesgo para el desarrollo de asma infantil? *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*, 61(3), 17-30.
- García-Viguera, C. y Pérez Vicente, A. (2004). La granada. Alimento rico en polifenoles antioxidantes y bajo en calorías. *Alimentación, nutrición y salud*, 11 (4), 113-120.
- Geankoplis, C. J. (2009). *Procesos de transporte y principios de procesos de separación (incluye operaciones unitarias)* (4ª. edición). Grupo Editorial Patria.
- Giraldo Gómez, G. I. (1999). *Métodos de estudio de vida de anaquel de los alimentos*. Universidad Nacional de Colombia - Sede Manizales. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/55806>
- Gironés-Vilaplana, A., Mena, P., Moreno, D. A. y García-Viguera, C. (2013). Evaluation of sensorial, phytochemical and biological properties of new isotonic beverages enriched with lemon and berries during shelf life. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(6), 1090-1100.
- Gómez-Castillo, J. (2018). *Análisis comparativo del perfil polifenólico en cáscara de Punica granatum cultivada en Guanajuato y Oaxaca* [Tesis de maestría, Universidad Tecnológica de la Mixteca]. Repositorio Institucional UTM. <http://repositorio.utm.mx/handle/123456789/94>
- Hu M., Bogoyevitch M. A., y Jans D. A. (2020). Impact of Respiratory Syncytial Virus Infection on Host Functions: Implications for Antiviral Strategies. *Physiological Reviews*. 100(4): 1-181. <https://doi.org/10.1152/physrev.00030.2019>
- Jijón Ceballos, M. E. (2017). Sustitución parcial de azúcar por Stevia y estudio del efecto del tratamiento térmico sobre el contenido de vitamina C en una bebida de piña (*Ananas comosus*) y soya (*Glycine max*) [Tesis de licenciatura, Universidad San francisco de Quito USFQ]. Archivo digital <https://192.188.53.14/bitstream/23000/6625/1/131687.pdf>
- Kausar, H., Saeed, S., Ahmad, M. y Salam, A. (2012). Studies on the development and storage stability of cucumber-melon functional drink. *Journal of agriculture research*, 50(2), 238-248.
- Khasanov, A. y Matveeva, N. (2020). Determination of the shelf life of a functional beverage by accelerated testing. *In E3S Web of Conferences*, 164, 1-5. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202016401003>
- Kilcast, D. y Subramaniam, P. (2000). *The stability and shelf-life of food*. Woodhead Publishing Limited.
- Knorr, D., Ade-Omowaye, B. I. O. y Heinz, V. (2002). Nutritional improvement of plant foods by nonthermal processing. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 61(2), 311-8.
- Kopjar, M., Bilic, B. y Piližota, V. (2011). Influence of different extracts addition on total phenols, anthocyanin content and antioxidant activity of blackberry juice during storage. *Croatian Journal of Food Science and Technology*, 3(1), 9-15.

- Lee, G. D., Kim, J. O., Kim, M. S. y Lee, K. P. (2006). The prediction of self-life on functional beverage. *Korean Journal of Food Preservation*, 13(2), 154-160.
- López-Hernández, A. (2017). *Desarrollo de una bebida funcional híbrida adicionada con extracto polifenólico obtenido a partir de cáscara de granada (Punica granatum), y la evaluación de sus propiedades antioxidante y antiviral* [Tesis de Maestría, Universidad Tecnológica de la Mixteca]. En confidencialidad.
- Mäkilä, L., Laaksonen, O., Kallio, H. y Yang, B. (2017). Effect of processing technologies and storage conditions on stability of black currant juices with special focus on phenolic compounds and sensory properties. *Food chemistry*, 221, 422-430.
- Malvais Delgado, R. E. (2017). *Estudio de vida de anaquel en bebidas saborizadas* [Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma del Estado de México]. Archivo digital. <http://hdl.handle.net/20.500.11799/67547>
- Maskan, M. (2001). Kinetics of colour change of kiwifruits during hot air and microwave drying. *Journal of food engineering*, 48(2), 169-175.
- Mathias-Rettig y Ah-Hen (2014). El color en los alimentos un criterio de calidad medible. *Agro Sur*, 42(2), 39-48.
- McCabe, W., Smith, J. y Harriott, P. (2004). *Unit Operations of Chemical Engineering* (Septima Ed). McGraw Hill.
- Mejías-Brizuela, N., Orozco-Guillen, E. y Galáan-Hernández, N. (2016). Aprovechamiento de los residuos agroindustriales y su contribución al desarrollo sostenible de México. *Revista de Ciencias Ambientales y Recursos Naturales*, 2(6), 27-41.
- Mena, P., Calani, L., Dall'Asta, C., Galaverna, G., García-Viguera, C., Bruni, R., Crozier, A. y Del Rio, D. (2012). Rapid and comprehensive evaluation of (poly)phenolic compounds in pomegranate (*Punica granatum* L.) Juice by UHPLC-MSn. *Molecules*, 17(12), 14821-14840.
- Mesa-Vanegas, A. M., Gaviria, C. A., Cardona, F., Sáez-Vega, J. A., Blair T. S. y Rojano, B. A. (2010). Actividad antioxidante y contenido de fenoles totales de algunas especies del género *Calophyllum*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 15(2), 13-26. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1028-47962010000200003&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962010000200003&lng=es&tlng=es)
- Morffi Figueroa, J., Peña Núñez, B. del R. y Oropesa, S. (2006). Actividad antiviral del extracto de *Punica granatum* L. (BLBu) en el modelo experimental de gripe en ratones de la línea Balb/C. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 37(2), 105-109. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181220540007>
- Moreno-Espinosa, S., Estrada-Ruelas, I., Sánchez-Miranda, Y., Flores-Arizmendi, R. A., Macías-Avilés, H. A., Ruiz-Gutiérrez, H. H., Lima-Rogel, V., Gutiérrez-Padilla, J. A. y González-Gómez, L. A. (2020). Prevención de la infección grave por virus sincicial respiratorio en la población pediátrica en México: postura de un grupo de expertos. *Bol. Med. Hosp. Infant.*, 77(3), 1665-1146.
- Moon, K., M., Kwon, E-B, Lee, B. y Kim, Ch., Y. (2020). Review Recent trends in controlling the enzymatic browning of fruit and vegetable products. *Molecules*, 25(2754), 1-15.
- Munera, S., Hernández, F., Aleixos, N., Cubero, S. y Blasco, J. (2019). Maturity monitoring of intact fruit and arils of pomegranate cv. 'Mollar de Elche' using machine vision and chemometrics. *Postharvest Biology and Technology*, 156, 110936.
- Naar Uc, P. B. (2017). *Factibilidad mercadológica de una bebida funcional a base de extractos polifenólicos obtenidos a partir de la cáscara de granada (Punica granatum) con propiedad virucida sobre el virus sincicial respiratorio humano* [Tesis de Licenciatura Universidad de Quintana Roo].
- Nicoli, M. C. (Ed.). (2012). *Shelf life assessment of food*. CRC Press.
- Norma Mexicana NMX-FF-006-1982. Productos alimenticios no industrializados para uso humano. Fruta fresca. Terminología. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas. Diario Oficial de la Federación. (1982).

