



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

“Jugo de piña tratado por ultrasonido y enriquecido con aceite de hígado de bacalao encapsulado en alginato: efecto sobre la carga microbiana y características fisicoquímicas”

TESIS

Para obtener el título de:

Maestra en Biotecnología

PRESENTA:

ARIDAITH PARRA REYES

Directora:

Dra. Delia Esther Páramo Calderón

Codirector:

Dr. Lucio Abel Vázquez León

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca 2024



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO	DEP/2024/563
ASUNTO	Autorización de impresión de tesis

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, a 05 de noviembre de 2024

M. EN C. HÉCTOR LÓPEZ ARJONA
VICE-RECTOR ACADÉMICO
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Sirva la presente para informarle que, el jurado evaluador del examen para obtener el grado de **Maestra en Biotecnología** de la **C. Aridaith Parra Reyes**, con número de **Matrícula 22140009**, ha autorizado la impresión del manuscrito que lleva por título "**Jugo de piña tratado por ultrasonido y enriquecido con aceite de hígado de bacalao encapsulado en alginato: efecto sobre la carga microbiana y características fisicoquímicas**", para su posterior presentación y defensa por el sustentante.

Agradezco su atención y quedo a sus órdenes para cualquier duda o aclaración.

Atentamente
terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chí jí jú

Dr. José Abad Zavaleta

Jefe de la División de Estudios de Posgrado



C.c.p. Dra. Delia Esther Paramo Calderón – Directora de tesis.
C.c.p. Dr. Paul Mauricio Sánchez Ocampo – Coordinador de la Maestría en Biotecnología.
C.c.p. M. E. Yesenia Barrientos Arenal – Jefa del Departamento de Servicios Escolares.
C.c.p. Archivo.

CAMPUS TUXTEPEC
C. Circuito central No. 200, Col. Parque Industrial.
C.P. 38301, Tuxtepec, Oax.
Tel. 01(287)8759240

www.unpa.edu.mx

CAMPUS LOMA BONITA
Av. Ferrocarril S/N, Ciudad universitaria.
C.P. 68400, Loma Bonita, Oax.
Tel. 01(281)8729230



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO	DEP/2024/564
ASUNTO	Jurado para examen de grado

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, a 05 de noviembre de 2024

C. ARIDAITH PARRA REYES
MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

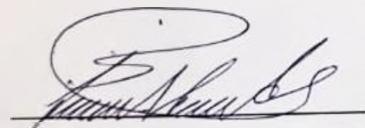
Por este medio le informo que el jurado de su examen para obtener el grado de **Maestra en Biotecnología** estará integrado por los siguientes investigadores.

Profesor Investigador	Jurado de Examen
Dr. Aurelio Ramirez Hernández	Presidente
Dr. Paul Mauricio Sánchez Ocampo	Secretario
Dr. Manuel Méndez Chávez	Vocal
Dr. Miguel Ángel García Muñoz	Primer Suplente
Dra. Delia Esther Paramo Calderón	Segundo Suplente


Sin más por el momento, le envío saludos cordiales.

Atentamente

terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chí jí jú


Dr. José Abad Zavaleta
Jefe de la división de estudios
de posgrado.




M. en C. Héctor López Arjona
Vicerrector Académico
Vo. Bo.



C.c.p. Dra. Delia Esther Paramo Calderón – Directora de tesis.
C.c.p. Dr. Paul Mauricio Sánchez Ocampo – Coordinador de la Maestría en Biotecnología.
C.c.p. M. E. Yesenia Barrientos Arenal – Jefa del Departamento de Servicios Escolares.
C.c.p. Archivo

CAMPUS TUXTEPEC
C. Circuito central No. 200, Col. Parque Industrial.
C.P. 38301, Tuxtepec, Oax.
Tel. 01(287)8759240

www.unpa.edu.mx

CAMPUS LOMA BONITA
Av. Ferrocarril S/N, Ciudad universitaria.
C.P. 68400, Loma Bonita, Oax.
Tel. 01(281)8729230

P R E F A C I O

La elaboración de esta tesis se presenta como parte de los requisitos para obtener el grado académico de la Maestría en Biotecnología, de la Universidad del Papaloapan campus Tuxtepec y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta universidad ni en ninguna otra. Dicha tesis contiene los resultados obtenidos en la investigación realizada durante el periodo comprendido de octubre 2022 a septiembre 2024 en el laboratorio de Ciencia de los Alimentos que pertenece al Centro de Investigaciones Científicas (CIC) y el Taller de Alimentos de dicha universidad. Esta investigación estuvo bajo la dirección de la Dra. Delia Esther Páramo Calderón, profesora investigadora adscrita a la misma universidad y en codirección del Dr. Lucio Abel Vázquez León, profesor investigador adscrito al Instituto Tecnológico de Tehuacán.

Aridaith Parra Reyes, 2024

Dedicatoria

Dedico este escrito a mí (Aridaith Parra Reyes), la Vida, el Universo y Dios por brindarme el momento para culminar este objetivo que formará parte de mi existencia en el ámbito profesional y personal. También dedico la formación de este escrito a mis padres Norma y Gilberto, ustedes son mis pilares, personas auténticas que han formado a un ser humano honesto, resiliente y responsable, capaz de superarse. De igual manera dedico esta tesis a mi compañero de vida Diego, quien ha sido mi apoyo, escuchando mis metas, miedos y frustraciones, me ha calmado con sus palabras y alentado a seguir siendo una mejor persona en todos los sentidos para lograr juntos nuestras metas.

Agradecimientos

Agradezco al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (Conahcyt), por darme la oportunidad de realizar mi Maestría a través de las becas nacional (tradicional) 2022-2024, con el No. CVU: 1073772.

Agradezco a mi coasesor el Dr. Lucio Abel Vázquez León, quien me dirigió en este gran proyecto que fue la maestría, así como en la investigación, desarrollo y culminación del proyecto de investigación y por darme seguimiento en la escritura de la tesis. Además de asesorarme en conocimiento también me apoyó en la parte experimental de la investigación. Me quedó con el conocimiento que me brindo, actitud y comportamiento profesional ante diversas situaciones. De igual manera agradezco sus consejos para mi formación a nivel profesional para ser más proactiva, tener la capacidad de adaptación, ser comprometida, responsable, autocrítica y **perfeccionar** mis habilidades. Le agradezco por su amabilidad, tolerancia y respeto, me es grato haber sido su primera alumna de maestría y que haya sido mi mentor. Como persona le agradezco sus consejos, palabras de ánimo y amistad.

Agradezco a mi Asesora la Dra. Delia Ester Páramo Calderón por darme seguimiento en la escritura de mi tesis de investigación, además de brindarme sus conocimientos y darme la libertad de ser a nivel profesional una persona más proactiva. De manera personal agradezco su honestidad y amabilidad.

Agradezco de igual manera a mi comité revisor por su tiempo y acompañarme en el desarrollo del escrito de mi tesis y darle seguimiento. Gracias por sus observaciones y comentarios fueron de mucha importancia para culminar este escrito.

Agradezco a la Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos (UNIDA), del Tecnológico Nacional de México, campus Veracruz y a la Dra. Madeleine Hidalgo Morales por recibirme y apoyarme en mi estancia profesional, para el desarrollo de la parte experimental del proyecto de investigación.

Agradezco al Instituto Tecnológico de Tehuacán y a la Dra. Violeta Carpintero Tepole por recibirme y apoyarme en mi estancia profesional, para el desarrollo de la parte experimental del proyecto de investigación.

Agradezco a mi compañera Vianey Vicente González por apoyarme en la parte experimental del proyecto de investigación. Por apoyarme en la parte profesional y personal.

Agradezco a la universidad del Papaloapan por darme la oportunidad de pertenecer al posgrado de Biotecnología y brindarme sus instalaciones para realizar el desarrollo y culminación del proyecto de investigación.

Resumen

El jugo de piña es un producto comercial relevante en la Cuenca del Papaloapan, sin embargo, se distribuye sin tratamiento de conservación, lo que limita su comercialización fuera de la región. En los últimos años, se ha investigado la aplicación del ultrasonido como método de conservación debido a su capacidad para inactivar microorganismos, a través del fenómeno de cavitación causado por las ondas sónicas. Por otra parte, en el desarrollo de alimentos funcionales se ha incursionado en la encapsulación por gelificación iónica externa (GIE), pues es una estrategia que permite proteger compuestos bioactivos tanto hidrosolubles como liposolubles. El aceite de hígado de bacalao (AHB) es de interés industrial como suplemento alimentario, sin embargo, el AHB puede verse afectado por factores que lo degraden. Una estrategia para evitar estos problemas es la aplicación de la GIE. Bajo este contexto, en el presente trabajo se propuso evaluar el efecto del ultrasonido sobre las características fisicoquímicas y microbiológicas del jugo de piña, enriquecido con AHB encapsulado en alginato por GIE. Se desarrollaron cápsulas a partir de emulsiones con diferentes concentraciones de alginato de sodio (1 y 2 % p/p) y en tres disolventes: Agua (A), jugo de piña (J) y una mezcla 50:50 (p:p) de Agua-Jugo de piña (AJ), adicionando 30% (p/p) de AHB y 1% de Tween 20 y una solución de CaCl_2 al 2% (p/v). Se presentaron eficiencias superiores al 90%, con rendimientos de proceso > 49%. Las cápsulas obtenidas de la emulsión con A 1% mostraron mayor estabilidad en su forma, debido al pH neutro (7) de las emulsiones y su menor viscosidad. Posteriormente se evaluó el efecto del tiempo (15 y 30 min) y la amplitud (40, 60 y 80 %) de ultrasonido (potencia: 130 W; frecuencia: 20 kHz; amplitud al 100%: 120) en baño de hielo ($-5\text{ }^\circ\text{C}$) sobre la carga microbiana del jugo de piña. Los diferentes tratamientos con ultrasonido no presentaron efectos en los parámetros fisicoquímicos y el contenido de vitamina C del jugo, a su vez, no presentaron reducción en la carga microbiana de hongos y levaduras, pero sí se alcanzó una reducción de la carga de bacterias aerobias, siendo el tratamiento a 15 min y 60% de amplitud el más efectivo. No obstante, debido a la falta de reducción en la carga de hongos y levaduras, se optó por modificar este tratamiento, quitando el baño de hielo para permitir el calentamiento de la muestra por acción del ultrasonido, además se adicionó benzoato de sodio al 0.1% en el jugo antes de ser tratado. Al aplicar este nuevo experimento se observó que el tratamiento no afectó los parámetros fisicoquímicos del jugo, a excepción del contenido de vitamina C que se redujo. Pero se logró una reducción del 99% en bacterias aerobias con una carga presente de 3.23 Log UFC/mL y la ausencia de hongos y levaduras. Teniendo establecidas las condiciones de ultrasonido, se adicionaron las cápsulas de AHB y la bebida se almacenó por un mes bajo refrigeración ($4\text{ }^\circ\text{C}$). Al finalizar el almacenamiento, las cápsulas no presentaron cambios en su morfología y en su eficiencia de encapsulación. El tratamiento final propuesto es apto para ser aplicado en el jugo de piña, sin generar cambios en sus parámetros fisicoquímicos y generando la reducción de microorganismos. Pruebas de vida de anaquel son necesarias para delimitar las condiciones de almacenamiento de la bebida funcional desarrollada.

Abstract

Pineapple juice is a relevant commercial product in the Papaloapan Basin, however, it is distributed without preservation treatment, which limits its commercialization outside the region. In recent years, the application of ultrasound as a preservation method has been investigated due to its capacity to inactivate microorganisms, through the cavitation phenomenon caused by sonic waves. On the other hand, in the development of functional foods, external ionic gelation encapsulation (EIG) has been explored, since it is a strategy that allows protecting both water-soluble and fat-soluble bioactive compounds. Cod liver oil (CLO) is of industrial interest as a food supplement, however, CLO can be affected by factors that degrade it. One strategy to avoid these problems is the application of CLO. In this context, in the present work it was proposed to evaluate the effect of ultrasound on the physicochemical and microbiological characteristics of pineapple juice, enriched with CLO encapsulated in alginate by CLO. Capsules were developed from emulsions with different concentrations of sodium alginate (1 and 2% w/w) and in three solvents: Water (A), pineapple juice (J) and a 50:50 (w:w) mixture of Water-Pineapple Juice (AJ), adding 30% (w/w) of AHB and 1% of Tween 20 and a 2% (w/v) CaCl₂ solution. Efficiencies higher than 90% were presented, with process yields > 49%. The capsules obtained from the emulsion with 1% A showed greater stability in its shape, due to the neutral pH (7) of the emulsions and its lower viscosity. The effect of ultrasound time (15 and 30 min) and amplitude (40, 60 and 80%) (power: 130 W; frequency: 20 kHz; amplitude at 100%: 120) in an ice bath (-5 °C) on the microbial load of pineapple juice was subsequently evaluated. The different ultrasound treatments had no effect on the physicochemical parameters and vitamin C content of the juice. They did not reduce the microbiological load of fungi and yeasts, but a reduction in the load of aerobic bacteria was achieved, with the treatment at 15 min and 60% amplitude being the most effective. However, due to the lack of reduction in the load of fungi and yeasts, it was decided to modify this treatment, removing the ice bath to allow the sample to be heated by the ultrasound action. In addition, 0.1% sodium benzoate was added to the juice before being treated. By applying this new experiment, it was observed that the treatment did not affect the physicochemical parameters of the juice, except for the vitamin C content, which was reduced. However, a 99% reduction in aerobic bacteria was achieved with a present load of 3.23 Log CFU/mL and the absence of fungi and yeasts. Once the ultrasound conditions were established, the AHB capsules were added and the drink was stored for one month under refrigeration (4 °C). At the end of the storage, the capsules did not present changes in their morphology and in their encapsulation efficiency. The proposed final treatment is suitable for application in pineapple juice, without generating changes in its physicochemical parameters and generating the reduction of microorganisms. Shelf life tests are necessary to delimit the storage conditions of the developed functional drink.

Contenido

Resumen	I
Abstract	II
Contenido	III
Lista de Tablas	VI
Lista de Figuras	VII
Abreviaturas	VIII
1 INTRODUCCIÓN	1
2 ANTECEDENTES	3
2.1 Generalidades de la piña (<i>Ananas comosus</i>)	3
2.1.1 Producción de piña en la Cuenca del Papaloapan	4
2.1.2 Aporte nutricional y compuestos bioactivos en la piña	5
2.2 La pasteurización y el benzoato de sodio como conservadores de alimentos	6
2.3 Aplicación del ultrasonido en el área de bebidas de frutas	8
2.3.1 Mecanismo de inactivación microbiana por ultrasonido	9
2.3.2 Estudios del proceso de ultrasonido en el tratamiento de bebidas de frutas	11
2.4 Evaluación de la calidad de los alimentos	13
2.4.1 Pruebas fisicoquímicas	13
2.4.2 Pruebas microbiológicas	15
2.5 Encapsulación de compuestos bioactivos mediante gelificación iónica	16
2.5.1 Gelificación iónica externa (GIE)	18
2.5.2 Encapsulación de compuestos bioactivos por GIE	20
2.6 Aceite de hígado de bacalao	22
3 JUSTIFICACIÓN	24
4 HIPÓTESIS	25
5 OBJETIVOS	26
5.1 Objetivo general	26
5.2 Objetivos específicos	26

6	MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
6.1	Encapsulación del ingrediente activo por gelificación iónica externa	28
6.1.1	Grasa total a partir de la composición de ácidos grasos (GC-FID) – método AOAC 996.06 modificado.....	28
6.1.2	Análisis de ácidos grasos metilados por CG-FID.....	28
6.1.3	Preparación de la emulsión	29
6.1.4	Caracterización reológica de las emulsiones	29
6.1.5	Proceso de encapsulación	29
6.1.6	Rendimiento del proceso de encapsulación.....	30
6.1.7	Eficiencia de encapsulación	31
6.2	Proceso de ultrasonido: diseño de experimentos y análisis estadístico	31
6.2.1	Caracterización fisicoquímica del jugo de piña	32
6.2.1.1	Determinación de pH.....	32
6.2.1.2	Determinación de sólidos solubles (°Brix)	32
6.2.1.3	Determinación de color.....	32
6.2.1.4	Determinación de acidez titulable	33
6.2.1.5	Determinación de vitamina C	33
6.2.2	Caracterización microbiológica del jugo de piña tratado por ultrasonido.....	33
6.2.2.1	Diluciones seriadas de la muestra de jugo para su análisis microbiológico	34
6.2.2.2	Método estándar para el recuento de aerobios mesófilos estándar en placa	34
6.2.2.3	Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.....	35
7	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
7.1	Determinación de perfil de ácidos grasos en aceite de hígado de bacalao	36
7.2	Encapsulación por gelificación iónica externa (GIE).....	36
7.2.1	Características reológicas de las emulsiones desarrolladas	37
7.2.2	Flujo másico, rendimiento y eficiencia de encapsulación	38
7.2.3	Morfología de las cápsulas obtenidas por GIE	39
7.3	Efecto del ultrasonido sobre las características fisicoquímicas y microbiológicas del jugo de piña	42

7.3.1	Análisis fisicoquímico	42
7.3.2	Análisis microbiológico	46
7.3.3	Sonicación sin baño de hielo y con conservador	49
7.3.4	Análisis fisicoquímico del tratamiento US-SB-15-60-CC	50
7.3.5	Análisis microbiológicos US-SB-15-60-CC	53
7.3.6	Eficiencia de las cápsulas adicionadas al jugo de piña tratado por US-SB-15-60-CC.....	58
8	CONCLUSIONES	61
9	Perspectivas.....	63
10	REFERENCIAS.....	64
	ANEXO 1	69

Lista de Tablas

Tabla 2.1 Descripción del índice de color de maduración de la piña.....	3
Tabla 2.2 Producción de piña durante el año 2022 en la Cuenca del Papaloapan.....	4
Tabla 2.3 Composición nutricional de la piña (<i>Ananas comosus</i>).	6
Tabla 2.4 Clasificación del ultrasonido y sus aplicaciones generales en la industria alimentaria.	8
Tabla 2.5 Estudios sobre la evaluación del efecto del ultrasonido sobre la carga microbiana y las propiedades fisicoquímicas de jugos de frutos.	12
Tabla 2.6 Ventajas y desventajas de los principales métodos de encapsulación.	18
Tabla 2.7 Estudios de encapsulación por gelificación iónica externa.....	21
Tabla 7.1 Determinación de ácidos grasos en los lípidos totales presentes del aceite de hígado comercial.	36
Tabla 7.2 Eficiencia de encapsulación y rendimiento de proceso obtenido a partir de la gelificación iónica de emulsiones al 30% (p/p) en peso de aceite de hígado de bacalao (AHB) en jugo de piña (J), agua (A) y mezcla 50:50 de A:J (p:p), adicionadas con 1 o 2 % (p/p) de alginato de sodio y Tween 20 al 1%. .	38
Tabla 7.3 Efecto del tiempo y amplitud del ultrasonido con una potencia de 130 W sobre las coordenadas cromáticas de los jugos tratados.....	42
Tabla 7.4 Efecto del tiempo y amplitud del ultrasonido con una potencia de 130 W sobre los parámetros fisicoquímicos (°Brix, sólidos totales, pH y acidez titulable) de los jugos tratados.	44
Tabla 7.5 Efecto del tiempo y amplitud del ultrasonido con una potencia de 130 W sobre el contenido de vitamina C de los jugos tratados.	45
Tabla 7.6 Efecto del tiempo y amplitud del ultrasonido con una potencia de 130 W sobre la carga microbiana de bacterias aerobias, hongos y levaduras del jugo de piña.	46
Tabla 7.7 Efecto del tratamiento de ultrasonido (60% amplitud por 15 min), sin baño de hielo sobre las características fisicoquímicas (°Brix, sólidos totales, pH y acidez titulable) de un jugo de piña con 0.1% de conservador (benzoato de sodio).....	50
Tabla 7.8 Efecto del tratamiento de ultrasonido (60% amplitud por 15 min), sin baño de hielo sobre las coordenadas cromáticas del jugo de piña con 0.1% de conservador (benzoato de sodio).....	52
Tabla 7.9 Efecto del tratamiento de ultrasonido (60% amplitud por 15 min), sin baño de hielo sobre el contenido de vitamina C del jugo de piña con 0.1% de conservador (benzoato de sodio).	53
Tabla 7.10 Efecto del ultrasonido US-SB-15-60 con conservador y sin conservador, con una potencia de 130 W sobre la carga microbiana de bacterias aerobias, hongos y levaduras del jugo de piña.	54
Tabla 7.11 Eficiencia de encapsulación en cápsulas almacenadas en jugo de piña tratado por US-SB-15-60-CC.....	58

Lista de Figuras

Figura 2.1 Índice de maduración de la piña. Tomado de:(MEFC)	4
Figura 2.2 Comportamiento de las burbujas durante la cavitación desarrollado en un proceso de ultrasonido de alta intensidad (Viresa, 2022).	10
Figura 2.3 Mecanismo de inactivación microbiana por el ultrasonido (Ulloa <i>et al.</i> , 2013).....	11
Figura 2.4 Formas moleculares en equilibrio del ácido ascórbico (Bineesh <i>et al.</i> , 2005).....	15
Figura 2.5 Clasificación de los métodos de encapsulación de compuestos bioactivos (Aldana <i>et al.</i> , 2004; Ortiz <i>et al.</i> , 2021; Niño <i>et al.</i> , 2022; Díaz <i>et al.</i> , 2023).	17
Figura 2.6 Estructura química del alginato y los bloque G y M (Helgerud <i>et al.</i> , 2009).....	19
Figura 2.7 Representación del modelo "caja de huevos" de gelificación del alginato (Helgerud <i>et al.</i> , 2009).	20
Figura 6.1 Diagrama general de la metodología de investigación.	27
Figura 6.0.2 Sistema de encapsulación por gelificación iónica externa.	30
Figura 7.1 Curva de flujo de emulsiones al 30% (p/p) de aceite de hígado de bacalao en jugo de piña (J), agua (A) y mezcla 50:50 de AJ (p:p), adicionadas con 1 o 2 % (p/p) de alginato de sodio, y Tween 20 al 1%.....	37
Figura 7.2 Morfología de las cápsulas obtenidas por diferentes formulaciones J 1%, J 2%, AJ 1%, AJ 2%, A 1% y A 2%.5.	41

Abreviaturas

A: Agua

J: Jugo

AJ: Agua-Jugo

AHB: Aceite de hígado de bacalao

ω 3-PUFA: Ácidos grasos poliinsaturados omega-3

GIE: Gelificación iónica externa

bh: Base húmeda

Sedapa: Secretaría de Desarrollo Agropecuario, Pesca y Acuicultura

UAI: ultrasonido de alta intensidad

H: Hidrógeno

OH: Hidróxido

CieLab: Espacio de color $L^*a^*b^*$

L^* : Parámetro de luminosidad de color

a^* : Posición entre rojo y verde

b^* : Posición entre amarillo y azul

AA: Ácido ascórbico

AOAC: Asociación Científica Dedicada a la Excelencia Analítica

bs: Base seca

EAG: Equivalente de ácido gálico

EE%: Eficiencia de Encapsulación

MANOVA: Análisis de Varianza Multifactorial

AE: Agar Estándar

RVBA: Agar-Rojo- Violeta-Bilis-Lactosa

APD: Agar papa–dextrosa

1 INTRODUCCIÓN

El procesamiento térmico es el más utilizado para aumentar la vida de anaquel de bebidas; sin embargo, las altas temperaturas alteran las propiedades nutricionales, fisicoquímicas y sensoriales de los alimentos, disminuyendo su calidad (Aneja *et al.*, 2014). Para evitar estos efectos negativos, se ha investigado la aplicación del ultrasonido para la inactivación microbiana, debido a su capacidad para destruir paredes celulares y membranas biológicas a través del fenómeno de cavitación causado por las ondas sónicas (Ulloa *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2017). Esta tecnología utiliza temperaturas de procesamiento inferiores a los procesos convencionales (ej., pasteurización, ultrapasteurización), favoreciendo la conservación de las propiedades fisicoquímicas del producto (Ortiz *et al.*, 2021).

En otro contexto, existe el interés de desarrollar alimentos funcionales listos para su consumo para satisfacer la demanda de consumidores interesados en llevar una dieta saludable y acorde a su ritmo acelerado de vida. Para obtener un alimento funcional se puede optar por la adición de compuestos bioactivos, no obstante, el enriquecimiento directo de estos componentes en los alimentos es limitado, pues ciertos factores los degradan, como el pH, temperatura, luz, humedad, oxígeno, tiempo de almacenamiento, entre otros (Tripathy *et al.*, 2021). En este campo, la encapsulación por gelificación iónica es una estrategia que permite proteger compuestos bioactivos tanto hidrosolubles como liposolubles (Ortiz *et al.*, 2021), consiste en producir pequeñas gotas de solución a partir de la mezcla del material de recubrimiento y el compuesto que se desea encapsular. El material de recubrimiento comúnmente usado es el alginato de sodio, debido a que es un polímero de fácil acceso, baja viscosidad y alta reactividad con los iones calcio. Esta solución se fuerza a través de boquillas generando gotas, y estas caen en un baño de iones calcio, formando así una cápsula de gel (Ortiz *et al.*, 2021). La industria alimentaria ha generado un interés sobre la aplicación del aceite de hígado de bacalao (AHB) como aditivo nutricional o suplemento alimentario para la ingesta diaria, debido a que es uno de los aceites que además de proporcionar una fuente de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 (ω 3-PUFA), también brinda una fuente de vitamina A y D (Dyck *et al.*, 2011), presentando efectos fisiológicos positivos en la salud de los consumidores, como la reducción de los lípidos en sangre, la regulación de la presión arterial y el colesterol. Sin embargo, el AHB puede verse afectado por factores que lo degraden. Por lo tanto, una estrategia para evitar estos problemas es la aplicación de la GIE.

En la Cuenca del Papaloapan se cuenta con una amplia variedad de frutos que pueden utilizarse para el desarrollo de bebidas. De acuerdo con la Secretaría de Desarrollo Agropecuario, Pesca y Acuicultura (Sedapa), esta región es uno de los lugares con mayor producción de piña. En la actualidad la Cuenca del Papaloapan cuenta con productores locales de jugos de piña, siendo un producto comercial importante del cual se sostienen varias familias y productores agrícolas; sin embargo, presenta una corta vida útil debido a que se comercializa sin un proceso de conservación que garantice su distribución

fuera de la región. El jugo de piña es un producto al que se le pueden aplicar ambas tecnologías citadas arriba; el ultrasonido para reducir la carga de microorganismos y la adición de compuestos bioactivos encapsulados para brindar un efecto positivo en la salud de sus consumidores. Por ello, el objetivo general del presente trabajo de investigación es evaluar el efecto del ultrasonido sobre las características fisicoquímicas y microbiológicas del jugo de piña, enriquecido con aceite de hígado de bacalao encapsulado en alginato.

2 ANTECEDENTES

2.1 Generalidades de la piña (*Ananas comosus*)

La piña (*Ananas comosus*) forma parte de la familia Bromeliaceae, una familia muy grande de las regiones tropicales de América (originaria de África); la mayoría de las plantas crecen sobre los troncos y ramas de los árboles (epífitas), sin embargo, la piña crece sobre el suelo. Es una planta herbácea perenne y monocárpica. Cada tallo florece sólo una vez y muere después de fructificar, entonces, un brote lateral toma el lugar de la planta madre (Morga y Cruz, 2014): El cultivo de piña se establece en los meses entre abril a junio. Pero se puede sembrar todo el año siempre y cuando se cuente con un sistema de riego (Ministerio de Economía Familiar Comunitaria [MEFC]). La cosecha de la piña inicia a principios del otoño (noviembre), y se mantiene en el invierno (diciembre y enero) mostrando una baja en la producción, pero a partir de febrero a junio aumentan los niveles de cosecha, bajando nuevamente su producción entre julio y octubre (Morga, 2003). En general, se espera que la planta de piña dé frutos dentro de los 15 meses o hasta dos años después de la siembra. Los primeros tres meses después de la siembra son la etapa crítica para la floración y maduración de la fruta, ya que la planta se vuelve sensible a factores climáticos, como la temperatura y la nubosidad. Requiriendo el cultivo de piña temperaturas óptimas entre 20 y 30 °C con suficiente luz solar (Ali *et al.*, 2020).

