



TECNOLÓGICO  
NACIONAL DE MÉXICO®

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MEXICO  
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TEPIC



INFLUENCIA DE LA TERMOSONICACIÓN SOBRE COMPUESTOS  
BIOACTIVOS, INACTIVACIÓN ENZIMÁTICA Y MICROBIOLÓGICA EN NÉCTAR  
DE FRESA (*Fragaria ananassa*).

por:

**I.T.B. DALIA MARIEL SOTELO LARA**

TESIS PROPUESTA A LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E  
INVESTIGACIÓN

COMO REQUISITO PARCIAL PARA

OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS EN ALIMENTOS**

**Director:**

Dra. Rita María Estrada Velázquez

**Co- director:**

Dr. Genaro Gustavo Amador Espejo

Tepic, Nayarit


Febrero, 2022




Tepic, Nayarit, **27/enero/2022**  
**CONSEJO DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS EN ALIMENTOS**  
**No. Oficio CMCA 2022-01**


**M.C. Luz del Carmen Romero Islas**  
**JEFE DE LA DIV. DE EST. DE POSG. E INV.**  
**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TEPIC**  
**P R E S E N T E**

Por este conducto comunico a usted que el Consejo de la Maestría en Ciencias en Alimentos ha designado como revisores de la tesis del alumno **Dalia Mariel Sotelo Lara** con número de control **M20400001**, cuyo título es **“Influencia de la termosonicación sobre compuestos bioactivos, inactivación enzimática y microbiológica en néctar de fresa (*Fragaria ananassa*)”** a los miembros que a continuación se enlistan, mismos que han evaluado y aprobado el contenido del manuscrito para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Alimentos y que firman de conformidad.

  
Dr. Porfirio Gutiérrez Martínez  
(Vocal suplente)

  
Dr. Víctor Manuel Zamora Gasca  
(Vocal)

  
Dr. Genaro Gustavo Amador Espejo  
(Secretario)

  
Dra. Rita María Velázquez Estrada  
(Presidente)

Por lo anterior, le solicito se sirva elaborar los oficios correspondientes para **AUTORIZAR LA IMPRESIÓN DE TESIS**. Agradeciendo de antemano la atención prestada a la presente, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
*Excelencia en Educación Tecnológica®*  
Sabiduría Tecnológica Pasión de Nuestro Espíritu®

  
**Dra. Porfirio Gutiérrez Martínez**  
**Presidente del Consejo de Maestría en Ciencias en Alimentos**





**EDUCACIÓN**  
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO  
NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Tepic  
División de Estudios de Posgrado e Investigación

Tepic, Nayarit, **28/Enero/2022**

No. Oficio: 25-074-2022

Asunto: Constancia Originalidad de Trabajo de Tesis

**A QUIEN CORRESPONDA:**

Por medio de la presente se CERTIFICA que una vez analizado mediante el uso del Software PLAGIARISM v. 1740, el trabajo de tesis "INFLUENCIA DE LA TERMOSONICACIÓN SOBRE COMPUESTOS BIOACTIVOS, INACTIVACIÓN ENZIMÁTICA Y MICROBIOLÓGICA EN NÉCTAR DE FRESA (*Fragaria ananassa*)" para obtener el grado de Maestro (a) en Ciencias en Alimentos del C. I.T.B. DALIA MARIEL SOTELO LARA con numero de control **M20400001** cuenta con un nivel de **originalidad Aceptable** según lo definido en el Procedimiento para la Verificación de Originalidad, por lo cual se determina que no constituye un plagio.

Es importante mencionar que de los trabajos de tesis se publican artículos en revistas Indizadas y/o arbitradas por lo que las técnicas utilizadas son citadas frecuentemente.

Se extiende la presente para los fines que mejor convengan al interesado.

Sin más por el momento envío saludos cordiales

**ATENTAMENTE**

Excelencia en Educación Tecnológica®  
Sabiduría Tecnológica, Pasión de nuestro espíritu®



**MANUEL ANGEL URIBE VÁZQUEZ**  
DIRECTOR




OGTM/lcr

Ccp. Archivo DEPI



Av. Tecnológico #2595 Fracc. Lagos del Country C.P.63175 Tepic, Nayarit, Tel. 01 (311) 2119400  
y 2119401 e-mail: info@ittepic.edu.mx tecnm.mx | tepic.tecnm.mx



**2022 Flores**  
Año de Magón  
PRELUDIO DE LA REVOLUCIÓN MEXICANA



Instituto Tecnológico de Tepic  
División de Estudios de Posgrado e Investigación

Tepic, Nayarit, **31/enero/2022**  
No. Oficio: 25-091-2022  
Asunto: Autorización de impresión

**I.T.B. DALIA MARIEL SOTELO LARA  
CANDIDATO AL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS EN ALIMENTOS  
P R E S E N T E**

De acuerdo con los Lineamientos para la Operación de los Estudios de Posgrado en el Tecnológico Nacional de México y las disposiciones en este Instituto, habiendo cumplido con todas las indicaciones que la Comisión Revisora realizó con respecto a su Trabajo de Tesis titulado "INFLUENCIA DE LA TERMOSONICACIÓN SOBRE COMPUESTOS BIOACTIVOS, INACTIVACIÓN ENZIMÁTICA Y MICROBIOLÓGICA EN NÉCTAR DE FRESA (*Fragaria ananassa*)", la División de Estudios de Posgrado e Investigación de este Instituto, concede la Autorización para que proceda a la impresión del mismo.

Sin otro particular, quedo de Usted.



**ATENTAMENTE**  
*Excelencia en Educación Tecnológica*  
Sabiduría Tecnológica Pasión de Nuestro Espíritu.

SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA  
INSTITUTO TECNOLÓGICO  
DE TEPIC  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE  
POSGRADO E INVESTIGACIÓN

**M.C. LUZ DEL CARMEN ROMERO ISLAS  
JEFE DE DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

ccp. Coordinación de Maestría en Ciencias en Alimentos  
Archivo



### Detector de plagio v. 1921 - Informe de originalidad 25/01/2022 10:04:43 p.

Documento analizado: TESIS FINAL-DALIA SOTELO.pdf Licenciado para: Roberto Enriquez\_License2

Preajuste de comparación: Palabra a palabra Idioma detectado: Es

Tipo de verificación: Control de internet  
[tee\_and\_enc\_string] [tee\_and\_enc\_value]

Análisis detallado del cuerpo del documento:

Tabla de relaciones:

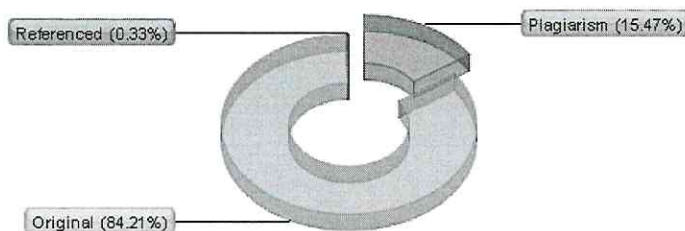


Gráfico de distribución:



Principales fuentes de plagio: 104

- 6% 1352 1. <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/19476337.2017.1321587>
- 5% 1176 2. [https://shsfeapi1.pdc-gate2.com/get\\_doc.php?id=6235/MTAuMTAxNi9qLnRpZnMuMjAxNi4xMS4wMjA=.txt](https://shsfeapi1.pdc-gate2.com/get_doc.php?id=6235/MTAuMTAxNi9qLnRpZnMuMjAxNi4xMS4wMjA=.txt)
- 5% 901 3. [https://shsfeapi1.pdc-gate2.com/get\\_doc.php?id=6390/MTAuMTAxNi9qLmZvb2RyZXMuMjAxNy4wNi4wMzZM=.txt](https://shsfeapi1.pdc-gate2.com/get_doc.php?id=6390/MTAuMTAxNi9qLmZvb2RyZXMuMjAxNy4wNi4wMzZM=.txt)

Detalles de recursos procesados: 236 - Okay / 30 - Ha fallado

Notas importantes:

Wikipedia:	Libros de Google:	Servicios de escritura fantasma:	Anti-trampa:

[uace\_headline]

[uace\_line1]  
[uace\_line2]  
[uace\_line3]  
[uace\_line4]  
[uace\_line5]

[uace\_line\_recommendation\_title]  
[uace\_line\_recommendation]

[uace\_abc\_stats\_header]



TECNOLÓGICO  
NACIONAL DE MÉXICO®

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MEXICO  
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TEPIC



DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN POSGRADO EN  
CIENCIAS EN ALIMENTOS

### **CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS**

En la ciudad de Tepic, Nayarit., el día 8 de febrero del 2022, el que suscribe Dalia Mariel Sotelo Lara alumno del Programa de Posgrado en Ciencias en Alimentos con número de control M20400001, manifiesto que todos los resultados derivados de mis estudios de posgrado, realizados bajo la dirección de la Dra. Rita María Velázquez Estrada, pertenecen al Instituto Tecnológico de Tepic, por lo que cedo los derechos de los mismos a este instituto con fines académicos e investigación. Así mismo manifiesto, que es de mi conocimiento que si estos resultados se originan patentes o publicaciones, participaré como coautor y de los beneficios que se deriven.

Atentamente

---

Dalia Mariel Sotelo Lara

EL PRESENTE PROYECTO FUE FINANCIADO POR TECNM, EL CUAL LLEVA  
POR NOMBRE **“INFLUENCIA DE LA TERMOSONICACIÓN SOBRE  
COMPUESTOS BIOACTIVOS, INACTIVACIÓN ENZIMÁTICA Y  
MICROBIOLÓGICA EN NÉCTAR DE FRESA (*Fragaria ananassa*)”**.

## DEDICATORIA

*A mis padres, Armando Sotelo e Ivoneé Lara,  
A mi hermana, Monserrat Sotelo,  
Por brindarme el amor más puro que existe.*



## AGRADECIMIENTOS

A mis padres y mi hermana por su amor y apoyo incondicional en cada una de mis etapas profesional y en cada caída, gracias por estar ahí, Dios me los guarde muchísimos años más.

A la Dra. Rita por ser una gran directora de tesis, tenerme una enorme paciencia y nunca dejarme sola en ninguna parte de mi proyecto durante estos dos años, por apoyarme y guiarme.

A mi codirector, el Dr. Genaro, por el interés que mostró hacia mi proyecto y que a pesar de la distancia jamás dejó de apoyarme.

Al Dr. Víctor por siempre estar dispuesto a ayudarme y ser una parte fundamental de este proyecto. Al Dr. Porfirio por su apoyo en este proyecto. Gracias a mi gran comité tutorial por ser unos excelentes tutores, personas y motivarme día a día.

A mis compañeros de maestría, en especial a Fernando por haberme brindado una gran amistad y por todo ese apoyo que tuvimos desde el primer día y aunque no resultó lo que me hubiera gustado, yo sé que vienen grandes cosas para ti, amigo.

A mi compañero de aventuras, Iván Castro, por apoyarme en todas mis decisiones y creer en mí cuando estaba a punto de rendirme, por estar en las buenas y en las malas, ser paciente cuando tenía trabajo todo el tiempo. Por caminar a mi lado a pesar de los momentos difíciles, por ese apoyo de ambos superarnos y lograr todos nuestros proyectos, por ser un gran equipo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada para la realización de la maestría.

## RESUMEN

Sotelo-Lara, Dalia Mariel. MCA. Instituto Tecnológico de Tepic. Enero de 2022. "INFLUENCIA DE LA TERMOSONICACIÓN SOBRE COMPUESTOS BIOACTIVOS, INACTIVACIÓN ENZIMÁTICA Y MICROBIOLÓGICA EN NÉCTAR DE FRESA (*Fragaria ananassa*)". Director: Velázquez-Estrada, Rita María.

Esta investigación tuvo como objetivo determinar el efecto del tratamiento de termosonicación sobre el contenido de compuestos bioactivos, inactivación enzimática y microbiológica en néctar de fresa (*Fragaria ananassa*) en comparación con un néctar tratado térmicamente procesado.

Se elaboró el néctar de fresa (14 °Bx y 40% pulpa), con diferentes porcentajes de pulpa/aquenio (0, 10 y 20%) obteniendo néctar: control, termosonicado y pasteurizado. Posteriormente se aplicaron los tratamientos de termosonicación (70 y 80%, 8 min, 50 °C) pasteurización (63 °C por 30 min) y se evaluaron parámetros fisicoquímicos (pH, sólidos solubles, acidez titulable), microbiológicos (mesófilos aerobios, enterobacterias, mohos y levaduras), enzimáticos (polifenoloxidasas y pectinmetilesterasa), fenoles solubles totales, ácido ascórbico, antocianinas, capacidad antioxidante y letalidad del tratamiento de termosonicación en *Escherichia coli* (ATCC 8739).

En el pH y °Brix de los néctares (control, termosonicados y pasteurizados) no se observaron diferencias significativas, mientras que en la acidez se observó un incremento ( $0.146 \pm 0.005$  a  $0.250 \pm 0.005$ ). En mesófilos aerobios, mohos y levaduras se observó una reducción en el recuento ( $3.263 \pm 0.177$  a  $1.983 \pm 0.215$  y  $3.143 \pm 0.159$  a  $1.913 \pm 0.104$  Log UFC/mL, respectivamente), mientras que no hubo detección en coliformes totales en ninguna de las muestras tratadas. Con respecto a las enzimas, en la polifenoloxidasas se observó poca actividad y en la pectinmetilesterasa ( $0.082 \pm 0.004$  a  $0.305 \pm 0.041$  UPME/mL) mostró diferencias entre el porcentaje de pulpa/aquenio agregado, pero con baja actividad. En relación a los fenoles solubles totales, ácido ascórbico, antocianinas y capacidad antioxidante se observó un aumento conforme se agregaban los diferentes porcentajes de pulpa/aquenio al néctar. Finalmente, el análisis de inactivación de *E. coli* mostró una reducción de 1 Log UFC/mL, lo cual no es suficiente para lograr el objetivo de La Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) para tratamientos de inactivación equiparables a pasteurización (Letalidad de 5 Log UFC/mL). Sin embargo, al almacenar la muestra de néctar sonicado se obtuvo un incremento de la letalidad ( $0.915 \pm 0.007$  a  $5.86 \pm 0.141$  Log UFC/mL). Al realizar una cinética de inactivación, en el minuto 20 de tratamiento se observó que se podría alcanzar una letalidad de 4.15 Log UFC/mL.

La termosonicación demostró ser una herramienta importante para el tratamiento de néctar de fresa ya que no mostró variaciones significativas en pH y °Brix, y presentó una mayor retención de compuestos bioactivos con la adición de pulpa/aquenio. Con la cinética y modelo al que se acopló, es necesario más de 20 minutos para lograr el objetivo de 5 Log UFC/mL.

**Palabras clave:** Termosonicación, néctar de fresa, compuestos bioactivos, inactivación.

## ABSTRACT

Sotelo-Lara, Dalia Mariel. MCA. Instituto Tecnológico de Tepic. January 2022. "INFLUENCE OF THERMOSONICATION ON BIOACTIVE COMPOUNDS, ENZYMATIC AND MICROBIOLOGICAL INACTIVATION IN STRAWBERRY NECTAR (*Fragaria ananassa*)". Director: Velázquez-Estrada, Rita María.

This research aimed to determine the effect of thermosonication treatment on the content of bioactive compounds, enzymatic and microbiological inactivation in strawberry nectar (*Fragaria ananassa*) in comparison with a thermally processed nectar.

Strawberry nectar (14 °Bx and 40% pulp) was elaborated, with different percentages of pulp/achene (0, 10 and 20%) obtaining nectar: control, thermosonicated and pasteurized. Subsequently, thermosonication treatments (70 and 80%, 8 min, 50 °C) pasteurization (63 °C for 30 min) were applied and physicochemical parameters (pH, soluble solids, titratable acidity), microbiological (aerobic mesophiles, enterobacteria, molds and yeasts), enzymes (polyphenoloxidase and pectinmethylesterase), total soluble phenols, ascorbic acid, anthocyanins, antioxidant capacity and lethality of thermosonication treatment in *Escherichia coli* (ATCC 8739).

In the pH and °Brix of the nectars (control, thermosonicated and pasteurized) no significant differences were observed, while in the acidity an increase was shown ( $0.146 \pm 0.005$  to  $0.250 \pm 0.005$ ). In aerobic mesophiles, molds and yeasts, a reduction in the count was decreased ( $3.263 \pm 0.177$  to  $1.983 \pm 0.215$  and  $3.143 \pm 0.159$  to  $1.913 \pm 0.104$  Log CFU/mL, respectively), while there was no detection in total coliforms in any of the treated samples. Regarding the enzymes, little activity was shown in polyphenol oxidase and in pectinmethyl esterase ( $0.082 \pm 0.004$  to  $0.305 \pm 0.041$  UPME/mL) differences were observed between the percentage of pulp/achene added, but with low activity. In relation to total soluble phenols, ascorbic acid, anthocyanins and antioxidant capacity, an increase was shown as the different percentages of pulp/achene were added to the nectar. Finally, the *E. coli* inactivation assay showed a reduction of 1 Log CFU/mL, which is not enough to meet the Food and Drug Administration (FDA) goal for comparable inactivation treatments. to pasteurization (Lethality of 5 Log CFU/mL). However, when storing the sonicated nectar sample, an increase in lethality was obtained ( $0.915 \pm 0.007$  to  $5.86 \pm 0.141$  Log CFU/mL). By performing inactivation kinetics, at minute 20 of treatment it was found that a lethality of 4.15 Log CFU/mL could be achieved.

Thermosonication appeared to be an important tool for the treatment of strawberry nectar since it did not show significant variations in pH and °Brix, and presented a greater retention of bioactive compounds with the reduction of pulp/achene. With the kinetics and model to which it was coupled, it takes more than 20 minutes to achieve the goal of 5 Log CFU/mL.