- Norma Mexicana NMX-FF-040-2002. Productos alimenticios no industrializados para consumo humano. Fruta fresca. Guayaba (*Psidium guajava* L.). Especificaciones. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas. (2002).
- Norma Mexicana NMX-F-066-S-1978. Determinación de cenizas en alimentos. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas. Diario Oficial de la Federación. (1978). <http://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-FF-038-2002.PDF>
- Norma Mexicana NMX-F-078-S-1980. Néctar de guayaba. Norma Mexicana. Dirección General de Normas. Diario oficial de la Federación. (1980).
- Norma Mexicana NMX-F-102-S-1978. Determinación de la acidez titulable en productos elaborados a partir de frutas y hortalizas. Norma Mexicana. Dirección general de normas. Diario Oficial de la Federación. (1978). <http://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-FF-038-2002.PDF>
- Norma Mexicana NMX-F-103-1982. Alimentos. Frutas y derivados. Determinación de grados Brix. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas. Diario Oficial de la Federación. (1982).
- Norma Mexicana NMX-F-118-1984. Alimentos para humanos. Bebidas no alcohólicas jugo de naranja envasado. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas. (1984).
- Norma Mexicana NMX-F-314-1977. Determinación de la masa de la capacidad de llenado para envases de productos alimenticios. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas. (1977).
- Norma Mexicana NMX-F-317-S-1978. Determinación de pH en alimentos. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas. Diario Oficial de la Federación. (1978). <http://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-FF-038-2002.PDF>
- Norma Mexicana NMX-F-439-1983. Alimentos. Bebidas no alcohólicas. Bebidas y refrescos clasificación y definiciones. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas. (1983).
- Norma Mexicana NMX-F-464-1984. Alimentos para humanos. Bebidas no alcohólicas jugo de naranja concentrado para manufactura. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas. (1984).
- Norma Mexicana NMX-F-466-1984. Alimentos para humanos. Bebidas no alcohólicas naranjada. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas. (1984).
- Norma Oficial Mexicana NOM-086-SSA1-1994. Bienes y servicios. Alimentos y bebidas no alcohólicas con modificaciones en su composición. Especificaciones nutrimentales. Diario oficial de la Federación. (1994).
- Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa. Secretaría de Salud. (1995).
- Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. Secretaría de Salud. (1994).
- Norma Oficial Mexicana NOM-111-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos. Secretaría de Salud. (1994). [http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/TecnicBasicas-Cuenta-mohos-levaduras\\_6530.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/TecnicBasicas-Cuenta-mohos-levaduras_6530.pdf)
- Norma Oficial Mexicana NOM-113-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa. Secretaría de Salud. (1994).
- Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994. Salud ambiental, agua para uso y consumo humano-límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización. Secretaría de Salud. (1994).
- Norma Oficial Mexicana NOM-130-SSA1-1995. Bienes y servicios. Alimentos envasados en recipientes de cierre hermético y sometidos a tratamiento térmico. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Diario Oficial de la Federación. (1995). <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/130ssa15.html>
- Norma Oficial Mexicana NOM-173-SCFI-2009. Jugos de frutas preenvasados-Denominaciones, especificaciones

- fisicoquímicas, información. (2009).
- Norma Oficial Mexicana NOM-218-SSA1-2011. Productos y servicios. Bebidas saborizadas no alcohólicas, sus congelados, productos concentrados para prepararlas y bebidas adicionadas con cafeína. Especificaciones y disposiciones sanitarias. Métodos de prueba. Diario Oficial de la Federación. (2011).
- Norma Oficial Mexicana NOM-251-SSA1-2009. Prácticas de higiene para el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios. Diario Oficial de la Federación. (2009). <http://www.cofepris.gob.mx/Paginas/Inicio.aspx>
- Norma Técnica Peruana NTP 203.110. Jugos, néctares y bebidas de fruta. Requisitos. (2009). <https://es.scribd.com/doc/285300947/NTP-NECTAR>
- Norma Venezolana COVENIN 1051-82. Alimentos envasados. Determinación del espacio libre. (1982).
- Ogundele, O. M. A., Awolu, O. O., Badejo, A. A., Nwachukwu, I. D. y Fagbemi, T. N. (2016). Development of functional beverages from blends of *Hibiscus sabdariffa* extract and selected fruit juices for optimal antioxidant properties. *Food Science and Nutrition*, 4(5), 679-685. <https://doi.org/10.1002/fsn3.331>
- Padilla, F. C., Rincón, A. M. y Bou-Rached, L. (2008). Contenido de polifenoles y actividad antioxidante de varias semillas y nueces. *Archivos latinoamericanos de nutrición*, 58(3), 303-308.
- Padilla Ramírez, J. S., González Gaona, E., Rodríguez Moreno, V. M., Reyes Muro, L., Osuna Ceja, E. S. y Acosta Díaz, E. (2014). Varianza entre y dentro e índice de repetitividad de características cuantitativas de fruto de guayaba. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 5(8), 1423-1432.
- Pedrero, F. D. y Pangborn, R. M. (1997). *Evaluación sensorial de los alimentos. Métodos analíticos*. Longman de México editores.
- Peña Núñez, B. R. (2008). *Actividad antiviral de un extracto liofilizado del fruto de Punica granatum L. frente al virus de la influenza* [Tesis doctoral en ciencias de la salud, La Habana, Cuba]. Red de Repositorios Latinoamericanos. <http://repositorioslatinoamericanos.uchile.cl/handle/2250/140094>
- Phimolsiripol, Y. y Suppakul, P. (2016). Techniques in Shelf Life Evaluation of Food Products. In Smithers, G. (Ed.). *En Reference Module in Food Science*, (1-8). Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.03293-5>
- Porto, M. R. A., Okina, V. S., Pimentel, T. C. y Prudencio, S. H. (2017). Physicochemical stability, antioxidant activity, and acceptance of beet and orange mixed juice during refrigerated storage. *Beverages*, 3(3), 36. <https://doi.org/10.3390/beverages3030036>
- Proyecto de Modificación a la Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-173-SE-2020. Jugos, agua de coco, néctares, bebidas no alcohólicas con vegetales o frutas, agua de coco o coco, verduras u hortalizas y bebidas no alcohólicas saborizadas-Denominación-Especificaciones-Información comercial y métodos de prueba. Diario Oficial de la Federación. (2020).
- Proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-211-SSA1-2002. Productos y servicios. Métodos de prueba fisicoquímicos. Determinación de humedad y sólidos totales en alimentos por secado en estufa. Determinación de arsénico, cadmio, cobre, cromo, estaño, hierro. Diario Oficial de la Federación. (2003).
- Puiggròs, F., Muguerza, B., Arola-Arnal, A., Aragonès, G., Suárez-García, S., Bladé, C., Arola, L., y Suárez, M. (2017). Functional beverages. En I. Aguiló-Aguayo, y L. Plaza (Eds). *Innovative technology in beverage processing* (pp. 275-288) Wiley Blackwell.
- Quiñones, M., Miguel, M. y Alexandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*, 27(1), 76-89.
- Ramírez, M., Alvarado, M. y Rodríguez, J. G. (2016). Correlación de polifenoles totales, actividad antioxidante y potencial reductor de plantas nativas del semidesierto de Coahuila. *Inv Desarrollo Cienc Tecnol Alimentos*, 1(1), 151-156.