Para clasificar el estado de maduración de la piña se utiliza el índice de color del fruto (Figura 2.1) que se describe en la Tabla 2.1. En el presente proyecto de investigación se utilizarán frutos con un índice de maduración 5 para la producción de jugo.

Tabla 2.1 Descripción del índice de color de maduración de la piña.

Nivel de color	Descripción
1	Color principalmente verde ocre con oscurecimiento en las fisuras que dividen las escamas que forman la corteza después de cosecha.
2	Color amarillo en la parte superior de cada escama que forma la piel y esta empieza a desarrollarse hacia los extremos cuando la madurez inicia.
3	Color amarillo-anaranjado en prácticamente todo el fruto y solo los extremos presentan una pequeña tonalidad verde. Las hojas de la corona han perdido turgencia.
4	Color totalmente anaranjado. El extremo basal del fruto es menos firme y las hojas de la corona presentan marchitamiento
5	Color intensamente anaranjado. El extremo basal del fruto es firme y las hojas de la corona presentan marchitamiento

Fuente: (MEFC)

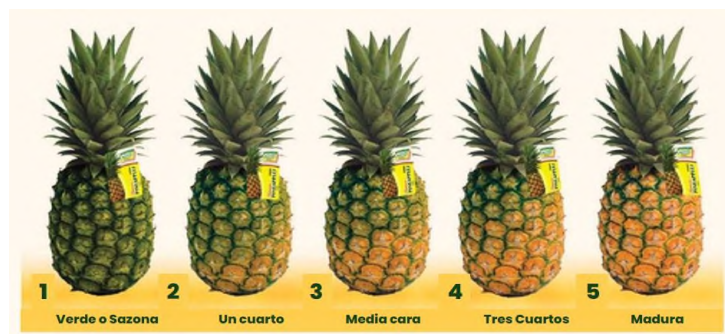


Figura 2.1 Índice de maduración de la piña. Tomado de:(MEFC)

2.1.1 Producción de piña en la Cuenca del Papaloapan

El cultivo de la piña ha tenido mayor impacto en todas las zonas tropicales, encontrándose entre los principales productores a: Tailandia, Filipinas, India, China, Nigeria y México, este último en el noveno lugar a nivel mundial. En México, la piña es uno de los cuatro frutos tropicales más importantes en cuanto a producción, junto con el mango, el aguacate y la papaya (Ibarra *et al.*, 2021). La mayor producción de piña se encuentra en los estados de: Veracruz, Oaxaca y Tabasco. La Secretaría de Desarrollo Agropecuario, Pesca y Acuicultura (Sedapa, 2022) ha informado que Oaxaca se encuentra por debajo de Veracruz, como segunda entidad en producción anual de piña, y en conjunto forman la zona de mayor producción del país, la denominada Cuenca del Papaloapan, zona baja (Morga y Cruz, 2014). En el 2019, el 80% de la producción nacional de piña se consiguió en la región del Bajo Papaloapan, que está constituida por siete municipios del estado de Veracruz (Isla, Juan Rodríguez Clara, José Azuela, Chacaltianguis, Medellín, Alvarado y Tlaxiucoyan), y por dos municipios del estado de Oaxaca (Loma Bonita y Tuxtepec). En la Tabla 2.2, se aprecia la producción de piña durante el año 2022 de los diferentes municipios pertenecientes a la Cuenca del Papaloapan (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera [SIAP]).

Tabla 2.2 Producción de piña durante el año 2022 en la Cuenca del Papaloapan

Municipio	Superficie (ha)		Valor de producción (miles de pesos)
	sembrada	Cosechada	
Tuxtepec	580	580	250,915.52
Loma Bonita	1,483.50	1,483.50	743,203.68
Tlaxiucoyan	297	295	57,703.30
Alvarado	212	210	42,526.08
Medellín	940.5	940	195,534.61
Isla	11,461.40	4,972.90	1,126,055.92
Juan Rodríguez Clara	11,394.00	4,516.00	947,900.40
José Azueta	10,591.00	3,648.00	796,735.86

Fuente: (Díaz *et al.*, 2023; SIAP)

De la piña que se produce en México, un 70% se destina normalmente para el mercado nacional de fruta fresca, un 20% para transformaciones de la fruta y un 10% para el mercado de exportación de fruta fresca, siendo E.U.A su principal destino (Morga y Cruz, 2014). La piña se consume principalmente como fruta fresca, enlatada, mínimamente procesada y como saborizante debido a su dulce sabor y aroma. Existe una amplia gama de productos de piña procesada que está disponible en el mercado, incluido el jugo de piña, la piña seca y congelada, el néctar y la piña enlatada (Morga y Cruz, 2014). En la Cuenca del Papaloapan la piña se cosecha de noviembre a julio. La producción obtenida en los primeros meses de ese período se destina preferentemente a la industria; en los meses finales, la abundancia de la fruta, así como su maduración acelerada a causa de las altas temperaturas, obliga a canalizar una elevada proporción de la cosecha al mercado interno de piña fresca. Entre las unidades industriales que se encuentran en municipios como Loma Bonita están: Cofrinsa, Herdez y Empacadora Clara, estos producen piña en rebanadas, medias rebanadas, trozos, cubos, molida y jugo (Departamento de Estudios y Proyectos [DEP], 1983). Actualmente, estas empresas ya no se encuentran vigentes en el municipio de Loma bonita, sin embargo, se han instalado nuevas empresas de conservas de piña como: Blue Planet Food, Conservas la Bonita y Conserva de Piña la Española. En los municipios como Tuxtepec y Loma bonita existen productores locales de jugo de piña, que elaboran de manera artesanal el jugo de piña mediante prensado en frío; sin embargo, este producto se comercializa sin un proceso de conservación que garantice su distribución fuera de la región (DEP, 1983). Debido a la relevancia agrícola, económica y cultural de este fruto, se seleccionó como objeto de estudio en el presente proyecto de investigación.

2.1.2 Aporte nutricional y compuestos bioactivos en la piña

De acuerdo con la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) y al Departamento de Agricultura de E.U.A (USDA, por sus siglas en inglés), la piña es una fuente significativa de vitaminas (vitamina C, tiamina y riboflavina) y minerales, como se aprecia en la Tabla 2.3 (Ibarra *et al.*, 2021). También se han reportado algunos compuestos bioactivos presentes en la piña, como carotenoides y fenoles (Ibarra *et al.*, 2021). Hossain y Rahman (2011), reportaron que la piña es una buena fuente de antioxidantes, por la significativa presencia de fenoles. Zdrojewicz (2018), dio a conocer que la piña madura contenía aproximadamente 28 mg de vitamina C, siendo un antioxidante que mantiene las células sanas contra los radicales libres. Cannon y Ho (2018), reportaron la presencia de tiamina en la piña, la cual tiene una importante aportación en el control de pacientes con problemas en el sistema nervioso. La tiamina es beneficiosa para reducir los cambios metabólicos debidos a la diabetes y los niveles de glucosa. La piña también contiene bromelina, una enzima que actúa en la mejora de la digestión y como agente cardioprotector (Asim *et al.*, 2015).

Tabla 2.3 Composición nutricional de la piña (*Ananas comosus*).

Nutrientes	Valor por 100 g	Nutrientes	Valor por 100 g
Agua	86 g	Vitaminas	
Energía	50 kcal	Vitamina C (Ácido ascórbico)	0.079 mg
Proteína	0.54 g	Vitamina B ¹ (Tiamina)	0.032 mg
Lípidos totales (grasas)	0.12 g	Vitamina B ² (Riboflavina)	0.5 mg
Carbohidratos	13.12 g	Vitamina B ³ (Niacina)	0.112 mg
Fibra dietética total	1.4 g	Vitamina B ⁶	18 ug
Azúcares totales	9.85 g	Ácido fólico	3 UI
Minerales		Vitamina A	0.02 mg
Calcio, (Ca)	13 mg	Vitamina E (Alfatocoferol)	0.7 ug
Hierro, (Fe)	0.29 mg	Vitamina K (Filoquinona)	47.8 mg
Magnesio, (Mg)	12 mg	Lípidos	
Fósforo, (P)	8 mg	Ácidos grasos saturados totales	0.009 g
Potasio, (K)	109 mg	Ácidos grasos moniinsaturados totales	0.013 g
Sodio, (Na)	1 mg	Ácidos grasos poliinsaturados totales	0.04 g
Zinc, (Zn)	0.12 mg		

Fuente: (Ibarra *et al.*, 2021).

Como se reporta en la Tabla 2.3, la piña contiene vitamina C o ácido ascórbico, siendo muy importante para la nutrición, ya que es una sustancia esencial que previene enfermedades como el escorbuto y presenta la función de antioxidante biológico. Además, los humanos no tienen la capacidad de sintetizar este componente, por lo que debe ser suministrado por la dieta. Sin embargo, su estabilidad en los alimentos se ve afectada por factores como las condiciones de proceso, almacenamiento y con la composición de la matriz alimentaria; por lo que la vitamina puede degradarse debido a factores como la temperatura, pH, luz, tiempo, presencia de enzimas, oxígeno y catalizadores metálicos. Existen estudios de conservación de alimentos como los jugos donde se han evaluado el contenido de vitamina C y se ha reportado que este componente sufre una reducción significativa; este efecto se atribuye a que este compuesto puede degradarse fácilmente por exposición al calor y por oxidación (Villareal *et al.*, 2013). Es por ello que este nutriente es considerado como un índice de la calidad del procesamiento y almacenamiento de los alimentos, ya que, si se mantiene estable, nos indica que los demás componentes presentes en el alimento también se mantienen estables (Kurozawa *et al.*, 2014). Debido a esto se seleccionó como compuesto bioactivo marcador, es decir, se evaluará el efecto de las condiciones de sonicación sobre su contenido.

2.2 La pasteurización y el benzoato de sodio como conservadores de alimentos

Los alimentos pueden sufrir deterioro a causa de los microorganismos (bacterias, levaduras y hongos), teniendo implicaciones económicas para los fabricantes y distribuidores, y de inocuidad y seguridad para los consumidores. Para prevenir esta situación se tiene como solución la utilización de procesos

térmicos y la adición de conservadores químicos para evitar y retardar el desarrollo de microorganismos en los alimentos. Los procesos térmicos tienen como finalidad de reducir o eliminar la carga microbiana inicial en el producto. Dichos procesos son los más utilizados para aumentar la vida útil de los alimentos líquidos como leches, bebidas fermentadas, y jugos de frutas y hortalizas; sin embargo, el producto puede perder su calidad nutricional por la degradación térmica de algunos nutrientes y compuestos activos (Aneja *et al.*, 2014). Actualmente, existen tres tipos de pasteurización térmica; Pasteurización lenta o baja, Pasteurización rápida (HTST) y Proceso UHT o Ultra High Temperature. Existiendo diferentes estudios de investigación donde se han evaluado procesos térmicos en jugos de frutas a diferentes temperaturas (75, 80, 85 y 90 °C) y tiempos de tratamiento (30, 60, 90 y 120 s), y reportan que no hay cambios significativos en las características sensoriales, pero sí una reducción significativa del contenido de vitamina C; este efecto se atribuye a que esta vitamina puede degradarse fácilmente por exposición al calor y por oxidación (Villareal *et al.*, 2013). Sin embargo, la pasteurización lenta o baja fue el primer proceso térmico creado y es uno de los tratamientos de pasteurización más comunes en donde se somete al producto a temperaturas entre los 65°C y 72°C, por lapsos de 15 y 30 minutos para luego proceder al enfriamiento del líquido y su envasado. Se han reportado estudios como el de Pupiales, (2021), donde reporta la evaluación de diferentes tratamientos de pasteurización de temperatura: 55, 60 y 65 °C en tiempos: 10, 20 y 30 min en un jugo de limón, reportando que el tratamiento de 55 °C en 10 min se obtiene una muestra con menor pérdida de vitamina C. Por su parte Ocampos y Saquinga (2016) reportaron la pasteurización del zumo y jugo de naranja aplicando dos tratamientos: 65 y 72 °C en tiempos de 15 y 30 min. Estableciendo que el mejor tratamiento para preservar la calidad del zumo fue de 65°C por 30 min y para el jugo fue de 72°C por 15 min. Debido a lo mencionado se optó por aplicar dichas condiciones convencionales en el presente estudio.

En cuanto a las sustancias conservantes químicas más usadas, se encuentra el benzoato de sodio, un conservador sintético que se obtiene de manera industrial por reacción del hidróxido de sodio con ácido benzoico, siendo la sal sódica del ácido benzoico. En la industria alimentaria es el conservante más utilizado por su menor costo y por prevenir la presencia de bacterias, levaduras y hongos. Generalmente, son más efectivos contra levaduras y mohos que contra bacterias en concentraciones menores de 0.2%. Se ha utilizado ampliamente en la conservación de alimentos ácidos (pH<3.6), como en refrescos, bebidas energéticas, zumos, jugos, cervezas sin alcohol, licores, vinos, mayonesas, pastelería. El ácido benzoico como sus sales (benzoato de sodio) no tienen efectos nocivos para los consumidores cuando se utiliza en pequeñas cantidades, debido a que se elimina rápidamente del organismo después de conjugarse con la glicina para formar ácido hipúrico (benzoiglicina), evitando así su acumulación (León, 2017). El benzoato de sodio es un conservador que, al utilizarse en pequeñas concentraciones, no altera las características fisicoquímicas, sensoriales y nutricionales de los alimentos.

2.3 Aplicación del ultrasonido en el área de bebidas de frutas

En las últimas décadas se han desarrollado métodos no térmicos como alternativas para los tratamientos térmicos de conservación. Por ejemplo, la tecnología de ultrasonido, que además de mantener el producto con una vida de anaquel más extensa, evita alteraciones en sus propiedades sensoriales y en el contenido de compuestos bioactivos y nutricionales (Delgado, 2012b). El ultrasonido se ha estudiado como método de conservación en los alimentos debido al efecto de reducción microbiana, generado por las ondas sonoras a través de la energía vibratoria, cuyas frecuencias son continuas y mayores a los 20 kHz, superando el límite auditivo del oído humano. La sonicación se puede clasificar de acuerdo con los intervalos de frecuencias utilizados, como se muestra en la Tabla 2.4 (Delgado, 2012a; Ulloa *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2017).

Tabla 2.4 Clasificación del ultrasonido y sus aplicaciones generales en la industria alimentaria.

Tipo de ultrasonido	Capacidad	Aplicación en alimentos
Baja intensidad	Análisis no invasivos, monitoreo de alimentos (procesamiento y almacenamiento) en el área de calidad e inocuidad.	Cárnicos crudos y fermentados Vegetales y frutos (cosecha) Quesos Aceites de cocina Cereales Alimentos congelados
Baja potencia (baja energía) Frecuencias >100 kHz Intensidades <1 W·cm ⁻²		
Alta intensidad	Cambios en las propiedades físicas, químicas y bioquímicas de los alimentos tratados (inactivación microbiana e inactivación enzimática).	
Alta potencia (alta energía) Frecuencias 20 y 100 kHz Intensidades >1 W·cm ⁻²		

Fuente: (Ulloa *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2017)

La aplicación del ultrasonido en los alimentos se puede clasificar en áreas como; análisis, control de calidad, así como procesamiento, conservación e inocuidad. El ultrasonido se ha aplicado a alimentos como cárnicos para la medición de grasa en carnes. En frutas y vegetales se ha utilizado como método de medición para valorar el estado de madurez. En cereales, la aplicación del ultrasonido va desde la evaluación de la calidad de la masa de productos de panificación en procesos en línea, caracterización de la fase de fermentación en productos de panificación, monitoreo en los cambios en la consistencia de la masa de harina de trigo. En productos grasos y emulsiones se ha utilizado el ultrasonido para monitorear la transición de fase y cristalización de varias formulaciones de emulsiones aceite-agua. El ultrasonido se ha utilizado como herramienta de monitoreo para la congelación de los alimentos, debido a que se utiliza para calcular el porcentaje del alimento congelado con función del tiempo, ofreciendo una predicción del tiempo para la congelación total del alimento. La aplicación del ultrasonido también se ha estudiado para modificar las propiedades fisicoquímicas y mejorar la calidad de los alimentos. Las

aplicaciones van desde la extracción de sabores, desgasificación, destrucción de espumas, mejoramiento de la cristalización y modificación del polimorfismo, de igual forma se ha utilizado como herramienta para la esterilización de equipos y prevención de contaminación en el procesamiento de los alimentos por microorganismos patógenos o no patógenos (Ulloa *et al.*, 2013).

Entre los alimentos estudiados se encuentran los jugos de frutas, en ellos se han evaluado la inactivación microbiana y enzimática, especialmente porque se ha demostrado su capacidad para destruir paredes celulares y membranas biológicas a temperaturas de procesamiento inferiores a la pasteurización convencional. En la siguiente sección se describe el mecanismo por el cual el ultrasonido consigue disminuir la carga microbiana e inactivar enzimas.

2.3.1 Mecanismo de inactivación microbiana por ultrasonido

Como se citó en la Tabla 2.4, el ultrasonido de alta intensidad (UAI) se utiliza para lograr la inactivación microbiana y enzimática. En el proceso de sonicación las vibraciones que genera el ultrasonido se clasifican de dos formas: condensación y rarefacción. En los ciclos de condensación, las partículas se comprimen promoviendo un aumento de presión y densidad en el medio. En los ciclos de rarefacción, las partículas se separan, mostrando un comportamiento opuesto en presión y densidad. Durante estos ciclos se producen miles de cavidades o burbujas, generando el fenómeno físico conocido como cavitación, como se aprecia en la Figura 2.2. La cavitación es un factor que promueve la muerte celular, mediante efectos físicos y químicos como calentamiento y descarga eléctrica y producción de radicales libres. Los efectos físicos que genera la cavitación se clasifican en estables y transitorias. En la cavitación estable, las burbujas crecen, pero no colapsan, sino que se disuelven en el medio mediante la formación de remolinos que generan una microcorriente que roza la superficie celular, promoviendo la formación de poros u orificios en la membrana celular y alterando la pared celular. Para la cavitación transitoria, las burbujas crecen rápidamente y colapsan violentamente en burbujas o fragmentos más pequeños, lo que implica sonoluminiscencia, es decir, un fenómeno violento con miles de explosiones y aumentos de temperatura y presión que eliminan partículas de la superficie de la célula (Earnshaw *et al.*, 1995). En los efectos químicos que genera la cavitación durante la formación, implosión y explosión de burbujas, se encuentra la sonólisis del agua, es decir el rompimiento de enlaces químicos, debido a los efectos de la temperatura y la presión, generándose la formación de radicales libres. Debido a que el agua es una de las sustancias más abundantes en los alimentos, las moléculas de agua se rompen en OH^- y H^+ . Estos radicales libres también tienen un efecto sobre la inactivación microbiana, actuando sobre la membrana celular en primer lugar. Pero cuando los radicales libres se combinan con otros compuestos, se producen oxidantes, lo que se considera un efecto secundario sobre la inactivación microbiana por ultrasonido (Tsukamoto *et al.*, 2004).

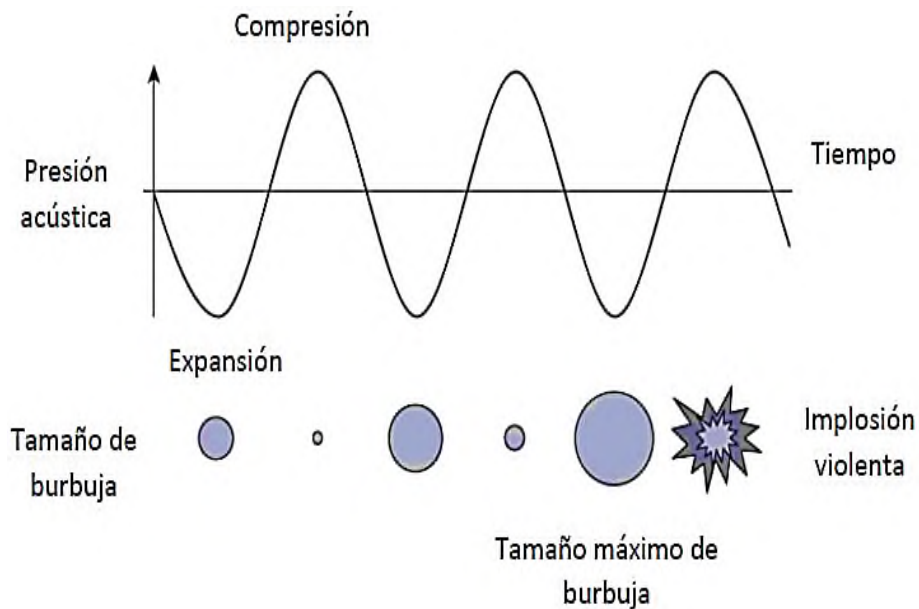


Figura 2.2 Comportamiento de las burbujas durante la cavitación desarrollado en un proceso de ultrasonido de alta intensidad (Viresa, 2022).

En la Figura 2.3 se representan algunos efectos físicos y químicos generados por el fenómeno de cavitación en células microbianas, desde el daño en la membrana por formación de poros, falta de componentes celulares, erosión y deposición de partículas celulares en la superficie, así como efectos de sonoluminiscencia y quimioluminiscencia, producción de radicales libres que se expresa como OH^- y H^+ , y aumento de temperatura y presión. Es importante señalar que la frecuencia ultrasónica utilizada debe ser inferior a 2.5 MHz, ya que la cavitación no se producirá por encima de ese nivel. También debe considerarse que los microorganismos son relativamente resistentes a los efectos aquí señalados, por lo que se requieren períodos prolongados de ultrasonificación, o potencias elevadas, para que el producto sea seguro e inocuo (Piyasena *et al.*, 2003). Por ello, se han realizado diferentes investigaciones para definir específicamente las condiciones de ultrasonido que consigan un tratamiento de reducción microbiana adecuada para distintos alimentos.

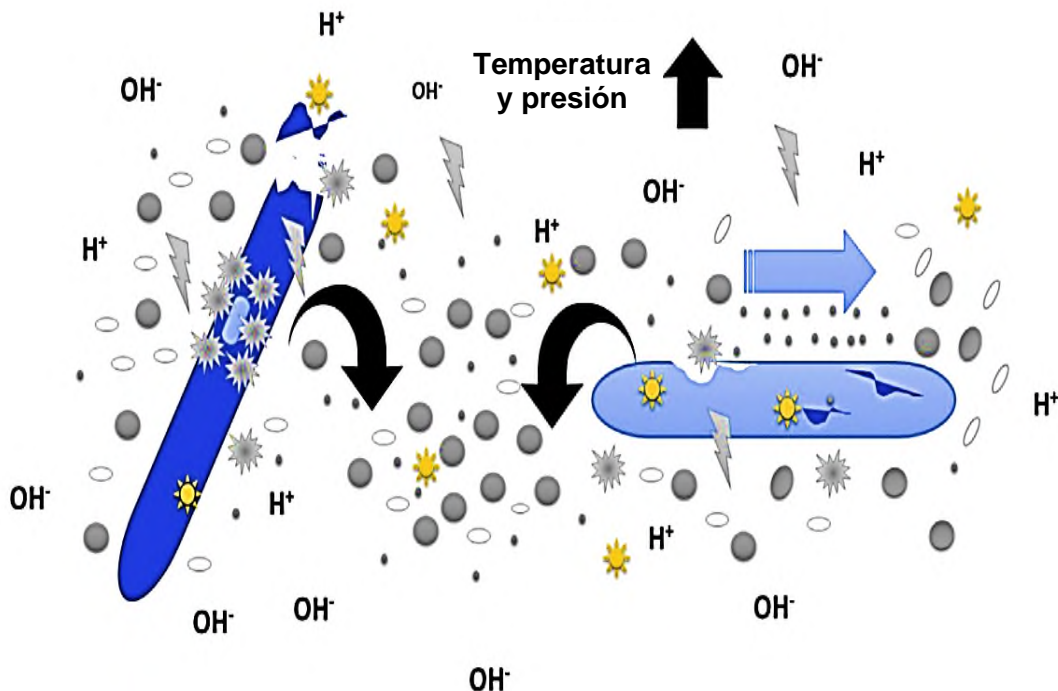


Figura 2.3 Mecanismo de inactivación microbiana por el ultrasonido (Ulloa *et al.*, 2013).

2.3.2 Estudios del proceso de ultrasonido en el tratamiento de bebidas de frutas

Actualmente, el método de ultrasonido se ha aplicado a nivel laboratorio en la elaboración de bebidas, como leches de sabores, panela, prebióticos, yogur, y particularmente en jugos de frutas, con la finalidad de evaluar su efectividad en la inactivación microbiana y el efecto que puede o no generar sobre las propiedades fisicoquímicas de los alimentos. En la Tabla 2.5, se pueden observar las condiciones del ultrasonido que se han evaluado, así como sus efectos sobre la reducción microbiana y fisicoquímicas de diferentes jugos de frutas.

Algunos estudios, como el realizado por Cordero, (2023), reportan el efecto de diferentes condiciones del ultrasonido (Tabla 2.5) sobre la pérdida promedio del contenido de compuestos bioactivos del jugo pulposo de piña; vitamina C total, ácido ascórbico, carotenoides, polifenoles totales, capacidad antioxidante hidrofílica (H-ORAC) y color en la escala CieLab (L^* , a^* , b^*). Los autores reportan que el tiempo de sonicación no afectó significativamente ($p > 0,05$) los valores promedio del H-ORAC, polifenoles totales, ni los descriptores del color (L^* , a^* , b^*) del jugo de piña. Sin embargo, reportaron que a medida que se aumenta el tiempo de sonicación las pérdidas de ácido ascórbico son mayores.

Tabla 2.5 Estudios sobre la evaluación del efecto del ultrasonido sobre la carga microbiana y las propiedades fisicoquímicas de jugos de frutos.