**Keywords:** thermosonication, strawberry nectar, bioactive compounds, inactivation.

## ÍNDICE

	Pág.
DEDICATORIA.....	I
AGRADECIMIENTOS .....	II
RESUMEN .....	III
ABSTRACT .....	IV
ÍNDICE DE CUADROS .....	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS .....	IX
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.....	11
CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES. ....	14
2.1. Generalidades de <i>Fragaria ananassa</i> . ....	14
2.1.1. Descripción general. ....	14
2.1.2. Compuestos bioactivos de <i>Fragaria ananassa</i> . ....	15
2.2. Bebidas de frutas y consumo. ....	16
2.2.1. Néctares. ....	17
2.3. Ultrasonido. ....	17
2.3.1. Generalidades del ultrasonido. ....	17
2.3.1.1. Cavitación. ....	18
2.3.1.2. Generación de radicales libres.....	19
2.3.1.3. Ultrasonido de alta y baja frecuencia. ....	19
2.3.1.4. Termosonicación.....	20
2.3.2. Efecto del ultrasonido en alimentos. ....	21
2.3.3. Efecto del ultrasonido sobre bebidas de frutas y verduras. ....	21
2.3.3.1. Efecto de la termosonicación en la inactivación microbiana. ....	23
2.3.3.2. Efecto de la termosonicación sobre microorganismos patógenos indicadores. ....	24
2.3.3.2. Efecto de la termosonicación sobre la inactivación enzimática. ....	25
2.3.3.3. Efecto de la termosonicación en los compuestos bioactivos. ....	27
CAPÍTULO 3. HIPÓTESIS. ....	30
CAPÍTULO 4. JUSTIFICACIÓN. ....	32

CAPÍTULO 5. OBJETIVOS. ....	34
5.1. Objetivo general. ....	34
5.2. Objetivos específicos. ....	34
CAPÍTULO 6. MATERIALES Y MÉTODOS. ....	36
6.1. Metodología. ....	36
6.1.1. Obtención del néctar de fresa. ....	37
6.1.3. Procesamiento del néctar de fresa por termosonicación y pasteurización. ....	38
6.2.1. Análisis físico químicos. ....	41
6.2.1.1. Determinación de pH. ....	41
6.2.1.2. Determinación de acidez titulable. ....	42
6.2.1.3 Determinación de sólidos solubles. ....	42
6.2.2. Análisis enzimáticos. ....	43
6.2.2.1. Polifenoloxidasasa (PPO). ....	43
6.2.2.2. Pectinmetilesterasa (PME). ....	43
6.2.3. Fenoles solubles totales. ....	44
6.2.3.1. Método de Folin-Ciocalteu. ....	44
6.2.4. Determinación de antocianinas. ....	44
6.2.5. Determinación de vitamina C (ácido ascórbico). ....	45
6.2.6. Capacidad antioxidante. ....	46
6.2.6.1. Método del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH). ....	46
6.2.6.2. Método de reducción de ion férrico por actividad antioxidante (FRAP). ....	46
6.2.6.3. Método del radical 2,2-azinobis 3-etilbenztiazolina-6-sulfónico (ABTS). ....	47
6.2.7. Análisis microbiológicos. ....	47
6.2.8. Inactivación de <i>Escherichia coli</i> por termosonicación. ....	48
6.2.8.1. Cinética de inactivación de <i>Escherichia coli</i> por termosonicación .	49
6.2.9. Análisis estadístico. ....	50
CAPÍTULO 7. RESULTADOS. ....	52

7.1. Efecto de la termosonicación en pH, sólidos solubles totales (°Brix) y acidez titulable.....	52
7.2. Efecto de la termosonicación en los recuentos microbianos.....	54
7.3. Efecto de la termosonicación en actividad enzimática. ....	56
7.4. Efecto de la termosonicación en los compuestos bioactivos. ....	61
7.4.1. Fenoles solubles totales. ....	61
7.4.2. Antocianinas. ....	63
7.4.3. Ácido ascórbico.....	64
7.4.4. Capacidad antioxidante (ABTS, DPPH y FRAP). ....	66
7.5. Efecto de la termosonicación en la inactivación de <i>Escherichia coli</i> . ....	69
7.5.2. Inactivación en néctar. ....	69
7.5.2. Inactivación en buffer PBS.....	71
7.5.3. Cinética de reducción de <i>Escherichia coli</i> .....	73
CAPÍTULO 8. CONCLUSIONES.....	80
CAPÍTULO 9. BIBLIOGRAFÍAS .....	82
CAPÍTULO 10. ANEXOS.....	105

## ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 2.1 Clasificación del ultrasonido .....	19
Cuadro 6.1 Estandarización del néctar .....	38
Cuadro 6. 2 Diseño experimental para análisis de termosonicación .....	40
Cuadro 6.3 Variables de respuesta .....	41
Cuadro 7.1 Efecto de la termosonicación sobre SST, pH y acidez titulable .....	53
Cuadro 7. 2 Efecto de la termosonicación en recuentos microbianos .....	56
Cuadro 7. 3 Efecto de la termosonicación en actividad enzimática.....	60
Cuadro 7.4 Efecto de la termosonicación en los compuestos bioactivos del néctar de fresa.....	62
Cuadro 7. 5 Efecto de la termosonicación en la capacidad antioxidante.....	68

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 2. 1 <i>Fragaria ananassa</i> . .....	14
Figura 2. 2 Fenómeno de cavitación.....	18
Figura 2.3 Factores externos / extrínsecos e intrínsecos que influyen en los resultados de la aplicación de ultrasonidos en jugos de frutas y verduras.....	22
Figura 2.4 Mecanismo de acción de polifenoloxidasas.....	27
Figura 6.1 Etapas del proyecto.....	37
Figura 7.1 Recuentos de <i>Escherichia coli</i> durante almacenamiento en refrigeración a 6 °C .....	72
Figura 7. 2 Recuentos de <i>Escherichia coli</i> en buffer fosfato pH 7.2 en almacenamiento a 6 °C .....	73
Figura 7. 3 Cinética de <i>Escherichia coli</i> .....	75
Figura 7. 4 Regresión lineal de letalidad .....	77
Figura 7. 5 Cinética en <i>E. coli</i> evaluada y predicha.....	78



## **CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN**

## CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

La fresa (*Fragaria ananassa*) es una de las frutas más populares de todo el mundo. Las fresas son muy perecederas, ya sea en su cosecha o almacenamiento, debido a sus propiedades fisiológicas se dañan rápidamente y, por lo tanto, se convierten en un objetivo abierto para las actividades enzimáticas (que causan cambios de calidad indeseables) y el crecimiento microbiano (Özkaya y cols., 2009). Por otro lado, el néctar de fresa es un producto muy consumido debido a su sabor, nutrientes esenciales y compuestos bioactivos que promueven la salud, como vitaminas, fibra, minerales y compuestos fenólicos que se han demostrado que pueden retrasar el envejecimiento, resistir al cáncer, y prevenir infecciones (Battino y cols., 2009).

El procesamiento de néctar de fresa incluye pasos que pueden influir en su sabor, compuestos bioactivos y propiedades nutricionales. La remoción de pulpa y aqúenio trae un producto clarificado, y la pasteurización térmica garantiza la inocuidad. Pero puede ser un factor negativo el remover estos componentes de la fresa (pulpa y aqúenio), debido a que el aqúenio es la parte de la fresa con el 81% de los antioxidantes (IFAPA, 2016).

La principal preocupación por los néctares de frutas frescos es la contaminación microbiana, especialmente por microorganismos tolerantes al ácido, que incluyen bacterias patógenas, como *Escherichia coli* que puede sobrevivir en condiciones ácidas (Aligiourchi y cols., 2014). Esta contaminación por microorganismos puede conducir eventualmente a la intoxicación alimentaria (Tournas, Heeres y Burgess, 2006; Ferrario, Alzamora y Guerrero, 2015;). Para garantizar la seguridad del jugo de frutas, es necesario cumplir con el estándar proporcionado por la FDA para reducir los 5 ciclos logarítmicos en la población de patógenos (Zoran, 2016). Algunas desventajas del procesamiento térmico de néctar de fresa son una reducción significativa en la capacidad antioxidante (18%), fenoles totales (22%), flavonoides (25%) y ácido ascórbico (36%) (Odriozola-serrano, Soliva-Fortuny y Martín- Belloso, 2008).

Teniendo en cuenta los efectos dañinos del procesamiento térmico convencional en néctares de frutas, se han sugerido, desarrollado e implementado tecnologías (alta presión hidrostática, microondas, irradiación, campos magnéticos) para minimizar la degradación de las biomoléculas nutricionales y activas (Velázquez-Estrada y cols., 2013; Jiménez-Sánchez y cols., 2015; Sasikumar, Pradhan y Deka, 2019).

El procesamiento de ultrasonido es una tecnología no térmica que ha sido efectiva en la inactivación de microorganismos y enzimas relacionadas con la degradación de los néctares de frutas (Rawson y cols., 2011). El ultrasonido se refiere a las ondas de presión que se propagan dentro de un medio con una frecuencia de 20 kHz o más (Butz y Tauscher, 2002). Los tratamientos de ultrasonidos dan como resultado la formación de microburbujas en el sistema alimenticio que eventualmente implica en un proceso llamado cavitación. La aplicación de ultrasonido y tratamiento térmico suave (entre 50-60 °C) ha dado lugar al procedimiento llamado termosonicación.

La innovación en las tecnologías de conservación de néctares de frutas se ha realizado en los últimos años para obtener el máximo rendimiento de todos los nutrientes presentes en frutas y cambios mínimos en el néctar como resultado del procesamiento y una de esas tecnologías de preservación es una tecnología de obstáculo emergente, el tratamiento térmico asistido por ultrasonido, la cual produce al néctar de frutas una calidad superior, retención máxima de fitonutrientes y alta aceptación de consumidores (Jabbar y cols., 2015; Anaya y cols., 2017;).

La termosonicación puede causar inactivación microbiana (Patil y cols., 2009). Además, varios estudios informaron que el procesamiento es beneficioso para mejorar el contenido de los compuestos bioactivos (por ejemplo, los fenoles totales, la vitamina C) y la actividad antioxidante en el néctar de fruta (Wang y cols., 2019). Por lo tanto, este estudio tuvo como objetivo determinar el efecto del tratamiento de la termosonicación en el contenido de los compuestos bioactivos, la inactivación enzimática y microbiológica en el néctar de fresa (*Fragaria Ananassa*) en comparación con un néctar tratado por proceso térmico convencional.

## **CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES**

## CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Generalidades de *Fragaria ananassa*

#### 2.1.1. Descripción general

La fresa o *Fragaria ananassa* (Figura 2.1), pertenece a la familia de las *Rosaceae* en el género *Fragaria*. Es originaria de las regiones templadas del mundo, la planta es de tipo herbáceo. Es pequeña, de no más de 50 cm de altura, con numerosas hojas originadas con una corona o rizoma muy corto que se encuentra a nivel del suelo y constituye la base de crecimiento de la planta. Su recolección es manual, debido a que la fruta es altamente susceptible al daño mecánico; debe cosecharse cada tres días y manejarse con mucho cuidado (SAGARPA, 2017).



Figura 2. 1 *Fragaria ananassa*.

En México el cultivo de la fresa se empezó con plantíos de variedades originadas en Lyon Francia en el estado de Guanajuato. Hacia finales de los años 80's la producción de fresa ya se había establecido en otros estados del país como Michoacán. Actualmente la fresa representa un mercado de casi 3 millones de toneladas métricas con un valor de exportación de más de 1 billón de dólares a nivel

mundial, donde México figura como el 8° productor (11,092 hectáreas sembradas en 2016) y 2° exportador (52.21% destinados a exportación) (SAGARPA, 2017).

Dentro de la República Mexicana, los primeros estados productores son Michoacán, Guanajuato y Baja California, donde el primero se considera la entidad con una mayor participación, ya que cuenta con el 51% de la superficie sembrada, el 55% en cosecha y el 52% en producción (SAGARPA, 2017).

### **2.1.2. Compuestos bioactivos de *Fragaria ananassa***

Las fresas poseen mayor actividad antioxidante que muchas frutas como la toronja, naranja, uva roja, kiwi. Se ha demostrado que los antioxidantes se encuentran en un 81% en las semillas (IFAPA, 2016).

Se destaca por su contenido de vitamina C, taninos, flavonoides, antocianinas, catequina, quercetina y kaempferol, ácidos orgánicos (cítrico, málico, oxálico, salicílico y elágico) y minerales (K, P, Ca y Mg), además de pigmentos y aceite esencial (da Silva-Pinto, Lajolo y Genovese, 2008). Estos compuestos presentes en la fresa tienen un potente poder antioxidante y ayudan a disminuir el riesgo de eventos cardiovasculares (Beattie, Crozier y Duthie, 2005). Por otra parte, se ha demostrado en varios sistemas experimentales la actividad anticancerígena de extractos de fresas, así como su bloqueo de iniciación de la carcinogénesis, y la supresión y la proliferación de tumores (Hannum, 2004). Estudios preliminares con animales indican que las dietas ricas en fresas también pueden tener el potencial para proporcionar beneficios para el envejecimiento cerebral (Olsson y cols., 2004).

La composición química de la fresa es de 89.6% de agua, 7% de hidratos de carbono, 0.7% de proteínas, 0.5% de lípidos y 2.2% de fibra. El contenido de azúcares en la fresa (de la porción comestible) es de 2.6% de glucosa, 2.3% de fructosa y 1.3% de sacarosa (Moreiras y cols., 2003).

## 2.2. Bebidas de frutas y consumo

Las bebidas se definen como todos aquellos líquidos que ingieren los seres humanos, incluida el agua (Rivera y cols., 2008). Según PROFECO (2018), en México el 27% consume bebidas de frutas naturales y el 69% lo prefiere envasado.

Existen diferentes bebidas a base de fruta entre las que se encuentran:

- Zumos: Sustancias totalmente líquidas extraídas de las frutas o verduras.
- Jugos: Líquidos de las frutas o verduras con un rastro poco perceptible de pulpa.
- Extractos: Sustancias obtenidas al pasar las frutas o verduras (normalmente con cáscara) por el extractor, con el que se consiguen los líquidos propios del insumo procesado.
- Batidos: Líquidos espesos con presencia de pulpa y predominio de elementos sólidos.
- Smoothies: Líquidos similares al batido, pero más espesos y cremosos. Suelen incluir un elemento frío, como el helado o el yogur.
- Frappés y frozens: Bebidas frías que contienen rastros considerables de hielo (en algunos casos más integrados que otros a la bebida). De textura espesa.
- Néctares: Se conoce así a preparaciones líquidas elaboradas con fruta cocida y, por lo general, licuada. Su consistencia depende de la cantidad de agua que se agregue, pero suele ser ligeramente espesa. Los néctares se oxidan más lentamente, y por ello se conservan en buen estado por más tiempo (Rivera y cols., 2018).

### **2.2.1. Néctares**

Por néctar de fruta se entiende el producto sin fermentar, pero fermentable, que se obtiene añadiendo agua con o sin la adición de azúcares de miel y/o jarabes y/o edulcorantes o a una mezcla de éstos. Podrán añadirse sustancias aromáticas, componentes aromatizantes volátiles, pulpa y células, todos los cuales deberán proceder del mismo tipo de fruta y obtenerse por procedimientos físicos. Un néctar mixto de fruta se obtiene a partir de dos o más tipos diferentes de fruta (CODEX STAN 247-2005).

Entre los ingredientes se destaca el uso de fruta (buena calidad y madurez completa), agua (potable y microbiológicamente aceptable), azúcar (se regula en función a los °Brix), ácido cítrico (regulador de acidez), estabilizador (evita la sedimentación) y conservadores para evitar el crecimiento microbiano (Pérez, 2015).

## **2.3. Ultrasonido**

### **2.3.1. Generalidades del ultrasonido**

Ultrasonido es el nombre que reciben las ondas de sonido con frecuencias mayores a aquellas que pueden ser detectadas por el oído humano. Es una de las tecnologías emergentes que se ha desarrollado para minimizar el tiempo de procesamiento, maximizar la calidad y garantizar la seguridad de los productos alimenticios. Se aplica para impartir efectos positivos en el procesamiento de alimentos, tales como la mejora en la transferencia de masa, conservación, análisis y reducción de la intensidad de los tratamientos térmicos y manipulación de la textura (Knorr y cols., 2011).



### 2.3.1.1. Cavitación

La cavitación se produce en las regiones de un líquido que se encuentran sometidas a presiones de variada amplitud de onda que alternan rápidamente. Las microburbujas que alcanzan un tamaño crítico implosionan o colapsan violentamente para volver al tamaño original. La implosión supone liberación de toda la energía acumulada, ocasionando incrementos de temperatura instantáneos y focales, que se disipan sin una elevación de temperatura sustancial del líquido tratado. La energía liberada y el choque mecánico asociadas al fenómeno de implosión afectan la estructura de los materiales situados en el microentorno. Cuando el ultrasonido pasa a través de un medio líquido, la interacción entre las ondas del ultrasonido, el líquido y el gas disuelto conduce a un fenómeno de excitación conocido como cavitación acústica (Figura 2.2), caracterizado por la generación y evolución de microburbujas en el medio líquido (Ulloa y cols., 2013).

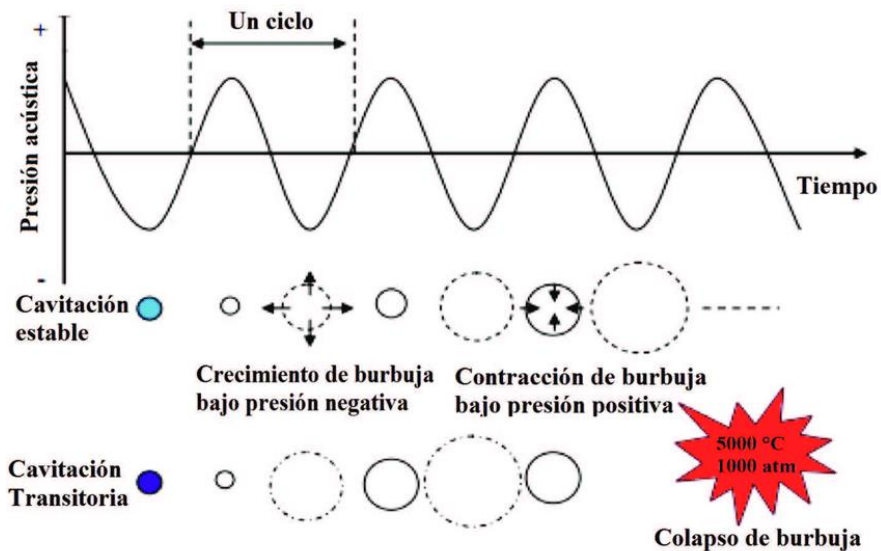


Figura 2. 2 Fenómeno de cavitación. (Fuente: Chen y cols., 2015)

### 2.3.1.2. Generación de radicales libres

La cavitación en líquidos puede ser tan intensa que se rompen las paredes celulares, se producen radicales libres y sonoquímicos. Una mayor actividad del agua significa la presencia de agua libre en el medio, lo que aumenta la producción de radicales libres debido a la destrucción de las moléculas de agua generadas por las ondas sonoras, aumentando la letalidad de los microorganismos. La sonólisis del agua puede producir iones (OH<sup>-</sup>) y (H<sup>+</sup>) y peróxido de hidrógeno, esto provoca la producción de radicales libres y la inactivación enzimática (Delgado, 2011).

### 2.3.1.3. Ultrasonido de alta y baja frecuencia

Dependiendo de los rangos de frecuencias utilizados, el ultrasonido se puede dividir en dos tipos: ultrasonido de baja intensidad y ultrasonido de alta intensidad (Ver cuadro 2.1).

Cuadro 2.1 Clasificación del ultrasonido

	Intensidad	Efecto
Ultrasonido	ALTA 18-100 kHz. Procesamiento o estabilización de alimentos	Rompimiento celular. Permeabilización de la membrana celular. Cambios estructurales y físico químicos. Homogeneización de emulsiones.
	BAJA >100 kHz. Diagnóstico, control de calidad, fenómenos de relajación	Ecografías. Aplicaciones terapéuticas.

Fuente: (Delgado, 2011).

En toda la industria, las aplicaciones de ingeniería del ultrasonido se dividen en dos categorías distintas: baja intensidad (también llamada alta frecuencia o "no destructiva"), y de alta intensidad (también llamado ultrasonido de baja frecuencia o "potencia") (Mason, 2003). Estas dos categorías difieren en el objetivo a alcanzar, la aplicación y la potencia y frecuencia ultrasónicas aplicadas. El objetivo del ultrasonido de baja intensidad suele ser identificar alguna sustancia invisible en un medio, mientras que el ultrasonido de alta intensidad generalmente se enfoca en alterar alguna parte de un medio o promover una reacción química.

Los principales parámetros del proceso que diferencian los dos tipos de ultrasonidos son la energía ultrasónica y la frecuencia. El ultrasonido de baja intensidad es de baja energía, con intensidades de potencia inferiores  $1 \text{ W / cm}^2$  y alta frecuencia de 1 a 10 MHz. Por lo tanto, el ultrasonido de baja intensidad también se denomina ultrasonido de alta frecuencia. El ultrasonido de alta intensidad es de alta energía con intensidades de potencia superiores a  $10 \text{ W / cm}^2$  y baja frecuencia de 10-100 kHz (Povey y Mason, 1998; McClements, 1995). El ultrasonido de alta intensidad también se conoce como ultrasonido de baja frecuencia.

#### **2.3.1.4. Termosonicación**

La termosonicación es una técnica novedosa y viable que se emplea para reemplazar el procesamiento térmico convencional. Puede aumentar las tasas de inactivación microbiana y enzimática, extender la vida útil del producto y reducir el impacto en el contenido nutricional y la calidad general en las bebidas de frutas y verduras. La evidencia científica muestra que la termosonicación es una tecnología viable, eficiente y confiable para el procesamiento de jugos de frutas y verduras que preservan la calidad, en comparación con el procesamiento térmico convencional (60 °C durante 30 min). El efecto entre el ultrasonido y el calor es potencial para asegurar la estabilidad del producto y también es eficaz para la inactivación de las enzimas presentes en los néctares. (Anaya y cols., 2017).