- Rodríguez Piedrahita, L. I., López, L. y García, M. (2010). Determinación de la composición química y actividad antioxidante en distintos estados de madurez de frutas de consumo habitual en Colombia, mora (*Rubus Glaucus B.*), maracuyá (*Passiflora Edulis s.*), guayaba (*Psidium Guajava l.*) y Papayuela (*Carica Cundinam*).
- Romeo, F. V., Ballistreri, G., Fabroni, S., Pangallo, S., Li Destri Nicosia, M. G., Schena, L. y Rapisarda, P. (2015). Chemical characterization of different sumac and pomegranate extracts effective against *Botrytis cinerea* rots. *Molecules*, 20(7), 11941-11958.
- Salido, F. P. y Fernández, A. C. (2005). Polifenoles de aplicación en farmacia: metabolismo y acción biológica. *Offarm: farmacia y sociedad*, 24(8), 85-94.
- Schvab, M. D. C., Ferreyra, M. M., Gerard, L. M. y Davies, C. V. (2013). Parámetros de calidad de jugos de naranja entrerrianas. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 14(1), 85-92.
- Sampedro, F., Geveke, D. J., Fan, X., Rodrigo, D. y Zhang, Q. H. (2009). Shelf-life study of an orange juice–milk based beverage after PEF and thermal processing. *Journal of food science*, 74(2), S107-S112.
- Santander-M, M., Osorio, O. y Mejía-E, D. (2017). Evaluación de propiedades antioxidantes y fisicoquímicas de una bebida mixta durante almacenamiento refrigerado. *Revista de Ciencias Agrícolas*, 34(1), 84-97.
- Tomás-Barberan, F. A. (2003). Los polifenoles de los alimentos y la salud. *Alimentación, Nutrición y Salud*, 10(2), 41-53.
- Valenzuela, B. A., Valenzuela, R., Sanhueza, J., Morales, I. G. (2014). Alimentos funcionales, nutraceuticos y foshu: ¿vamos hacia un nuevo concepto de alimentación? *Rev Chil Nutr* 41(2), 198-204.
- Vano, K., Jiménez, Y. y De Nuñez, M. G. (2009). Evaluación de la incertidumbre en la determinación gravimétrica de humedad, cenizas, grasa y fibra cruda. *Revista INGENIERÍA UC*, 16(2), 27-33.
- Vega, A., De León, J. A. y Reyes, S. M. (2017). Determinación del contenido de polifenoles totales, flavonoides y actividad antioxidante de 34 cafés comerciales de Panamá. *Información Tecnológica*, 28 (4), 29-38.
- Williamson, G. (2017). The role of polyphenols in modern nutrition. *Nutr. Bull*, 42(3), 226-235.
- Yilmaz-Akyuz, E., Ustun-Aytekin, O., Bayram, B. y Tutar, Y. (2019). Nutrients, Bioactive Compounds, and Health Benefits of Functional and Medicinal Beverages. In Grumezescu, A., & Holban, A. M. (Eds). *Nutrients in Beverages* (175-235). Elsevier Inc.

## Patentes

- Clymer, J. W. y Rennie P. J. Gamble (2009). *Methods of treating or preventing respiratory tract infection comprising administering colecalciferol*. Patente EE. UU. WO2009/032887 A1. Oficinas de patentes y marcas Washington, D. C. [https://patents.google.com/patent/WO2009032887A1/en?q=WO2009%2f032887+A1+\(THE+PROTEC+%26+GAMBLE%2c+\[US%2fUS#patentCitations](https://patents.google.com/patent/WO2009032887A1/en?q=WO2009%2f032887+A1+(THE+PROTEC+%26+GAMBLE%2c+[US%2fUS#patentCitations)
- González Mondragón, E. A., Santiago Gómez, M.P., López Hernández, A., Gómez Castillo, J.F. y Tirado Mendoza, R. G. (2017). *Composición para contrarrestar infecciones de vías respiratorias por el virus sincitial respiratorio humano*. Solicitud de patente de México UMX/a/2017/007342. Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial.

## Páginas electrónicas

- Arozarena, I. (2015, 19 de octubre). *Alimentos sin desperdicio*. <https://alimentosindesperdicio.blog/2015/10/19/subproducto-vs-residuo/>
- Bastida Cañada, O. A. (2020, 08 de Julio). *Estados de México productores de granada en 2019*. <https://blogagricultura.com/estados-productores-granada-2019/>

- Centro Mario Molina. (2016). *Bioenergía: Análisis regional del aprovechamiento integral de los residuos de la industria agropecuaria*. [https://centromariomolina.org/wp-content/uploads/2017/10/5.-Bioenerg %C3 %ADa\\_2016.pdf](https://centromariomolina.org/wp-content/uploads/2017/10/5.-Bioenerg%C3%ADa_2016.pdf).
- Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios [COFEPRIS]. (s.f.). *6 pasos de la salud con prevención*. <http://www.fao.org/3/y4893s/y4893s00.htm>
- Ecosphere Technologies Inc. (2017). *Acoustic Cavitation*. <https://www.ecospheretechnologies.com/environmental-engineering-technologies/ozonix>
- Énfasis on line (21 de junio del 2018). *México: Avanzan con éxito los alimentos funcionales y naturalmente saludables. Sistema Integrado de Información de comercio Exterior*. [https://www.siicex.gob.pe/siicex/portal5ES.asp?\\_page\\_=726.72400&\\_portletid=\\_aim\\_wlistalerta&scriptdo=usp\\_aim\\_wlistdalerta&pc\\_alerta=46019](https://www.siicex.gob.pe/siicex/portal5ES.asp?_page_=726.72400&_portletid=_aim_wlistalerta&scriptdo=usp_aim_wlistdalerta&pc_alerta=46019)
- Fideicomiso de Riesgo Compartido [FIRCO]. (2017, 08 de mayo). *Agroindustria en México*. <https://www.gob.mx/firco/articulos/agroindustria-en-mexico?idiom=e>
- Gunt Hamburg Company. (2017). *Extracción sólido-líquido*. [https://www.gunt.de/images/download/extraction\\_spanish.pdf](https://www.gunt.de/images/download/extraction_spanish.pdf)
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía [INEGI]. (2008). *Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos: Heroica Ciudad de Ejutla de Crespo, Oaxaca. Clave geoestadística 20028*. [http://www3.inegi.org.mx/contenidos/app/mexicocifras/datos\\_geograficos/20/20028.pdf](http://www3.inegi.org.mx/contenidos/app/mexicocifras/datos_geograficos/20/20028.pdf)
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía [INEGI]. (2008). *Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos: Heroica Ciudad de Huajuapán de León, Oaxaca. Clave geoestadística 20039*. [http://www3.inegi.org.mx/contenidos/app/mexicocifras/datos\\_geograficos/20/20039.pdf](http://www3.inegi.org.mx/contenidos/app/mexicocifras/datos_geograficos/20/20039.pdf)
- Konica Minolta (s. f.). *Precise color communication*. <https://sensing.konicaminolta.us/us/>
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación [FAO]. (2003). *Manual Para la Preparación y Venta de Frutas y Hortalizas*. <http://www.fao.org/3/y4893s/y4893s00.htm>
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación [FAO]. (2005). *Estudio de caso: enfermedades transmitidas por alimentos en Nicaragua*. <http://www.fao.org/3/i0480s/i0480s06.pdf>
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera [SIAP]. (2020). *Anuario Estadístico de la Producción Agrícola*. <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>
- Instituto Suizo de bioinformática [SIB]. (s.f.). *Formación de sincitio inducida por infección viral*. <https://viralzone.expasy.org/5957>
- Universidad Nacional Autónoma de México [UNAM]. (2008). *Fundamentos y Técnicas de análisis de alimentos*. [http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/FUNDAMENTOSYTECNICASDEANALISISDEALIMENTOS\\_1286.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/FUNDAMENTOSYTECNICASDEANALISISDEALIMENTOS_1286.pdf)