Referencia	Fruto (s) base de la bebida	Factores evaluados	Efecto sobre carga microbiana	Efecto sobre propiedades fisicoquímicas
Bhat et al., (2011)	Lima	<ul style="list-style-type: none"> Tiempo: 0, 30 y 60 min Frecuencia: 25 kHz Potencia: 70% Temperatura: 20 °C 	Reducción microbiana significativa a los 60 min.	No se observó un efecto significativo en el pH, sólidos solubles totales (Brix) y acidez titulable.
Abid et al., (2013)	Manzana	<ul style="list-style-type: none"> Tiempo: 0, 30, 60 y 90 min Frecuencia: 25 kHz Potencia: 70% (350 W) Temperatura: 20 °C 	Reducción microbiana significativa a 60 y 90 min.	No se observó un efecto significativo en el pH, sólidos solubles totales (Brix) y acidez titulable.
Aadil et al., (2015)	Toronja	<ul style="list-style-type: none"> Tiempo: 30 y 60 min Frecuencia: 28 kHz Potencia: 70%, 420 W Temperatura: 20, 30, 40, 50 y 60 °C 	Reducción microbiana significativa a 60 °C durante 60 min.	Diferencias en los valores de color y contenido de carotenoides.
Jambrak et al., (2018)	Manzana, arándano y mora azul	<ul style="list-style-type: none"> Tiempo: 3, 6 y 9 min Frecuencia: 20 kHz Potencia: 70 % 525 W Amplitud: 60, 90 y 120 µm Temperatura: 20, 40 y 60 °C 	La inactivación microbiana eficaz ocurrió a 40 y 60 °C a través de las amplitudes de 90 µm y 120 µm, y tiempo de tratamiento de 6 min.	No reportado.
Adekunte et al., (2010)	Tomate	<ul style="list-style-type: none"> Tiempos: 2 a 10 min, con pulsos de 5 s encendido y 5 s apagado. Frecuencia: 20 kHz Amplitud: 24.4 y 61 µm Temperatura no reportada 	Inactivación de levaduras a una amplitud de 61 µm y a un tiempo de 10 min.	No reportado.
Starek et al., (2021)	Tomate	<ul style="list-style-type: none"> Tiempo: 2, 5 y 10 min Intensidad: 28 y 40 W/cm² Temperatura no reportada 	Inactivación microbiana a una intensidad de 40 W/cm ² , durante 5 y 10 min.	Sin efectos significantes en el pH. Cambios menores en el contenido de licopeno y disminución en el contenido de vitamina C.
Rodríguez al., (2022)	Melón	<ul style="list-style-type: none"> Tiempo: 10 y 15 min Frecuencia: 20 kHz Intensidad: 27 y 52 W/cm² Temperatura no reportada 	Inactivación total en bacterias coliformes a una intensidad de 52 W/cm ² , con 10 min de sonicación.	Los carotenoides aumentaron hasta un 42 % y los fenoles disminuyeron un 33 %. La capacidad antioxidante del jugo fue mejorada
Cordero, 2023	Piña	<ul style="list-style-type: none"> Amplitud del 40% (24,4 µm), Intensidad de 39.4 W/cm² Potencia 750 W Frecuencia de 20 kHz Tiempos (4, 8, 12, 16 y 20) min Temperatura a 25 (± 2) °C. 	No reportado	A medida que se incrementó el tiempo de sonicación las pérdidas promedio del ácido ascórbico es mayor

En los demás estudios reportados en la Tabla 2.5, se observan que además de evaluar las características fisicoquímicas y presencia de ácido ascórbico, evalúan la inactivación microbiana por efecto de las condiciones de ultrasonido, siendo las más estudiadas el tiempo, potencia, amplitud, frecuencia y temperatura, reportándose que a condiciones mayores se genera una inactivación microbiana más efectiva. Las potencias se han evaluado entre 420 y 525 W, por lo que valdría la pena evaluar potencias mayores. En los antecedentes reportados se han estudiado tanto los análisis fisicoquímicos como los análisis microbiológicos, con la finalidad de poder evaluar el efecto que brindar la aplicación del ultrasonido en la calidad e inocuidad de los alimentos tratados. Es importante mencionar que los diferentes estudios presentan variaciones en las condiciones que estudiaron respecto al equipo de ultrasonido.

2.4 Evaluación de la calidad de los alimentos

Para estudiar las características de un alimento existen diferentes análisis a evaluar, entre los cuales se encuentran los análisis fisicoquímicos, que evalúan los parámetros del producto final como; el pH, sólidos totales, acidez titulable total, color y el contenido de vitamina C. Mientras que el análisis microbiológico se realiza para tener una mayor seguridad de que los alimentos son libres de contaminación microbiológica.

2.4.1 Pruebas fisicoquímicas

Los parámetros fisicoquímicos que suelen estudiarse en los alimentos líquidos son: el pH, sólidos totales, acidez titulable total, color, fuera de estos también se determina vitamina C.

El pH de los frutos y jugos se encuentra entre un intervalo de 2.0-4.7, y estos valores varían con el grado de madurez de la fruta. Esta acidez en los frutos es debido a la presencia de ácidos orgánicos. El pH de un alimento puede variar de acuerdo al tipo de procesamiento al que debe de ser sometido para asegurar la estabilidad microbiológica, la inocuidad, vida de anaquel y condiciones de almacenamiento. Las variaciones del pH pueden ocasionar la formación de precipitados, cambios de color o potenciar la actividad enzimática, generando cambios indeseables en el producto (McCabe, 2003; Roobha *et al.*, 2011).

Los sólidos solubles totales se miden en °Brix, que es una escala de la relación que existe entre la densidad de un jugo y el contenido de azúcar. Se define como el porcentaje masa/masa de sólidos disueltos presentes en una solución acuosa (Shachman, 2004). Usualmente en los jugos de frutas, la totalidad de sólidos solubles habitualmente no solamente suele ser sacarosa, ya que también están presentes ácidos orgánicos disueltos, sales, polialcoholes que pueden alterar el valor de los °Brix (Sibaja, 2015). Los sólidos solubles son un importante indicador de calidad, puesto que de ellos depende

el sabor y la viscosidad del producto. Las condiciones de procesamiento en el jugo podrían alterar la naturaleza de los sólidos solubles, debido a que generan la ruptura de las estructuras y en consecuencia la liberación de sustancias solubles. Además, la disminución de los niveles de °Brix podría atribuirse al inicio de la fermentación debido a un procesamiento ineficiente y/o a temperaturas de almacenamiento inadecuadas de algunos de los jugos (Nonga *et al.*, 2014).

La acidez de una sustancia se puede determinar por métodos volumétricos. Esta medición se realiza mediante titulación, en la cual se utilizan el titulante, el titulado y el colorante. La reacción entre el ácido y la base se observa con un colorante, y el más utilizado es la fenolftaleína, el cual cambia a color rosa cuando se encuentra presente una reacción ácido-base, siendo el agente titulante la base y el agente titulado el ácido (sustancia que contiene el ácido). Durante la conservación de alimentos y en el deterioro de estos, se pueden presentar cambios en la acidez del alimento debido a la acción enzimática y el desarrollo de microorganismos (Abiola *et al.*, 2018).

Por otra parte, el color es el resultado de la interacción de la luz con el objeto, y dependerá de la constitución fisicoquímica del alimento, siendo un parámetro sensorial importante, porque define el atractivo visual hacia los consumidores. Los procesos térmicos pueden ocasionar variaciones en el color debido a la acción enzimática y la degradación de pigmentos (Tiwari *et al.*, 2010).

El ácido ascórbico ($C_6H_8O_6$) o vitamina C, pertenece a la familia de los monosacáridos. En la Figura 2.4 se observa la estructura química del ácido ascórbico, conformado por una cetolactona soluble en agua con dos grupos hidroxilos enólicos ionizables, por lo que tiene características reductoras; es termolábil y se oxida fácilmente en presencia de luz y el oxígeno del aire. Sus dos formas moleculares principales se encuentran en equilibrio y ambas presentan actividad biológica. En la industria alimentaria, se ha aprovechado por su capacidad antioxidante y estabilizadora. La palabra ascórbico, deriva del latín *a* (que significa *no*) + *scorbutus* y se refiere al escorbuto, la enfermedad causada por la deficiencia de vitamina C. Este problema se debe a la incapacidad para sintetizar el compuesto orgánico debido a la falta de la enzima L-gulonolactona oxidasa, responsable de la última fase metabólica necesaria para la transformación de la glucosa en vitamina C. Por ello, se recomienda el consumo de ácido ascórbico con alimentos ricos en este elemento, como frutas y verduras (Loewus, 1999; Bineesh *et al.*, 2005; Varvara *et al.*, 2016).

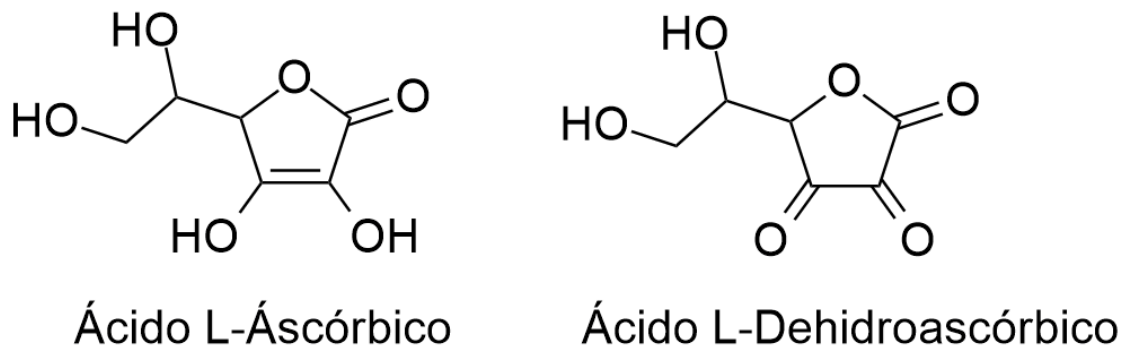


Figura 2.4 Formas moleculares en equilibrio del ácido ascórbico (Bineesh *et al.*, 2005).

Sin embargo, las frutas y verduras pasan por varios pasos de manipulación, almacenamiento y procesamiento antes de consumirse. El procesamiento térmico aporta seguridad microbiana, textura y sabor, pero la aplicación de calor provoca la pérdida de vitaminas y minerales. Por ello, el ácido ascórbico soluble en agua se destruye fácilmente durante el proceso de limpieza y cocción. En el procesamiento de alimentos puede haber diferentes factores que pueden influir en la naturaleza del mecanismo de degradación, incluyendo: la temperatura, la concentración de sal y azúcar, el pH, el oxígeno, las enzimas y el catalizador metálico (Bineesh *et al.*, 2005). El ácido ascórbico (AA) es una vitamina esencial en la dieta humana, y su determinación es posible por técnicas sensibles y rápidas. Este compuesto se puede determinar mediante el método de AOAC 967.21 (método de titulación con indofenol) (AOAC; 2006).

2.4.2 Pruebas microbiológicas

Los jugos de frutos contienen diferentes nutrientes, estos se convierten en un medio apropiado para el crecimiento de microorganismos que conducen al deterioro de la bebida. Si un jugo no es tratado adecuadamente, durante su almacenamiento suelen desarrollarse bacterias, hongos y levaduras, los cuales generan el deterioro del producto, alterando el color, sabor y generando fermentaciones (Vasavada, 2003). Para tener una mayor seguridad de que los alimentos son libres de contaminación microbiológica, se han establecido distintas normas nacionales e internacionales con criterios estipulados para definir la calidad e inocuidad de estos productos. Entre las normas que se encuentran en México, se pueden citar:

- NOM-109-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Procedimiento para la toma, manejo y transporte de las muestras de alimentos para su análisis microbiológico.
- NOM-110-SSA1-1994, Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.

- NOM-092-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.
- NOM-111-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.

En el presente trabajo de investigación se seguirán los protocolos correspondientes para determinar el contenido de mohos y levaduras, y bacterias aerobias (conteo estándar); que podrían indicar una visión general del efecto del ultrasonido sobre la carga microbiana del jugo de piña.

2.5 Encapsulación de compuestos bioactivos mediante gelificación iónica

En el presente trabajo de investigación se decidió enriquecer el jugo tratado por ultrasonido con un compuesto bioactivo, para satisfacer la demanda de alimentos funcionales que en los últimos años ha ido en aumento, que se disparó incluso durante la pandemia por COVID-19. La adición de nutrientes y compuestos bioactivos de forma directa para el enriquecimiento en alimentos es limitado, debido a diferentes factores (incompatibilidad entre el ingrediente activo y la matriz del alimento o al ser digeridos, pH, temperatura, luz, humedad, oxígeno, tiempo de almacenamiento) que degradan a los compuestos activos (Tripathy *et al.*, 2021). Debido a esta situación, se ha propuesto la encapsulación como estrategia para la protección de compuestos bioactivos, aportando una mejor estabilidad fisicoquímica al compuesto bioactivo, teniendo una menor degradación del compuesto y control de su liberación (Ortiz-Romero *et al.*, 2021). El método de encapsulación envuelve a través de una matriz al compuesto activo. Esta matriz puede estar compuesta por algún polímero u otro tipo de compuesto o mezclas de estos (Parra, 2010; Cáceres *et al.*, 2020; Niño *et al.*, 2022).

Existen diferentes métodos de encapsulación, los cuales pueden ser clasificados en dos grupos: los métodos fisicoquímicos y físicos, los cuales cuentan con diferentes técnicas de encapsulación, como se aprecia en la Figura 2.5. Las diferentes técnicas de encapsulación se pueden elegir de acuerdo con las características de la partícula requerida (morfología), material de pared, escala (laboratorio, piloto o industrial) y la aplicación en alimentos, farmacéutica, cosmética o textil (Aldana *et al.*, 2004; Ortiz *et al.*, 2021; Niño *et al.*, 2022; Díaz *et al.*, 2023). En la Tabla 2.6 se presentan las ventajas y desventajas de las principales técnicas de encapsulación, que muchas veces sirven como criterio de decisión en la selección de técnicas de encapsulación.

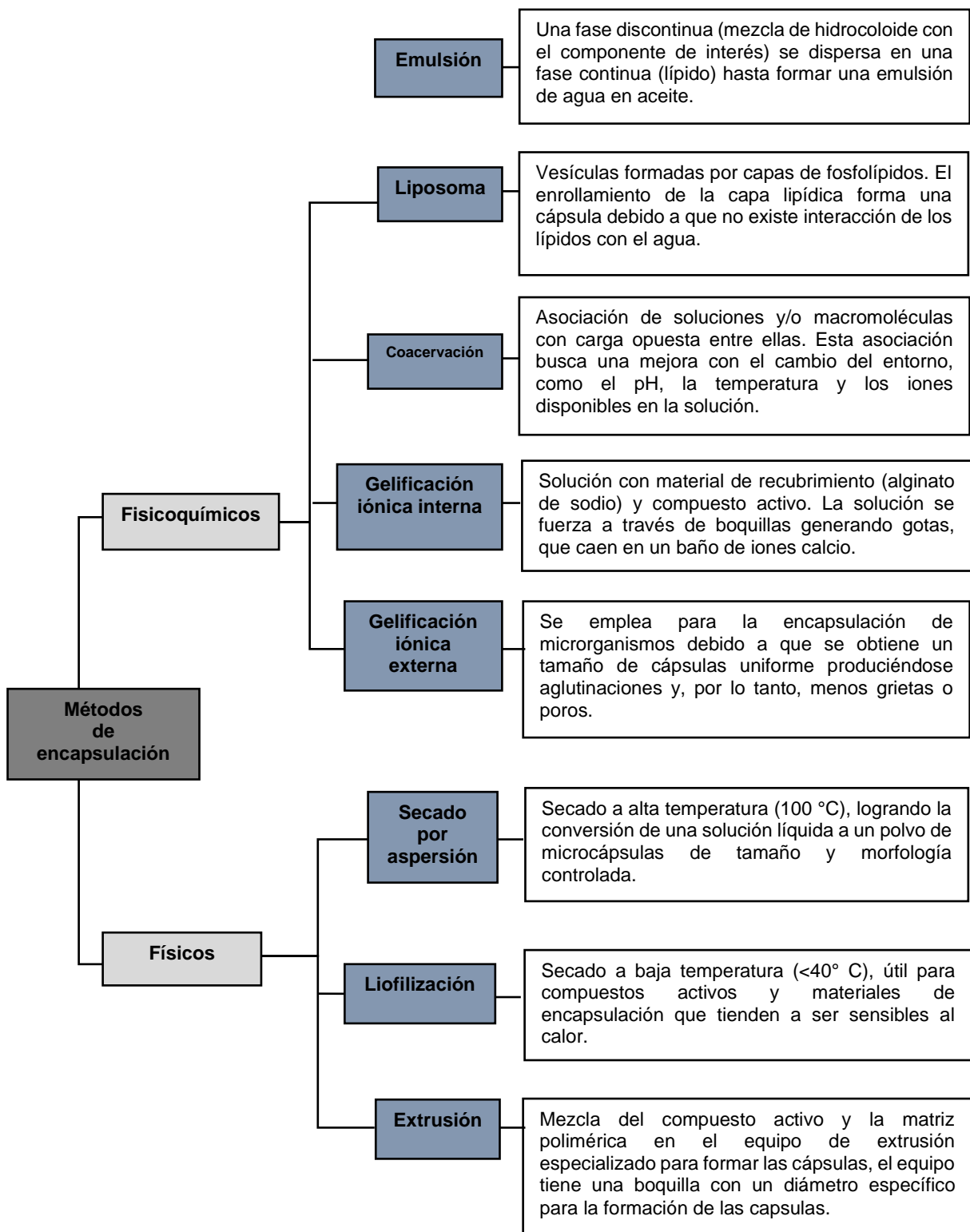


Figura 2.5 Clasificación de los métodos de encapsulación de compuestos bioactivos (Aldana *et al.*, 2004; Ortiz *et al.*, 2021; Niño *et al.*, 2022; Díaz *et al.*, 2023).

Tabla 2.6 Ventajas y desventajas de los principales métodos de encapsulación.

Métodos	Técnicas	Ventajas	Desventajas
Fisicoquímicos	Liposomas	<ul style="list-style-type: none"> Permeabilidad Estabilidad 	<ul style="list-style-type: none"> Evitar la exposición al oxígeno Limitar las temperaturas excesivas. Adición de antioxidante
	Emulsión	<ul style="list-style-type: none"> Técnica simple Estabilidad de compuestos 	<ul style="list-style-type: none"> No presenta control en la morfología, tamaño y rugosidad de las cápsulas
	Coacervación	<ul style="list-style-type: none"> Rápida y alta escalabilidad industrial 	<ul style="list-style-type: none"> Incompatibilidad entre los materiales de encapsulación
	Gelación iónica interna	<ul style="list-style-type: none"> Cápsulas uniformes 	<ul style="list-style-type: none"> Solo para encapsular microorganismos
	Gelación iónica externa	<ul style="list-style-type: none"> Común y fácil para compuestos solubles e insolubles. No emplea altas temperaturas No emplea disolventes orgánicos Cápsulas (>2000 µm) Eficiencia Proceso escalable 	<ul style="list-style-type: none"> Rápida liberación del compuesto a través del gel, por lo que es necesario el uso de una emulsión
	Secado por aspersión		<ul style="list-style-type: none"> Las altas temperaturas en la cámara de secado pueden dañar el compuesto activo y los materiales de encapsulación
	Extrusión	<ul style="list-style-type: none"> Proceso rápido (100 a 300 microcápsulas por segundo) 	<ul style="list-style-type: none"> Las cápsulas tienen altos niveles de humedad alterando su estabilidad por lo que requiere de un equipo de secado
Físicos			<ul style="list-style-type: none"> Susceptibilidad a contaminación microbiana Vida útil más corta (30 días)
	Liofilización	<ul style="list-style-type: none"> Temperaturas y presiones bajas El daño al compuesto activo y al material de encapsulación es mínimo 	<ul style="list-style-type: none"> El tiempo del proceso, es lento (deshidratación). Las cápsulas presentan una estructura porosa

Fuente: (Aldana *et al.*, 2004; Ortiz *et al.*, 2021; Niño *et al.*, 2022; Díaz *et al.*, 2023).

2.5.1 Gelificación iónica externa (GIE)

Entre las técnicas de encapsulación se encuentra la gelificación iónica externa que consiste en producir pequeñas gotas de solución a partir de la mezcla del material de recubrimiento y el compuesto que se desea encapsular. El material de recubrimiento comúnmente usado es el alginato de sodio, debido a que es un polímero de fácil acceso, baja viscosidad y alta reactividad con los iones calcio. Esta solución se fuerza a través de boquillas generando gotas, y estas caen en un baño de iones calcio, formando así una cápsula de gel. Este mecanismo se denomina de gelificación iónica externa y es el más común y fácil para ambos tipos de compuestos, solubles e insolubles. La GIE brinda tamaños de cápsulas más grandes (>2 mm) y una mejor eficiencia de encapsulación, por ello se utiliza para la encapsulación de aceites esenciales, compuestos bioactivos y extractos (Ortiz *et al.*, 2021). Los alginatos son polímeros de carbohidratos derivados de algas pardas de la Clase *Feofíceas*. Los alginatos se componen de dos azúcares uronato y las sales de ácido manurónico y gulurónico derivadas del ácido algínico. Durante la obtención de alginatos de algas recolectadas, los ácidos urónicos se convierten en las formas salinas manuronato (M) y guluronato (G) mediante un paso de neutralización. El alginato es un copolímero compuesto de largas cadenas de bloques M o G. Estos bloques pueden ser homogéneos (GG, MM) o

heterogéneos (MG, GM). La Figura 2.6 muestra la estructura química del alginato y los bloques G y M. La proporción, distribución y longitud de los tipos de bloques determinan las propiedades químicas y físicas del alginato, como la rigidez o flexibilidad relativa de los geles formados en presencia de iones metálicos (Łętocha *et al.*, 2022).

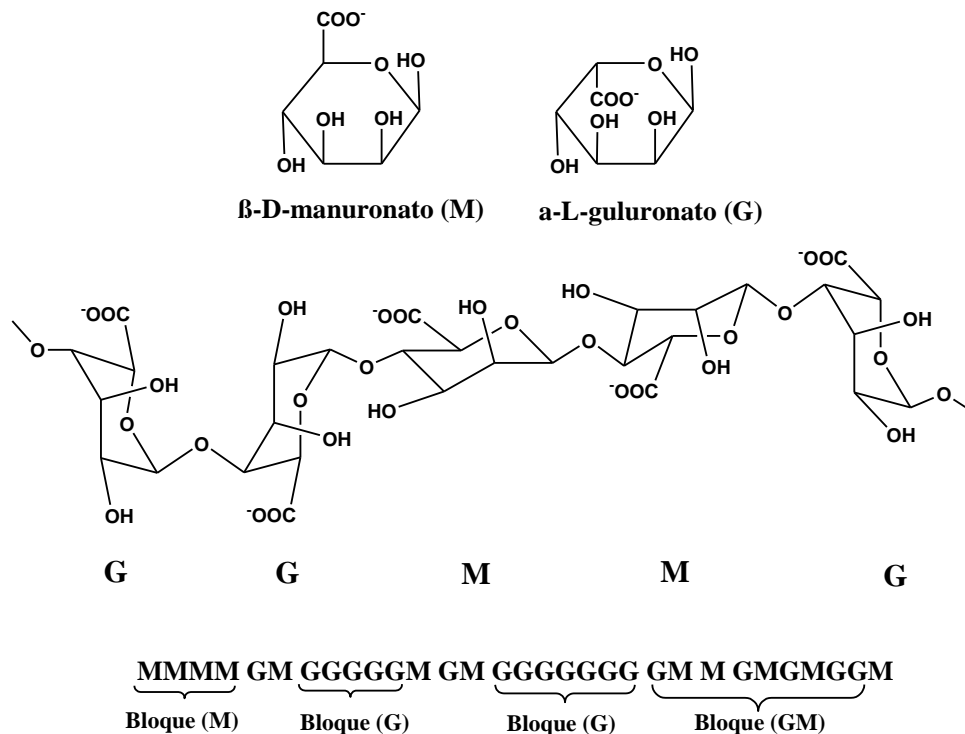


Figura 2.6 Estructura química del alginato y los bloques G y M (Helgerud *et al.*, 2009).

En presencia de cationes monovalentes, como lo es el sodio, los alginatos no forman geles y pueden usarse como agentes espesantes en los alimentos. En presencia de cationes divalentes, los alginatos forman geles. El calcio es el catión más comúnmente utilizado para inducir la formación de gel. Debido a que el catión actúa como reticulante o puente entre los grupos funcionales de las cadenas de alginato. Los grupos funcionales del alginato tienen una gran afinidad por el calcio generando una transformación conformacional de las cadenas de poliuronido en forma de caja de huevo, en las que los cationes están fuertemente quelados (Acartürk, F., y Takka, S., 1999). La agregación de cadenas de alginato conduce a la formación de geles, ya que se forman enlaces de hidrógeno entre los átomos de oxígeno (O) y el ion metálico divalente, y se forman enlaces iónicos entre los grupos carboxilo y el mismo ion metálico, como se aprecia en la Figura 2.7.

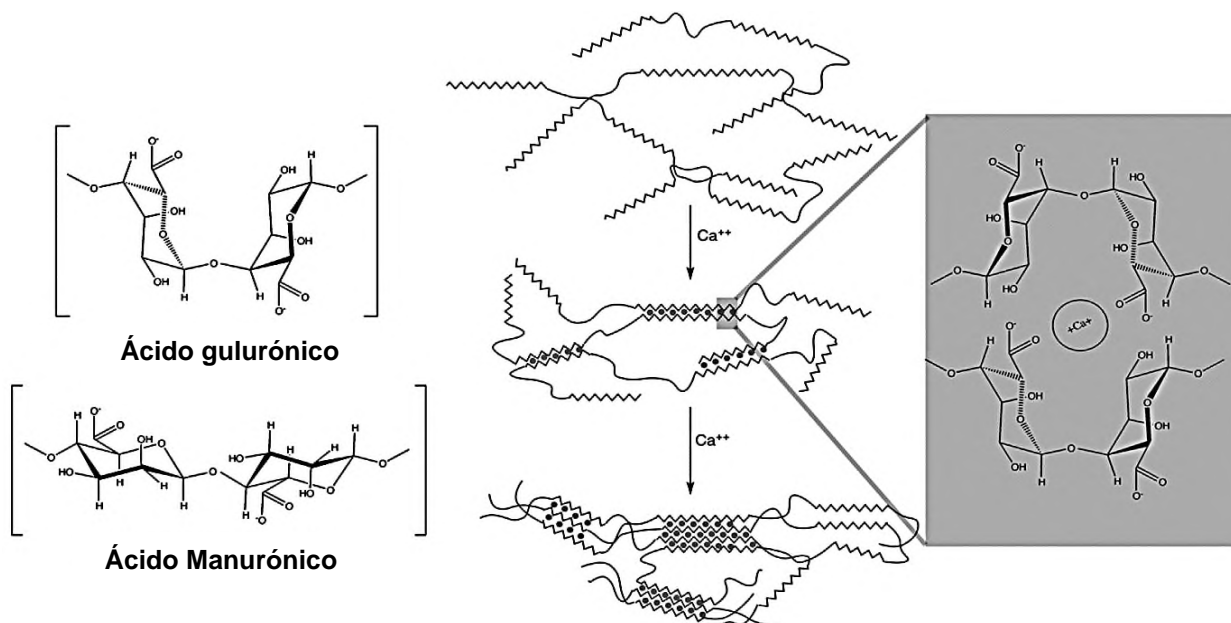


Figura 2.7 Representación del modelo "caja de huevos" de gelificación del alginato (Helgerud *et al.*, 2009).

2.5.2 Encapsulación de compuestos bioactivos por GIE

La GIE es una alternativa que ofrece la protección de las condiciones externas de los compuestos bioactivos. Calvo *et al.* (2018) reportan la retención de un 15 % a un 60 % de betacianinas y polifenoles extraídos de residuos de betabel en cápsulas de Ca (II)-alginato. Castañón *et al.*, (2020) realizaron una evaluación de la estabilidad de jugo de naranja encapsulado mediante gelación iónica. Utilizaron alginato de sodio y pectina de alto metoxilo. Demostraron que las cápsulas almacenadas a 4 °C obtuvieron parámetros de calidad aceptables comparados con las almacenadas a temperatura ambiente. La GIE de compuestos bioactivos han tomado gran auge debido al impacto positivo que representan en la salud humana. La técnica de GIE presenta un gran potencial como una alternativa de conservación para este tipo de compuestos. Es importante mencionar que también existe un amplio estudio sobre la GIE con compuestos activos liposolubles como los aceites esenciales obtenidos de diversas plantas, como se aprecia en la Tabla 2.7.

Tabla 2.7 Estudios de encapsulación por gelificación iónica externa.