### **2.3.2. Efecto del ultrasonido en alimentos**

En años recientes se ha descubierto al ultrasonido como una herramienta para la tecnología de alimentos. El tipo de ultrasonido que se usa en aplicaciones alimenticias es más poderoso y a más bajas frecuencias que el usado en aplicaciones de diagnóstico. El ultrasonido puede utilizarse como una técnica de procesamiento de alimentos basada en procesos no térmicos que tiene el potencial de destruir microorganismos a temperaturas cercanas a la ambiental evitando cambios debidos al calor en: el sabor, color y valor nutricional del alimento. De igual manera puede encontrarse cambios enzimáticos y estructurales (Bermúdez, 2017).

### **2.3.3. Efecto del ultrasonido sobre bebidas de frutas y verduras**

Los resultados de la aplicación de ultrasonido en las bebidas de frutas y verduras dependen de factores externos / extrínsecos e intrínsecos, como se muestra en la figura 2.3. Los factores externos incluyen las condiciones ambientales y las características del equipo (temperatura, tiempo de procesamiento, potencia de ultrasonido, frecuencia y amplitud) y los factores intrínsecos dependen de las características y composición de la matriz. Después de la aplicación del ultrasonido, se pueden observar diferentes modificaciones a nivel microscópico de células y tejidos, como erosión de la superficie de las partículas y rotura celular, reducción de tamaño y cambios en la conformación molecular. Estos cambios conducen a diferentes mecanismos que resultan en una mejora de la estabilidad física, microbiana y enzimática (Rojas, Miano y Augusto, 2017).

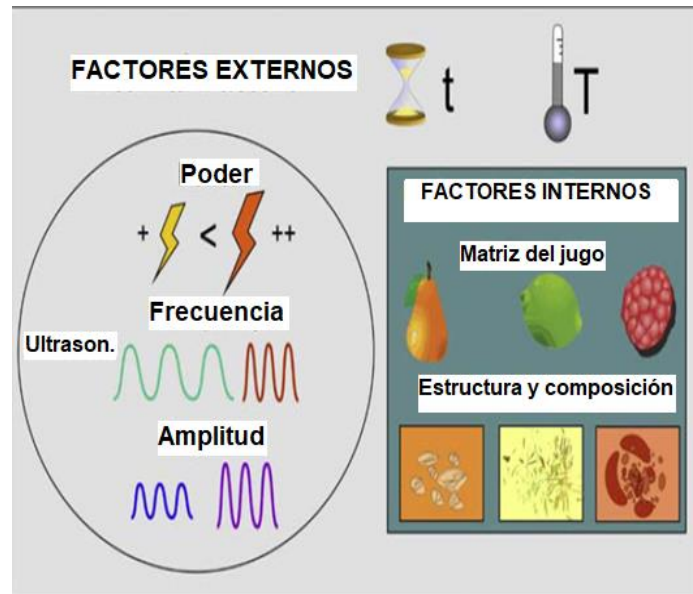


Figura 2. 3 Factores externos / extrínsecos e intrínsecos que influyen en los resultados de la aplicación de ultrasonidos en jugos de frutas y verduras (Fuente: Zhou y cols., 2010).

El principal impacto de la aplicación de ultrasonidos en las bebidas es a nivel estructural. Las bebidas de frutas y verduras se pueden considerar como sistemas polidispersos (Zhou y cols., 2010), compuestos por una fase insoluble (la fase dispersa o pulpa, que está compuesta por células de tejido de la fruta y sus fragmentos, y grupos y cadenas de polímeros insolubles) dispersos en una solución viscosa (el suero, que es una solución acuosa de los componentes intercelulares, como polisacáridos solubles, azúcares, sales y ácidos) (Augusto, Ibarz y Cristianini, 2012). Los cambios en la estructura de estos componentes se demostraron en función del tiempo de procesamiento del ultrasonido o la energía acústica suministrada a las muestras. La figura 2.3 muestra una representación de los cambios en ambas fases de las bebidas (células pulpaes y suero) procesadas con ultrasonido (basado en imágenes microscópicas ópticas) (Rojas, Miano y Augusto, 2017).

Existe un mecanismo interesante sobre cómo actúa el ultrasonido en diferentes pasos, dependiendo del tiempo de procesamiento. Primero, el movimiento de los compuestos intracelulares se observa cuando la estructura

interna de la célula pasa de un sistema altamente organizado a uno disperso. Posteriormente, el ultrasonido provoca la rotura de la pared celular en áreas localizadas, con probable entrada de agua y salida posterior de compuestos intracelulares, conservando la estructura de la pared celular. Finalmente, tiene lugar la mezcla de todas las estructuras rotas y compuestos internos (Rojas, Miano y Augusto, 2017).

El color es una de las propiedades sensoriales más importantes de los alimentos. El color también constituye una herramienta importante para determinar la calidad y las pérdidas nutricionales de los alimentos líquidos durante el procesamiento y / o almacenamiento posterior. La estabilidad del color durante el almacenamiento dependerá de las condiciones de almacenamiento (especialmente temperatura y luz). El ultrasonido puede mejorar la estabilización del color de muchos jugos, como el jugo de piña (Costa y cols., 2013) y el jugo de durazno (Rojas y cols., 2016) durante el almacenamiento.

#### **2.3.3.1. Efecto de la termosonicación en la inactivación microbiana**

Debido a la inactivación microbiana limitada del ultrasonido, se han realizado muchas investigaciones usando la termosonicación. La mayor parte de la investigación apunta a un efecto del calor en algunos sitios objetivo de la célula que aumenta la resistencia térmica en algunos microorganismos. Estos sitios son los, ribosomas, ácidos nucleicos, enzimas y proteínas (Earnshaw, Appleyard y Hurst, 1995). El tratamiento térmico actúa directamente sobre la membrana celular, debilitando esta importante barrera a las condiciones ambientales. Además, hay una pérdida de iones y nutrientes vitales para la célula (Mañas y Pagán, 2005).

Cuando la temperatura se aplica junto con ultrasonido (termosonicación) los microorganismos son menos resistentes debido a los efectos de la cavitación que debilitan la membrana celular más el efecto directo del calor sobre la membrana. La mayoría de los estudios reportados muestran una inactivación microbiana limitada

o nula cuando la temperatura es inferior a 50 °C. Sin embargo, cuando se aplica la temperatura como un tratamiento térmico suave (por encima de 50 °C), se mejora la inactivación celular (Bermúdez, 2017). La combinación de factores letales (calor y / o sonicación) ha demostrado acortar significativamente el tiempo de tratamiento necesario para lograr una reducción de 5 log en el recuento de supervivencia de *E. coli* K12 (Lee y cols., 2009). El tratamiento con ultrasonido con sonda a una temperatura de hasta 60 °C resultó en la mayor inactivación de células microbianas con menores pérdidas de ácido ascórbico, fenoles totales, flavonoides y flavonoles en jugo de manzana (Abid y cols., 2014).

### **2.3.3.2. Efecto de la termosonicación sobre microorganismos patógenos indicadores**

Los microorganismos indicadores sirven para evaluar las condiciones higiénicas bajo las cuales se ha elaborado un alimento. La presencia en los alimentos de algunos como *Escherichia coli*, sugiere que el alimento se contaminó con materia fecal. Los coliformes son microorganismos indicadores, en el sentido de que su presencia en el alimento sugiere una deficiencia sanitaria en su manejo (Fernández, 2000). *Escherichia coli*, también conocida como *E. coli*, es una bacteria que pertenece al género de las enterobacterias y al grupo de los coliformes fecales. Más específicamente, es una bacteria gram negativa de forma de bastón, que se dispone en forma de racimos, no forma esporas, es aerobia y anaerobia facultativa y reduce los nitratos a nitritos. Su crecimiento se puede dar en un rango de pH de 4.4 a 8.8 y a una temperatura desde los 9 °C hasta los 45 °C. *E. coli* fermenta la lactosa (termotolerante a 45°C de 24 a 48 h) produciendo indol a partir de triptófano, lo que la diferencia de otras bacterias. Sobrevive a las temperaturas de refrigeración y es bastante tolerante a la sal, la sequedad y la acidez, siendo más sensible al calor (Davis y Kendall, 2005).

Cuando *E. coli* se enfrenta a un estrés por acidez, su membrana exterior se daña debido a que es la que se encuentra en contacto directo con el medio. Por esta razón, la bacteria sufre adaptaciones físicas, que incluyen un cambio en la

composición de sus membranas mediante una disminución en su fluidez y permeabilidad. Esto se logra a causa de una reducción en los ácidos grasos insaturados y aumentando la concentración del ácido graso ciclopropano (Kanjee y Houry, 2013). Esta resistencia a la acidez es la que hace posible que *E.coli* pueda sobrevivir en bebidas de frutas ácidas.

Según la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, 2004) en su "Guía para la industria: jugos, análisis de peligros y puntos críticos de control (HACCP)", el propósito de cualquier tecnología es garantizar un producto estable y cumplir con las disposiciones de las agencias reguladoras para reducir al menos cinco ciclos logarítmicos de las bacterias objetivo (por ejemplo, *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes*). Debido a esto, algunos microorganismos patógenos y de descomposición se han identificado como de especial preocupación para la industria de los jugos de frutas (Anaya y cols., 2017).

Estudios demuestran que muestras de jugo de mango tratadas con sonicación a 60°C mostraron una reducción de aproximadamente 5 ciclos logarítmicos en *E. coli* O157:H7, después de 7 min (Kiang, 2012). Se puede recomendar la termosonicación continua a 50 °C que logró la reducción de 5 log de *E. coli* ATCC 25922 en jugo de morera negra (Dinçer y Topuz, 2015).

### **2.3.3.2. Efecto de la termosonicación sobre la inactivación enzimática**

La inactivación de las enzimas se atribuye a un efecto sinérgico entre el calor y el daño mecánico por termosonicación que provoca la desnaturalización de las proteínas por despolimerización y cambio en la conformación de su estructura terciaria, que se relaciona con la reducción de la actividad enzimática específica (Aadil y cols., 2015). El micro-flujo que se produce por sonicación puede interrumpir las interacciones de Van der Waals y los enlaces de hidrógeno en las cadenas polipeptídicas (Feng y cols., 2008). Los mecanismos de inactivación son específicos



de cada enzima y dependen de su composición de aminoácidos y su estructura conformacional (Islam, Zhang y Adhikari, 2014).

La polifenoloxidasas (PPO) es una enzima que se encuentra comúnmente en frutas y verduras y se considera que es la principal responsable del pardeamiento. La PPO es una enzima que contiene cobre, que cataliza la oxidación de compuestos monofenólicos a o-difenoles y compuestos o-dihidroxi a o-quinonas. Las o-quinonas experimentan reacciones de polimerización que conducen a la formación de pigmentos de color oscuro (Figura 2.4). Además, el pardeamiento enzimático también puede provocar un mal sabor y, en última instancia, reducir el valor nutricional y de mercado. Por tanto, la inhibición del pardeamiento enzimático es un esfuerzo importante en la industria alimentaria (McEvily, Iyengar y Otwell, 1992). Se han realizado estudios de termosonicación en extracto de hongos donde aplicando una temperatura de 55 °C a 75 °C por 5 segundos, se encontró que el tratamiento termosónico es más efectivo para inactivar la PPO en el extracto de hongos que un tratamiento térmico (Cheng, Zhang y Adhikari, 2013) y en jugo de arándano (Cao y cols., 2018).

Un problema común asociado a los jugos de fruta es la pérdida de turbidez, consistencia, separación de fases, decoloración y gelificación, provocada por enzimas pécticas, particularmente la enzima pectinmetilesterasa (PME), (Basak y Ramaswamy, 1996; Carbonell y cols., 2006). La PME se presenta de forma natural en plantas, reacciona con los grupos carboxilo de la pectina presente en la pared celular de los frutos, hidroliza los enlaces éster de la pectina presente en los jugos de fruta provocando la pérdida de turbidez que es atribuida a la suspensión de partículas como proteínas, pectinas, lípidos, hemicelulosas, celulosas y otros componentes minoritarios (Baker y Cameron, 1999). La PME provoca cambios importantes en las sustancias pécticas, carbohidratos, ácidos orgánicos, compuestos fenólicos y otros componentes que afectan las características sensoriales como color, aroma, sabor y textura (Willats y cols., 2001). La presencia de PME provoca que en las bebidas de estos frutos se formen dos fases, una de ellas clara en la parte superior y otra turbia en la parte inferior dejando un aspecto visible indeseado en el producto final. El proceso de ultrasonido en jugos de tomate

ha sido reportado con un mejoramiento en las propiedades reológicas por la reducción del tamaño de partículas y la inactivación de pectinmetilesterasa (Terefe y cols., 2009). Estudios comprueban que la actividad de enzimas endógenas del jugo de limón decrece cuando es utilizado el ultrasonido como método, logrando también una estabilidad de partículas suspendidas debido al daño mecánico de la estructura proteica de la PME (Kim, y cols., 2001).

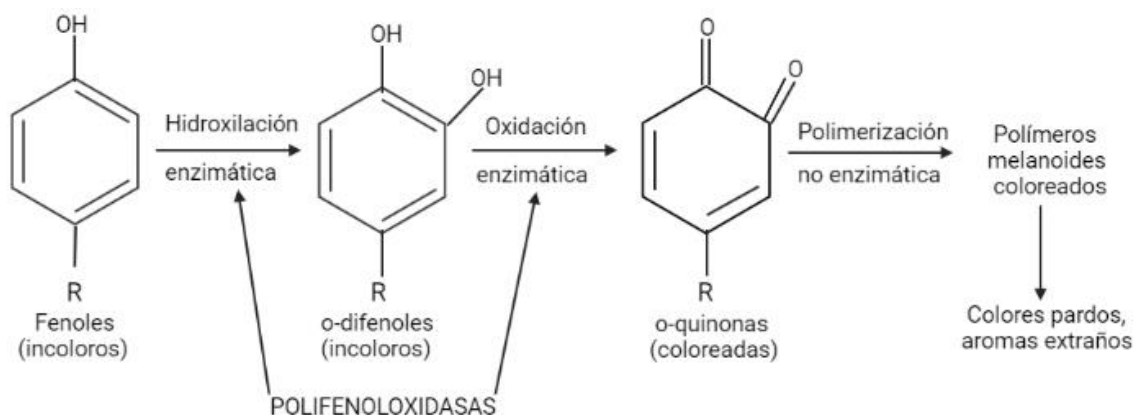


Figura 2. 4 Mecanismo de acción de polifenoloxidasas. Fuente: (López-Nicolás, 2015)

### 2.3.3.3. Efecto de la termosonicación en los compuestos bioactivos

La retención de ácido ascórbico en los jugos se ha empleado como indicador de calidad. Se supone que su vida útil termina cuando la concentración original de ácido ascórbico disminuye en un 50% (Abid y cols., 2014). La cavitación es directamente responsable de la menor degradación del ácido ascórbico debido a las condiciones físicas extremas que ocurren dentro de las burbujas durante el colapso cavitacional a microescala. Por el contrario, se menciona que el calor y la cavitación ayudan a eliminar el oxígeno disuelto del medio, por lo que retrasan la degradación del ácido ascórbico (Cheng y cols., 2007). La producción de radicales hidroxilos por sonólisis de agua puede estar involucrada en la degradación del ácido ascórbico; las interacciones entre estos radicales libres y el ácido ascórbico pueden ocurrir en

la interfase gas-líquido causando oxidación (Adekunte y cols., 2010). En algunos casos, la degradación se produce porque el ácido ascórbico proporciona un efecto protector sobre otros compuestos como carotenoides, compuestos fenólicos o antocianinas, o por la presencia de oxígeno (Tiwari y cols., 2009).

El aumento de los compuestos fenólicos y carotenoides totales por termosonicación podría deberse a la rotura mecánica de la pared celular y la liberación final de estos compuestos (Costa y cols., 2013). El mecanismo de disrupción depende de la estructura de las paredes celulares y del contenido de lignina porque los compuestos fenólicos pueden formar enlaces con varios compuestos de las paredes celulares, como polisacáridos o proteínas (Bychkov y cols., 2012). Otros autores proponen que dicho incremento es provocado por una respuesta de las células vegetales al estrés sufrido durante la cavitación o invasión microbiana, que aumentan su capacidad antioxidante al incrementar la síntesis de estos compuestos (Hsieh y Ko, 2008). La temperatura, el nivel de amplitud y el tiempo de procesamiento pueden influir en la pérdida de fenoles, flavonoides, antocianinas y licopeno (Rawson y cols., 2011). Algunas teorías sobre la degradación de estos compuestos proponen que puede ser causada por el colapso de burbujas microscópicas producidas por cavitación y la correspondiente formación de radicales libres; por lo tanto, los antioxidantes actúan sobre estos radicales libres y disminuyen su propia concentración (Dubrovic y cols., 2011).



### **CAPÍTULO 3. HIPÓTESIS**

La termosonicación del néctar de fresa (*Fragaria ananassa*) permitirá una mejor retención de compuestos bioactivos, con características físico-químicas y enzimáticas similares al néctar pasteurizado térmicamente, y con una reducción microbiológica.

## **CAPÍTULO 4. JUSTIFICACIÓN**

## CAPÍTULO 4. JUSTIFICACIÓN

Las frutas tienen diversos procesos industriales, entre ellos se encuentra la elaboración de néctares, donde generalmente la materia prima no se aprovecha en su totalidad.

Actualmente, en México el principal productor de fresa es el estado de Michoacán (10,120 ha cultivadas, SAGARPA 2017). Diversas investigaciones han demostrado el beneficio potencial del consumo de la fresa, gracias a su gran poder antioxidante el cual se encuentra en gran parte en las semillas (aquenio), lo cual lo hace un producto interesante para incrementar su consumo, más allá del fruto fresco. La industria alimentaria enfrenta el reto de desarrollar nuevos productos que utilicen tecnologías que permitan incrementar el contenido de compuestos bioactivos y minimicen su degradación durante el procesamiento y almacenamiento.

Una alternativa al tratamiento térmico convencional y que puede generar un producto estable sin las desventajas del tratamiento térmico en el néctar es el tratamiento de ultrasonido; al cual, aplicando un tratamiento térmico se le conoce como termosonicación. Este método posee una gran ventaja en parámetros de calidad respecto a la pasteurización que es un proceso muy utilizado actualmente en la industria. Por tanto, una solución para tener néctar de fresa con una mayor cantidad de pulpa y aquenio, puede ser el uso de la termosonicación.





## CAPÍTULO 5. OBJETIVOS

### 5.1. Objetivo general

Determinar el efecto del tratamiento de termosonicación sobre el contenido de compuestos bioactivos, inactivación enzimática y microbiológica en néctar de fresa (*Fragaria ananassa*) en comparación con un néctar tratado térmicamente

### 5.2. Objetivos específicos

- Obtener el jugo de fresa mediante una extracción mecánica para la posterior elaboración del néctar y la respectiva adición del porcentaje de pulpa/aquenio.
- Evaluar el efecto de la amplitud (70 y 80%) y porcentajes de pulpa/aquenio (0, 10 y 20%) sobre parámetros físico químicos, microbiológicos, enzimáticos, fenoles totales, vitamina C, capacidad antioxidante y antocianinas en néctar de fresa.
- Determinar la letalidad del tratamiento de termosonicación que mostró los mejores parámetros (físico químicos, microbiológicos, enzimáticos, fenoles totales, vitamina C, capacidad antioxidante y antocianinas) en *Escherichia coli* como microorganismo indicador en néctar de fresa.



## CAPÍTULO 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. Metodología

Este proyecto se realizó en 3 etapas (Figura 6.1): en la primera se obtuvo el néctar de fresa a los diferentes porcentajes de pulpa/aquenio (0, 10 y 20%), posterior se dividió en 3 lotes:

Lote 1. Néctar control, al cual no se le aplicó ningún tratamiento

Lote 2. Néctar termosonicado, se destinó para los tratamientos de termosonicación

Lote 3. Néctar pasteurizado, se pasteurizó por calor.