## 12. ANEXOS

### ANEXO I

**Tabla A1.** Escala hedónica utilizada en la evaluación sensorial de la bebida funcional mixta.

<b>Descripción</b>	<b>Calificación</b>
Me gusta muchísimo	9
Me gusta mucho	8
Me gusta bastante	7
Me gusta ligeramente	6
Ni me gusta ni me disgusta	5
Me disgusta ligeramente	4
Me disgusta bastante	3
Me disgusta mucho	2
Me disgusta muchísimo	1

UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE LA MIXTECA

Nombre: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_

Sesión 1 Producto: Bebida Funcional híbrida

Instrucciones: Ante usted se encuentra una muestra de bebida de naranja con guayaba la cual evaluará en cuanto a apariencia general, color, olor y sabor. Escriba la clave de la muestra dentro del recuadro y marque con una (X) el renglón que corresponda a la calificación según su opinión. Enjuáguese la boca antes de evaluar.

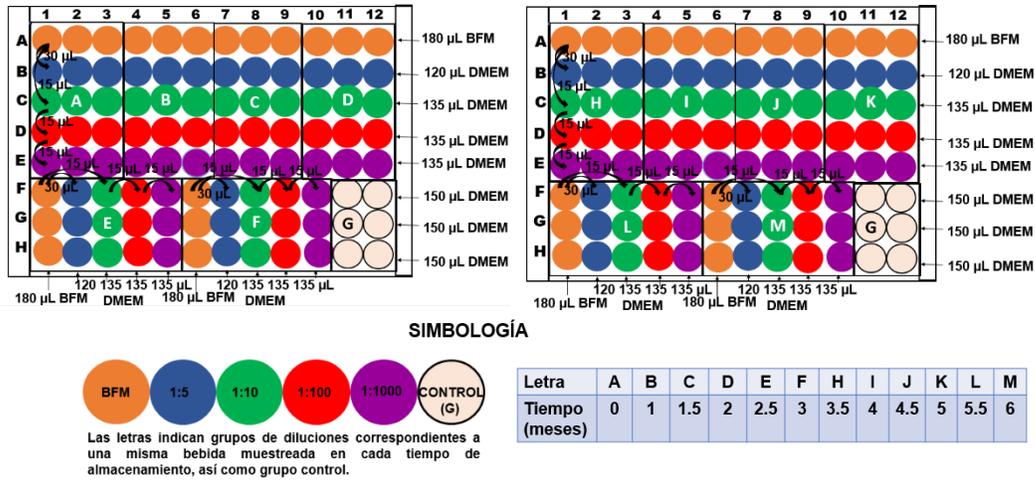
<b>Característica/ Nivel de agrado</b>	<b>Apariencia General</b>	<b>Color</b>	<b>Olor</b>	<b>Sabor</b>
Me gusta muchísimo	_____	_____	_____	_____
Me gusta mucho	_____	_____	_____	_____
Me gusta bastante	_____	_____	_____	_____
Me gusta ligeramente	_____	_____	_____	_____
Ni me gusta ni me disgusta	_____	_____	_____	_____
Me disgusta ligeramente	_____	_____	_____	_____
Me disgusta bastante	_____	_____	_____	_____
Me disgusta mucho	_____	_____	_____	_____
Me disgusta muchísimo	_____	_____	_____	_____

Comentarios:  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

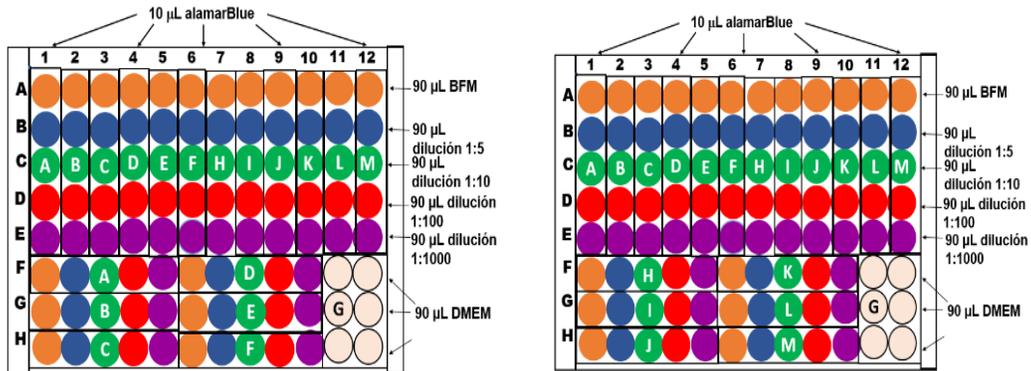
¡Gracias por su participación!