Autor y año	Compuesto activo y matriz polimérica	Factores evaluados	Resultados
Benavides et al. (2016)	Aceite de tomillo Alginato de sodio	<ul style="list-style-type: none"> • Velocidades de agitación (6000, 8000, 10,000, 12,000, 14,000, 16,000, 18,000 rpm). • Tiempos de agitación (1, 3 y 5 min). • Concentración del compuesto activo 1%, 2% y 3% (v/v). 	Velocidad de 18,000 rpm durante 5 min, con una concentración de aceite de tomillo de 2% v/v, obteniendo un %E de 85% y % LC 50%.
Cáceres et al. (2020)	Aceite de toronja Alginato de sodio	<ul style="list-style-type: none"> • Soluciones de CaCl₂ 2%, 5% y 10% (p/v). • Tiempos de entrecruzamiento (30, 45 y 60 min). 	Cloruro de calcio de 7.4% p/v y un tiempo de entrecruzamiento de 58 min obteniendo un rendimiento del 62%, %E de 100% con un %LC 10% p/p.
Velázquez et al., (2020)	Aceite de sésamo (SO). Alginato de sodio y mucilago de nopal (SA-NM)	<ul style="list-style-type: none"> • SA-NM: 2% • CaCl₂: 2.5 % • Tiempo de reticulación: 60 min • Compuesto bioactivo: 10 g de aceite de sésamo • Velocidad de agitación: 6400 rpm • Tiempo de velocidad: 10 min 	Las cápsulas SA-NM T dieron una forma semiesférica irregular %E > 75.44 %
Wissam y Samer, (2019)	Aceite de linaza Alginato de sodio	<ul style="list-style-type: none"> • Alginato de sodio: 1, 2, 3 % • CaCl₂: 0.2, 0.3, 0.4 M • Tiempo de reticulación: 30 min • velocidad de agitación: 300 rpm • tiempo de agitación: 45 min 	2% de alginato de sodio con solución gelificante de CaCl ₂ 0,3 M, obtuvieron un %E 93,46 ± 0,064
Silva et al., (2019)	Aceite de sachá inchi	<ul style="list-style-type: none"> • Alginato de sodio: 2 % • CaCl₂: 2 % p/v • Tween 20 y 80: 0.5 y 1% • Tiempo de reticulación: 30 min • Compuesto activo: 45%, 60% y 75% 	El sistema con Tween 20 al 1% exhibió el comportamiento más apropiado para la formación de partículas debido a la baja presencia de aglomerados de gotas, con una eficiencia de encapsulación >99%.
Castañón et al., 2020	Jugo de naranja	<ul style="list-style-type: none"> • Alginato de sodio: 0.5 % • Lactato de calcio: 3 % p/v • Pectina: 1.5, 2 y 2.5 % • Tiempo de reticulación: 30 min • Compuesto activo: 45%, 60% y 75% 	Los encapsulados de jugo de naranja fueron eficaces a 5 ° Brix, alginato de sodio 0.5 % (p/v) y pectina 2 % (p/v) como agentes encapsulantes, pH 2.5 y almacenados a 4 ° C.

En los diferentes antecedentes mencionados en la Tabla 2.7, se observan las diferentes condiciones que han evaluado, utilizándose diferentes concentraciones de alginato de sodio como matriz protectora, o también se han aplicado mezclas de otros componentes. Se han evaluado diferentes concentraciones de CaCl₂ como gelificante y se han reportado la aplicación de diferentes concentraciones del compuesto bioactivo. Silva *et al.* (2019), ha reportado la aplicación de concentraciones elevadas (45-75%) de aceite de *Plukenetia volubilis* L., logrando una eficiencia de encapsulación superior al 90%; sin embargo, no reportan rendimiento del proceso. También otros autores han reportado que la adición de un surfactante favorece la encapsulación del aceite en la estructura de hidrogel de alginato, pues se favorece la formación de emulsiones aceite en agua (Silva *et al.*, 2019). En este proyecto de investigación se siguió el protocolo de formación de cápsulas por GIE propuesto por Benavides *et al.*, (2016), donde implemento

la adición de 1% de alginato de sodio y Silva *et al.*, (2019) utilizó una concentración de alginato al 2% y elevadas concentraciones de aceite para encapsular, además de implementar la aplicación del surfactante Tween 20 al 1% para reducir el tamaño de gota de aceite y tener una mayor eficiencia de encapsulación. Debido a ello, en este proyecto se realizaron soluciones de alginato de sodio al 1 y 2% de concentración con tres diferentes solventes: Jugo de piña, mezcla de jugo-agua destilada y agua destilada. Las soluciones se dejaron en agitación con una ligera modificación en el tiempo de agitación de 30 min. Adicionando aceite de hígado de bacalao (AHB) al 30 % (v/v) y Tween 20 al 1% y utilizando CaCl_2 al 2%. Nuestro compuesto a proteger es el aceite de hígado de bacalao (AHB), debido a todos los beneficios saludables que se mencionan en la siguiente sección del escrito.

2.6 Aceite de hígado de bacalao

El aceite de hígado de bacalao (AHB) es uno de los aceites que, además de proporcionar una fuente de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 (ω 3-PUFA), también brinda una fuente de vitamina A y D (Dyck *et al.*, 2011). Los ácidos grasos omega-3 que forman parte del AHB son: el ácido α -linolénico, el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA). Estos son ácidos grasos esenciales, es decir, se requieren ingerir por la dieta, ya que el organismo no los sintetiza. Por esta composición, el AHB presenta varios efectos fisiológicos positivos al ser consumido, por ejemplo, la reducción de la glucosa en sangre, la regulación de la presión arterial y el colesterol, la prevención de la arteriosclerosis, la reducción de la trombosis y la prevención de enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares, protección de retina y mejoramiento de la visión, promueve el desarrollo intelectual de los bebés y mejora la memoria. Estas funciones son generadas por los diferentes mecanismos que tiene el omega-3 al incorporarse en los fosfolípidos de las membranas celulares. Estos mecanismos actúan en el aumento de señalización de proteínas, aumentan la síntesis de protectinas y resolvinas, que tienen un efecto antiinflamatorio y regulan diversos genes que participan en la activación de vías metabólicas. La ingesta media recomendada de ambos ácidos grasos es de 80 a 100 mg/100 g por día (Yang *et al.*, 2019).

La industria alimentaria ha generado un interés sobre la aplicación del AHB como aditivo nutricional o suplemento alimentario, implementándose estrategias viables para el aumento de la ingesta de ácidos grasos omega-3 en lugares donde el consumo de pescado es bajo. Presentándose mediante la adición de AHB en un alimento saludable para los consumidores. Sin embargo, el AHB puede verse afectado por factores como la temperatura, irradiaciones, metales o agentes oxidantes orgánicos (enzimas). Además, se ha reportado que los radicales libres formados en los grupos metilénicos de la cadena hidrocarbonada de los ácidos grasos inician la rancidez oxidativa (Valenzuela *et al.*, 2002). Debido a la sensibilidad de estos compuestos a la oxidación, se forman componentes de mal sabor o poco atractivos y le da al aceite una fragancia distintiva, lo que dificulta su uso. Por lo tanto, una estrategia para evitar

estos problemas es mediante la encapsulación. Se han realizado estudios sobre la encapsulación del AHB, por ejemplo, Elsebaie *et al.*, (2022), realizaron una investigación utilizando proteína de alginato como material de pared para la encapsulación de AHB mediante la técnica GIE. En este estudio, evaluaron la estabilidad oxidativa, los parámetros de calidad y los atributos sensoriales de albóndigas enriquecidas con AHB libres y AHB encapsulados durante el almacenamiento a 4 ± 1 °C durante 16 días. Las cápsulas de AHB tenían una forma redonda homogénea, un diámetro de 0.82 ± 0.06 mm, un factor de esfericidad de 0.092 ± 0.01 , alcanzando una eficiencia de encapsulación de $95.62\% \pm 1.13\%$. Los autores reportaron que el aceite encapsulado era más estable que los libres a los tratamientos térmicos (70–100 °C, 24 h). Por lo tanto, la GIE es una excelente estrategia para conservar las propiedades del AHB.

3 JUSTIFICACIÓN

En la Cuenca del Papaloapan se cuenta con una amplia variedad de frutos que pueden utilizarse para el desarrollo de productos alimenticios, incluidos jugos. La región es considerada por la Sedapa como una de las zonas de mayor producción de piña. De hecho, la región se caracteriza por la producción local de jugos de piña, siendo un producto comercial importante. Sin embargo, es un producto que no cuenta con un proceso de conservación que garantice su vida útil prolongada, de tal manera que sufre cambios en su percepción sensorial por acción de microorganismos y levaduras, limitando su comercialización a las inmediaciones de la región productora, y en consecuencia su potencial comercial es reducido. Por ello, se requieren proponer estrategias que permitan dar valor agregado a este recurso de relevancia económica y cultural de la Cuenca del Papaloapan, y que al mismo tiempo se garantice su calidad e inocuidad.

Como se ha discutido en la sección de Antecedentes, el ultrasonido es una tecnología prometedora para propósitos de inactivación microbiana, debido a su capacidad para destruir paredes y membranas biológicas (Ulloa *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2017). Además de que se lleva a cabo a temperaturas de procesamiento inferiores a las utilizadas en los procesos térmicos, favoreciendo la alta retención de las propiedades nutricionales, fisicoquímicas y sensoriales en los alimentos, aportando una vida de anaquel favorable (Aneja *et al.*, 2014; Ortiz *et al.*, 2021). El jugo de piña es un producto al que se le puede aplicar el ultrasonido para garantizar su inocuidad, sin afectar sus propiedades sensoriales, de tal manera que se puede abrir su comercialización fuera de la región productora de piña.

El jugo de piña, además de presentar su valor nutricional, puede ser enriquecido mediante la adición de aceite de hígado de bacalao debido a su alto contenido nutricional y los efectos fisiológicos que presenta, los cuales generan una serie de beneficios para la salud; sin embargo, debido a diversos factores, los compuestos presentes en AHB pueden degradarse. Estos compuestos pueden ser protegidos mediante la tecnología de encapsulación por gelificación iónica externa, además de enmascarar su sabor (Ortiz *et al.*, 2021).

Por lo informado anteriormente, se busca estudiar el efecto que presentará el ultrasonido sobre las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas del jugo de piña. Además de adicionar el AHB encapsulado en alginato en el jugo tratado y ver cómo afecta la eficiencia de encapsulación su almacenamiento.

4 HIPÓTESIS

El procesamiento por ultrasonido permitirá la reducción de la carga microbiana del jugo de piña, sin que el tratamiento logre afectar las características fisicoquímicas del jugo, además de no generar efectos en la eficiencia de encapsulación y morfología de las cápsulas de alginato con aceite de hígado de bacalao adicionadas al jugo.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto del ultrasonido sobre las características fisicoquímicas y microbiológicas del jugo de piña, enriquecido con aceite de hígado de bacalao encapsulado en alginato.

5.2 Objetivos específicos

- Evaluar el perfil de ácidos grasos del aceite de hígado de bacalao (AHB).
- Estudiar la morfología y la eficiencia de encapsulación de aceite de hígado de bacalao encapsulado en alginato mediante gelificación iónica externa.
- Evaluar el efecto de las condiciones de ultrasonido (amplitud, tiempo) sobre la carga microbiana (cuenta de bacterias aerobias, hongos y levaduras) y las propiedades fisicoquímicas (pH, sólidos solubles, acidez titulable, color, contenido de vitamina C) del jugo de piña.
- Estudiar la morfología y la tasa de encapsulación de las cápsulas de alginato cargadas con aceite de hígado de bacalao contenidas en un jugo de piña tratado previamente por ultrasonido y almacenado a diferentes temperaturas (4 y 25 °C).

6 MATERIALES Y MÉTODOS

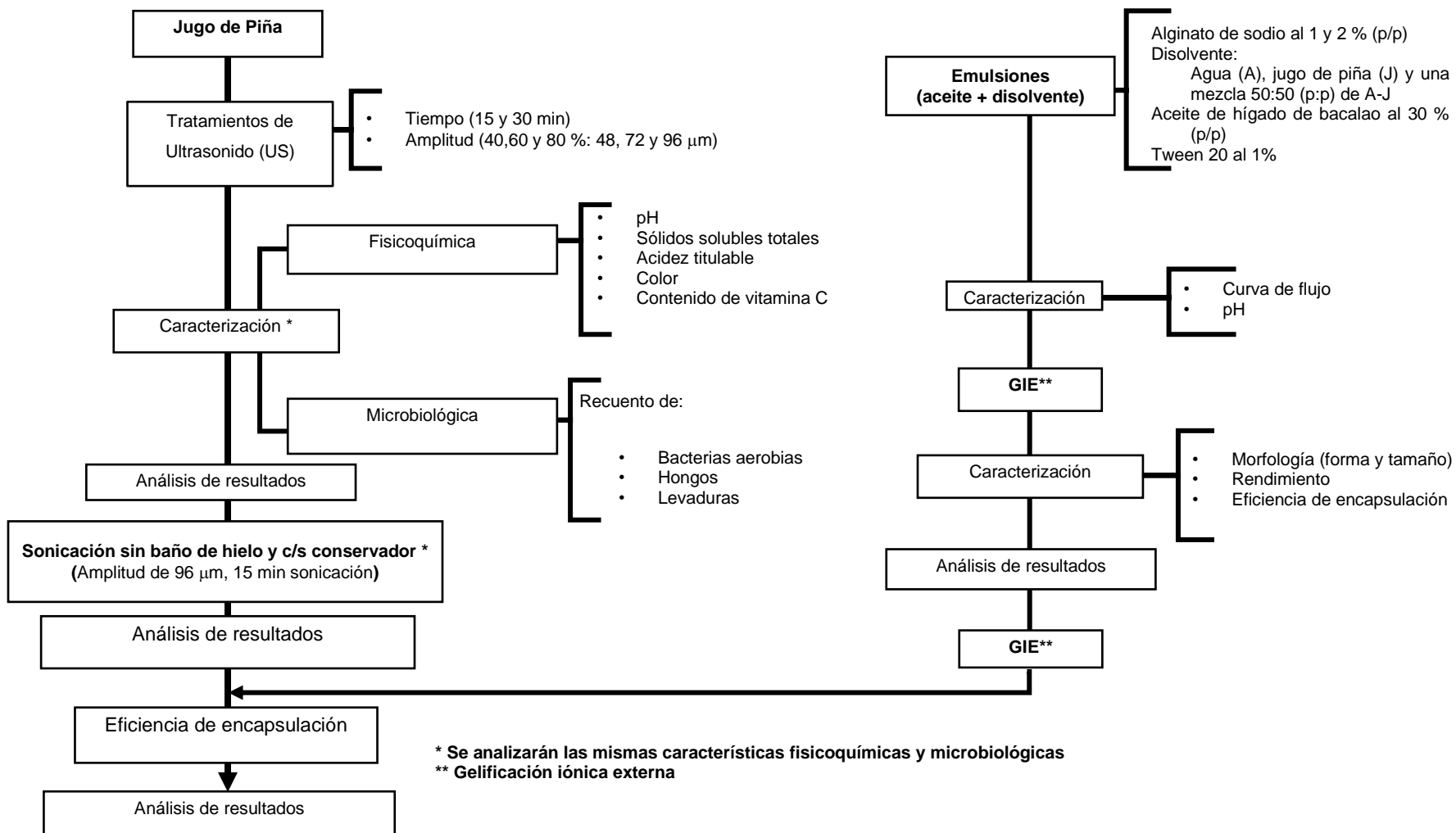


Figura 6.1 Diagrama general de la metodología de investigación.

El diagrama general de la metodología seguida en el presente proyecto de investigación se describe en la Figura 6.1.

6.1 Encapsulación del ingrediente activo por gelificación iónica externa

6.1.1 Grasa total a partir de la composición de ácidos grasos (GC-FID) – método AOAC 996.06 modificado

La cuantificación de grasa total, monoinsaturada, poliinsaturada y saturada fue obtenida a partir de la identificación y composición de ácidos grasos determinados mediante el método AOAC 996.06 con ligeras modificaciones. Se colocaron 0.5 g de muestra en un matraz Mojonnier, posteriormente, se agregaron 100 mg de ácido pirogálico, 2 mL de solución de estándar interno de Triundecanoato de glicerilo (5 mg/mL en cloroformo, C11:0), 2 mL de etanol al 95% y 10 mL de HCl 8.3 M. El matraz fue colocado en un baño de agua a 70-80 °C con agitación moderada por 40 min. Posteriormente, la muestra fue enfriada a temperatura ambiente (≈ 25 °C), se adicionaron 25 mL de éter dietílico y seguido de 25 mL de éter de petróleo. El matraz fue agitado cuidadosamente por 1 min y la muestra se dejó reposar por 60 min hasta una separación de capas. La capa superior (éter-aceite) fue separada, decantada en tubo de ensayo, y la evaporación de los solventes. El residuo contenido en el tubo se reconstituyó con 2 mL de cloroformo y 2 mL de éter dietílico, fue transvasado a un vial ámbar de 20 mL. Después, la mezcla se evaporó hasta sequedad en un baño de agua a 40 °C. Una vez evaporados los solventes, se agregaron 2 mL de BF_3 al 7% en metanol y 1 mL de tolueno. El vial fue cerrado con un tapón de rosca con septa de silicona/PTFE y se calentó en una estufa a 100 °C durante 50 min, agitando en periodos de 10 minutos. Luego, el vial se dejó enfriar a temperatura ambiente (≈ 25 °C), se abrió y agregaron 5 mL de agua destilada, 1 mL de hexano y 1 g de Na_2SO_4 . El vial se volvió a tapar, se agitó por 1 min y se dejó reposar hasta la separación de capas. Finalmente, la capa superior que contenía los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES) fue transferida cuidadosamente a un vial de muestreo con 1 g de Na_2SO_4 para su análisis por CG.

6.1.2 Análisis de ácidos grasos metilados por CG-FID

Por triplicado, se inyectó 1 μL de la muestra de FAMES en un cromatógrafo de gases con detector de llama ionizada (CG-FID) Perkin Elmer Clarus 500 y una columna capilar (100 m x 0.25 mm diámetro interno; 0.2 μm espesor de película). El nitrógeno fue el gas portador, con una velocidad de flujo de 0.75 mL y un split ratio 100:1. La temperatura del inyector y del detector fueron 225 y 285 °C, respectivamente. Los flujos de hidrógeno y aire se establecieron en 45 y 450 mL/min, respectivamente. La temperatura inicial del horno fue de 100 °C, se mantuvo estable durante 4 min, y luego incrementó a una velocidad de 3 °C/min hasta 240 °C y a esta condición se mantuvo durante 15 min. Se utilizó una

mezcla de FAMES de 37 componentes (RESTEK) para identificar y cuantificar ácidos grasos individuales. Cada ácido graso fue convertido y expresado en su equivalente de triglicérido. La grasa total fue estimada mediante la suma de cada uno de ellos. Las grasas saturadas, poliinsaturadas, monoinsaturadas y trans se calcularon como la suma de los respectivos ácidos grasos.

6.1.3 Preparación de la emulsión

Antes del proceso de encapsulación por gelificación iónica externa (GIE) es necesario obtener una emulsión del aceite en agua. Para esta parte, se decidió evaluar tres disolventes: agua destilada, jugo de piña (13° Brix, pH 3.9), y una mezcla 50:50 (p:p) de agua: jugo de piña. Así también se evaluaron diferentes concentraciones de alginato de sodio (1 y 2% p/p) en los distintos disolventes. Primeramente, las soluciones de alginato se dejaron en agitación magnética (200 rpm) (Heathrow Scientific, Mini Stirrer 1L; China) durante la noche (14 h aproximadamente). Posteriormente, a las diluciones acuosas de alginato se le adicionaron alícuotas de Tween 20 en una proporción de 1% (v/p) con respecto al peso total de la dilución. Después de 2 min de agitación magnética, se adicionó la cantidad de aceite de hígado de bacalao suficiente para formar una mezcla, aceite: agua de 30:70 (p:p). Esta mezcla se dejó en agitación magnética por aproximadamente 30 min, tiempo que fue suficiente para formar la emulsión (Benavides *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2019). Antes del proceso de encapsulación, las emulsiones fueron caracterizadas en términos de pH y comportamiento reológico, lo primero de acuerdo con la sección 6.1.1, y el segundo se describe a continuación.

6.1.4 Caracterización reológica de las emulsiones

Las emulsiones preparadas fueron utilizadas directamente para determinar su viscosidad a diferentes esfuerzos de corte ($0.01 - 100 \text{ s}^{-1}$) en un reómetro (TA Instruments, Discovery HR-2 Hybrid; New Castle, DE, USA) equipado con una geometría de platos paralelos de 0° y 40 mm de diámetro (TA Instruments, Smart Swap™; New Castle, DE, USA). Las mediciones se realizaron con un GAP de 500 μm , y a 25°C . (e Silva *et al.*, 2019). El análisis se hizo en el intervalo de esfuerzos de corte en dos pasos: ascendente-descendente. Con los datos del segundo paso se construyeron las curvas de flujo. El software Trios V.4 (TA Instruments; New Castle, DE, USA) se utilizó para controlar el equipo y recuperar los datos.

6.1.5 Proceso de encapsulación

Las emulsiones de alginato con aceite de hígado de bacalao se hicieron pasar por extrusión a través de una puntilla con un diámetro de 0.1 mm, con ayuda de una bomba peristáltica (INTLLAB, DIY 5~100 mL/min; China), como se aprecia en la Figura 6.2. La emulsión se vertió por goteo en una solución de CaCl_2 al 2% (p/v) para formar cápsulas cargadas con aceite. La altura entre la puntilla de alimentación

y esta solución fue inicialmente de 18 cm. Es evidente que el volumen de la solución se incrementó con el tiempo debido a la alimentación de la emulsión, y en consecuencia esta distancia fue disminuyendo. La solución gelificante se mantuvo en agitación a temperatura ambiente (25 ± 1 °C). Las cápsulas se mantuvieron bajo agitación constante en el baño de gelificación durante 1 h, para favorecer la reticulación de su superficie. Las cápsulas obtenidas se lavaron con agua destilada y se almacenaron en refrigeración (Silva *et al.*, 2019).



Figura 6.0.2 Sistema de encapsulación por gelificación iónica externa.

La caracterización de esta etapa se basó en la evaluación del rendimiento de producción de cápsulas ($Y\%$), la eficiencia de encapsulación ($EE\%$), la morfología de las cápsulas y el flujo de alimentación (Benavides *et al.*, 2016). Para determinar el flujo de alimentación (g emulsión/min), se registró la masa de emulsión alimentada y el tiempo de proceso.

6.1.6 Rendimiento del proceso de encapsulación

El rendimiento del proceso de encapsulación (Y (%)) se estableció como la relación entre la cantidad de cápsulas obtenidas (masa en g, M_{mc}) y la cantidad de emulsión utilizada en el proceso de encapsulación (masa en g, M_{em}), como se muestra en la Ec. (6.1) (Benavides *et al.*, 2016).

$$Y (\%) = \frac{M_{mc}}{M_{em}} \times 100 \quad (6.1)$$

6.1.7 Eficiencia de encapsulación

La eficiencia de encapsulación se determinó de acuerdo con el método descrito por Silva *et al.*, (2019), con modificaciones menores. Para estimar la cantidad de aceite en la superficie de las cápsulas (aceite no encapsulado), se añadieron 10 mL de éter de petróleo a 1 g de cápsulas de alginato de Ca, y se agitaron suavemente durante 1 min a temperatura ambiente. El sobrenadante de éter de petróleo se transfirió a un recipiente previamente llevado a masa constante, y entonces se llevó a sequedad en un horno de convección forzada (SHEL LAB, horno de secado SVAC2, México) a 65 °C. Entonces, la cantidad de aceite no encapsulado (M_{SO}) se determinó gravimétricamente por diferencia de masa, y se expresó como g de aceite superficial/g de cápsulas (M_{SO}).

Para determinar la cantidad total de aceite en las cápsulas de alginato de Ca (M_{TO}), primeramente, estas se llevaron a masa constante a 65 °C, con la finalidad de deformar las cápsulas y facilitar la transferencia del aceite encapsulado. Por diferencia de masa, se estimó la humedad y se expresó como g de agua/g de cápsulas. Con este dato fue posible estimar la masa de sólidos secos, y se expresó como g de cápsulas secas/g de cápsulas. Entonces, 1 g de las cápsulas deformadas y secas se llevaron a extracción Soxhlet, utilizando éter de petróleo como disolvente. El calentamiento se fijó a una potencia suficiente para mantener 5 ciclos/h, así durante 4 h continuas. Posteriormente, el extracto se llevó a un horno a 65 °C hasta lograr masa constante. Entonces, se determinó por diferencia de masa la cantidad de aceite en las cápsulas secas (g de aceite/g de cápsulas secas), y con la información de los g de cápsulas secas/g de cápsulas se convirtió a g de aceite/g de cápsulas (M_{TO}).

Finalmente, el porcentaje de eficiencia de encapsulación (EE (%)) se calculó a partir de la ecuación (6.2). Todas las medidas se realizaron por duplicado.

$$EE (\%) = \frac{M_{TO} - M_{SO}}{M_{TO}} \times 100 \quad (6.2)$$

6.2 Proceso de ultrasonido: diseño de experimentos y análisis estadístico

Para estudiar el efecto de las condiciones del ultrasonido sobre la carga microbiana y las características fisicoquímicas iniciales del jugo de piña, las variables del proceso de ultrasonido que se evaluaron fueron; el tiempo de procesamiento a 2 niveles (15 y 30 min), la amplitud a 3 niveles (40, 60 y 80 %), con una potencia de 130 W, frecuencia de 20 kHz, utilizando una sonda de 120 μ m de amplitud (al 100%), y con ciclos ON/OFF de 40/10 s (Cole-Parmer, Modelo GEX 130; Illinois, EUA). Para descartar el efecto del incremento de temperatura por acción de las ondas de ultrasonido, las muestras se mantuvieron en un baño de hielo con etanol al 70% v/v (temperatura alcanzada: -5 °C). Se midió la temperatura final de la muestra de cada tratamiento, y también se registró la energía total suministrada

por el equipo de ultrasonido. Cada tratamiento se realizó por lotes de 50 mL de jugo a temperatura inicial de 4 ± 1 °C (Starek *et al.*, 2021).

Después del proceso ultrasónico, al jugo se le realizaron los análisis fisicoquímicos y microbiológicos detallados en las secciones 6.2.1 y 6.2.2, respectivamente. Los resultados obtenidos se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA), para definir los parámetros que resultaron significativos sobre las respuestas. Los datos son presentados como las medias y sus errores estándar, y se les aplicó la prueba conclusiva de Tukey ($p < 0.05$) para verificar diferencias significativas entre los tratamientos. Para el análisis estadístico se utilizó el software Minitab® 18.

6.2.1 Caracterización fisicoquímica del jugo de piña

El jugo de piña tratado por ultrasonido se adquirió con un productor local de la Ciudad de San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca. El jugo se almacenó en frascos de cierre hermético y se mantuvo a 4 °C hasta su posterior caracterización fisicoquímica, microbiológica y procesamiento por ultrasonido.

6.2.1.1 Determinación de pH

Para medir el pH se utilizó un potenciómetro digital (HANNA, HI 2211 medidor PH/MV/°C, México), que se calibró con las soluciones buffer correspondientes a pH 4, 7 y 10. Entre cada medición, se enjuagó el electrodo con agua destilada y se secó cuidadosamente. Las lecturas se realizaron directamente sobre las muestras, y por duplicado (Luna, 2015).

6.2.1.2 Determinación de sólidos solubles (°Brix)

La determinación de los °Brix se realizó con ayuda de un refractómetro digital, a 25 °C. El refractómetro fue previamente calibrado con agua destilada y posteriormente se colocó una alícuota de la muestra. El valor de °Brix se determinó por duplicado (Luna, 2015).

6.2.1.3 Determinación de color

Se colocó la muestra directamente en la celda de medición del equipo, y se midió directamente el color con un colorímetro portátil (3nh Global, NR-110/145) en escala LCH, donde L es la luminosidad de la muestra, C es la intensidad o saturación del color y H es el tono de la muestra (Luna, 2015).