La segunda etapa consistió en aplicar los tratamientos de termosonicación y pasteurización, y posterior se realizó las pruebas fisicoquímicas, microbiológicas, enzimáticas; se liofilizaron (Labconco, E.U.A) las muestras para el contenido de compuestos fenólicos, vitamina C, capacidad antioxidante y antocianinas, todo esto fue comparado con el néctar control; y, finalmente, en la tercera etapa se determinó la letalidad del tratamiento de termosonicación en (*Escherichia coli*) como microorganismo indicador.

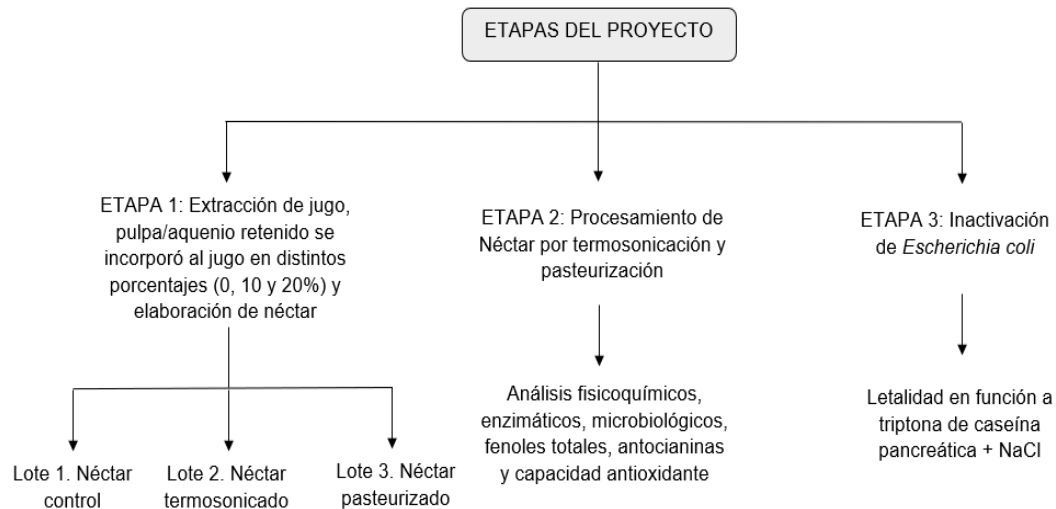


Figura 6.1 Etapas del proyecto

### 6.1.1. Obtención del néctar de fresa

Para realizar este trabajo se emplearon fresas (*Fragaria ananassa*), compradas en Irapuato, Guanajuato, México. Se seleccionaron con el mismo grado de madurez (de consumo), con un tamaño y color uniforme de al menos  $\frac{3}{4}$  partes rojo, °Brix entre 9-10 y pH 3-3.5. Las fresas se llevaron al laboratorio de biotecnología (Instituto Tecnológico de Tepic), en donde se lavaron, desinfectaron con hipoclorito de sodio (50 ppm) y se despataron (se retiró el pedúnculo), después fueron congeladas a -20 °C. El jugo se obtuvo por medio de un extractor de jugos (Breville BJE510XL/A, Australia), posterior se filtró con un colador, la pulpa/aquenio retenido se licuó (Nutribullet, EUA) y se incorporó al jugo en distintos porcentajes (0, 10 y 20%).

Se realizó 800 mL de néctar control, néctar 10% pulpa/aquenio y néctar 20% pulpa/aquenio con 40 % de pulpa base (jugo), se hicieron los cálculos correspondientes para adicionar el azúcar (en base a °Bx del jugo) con la finalidad de obtener un néctar con 14 °Bx y finalmente el agua agregada fue la diferencia del néctar total y los ingredientes ya agregados. En el cuadro 6.1 se observan las

cantidades necesarias para un néctar en base a 100 g, partiendo de un jugo con 9.2 °Bx.

Cuadro 6.1 Estandarización del néctar

Ingrediente	Cantidades		
Aquenio	0%	10%	20%
Pulpa	40 g	40 g	40 g
Azúcar	10.14 g	9.4 g	8.48 g
Agua	49.86 g	40.6 g	31.52 g

### **6.1.3. Procesamiento del néctar de fresa por termosonicación y pasteurización**

La termosonicación del néctar se llevó a cabo en un procesador ultrasónico (Hielscher UP400S, Alemania), utilizando el sonotrodo H7 de 7 mm (400 W, 24 kHz) se termosonicaron alícuotas de 200 mL de néctar de fresa, se probaron dos amplitudes (70 y 80%), por 8 minutos, manteniendo una temperatura de salida de 50°C por medio de un baño de agua acoplado al procesador ultrasónico. La pasteurización térmica se realizó en un baño de agua (Thermo scientific 2870, USA) a 63°C por 30 min. El diseño experimental fue un factorial completo 3x2 (Cuadro 6.2).

Se consideraron 2 factores  $X_1$ , Amplitud con niveles de 70 y 80% y  $X_2$ , Pulpa/aquenio con los niveles 0, 10 y 20% para el tratamiento de ultrasonido, se mantuvo la temperatura fija de 50 °C, al igual que el tiempo de 8 min. En el cuadro 6.3 se muestran las variables de respuesta a evaluar. Se elaboró por triplicado y se comparó con el néctar pasteurizado (0, 10, 20% pulpa/aquenio) y néctar control (0, 10, 20% pulpa/aquenio).

La potencia efectiva de los tratamientos fue determinada por el método colorimétrico de Torkamani y cols., (2014). Las temperaturas en la muestra se

controlaron y midieron con un multímetro (RADOX 535-339, México) desde el minuto 0 al 8 de cada tratamiento como se puede ver en el cuadro 6.2. Todos los tratamientos fueron realizados por triplicado.

El aumento de temperatura ( $dT/dt$ ) se determinó de la pendiente de los datos de temperatura registrados contra el tiempo para cada tratamiento. La potencia efectiva para cada tratamiento fue calculada a partir de la siguiente ecuación:

$$P_n = m_n C_p \left( \frac{dT}{dt} \right)$$

Dónde:

$P_n$  es la potencia efectiva determinada para el tratamiento en W.

$m_n$  es la masa utilizada en el tratamiento n en kg

$C_p$  es el calor específico para la muestra n en J/ (kg °C)

El calor específico para cada muestra se calculó a partir de la composición determinada para cada tratamiento:

$$c_p = \sum_{i=1}^n c_{pi} X_i$$

Dónde:

$c_{pi}$  es el calor específico para el componente i

$X_i$  es la fracción peso del componente i

Los calores específicos para los componentes en el néctar de fresa se determinaron con las siguientes fórmulas (Singh & Heldman, 2009) utilizando la temperatura promedio (T) registrada en cada tratamiento:

Proteína	$c_p = 2.0082 + 1.2089 \times 10^{-3}T - 1.3129 \times 10^{-6}T^2$
Grasa	$c_p = 1.9842 + 1.4733 \times 10^{-3}T - 4.8008 \times 10^{-6}T^2$
Carbohidratos	$c_p = 1.5488 + 1.9625 \times 10^{-3}T - 5.9399 \times 10^{-6}T^2$
Cenizas	$c_p = 1.0926 + 1.8896 \times 10^{-3}T - 3.6817 \times 10^{-6}T^2$
Agua	$c_p = 4.1762 + 9.0864 \times 10^{-5}T + 5.4731 \times 10^{-6}T^2$

Cuadro 6. 2 Diseño experimental para análisis de termosonicación

Tratamiento	Amplitud (%)	Pulpa/aqueño (%)	Tiempo (min)	Potencia efectiva (W)	Temperatura de entrada (°C)	Temperatura de salida (°C)	Temperatura promedio (°C)
1	70	0	8	40.179 ± 1.376 <sup>b</sup>	7	47.83 ± 0.2	
2	70	10	8	38.640 ± 0.254 <sup>b</sup>	7	48.5 ± 0.5	
3	70	20	8	39.126 ± 0.110 <sup>b</sup>	7	49.5 ± 0.5	48.61 ± 0.8
4	80	0	8	42.880 ± 0.191 <sup>c</sup>	7	48.66 ± 0.5	
5	80	10	8	43.655 ± 0.335 <sup>c</sup>	7	47.66 ± 0.2	
6	80	20	8	47.465 ± 0.105 <sup>d</sup>	7	49.5 ± 0.5	48.61 ± 1.1
7	80	20	20	35.945 ± 0.842 <sup>a</sup>	7	49.83 ± 0.7	48.83 ± 0.05
Control	-	0	-	-	-	-	-
Control	-	10	-	-	-	-	-
Control	-	20	-	-	-	-	-
Pasteurizado	-	0	30	-	7	63	-
Pasteurizado	-	10	30	-	7	63	-
Pasteurizado	-	20	30	-	7	63	-

Los resultados se expresan como la media ± desviación estándar (n=3). Diferentes letras en la misma columna son significativamente diferentes (p<0.05). Letras iguales no muestran diferencias significativas. El tratamiento 7 fue el más óptimo y el que se utilizó exclusivamente en la etapa 3 de inactivación bacteriana.

Cuadro 6.3 Variables de respuesta

Código	Definición	Código	Definición
Y <sub>1</sub>	pH	Y <sub>8</sub>	Polifenoloxidasa
Y <sub>2</sub>	°Brix	Y <sub>9</sub>	Compuestos fenólicos totales
Y <sub>3</sub>	Acidez titulable	Y <sub>10</sub>	Ácido ascórbico
Y <sub>4</sub>	Coliformes totales	Y <sub>11</sub>	Antocianinas
Y <sub>5</sub>	Hongos y levaduras	Y <sub>12</sub>	Capacidad antioxidante DPPH
Y <sub>6</sub>	Mesofílicos aerobios	Y <sub>13</sub>	Capacidad antioxidante ABTS
Y <sub>7</sub>	Pectinmetilesterasa	Y <sub>14</sub>	Capacidad antioxidante FRAP

### 6.2.1. Análisis físico químicos

#### 6.2.1.1. Determinación de pH

Para la determinación del pH se utilizó el método 981.12 de la AOAC (2005). Se tomó aproximadamente 5 mL de muestra homogénea, en un vaso de precipitados. Posteriormente se sumergió el electrodo del medidor de pH (Hach Sension, España) previamente calibrado con soluciones buffer de pH 4, 7 y 10, en la muestra y se tomó la lectura.



### 6.2.1.2. Determinación de acidez titulable

Se utilizó el método 942.15 de la AOAC (2005) mediante valoración potenciométrica de la muestra con NaOH hasta pH 8.1 que indica el contenido de ácidos libres (cítrico, láctico, málico, oleico) expresándose el resultado en porcentaje del ácido predominante en la muestra. Se pesó aproximadamente 10 g de muestra homogenizada, en un vaso de precipitados y se mezcló con 100 mL de agua desionizada, se agitó durante 5 min. Se determinó el pH de la muestra y posteriormente, se tituló con hidróxido de sodio 0.1 N de factor conocido, hasta llegar a pH 8.1. Esto se hizo por triplicado.

Los resultados se reportaron en % de ácido cítrico (mg de ácido cítrico/100 mg de muestra) y se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Acidez total (\% ácido cítrico)} = \frac{N \times V \times f \times F}{P} \times 100$$

Dónde:

N= Normalidad de NaOH

V= mL de NaOH consumidos en la valoración

f= Factor de corrección del hidróxido de sodio

F= Factor de conversión de ácido cítrico anhidro 0.064

P= Peso en g de la muestra

### 6.2.1.3 Determinación de sólidos solubles

Los sólidos solubles totales (°Brix) se determinaron por el método de la AOAC (1990) se colocó dos gotas de la muestra (cubriendo completamente la superficie) en el prisma de un refractómetro digital (HANNA HI 96801, U.S.A), adecuadamente calibrado y se registró la lectura.

## 6.2.2. Análisis enzimáticos

### 6.2.2.1. Polifenoloxidasasa (PPO)

La actividad de la PPO se midió por espectrometría a 420 nm en un espectrofotómetro (GENESYS 10S, Uruguay) de acuerdo a la metodología de Guerrero- Beltrán y Barbosa-Cénovas, (2006). El extracto de la enzima se obtuvo mezclando 5 mL de muestra con 5 mL de buffer McIlvaine (pH 6.6). Esta mezcla se centrifugó (LabTech 1580R, Italia) a 4°C, a 4000xg por 40 min y posteriormente se filtró con papel whatman no. 1. Una vez obtenido el extracto, se tomó 0.25 mL y se añadió 1 mL de buffer McIlvaine (pH 6.6) y 0.5 mL de catecol (0.175 M). La absorbancia se midió cada 2 min por 20 min y la porción lineal de la curva se utilizó para calcular las unidades de actividad enzimática (UAE). Una UAE fue definida como 0.001  $\Delta A_{420}$  /min/mL.

### 6.2.2.2. Pectinmetilesterasa (PME)

La determinación de la actividad residual de la enzima PME se realizó mediante la titulación del grupo carboxil, de acuerdo a Askar y Treptow, (1993). Se añadió 20 mL de jugo a 40 mL de solución de pectina cítrica al 1%, en una solución de NaCl 2N. La mezcla se ajustó a pH 7.0 con NaOH 1N. Una vez alcanzado el pH de 7.0, se agregó 1 mL de NaOH 0.05 N y se midió el tiempo requerido para que la muestra regrese al pH 7.0. Una unidad de PME (UPME) fue definida como la liberación de 1  $\mu$ mol del grupo carboxil por minuto a pH 7.0 a 30°C. Para el cálculo de la actividad enzimática se utilizó la siguiente fórmula:

$$\frac{UPME}{ml} = \frac{(mL \text{ de NaOH}) * (\text{normalidad del NaOH})}{(\text{Minutos}) * (mL \text{ de muestra})} * 1000$$

### 6.2.3. Fenoles solubles totales

#### 6.2.3.1. Método de Folin-Ciocalteu

El contenido de fenoles solubles totales (FST) se determinó por medio de un lector de microplacas (Bio-Tek®, Synergy HT, Winooski, VT, EE. UU) con el programa Gen5, usando el ensayo de Folin-Ciocalteu (Montreau, 1972). Se agregó en tubos de ensaye 1 mL carbonato de sodio 7.5%, 250 µL de muestra y 1.250 mL de Folin-Ciocalteu, se agitaron en vortex y se dejó reposar 15 min a 50 °C, luego se agregó 270 µL de los tubos a la microplaca y se leyó la absorbancia a 750 nm. Se realizó una curva de calibración con ácido gálico (AG) a diferentes concentraciones (0, 0.0125, 0.025, 0.05, 0.10 y 0.20 mg/mL). Los datos se expresaron como el promedio de mg equivalentes de AG por gramo de muestra (mg EAG/g).

#### 6.2.4. Determinación de antocianinas

Para la determinación de antocianinas totales se utilizó el método reportado por Giusti y Wrolstad, (2001), el cual es un método colorimétrico que se basa en el diferencial de color emitido por las antocianinas en distintos pH. Se colocó 0.5 mL de muestra y se diluyó usando 4.5 mL de buffer de cloruro de potasio al 0.025 M, ajustado a pH de 1.0. En otro vial, se diluyó la misma cantidad de muestra con 4.5 mL de solución de acetato de sodio 0.4 M y se ajustó a pH de 4.5 con HCl 0.1 M. Las muestras se dejaron reposar durante 15 min en la oscuridad, para posteriormente realizar la lectura a 510 y 700 nm, en un lector de microplacas (Bio-Tek®, Synergy HT, Winooski, VT, EE. UU) con el programa Gen5. El contenido de antocianinas se calculó por la siguiente ecuación:

$$\text{Contenido de antocianinas (mg } \frac{\text{Cy3gl}}{\text{L}}) = \frac{(A * PM * FD * 1000)}{(E * Tc)}$$

Dónde:

A = Resta de la absorbancia de los valores con cloruro de potasio (510 nm - 700 nm) menos la resta de la absorbancia de los valores con acetato de sodio (510 nm – 700 nm).

PM = Peso molecular de cyanidin-3-glucósido (449.2 g/mol)

FD = Factor de dilución

E = Absorción molar (26900 L mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>)

### **6.2.5. Determinación de vitamina C (ácido ascórbico)**

El contenido de ácido ascórbico (Dürust y cols., 1997) se determinó por medio de espectrofotometría (GENESYS 10S, Uruguay). Utilizando sal sódica de 2,6-diclorofenolindofenol hidratada (DCPI). Para las medidas de absorbancia de las soluciones de muestra, el ajuste a cero se realizó mediante una mezcla de solución de muestra (200 µL), tampón acetato (200 µL) y agua destilada (1600 µL). La absorbancia de la solución de muestra (200 µL) + tampón acetato (200 µL) + DCPI (1600 µL) se registró exactamente después de la adición de DCPI al final de 15 segundos. Este es el valor L2 de la solución de muestra. Los valores L1 - L2 representan la absorbancia de la muestra; donde L1 es la absorbancia de la solución de ácido oxálico (200 µL) + solución tampón de acetato (200 µL) + solución de DCPI (1600 µL). Se leyó absorbancias a 525 nm cada 15 segundos. Se realizó curva de calibración de ácido ascórbico de 0, 5, 10, 20, 30 y 40 mg/L. Los resultados se expresaron como el promedio de mg equivalentes de ácido ascórbico por gramo de muestra (mg EAA/g).

## **6.2.6. Capacidad antioxidante**

### **6.2.6.1. Método del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH)**

La determinación antirradical por el método con DPPH se realizó según la metodología reportada por Álvarez- Parrila y cols., (2011). El reactivo DPPH es un radical libre estable, que en solución etanólica presenta una coloración violeta. Si se adiciona a este medio una sustancia susceptible de atrapar radicales libres, el electrón no apareado del DPPH se aparea e inmediatamente se presenta una decoloración de la solución que puede ir hasta amarillo en razón del número de electrones apareados.

Se preparó el radical DPPH en solución etanólica. Se colocó 30  $\mu\text{L}$  de muestra en la microplaca. La absorbancia se midió a 517 nm utilizando un lector de microplacas (Bio-Tek®, Synergy HT, Winooski, VT, EE. UU) con el programa Gen5. Se realizó una curva de calibración, utilizando trolox como antioxidante de referencia, a concentraciones de 0, 37.5, 75, 150, 300 y 600  $\mu\text{M}$ . La actividad antioxidante se expresó como el promedio de mmol equivalentes de trolox por gramo de muestra (mmol ET/g).

### **6.2.6.2. Método de reducción de ion férrico por actividad antioxidante (FRAP)**

Este método evalúa la capacidad antioxidante de una muestra de acuerdo a su capacidad para reducir el  $\text{Fe}^{+3}$  presente en un complejo con la 2,4,6-tri(2-piridil) striazina (TPTZ) hasta la forma ferrosa ( $\text{Fe}^{+2}$ ), que presenta un máximo de absorbancia a una longitud de onda entre 590- 595 nm. Para realizar la técnica se siguió la metodología descrita por Álvarez- Parrila y cols., (2010) con modificaciones, en el cual se preparó el reactivo FRAP, posteriormente se agregaron 24  $\mu\text{L}$  de muestra a la microplaca y se leyó la absorbancia a 595 nm a 37 °C en el lector de microplacas (Bio-Tek®, Synergy HT, Winooski, VT, EE. UU)

con el programa Gen5. La curva patrón se realizó utilizando trolox a las siguientes concentraciones 0, 0.008, 0.016, 0.032, 0.065 y 0.13 mM. La actividad antioxidante se expresó como el promedio de mmol equivalentes de trolox por gramo de muestra (mmol ET/g).

#### **6.2.6.3. Método del radical 2,2-azinobis 3-etilbenzotiazolína-6-sulfónico (ABTS)**

La determinación de la actividad antioxidante por medio del atrapamiento del radical ABTS se realizó de acuerdo a Prior, Wu & Schaich, (2005). El ABTS es un radical con un nitrógeno central que presenta un color característico azul-verde, cuando este catión es reducido por un antioxidante a la forma no radical, presenta una pérdida de color. Se preparó una solución de ABTS al 7 mM con persulfato de potasio al 2.45 mM, se incubó durante 16 hrs a temperatura ambiente en la oscuridad para dar lugar a la formación del radical libre ABTS, posteriormente se realizó en factor de dilución para obtener una absorbancia de  $0.8 \pm 0.05$  a 734 nm. Se colocaron 20  $\mu$ L de muestra en la microplaca, posteriormente se realizó la lectura espectrofotométrica a 734 nm en el lector de microplacas (Bio-Tek®, Synergy HT, Winooski, VT, EE. UU) con el programa Gen5. Se utilizó una curva estándar, para la cual, se preparó una solución de trolox con las siguientes concentraciones: 0, 37.5, 75, 150, 300 y 600  $\mu$ M. La actividad antioxidante se expresó como el promedio de mmol equivalentes de trolox por gramo de muestra (mmol ET/g).