**Figura A1.** Formato utilizado por los evaluadores para el análisis sensorial de la bebida funcional mixta.

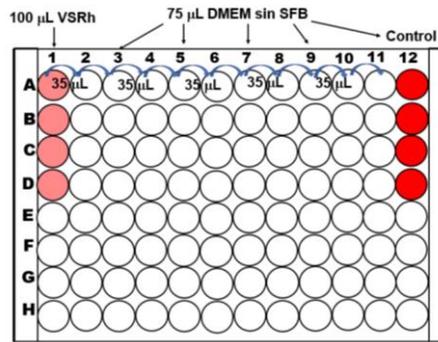
## ANEXO II



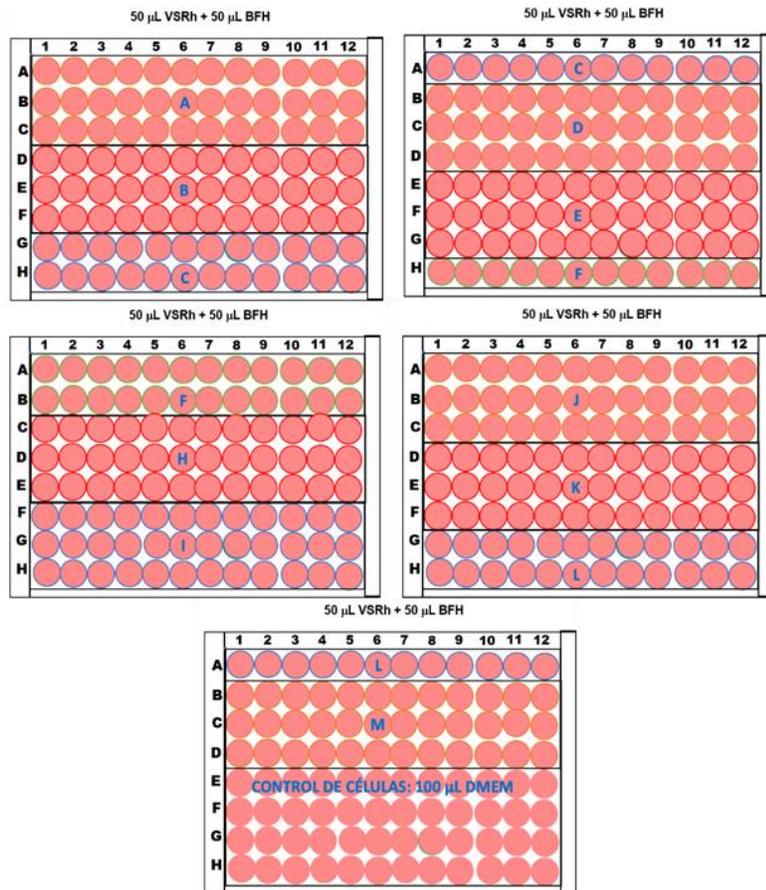
**Figura A2.1.** Preparación y colocación de las muestras de la BFM en una placa de 96 pozos para obtener las diluciones para el ensayo de citotoxicidad celular.



**Figura A2.2.** Ensayo de citotoxicidad de la BFM y sus diluciones seriadas (1:5, 1:10, 1:100 y 1:1000) en una placa de 96 pozos con células Hep-2 confluentes.



**Figura A2.3.** Preparación de diluciones seriadas de la solución de VSRh en una placa de 96 pozos.



**Figura A2.4.** Ensayos de unión en placa de 96 pozos con monocapa confluyente de células HEp-2 con BFM muestreada en los distintos tiempos de almacenamiento a 4 °C.

### Anexo III

**Tabla A3.1.** Parámetros fisicoquímicos durante el almacenamiento a 4 °C de la bebida funcional de naranja-guayaba adicionada con extracto de cáscara de granada

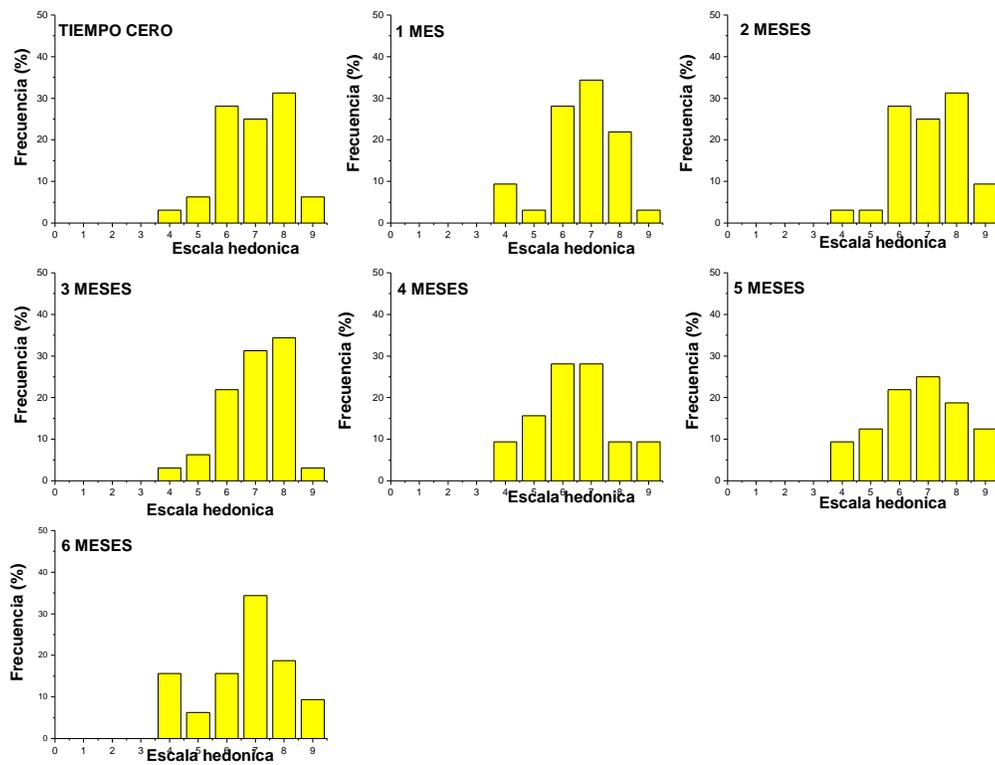
Parámetro	Tiempo (meses)			
	1	2	4	6
°Brix	10.50±0.00 <sup>a</sup>	10.46±0.05 <sup>a</sup>	10.60±0.10 <sup>a</sup>	10.46±0.05 <sup>a</sup>
pH	3.74±0.01 <sup>c</sup>	3.80±0.01 <sup>b</sup>	3.86±0.02 <sup>a</sup>	3.68±0.03 <sup>d</sup>
Sólidos totales (%)	10.03±0.01 <sup>ab</sup>	10.13±0.07 <sup>a</sup>	9.64±0.04 <sup>c</sup>	9.96±0.01 <sup>b</sup>
Cenizas totales (%)	0.16±0.00 <sup>a</sup>	0.15±0.00 <sup>a</sup>	0.15±0.02 <sup>a</sup>	0.16±0.00 <sup>a</sup>
Acidez titulable (g ácido cítrico/100 mL)	0.30±0.00 <sup>b</sup>	0.31±0.00 <sup>ab</sup>	0.33±0.00 <sup>a</sup>	0.30±0.00 <sup>b</sup>
<b>Color</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>6</b>
L*	52.85±1.34 <sup>a</sup>	53.69±0.71 <sup>a</sup>	52.96±1.48 <sup>a</sup>	52.07±1.01 <sup>a</sup>
a*	4.77±0.05 <sup>b</sup>	4.81±0.01 <sup>b</sup>	4.80±0.01 <sup>b</sup>	5.56±0.04 <sup>a</sup>
b*	49.06±0.91 <sup>a</sup>	49.40±0.49 <sup>a</sup>	49.82±0.19 <sup>a</sup>	49.49±0.59 <sup>a</sup>
C*	49.29±0.91 <sup>a</sup>	49.63±0.49 <sup>a</sup>	50.05±0.19 <sup>a</sup>	49.80±0.59 <sup>a</sup>
h°	84.44±0.04 <sup>b</sup>	84.43±0.07 <sup>b</sup>	84.49±0.01 <sup>b</sup>	83.58±0.05 <sup>a</sup>
ΔE	1.96±1.43 <sup>a</sup>	1.18±0.65 <sup>a</sup>	1.71±0.92 <sup>a</sup>	2.41±0.95 <sup>a</sup>
IB	185.95±2.49 <sup>a</sup>	182.83±3.47 <sup>a</sup>	191.06±10.30 <sup>a</sup>	195.79±3.29 <sup>a</sup>