6.2.1.4 Determinación de acidez titulable

La acidez titulable se determinó utilizando el método propuesto por Sidhu et al., (2019). 1 mL de jugo fue filtrado en papel Whatman No. 4. Se añadieron 10 mL de alcohol etílico al 90% en un matraz Erlenmeyer y se mezcló mediante agitación. La titulación se llevó a cabo frente a NaOH 0.1 N utilizando cinco gotas de fenolftaleína como indicador hasta que apareció el color rosa. Se corrió un blanco utilizando 10 mL de alcohol etílico al 90%. El porcentaje de acidez se estimó con la siguiente ecuación:

$$\text{Acidez (\%)} = \frac{6.4 (N)(A)}{V} \quad (6.3)$$

Donde N es la normalidad de la solución de NaOH, A el volumen de la solución estándar de NaOH utilizada en la titulación (mL), y V el volumen del extracto analizado (mL).

6.2.1.5 Determinación de vitamina C

El ácido ascórbico (AA) es una vitamina esencial en la dieta humana, y su determinación es por técnicas sensibles y rápidas. Este compuesto se determinó mediante el método de AOAC 967.21 (método de titulación con indofenol), (AOAC; 2006). Para el análisis, se homogeneizaron 300 mg de sólidos secos de cada muestra (se tomaron como base de cálculo los datos de humedad de las muestras) en 10 mL de solución de ácido metafosfórico (15 g de ácido metafosfórico y 40 mL de ácido acético aforados a 500 mL con agua destilada). Las mezclas se llevaron a vórtex por 1 min. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 4000 ×g durante 5 min (LW Scientific, DSC- 1512SD). Se titularon 7 mL de cada sobrenadante con una solución de 2,6-diclorofenol-indofenol en presencia de bicarbonato de sodio (50 mg de 2,6-diclorofenol-indofenol y 42 mg de bicarbonato de sodio aforados a 200 mL con agua destilada) hasta alcanzar un punto final rosa. Los datos se compararon con una solución estándar de ácido ascórbico (1 mg·mL⁻¹) y los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido ascórbico por cada 100 g bs (mg EAA·100 g bs⁻¹).

6.2.2 Caracterización microbiológica del jugo de piña tratado por ultrasonido

Al realizar el análisis microbiológico en los productos alimenticios, se siguen diferentes normas de acuerdo al país donde sea generado el alimento. Por lo que, de acuerdo con las Normas Oficiales Mexicanas y la AOAC (2005), se aplicaron diferentes técnicas, tanto para la preparación de las muestras como para la detección de diferentes microorganismos.

- NOM-109-SSA1-1994, bienes y servicios. Procedimiento para la toma, manejo y transporte de las muestras de alimentos para su análisis microbiológico.

- NOM-111-SSA1-1994, bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.
- Método 966.23 para la cuenta estándar de bacterias aerobias mesófilos, para determinar la calidad microbiológica de la leche y otros alimentos (AOAC, 2005).

A continuación, se detallan dichos procedimientos.

6.2.2.1 Diluciones seriadas de la muestra de jugo para su análisis microbiológico

Las muestras se transportaron en hielera desde el local donde se adquirieron hasta el laboratorio, utilizando refrigerantes (temperatura: 2-8 °C), mientras que la toma de muestra en el laboratorio se realizó de acuerdo con la NOM-109-SSA1-1994, tomando las medidas higiénicas necesarias, evitando tocar el fondo del envase y la contaminación con la tapa.

Se utilizó solución peptonada (preparación en el Anexo 1) para realizar diluciones seriadas en factor 1:10 de la muestra. Con puntas estériles para micropipetas se tomó 1 mL de la muestra de jugo sin tratamiento ultrasónico y de las muestras previamente tratadas por ultrasonido (fila 0) y se transfirieron a la siguiente fila (A), diluyendo y homogeneizando la muestra en 9 mL de solución peptonada contenida en los tubos, resultando en una dilución 1/10. Se cambió la punta de la pipeta y se tomó 1 mL de la dilución 1/10 de la fila A y se transfirió a la fila B volviendo a diluir y homogeneizar la muestra en 9 mL de agua peptonada durante 8 s, resultando una dilución 1/100 en la fila B. Este procedimiento se continuó hasta diluir la muestra a una razón de 1/1000000 en la fila F.

De la misma manera, se prepararon diluciones seriadas de los controles a utilizarse para el análisis microbiológico. Como control positivo se aplicó la pasteurización (65 ± 1 °C, durante 30 min) y esterilización (120 °C, durante 15 min) al jugo de piña. En el caso del control negativo, se tomó la muestra de jugo sin tratamiento (la muestra en tiempo 0 de sonicación).

6.2.2.2 Método estándar para el recuento de aerobios mesófilos estándar en placa

La preparación del medio de cultivo (agar estándar, AE) utilizado para el recuento de microorganismos aerobios mesófilos se encuentra en el Anexo 1, y se basa en el método 966.23 de la AOAC (2005). Primeramente, 1 mL de las diluciones descritas en la sección anterior se colocó directamente en el centro de la caja de Petri previamente rotulada, y se vertieron 10 mL de AE a 45 ± 1 °C. Se homogeneizó la muestra con el agar moviendo en forma circular la caja Petri sobre la superficie de trabajo, evitando que salpicara la tapa de la misma. Después de que solidificara a temperatura ambiente, se vertieron 5-10 mL de AE en una segunda capa, para evitar colonias esparcidas y se dejó solidificar nuevamente a temperatura ambiente. Se incubaron las cajas Petri a 37 °C por 24 h. Finalmente, con ayuda de la

cámara de Quebec se procedió al conteo de las colonias desarrolladas en las cajas Petri, y se seleccionaron aquellas placas que contenían entre 25 y 250 colonias.

6.2.2.3 Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos

Para esta técnica se utilizó el medio de cultivo agar papa–dextrosa (APD) y la solución estéril de ácido tartárico al 10%. Su preparación se encuentra en el Anexo 1. De acuerdo con la NOM-111-SSA1-1994, se colocó por duplicado 1 mL de cada dilución seriada en el centro de las cajas Petri, utilizando una pipeta estéril, y se vertieron de 15 a 20 mL de APD a 45 ± 1 °C, mezclando cuidadosamente el medio con la muestra, realizando movimientos circulares sobre la superficie de trabajo, sin salpicar la tapa de las cajas Petri. Posteriormente, se dejaron solidificar bajo reposo a temperatura ambiente. Las cajas Petri se colocaron en la incubadora a 25 ± 1 °C durante 5 días. Finalmente, con ayuda de la cámara de Quebec se procedió a contar las colonias desarrolladas en las cajas Petri, y se seleccionaron aquellas placas que contenían entre 10 y 150 colonias.

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Determinación de perfil de ácidos grasos en aceite de hígado de bacalao

En nuestra investigación se usó el aceite de hígado de bacalao como componente funcional encapsulado por GIE, para enriquecer el jugo de piña, ya que es una fuente rica de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 (ω 3-PUFA) y también brinda una fuente de vitamina A y D (Dyck *et al.*, 2011). En la Tabla 7.1 se observan los resultados obtenidos en la determinación de ácidos grasos en los lípidos totales presentes del aceite de hígado de bacalao comercial utilizado en el presente proyecto de investigación.

Tabla 7.1 Determinación de ácidos grasos en los lípidos totales presentes del aceite de hígado comercial.

Muestra	Aceite de hígado de bacalao
% de Grasa Saturada	23.30±0.6
% de Grasa Poliinsaturada	35.85±0.6
% de Grasas Monoinsaturada	39.75±0.5
% Grasa Total	98.90±0.5

En la Tabla 7.1 se aprecia que el porcentaje de grasas saturadas es menor, en comparación con las grasas saludables (grasas poliinsaturadas y monoinsaturadas). Estos valores coinciden con lo reportado por Bimbo, AP. (2013), mencionando que el aceite de hígado de bacalao del atlántico contiene 18% de grasa saturada, 43% de grasa insaturada, 24% de EPA (ácido eicosapentaenoico) y DHA (ácido docosahexaenoico), ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga omega-3 y un total de 31% de grasa omega-3.

7.2 Encapsulación por gelificación iónica externa (GIE)

Para la obtención de las cápsulas por GIE se decidió evaluar seis formulaciones de emulsiones de acuerdo a dos concentraciones de alginato de sodio 1 y 2 % (p/p) y a tres disolventes: jugo de piña (J) y una mezcla Agua destilada -Jugo de piña (A-J) y Agua destilada (A), adicionando 30% (p/p) de aceite de hígado de bacalao (AHB) y 1% de Tween 20, la emulsión ya elaborada se añadió a un baño iónico con CaCl_2 al 2% (p/v) a través de un sistema montado por parte del grupo de investigación (Figura 6.2). Ya obtenidas las emulsiones, se evaluaron dos características; curva de flujo y pH. Durante el proceso de obtención de las cápsulas, se evaluó el flujo másico de la alimentación de las emulsiones. Para el estudio de las cápsulas ya obtenidas, se evaluó el rendimiento y eficiencia de encapsulación.

7.2.1 Características reológicas de las emulsiones desarrolladas

En cuanto al comportamiento reológico, todas las formulaciones de emulsiones mostraron curvas de flujo con un comportamiento de adelgazamiento al incrementar la velocidad de cizalla o esfuerzo cortante (Figura 7.1). Este comportamiento se debe a que ocurre una reorganización de los elementos estructurales durante la deformación de las macromoléculas o partículas con alineación en dirección al flujo y al disminuir la velocidad de corte, las partículas se vuelven a enlazar y/o a organizar (Martinez-Padilla, 2022).

Las formulaciones de emulsiones con una concentración del 2% de alginato de sodio a una velocidad de corte de 0.004 s^{-1} presentan viscosidades más elevadas (J: 455.63 Pa s, JA: 1170.21 Pa s, A: 434.62 Pa s), en comparación de las formulaciones de emulsiones con concentración de alginato al 1% (J: 12.89 Pa s, JA: 4.54 Pa s, A: 17.16 Pa s), como se puede apreciar en la Figura 7.1. Silva *et al.*, (2019) reportan que el aumento en la viscosidad de la emulsión está asociado con la concentración de alginato, lo cual concuerda con nuestros resultados. Es importante mencionar que el comportamiento reológico de las emulsiones es muy importante, ya que, con base en los resultados obtenidos de las viscosidades, se pudo determinar el efecto que tiene esta condición en otras características del proceso de encapsulación, como el flujo másico de la alimentación de las emulsiones, el rendimiento de encapsulación y la forma final de las cápsulas.

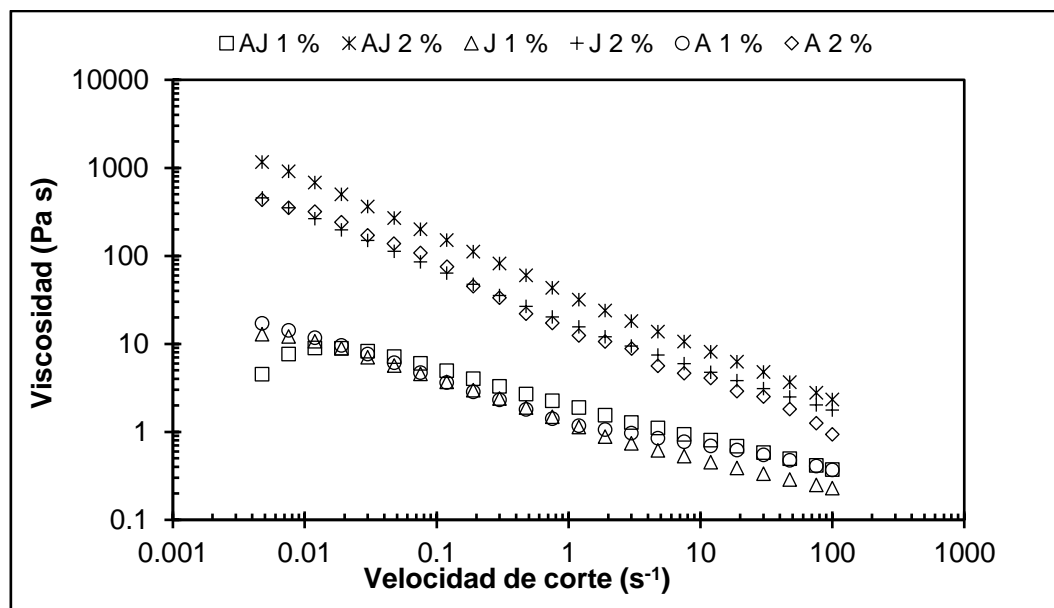


Figura 7.1 Curva de flujo de emulsiones al 30% (p/p) de aceite de hígado de bacalao en jugo de piña (J), agua (A) y mezcla 50:50 de AJ (p:p), adicionadas con 1 o 2 % (p/p) de alginato de sodio, y Tween 20 al 1%.

7.2.2 Flujo másico, rendimiento y eficiencia de encapsulación

En la Tabla 7.2 se reportan el flujo másico, el rendimiento del proceso y la eficiencia de encapsulación por GIE. Como se observa en la Tabla 7.2, el flujo másico obtenido con las diferentes emulsiones no presentó diferencias significativas ($p \geq 0.05$); sin embargo, esto se debe a la alta dispersión de los flujos que se presentaron con las emulsiones al 2% de alginato de sodio. Dichos tratamientos ocasionaron obstrucciones en el sistema a pesar de utilizar flujos másicos menores en comparación con los otros tratamientos al 1% de alginato. Este fenómeno se asoció al aumento de viscosidad que se presentó al incrementar la concentración del alginato de sodio al 2%, como se observa en la Figura 7.2.

Estas dificultades técnicas también afectaron los valores del rendimiento del proceso, de tal manera que el análisis estadístico no arrojó diferencias significativas entre ellos ($p \geq 0.05$), como se logra apreciar en la Tabla 7.2. Los valores de rendimiento oscilaron entre 49.01% y 83%. Benavides *et al.*, (2016), lograron un rendimiento máximo del 62 % utilizando CaCl_2 al 1.5 % con una capacidad de carga de aceite de 1 a 3 % v/v. En un estudio reportado por Cáceres *et al.*, (2020), evaluaron la encapsulación de aceite de toronja al 10%, utilizando 1% de alginato de calcio y de solución reticulante CaCl_2 al 2.5 y 10% (p/v), con lo cual obtuvieron rendimientos de 42 a 68%. En el presente trabajo, las emulsiones tuvieron una carga del 30% de AHB, lo cual es superior a lo reportado por estos autores, y a pesar de ello se lograron rendimientos superiores, específicamente con los tratamientos formulados con agua (A 1% y A 2%).

Tabla 7.2 Eficiencia de encapsulación y rendimiento de proceso obtenido a partir de la gelificación iónica de emulsiones al 30% (p/p) en peso de aceite de hígado de bacalao (AHB) en jugo de piña (J), agua (A) y mezcla 50:50 de A:J (p:p), adicionadas con 1 o 2 % (p/p) de alginato de sodio y Tween 20 al 1%.

Formulaciones	pH de la emulsión	Flujo másico (g/min)	Eficiencia de encapsulación (%)	Rendimiento (%)
J 1%	4.2 ± 0.04 ^B	1.42 ± 0.07 ^A	96 ± 1.11 ^A	49.01 ± 6.15 ^A
J 2%	4.2 ± 0.02 ^B	0.93 ± 0.12 ^A	100 ± 0.01 ^A	60.86 ± 0.00 ^A
AJ 1%	4.3 ± 0.16 ^B	1.05 ± 0.31 ^A	92 ± 7.01 ^A	49.93 ± 2.42 ^A
AJ 2%	4.32 ± 0.17 ^B	0.39 ± 0.14 ^A	93 ± 6.45 ^A	61.77 ± 3.54 ^A
A 1%	7.22 ± 0.08 ^A	0.99 ± 0.37 ^A	100 ± 0.0 ^A	83.60 ± 5.91 ^A
A 2%	7.35 ± 0.01 ^A	0.29 ± 0.04 ^A	100 ± 0.10 ^A	68.07 ± 7.18 ^A

Los valores reportados son la media ± error estándar ($n = 2$). En la misma columna, las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Las diferentes cápsulas mostraron una eficiencia de encapsulación superior al 90% (Tabla 7.2). Silva *et al.*, (2019), atribuyen la alta eficiencia de encapsulación a dos eventos: a la adición de Tween 20 asociada con la emulsión, ya que reportan que el surfactante reduce el tamaño de las gotas de aceite, favoreciendo la encapsulación del aceite en la estructura de hidrogel de alginato. También se asocia a

la cantidad de bloques de homopolímeros de ácido gulurónico (bloque G) presentes en el alginato de sodio y que contribuyen a la formación de una capa densa de hidrogel en la superficie de la cápsula.

Benavides *et al.*, (2016), obtuvieron cápsulas con una eficiencia de encapsulación del 75 al 80% con emulsiones que presentaban 1% de aceite de tomillo, mientras que al aumentar la concentración al 3% de aceite, las cápsulas presentaron una eficiencia menor de entre 60% a 75%, reportando que el aumento de aceite disminuyó significativamente la eficiencia de encapsulación, lo cual se puede deber a la limitada capacidad de la cápsula para contener aceite. Cuando aumenta el contenido de aceite, una cantidad significativa está cerca de la superficie de la cápsula, y durante el proceso de secado de la cápsula obtenida por GIE, este aceite superficial se puede degradar en presencia de oxígeno, y luz ambiental, así como bajo la acción de temperaturas moderadas, debido a que no se encuentra protegido dentro de la cápsula (Sebesan y Caraban, 2008; Beyki, 2014). Por esta razón, en nuestro estudio se decidió no secar las cápsulas después de la GIE, además de que serán colocadas directamente en el jugo de piña después de su lavado superficial para remover la solución reticulante.

De acuerdo a los resultados ya mencionados, las formulaciones de emulsiones con concentraciones al 2% de alginato de sodio presentan viscosidades elevadas, generando obstrucciones en el sistema de encapsulación, generando alta dispersión de los flujos másicos, y por ende afectando los valores del rendimiento del proceso. Debido a los resultados ya mencionados, se descartaría la aplicación de las formulaciones de emulsiones al 2% de alginato.

7.2.3 Morfología de las cápsulas obtenidas por GIE

Las diferentes emulsiones evaluadas generaron cápsulas con formas y tamaños aceptables como se aprecia en la Figura 7.2. La forma de las cápsulas es esférica y de tamaño aproximado a 2 mm. Sin embargo, también se puede apreciar visualmente en la Figura 7.2 que las cápsulas obtenidas de las emulsiones J 1%, J 2% y AJ 1% presentan desintegración en su formación, ya que, al adicionarse en agua destilada, las cápsulas comienzan a desintegrarse y mezclarse con el medio, mientras que las cápsulas obtenidas con las formulaciones A 1% y A 2% al ser adicionadas en agua destilada fueron estables y no presentaron desintegración.

Castañón *et al.*, (2020) realizaron la encapsulación por GIE del jugo de naranja, y reportan que la desintegración al momento de la formación de las cápsulas puede asociarse a la inestabilidad del polímero (alginato) frente a valores de pH por debajo de 4, pues ocurren fuertes interacciones en las macromoléculas de los hidrogeles de las cápsulas, debido a la formación de enlaces hidrógeno en los grupos carboxilos no disociados y no cargados, lo que se traduce en la formación de agregados a partir de las cápsulas, como se observa en las muestras con jugo de piña (ver Figura 7.2). Mientras que a pH altos (>4-10) los grupos carboxilo disociados están cargados negativamente y causan repulsión

electrostática de las macromoléculas, lo que determina finalmente la estabilidad de las cápsulas. Esta información concuerda con los resultados que obtuvimos en las cápsulas obtenidas de las emulsiones J 1%, J 2% y AJ 1% con pH de aproximadamente de 4.2 a 4.3, presentándose la desintegración de las cápsulas durante su formación e incluso al ser suspendidas posteriormente en medio acuoso. Gacesa (1988), reporta que las soluciones con 1 % de alginato de sodio en agua (disolvente) presentan un pH de 5-7.5; sin embargo, también reporta que a pH mayores a 10 los alginatos dejan de ser estables y empieza una despolimerización, por lo cual no se recomienda la GIE bajo estas condiciones básicas. También menciona que las cápsulas de alginato ya formadas bajo condiciones estables son compatibles con alimentos ácidos debido a que las cápsulas no se hidratan en sistemas altamente ácidos (pH <4 o 5). En nuestros resultados, las cápsulas obtenidas de las formulaciones A 1% y A 2% fueron las más estables, presentando un pH de 7 durante su formación (Tabla 7.2). Por lo tanto, los resultados que obtuvimos sobre la morfología y estabilidad de las cápsulas coinciden con lo reportado por Castañón *et al.*, (2020) y Gacesa, (1988). La formulación que finalmente se seleccionó fue la A 1%, pues debido a su menor viscosidad con respecto a A 2%, no presenta dificultades técnicas durante su alimentación en la solución reticulante. Se obtienen rendimientos del 83.6%, con eficiencia de encapsulación superior al 90%, y además las cápsulas formadas son estables.

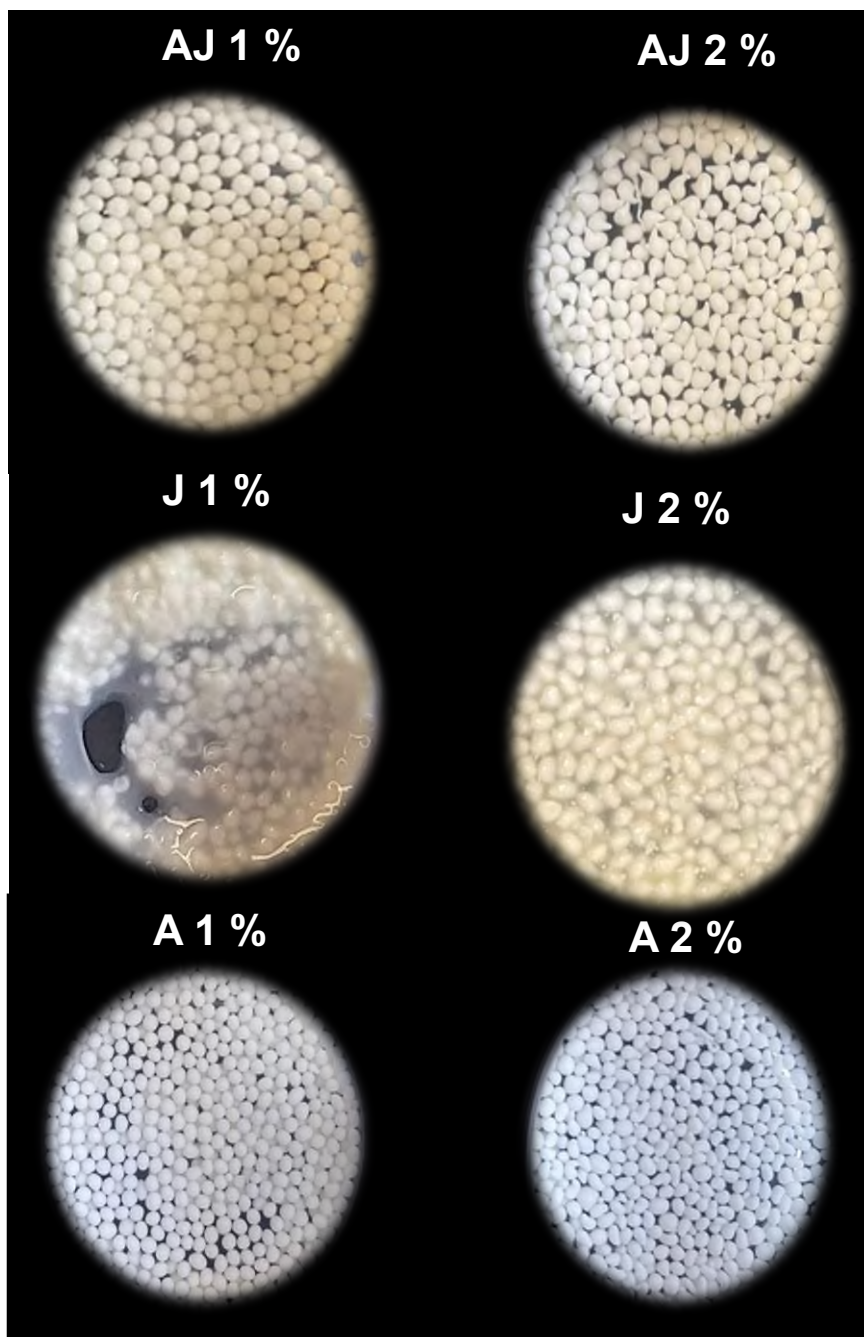


Figura 7.2 Morfología de las cápsulas obtenidas por diferentes formulaciones J 1%, J 2%, AJ 1%, AJ 2%, A 1% y A 2%.5.

7.3 Efecto del ultrasonido sobre las características fisicoquímicas y microbiológicas del jugo de piña

A un jugo de piña comercial se le aplicaron diferentes tratamientos de ultrasonido en cuanto a tiempo de sonicación (15 y 30 min) y amplitud (40, 60 y 80%: 48, 72 y 96 μm , respectivamente) con un equipo de 130 W de potencia y una frecuencia de 20 kHz, utilizando una sonda de 120 μm de amplitud (al 100%). También se aplicaron dos controles de proceso térmico en el jugo de piña, la pasteurización y la esterilización.

7.3.1 Análisis fisicoquímico

Los análisis fisicoquímicos se llevaron a cabo siguiendo el protocolo propuesto de la sección 6.1. En la Tabla 7.3 se exponen los resultados que generaron los tratamientos con ultrasonido sobre las coordenadas cromáticas de los jugos tratados.

Tabla 7.3 Efecto del tiempo y amplitud del ultrasonido con una potencia de 130 W sobre las coordenadas cromáticas de los jugos tratados.