#### **6.2.7. Análisis microbiológicos**

Los análisis microbiológicos se realizaron mediante la técnica de vaciado en placa, para lo cual se agregó 1 mL de jugo diluido en agua peptonada al 0.1% previamente esterilizada. Las diluciones fueron seriadas de  $10^{-1}$  a  $10^{-3}$ . Se realizaron

el recuento total de mesófilos (MT) (NOM-092-SSA1-1994), enterobacterias (EB) (NOM-113-SSA1-1994), levaduras y hongos (HL)(NOM-111-SSA1-1994).

Para MT se utilizó el agar para métodos estándar (PCA), se incubó a 30°C y se realizó el conteo a las 48 h. El recuento de EB se realizó en agar bilis rojo violeta glucosado (VRBG), las placas se incubaron a 37°C y se realizó el conteo a las 48 h. Para el análisis de HL se utilizó el agar rosa de bengala y el conteo se realizó a los 5 días en incubación a 25 °C. Los resultados de los recuentos microbiológicos se expresaron en Log UFC/mL.

### **6.2.8. Inactivación de *Escherichia coli* por termosonicación**

Una vez obtenido el tratamiento de termosonicación óptimo, se evaluó su letalidad en *Escherichia coli* (ATCC 8739). Previo a la inoculación de *E. coli* en el néctar de fresa, la cepa se activó en caldo de soya tripticaseína y se incubó por 48 horas a 37 °C. Para preparar la suspensión bacteriana se realizaron siembras de la cepa por superficie mediante asa bacteriológica tanto en cajas Petri como en tubos inclinados con agar soya y tripticaseína con extracto de levadura (TSA+EL) dejando incubar por 24 horas a 37 °C. Después se tomaron asadas de las colonias de las placas y tubos para colocarlas en 10 mL de una solución de triptona caseína pancreática (1 g/L) más cloruro de sodio (8.5 g/L). Por medio de un espectrofotómetro se leyó la absorbancia de la suspensión a 405 nm hasta registrar una absorbancia mayor a 1, esto para alcanzar 9 Log UFC/mL aproximadamente. Posteriormente, la suspensión se inoculó en un litro de néctar de fresa quedando con una carga de 7 Log de UFC/mL de *E. coli*. Una vez inoculado el néctar con la cepa se realizó el tratamiento de termosonicación, teniendo como control una muestra de néctar inoculado sin tratamiento.

Para determinar la carga inicial de células en el néctar inoculado se utilizó 1 mL para preparar diluciones decimales en agua de peptona (10 g / L de peptona y 5 g / L de NaCl). Posteriormente, se sembró por inclusión 1 mL de estas diluciones

por duplicado en cajas Petri con TSAYE (agar triptona de soya y extracto de levadura 6 g / L) y se incubó a 37 ° C durante 48 h. El análisis microbiológico de los néctares tratados y el control se realizó 2 h después de haber realizado los tratamientos y después de 5 y 10 días de almacenamiento a 6°C, la letalidad se calculó como la diferencia entre los logaritmos de los recuentos de colonias del néctar antes del tratamiento y del néctar después del tratamiento (Log No – Log N).

#### **6.2.8.1. Cinética de inactivación de *Escherichia coli* por termosonicación**

Se realizó la cinética de inactivación con *Escherichia coli* (ATCC 8739). Para la activación de la bacteria, la realización de la suspensión y la inoculación en el néctar se hizo según la metodología del apartado 6.2.8. Solo se realizó la cinética del néctar tratado con termosonicación (50 °C, 20 minutos, 80% amplitud) y se retiró 3 mL de muestra cada 4 minutos hasta completar un tratamiento de 20 minutos. El análisis microbiológico del néctar tratado se realizó 2 h después de haber realizado los tratamientos, la letalidad se calculó como la diferencia entre los logaritmos de los recuentos de colonias del néctar en el minuto 0 y del néctar después de cada 4 minutos (Log No – Log N). Finalmente se ajustó a un modelo matemático mediante una regresión simple, tomando como variable independiente el tiempo de tratamiento y como variable dependiente la letalidad. Fue realizado con el paquete estadístico STATISTICA 12 (TIBCO Software Inc. USA) para Windows.



### 6.2.9. Análisis estadístico

En el procesamiento del néctar de fresa por termosonicación (Etapa 2), los datos se expresaron como las medias  $\pm$  desviación estándar ( $n=3$ ). Se evaluaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas con las pruebas de Shapiro Wilk y Barlett respectivamente. En caso de cumplir con ambos supuestos se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia del 0.05. En caso de encontrar diferencias significativas se aplicó la prueba Tukey para comparar las medias de los tratamientos. Si se dio el incumplimiento de alguno de los supuestos se realizó la prueba de Kruskal-Wallis y la comparación de rangos medios. Para optimizar las variables se utilizó un análisis de Superficie de Respuesta. Todos los análisis se realizaron con el paquete estadístico STATISTICA 12 (TIBCO Software Inc. USA) para Windows, con un nivel de confianza del 95%.

En la letalidad de *Escherichia coli* (Etapa 3) se realizó un diseño unifactorial en donde se pretendió observar cómo influyen los días de almacenamiento en la reducción logarítmica de *E. coli*. respecto al néctar tratado con termosonicación, se analizó por medio de un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia del 0.05, aplicando una prueba Tukey para comparar las medias.



## CAPÍTULO 7. RESULTADOS

### 7.1. Efecto de la termosonicación en pH, sólidos solubles totales (°Brix) y acidez titulable

Los resultados obtenidos (Cuadro 7.1) muestran que los sólidos solubles totales (SST) se encuentran entre 14.10 a 14.23 °Brix y el pH entre 3.80 a 3.88, los cuales cumplen con los parámetros de calidad establecidos para néctares, donde indica que el pH no debe ser inferior a 2.5 y para °Brix a 14 (CODEX STAN 247-2005). Entre los tratamientos se obtuvo menores °Brix en el tratamiento “0/80” con 14.10 y el de mayor fue en “10/70” con 14.23 pero sin diferencias significativas ( $p > 0.05$ ), En el pH, se tiene 3.80 en “0/80” como menor valor y 3.88 en “20/80” como mayor, pero sin diferencia significativa ( $p > 0.05$ ). Además, no se observaron diferencias entre los néctares termosonicados, el néctar control y el pasteurizado. Resultados similares en °Brix y pH se han reportado en jugo de carambola (Nayak y cols., 2018) y néctar de camu-camu (do Amaral Souza y cols., 2019). Anaya-Esparza y cols., (2017) informaron en el néctar de guanábana que la termosonicación no promovió diferencias significativas en los valores de pH (3.6–3.9) y SST (14.4–14.9 ° Brix). Estos parámetros, por lo tanto, no se ven afectados al agregar los distintos porcentajes de pulpa/aqueño al néctar.

En la acidez titulable se puede observar un incremento entre los néctares controles y los termosonicados, teniendo el menor valor en C (Control) “0/0” y P (Pasteurizado) “0/0” de 0.146. El incremento en acidez puede estar relacionado con la liberación de ácidos orgánicos desde el citoplasma celular al exterior, provocada por la ruptura de la membrana celular debido al proceso de cavitación (Oladunjoye y cols., 2021). Asimismo, puede deberse a una posible liberación de ácido galacturónico de la estructura de la pectina también debido a la cavitación, como lo sugirieron Bora, Handique y Sit (2017) al estudiar el efecto de la termosonicación en el jugo de banano (40 kHz, 5 min a 80 ° C). De igual manera, la aplicación de

ultrasonido, combinado con la temperatura, puede potenciar el proceso de sonólisis de las moléculas de agua (OH<sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y H<sup>+</sup>), modificando la acidez de la solución (Anaya-Esparza, Velázquez-Estrada, Roig, y cols., 2017). A pesar de que se tuvo un incremento en acidez respecto al control, pasteurizado y los néctares termosonicados, no se pudo observar cambios importantes de pH que afecten su calidad conforme a los que establece la normatividad para néctares.

Cuadro 7.1 Efecto de la termosonicación sobre SST, pH y acidez titulable

Tratamientos	SST (°Brix)	pH	Acidez titulable (mg AC/ 100 mL)
(0/70)	14.22 ± 0.05 <sup>a</sup>	3.82 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.250 ± 0.000 <sup>a</sup>
(10/70)	14.23 ± 0.09 <sup>a</sup>	3.85 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.240 ± 0.000 <sup>a</sup>
(20/70)	14.15 ± 0.16 <sup>a</sup>	3.84 ± 0.09 <sup>a</sup>	0.240 ± 0.000 <sup>a</sup>
(0/80)	14.10 ± 0.11 <sup>a</sup>	3.80 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.250 ± 0.000 <sup>e</sup>
(10/80)	14.13 ± 0.26 <sup>a</sup>	3.87 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.240 ± 0.000 <sup>a</sup>
(20/80)	14.20 ± 0.23 <sup>a</sup>	3.88 ± 0.09 <sup>a</sup>	0.240 ± 0.000 <sup>a</sup>
C (0/0)	14.11 ± 0.37 <sup>a</sup>	3.80 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.146 ± 0.005 <sup>d</sup>
C (10/0)	14.16 ± 0.32 <sup>a</sup>	3.80 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.170 ± 0.000 <sup>bc</sup>
C (20/0)	14.00 ± 0.08 <sup>a</sup>	3.85 ± 0.08 <sup>a</sup>	0.176 ± 0.005 <sup>c</sup>
P (0/0)	14.42 ± 0.31 <sup>a</sup>	3.81 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.146 ± 0.005 <sup>d</sup>
P (10/0)	14.33 ± 0.17 <sup>a</sup>	3.84 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.166 ± 0.005 <sup>b</sup>
P (20/0)	14.33 ± 0.23 <sup>a</sup>	3.95 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.170 ± 0.000 <sup>bc</sup>

Los resultados se expresan como la media ± desviación estándar (n=3). Diferentes letras en la misma columna son significativamente diferentes (p<0.05). Letras iguales no muestran diferencias significativas. (0/70): 0% pulpa/aqueño y 70%; (10/70): 10% pulpa/aqueño y 70%; (20/70): 20% pulpa/aqueño y 70%; (0/80): 0% pulpa/aqueño y 80%; (10/80): 10% pulpa/aqueño y 80%; (20/80): 20% pulpa/aqueño y 80%; C (0/0): 0% pulpa/aqueño; C (10/0): 10% pulpa/aqueño; C (20/0): 20% pulpa/aqueño; P (0/0): 0% pulpa/aqueño; P (10/0): 10% pulpa/aqueño; P (20/0): 20% pulpa/aqueño. C= CONTROL, P= PASTEURIZADO.

## 7.2. Efecto de la termosonicación en los recuentos microbianos

El cuadro 7.2 muestra los recuentos de mesófilos aerobios, coliformes totales en placa y hongos y levaduras; donde se observa que entre los tratamientos de termosonicación no hay diferencias significativas a pesar de presentarse recuentos menores (1.96 a 2.08 Log UFC/mL en hongos y levaduras y 1.98 a 2.13 Log UFC/mL en mesófilos aerobios) utilizando una amplitud de 80%. Sin embargo, los tratamientos de termosonicación mostraron una reducción significativa ( $p < 0.05$ ) en hongos, levaduras y mesófilos aerobios con respecto al néctar control. En este sentido, se obtuvo una reducción en hongos y levaduras de 2.88 a 1.91 Log UFC/mL, y de 3.26 a 1.98 Log UFC/mL en mesófilos aerobios; en coliformes totales se detectó ausencia de colonias en los tratamientos, no obstante, en el control hubo presencia, pero por debajo de los límites detectables, esto afirma que se tuvieron las prácticas de higiene correspondientes y se evitó alguna contaminación cruzada. No obstante, la reducción completa de hongos, levaduras y mesófilos aerobios no se logró como en la pasteurización.

Existen varias teorías para explicar el efecto letal de la termosonicación sobre los microorganismos, incluido el fenómeno de la cavitación, que es capaz de dañar la pared celular y la membrana de los microorganismos, formando poros (sonoporación), y como consecuencia provocando la pérdida de contenido intracelular (Vinatoru, 2001). La cavitación también aumenta la temperatura y la presión del medio, así como los niveles de radicales libres con propiedades bactericidas, que también pueden contribuir a la letalidad microbiana (Anaya-Esparza y cols., 2017), y la inhibición del crecimiento de microorganismos al inactivar la actividad enzimática de las mitocondrias (Tomadoni y cols., 2017). El efecto letal de la termosonicación no es el mismo para todos los microorganismos porque la eficiencia de la inactivación microbiana se ve afectada por la morfología como el tipo, forma o diámetro del microorganismo, en este sentido, las gram negativas son menos resistentes que las gram positivas debido a su capa de peptidoglucano, los cocos o células esféricas son más resistentes que los bacilos o

formas de bastón debido a la relación entre la superficie celular y el volumen, las células con una superficie más grande son más sensibles que las células pequeñas y redondas, las esporas bacterianas y los mohos son más resistentes al ultrasonido que las bacterias vegetativas (Ramteke y cols., 2020). Factores como amplitud, temperatura y tiempo de tratamiento también son clave para una inactivación microbiana. Amador-Espejo y cols., (2020) obtuvieron una mayor reducción microbiana en smoothie de frutas evaluando diferentes amplitudes (70-85%), temperaturas (40-55 °C) y tiempos de tratamiento (15-25 minutos). En donde se puede resaltar que para obtener una mayor inactivación microbiana en el néctar de fresa se necesita incrementar un poco más la amplitud y/o temperatura o simplemente tener un tiempo de tratamiento mayor, sin embargo, se necesitan más análisis para confirmar esta hipótesis. Herceg y cols., (2013) detectaron una inactivación completa de mesófilos aerobios en jugo de fresa en tratamientos de termosonicación de 23% de amplitud por 9 minutos a 55 °C. En este caso, ellos concluyen que el factor más importante para tener la inactivación microbiana es la temperatura.

Los néctares pasteurizados mostraron una excelente calidad microbiana ya que se observó la eliminación completa de todos los microorganismos analizados. La aplicación de altas temperaturas durante la pasteurización puede destruir sustancias orgánicas (ADN, ARN y proteínas) que son necesarias para el correcto funcionamiento de los microorganismos, por lo que resulta en la lisis celular (Santhirasegaram y cols., 2015). Resultados similares se han reportado en jugo de mandarina (Alves y cols., 2020), néctar de jaca (Cruz-Cansino y cols., 2021), smoothie de frutas (Amador-Espejo y cols., 2020) y jugo de uva (Aadil y cols., 2015)

Aunque el néctar de fresa presentó un recuento microbiano significativo y se obtuvo una reducción aproximada de 1 Log UFC/mL, todos los tratamientos están dentro del límite permitido por la NOM-093-SSA1-1994.

Tratamientos	Hongos y levaduras (log UFC/mL)	Mesófilos aerobios (log UFC/mL)	Coliformes en placa (log UFC/mL)
(0/70)	1.913 ± 0.104 <sup>a</sup>	2.166 ± 0.231 <sup>a</sup>	ND
(10/70)	2.156 ± 0.292 <sup>a</sup>	2.330 ± 0.173 <sup>a</sup>	ND
(20/70)	1.950 ± 0.177 <sup>a</sup>	2.073 ± 0.120 <sup>a</sup>	ND
(0/80)	2.083 ± 0.040 <sup>a</sup>	2.040 ± 0.115 <sup>a</sup>	ND
(10/80)	2.003 ± 0.280 <sup>a</sup>	2.133 ± 0.100 <sup>a</sup>	ND
(20/80)	1.966 ± 0.060 <sup>a</sup>	1.983 ± 0.215 <sup>a</sup>	ND
C (0/0)	2.780 ± 0.098 <sup>b</sup>	3.263 ± 0.177 <sup>b</sup>	ND
C (10/0)	2.886 ± 0.380 <sup>b</sup>	3.096 ± 0.205 <sup>b</sup>	ND
C (20/0)	3.143 ± 0.159 <sup>b</sup>	2.863 ± 0.184 <sup>b</sup>	ND
P (0/0)	ND	ND	ND
P (10/0)	ND	ND	ND
P (20/0)	ND	ND	ND

Cuadro 7. 2 Efecto de la termosonicación en recuentos microbianos

Los resultados se expresan como la media ± desviación estándar (n=3). Diferentes letras en la misma columna son significativamente diferentes (p<0.05). Letras iguales no muestran diferencias significativas. (0/70): 0% pulpa/aqueño y 70%; (10/70): 10% pulpa/aqueño y 70%; (20/70): 20% pulpa/aqueño y 70%; (0/80): 0% pulpa/aqueño y 80%; (10/80): 10% pulpa/aqueño y 80%; (20/80): 20% pulpa/aqueño y 80%; C (0/0): 0% pulpa/aqueño; C (10/0): 10% pulpa/aqueño; C (20/0): 20% pulpa/aqueño; P (0/0): 0% pulpa/aqueño; P (10/0): 10% pulpa/aqueño; P (20/0): 20% pulpa/aqueño. ND= No detectado. C= CONTROL, P= PASTEURIZADO.

### 7.3. Efecto de la termosonicación en actividad enzimática

De manera general los néctares de fresa presentaron una actividad baja de polifenoloxidasas (Cuadro 7.3), un valor menor (2.296 UAE/min/mL) en el tratamiento “0/70” pero estadísticamente no se presentan diferencias significativas. Esta pequeña o nula actividad enzimática en el néctar de fresa se puede deber a que la

enzima es potenciada por la presencia del cobre en el extracto, siendo el cofactor por excelencia de esta enzima, Jiménez-Vieyra y Zambrano-Zaragoza, (2011) han revelado que la fresa muestra valores muy bajos de cobre ( $0.094 \pm 0.010$  mg Cu/ 100 g en fruto y en extracto con  $0.016 \pm 0.010$  mg de Cu/100 g), respecto a otras frutas como el aguacate que muestra un valor de 0.292 mg Cu/ 100 g. Un fruto que contiene polifenoles y polifenoloxidasas está destinado a presentar oscurecimiento, pero un fruto que además tiene un alto contenido de cobre anuncia un oscurecimiento acelerado (Es-Safi y cols., 2003). De igual manera el néctar presenta un pH bajo y a pH ácido se inhibe la actividad de esta enzima (Jiménez-Vieyra y Zambrano-Zaragoza, 2011)

Por lo que, el oscurecimiento del néctar, más que la acción de la enzima, la cual influye, pero no del todo, puede estar más ligado a cambios que se pueden presentar durante la termosonicación, como son la cavitación acústica presente en los tratamientos de ultrasonido, ya sea por radicales libres en la sonólisis de moléculas de agua o fuerzas de cizallamiento resultantes de la cavitación acústica (Mason y cols., 1994; Kadkhodaei y Povey 2008). En algunos casos, los cambios de color pueden ser causados por la rotura mecánica de la pared celular y además la liberación de compuestos coloreados como se ha encontrado en los carotenos del jugo de zanahoria (Martínez-Flores et al., 2015) y compuestos fenólicos en jugo de uva (Lieu y Le, 2010) en comparación con muestras frescas o pasteurizadas.