L\*: luminosidad o claridad, de 0 (oscuros) a 100 (claros); a\*: luminosidad: rojo (+a) a verde (-a); b\*: amarillo (+b) a el azul (-b); C\*: cromaticidad; h°: tono o matiz, 0°-360°; ΔE: Cambio de color total; IC: Índice de color; BI: Índice de oscurecimiento. Medias con letras diferentes entre columnas presentan diferencia estadísticamente significativa. Tukey  $\alpha=0.05$ .

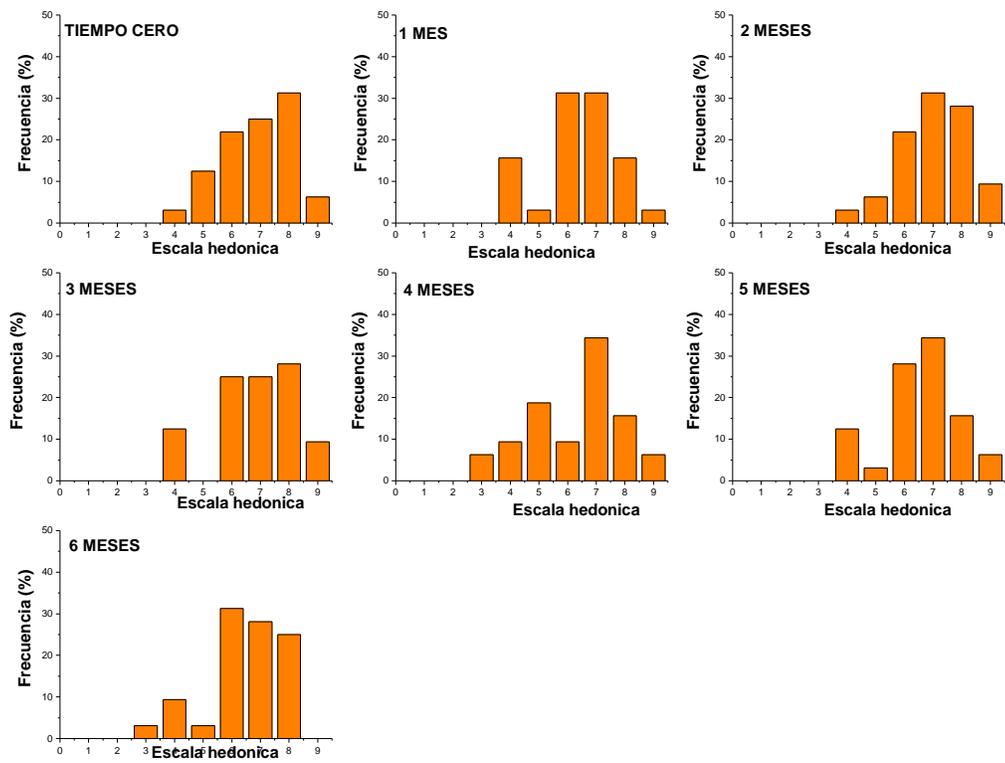
**Tabla A3.2.** Atributos de la evaluación sensorial de la BFM durante su almacenamiento a 4 °C

Tiempo (meses)	Apariencia			
	General	Color	Olor	Sabor
0	6.93±1.19 <sup>a</sup>	6.87±1.26 <sup>a</sup>	7.09±1.05 <sup>a</sup>	7.56±1.10 <sup>a</sup>
1	6.65±1.23 <sup>a</sup>	6.37±1.33 <sup>a</sup>	6.93±1.04 <sup>a</sup>	6.96±1.33 <sup>a</sup>
2	7.06±1.19 <sup>a</sup>	7.03±1.20 <sup>a</sup>	7.40±1.29 <sup>a</sup>	7.53±1.36 <sup>a</sup>
3	6.96±1.12 <sup>a</sup>	6.84±1.43 <sup>a</sup>	7.25±1.01 <sup>a</sup>	7.43±1.48 <sup>a</sup>
4	6.40±1.38 <sup>a</sup>	6.28±1.63 <sup>a</sup>	7.25±1.21 <sup>a</sup>	7.03±1.51 <sup>a</sup>
5	6.68±1.49 <sup>a</sup>	6.56±1.34 <sup>a</sup>	7.50±1.24 <sup>a</sup>	7.09±1.25 <sup>a</sup>
6	6.59±1.58 <sup>a</sup>	6.46±1.34 <sup>a</sup>	7.25±1.29 <sup>a</sup>	7.18±1.46 <sup>a</sup>

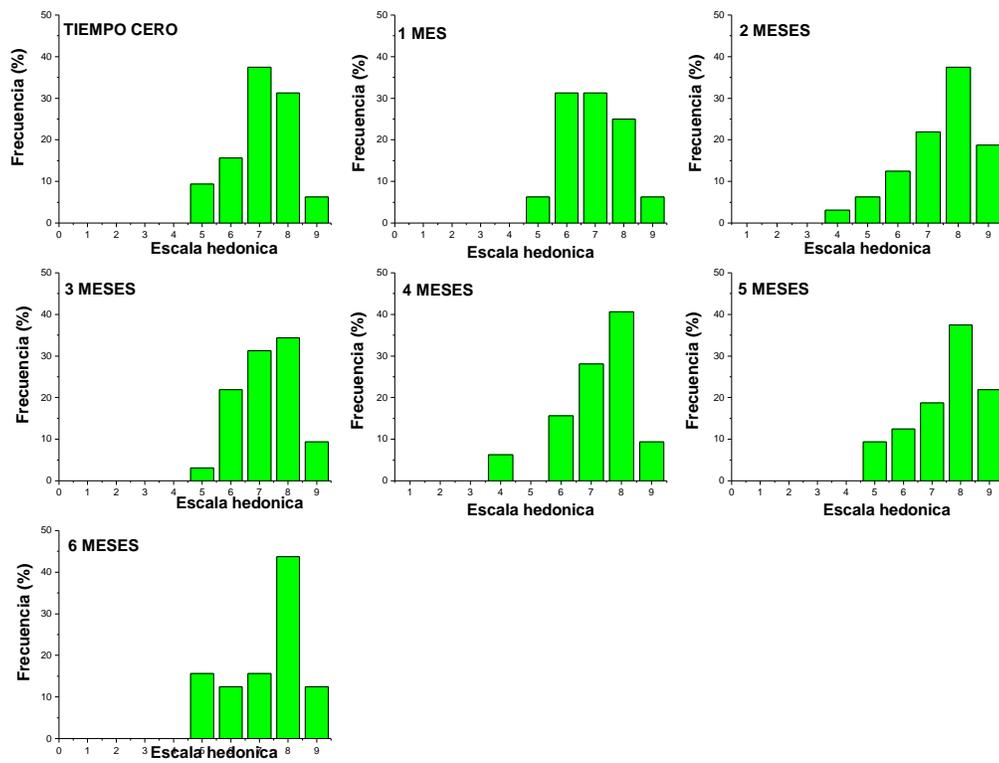
Letras minúsculas iguales: no hubo diferencia entre valores de la misma columna a un nivel de significancia de 0.05.