Tratamientos	Atributos de color				
	L	A	b	C	H
US-15-40	55.82 \pm 0.22 ^a	-3.08 \pm 0.75 ^a	16.76 \pm 2.11 ^a	17.05 \pm 2.18 ^a	280.23 \pm 1.92 ^a
US-30-40	57.39 \pm 0.77 ^a	-3.23 \pm 0.58 ^a	23.67 \pm 1.65 ^a	23.90 \pm 1.68 ^a	277.72 \pm 1.10 ^a
US-15-60	56.31 \pm 0.86 ^a	-3.98 \pm 0.55 ^a	15.35 \pm 1.61 ^a	15.86 \pm 1.70 ^a	284.40 \pm 0.55 ^a
US-30-60	61.91 \pm 4.87 ^a	-3.89 \pm 0.30 ^a	18.23 \pm 4.75 ^a	18.69 \pm 4.66 ^a	283.73 \pm 3.67 ^a
US-15-80	50.85 \pm 1.99 ^a	-4.43 \pm 0.67 ^a	16.01 \pm 0.44 ^a	16.64 \pm 0.28 ^a	285.52 \pm 2.59 ^a
US-30-80	57.28 \pm 3.44 ^a	-3.22 \pm 0.69 ^a	23.98 \pm 5.49 ^a	24.26 \pm 5.38 ^a	278.88 \pm 86 ^a
Jugo de piña pasteurizado	58.64 \pm 2.59 ^a	-4.66 \pm 1.19 ^a	22.05 \pm 4.38 ^a	22.59 \pm 4.40 ^a	282.41 \pm 3.09 ^a
Jugo de piña esterilizado	54.34 \pm 0.72 ^a	-5.29 \pm 0.68 ^a	19.80 \pm 1.89 ^a	20.56 \pm 1.61 ^a	285.50 \pm 3.50 ^a
Jugo de piña	56.74 \pm 0.31 ^a	-4.91 \pm 0.18 ^a	19.23 \pm 1.82 ^a	19.86 \pm 1.76 ^a	284.57 \pm 1.45 ^a

Los valores reportados son la media \pm error estándar ($n = 2$). En la misma columna, las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

En cuanto a las coordenadas cromáticas del jugo tratado, las diferentes condiciones del ultrasonido no generaron cambios significativos ($p > 0.05$) entre los jugos tratados con ultrasonido y los tratamientos testigos (jugo sin tratar, jugo pasteurizado y jugo esterilizado). Los valores de L (luminosidad)

presentaron coordenadas entre 50 y 62%, alcanzando un espacio de color luminoso. Las coordenadas de a^* (verde a rojo) presentaron valores negativos de -3.08 a -5.3 grados, indicando una tonalidad verde. Las coordenadas b^* (azul a amarillo) indicaron valores de 15.35 a 23.98 que indican un espacio de color amarillo. Estas coordenadas arrojaron el color amarillo-verde distintivo del jugo de piña, y que no fue afectado por ninguno de los tratamientos evaluados. De acuerdo al estudio reportado por Bhat *et al.*, (2011), quienes realizaron tratamientos de sonicación con temperatura regulada a 20 °C (30 y 60 min, con 70% de potencia) en un jugo de lima, los tratamientos no indujeron cambios significativos en las características fisicoquímicas (pH, acidez total, °Brix,) del jugo tratado, a excepción de los atributos de color, reportando que el tratamiento con 60 min de sonicación mostró los valores más bajos de L (luminosidad) y a^* (rojo-verde), con valores altos en la coordenada b^* (azul-amarillo). Sin embargo, su proceso fue llevado a cabo durante 60 min, tiempo superior a los niveles evaluados en el presente proyecto (15 y 30 min). En otro estudio reportado por Sibaja, (2015), evaluaron los parámetros del jugo de guayaba tratado por ultrasonido (20 KHz de frecuencia, 40% amplitud por tiempos de 5, 10 y 15 min), y reportaron no observar diferencias significativas en el pH y °Brix, también indicaron que las coordenadas L^* , a^* y b^* del análisis de color se mantuvieron constantes. Por lo tanto, se puede inferir que tratamientos de hasta 30 min de sonicación podrían permitir conservar el color original del jugo tratado.

En la Tabla 7.4, se observan los parámetros fisicoquímicos (°Brix, sólidos totales, pH y acidez titulable) de las muestras de jugo tratadas por el ultrasonido. Los valores presentes muestran que no existen diferencias significativas entre los diferentes tratamientos con ultrasonido con respecto a los diferentes controles. Esto concuerda con lo reportado por Starek *et al.*, (2021), realizaron una evaluación del efecto de los tratamientos de ultrasonido (2, 5 y 10 min: 750 W, 20 KHz, 28 y 40 W·cm⁻² y temperatura de 37 a 52 °C) sobre los parámetros fisicoquímicos (pH, color y vitamina C) del jugo de tomate, reportando que no observaron diferencias estadísticamente significativas durante su primer día de almacenamiento. Sin embargo, al aumentar el tiempo de almacenamiento a 10 días, se observó un aumento en el pH y una degradación del contenido de ácido ascórbico en los jugos tratados con 10 min de sonicación a una intensidad de 40 W·cm⁻² con temperatura de 37 a 52 °C. Debido a lo informado, el tiempo de almacenamiento es una variable importante para determinar el efecto de las condiciones del ultrasonido en las propiedades fisicoquímicas del jugo de piña tratado, por lo que es posible que debido a las muestras realizadas en el día uno, no se observen en ese momento cambios en los parámetros. O de igual manera, puede ser posible que las condiciones de sonicación no sean tan agresivas para alterar los parámetros de las muestras tratadas.

Tabla 7.4 Efecto del tiempo y amplitud del ultrasonido con una potencia de 130 W sobre los parámetros fisicoquímicos (°Brix, sólidos totales, pH y acidez titulable) de los jugos tratados.

Tratamientos	° Brix	Sólidos totales (%)	pH	Acidez titulable (%)
US-15-40	11.5 ± 0.5 ^a	4.70 ± 0.01 ^{bc}	3.94 ± 0.005 ^{abc}	60.8 ± 3.2 ^b
US-30-40	11.5 ± 0.5 ^a	4.69 ± 0.00 ^{bc}	3.96 ± 0.00 ^{ab}	60.8 ± 3.2 ^b
US-15-60	11 ± 0.00 ^a	4.71 ± 0.03 ^{bc}	3.93 ± 0.00 ^{bcd}	57.6 ± 0.0 ^b
US-30-60	11 ± 0.00 ^a	4.73 ± 0.01 ^{bc}	3.90 ± 0.005 ^{de}	57.6 ± 0.0 ^b
US-15-80	11 ± 0.00 ^a	4.78 ± 0.03 ^{bc}	3.92 ± 0.01 ^{cde}	57.6 ± 6.4 ^b
US-30-80	11 ± 0.00 ^a	4.78 ± 0.07 ^{bc}	3.89 ± 0.01 ^e	64 ± 6.4 ^{ab}
Jugo de piña pasteurizado	11 ± 0.00 ^a	4.67 ± 0.04 ^c	3.94 ± 0.005 ^{abc}	89.6 ± 6.4 ^a
Jugo de piña esterilizado	12 ± 0.00 ^a	4.99 ± 0.00 ^a	3.97 ± 0.005 ^a	60.8 ± 3.2 ^b
Jugo de piña	11 ± 0.00 ^a	4.84 ± 0.01 ^{ab}	3.93 ± 0.005 ^{bcd}	57.6 ± 6.4 ^b

Los valores reportados son la media ± error estándar (n = 2). En la misma columna, las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes (p < 0.05).

Otro parámetro que se evaluó fue el contenido de vitamina C, un compuesto termolábil y altamente sensible a la luz, el cual se utiliza como indicador de calidad nutricional en los jugos, pues es susceptible a la degradación durante el procesamiento y almacenamiento. En la Tabla 7.5 se observa que la amplitud y el tiempo del ultrasonido son condiciones que generan un cambio significativo (p < 0.05) en los valores del contenido de la vitamina C. Los tratamientos US-15-40 y US-30-40 presentaron un contenido de vitamina C similar al jugo no tratado. Mientras que los tratamientos US-15-60, US-15-80 y US-30-80 presentaron una concentración similar a la pasteurización de 20 mg de ácido ascórbico/g. Los tratamientos que presentaron menor concentración de vitamina C fueron: la esterilización con 15 mg de ácido ascórbico/g y el tratamiento US-30-60 que presentó en la lectura 17.69 mg de ácido ascórbico/g. La variación que existe por parte de los diferentes tratamientos en el contenido de vitamina C se puede deber a factores físicos y químicos que degradan los compuestos al aplicar el ultrasonido. Ya que, en el interior de las burbujas generadas por la cavitación, se generan reacciones de termólisis y de pardeamiento no enzimático que generan la pérdida de vitamina C por oxidación, favoreciendo la generación de radicales libres como el hidroxilo. Estos radicales reaccionan con la vitamina C en la

superficie de las burbujas, formándose productos oxidativos. Los factores físicos por parte del ultrasonido que degradan la vitamina C son el aumento de temperatura y presión, así como el esfuerzo de cizalla, ondas de choque y turbulencia (Sibaja, 2015). Esto concuerda con el estudio reportado por Starek *et al.*, (2021), quienes al aumentar la intensidad de 28 a 40 W·cm⁻² y el tiempo de sonicación de 2, 5 y 10 min, obtienen contenidos menores de vitamina C que van de 12.27 a 9.97 mg/100 g al aumentar las condiciones de sonicación en las muestras de jugo de tomate tratadas por ultrasonido. Por otra parte, en el estudio reportado por Sibaja, (2015), evaluaron el jugo de guayaba, reportando que no se generaron efectos significativos en el contenido de vitamina C en las diferentes muestras tratadas con una frecuencia de 20 KHz, 40% de amplitud y tiempo de 5,10 y 15 min. Sin embargo, de acuerdo con Bhat *et al.*, (2011), el contenido de ácido ascórbico del jugo de lima, tratado por ultrasonido, presenta un aumento significativo. Mencionando que este efecto se debe a la eliminación del oxígeno disuelto, que es esencial para la degradación del ácido ascórbico durante las cavitaciones, producida durante los tratamientos de sonicación. Por todos estos resultados tan contrastantes es importante la comparación contra procesos convencionales de conservación de jugos, por ello en este proyecto se pasteurizó y esterilizó el jugo de piña.

Tabla 7.5 Efecto del tiempo y amplitud del ultrasonido con una potencia de 130 W sobre el contenido de vitamina C de los jugos tratados.

Tratamientos	Vitamina C mg á. ascórbico/g seco de jugo
US-15-40	21.88 ± 0.03 ^b
US-30-40	21.84 ± 0.03 ^b
US-15-60	20.76 ± 0.02 ^c
US-30-60	17.69 ± 0.01 ^f
US-15-80	20.26 ± 0.03 ^d
US-30-80	20.09 ± 0.02 ^e
Jugo de piña pasteurizado	20.13 ± 0.02 ^{de}
Jugo de piña esterilizado	15.09 ± 0.02 ^g
Jugo de piña	22.22 ± 0.03 ^a

Los valores reportados son la media ± error estándar (n = 2). En la misma columna, las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes (p < 0.05).

7.3.2 Análisis microbiológico

Las pruebas microbiológicas se llevaron a cabo siguiendo los protocolos propuestos en la sección 6.4. En la Tabla 7.6 se presentan los datos obtenidos del análisis microbiológico, de los tratamientos de ultrasonido evaluados, y de los testigos (jugo de piña pasteurizado, jugo de piña esterilizado, jugo de piña sin tratar).

Tabla 7.6 Efecto del tiempo y amplitud del ultrasonido con una potencia de 130 W sobre la carga microbiana de bacterias aerobias, hongos y levaduras del jugo de piña.

Tratamientos	Energía suministrada (kJ)	Reducción de bacterias aerobias (%)	Hongos (Log UFC/mL)	Levaduras (Log UFC/mL)
US-15-40	7.91 ± 0.00 ^e	8.45 ± 6.10 ^c	4.84 ± 0.01 ^a	5.28 ± 0.00 ^a
US-30-40	15.81 ± 0.02 ^d	58.22 ± 5.16 ^b	4.62 ± 0.01 ^b	5.21 ± 0.07 ^a
US-15-60	14.62 ± 0.28 ^d	95.87 ± 1.69 ^a	4.88 ± 0.00 ^a	5.24 ± 0.01 ^a
US-30-60	29.65 ± 0.36 ^b	96.38 ± 2.02 ^a	4.87 ± 0.04 ^a	5.11 ± 0.03 ^a
US-15-80	22.83 ± 0.39 ^c	98.31 ± 6.57 ^a	4.87 ± 0.03 ^a	4.92 ± 0.08 ^a
US-30-80	45.89 ± 0.13 ^a	98.50 ± 0.14 ^a	4.57 ± 0.01 ^b	5.03 ± 0.09 ^a
Jugo de piña pasteurizado		99.53 ± 0.02 ^a	ND	2.52 ± 0.41 ^b
Jugo de piña esterilizado		100.00 ± 0.00 ^a	ND	ND
Jugo de piña	NA	NA	4.60 ± 0.00 ^b	5.05 ± 0.21 ^a

Los valores reportados son la media ± error estándar (n = 2). En la misma columna, las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes (p < 0.05). ND: No detectado. NA: no aplica.

Como se muestra en la Tabla 7.6, para el caso del jugo de piña esterilizado, como se esperaba, esta muestra alcanzó la esterilidad comercial (valor de tiempo de reducción decimal en 12 D) en bacterias aerobias, hongos y levaduras. Por otra parte, el jugo de piña pasteurizado, mostró un valor de 3 reducciones logarítmicas con respecto al jugo de piña sin tratamiento térmico, lo cual equivale a 3D, esto para el caso de bacterias aerobias y levaduras, mientras que para hongos no se detectaron colonias viables después de la pasteurización. Se observa que los diferentes tratamientos con ultrasonido redujeron la carga de bacterias aerobias hasta un valor de 98.5% de reducción, sin embargo, no alcanzan una sola reducción logarítmica en la carga de hongos y levaduras; por ello, no se estimaron los porcentajes de reducción correspondientes. De acuerdo a Starek *et al.*, (2021), este comportamiento se puede deber a que el ultrasonido de baja intensidad puede aumentar la permeabilidad de las membranas celulares de ciertas levaduras como *S. cerevisiae*, lo que da como resultado un mayor contenido de Ca²⁺ en el citoplasma y una mayor proliferación celular.

Existen investigaciones como la reportada por Ruiz, *et al.*, (2018), donde aplicaron el ultrasonido en jugo de naranja y apio a diferentes tiempos (0, 15, 30, 45, 60, 75 y 90 min) con una potencia de 120 W y frecuencia de 20 kHz, sin reportar amplitud utilizada. Reportaron que la aplicación del ultrasonido produce una disminución significativa ($p < 0.05$) en la cuenta total de microorganismos. Mostraron que, a un tiempo de sonicación de 90 min se presentaba una carga microbiológica de hongos y levaduras menor de 2.20 Log UFC/mL. Este tiempo es superior a lo evaluado en el presente proyecto de investigación. En el caso del jugo de piña, se procesaron las muestras hasta 30 min, por lo tanto, podría ser necesario más tiempo de proceso para conseguir una reducción en la carga de hongos y levaduras. Es importante mencionar que la inactivación de microorganismos por ultrasonidos depende de características intrínsecas de las células microbianas (Bermúdez-Aguirre, 2017). Especialmente entre levaduras y bacterias. Autores como Nevárez *et al.*, (2020), reportan que el proceso de ultrasonido para inactivar microorganismos no depende del tamaño, tipo de Gram o hidrofobicidad bacteriana, sino de la estructura celular. La pared celular, aunque está presente en levaduras y bacterias, su composición es diferente: en las levaduras está formada básicamente por betaglucanos, manoproteína y quitina. Mientras que en las bacterias es el peptidoglicano el componente mayoritario (Muñoz *et al.*, 2021). Bermúdez-Aguirre (2017) reporta que las bacterias son más sensibles a la cavitación generada por el ultrasonido, debido a la falta de una pared celular fuerte. Sin embargo, se sabe que las bacterias grampositivas son más resistentes que las gramnegativas, debido a su pared celular más gruesa, que les proporciona una mejor protección contra los efectos del ultrasonido (Chemat y Khan, 2011). Esto explica el comportamiento observado en la presente investigación. Las condiciones de ultrasonido evaluadas no afectaron la carga de hongos y levaduras, pero sí se consiguió una reducción significativa en bacterias por parte de algunos tratamientos de ultrasonido. Por ejemplo, el tratamiento US-15-80 genera porcentajes de reducción de bacterias aerobias de 98% (Tabla 7.4), lo cual se aproxima a 3 reducciones logarítmicas (valor de 3D), que se consiguen convencionalmente con pasteurización a 65 °C, durante 30 min (99.9 % de reducción o muerte microbiana). Bajo estas condiciones de ultrasonido se suministraron 22.83 – 45.89 kJ de energía sobre las muestras. Estos resultados nos muestran que el tiempo, la amplitud y la energía suministrada, son factores importantes que actúan en la inactivación microbiológica.

En un estudio realizado por Bhat *et al.*, (2011), reportaron que la carga microbiológica depende de las condiciones del ultrasonido, siendo la variable del tiempo la más importante, pero sus condiciones superan los 30 min de procesamiento. Elaboraron un jugo de lima con una carga microbiológica de bacterias aerobias de 3.8 Log UFC/mL y 2.9 Log UFC /mL de hongos y levaduras. Aplicaron una frecuencia de 25 kHz, potencia establecida al 70%, temperatura de 20 °C y un tiempo de sonicación de 30 y 60 min. Observaron en la carga aerobia una disminución significativa de 1.9 Log UFC/mL durante 60 min y la muestra de 30 min obtuvo una disminución de carga de 3.7 Log UFC/mL. Así también obtuvieron una reducción significativa de 2.5 Log UFC/mL en 30 min y 2.4 Log UFC/mL en 60 min de

hongos y levaduras. En otro estudio reportado por Abid *et al.*, (2013), elaboraron un jugo de manzana y evaluaron diversas condiciones de ultrasonido con una frecuencia de 25 kHz, potencia establecida al 70%, temperatura de 20 °C y un tiempo de sonicación de 30, 60 y 90 min. Su jugo presentaba una carga inicial de bacterias aerobias de 3.75 Log UFC/mL y 3.21 Log UFC/mL de hongos y levaduras, donde observaron que al aplicar un tiempo de 90 min se presentaba una reducción en la carga de aerobias de 2.63 Log UFC/mL y 1.99 Log UFC/mL de hongos y levaduras. En el tratamiento de 30 min se presentó una carga de 3.7 y 2.71 Log UFC/mL en aerobias y hongos/levaduras. En una investigación reportada por Ruiz *et al.*, (2018), elaboraron un jugo a base de naranja y apio, donde presentó una carga aerobia inicial de 4.48 Log UFC/mL y 2.55 Log UFC/mL de hongos y levaduras. Reportaron que con un tratamiento de 20 KHz, 120 W y 90 min de sonicación obtuvieron una carga aerobia de 4.10 Log UFC/mL y en un tratamiento de 30 min 4.35 Log UFC/mL.

Es importante mencionar que los diferentes estudios mencionados elaboraron sus propios jugos y utilizaron tiempos de sonicación y potencia más elevados que en el presente proyecto, además de no presentar más condiciones que ayuden en la comparación de los diferentes tratamientos, faltando variables como la intensidad de las ondas de ultrasonido y la amplitud. En esta investigación se utilizó de muestra un jugo comercial artesanal obtenido por prensado en frío, sin supervisar las medidas sanitarias, obteniendo un jugo de piña con una carga microbiológica elevada. Los tratamientos US-15-80 y US-30-80 de esta investigación generaron una reducción de carga microbiológica que concuerda con los resultados ya reportados por los autores mencionados. A excepción de la carga microbiológica de hongos y levaduras. Los tratamientos US-15-60 y US-30-60 también generaron una reducción >90% en la carga de bacterias aerobias. En la Tabla 7.6 podemos observar que de los cuatro tratamientos que presentaron una reducción significativa en la carga de bacterias, el tratamiento que requiere de menor energía al ser aplicado es el US-15-60, utilizando una energía de 14.62 KJ, además de utilizar un tiempo de sonicación de 15 min con una amplitud de 60%.

De acuerdo con los resultados obtenidos en esta investigación, los tratamientos con ultrasonido aplicados al jugo de piña, no generaron cambios en el contenido de las propiedades fisicoquímicas del jugo. De los seis tratamientos aplicados, los tratamientos que no generaron cambios en el contenido de vitamina C fueron US-15-40, US-30-40 y US-15-60. Sin embargo, la finalidad de aplicar el ultrasonido es realmente lograr la inactivación microbiana presente en el jugo de piña, por ello, se realizó el análisis microbiológico, con el fin de poder identificar el tratamiento con mayor potencial para inactivar los microorganismos, sin alterar las propiedades fisicoquímicas del alimento. De acuerdo con los resultados microbiológicos, el tratamiento US-15-60 es el que presenta mayor ventaja en ser aplicado, de acuerdo a la energía suministrada, tiempo de proceso, amplitud y reducción microbiológica en bacterias aerobias. Además, es uno de los tratamientos que no genera cambios en el contenido de vitamina C en el jugo de piña y en sus parámetros fisicoquímicos.

Según lo que hasta aquí se ha discutido de acuerdo con los resultados obtenidos por el análisis fisicoquímico y microbiológico, se podría sugerir el incremento del tiempo de procesamiento; sin embargo, con ello los requerimientos de energía aumentarían, arriesgando la factibilidad económica del proceso y quizás se afecten las propiedades fisicoquímicas del jugo al exponerse por tanto tiempo a las ondas de ultrasonido. Por todo lo expuesto y de acuerdo con los resultados que se observaron en la inactivación microbiana limitada en hongos y levaduras al aplicar el ultrasonido con baño de hielo (temperatura de -5 °C) sobre el jugo de piña, se implementó el uso del tratamiento US-15-60 como base, ya que brindó una reducción de bacterias aerobias del 95.87%. Sin embargo, se decidió no controlar la temperatura durante el proceso de ultrasonido, ya que de acuerdo con investigaciones recientes aportadas por Starek *et al.*, (2021), argumentan que, al no aplicarse un proceso de enfriamiento, el calor generado por el proceso de sonicación ayuda en la reducción de la carga microbiana de hongos y levaduras. También se implementó la adición de benzoato de sodio para retardar el desarrollo de microorganismos en el jugo, sin alterar las características fisicoquímicas del mismo. Este conservador es el más utilizado en la industria alimentaria, porque previene la presencia de bacterias, levaduras y hongos. Generalmente, son más efectivos contra levaduras y mohos en concentraciones menores de 0.2% (Abiola *et al.*, 2018). Por lo que se adicionó una concentración de 0.1% de benzoato de sodio en el jugo de piña, de acuerdo a investigaciones recientes (Cedeño 2017; León 2017; Rani *et al.*, 2018).

7.3.3 Sonicación sin baño de hielo y con conservador

De acuerdo a la información reportada anteriormente sobre los tratamientos con ultrasonido, se optó por seleccionar el tratamiento US-15-60 como el tratamiento más eficiente respecto a la reducción del 95.87% en bacterias aerobias, la energía suministrada de 14.62 KJ, tiempo de sonicación, amplitud y por no generar cambios en las características fisicoquímicas del jugo de piña y en su contenido de vitamina C. Sin embargo, debido a la falta de reducción en la carga de hongos y levaduras, se llevó a cabo una estrategia para generar esa reducción, mediante la aplicación de 0.1% del benzoato de sodio, un conservador efectivo contra levaduras y mohos en el área de alimentos. Al mismo tiempo, se optó por retirar el baño de hielo (-5 °C) que controlaba la temperatura de la muestra en el proceso de sonicación, generando así un aumento de temperatura de hasta 50 °C. En el jugo de piña comercial se aplicó 0.1% de benzoato de sodio antes del tratamiento con ultrasonido. El proceso de sonicación se llevó en un tiempo de 15 min a una amplitud del 60 % (72 μm) con un equipo de 130 W de potencia y una frecuencia de 20 kHz, utilizando una sonda de 120 μm de amplitud (al 100%) y sin un baño de hielo. Se optó por cuatro controles: US-SB15-60-SC (Ultrasonido sin baño a 15 min y 60 % amplitud sin conservador), pasteurización, esterilización y jugo de piña sin tratamiento. Los estudios que se evaluaron en este tratamiento fueron los análisis fisicoquímicos y microbiológicos de la sección 6.1 y 6.4 respectivamente.

7.3.4 Análisis fisicoquímico del tratamiento US-SB-15-60-CC

En la Tabla 7.7 se muestran los resultados de los parámetros fisicoquímicos (°Brix, sólidos totales, pH y acidez titulable) de los tratamientos y testigos. Se observa que no se presentó una diferencia significativa en los valores de °Brix. Los porcentajes de sólidos totales en los jugos de piña tratados, presentaron diferencia significativa entre los tratamientos y testigos, debido a que los testigos y los tratamientos US-SB-15-60-SC y US-SB-15-60-CC presentaron porcentajes de sólidos totales mayores en comparación con el jugo de piña sin tratar. Este comportamiento se podría deber a diferentes factores aplicados en el jugo de piña tratado; el primero es que el jugo de piña, aparte de presentar sólidos como los azúcares (sacarosa), contiene otros constituyentes como los ácidos orgánicos y la vitamina C, siendo estos los sólidos totales presentes en el jugo (Bravo 2005). El siguiente factor es que, al no utilizar un baño de hielo que regule la temperatura, se puede crear la hidrólisis de los azúcares y formar ácidos orgánicos, aumentando el contenido de sólidos totales (Mohamad *et al.*, 2022). Otro factor que puede actuar en la variación del porcentaje de sólidos totales de los tratamientos es la adición del benzoato de sodio en el jugo de piña, generando un aumento en su contenido. En la Tabla 7.7 se observa que el tratamiento US-SB-15-60-SC presentó un porcentaje del 4.80% de sólidos totales en comparación con el tratamiento US-SB-15-60-CC de 3.62%. Esto podría deberse a un error en la experimentación, ya que el tratamiento US-SB-15-60-SC no fue adicionado con benzoato de sodio, como para presentar un aumento en el porcentaje de sólidos totales.

Tabla 7.7 Efecto del tratamiento de ultrasonido (60% amplitud por 15 min), sin baño de hielo sobre las características fisicoquímicas (°Brix, sólidos totales, pH y acidez titulable) de un jugo de piña con 0.1% de conservador (benzoato de sodio).

Tratamientos	° Brix	Sólidos totales (%)	pH	Acidez titulable (%)
US-SB15-60-SC	12.00 ± 0.00 ^a	4.80 ± 2.79 ^a	3.97 ± 0.0 ^c	60.80 ± 3.20 ^b
US-SB15-60-CC	12.00 ± 0.00 ^a	3.62 ± 3.39 ^b	4.12 ± 0.00 ^a	57.60 ± 6.40 ^b
Jugo de piña pasteurizado	11.5 ± 0.50 ^a	3.59 ± 2.56 ^c	3.95 ± 0.00 ^d	89.60 ± 6.40 ^a
Jugo de piña esterilizado	12.50 ± 0.50 ^a	4.00 ± 2.83 ^d	3.91 ± 0.00 ^e	54.40 ± 3.20 ^b
Jugo de piña	12.00 ± 0.00 ^a	3.32 ± 2.35 ^c	3.96 ± 0.00 ^c	57.60 ± 0.00 ^b

Los valores reportados son la media ± error estándar (n = 2). En la misma columna, las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes (p < 0.05).

En cuanto al pH de los diferentes tratamientos de la Tabla 7.7, se observa que estos presentaron cambios significativos con respecto al jugo de piña sin tratar. Se observa que los testigos presentaron valores semejantes al jugo sin tratar, por lo que la temperatura aplicada por parte de la pasteurización

y esterilización no modificó significativamente el pH del jugo. Entre los tratamientos con ultrasonido, el US-SB-15-60 SC presentó un pH de 3.97, encontrándose en un rango semejante al presentado por los testigos y jugo sin tratar. Mientras que el tratamiento US-SB-15-60-CC presenta un pH mayor al resto de los tratamientos. La variación observada en los valores de los diferentes tratamientos podría explicarse debido a la presencia de sustancias que tengan una capacidad amortiguadora, ya que el jugo de piña posee minerales y ácidos orgánicos. Estas sustancias tienen la capacidad de aceptar o donar protones en función de los cambios que existen en el medio en el que se encuentran. Debido a la presencia de estas sustancias en el jugo de piña, el producto puede neutralizar los efectos que podrían tener pequeñas variaciones de concentración de sustancias ácidas o alcalinas presentes en la matriz generadas por las ondas del ultrasonido (Sibaja, 2015).

El parámetro de acidez titulable de los diferentes tratamientos no muestra un cambio significativo entre los valores, a excepción del jugo pasteurizado, presentando un porcentaje de acidez del 89.60%. Estos cambios pueden deberse al manejo de la muestra o a la formación de compuestos químicos (peróxido de hidrógeno, nitratos, nitritos) formados por la aplicación del ultrasonido. Los compuestos fenólicos presentes en los alimentos también pueden presentar alteraciones al aplicarse el ultrasonido, siendo convertidos a quininas o antioxidantes, provocando alteraciones en los valores del pH o acidez. En un estudio reportado por Baba *et al.*, (2016), se evaluó el comportamiento de acidez del jugo de piña y naranja adicionado con benzoato de sodio, reportando que el conservador modificó mínimamente la acidez del jugo.