El tiempo de tratamiento es un parámetro a considerar en la inactivación de la polifenoloxidasas debido a que son necesarios periodos de exposición prolongados para inactivarla (Rithmanee e Intipunya 2012). Se ha reportado una menor actividad (4.72 UAE/min/mL) en un rango de tiempo de 18 a 22 minutos, amplitud de 70-85% y 40-55 °C (Amador-Espejo y cols., 2020). Pero, se ha reportado un aumento en la actividad de la enzima (6 UAE/min/mL) cuando se tiene una exposición de 24 minutos, bajo estas mismas condiciones de tratamiento. En jugo de guayaba fue observado este aumento de la actividad de la enzima (10 a 18 U) con una sonicación a 35 kHz por 30 minutos y ellos atribuyeron el incremento de la actividad de la PPO a la producción de un sistema coloide estabilizado debido a un tamaño de partícula



más pequeño y una mayor disponibilidad de compuestos fenólicos (Cheng y cols., 2007). En el néctar de fresa 8 minutos posiblemente no fueron suficientes para hacer notoria una inactividad de la enzima, aunado al poco contenido de cofactor (Cu) que tiene el fruto.

En las muestras pasteurizadas se mostraron los valores más bajos, pero esto es debido a que valores entre 70°C - 90°C, pueden causar inhibición de la polifenoloxidasas. Terefe y cols., (2009) obtuvieron una actividad residual del 28% en puré de fresa aplicando un tratamiento térmico de 100 °C por 30 min.

En la pectinmetilesterasa pudo observarse (Cuadro 7.4) un valor menor en (0/80) de 0.148 UPME/ml, y mayor de 0.287 UPME/ml en "20/70", en donde resultó un incremento y diferencia mientras más pulpa se le agregue al néctar, sin embargo, se muestra una baja actividad de la enzima y esto puede ser debido a que la fresa es una de las frutas con menos contenido de pectina, por lo tanto, hay poco sustrato para la enzima. Se ha demostrado una mayor actividad de la pectinmetilesterasa en fresa verde y una disminución alcanzando su grado de madurez (Draye y Van Cutsem, 2008). La mayor fracción péctica en fresa es pectina soluble en oxalato, la cual no es usual en otras frutas como la manzana (Contreras y cols., 2005). Esta fracción de pectina de baja esterificación puede favorecer la unión del calcio y formar una estructura de reticulación (Sirisomboon y cols., 2001). Por lo tanto, la pectinmetilesterasa en fresa desesterifica la pectina de una manera más lenta hasta el punto que pueda servir de sustrato para las enzimas pentín liasas (Yu y cols, 1996). Zhang y cols., (2018) obtuvieron una inhibición en la degradación de pectina soluble en fresa, utilizando ultrasonido + Ca.

Otra razón por la cual no pudo haber actividad de la enzima, es debido a las proteínas inhibidoras de pectinmetilesterasa, las cuales podrían estar presentes en cualquier etapa de maduración. Estos inhibidores, aunque todavía no se caracterizan en fresa, son bien conocidos en kiwi, papa y plátano (McMillan y Pérombelon, 1995).

No obstante, se observaron valores menores en el néctar pasteurizado, aunque no significativos. Osorio (2008) consiguió una reducción de 5.4% en

pectinmetilesterasa, utilizando un tratamiento térmico a 90°C por 20 segundos en puré de fresa, mostrando una menor resistencia al calor que la polifenoloxidasa. Inactivación del 10% en tomate de árbol con un tratamiento térmico de 60°C por 2 segundos (Maca y cols., 2013).

Las enzimas son sensibles a la activación o desactivación en el proceso de ultrasonido. Los cambios en la actividad enzimática pueden depender de los parámetros operativos del ultrasonido, las propiedades de los medios, la composición de los aminoácidos y la estructura conformacional de la enzima (Özbek y Ülgen 2000; Kadkhodae y Povey 2008), es por eso que elegir los parámetros apropiados pueden mejorar la inactivación enzimática. Amador-Espejo y cols., (2020) comentan que la amplitud y temperatura fueron parámetros importante para la actividad de la pectinmetilesterasa y cuando fue aplicada una amplitud de 80 y 85%; 40, 47.5 y 55 °C a los diferentes tiempos de 15, 20 y 25 minutos, la actividad de la enzima disminuyó de 0.12 a 0.09 UPME/mL, lo cuál no fue observado en amplitudes por debajo de 80%. Wang y cols., (2012) informaron que la actividad enzimática mejora con el aumento de la potencia ultrasónica. Abid y cols., (2014) observaron una inactivación considerable de pectinmetilesterasa en jugo de manzana termosonicado debido a las altas temperatura aplicadas (60 °C). La inactivación de la enzima depende del tiempo y temperatura del tratamiento. En el néctar de fresa no se logró una inactivación de la pectinmetilesterasa, por lo que es posible que al aplicar una amplitud y temperatura mayor se pudiera lograr un porcentaje de reducción.

Cuadro 7. 3 Efecto de la termosonicación en actividad enzimática

Tratamientos	Polifenoloxidasas (UAE/min/mL)	Pectinmetilesterasa (UPME/mL)
(0/70)	2.296 ± 0.387 <sup>ab</sup>	0.187 ± 0.030 <sup>ac</sup>
(10/70)	2.706 ± 0.435 <sup>a</sup>	0.258 ± 0.008 <sup>df</sup>
(20/70)	2.886 ± 0.566 <sup>a</sup>	0.287 ± 0.014 <sup>f</sup>
(0/80)	2.396 ± 0.491 <sup>ab</sup>	0.148 ± 0.005 <sup>bc</sup>
(10/80)	2.920 ± 0.590 <sup>a</sup>	0.224 ± 0.031 <sup>ad</sup>
(20/80)	2.830 ± 0.287 <sup>a</sup>	0.218 ± 0.023 <sup>ad</sup>
C (0/0)	2.400 ± 0.708 <sup>a</sup>	0.116 ± 0.007 <sup>be</sup>
C (10/0)	2.466 ± 0.448 <sup>ab</sup>	0.133 ± 0.009 <sup>bce</sup>
C (20/0)	2.950 ± 1.213 <sup>ab</sup>	0.305 ± 0.041 <sup>f</sup>
P (0/0)	0.683 ± 0.152 <sup>b</sup>	0.082 ± 0.004 <sup>e</sup>
P (10/0)	1.550 ± 0.926 <sup>ab</sup>	0.173 ± 0.006 <sup>abc</sup>
P (20/0)	2.300 ± 0.563 <sup>ab</sup>	0.219 ± 0.024 <sup>ad</sup>

Los resultados se expresan como la media ± desviación estándar (n=3). Diferentes letras en la misma columna son significativamente diferentes (p<0.05). Letras iguales no muestran diferencias significativas. (0/70): 0% pulpa/aqueño y 70%; (10/70): 10% pulpa/aqueño y 70%; (20/70): 20% pulpa/aqueño y 70%; (0/80): 0% pulpa/aqueño y 80%; (10/80): 10% pulpa/aqueño y 80%; (20/80): 20% pulpa/aqueño y 80%; C (0/0): 0% pulpa/aqueño; C (10/0): 10% pulpa/aqueño; C (20/0): 20% pulpa/aqueño; P (0/0): 0% pulpa/aqueño; P (10/0): 10% pulpa/aqueño; P (20/0): 20% pulpa/aqueño. C= CONTROL, P= PASTEURIZADO.

## **7.4. Efecto de la termosonicación en los compuestos bioactivos**

### **7.4.1. Fenoles solubles totales**

En el cuadro 7.4 se tienen los resultados de fenoles solubles totales donde se pudo observar un aumento gradual al agregar los diferentes porcentajes de pulpa/aquenio, valores que van de 9.061 a 20.017 mg EAG/g en néctar termosonicado, lo cual puede ser atribuido al aquenio donde hay una mayor concentración de ácido elágico (Aaby, y cols., 2007). La diferencia entre el néctar fresco, pasteurizado y termosonicado fue notoria pero no significativa ( $p > 0.05$ ).

Los compuestos fenólicos tienen un papel importante en la mejora del estado de salud de los seres humanos al ayudar a reducir los factores de riesgo asociados con diversas enfermedades fisiológicas y degenerativas (Aadil y cols., 2015), son reconocidos por sus efectos antiinflamatorios, antioxidantes, antimutagénicos y antitumorales, por lo que su ingesta es altamente recomendada para el mantenimiento de la buena salud (Lajolo & Mercadante, 2018).

Factores como tiempo, temperatura y amplitud pueden afectar o incrementar el contenido de los compuestos fenólicos. Cruz-Cansino y cols., (2021) en néctar de jaca encontraron una reducción de compuestos fenólicos conforme se aumentaba la temperatura de 38 °C a 52 °C, por 13 a 27 min y amplitud de 80%. Aadil y cols., (2015) en jugo de uva obtuvieron un incremento de estos compuestos respecto al control utilizando un tiempo de 60 min a 60 °C con 70% amplitud.

Cuadro 7.4 Efecto de la termosonicación en los compuestos bioactivos del néctar de fresa

Tratamientos	Fenoles solubles totales (mg EAG/g)	Antocianinas (mg Cy3gl/g)	Ácido ascórbico (mg EAA/g)
(0/70)	9.777 ± 0.842 <sup>abc</sup>	54.920 ± 2.801 <sup>bc</sup>	154.571 ± 7.564 <sup>cd</sup>
(10/70)	15.318 ± 2.454 <sup>de</sup>	78.051 ± 6.682 <sup>ef</sup>	193.475 ± 10.332 <sup>e</sup>
(20/70)	20.017 ± 2.824 <sup>e</sup>	70.135 ± 4.013 <sup>de</sup>	225.504 ± 10.209 <sup>f</sup>
(0/80)	9.061 ± 0.383 <sup>a</sup>	41.932 ± 2.801 <sup>ab</sup>	165.819 ± 6.368 <sup>d</sup>
(10/80)	13.700 ± 2.025 <sup>abcd</sup>	62.713 ± 5.491 <sup>cd</sup>	182.362 ± 7.204 <sup>e</sup>
(20/80)	18.810 ± 0.742 <sup>de</sup>	111.325 ± 8.906 <sup>g</sup>	249.854 ± 18.661 <sup>g</sup>
C (0/0)	11.508 ± 1.870 <sup>abc</sup>	31.542 ± 3.578 <sup>a</sup>	131.808 ± 2.186 <sup>b</sup>
C (10/0)	15.042 ± 2.259 <sup>bcde</sup>	30.058 ± 2.945 <sup>a</sup>	140.543 ± 11.570 <sup>bc</sup>
C (20/0)	20.981 ± 1.624 <sup>e</sup>	92.029 ± 2.801 <sup>f</sup>	190.566 ± 7.803 <sup>e</sup>
P (0/0)	9.136 ± 0.915 <sup>ab</sup>	33.026 ± 2.570 <sup>a</sup>	32.793 ± 0.927 <sup>a</sup>
P (10/0)	15.233 ± 2.653 <sup>cde</sup>	65.311 ± 1.700 <sup>cde</sup>	33.137 ± 1.564 <sup>a</sup>
P (20/0)	19.068 ± 2.572 <sup>cde</sup>	55.662 ± 5.101 <sup>bc</sup>	29.193 ± 2.641 <sup>a</sup>
Pulpa/aqueño	51.668 ± 1.328 <sup>f</sup>	152.516 ± 5.101 <sup>h</sup>	373.193 ± 11.705 <sup>h</sup>
Aqueño (Ariza y cols., 2016)	382.87 ± 4.69 mg GAE/g	6.97 ± 0.79 mg Pel-glc/g)	34.7 mg/ 100 g de AA

Los resultados se expresan como la media ± desviación estándar (n=3). Diferentes letras en la misma columna son significativamente diferentes (p<0.05). Letras iguales no muestran diferencias significativas. (0/70): 0% pulpa/aqueño y 70%; (10/70): 10% pulpa/aqueño y 70%; (20/70): 20% pulpa/aqueño y 70%; (0/80): 0% pulpa/aqueño y 80%; (10/80): 10% pulpa/aqueño y 80%; (20/80): 20% pulpa/aqueño y 80%; C (0/0): 0% pulpa/aqueño; C (10/0): 10% pulpa/aqueño; C (20/0): 20% pulpa/aqueño; P (0/0): 0% pulpa/aqueño; P (10/0): 10% pulpa/aqueño; P (20/0): 20% pulpa/aqueño. C= CONTROL, P= PASTEURIZADO.

Sobre la degradación de estos compuestos algunas teorías proponen que puede deberse al colapso de burbujas microscópicas producidas por la cavitación y la oportuna formación de radicales libres; por esta razón, los antioxidantes actúan sobre estos radicales libres y disminuyen su propia concentración (Dubrovic y cols., 2011). También, se ha reportado que varios polifenoles son termosensibles (Alves y cols., 2020), esto podría explicar porque se encontró un mayor contenido en el néctar fresco y en el termosonicado (50 °C) respecto al néctar pasteurizado (63 °C).

Se observó un comportamiento similar en jugos de grosella espinosa (Ordóñez-Santos y cols., 2017) y jugo de agracejo (Origen Japón) (Hashemi y cols., 2018).

El comportamiento del contenido de compuestos fenólicos en el néctar de fresa posiblemente se debió a la temperatura de salida de los néctares termosonicados que degradó los fenoles o a que el tiempo pudo ser poco para una buena extracción como lo reportan en jugo de fresa sonicado (20 kHz; 50%; 400 W; 4, 8, 12 y 16 min) Wang y cols., (2019).

#### **7.4.2. Antocianinas**

Las antocianinas son pigmentos naturales que se encuentran en los alimentos; los cuales tienen actividad antioxidante y contribuyen al color de frutas y verduras. Sus colores van desde el rojo, el morado o el azul (Finley y cols., 2018). El contenido de antocianinas (Cuadro 7.4) incrementó conforme se incrementó el contenido de pulpa/ aquenio alcanzando hasta  $111.325 \pm 8.906$  mg Cy3gl/gr en el tratamiento "20/80". Aaby, y cols., (2007) reportan un mayor contenido de este compuesto en el aquenio, siendo las principales antocianinas la pelargonidina 3-glucósido y cianidina 3-glucósido. En el néctar control se observó un contenido bajo a comparación de los tratamientos, esto se debe al mecanismo de cavitación presente en la termosonicación, lo que conduce a una mejor extracción de los materiales unidos a las células y al hecho de emplear una menor temperatura que mejora la extracción (Sasikumar y cols., 2019). Por otra parte, cuando se tiene una alta actividad enzimática de la polifenoloxidasas el contenido de antocianinas es menor debido a que en presencia de esta enzima el compuesto tiende a degradarse (Patras y cols. 2010). Esta puede ser una razón por la cual no haya existido una degradación de este compuesto bioactivo entre los tratamientos de termosonicación, ya que la actividad de esta enzima en la fresa es poca. Sin embargo, en el néctar pasteurizado se observó un contenido menor a diferencia de los termosonicados, esto puede estar directamente relacionado a una degradación de las antocianinas debido a la temperatura del tratamiento térmico. En este sentido, diversos estudios han

demostrado que las antocianinas presentan mayores tasas de degradación a temperaturas en el intervalo de 65-90 °C (Wang y Xu 2007) para jugo de fresa (Menelli y cols., 2021) y jugo de khoonphal (Fruta de sangre, originaria del sureste de Asia) (Sasikumar y cols., 2019).

Adicionalmente, la temperatura y tiempo (temperaturas moderadas de 40 a 50°C y tiempos medios de 10 a 30 minutos) a utilizar en los tratamientos son indispensables para la buena extracción de las antocianinas. do Amaral Souza y cols., 2019 en néctar de camu-camu en baño ultrasónico (40 kHz; 40, 50 y 60 °C; 30 y 60 min) obtuvieron una mejor extracción cuando se utilizó una temperatura de extracción de 40 y 50 °C por 30 min, al momento de aumentar la temperatura a 60 °C por 60 min se tuvo un resultado similar al néctar control.

### **7.4.3. Ácido ascórbico**

El ácido ascórbico es uno de los indicadores más utilizados para evaluar la calidad nutricional general de diferentes tipos de alimentos. Es el menos estable entre todas las vitaminas, ya que se destruye fácilmente durante el procesamiento o almacenamiento debido a la exposición al calor, la luz y el oxígeno (Cassani y cols., 2020; C. X. Cheng y cols., 2020).

Se pudo observar (Cuadro 7.4) en el tratamiento convencional que implica calor, una importante reducción del 82% aproximadamente en el ácido ascórbico, respecto al néctar control (190.566 a 33.137 mg EAA/g). La degradación del ácido ascórbico es mediada por la presencia de oxígeno y la aplicación de calor (Aadil y cols., 2013). Cuando el néctar se trató con ultrasonido y una temperatura moderada (50 °C) se observaron valores mayores y similares al control ( $p > 0.05$ ) y también un aumento conforme se incrementaba el porcentaje de pulpa/ aquenio. Aaby y cols., (2007) hacen mención a un contenido mayor en ácido ascórbico en pulpa y aquenio de fresa (34.7 mg/ 100 g de AA) en comparación del jugo (6.7 mg/ 100 g de AA), lo

cual confirma lo observado en el cuadro 7.5 donde la cantidad de ácido ascórbico en el aquenio fue mayor ( $373.193 \pm 11.705$  mg EAA/g). Asimismo, el aumento en los niveles de ácido ascórbico como resultado de la termosonicación puede deberse a la eliminación de moléculas de oxígeno atrapadas en el jugo (Abid y cols., 2014) y el uso de temperaturas menores en el tratamiento, es uno de los factores que determinan la estabilidad del ácido ascórbico. También, puede existir un efecto de rompimiento de estructuras dentro del aquenio que contenga ácido ascórbico, lo cual explica que a las mismas concentraciones de pulpa/aquenio, la concentración es superior en los néctares tratados con termosonicación.

Se sabe que los parámetros acústicos (frecuencia, amplitud, intensidad, potencia y densidad de energía acústica), temperatura y tiempo de tratamiento son determinantes para los niveles de ácido ascórbico (Liao y cols., 2018). En este sentido, Anaya-Esparza y cols., (2016) conservaron el contenido de ácido ascórbico con un tratamiento de 10 minutos en néctar de guanábana (24 kHz; 400 W; 1.1, 1.2 y 1.4 W/mL; 34, 44 y 54 °C; 2, 6 y 10 min), lo cual atribuyeron a que la cavitación facilitó la eliminación del oxígeno disuelto en el medio, evitando la degradación del ácido ascórbico y contribuyendo así a la estabilidad del compuesto en algunas muestras termosonicadas. Alves y cols., (2020) en jugo de mandarina usando un baño ultrasónico (35 kHz; 750 W; 100%; 50 y 60 °C; 5 y 10 min), tuvieron un aumento en ácido ascórbico utilizando un tratamiento de 50 °C por 10 minutos, pero al realizar el tratamiento a 60 °C se pudo observar una disminución con respecto al control. De igual manera, el tiempo de procesamiento puede favorecer la degradación de este micronutriente durante la termosonicación (Wang y cols., 2019). La aplicación de ultrasonidos en sistemas de fluidos conduce a la formación de radicales libres. La generación excesiva de OH<sup>-</sup> por cavitación puede inducir la oxidación del ácido ascórbico y reducir su contenido (Lee y cols., 2013).

Liao y cols., (2018), menciona que las temperaturas de 50 y 60 °C utilizadas en la termosonicación, con tiempos de tratamiento relativamente cortos (5 a 10 min), contribuyen al mantenimiento de la concentración de ácido ascórbico, así que el aumento del ácido ascórbico en los tratamientos se podría atribuir a las



temperaturas moderadas, tratamientos cortos y a la de cavitación que facilita la eliminación de oxígeno, así como la pulpa y aquenio que se le agrega al néctar.

#### **7.4.4. Capacidad antioxidante (ABTS, DPPH y FRAP)**

Debido a la diversidad de compuestos antioxidantes que actúan a través de diferentes mecanismos, se recomienda utilizar más de una técnica para estimar la capacidad antioxidante de un alimento, y obtener un resultado más confiable (Cömert & Gökmen, 2018). Por esto se determinó la capacidad antioxidante por tres métodos ABTS, FRAP y DPPH (Cuadro 7.5), donde se evaluó la capacidad que tienen los compuestos bioactivos presentes para estabilizar a los radicales libres y la quelación de iones metales que contribuyen a la formación de los radicales libres.