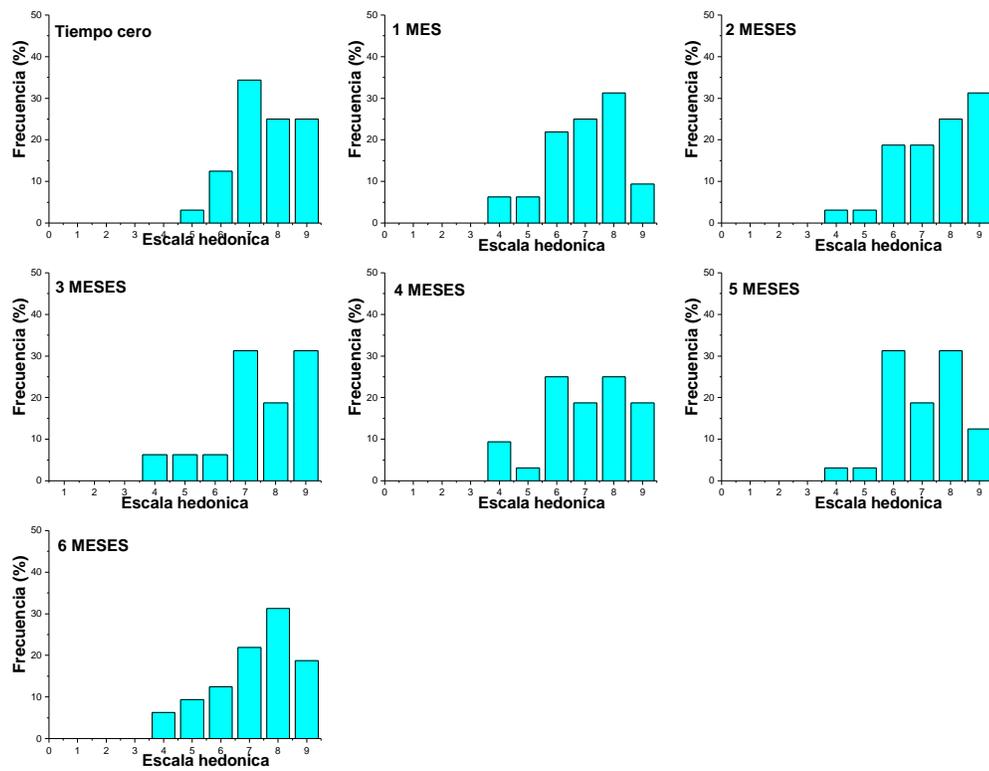
**Figura A3.1.** Distribución de frecuencia de respuesta para la prueba de apariencia general en relación con los nueve puntos de la escala hedónica.



**Figura A3.2.** Distribución de frecuencia de respuesta para la prueba de color en relación con los nueve puntos de la escala hedónica.



**Figura A3.3.** Distribución de frecuencia de respuesta para la prueba de olor en relación con los nueve puntos de la escala hedónica.

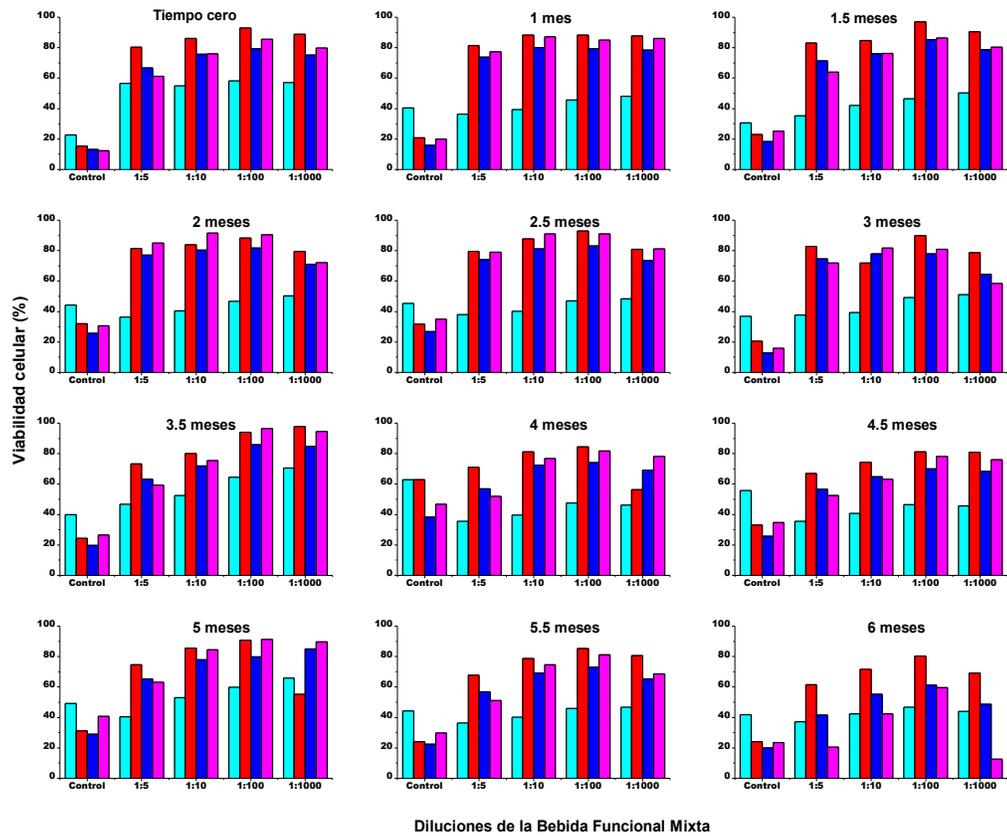


**Figura A3.4.** Distribución de frecuencia de respuesta para la prueba de sabor en relación con los nueve puntos de la escala hedónica.