En la Tabla 7.8 se observan las coordenadas cromáticas de los jugos tratados, donde no se aprecian cambios significativos. Esto se podría atribuir a la inactivación de la enzima polifenol oxidasa por sonicación y calor. Esta enzima participa en el pardeamiento de frutas y verduras, ocasionando disminución en las propiedades sensoriales del alimento, como en el color (Starek *et al.*, 2021). Ruiz *et al.*, 2018 y Bhat *et al.*, (2011), reportan que la energía acústica, ocasionada por el ultrasonido, genera una isomerización acelerada de los carotenoides presentes en el jugo. También podría ocasionarse la oxidación por la presencia de radicales libres generados por la sonicación. Sin embargo, Luna, (2015), reporta que el jugo de pomelo, carambola y piña tratado por ultrasonido presentó un ligero aumento en sus coordenadas colorimétricas, mencionando que eso podría deberse al ultrasonido, ya que puede generar una ligera degradación de la pared celular de la pulpa del jugo y liberar pigmentos que no se encontraban en el medio, potencializando la tonalidad del producto. En cuanto a la adición del benzoato de sodio en el tratamiento, no generó ningún cambio en el color del jugo tratado, lo cual concuerda con Zeb *et al.*, (2009), reportando que el benzoato de sodio es el mejor conservador para mantener el color del jugo de uva, evitando que los microorganismos generen alteraciones en los parámetros fisicoquímicos del producto.

Tabla 7.8 Efecto del tratamiento de ultrasonido (60% amplitud por 15 min), sin baño de hielo sobre las coordenadas cromáticas del jugo de piña con 0.1% de conservador (benzoato de sodio).

Tratamientos	Atributos de color				
	L	a	B	C	H
US-SB15-60-SC	54.25 ± 2.95 ^a	-3.48 ± 1.36 ^a	20.17 ± 3.81 ^a	20.60 ± 3.69 ^a	280.99 ± 4.33 ^a
US-SB15-60-CC	55.59 ± 0.32 ^a	-4.95 ± 0.27 ^a	14.69 ± 0.45 ^a	15.51 ± 0.49 ^a	288.62 ± 0.71 ^a
Jugo de piña pasteurizado	57.81 ± 1.33 ^a	-2.00 ± 0.19 ^a	16.09 ± 2.97 ^a	16.23 ± 2.93 ^a	277.70 ± 1.76 ^a
Jugo de piña esterilizado	54.34 ± 0.72 ^a	-5.29 ± 0.68 ^a	19.80 ± 1.89 ^a	20.56 ± 1.60 ^a	285.50 ± 3.50 ^a
Jugo de piña	53.44 ± 0.29 ^a	-3.98 ± 0.29 ^a	21.87 ± 1.51 ^a	22.25 ± 1.44 ^a	280.48 ± 1.35 ^a

Los valores reportados son la media ± error estándar (n = 2). En la misma columna, las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes (p < 0.05).

En la Tabla 7.9 se observa una diferencia significativa en los valores del contenido de vitamina C de los diferentes tratamientos con respecto al jugo de piña sin tratamiento. Se aprecia que los testigos de pasteurización y esterilización presentaron valores menores en el contenido de vitamina C con respecto al jugo de piña sin tratar. Este comportamiento se debe al calor que generan estos procesos, ya que afectan la vitamina C, debido a que es un compuesto bioactivo sensible al calor (Rabie *et al.*, 2014). En los tratamientos con ultrasonido, sin baño de hielo se presentó un contenido menor de vitamina C con respecto del jugo sin tratamiento y a los testigos; este comportamiento se debe a la cavitación generada por el equipo de ultrasonido, debido a que dentro de las burbujas se dan reacciones de termólisis y de pardeamiento no enzimático. La sonicación favorece la formación de radicales libres como el hidroxilo. Estos radicales reaccionan con la vitamina C en la superficie de las burbujas, formándose productos oxidativos. Otros factores que pueden actuar en la degradación de la vitamina C pueden ser los efectos térmicos y mecánicos ocasionados por la cavitación. Este fenómeno genera condiciones físicas extremas, como aumentos localizados de temperatura y presión. De igual manera, produce fuerzas de cizalla, ondas de choque y turbulencia (Sibaja, 2015). En otro estudio reportado por Starek *et al.*, 2021, realizaron una evaluación del contenido de vitamina C en un jugo de tomate tratado por un ultrasonido de alta potencia y frecuencia 20 kHz con tres parámetros operativos: intensidad de ultrasonido (28 y 40 W cm), tiempo de tratamiento (2, 5 y 10 min), y tiempo de almacenamiento del producto (1, 4, 7 y 10 días), con temperatura del jugo durante la sonicación de 37 a 52 °C. Los autores observaron pérdidas mayores del contenido de vitamina C con el tratamiento de 40 W en un tiempo de 10 min. Mientras que el tratamiento con una intensidad de ultrasonido de 28 W cm y tiempo de sonicación de 5 y 10 min presentaron pérdidas menores. Sibaja, (2015), reportó el contenido de vitamina C en un jugo de guayaba aplicado el tratamiento de una frecuencia de 20 KHz, con una amplitud de 40% por 5, 10 y 15 min. Mencionando que el contenido de vitamina C disminuía conforme, se aplicaba mayor tiempo de sonicación teniendo un contenido que iba de 600 a 450 mg/kg de vitamina C. Luna (2015), realizó un estudio en el contenido de vitamina C en una mezcla de jugo (piña, carambola y pomelo) tratado con

ultrasonido con una frecuencia de 24 KHz, amplitud del 20% y potencia de 80 % con pulsaciones de 50/100, mencionando que el contenido de vitamina fue menor al jugo no tratado.

Tabla 7.9 Efecto del tratamiento de ultrasonido (60% amplitud por 15 min), sin baño de hielo sobre el contenido de vitamina C del jugo de piña con 0.1% de conservador (benzoato de sodio).

Tratamientos	Vitamina C mg á. ascórbico/g
US-SB15-60-SC	12.34 ± 0.03 ^d
US-SB15-60-CC	11.21 ± 0.12 ^d
Jugo de piña pasteurizado	16.23 ± 0.01 ^b
Jugo de piña esterilizado	14.87 ± 0.29 ^c
Jugo de piña	18.23 ± 0.27 ^a

Los valores reportados son la media ± error estándar (n = 2). En la misma columna, las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes (p < 0.05).

De acuerdo a los resultados obtenidos del análisis fisicoquímico en el jugo de piña tratado por US-SB-15-60-CC y US-SB-15-60-CC con respecto a los testigos (jugo de piña sin tratar, jugo pasteurizado y jugo esterilizado), se observaron mínimas variaciones entre los valores de cada parámetro evaluado con respecto a los diferentes tratamientos, presentándose el contenido de vitamina C como el parámetro con mayor variación, debido a que el jugo sin tratamiento presentó un contenido de vitamina C de 18.23 mg/100g y los tratamientos US-SB-15-60-CC y US-SB-15-60-CC presentaron contenidos menores, de 11.21 y 12.34 mg/100 g, respectivamente. Mientras que los testigos presentaron contenidos de 14.87 y 16.23 mg/100 g. Se podría pensar que, de acuerdo a ello, lo más factible sería optar por la aplicación de un método convencional, sin embargo, los análisis fisicoquímicos no son los únicos análisis que se realizan para evaluar un tratamiento de conservación alimentaria, también se requiere de un análisis microbiológico, los cuales se discutirán en la siguiente sección.

7.3.5 Análisis microbiológicos US-SB-15-60-CC

Los resultados del análisis microbiológico del jugo de piña tratado por ultrasonido US-SB-15-60-CC/SC con respecto a los testigos (jugo de piña sin tratamiento, jugo pasteurizado y jugo esterilizado) se muestran en la Tabla 7.10. Se observa que los tratamientos evaluados y los testigos presentaron una reducción de los microorganismos por arriba del 95%, sin tener diferencias significativas entre ellos. Los tratamientos US-SB-15-60-SC y US-SB-15-60-CC presentaron reducciones del 99.84 y 99.93% en la carga de bacterias y en hongos se presentó una ausencia de su crecimiento, de igual manera en la carga de levaduras. Esto se debe al mecanismo de inactivación ultrasónica de los microorganismos como resultado de la acción física que es generada por la cavitación, efectos mecánicos (cargas

mecánicas) y térmicos, esta acción a su vez es generada por efectos químicos relacionados con la generación de radicales libres (H y OH a través de reacciones sonoquímicas) a través de la descomposición del agua dentro de burbujas oscilantes. Las cargas mecánicas generadas por el ultrasonido actúan en los microorganismos perforando sus membranas celulares (adelgazamiento de las membranas celulares) y producen radicales libres, y la extrusión de la matriz intracelular elimina a los microorganismos debido a que la rápida formación y el colapso de las burbujas son capaces de romper los enlaces de hidrógeno, así como las interacciones de van der Waals en las cadenas polipeptídicas (Starek *et al.*, 2021).

Tabla 7.10 Efecto del ultrasonido US-SB-15-60 con conservador y sin conservador, con una potencia de 130 W sobre la carga microbiana de bacterias aerobias, hongos y levaduras del jugo de piña.

Tratamientos	Energía suministrada (kJ)	Reducción de bacterias aerobias (%)	Reducción de hongos (%)	Reducción de levaduras (%)
US-SB15-60-SC	13.15 ± 0.01 ^b	99.84 ± 0.00 ^a	98.34 ± 0.29	99.90 ± 0.00
US-SB15-60-CC	13.25 ± 0.00 ^a	99.93 ± 2.00 ^a	ND	ND
Jugo de piña pasteurizado	NA	99.98 ± 0.00 ^a	ND	ND
Jugo de piña esterilizado	NA	ND	ND	ND
Jugo de piña	NA	NA	NA	NA

Los valores reportados son la media ± error estándar (n = 2). En la misma columna, las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes (p < 0.05). ND: No detectado. NA: no aplica.

En general, la inactivación de microorganismos por ultrasonido depende de muchos factores que incluyen la potencia ultrasónica y la amplitud de la onda, la temperatura, el volumen de la muestra, la composición y las propiedades físicas de los alimentos, el tipo (microbios probióticos, de descomposición o patógenos) y las características del microorganismo (forma, gramnegatividad o positividad y etapa de crecimiento). Además de la inactivación de microorganismos, el tratamiento con ultrasonido también inactiva las enzimas, especialmente la pectina metilesterasa y la poligalacturonasa, que son responsables de descomponer algunas de las pectinas y reducir la viscosidad del jugo, debido a que el ultrasonido altera la estructura secundaria y terciaria de las enzimas y conduce a la pérdida de su actividad biológica (Ruiz *et al.*, 2018; Starek *et al.*, 2021). Para la pasteurización y esterilización se una ausencia del crecimiento de microorganismos. Es importante recordar que los resultados microbiológicos que se obtuvieron en la Tabla 7.6 de los diferentes tratamientos con ultrasonido (40, 60 y 80 amplitud; 15 y 30 min de sonicación) con baño de hielo no pudieron generar una reducción en la carga de hongos y levaduras, sin embargo, si generaron reducción en la carga de bacterias. Se ha mencionado, por parte de Starek *et al.*, (2021), que los tratamientos con ultrasonido están limitados en el procesamiento de alimentos por la generación de calor durante este proceso, que puede provocar

cambios físicos, químicos y bioquímicos en las materias primas procesadas. Sin embargo, también menciona que el ultrasonido presenta una baja eficiencia para inactivar esporas y levaduras. Comentando que para aumentar la eficacia de inactivación de estos microorganismos se utilizan técnicas combinadas; por ejemplo, la combinación de ultrasonificación con tratamiento térmico suave y el uso de ultrasonidos de alta intensidad. Ellos optaron por no regular la temperatura generada por parte del equipo en la muestra tratada para obtener mayor efectividad en la reducción microbiana. Por ello, se optó en nuestra investigación por seleccionar el tratamiento que presentara una reducción eficiente, al igual que los demás tratamientos, pero que requiriera de menor gasto de energía suministrada y menor tiempo de sonicación, seleccionando así el tratamiento US-15-60. Para brindar una reducción en hongos y levaduras con este tratamiento, se optó por añadir un conservador como el benzoato de sodio a una concentración de 0.1% y también se retiró el baño de hielo que ayudaba a regular la temperatura que genera el ultrasonido en la muestra de jugo de piña. Gracias a estas modificaciones en el tratamiento US-SB-15-60-SC y US-SB-15-60-CC registraron temperaturas de 50 °C y energías suministradas de 13.15 y 13.25 KJ y un tiempo de sonicación de 15 min, logrando una reducción del 98 al 100%, mientras que los testigos como la pasteurización presentaron una temperatura de 65 °C y un tiempo de calentamiento de 30 min, y la esterilización a una temperatura de 120 °C y tiempo de 15 min, estos testigos presentan condiciones de procesamiento mayores a las aplicadas en los tratamientos con ultrasonido. La carga de microorganismos en Log UFC/mL presentes en el jugo de piña sin tratar fue de 6.38 Log UFC/mL de bacterias aerobias, 4.31 Log UFC/mL y 5.71 Log UFC/mL hongos y levaduras. Al aplicar los tratamientos US-SB-15-60-SC y US-SB-15-60-CC estos presentaron cargas de 3.59 y 3.23 Log UFC/mL en bacterias. De hongos, presentaron 2.52 Log UFC/mL a 0 Log UFC/mL y en levaduras de 2.71 Log UFC/mL y 0 Log UFC/mL. Estudios sobre el efecto del ultrasonido en la reducción microbiana de jugos de frutas, han reportado que a mayor tiempo de sonicación se presentan cargas de microorganismos menores, aplicando tratamientos como el propuesto por Ruiz *et al.*, (2018), donde evaluaron la carga de microorganismos presentes en un jugo de naranja y apio, aplicando el ultrasonido con las condiciones de potencia de 120 W de un ultrasonido con una frecuencia de 20 KHz, en tres tiempos de sonicación (30, 60 y 90 min), reportando que en un tiempo de 90 min se encuentran cargas de bacterias de 4.10 Log UFC/mL y una carga de hongos y levaduras de 2.15 Log UFC/mL. Sus resultados concuerdan con los obtenidos en nuestra investigación, sin embargo, ellos mantuvieron regulada la temperatura generada por el equipo en la muestra a 20 °C. Mientras que en nuestro tratamiento no regulamos la temperatura, llegando a un valor de 50 °C, generado por el equipo en la muestra y utilizando un tiempo de sonicación de 15 min, ya que al utilizar tiempos de sonicación mayores se requiere de mayor gasto de energía suministrada, obteniendo así una carga de bacterias de 3.23 Log UFC/mL. En hongos y levaduras no se observó crecimiento de estos microorganismos.

En otro estudio reportado por Bhat *et al.*, (2011), se menciona que los tratamientos con frecuencia de 25 KHz, 70% de potencia y tiempo de sonicación de 30 y 60 min con temperatura de 20 °C aplicados

en un jugo de lima, sí generan reducción en la carga microbiana. Sin embargo, en sus resultados se observa que, en la reducción de bacterias, el tratamiento de 60 min fue el que presentó una mayor reducción. En la carga de hongos y levaduras no se observaron diferencias significativas en la aplicación de los dos tratamientos. Mencionando que este resultado se debe a que no se pudo lograr una descontaminación completa del jugo de lima en los dos tiempos de tratamiento empleados, señalando que la sonicación por sí sola es ineficaz para la descontaminación de los productos; por lo tanto, es necesario emplear la sonicación combinada con otros tratamientos físicos, como la aplicación de presión, calor suave o tratamientos no térmicos.

Jingfei y Vasantha, (2012), informan que, al aplicar una potencia mayor en las muestras tratadas por ultrasonido, no se requiere de aplicar tiempos prolongados de sonicación para reducir la carga microbiana. Ellos evaluaron el recuento aeróbico total en mezclas de jugos de manzana y zanahoria tratadas con ultrasonido a una potencia de 1000 W con una frecuencia de 20 Khz y tiempo de sonicación de 10 min, manteniendo una temperatura de 25 °C y almacenadas por 30 días, reportando que en el día inicial se presentó una carga de 10^2 UFC/mL; sin embargo, al pasar el tiempo de almacenamiento incrementó la carga de microorganismos de 10^4 a 10^5 UFC/mL. Sus datos fueron semejantes a la pasteurización convencional que realizaron como comparación, presentando en el día inicial una carga de 10^1 hasta llegar al día 30 con una carga de 10^4 a 10^5 UFC/mL.

En un estudio realizado por Starek *et al.*, (2021), reportan que la reducción microbiana que genera el ultrasonido se asocia con la duración del tratamiento y la intensidad del ultrasonido. Ya que, al probar un tiempo de sonicación de 2, 5 y 10 min, así como intensidades de 28 y 40 W cm⁻² sin regular la temperatura generada por el equipo, presenta temperaturas de 35 a 52 °C de acuerdo al aumento del tiempo de sonicación. Ellos observaron que al aplicar 10 min se generaba una reducción en la carga de mesófilos aerobios de 2.8 y 2.5 Log UFC/mL con ambas intensidades en el primer día de almacenamiento, sin embargo, conforme avanzaban los días de almacenamiento, la muestra tratada con una intensidad de 28 W cm⁻² aumentaba la carga de bacterias a 3.8 UFC/mL. Mientras que con el tratamiento de 40 W cm⁻² de intensidad al aumentar los días de almacenamiento se presentaba una carga de bacterias menor de 1.5 UFC/mL. Ellos mencionan que este efecto en la proliferación microbiana depende de la intensidad y tiempo del procesamiento. Ya que el tratamiento de ultrasonido con alta intensidad provoca daño celular, mientras que el de baja intensidad provoca una cavitación constante, estimulando la proliferación celular, así como aumento de la actividad metabólica o incluso la producción del producto deseado. Mientras que, en la carga de levaduras, ellos observaron que a los 10 min de los tratamientos con intensidades de 28 y 40 W cm⁻² se generó una reducción mayor que permaneció constante al aumentar los días de almacenamiento, obteniendo cargas de 0.2 y 0.5 Log UFC/mL desde el primer día. Sin embargo, el tratamiento de 40 W cm⁻² con 5 min de sonicación presentó una reducción similar al de 10 min, manteniéndose constante al transcurrir los días de almacenamiento

de 0.5 Log UFC/mL. Sibaja, (2015), menciona que entre mayor sea el tiempo de sonicación mayor será el número de microorganismos inactivados; sin embargo, en su investigación utilizó un equipo de ultrasonido con una potencia de 750 W, donde la potencia que utilizaron fue de 50 W con una frecuencia de 20 KHz, tiempos de sonicación de 5, 10 y 15 min y una temperatura de 20 °C.

Mientras que en nuestro tratamiento de selección se utilizó un equipo con una potencia de 130 W donde solo utilizamos una potencia de 15 W, un tiempo de sonicación de 15 min y sin baño de hielo, obteniendo como resultado que el jugo sin tratar presentó con una carga de 6.38 Log UFC/mL de bacterias, al aplicar el tratamiento se presentó una carga de 3.23 Log UFC/mL, teniendo una reducción de 3.15 Log UFC/mL menos que en la carga inicial del jugo. En el caso de la carga de hongos presentes en el jugo sin tratar fue de 4.31 Log UFC/mL y con el tratamiento no se observaron UFC. En la investigación de Luna, (2015), reportó que al aplicar un tratamiento en una mezcla de jugo (piña, carambola y pomelo) con una potencia final de 96 W y una frecuencia de 24 KHz, así como una amplitud de 20% y pulsaciones de 50/60 se generó una reducción total en la carga de microorganismos como aerobios, hongos y levadura, en su investigación menciona que antes de aplicar el tratamiento, el jugo se lleva previamente a un baño de hielo, sin monitorear la temperatura de la muestra, pudiendo afectar sus resultados de ultrasonido, ya que en el equipo de ultrasonido gran parte de la energía acústica que genera se convierte en energía térmica, por lo que se genera un aumento de la temperatura del medio sonificado.

De acuerdo a la información discutida, la utilización de equipos con una potencia, tiempos de sonicación, intensidades y potencias finales más elevadas aplicadas a las muestras, se obtienen reducciones más efectivas en las cargas microbianas del producto, Sin embargo, los resultados que obtuvieron los autores se encuentran en un intervalo por debajo de nuestros resultados, sin bien nosotros no controlamos la temperatura que genera el equipo para el tratamiento US-SB-15-60 con conservador, la monitoreamos para saber el aumento que generaba en la muestra, llegando a una temperatura de 50 °C, esta temperatura ayudó en la reducción de hongos y levaduras que no pudo reducir el tratamiento de US-15-60 con baño de hielo que regulaba la temperatura a -5 °C, y que sólo generó reducción en la carga de bacterias, sin embargo, es importante mencionar que al no utilizar potencias tan elevadas y tiempos tan prolongados de sonicación, se utiliza menor consumo de energía suministrada y un proceso más rápido de conservación.

Es importante mencionar que el tratamiento US-15-60 brindó una reducción de bacterias del 95.87%; sin embargo, el tratamiento US-SB-15-60-SC brindó una reducción del 99.84 %, mientras que el tratamiento US-SB-15-60-CC presentó una reducción de carga de bacterias del 99.93%. Como podemos observar, los tratamientos presentaron valores similares en la reducción de bacterias. Estos diferentes tratamientos generaron cambios significativos en la reducción de hongos y levaduras presentes en el jugo de piña. Al aplicar el tratamiento US-15-60 se detectó una carga de hongos de 4.88 Log UFC/mL y de 5.24 Log UFC/mL de levaduras, por esta razón no se presentó el porcentaje de

reducción, pero al aplicar el tratamiento US-SB-15-60 SC se obtuvieron reducciones de 98.34 (2.54 Log UFC/mL) y 99.90 % (2.71 Log UFC/mL). Sin embargo, al adicionar benzoato de sodio al 0.1% en el tratamiento US-SB-15-60-CC se obtuvo un porcentaje de reducción del 100% en la carga de hongos y levaduras en comparación con el tratamiento US-SB-15-60 SC. Este comportamiento por parte del benzoato de sodio es porque se ha utilizado como un conservador para retardar el crecimiento de microorganismos patógenos en los alimentos. El benzoato de sodio es un ácido débil y su acción antimicrobiana se debe a la acumulación de protones y aniones dentro de la célula microbiana que altera el metabolismo normal, estando permitido en los productos alimenticios en niveles del 0.1 % (Musyoka *et al.*, 2018).

De acuerdo con lo mencionado, el tratamiento US-SB-15-60-CC genera una reducción del 100% en la carga microbiana del jugo de piña comercial de la Cuenca del Papaloapan. Sin afectar las características fisicoquímicas del jugo (°Brix, sólidos totales, pH, acidez, color), a excepción del contenido de vitamina C. El tratamiento sin baño de hielo lleva a la muestra a una temperatura de 50 °C, utilizando una potencia final de 15 W, amplitud de 60% (72 μm) y un tiempo de 15 min, requiriendo así una energía suministrada de 15 KJ. Estas condiciones son mínimas a las aplicadas en las investigaciones mencionadas; sin embargo, nuestro tratamiento brinda una reducción microbiana aceptable.

7.3.6 Eficiencia de las cápsulas adicionadas al jugo de piña tratado por US-SB-15-60-CC

Después de evaluar el tratamiento US-SB-15-60-CC, se llevó a cabo la adición de las cápsulas (30 % de AHB, en agua con 1 % de alginato, y 1 % de Tween 20) al jugo de piña previamente tratado por el tratamiento US-SB-15-60-CC establecido. El jugo tratado por ultrasonido y adicionado con cápsulas de alginato al 1% fue almacenado por un mes a una temperatura de 4 °C. Posteriormente, se evaluó la eficiencia de encapsulación de las cápsulas adicionadas al jugo. En la Tabla 7.11 se aprecia un cambio significativo en la evaluación de la eficiencia de encapsulación de las cápsulas almacenadas por un mes en jugo de piña tratado por ultrasonido con respecto al testigo (cápsulas de alginato al 1% almacenadas en agua destilada).

Tabla 7.11 Eficiencia de encapsulación en cápsulas almacenadas en jugo de piña tratado por US-SB-15-60-CC.

Fórmula	Eficiencia de encapsulación %
A 1 % almacenado en agua	96.17±0.65 ^b
A 1 % almacenado en Jugo tratado	99.66±0.05 ^a

Los valores reportados son la media \pm error estándar (n = 2). En la misma columna, las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Esto es por la conformación del alginato, debido a que este compuesto está conformado por monómeros de ácido gulónico y ácido manurónico, y al momento de presentarse la reticulación, sus grupos carboxilos de diferentes cadenas se unen selectivamente a través de una interacción iónica con cationes divalentes como el Ca^{+2} , formando regiones tridimensionales ordenadas (Łętocha *et al.*, 2022). Se ha mencionado que los bloques de ácido gulónico tienden a tener mayor afinidad por los cationes divalentes, por lo que los alginatos con un alto nivel de este ácido son los mejores para formar geles más rígidos y menos propensos a la erosión. En la Tabla 7.11 podemos observar la variación entre las muestras, esta variación podría corresponder a factores como el manejo de las muestras o debido a que los alginatos pueden presentar propiedades de hinchamiento, debido a su sensibilidad al pH y la fuerza iónica. Ya que las cápsulas tienden a ser estables en medios ácidos con pH por debajo de 4.5, pero se comienzan a hinchar en medios alcalinos con pH de 7 a 7.5 y luego se rompen. De acuerdo con Acarturk y Takka, (1999), quienes realizaron un estudio sobre la liberación de un fármaco encapsulado en alginato, reportaron que al poner las cápsulas en soluciones tampón de fosfato a pH de 7.5 se generaba la ruptura de las cápsulas, debido a la repulsión electrostática entre los iones carboxilatos o bien debido al secuestro de los iones de calcio reticulantes por grupos fosfatos. Esto sugiere que las cápsulas de alginato de calcio no se desintegran en el estómago, pero sí en flujos intestinales simulados (Acarturk y Takka, 1999; Lee *et al.*, 2023).

En la literatura existen estudios sobre la adición de cápsulas en algunos alimentos. Sin embargo, la evaluación por parte de estos estudios va más a observar las características sensoriales de la matriz alimentaria y no con respecto a la estabilidad de las cápsulas, por lo que hacen falta más datos experimentales para predecir su estabilidad en condiciones de procesamiento industrial. En los estudios de investigación se encuentra el realizado por Kaur *et al.*, (2020), donde estudiaron la vida útil de una galleta adicionada con α -tocoferol y aceite de germen de trigo encapsulado en alginato al 1.5%. Reportando que obtuvieron una eficiencia de encapsulación de 55.97% antes de adicionar las cápsulas a la matriz alimentaria, pero no se evaluó después de obtener el producto final, debido a que su objetivo fue evaluar la humedad, desarrollo de ácidos grasos libres, actividad antioxidante, recuento total en placa, retención de vitamina E en la galleta, valor de peróxido y aceptabilidad general. En otro estudio realizado por Heck *et al.*, (2018), evaluaron la estabilidad oxidativa de hamburguesas con aceite de chía y extracto de romero encapsulados en alginato, reportando que el aceite de chía y el extracto encapsulados fueron utilizados para sustituir el 50% de grasa en las hamburguesas. Mencionando que, gracias a la adición de las cápsulas, la matriz alimentaria mostró mayor estabilidad oxidativa después de la cocción.

Con nuestra investigación se pudo reafirmar que el ultrasonido sí es una tecnología que se puede aplicar como un método de conservación y al actuar en conjunto con un conservador como el benzoato de sodio, se puede generar una reducción microbiana del 100% en alimentos como el jugo de piña, sin

generar cambios elevados en los parámetros fisicoquímicos y que al adicionar en la matriz alimentaria tratada por ultrasonido encapsulados de AHB, la matriz no afectó la eficiencia de encapsulación en un almacenamiento de un mes.