En las tres metodologías utilizadas para medir la capacidad antioxidante se pudo observar un aumento gradual conforme se incrementaban los diferentes porcentajes de pulpa/aquenio y en efecto el aquenio por sí solo tuvo un contenido mayor. Teniendo en cuenta que el 90% del peso total de la fruta fresca es agua, los aquenios representan el 7.5% del peso seco total de la fruta (Aaby y cols., 2005), Ariza y cols., (2016) utilizaron estas cifras para calcular la contribución relativa de los aquenios y la pulpa al contenido y la capacidad de antioxidantes en una fruta entera en base a su estimación en pulpa y aquenio en fresa no digerida, teniendo para la pulpa el 47% en FRAP, 55% DPPH y 19% ABTS, mientras que en aquenio se obtuvo 53% para FRAP, 45% DPPH y 81% ABTS. Lo cual confirma un mayor contenido de estos compuestos antioxidantes en el aquenio y se reflejó en un aumento paulatino en los tratamientos al momento de agregar los diferentes porcentajes.

Se pudo observar un aumento en las determinaciones de ABTS, FRAP y DPPH en los tratamientos de termosonicación aplicados con respecto al control, pero sin diferencias significativas ( $p > 0.05$ ). En este sentido, se ha informado de un aumento similar con la condición del tratamiento en el jugo de zanahoria (24 kHz,

120  $\mu\text{m}$ , 50, 54 y 58  $^{\circ}\text{C}$ ; 10 min) (Martínez y cols., 2015). Otros autores asocian el aumento de la actividad antioxidante con la disminución de la formación de radicales hidroxilos libres durante la termosonicación en el componente de jugo (Muzaffar y cols., 2016). De igual manera el tener un aumento no significativo puede estar asociado a que se tuvo un contacto con un alto nivel de estos radicales durante un período más prolongado y eso tiene un impacto perjudicial sobre la actividad antioxidante (Qureshi y cols., 2020).

De entre las pruebas aplicadas a una misma muestra, la prueba ABTS obtuvo un mayor contenido a comparación con las pruebas FRAP y DPPH. Esto puede deberse a que la prueba ABTS determina la actividad antioxidante no solo de compuestos hidrofílicos sino también de lipofílicos, en comparación con la prueba DPPH que solo determina en compuestos hidrofílicos (Kuskoski y cols., 2005). Asimismo, la prueba FRAP puede reducir diferentes antioxidantes no enzimáticos como es el caso de vitamina C (ácido ascórbico) y ácido úrico, entre otros; pero no mide los antioxidantes, tal como el glutatión, ácido lipoico y algunos aminoácidos (Londoño, 2012).

Cuadro 7. 5 Efecto de la termosonicación en la capacidad antioxidante

Tratamientos	ABTS (mmol ET/g)	FRAP (mmol ET/g)	DPPH (mmol ET/g)
(0/70)	85.011 ± 7.590 <sup>a</sup>	35.869 ± 5.845 <sup>ab</sup>	7.604 ± 2.242 <sup>ab</sup>
(10/70)	116.660 ± 10.330 <sup>b</sup>	57.531 ± 1.980 <sup>c</sup>	18.726 ± 3.721 <sup>c</sup>
(20/70)	194.387 ± 10.678 <sup>c</sup>	61.100 ± 5.643 <sup>c</sup>	44.449 ± 6.031 <sup>f</sup>
(0/80)	78.734 ± 1.143 <sup>a</sup>	35.026 ± 3.898 <sup>ab</sup>	8.434 ± 0.867 <sup>ab</sup>
(10/80)	118.818 ± 12.680 <sup>b</sup>	49.518 ± 7.464 <sup>bc</sup>	22.689 ± 2.864 <sup>cd</sup>
(20/80)	191.010 ± 15.168 <sup>c</sup>	61.617 ± 6.606 <sup>c</sup>	38.034 ± 3.754 <sup>ef</sup>
C (0/0)	78.328 ± 2.346 <sup>a</sup>	31.411 ± 3.599 <sup>a</sup>	2.873 ± 1.137 <sup>a</sup>
C (10/0)	121.982 ± 8.654 <sup>b</sup>	55.932 ± 6.768 <sup>c</sup>	16.385 ± 3.135 <sup>bc</sup>
C (20/0)	184.910 ± 13.613 <sup>c</sup>	58.998 ± 1.436 <sup>c</sup>	36.932 ± 4.284 <sup>e</sup>
P (0/0)	77.974 ± 7.577 <sup>a</sup>	33.599 ± 5.976 <sup>a</sup>	5.635 ± 1.282 <sup>af</sup>
P (10/0)	142.776 ± 4.035 <sup>b</sup>	53.396 ± 1.286 <sup>c</sup>	29.129 ± 1.345 <sup>de</sup>
P (20/0)	194.546 ± 12.640 <sup>c</sup>	58.022 ± 0.870 <sup>c</sup>	34.554 ± 3.896 <sup>ef</sup>
Pulpa/aqueño	1147.332 ± 73.465 <sup>d</sup>	251.805 ± 30.840 <sup>d</sup>	125.312 ± 6.107 <sup>g</sup>
Aqueño (Ariza y cols., 2016)	1236.015 ± 0.39	642.627 ± 0.92	595.575 ± 0.09 mmol ET/g

Los resultados se expresan como la media ± desviación estándar (n=3). Diferentes letras en la misma columna son significativamente diferentes (p<0.05). Letras iguales no muestran diferencias significativas. (0/70): 0% pulpa/aqueño y 70%; (10/70): 10% pulpa/aqueño y 70%; (20/70): 20% pulpa/aqueño y 70%; (0/80): 0% pulpa/aqueño y 80%; (10/80): 10% pulpa/aqueño y 80%; (20/80): 20% pulpa/aqueño y 80%; C (0/0): 0% pulpa/aqueño; C (10/0): 10% pulpa/aqueño; C (20/0): 20% pulpa/aqueño; P (0/0): 0% pulpa/aqueño; P (10/0): 10% pulpa/aqueño; P (20/0): 20% pulpa/aqueño. C= CONTROL, P= PASTEURIZADO

En los tratamientos de termosonicación la interacción de temperatura-tiempo influye en la actividad antioxidante. En relación con esto, Sasikumar y cols., (2019) observaron que el jugo de khoonphal (20 kHz; 700 W; 100%; 40, 45, 50 y 60 °C; 9, 16, 21, 26 y 31 min) sonicado a 50 °C durante 21 min mostró retención de todos estos componentes funcionales del alimento al igual que el tratamiento a temperaturas más bajas, posteriormente se observó una disminución en los

tratamientos realizados con temperaturas mayores (60 °C). Las altas temperaturas o la exposición prolongada a tratamientos de conservación pueden degradar compuestos bioactivos como los compuestos fenólicos. Sin embargo, según Cheng y cols., (2014) y Tomadoni y cols., (2017), mencionan que un paso de escaldado tuvo un efecto positivo sobre el contenido de compuestos fenólicos y la conservación de la capacidad antioxidante.

### **7.5. Efecto de la termosonicación en la inactivación de *Escherichia coli***

Para esta etapa se evaluó la inactivación de *E. coli* por termosonicación donde se seleccionó el tratamiento a aplicar mediante una superficie de respuesta, dando como resultado el tratamiento 20% pulpa/aqueño y 80% de amplitud. En este análisis, se emplearon las variables de respuesta de los compuestos bioactivos, debido a que las demás variables no mostraron diferencias significativas entre tratamientos.

El reducir al menos 5 Log de las bacterias indicadoras como *E. coli*, como una etapa necesaria en un plan HACCP, dio paso a la implementación de diversas tecnologías emergentes que pudieran alcanzar este objetivo en los alimentos (Demir y Kiliñç, 2019).

#### **7.5.2. Inactivación en néctar.**

La carga inicial de la bacteria fue de  $6.525 \pm 0.007$  Log UFC/mL, el néctar fue almacenado por 10 días a 6 °C, realizando los análisis microbiológicos en el día 0, 5 y 10. En la Figura 7.1 pueden observarse los resultados obtenidos en esta etapa, en donde el pasteurizado no fue mostrado debido a que no fue detectada carga bacteriana desde el día 0. El tratamiento térmico (50 °C por 8 min) tuvo una disminución respecto al néctar control, aunque no significativa. Finalmente, el

termosonicado a 50 °C por 8 minutos en el día 0 logró 1 Log UFC/mL de letalidad, lo cual indica la diferencia entre solo aplicar temperatura (50 °C) y el aplicar el ultrasonido más la temperatura (50 °C), la inactivación de la población microbiana por termosonicación podría atribuirse al fenómeno de cavitación que proporciona efectos mecánicos generando así alta presión y temperatura localizadas requeridas para la lisis celular, y reduciendo la aplicación de la temperatura externa requerida para la inactivación microbiana en comparación con el tratamiento térmico convencional (Lee y cols., 2009). No obstante, 1 Log de letalidad no es suficiente para lograr el criterio que impone la FDA. En este sentido, Demir y Kiliç, (2019) obtuvieron una letalidad de 2.98 log de *E. coli* K-12 (ATCC 25253) en jugo de calabaza a 60 °C por 9 minutos. Durante el almacenamiento de las muestras tratadas, al día 5 se observó una reducción de la bacteria en todas las muestras de néctar, pero teniendo un menor recuento en el néctar termosonicado ( $1.22 \pm 0.04$  Log UFC/mL), al día 10 solo fue analizado el néctar termosonicado, sin mostrar diferencias significativas con respecto al día 5. Esta reducción de la población del microorganismo a través de los días puede estar ligada a la matriz del alimento, ya que es observada tanto el néctar control, como en térmico y en el termosonicado. Recordando que el néctar con 20% pulpa/aqueno y tratado con 80% amplitud es el que tiene un mayor contenido de ácido ascórbico ( $249.854 \pm 18.661$  mg EAA/gr) la inactivación observada a través de los días de almacenamiento podría atribuirse a este contenido. En este sentido, algunos estudios han informado sobre el efecto antimicrobiano del ácido ascórbico (Akbas y Ölmez, 2007; Tajkarimi e Ibrahim, 2011). Además, Park, Olawuyi y Lee (2021) muestran un estudio de jugo de caqui blando al cual le agregaron diferentes porcentajes de ácido ascórbico, observaron una mayor reducción de *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Listeria monocytogenes* (NCCP 10943) (5.17 y 4.35 log UFC / mL, respectivamente) en jugo con 1% de ácido ascórbico, el cual fue sometido a un tratamiento de 50 °C, 30 minutos, 100% amplitud, 600 W y 100 kHz. Por otro lado, Lancombe y cols., (2010), atribuyen a las antocianinas y a los compuestos fenólicos la destrucción de la membrana celular externa de *Escherichia coli* O157:H7. Lucas Bautista (2017) observó poder antimicrobiano en extractos de antocianinas de fresa contra bacterias fitopatógenas

como *Xanthomonas vesicatoria* y *Pseudomonas syringae*, siendo la pelargonidina 3-glucósido y la cianidina 3-glucósido las principales responsables en esta inactivación. La cianidina 3-glucósido inhibe la secreción de las toxinas que intervienen en la patogénesis de *Helicobacter pylori* (Kim y cols.,2012). Cabe resaltar que este tratamiento también resultó con el contenido más alto de antocianinas ( $111.325 \pm 8.906$  mg Cy3gl/g)

Otro factor que puede influir de manera positiva en la inactivación del microorganismo puede ser el pH, ya que el néctar ronda en un pH de 3.88, mientras que el buffer un pH neutro de 7.2, *E. coli* no logra sobrevivir bien en condiciones ácidas, debido a su alta sensibilidad al pH (Ray 2019).

### **7.5.2. Inactivación en buffer PBS**

Para corroborar que la matriz tiene un efecto en la inactivación, se inoculó la bacteria y se realizaron los tratamientos al igual que en el néctar (Figura 7.2). La resistencia de la bacteria en el tratamiento se puede observar, ya que entre el recuento del buffer termosonicado y el tratado térmicamente no hay diferencias significativas al día 0 y durante el almacenamiento en el día 5 y 10 los recuentos se mantuvieron igual. Uno de los factores que pudieron contribuir a esta permanencia en los recuentos es el pH del buffer utilizado, si bien el néctar tiene un pH ácido y eso ayuda a una reducción, en el caso del buffer, este cuenta con un pH neutro debido al uso de diferentes sales para su elaboración, *E. coli* es bastante tolerante a la presencia de sales (Miranda, 2017) y finalmente, en el almacenamiento en refrigeración esta bacteria también es muy resistente (Miranda, 2017). Infante y cols., (2012), mencionan que una solución salina a 0.9% permite el desarrollo de bacterias con potencial patógeno. Por otro lado, Gómez y cols., (2014), argumentan que *E. coli* es capaz de asociarse a la cristalización de NaCl y modular el desarrollo y crecimiento de cristales y estos usarlos como una barrera de protección.

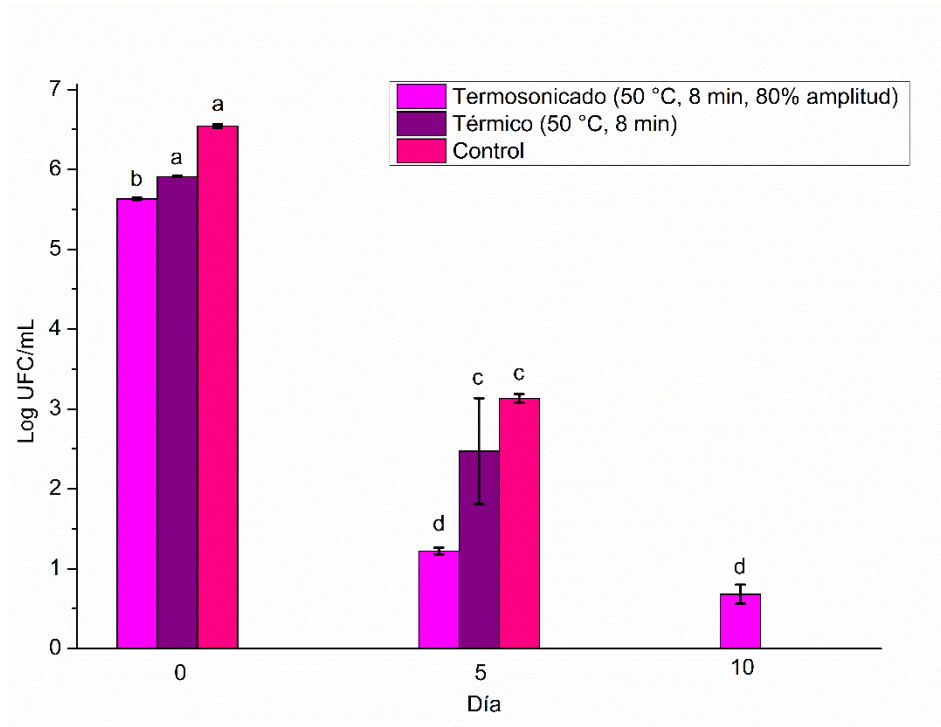


Figura 7.1 Recuentos de *Escherichia coli* en néctar durante almacenamiento en refrigeración a 6 °C. Los valores son promedio de tres determinaciones de dos diferentes experimentos ( $n = 6$ )  $\pm$  desviación estándar (SD). Letras minúsculas distintas indica diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0.05$ ). Letras iguales no muestran diferencias significativas.

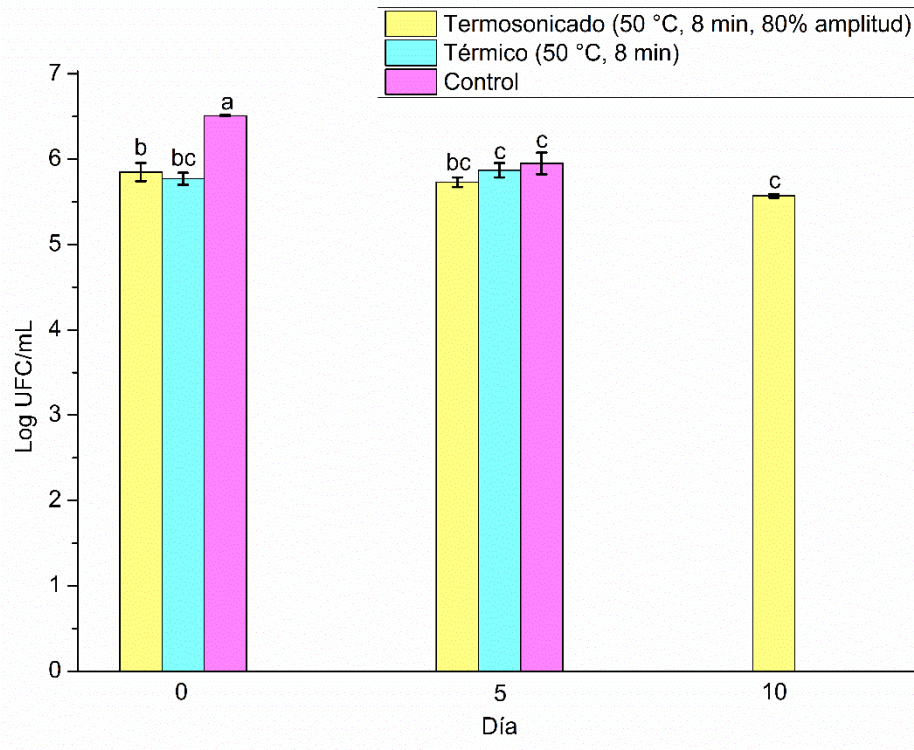


Figura 7. 2 Recuentos de *Escherichia coli* en buffer fosfato pH 7.2 en almacenamiento a 6 °C. Los valores son promedio de tres determinaciones de dos diferentes experimentos (n = 6) ± desviación estándar (SD). Letras minúsculas distintas indica diferencias significativas entre tratamientos (p < 0.05). Letras iguales no muestran diferencias significativas.

### 7.5.3. Cinética de reducción de *Escherichia coli*

Debido a que el tratamiento de termosonicación con 50 °C de temperatura de salida y 8 minutos solo fue suficiente para obtener una reducción de 1 log UFC/mL, se realizó una cinética propuesta para lograr una mayor reducción en *E. coli*, utilizando la misma temperatura incrementando el tiempo de tratamiento que se llevó hasta 20 minutos, analizando la muestra cada 4 minutos. En este estudio, se pudo observar (Figura 7.3) que se comenzó con una carga bacteriana de 6.696 Log UFC/mL. En el minuto 4 y 8 la reducción es estadísticamente igual, a partir del



minuto 12, se comenzó a evidenciar una reducción más notoria de 2 log UFC/mL y ya para el minuto 20 se obtuvo una letalidad de 4.15 log UFC/mL. Es por eso que para lograr una reducción de 5 Log UFC/mL como lo expone la FDA, es necesario aumentar el tiempo de tratamiento, Bermúdez & Barbosa, (2012) exponen que se puede lograr el objetivo por la FDA extendiendo el tiempo de exposición de 20 a 40 minutos. Asimismo, otra opción para incrementar la letalidad es aumentar la temperatura de tratamiento, ya que se ha informado que la termosonicación a temperaturas más altas proporciona sinergismo entre la sonicación y el calor al aumentar la sensibilidad microbiana al calor y al pH bajo debido a la cavitación y los cambios en la membrana externa de la estructura celular (Wordon y cols., 2012). Sin embargo, el aumentar la temperatura puede traer una disminución de compuestos bioactivos ya que en su mayoría son termolábiles, por lo tanto, se debe encontrar un balance entre estos dos factores. Sasihumar y cols., (2019) en jugo de khoonpahl lograron una letalidad de  $5.183 \pm 0.13$  Log UFC/mL en *E. coli* (MCC 452) y  $5.934 \pm 0.10$  en *S. cerevisiae* (MCC 1036) con un tratamiento de 50 °C por 21 minutos, 100% amplitud y 700 W. Igualmente, los autores mencionan en su estudio que la termosonicación a 50 °C durante 21 minutos no afectó las cualidades funcionales del jugo.