**Tabla A3.3.** Contenido de polifenoles totales y actividad antioxidante de la BFM durante su almacenamiento a 4 °C

Tiempo (meses)	CPT ( $\mu\text{g}$ EAG/mL)	AA (% Inhibición)
1.0	489.30 $\pm$ 17.32 <sup>a</sup>	71.97 $\pm$ 1.30 <sup>ab</sup>
1.5	407.30 $\pm$ 32.9 <sup>b</sup>	64.33 $\pm$ 5.47 <sup>b</sup>
2.0	403.30 $\pm$ 28.0 <sup>b</sup>	78.18 $\pm$ 3.27 <sup>a</sup>
2.5	388.96 $\pm$ 3.78 <sup>b</sup>	74.20 $\pm$ 2.20 <sup>ab</sup>
3.0	431.63 $\pm$ 12.2 <sup>ab</sup>	75.06 $\pm$ 2.76 <sup>a</sup>
3.5	409.63 $\pm$ 15.3 <sup>b</sup>	52.11 $\pm$ 3.15 <sup>c</sup>
4.0	376.96 $\pm$ 0.57 <sup>b</sup>	44.54 $\pm$ 3.42 <sup>c</sup>
4.5	408.30 $\pm$ 5.56 <sup>b</sup>	50.90 $\pm$ 2.47 <sup>c</sup>
5.0	389.30 $\pm$ 4.35 <sup>b</sup>	48.31 $\pm$ 1.33 <sup>c</sup>
5.5	386.30 $\pm$ 4.35 <sup>b</sup>	46.57 $\pm$ 3.30 <sup>c</sup>
6.0	380.96 $\pm$ 7.09 <sup>b</sup>	51.58 $\pm$ 3.70 <sup>c</sup>

CPT: Contenido de polifenoles totales; EAG: Equivalentes de ácido gálico; AA: Actividad antioxidante.



**Figura A3.5.** Ensayo de citotoxicidad de células HEp-2 (%) frente a la bebida funcional mixta. Se realizaron cinéticas de 72 h empleando cultivos confluentes de células Hep-2 incubados con diferentes diluciones (1:5, 1:10: 1:100 y 1:1000) de la BFM a diferentes tiempos (0-6 meses) de almacenamiento a 4 °C. Se hicieron muestreos cada 24 h: 0 h (barras color cian), 24 h (barras color rojo), 48 h (barras color azul) y 72 h (barras color magenta).

**Tabla A3.4.** Viabilidad celular (%). Cinéticas de incubación de diluciones seriadas de la BFM a diferentes tiempos de almacenamiento a 4 °C

Tiempo de incubación (h)	BEBIDA FUNCIONAL MIXTA				
	Concentrada	Dilución			
		1:5	1:10	1:100	1:1000
<b>Tiempo cero de almacenamiento</b>					
0	22.60	56.68	54.80	58.32	57.02
24	15.27	80.36	85.97	92.96	88.86
48	12.98	66.72	75.76	79.16	75.24
72	12.34	61.23	76.03	85.65	79.85
<b>1.0 mes de almacenamiento</b>					
0	40.36	36.44	39.39	45.50	48.02
24	20.86	81.46	88.30	88.30	87.66
48	15.83	73.66	80.00	79.34	78.39
72	19.85	77.24	87.25	85.09	86.20
<b>1.5 meses de almacenamiento</b>					
0	30.48	35.35	41.99	46.35	50.17
24	22.82	83.10	84.80	97.03	90.50
48	18.29	71.22	75.90	85.27	78.68
72	25.27	63.91	76.19	86.35	80.35
<b>2.0 meses de almacenamiento</b>					
0	44.36	36.30	40.53	46.79	50.23
24	32.08	81.32	83.82	88.37	79.62
48	25.60	77.00	80.33	81.76	70.93
72	30.47	85.00	91.61	90.44	72.22
<b>2.5 meses de almacenamiento</b>					
0	45.49	38.00	40.20	46.90	48.27
24	31.64	79.52	87.65	92.97	80.95
48	26.84	73.94	81.10	83.15	73.49
72	35.08	78.96	90.86	90.85	81.24
<b>3.0 meses de almacenamiento</b>					
0	36.84	37.82	39.47	49.07	51.07
24	20.52	82.85	71.79	89.80	78.60
48	12.95	74.47	77.82	77.93	64.59
72	15.80	71.90	81.80	81.00	58.50

**Tabla A3.4.** Continuación...

Tiempo de incubación (h)	BEBIDA FUNCIONAL MIXTA				
	Concentrada	Dilución			
		1:5	1:10	1:100	1:1000
<b>3.5 meses de almacenamiento</b>					
0	39.87	46.83	52.46	64.55	70.51
24	24.32	73.11	80.00	93.94	97.76
48	19.63	63.02	71.79	85.69	84.60
72	26.55	59.27	75.38	96.43	94.46
<b>4.0 meses de almacenamiento</b>					
0	62.78	35.49	39.50	47.57	46.28
24	62.74	70.94	81.14	84.35	56.37
48	38.25	56.86	72.38	73.94	69.23
72	46.77	51.78	76.88	81.57	78.17
<b>4.5 meses de almacenamiento</b>					
0	55.74	35.56	40.66	46.53	45.65
24	32.94	66.91	74.21	81.12	80.96
48	25.78	56.50	64.83	69.88	68.27
72	34.75	52.50	63.07	78.16	76.01
<b>5.0 meses de almacenamiento</b>					
0	49.07	40.52	52.88	59.78	65.93
24	31.12	74.68	85.61	90.74	55.16
48	28.95	65.23	77.93	79.78	84.91
72	40.62	63.03	84.44	91.26	89.52
<b>5.5 meses de almacenamiento</b>					
0	44.33	36.23	40.05	45.93	46.64
24	24.06	67.89	78.63	85.38	80.63
48	22.46	56.70	69.16	72.85	65.29
72	29.78	51.18	74.53	81.16	68.69
<b>6.0 meses de almacenamiento</b>					
0	41.84	37.09	42.42	46.85	44.08
24	23.93	61.45	71.66	80.32	69.09
48	19.86	41.65	55.06	61.28	48.53
72	23.55	20.47	42.24	59.43	12.46

**Tabla A3.5.** Efecto de la BFM en la infectividad del VSRh expresado en porcentaje de infectividad

<b>Tiempo (meses)</b>	<b>TCID<sub>50</sub>/mL</b>	<b>% Infectividad</b>
0.0	306827.60	100
1.0	306827.60	100
1.5	306827.60	100
2.0	306827.60	100
2.5	306827.60	100
3.0	102275.87	11.1
3.5	212742.38	33.3
4.0	34091.96	3.7
4.5	23638.04	0.1
5.0	3788.00	0.1
5.5	306827.60	100
6.0	306827.60	100
Control positivo	306827.60	

Control positivo (sin BFM)