8 CONCLUSIONES

Las diferentes formulaciones de emulsiones no presentan diferencias significativas en la mayoría de las características descritas y presentaron una eficiencia por arriba del 90%. Sin embargo, las cápsulas obtenidas de las emulsiones con jugo de piña presentaron degradación debido a la inestabilidad del alginato a pH ácido con respecto a su formación. Las cápsulas obtenidas de las emulsiones con agua presentaron estabilidad en su forma posterior a su proceso de GIE. Sin embargo, el comportamiento reológico de las emulsiones al 2% ocasionó obstrucciones en el sistema, alterando el proceso de encapsulación (principalmente en el flujo másico de la alimentación de las emulsiones) y en el rendimiento del proceso. Por lo tanto, se decidió seleccionar la emulsión A 1% (alginato al 1% en agua) para la elaboración de las cápsulas, debido a que esta formulación permite obtener mayor contenido de cápsulas en g/min. Al seleccionar esta formulación, nos permitió obtener cápsulas estables, las cuales se añadieron al jugo de piña para su enriquecimiento.

Los tratamientos de ultrasonido con baño de hielo aplicados al jugo de piña, no generaron cambios en las propiedades fisicoquímicas (°Brix, sólidos totales, pH, acidez y color) del jugo. De los seis tratamientos aplicados, los tratamientos que no generaron cambios en el contenido de vitamina C fueron US-15-40, US-30-40 y US-15-60. En cuanto a los análisis microbiológicos, los tratamientos no afectaron la carga de hongos y levaduras del jugo de piña, pero sí lograron reducir la carga de bacterias aerobias, a excepción de los tratamientos US-15-40 y US-30-40. Los demás tratamientos se comportaron de manera similar a un proceso de pasteurización convencional (65 °C, 30 min). Esto está asociado al efecto que genera la cavitación en las diferencias estructurales de los microorganismos evaluados (bacterias aerobias, hongos, levaduras). De acuerdo con los resultados microbiológicos, se seleccionó el tratamiento US-15-60 debido a sus ventajas: la energía suministrada, tiempo de proceso, amplitud y reducción microbiológica en bacterias aerobias. Sin embargo, al no afectar la carga de hongos y levaduras del jugo de piña, se implementó la aplicación del tratamiento US-15-60 sin baño de hielo y la adición de benzoato de sodio (US-SB-15-60-CC) al jugo de piña. El tratamiento US-SB-15-60-CC no generó cambios en los parámetros fisicoquímicos, pero sí una disminución en el contenido de vitamina C. Mientras que en la carga microbiana el tratamiento US-SB-15-60-CC presentó una reducción de bacterias del 99.93%, mientras que en la carga de hongos y levaduras generó una reducción del 100%.

Al tener un tratamiento de ultrasonido ya establecido, se adicionaron las cápsulas de AHB al 1% de alginato al jugo de piña previamente tratado y se almacenó por un mes para evaluar el efecto generado por parte de la matriz alimentaria en la eficiencia de encapsulación de las cápsulas. Se observó que durante el tiempo de almacenamiento de un mes, la matriz alimentaria ácida (jugo de piña tratado por US-SB-15-60-CC) no generó un efecto en la eficiencia de encapsulación, ya que las cápsulas tienden a ser estables en medios ácidos con pH por debajo de 4.5, pero se comienzan a hinchar en medios

alcalinos con pH de 7 a 7.5 y luego se rompen, esto debido a la repulsión electrostática entre los iones carboxilatos o bien debido al secuestro de los iones de calcio reticulados.

De acuerdo con la investigación realizada por parte del grupo de investigación, el tratamiento US-SB-15-60-CC es apto para ser aplicado en el jugo de piña, sin generar cambios en sus parámetros fisicoquímicos y generando la reducción de microorganismos presentes en el jugo de piña. Además, el jugo de piña tratado por US-SB-15-60-CC es apto para ser enriquecido por medio de la adición de cápsulas con aceite de hígado de bacalao en alginato al 1%, sin afectar la eficiencia de encapsulación de las cápsulas almacenadas por un mes en la matriz alimentaria. Sin embargo, es importante mencionar que hacen falta más datos experimentales para predecir la estabilidad en condiciones de procesamiento industrial del jugo de piña tratado por US-SB-15-60-CC, así como la estabilidad de las cápsulas adicionadas a la matriz alimentaria.

9 Perspectivas

- Evaluar la vida de anaquel del jugo de piña tratado por el tratamiento US-SB-15-60-CC en un tiempo de almacenamiento de un mes (5, 10, 15, 20, 25 y 30 días) a una temperatura de 4 °C, sobre las propiedades fisicoquímicas (pH, sólidos solubles, color, acidez titulable, contenido de ácido ascórbico) del jugo de piña. De igual manera, evaluar las características microbiológicas del jugo de piña tratado.
- Determinar el contenido de AHB en las cápsulas almacenadas en el jugo de piña tratado por US-SB-15-60-CC. A sí mismo, determinar el tamaño de partícula y el perfil de ácidos grasos después del almacenamiento.
- Estudiar la liberación del AHB en un sistema de digestión simulado.

10 REFERENCIAS

- Abid, M., Jabbar, S., Wu, T., Hashim, MM, Hu, B., Lei, S., ... y Zeng, X. (2013). Efecto del ultrasonido en diferentes parámetros de calidad del jugo de manzana. *Sonoquímica ultrasónica*, 20 (5), 1182-1187.
- ABIOLA, S., Akinmadeyemi, A. S., Ajatta, M. A., & Aworh, C. O. (2018). Influence of chemical preservatives on quality attributes of orange juice. *Croatian journal of food science and technology*, 10(1), 8-15.
- Acarturk, F. Ü. S. U. N., & Takka, S. E. V. G. İ. (1999). Calcium alginate microparticles for oral administration: II: effect of formulation factors on drug release and drug entrapment efficiency. *Journal of microencapsulation*, 16(3), 291-302: <https://doi.org/10.1080/026520499289022>
- Acartürk, F., & Takka, S. (1999). Calcium alginate microparticles for oral administration: II. Effect of formulation factors on drug release and drug entrapment efficiency. *Journal of microencapsulation*, 16(3), 291–301. <https://doi.org/10.1080/026520499289022>
- Aldana, A.S., Sandoval, E.R., y Aponte, A.A. (2004). Encapsulación de Aditivos para la Industria de Alimentos. *Ingeniería y competitividad*, 5(2), 73-83.
- Ali, M.M., Hashim, N., Abd Aziz, S., y Lasekan, O. (2020). Pineapple (Ananas comosus): A comprehensive review of nutritional values, volatile compounds, health benefits, and potential food products. *Food Research International*, 137, 109675.
- Aneja, K.R., Dhiman, R., Aggarwal, N.K., y Aneja, A. (2014). Emerging preservation techniques for controlling spoilage and pathogenic microorganisms in fruit juices. *International journal of microbiology*, 2014.
- Anzaldúa-Morales, A. (1994). *Evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y la práctica*.
- Asim, M., Abdan, K., Jawaid, M., Nasir, M., Dashtizadeh, Z., Ishak, M.R., y Hoque, M.E. (2015). A Review on Pineapple Leaves Fibre and Its Composites. *International Journal of Polymer Science*, 2015, 950567.
- Baba, A., Ocheni, A., Ochala, AU y Atiga, S. (2016). Comparación de la eficacia de varios conservantes en algunos zumos de frutas locales. *Natural Science*, 4 (5), 477-480.
- Benavides, S., Cortés, P., Parada, J., y Franco, W. (2016). Development of alginate microspheres containing thyme essential oil using ionic gelation. *Food chemistry*, 204, 77-83.
- Bermudez-Aguirre, D. (2017). Avances en termo y manotermosonicación para la inactivación microbiana. En *Ultrasonido: Avances para el procesamiento y conservación de alimentos* (pp. 15-37). Academic Press.
- Bhat, R., Kamaruddin, N. S., Min-Tze, L., & Karim, A. A. (2011). Sonication improves kasturi lime (Citrus microcarpa) juice quality. *Ultrasonics sonochemistry*, 18(6), 1295–1300. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2011.04.002>
- Bimbo, A. P. (2013). Sources of omega-3 fatty acids. In *Food enrichment with omega-3 fatty acids* (pp. 27-107). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1533/9780857098863.1.27>
- Bineesh, N. P., Singhal, R. S., & Pandit, A. B. (2005). A study on degradation kinetics of ascorbic acid in drumstick (Moringa olifera) leaves during cooking. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(11), 1953-1958.

- Bravo Lozano, M. (2005). Ensayo de estabilidad y caracterización de los atributos sensoriales del jugo de limón sutil (*Citrus aurantifolia*). <http://hdl.handle.net/11458/79>
- Cáceres, L.M., Velasco, G.A., Dagnino, E.P., y Chamorro, E.R. (2020). MICROENCAPSULATION of grapefruit oil with sodium alginate by gelation and ionic extrusion: Optimization and modeling of crosslinking and study of controlled release kinetics.
- Calvo, T.R.A., Perullini, M., y Santagapita, P.R. (2018). Encapsulation of betacyanins and polyphenols extracted from leaves and stems of beetroot in Ca (II)-alginate beads: A structural study. *Journal of Food Engineering*, 235, 32-40.
- Cannon, R.J., y Ho, C.-T. (2018). Volatile sulfur compounds in tropical fruits. *Journal of Food and Drug Analysis*, 26(2), 445-468.
- Castañón-Rodríguez, J.F., Soto-Gómez, M.G., y Uresti-Marín, R.M. (2020). Evaluation of the stability of orange juice capsules obtained by ionic gelation. *CienciaUAT*, 14(2), 117.
- Cedeño Ortiz, O. a., & Vera Ponce, j. j. (2017). *Determinación del tipo de preservante apto para la preservación del jugo de zanahoria* (Doctoral dissertation).
- Chemat, F., y Khan, MK (2011). Aplicaciones del ultrasonido en la tecnología de alimentos: procesamiento, conservación y extracción. *Sonoquímica ultrasónica*, 18 (4), 813-835. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2010.11.023>
- Cordero Madrigal, R. (2023). Evaluación del impacto de la sonicación sobre los micronutrientes y el color del jugo de piña (*Ananas comosus*) pulposo.
- Cordinación de Comunicación Social del Gobierno del Estado de Oaxaca (s. f.). Incrementa Oaxaca producción anual de piña, ocupa 2º lugar nacional. <https://www.oaxaca.gob.mx/comunicacion/incrementa-oaxaca-produccion-anual-de-pina-ocupa-2o-lugar-nacional/#:~:text=La%20entidad%2C%20del%202012%20a,con%20el%20Atlas%20Agroalimntario%202018>.
- Delgado, J.O. (2012a). Aplicación del Ultrasonido en la Industria de los Alimentos. *Publicaciones e Investigación*, 6, 141-152.
- Delgado, J.O. (2012b). Application of Ultrasound in the Food Industry.
- Departamento de Estudios y Proyectos (1983). Piña en almíbaro en jugo.
- Díaz-Montes, E., Cerón-Montes, G.I., y Vargas-León, E.A. (2023). Encapsulación de compuestos bioactivos: una revisión sistemática. *Pädi Boletín Científico de Ciencias Básicas e Ingenierías del ICBI*.
- Dyck, M.C., Ma, D.W.L., y Meckling, K.A. (2011). The anticancer effects of Vitamin D and omega-3 PUFAs in combination via cod-liver oil: One plus one may equal more than two. *Medical Hypotheses*, 77(3), 326-332.
- e Silva, K.F.C., da Silva Carvalho, A.G., Rabelo, R.S., y Hubinger, M.D. (2019). Sacha inchi oil encapsulation: Emulsion and alginate beads characterization. *Food and bioproducts processing*, 116, 118-129.
- Earnshaw, RG, Appleyard, J., y Hurst, RM (1995). Comprensión de los procesos de inactivación física: oportunidades de conservación combinadas mediante calor, ultrasonido y presión. *Revista internacional de microbiología de alimentos*, 28 (2), 197-219.
- Elsebaie, E.M., Kassem, M.M., Mousa, M.M., Basuony, M.A.M., Zeima, N.M., y Essa, R.Y. (2022). Cod Liver Oil's Encapsulation into Sodium Alginate/Lupin Protein Beads and Its Application in Functional Meatballs' Preparation. *Foods*, 11(9).
- Gacesa, P. (1988). Alginates. *Carbohydrate Polymers*, 8(3), 161-182.
- Gómez, J. (1999). *Métodos de estudio de vida de anaquel de los alimentos*.
- Heck, R. T., Lucas, B. N., Dos Santos, D. J. P., Pinton, M. B., Fagundes, M. B., de Araújo Etchepare, M., ... & Campagnol, P. C. B. (2018). Oxidative stability of burgers containing chia oil microparticles enriched with rosemary by green-extraction techniques. *Meat Science*, 146, 147-153. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.08.009>

- Helgerud, T.; Gåserød, O.; Fjæreide, T.; Andersen, P.O.; Larsen, C.K. Alginates. In Food Stabilisers, Thickeners and Gelling Agents; John Wiley & Son: Hoboken, NJ, USA, 2009; pp. 50–72
- Hossain, M.A., y Rahman, S.M.M. (2011). Total phenolics, flavonoids and antioxidant activity of tropical fruit pineapple. *Food Research International*, 44(3), 672-676.
<https://doi.org/10.1155/2018/8410747>
- Huang, G., Chen, S., Dai, C., Sun, L., Sun, W., Tang, Y., Xiong, F., He, R., y Ma, H. (2017). Effects of ultrasound on microbial growth and enzyme activity. *Ultrasonics Sonochemistry*, 37, 144-149.
- Ibarra, E.O., Ramírez, G.H., y Ibarra, I.H.O. (2021). Composición nutricional y compuestos fitoquímicos de la piña (Ananas comosus) y su potencial emergente para el desarrollo de alimentos funcionales. *Boletín de Ciencias Agropecuarias del ICAP*, 7(14), 24-28.
- Jambrak, A.R., Šimunek, M., Evačić, S., Markov, K., Smoljanić, G., y Frece, J. (2018). Influence of high power ultrasound on selected moulds, yeasts and Alicyclobacillus acidoterrestris in apple, cranberry and blueberry juice and nectar. *Ultrasonics*, 83, 3-17.
- Jingfei, G., y HP Vasantha, R. (2012). Calidad nutricional, fisicoquímica y microbiana de mezclas de jugo de manzana y zanahoria tratadas con ultrasonido. *Food and Nutrition Sciences*, 2012 .
- Kaur, K., Singh, J., & Singh, V. (2020). Effect of encapsulated vitamin E on physical, storage and retention parameters in cookies. *Journal of food science and technology*, 57(9), 3509–3517.
<https://doi.org/10.1007/s13197-020-04386-6>
- Kurozawa, L.E., Terng, I., Hubinger, M.D., y Park, K.J. (2014). Ascorbic acid degradation of papaya during drying: Effect of process conditions and glass transition phenomenon. *Journal of Food Engineering*, 123, 157-164.
- Ledesma, S.C. (2006). *Uso de ultrasonido como técnica alternativa en la desinfección de vegetales* Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, campus Estado de México
- Lee, DW, Hwang, SJ, Park, JB y Park, HJ (2003). Preparación y características de liberación de microesferas de alginato recubiertas y mezcladas con polímeros. *Journal of Microencapsulation*, 20 (2), 179-192. <https://doi.org/10.3109/02652040309178060>
- León Moreno, M. (2017). Evaluación de eficiencia de dos marcas diferentes de benzoato de sodio en zumo de naranja sobre pruebas microbiológicas.
- Łętocha, A., Miastkowska, M., & Sikora, E. (2022). Preparation and Characteristics of Alginate Microparticles for Food, Pharmaceutical and Cosmetic Applications. *Polymers*, 14(18), 3834.
<https://doi.org/10.3390/polym14183834>
- Loewus, FA (1999). Biosíntesis y metabolismo del ácido ascórbico en plantas y de análogos del ácido ascórbico en hongos. *Fitoquímica*, 52 (2), 193-210.
- Luna, R.D.J.N. (2015). *Efecto del ultrasonido sobre las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas en una mezcla de jugo de piña (Ananas Comosus), carambola (Averrhoa Carambola L.) y pomelo (Citrus Grandis)*. Unpublished Tesis Ingeniería en Alimentos. Universidad del Papaloapan, San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca.
- Maldonado, M., Aguilar, C., Carvajal, F., González, G., y Klotz, B. (2011). Aproximación al mecanismo de inactivación de Escherichia coli por ondas de ultrasonido de alta intensidad. *Alimentos Hoy*, 20(24), 53-68.
- Martinez-Padilla, L.P. (2022). Tratamiento de datos de alimentos fluidos para la determinación experimental de viscosidad. *Educación química*, 33(3), 21-32.
- McCabe, B.J. (2003). Dietary counseling to prevent food-drug interactions. In *Handbook of Food-Drug Interactions* (pp. 295-324): CRC Press, Boca Raton, FL.

- Ministerio de economía familiar comunitaria, c.y.a. (s. f.). Cartilla del cultivo de piña In (pp. 19).
- Morga Hernandez, J., y Cruz, B., Jose A. (2014). El cultivo de la piña (Ananas comosus)(L) Merr. en el sur d México.
- Musyoka, J. N., Abong', G. O., Mbogo, D. M., Fuchs, R., Low, J., Heck, S., & Muzhingiri, T. (2018). Effects of acidification and preservatives on microbial growth during storage of orange fleshed sweet potato puree. *International journal of food science*, 2018(1), 8410747.
- Nevárez-Moorillón, GV, Prado-Barragan, A., Martínez-Hernández, JL, & Aguilar, CN (Eds.). (2020). *Microbiología y biotecnología de alimentos: producción segura y sostenible de alimentos*. CRC Press.
- Niño-Vásquez, I.A., Muñiz-Márquez, D., Ascacio-Valdés, J.A., Contreras-Esquivel, J.C., Aguilar, C.N., Rodríguez-Herrera, R., y Flores-Gallegos, A.C. (2022). Co-microencapsulation: a promising multi-approach technique for enhancement of functional properties. *Bioengineered*, 13(3), 5168-5189.
- Nonga, H.E., Simforian, E.A., y Ndabikunze, B.K. (2014). Assessment of physicochemical characteristics and hygienic practices along the value chain of raw fruit juice vended in Dar es Salaam City, Tanzania. *Tanzania journal of health research*, 16(4).
- o en su Jugo In *bancomext*.
- Ocampo Vásconez, M. E., & Saquinga Sangoquiza, L. M. (2016). *Parámetros óptimos de pasteurización para la preservación de calidad del zumo y jugo de naranja, de las variedades valencia y nacional (citrus sinensis) en la Universidad Estatal de Bolívar* (Bachelor's thesis, Universidad Estatal de Bolívar. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Recursos Naturales y del Ambiente. Escuela Ingeniería Agroindustrial).
- Ortiz-Romero, N., Ochoa-Martínez, L.A., González-Herrera, S.M., Rutiaga-Quiñones, O.M., y Gallegos-Infante, J.A. (2021). Advances in Research into Encapsulation through Ionic Gelation: A Systematic Review. *Tecnológicas*, 24(52), 262-280.
- Parra Huertas, R.A. (2010). Revisión: microencapsulación de alimentos. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 63(2), 5669-5684.
- Piyasena, P., Mohareb, E., y McKellar, R. (2003). Inactivation of microbes using ultrasound: a review. *International journal of food microbiology*, 87(3), 207-216.
- Pupiales Nazaty, E. D. (2021). *Incidencia de la pasteurización lenta en la capacidad antioxidante hidrosoluble, calidad microbiológica y las propiedades físico químicas del jugo del limón meyer citrus meyeri y. tan* (Bachelor's thesis).
- Rabie, M. A., Soliman, A. Z., Diaconeasa, Z. S., & Constantin, B. (2015). Effect of pasteurization and shelf life on the physicochemical properties of Physalis (P hysalis peruviana L.) Juice. *Journal of Food Processing and Preservation*, 39(6), 1051-1060.
<http://dx.doi.org/10.1111/jfpp.12320>
- Rani, S., Nasir, JA, Ayub, M., Shahni, U., y Zeb, A. (2018). 13. Estudio sobre la estabilidad durante el almacenamiento del jugo de uva conservado con benzoato de sodio, sorbato de potasio y metabisulfito de potasio. *Pure and Applied Biology (PAB)* , 7 (1), 103-111.
<http://dx.doi.org/10.19045/bspab.2018.70013>
- Roobha, J.J., Saravanakumar, M., Aravindhan, K., y Devi, P.S. (2011). The effect of light, temperature, pH on stability of anthocyanin pigments in Musa acuminata bract. *Research in plant biology*, 1(5), 5-12.
- Ruiz-De Anda, D., Ventura-Lara, M. G., Rodríguez-Hernández, G., del Rosario Abraham-Juárez, M., & Ozuna, C. (2018). ESTUDIO DE LA APLICACIÓN DE ULTRASONIDOS DE POTENCIA EN LAS PROPIEDADES FÍSICAS DE UN JUGO MIXTO DE FRUTAS Y VEGETALES. *JÓVENES EN LA CIENCIA*, 4(1), 43-48.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (s. f.). Avance de Siembras y Cosechas resumen por estado. http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/ResumenProducto.do
- Shachman, M. (2004). *The soft drinks companion: a technical handbook for the beverage industry*. CRC Press.

- Sibaja, L. (2015). Evaluation of the effect of the application of emerging technologies (ultrasound and ultraviolet) on the physico-chemical, microbiological and sensory quality of cas juice (*Psidium friedrichsthalianum*)(Berg.) Niedz.) and coconut water (*Cocos nucifera* L.
- Starek, A., Kobus, Z., Sagan, A., Chudzik, B., Pawlat, J., Kwiatkowski, M., Terebun, P., y Andrejko, D. (2021). Influence of ultrasound on selected microorganisms, chemical and structural changes in fresh tomato juice. *Scientific Reports*, 11(1), 1-12.
- Tan, W.C., Muhialdin, B.J., y Meor Hussin, A.S. (2020). Influence of Storage Conditions on the Quality, Metabolites, and Biological Activity of Soursop (*Annona muricata*. L.) Kombucha. *Front Microbiol*, 11, 603481.
- Tiwari, B., Patras, A., Brunton, N., Cullen, P., y O'donnell, C. (2010). Effect of ultrasound processing on anthocyanins and color of red grape juice. *Ultrasonics Sonochemistry*, 17(3), 598-604.
- Tripathy, S., Verma, D.K., Thakur, M., Patel, A.R., Srivastav, P.P., Singh, S., Chávez-González, M.L., y Aguilar, C.N. (2021). Encapsulated food products as a strategy to strengthen immunity against COVID-19. *Frontiers in Nutrition*, 8, 673174.
- Tsukamoto, I., Yim, B., Stavarache, C. E., Furuta, M., Hashiba, K., & Maeda, Y. (2004). Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* by ultrasonic irradiation. *Ultrasonics sonochemistry*, 11(2), 61-65.
- Ulloa, J., Rosas, P., Ramírez, J., y Ulloa, B. (2013). Ultrasonido: aplicaciones en el campo de los alimentos. *Revista: Nueva Época. Nayarit. México*.
- Valenzuela B, A., Sanhueza C, J., y Nieto K., S. (2002). OXIDOS DEL COLESTEROL (OXISTEROLES): FACTORES QUE CONDICIONAN SU FORMACION, EFECTOS BIOLOGICOS, Y SU PRESENCIA EN LOS ALIMENTOS. *Revista chilena de nutrición*, 29, 116-124.
- Varvara, M., Bozzo, G., Celano, G., Disanto, C., Pagliarone, CN, & Celano, GV (2016). El uso del ácido ascórbico como aditivo alimentario: aspectos técnico-legales. *Revista italiana de seguridad alimentaria* , 5 (1).
- Vasavada, P.C. (2003). *Microbiology of fruit juice and beverages* (Vol. 4).
- Villareal, Y., Mejía, D.F., Osorio, O., y Ceron, A.F. (2013). Efecto de pasteurización sobre características sensoriales y contenido de vitamina C en jugos de frutas. *Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial*, 11(2), 66-75.
- Viresa. (2022). EL ULTRASONIDO: APLICACIONES EN LOS ALIMENTOS. In.
- Yang, S., Lin, R., Si, L., Li, Z., Jian, W., Yu, Q., y Jia, Y. (2019). Cod-Liver Oil Improves Metabolic Indices and hs-CRP Levels in Gestational Diabetes Mellitus Patients: A Double-Blind Randomized Controlled Trial. *J Diabetes Res*, 2019, 7074042.
- Zdrojewicz, Z., Chorbińska, J., Biezyński, B. y Krajewski, P. (2018). Health-promoting properties of pineapple. *Pediatrics i Medycyna Rodzinna*, 14(2), 133-142.
- Zeb, A., Ullah, I., Ahmad, A., Ali, K., y Ayub, M. (2009). Conservación de jugo de uva con benzoato y sorbato. *J Advance in Food Sci* , 31 (1), 17-21. https://www.researchgate.net/profile/Mohammad-Ayub/publication/362388320_GRAPE_JUICE_PRESERVATION_WITH_BENZOATE_AND_SORBATE/links/62e792d99d410c5ff37a1938/GRAPE-JUICE-PRESERVATION-WITH-BENZOATE-AND-SORBATE.pdf
- Zhang, H., Lu, S., Chen, L., Huang, X., Jiang, L., Li, Y., Liao, P., Wu, X., Zhou, X., Qin, L., Wei, J., y Huang, R. (2020). 2-Dodecyl-6-methoxycyclohexa-2,5-diene-1,4-dione, isolated from the root of *Averrhoa carambola* L., protects against diabetic kidney disease by inhibiting TLR4/TGF β signaling pathway. *Int Immunopharmacol*, 80, 106120.

ANEXO 1

Solución pectonada

Ingredientes	Cantidades
Peptona	1.0 g
Cloruro de sodio	8.5 g
Agua	1.0 L

Preparación de solución concentrada:

Disolver los componentes en 1 L de agua. Ajustar el pH a 7 ± 0.1 con hidróxido de sodio 1.0 N. Distribuir en porciones de 99, 90 y 9 mL o en cualquier volumen múltiplo de nueve según se requiera. Esterilizar a 121 ± 1.0 °C durante 15 min. Después de la esterilización, el pH y los volúmenes finales de la solución de trabajo deberán ser iguales a los iniciales. Si el diluyente no es usado al momento, almacenar en lugar oscuro a una temperatura entre 0 a 5° C por un tiempo no mayor de un mes, en condiciones tales que no alteren su volumen o composición.

Preparación de solución de trabajo:

Tomar 1.25 mL de la solución concentrada y llevar a un litro con agua (solución de trabajo). Distribuir en porciones de 99, 90 y 9 mL según se requiera. Esterilizar a 121 ± 1.0 °C durante 15 min. Después de la esterilización, el pH y los volúmenes finales de la solución de trabajo deberán ser iguales a los iniciales.

Preparación del medio estándar

Suspender 22.5 g del medio agar estándar/L. Poner en autoclave (15 min a 121 °C) con un pH: 7.0 ± 0.2 a 25 °C.

Preparación del medio agar papa-dextrosa

El medio de cultivo con instrucciones del fabricante se preparará y se esterilizará (15 min a 121 °C), posteriormente se enfriará en baño de agua a 45 ± 1 °C, acidificar a un pH de 3.5 ± 0.1 con ácido tartárico estéril al 10% (aproximadamente 1.4 mL de ácido tartárico por 100 mL de medio). Después se dejará solidificar una porción del medio. Es importante saber que no se debe calentar después de agregar el ácido tartárico.

Solución estéril de ácido tartárico al 10%.

Ingredientes	Cantidades
Acido tartárico	10.0 g
Agua destilada	100.0 mL

Preparación del ácido tartárico

Disolver el ácido en el agua y esterilizar a 121 ± 1.0 °C por 15 min o por filtración a través de membrana de 0.45 μm .