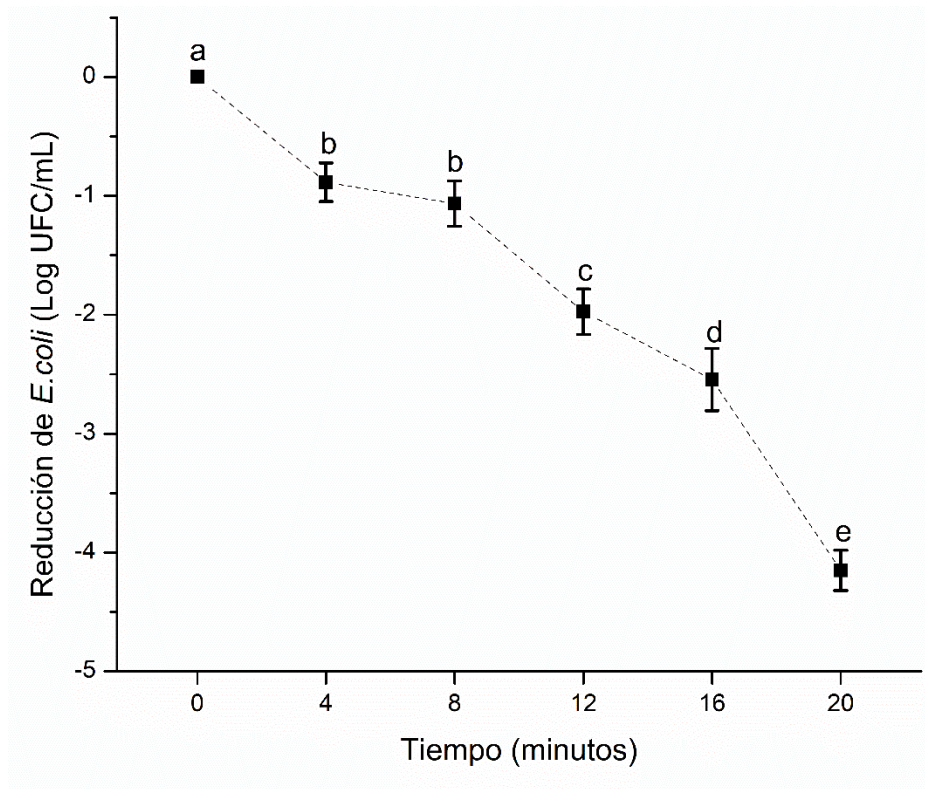


Figura 7. 3 Cinética de *Escherichia coli*. Los valores son promedio de tres determinaciones de dos diferentes experimentos ( $n = 6$ )  $\pm$  desviación estándar (SD). Letras minúsculas distintas indica diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0.05$ ). Letras iguales no muestran diferencias significativas.

Una vez realizada la cinética de inactivación se ajustó a un modelo matemático, el cual consistió en una regresión simple y como variables la letalidad y el tiempo de tratamiento. Cabe mencionar que no se aplicó una regresión múltiple debido a que se daba un “fenómeno de confusión”, el cual modifica la relación entre la variable independiente que es el tiempo de tratamiento y la dependiente que es la letalidad. El modelo ajustado a la cinética de reducción fue:

$$\text{Letalidad} = -0.1329 + 0.1903 * X$$

En la Figura 7.4 se muestra la regresión de este modelo en donde la pendiente se encontró inclinada hacia arriba, lo cual indicó que se tuvo una pendiente positiva, o sea que, conforme se aumentan los minutos de tratamiento, la letalidad también

incrementa, con una relación proporcional. Con un coeficiente de correlación de Pearson de  $r=0.9724$ , la  $r^2$  explica la variabilidad que tendrá la letalidad de acuerdo al tiempo, teniendo  $r^2=0.9457$ . De las variables estudiadas, el tiempo explica un 94.57% de variabilidad de la letalidad y el porcentaje restante (5.43%) es de aquellas variables que por alguna u otra razón no se agregaron al modelo como la potencia efectiva y temperatura. Finalmente, se tiene una  $r^2$  ajustada= $0.9321$ , mayor a 0.7, lo cual nos indicó una buena calidad del modelo ajustado.

En la Figura 7.5 se observa la curva de supervivencia microbiana experimental y comparada con la curva resultante del modelo de regresión aplicado. En esta Figura, la letalidad real y la predicha presentan cierta diferencia, según el modelo de predicción, hasta el minuto 28 se tendría una reducción de 5.1951 Log UFC/mL, mientras que, en la curva experimental, en el minuto 20 se obtuvo una inactivación cercana al valor requerido por FDA. Sin embargo, estos resultados pueden estar influenciados por la matriz tratada, debido a que los sistemas alimentarios reales pueden influir en la resistencia térmica de los microorganismos (Knorr y cols., 2011), lo cual el modelo matemático no considera, como lo informa Ávila-Sosa y cols., (2010).

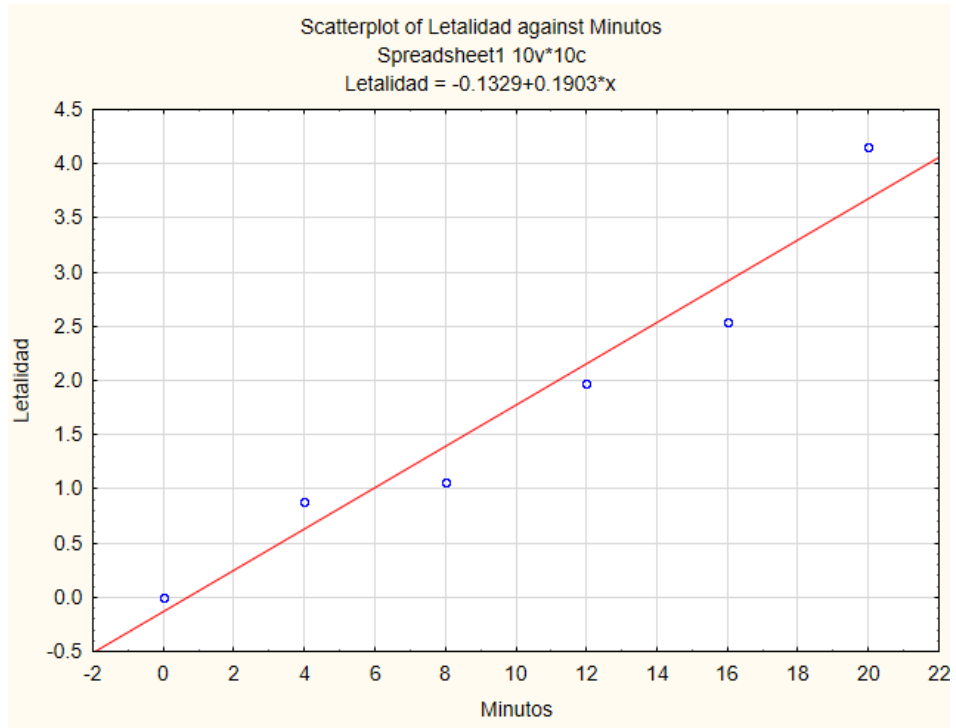


Figura 7. 4 Regresión lineal de letalidad

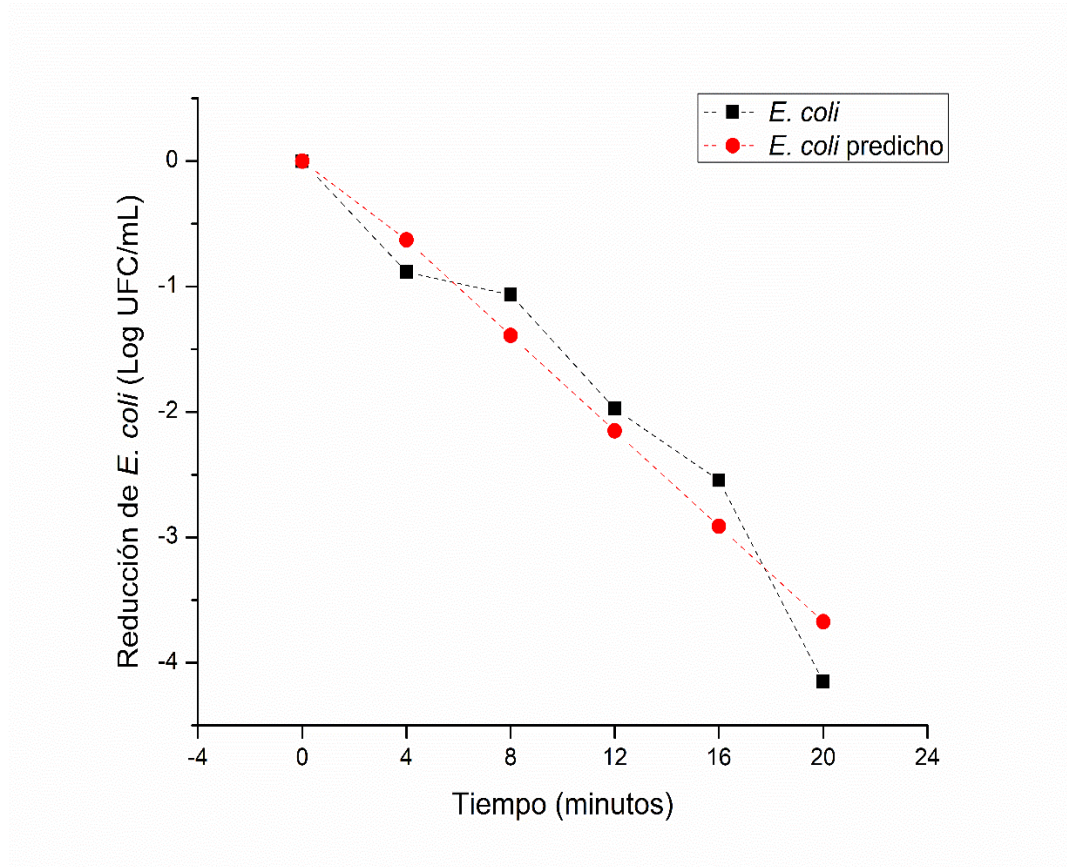


Figura 7. 5 Cinética en *E. coli* evaluada y predicha

## **CAPÍTULO 8. CONCLUSIONES**

## CAPÍTULO 8. CONCLUSIONES

La termosonicación en el néctar de fresa no mostró variaciones significativas en pH y sólidos solubles, pero sí en la acidez; mientras que, en las enzimas pectinmetilesterasa y polifenoloxidasa hubo una disminución, y en cuanto a la inactivación microbiana esta fue mayor en el tratamiento térmico, sin embargo, en los compuestos bioactivos se vio un aumento significativo en el néctar termosonicado, teniendo un impacto importante el aumento de pulpa/aqueño, resultando el tratamiento de 20% pulpa/aqueño y 80% amplitud el más eficaz. No obstante, la disminución de *E. coli* a través de los días de almacenamiento fue notoria, lo cual se atribuye a la matriz del alimento y el porcentaje de pulpa/aqueño, debido a que el tiempo de tratamiento de 8 minutos no fue suficiente para cumplir con lo que estipula la FDA. Cabe resaltar que con la propuesta de cinética de inactivación realizada y con el modelo al que se acopló, es necesario aplicar más de 20 minutos para lograr el objetivo de 5 Log UFC/mL.

Se recomienda seguir el estudio con tiempos de termosonicación más largos para ver el efecto sobre los compuestos bioactivos. También, llevar a cabo un estudio de vida útil y análisis sensorial. Asimismo, sería ideal realizar un estudio sobre los compuestos volátiles del néctar después del tratamiento y durante su almacenamiento.

## **CAPÍTULO 9. BIBLIOGRAFÍAS**



## CAPÍTULO 9. BIBLIOGRAFÍAS

Aaby, K., Skrede, G., & Wrolstad, R. E. (2005). Phenolic composition and antioxidant activities in flesh and achenes of strawberries (*Fragaria ananassa*). *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 53(10), 4032-4040.

Aaby, K., Wrolstad, R. E., Ekeberg, D., & Skrede, G. (2007). Polyphenol composition and antioxidant activity in strawberry purees; impact of achene level and storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(13), 5156-5166.

Aadil, R. M., Zeng, X. A., Han, Z., & Sun, D. W. (2013). Effects of ultrasound treatments on quality of grapefruit juice. *Food Chemistry*, 141(3), 3201–3206.

Aadil, R. M., Zeng, X. A., Zhang, Z. H., Wang, M. S., Han, Z., Jing, H., & Jabbar, S. (2015). Thermosonication: A potential technique that influences the quality of grapefruit juice. *International Journal of Food Science & Technology*, 50(5), 1275-1282.

Abid, M., Jabbar, S., Hu, B., Hashim, M. M., Wu, T., Lei, S., & Zeng, X. (2014). Thermosonication as a potential quality enhancement technique of apple juice. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21(3), 984-990.

Abid, M., Jabbar, S., Wu, T., Hashim, M. M., Hu, B., Lei, S., & Zeng, X. (2014). Sonication enhances polyphenolic compounds, sugars, carot- enoids and mineral elements of apple juice. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21(1), 93–97.

Adekunte, A. O., Tiwari, B. K., Cullen, P. J., Scannell, A. G. M., & O'donnell, C. P. (2010). Effect of sonication on colour, ascorbic acid and yeast inactivation in tomato juice. *Food Chemistry*, 122(3), 500-507.

Akbas, M., & Ölmez, H. (2007). Inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* on iceberg lettuce by dip wash treatments with organic acids. *Letters in Applied Microbiology*, 44(6), 619–624.

AOAC International. (2005). *Official methods of analysis of AOAC International*. AOAC International.

Augusto, P. E., Ibarz, A., & Cristianini, M. (2012). Effect of high pressure homogenization (HPH) on the rheological properties of tomato juice: Time-dependent and steady-state shear. *Journal of Food Engineering*, 111(4), 570-579.

Amador-Espejo, G. G., Chávez-Ocegueda, J., Cruz-Cansino, N., Suárez-Jacobo, A., Gutiérrez-Martínez, P., Valencia-Flores, D., & Velázquez Estrada, R. (2020). Thermosonication parameter effects on physicochemical changes, microbial and enzymatic inactivation of fruit smoothie. *Journal of Food Science and Technology*, 57(5), 1680–1688.

Anaya-Esparza, L. M., Méndez-Robles, M. D., Sayago-Ayerdi, S. G., García-Magaña, M. D. L., Ramírez-Mares, M. V., Sánchez-Burgos, J. A., & Montalvo-González, E. (2017). Effect of thermosonication on pathogenic bacteria, quality attributes and stability of soursop nectar during cold storage. *CyTA—Journal of Food*, 15, 592–600.

Anaya-Esparza, L. M., Velázquez-Estrada, R. M., Sayago-Ayerdi, S. G., Sánchez-Burgos, J. A., Ramírez-Mares, M. V., de Lourdes García-Magana, M., & Montalvo-González, E. (2017). Effect of thermosonication on polyphenol oxidase inactivation and quality parameters of soursop nectar. *LWT*, 75, 545-551.

Anaya-Esparza, L. M., Velázquez-Estrada, R. M., Roig, A. X., García-Galindo, H. S., Sayago-Ayerdi, S. G., & Montalvo-González, E. (2017). Thermosonication: An

alternative processing for fruit and vegetable juices. *Trends in food science & technology*, 61, 26-37.

Anaya-Esparza, L. M., Méndez-Robles, M. D., Pérez-Larios, A., Yahia, E. M., & Montalvo-González, E. (2018). Nutritional composition and physicochemical parameters of thermosonicated soursop nectar. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 21, 5–13.

Alighourchi, H., Barzegar, M., Sahari, M. A., & Abbasi, S. (2014). The effects of sonication and gamma irradiation on the inactivation of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* in pomegranate juice. *Iranian Journal of Microbiology*, 6(1), 51–58.

Alimentarius, C. (2005). Norma general del codex para zumos (jugos) y néctares de frutas. *Codex Stan*, 247.

Alvarez-Parrilla, E., De La Rosa, L. A., Legarreta, P., Saenz, L., Rodrigo-García, J., González-Aguilar, G. A., & nutrition. (2010). Daily consumption of apple, pear and orange juice differently affects plasma lipids and antioxidant capacity of smoking and non-smoking adults. *International journal of food sciences*, 61(4), 369-380.

Álvarez-Parrilla, E., de la Rosa, L. A., Armarowics, R., & Shahidi, F. (2011). Antioxidant activity of fresh and processed Jalapeño and Serrano peppers. *International J. Agric. Food Chem.*, 59, 163-173.

Alves, L. de L., dos Santos, R. L., Bayer, B. L., Devens, A. L. M., Cichoski, A. J., & Mendonça, C. R. B. (2020). Thermosonication of tangerine juice: Effects on quality characteristics, bioactive compounds, and antioxidant activity. *Journal of Food Processing and Preservation*, 44(12), 1–9.

Ariza, M. T., Reboredo-Rodríguez, P., Mazzoni, L., Forbes-Hernández, T. Y., Giampieri, F., Afrin, S., & Mezzetti, B. (2016). Strawberry achenes are an important source of bioactive compounds for human health. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(7), 1103.

Askar, A., & Treptow, H. (1993). Determination of pectin methylesterase activity. *Quality assurance in tropical fruit processing*, 41-45.

Ávila-Sosa, R., Gastélum, G.G., López-Malo, A., & Palou, E. (2010). Modelización de la inactivación termosónica de *Staphylococcus aureus*, un enfoque multifactorial. *Cyta - Journal of Food*, 8, 177–183.

Baker, R. A., & Cameron, R. G. (1999). Clouds of citrus juices and juice drinks. *Food technology (Chicago)*, 53(1), 64-69.

Basak, S., & Ramaswamy, H. S. (1996). Ultra high pressure treatment of orange juice: a kinetic study on inactivation of pectin methyl esterase. *Food Research International*, 29(7), 601-607.

Bhat, R., & Goh, K. M. (2017). Sonication treatment convalesce the overall quality of hand-pressed strawberry juice. *Food Chemistry*, 215, 470–476.

Battino, M., Beekwilder, J., Denoyes-Rothan, B., Laimer, M., McDougall, G. J., & Mezzetti, B. (2009). Bioactive compounds in berries relevant to human health. *Nutrition Reviews*, 67(suppl\_1), S145-S150.

Beattie, J., Crozier, A., & Duthie, G. G. (2005). Potential health benefits of berries. *Current Nutrition & Food Science*, 1(1), 71-86.

Bermudez-Aguirre Daniela. (2017). Ultrasound Processing of Fruit and Vegetables Juice. En *Ultrasound: advances in food processing and preservation* (181-191). EE. UU: *Academic Press*.

Bermúdez-Aguirre, D., & Barbosa Cánovas, G.V. (2011). Power Ultrasound Fact Sheet (Appendix 7). In H.Q. Zhang, G.V. Barbosa Cánovas, V. M. Balasubramaniam, C.P. Dunne, D.F. Farkas, & J.T.C. Yuan (Eds.), *Nonthermal Processing Technologies for Food* (pp. 622–625). UK: IFT Press, Wiley-Blackwell.

Bora, S. J., Handique, J., & Sit, N. (2017). Effect of ultrasound and enzymatic pre-treatment on yield and properties of banana juice. *Ultrasonics Sonochemistry*, 37, 445–451.

Butz, P., & Tauscher, B. (2002). Emerging technologies: chemical aspects. *Food research international*, 35(2-3), 279-284.

Bychkov, A. L., Ryabchikova, E. I., Korolev, K. G., & Lomovsky, O. I. (2012). Ultrastructural changes of cell walls under intense mechanical treatment of selective plant raw material. *Biomass and bioenergy*, 47, 260-267.

Cao, X., Cai, C., Wang, Y., & Zheng, X. (2018). The inactivation kinetics of polyphenol oxidase and peroxidase in bayberry juice during thermal and ultrasound treatments. *Innovative food science & emerging technologies*, 45, 169-178.

Carbonell, J. V., Contreras, P., Carbonell, L., & Navarro, J. L. (2006). Pectin methylesterase activity in juices from mandarins, oranges and hybrids. *European Food Research and Technology*, 222(1-2), 83-87.

Cassani, L., Tomadoni, B., & Del Rosario Moreira, M. (2020). Green ultrasound-assisted processing for extending the shelf-life of prebiotic-rich prebiotic-rich strawberry juices. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(15), 5518–5526.

Chen, C., You, L. J., Abbasi, A. M., Fu, X., & Liu, R. H. (2015). Optimization for ultrasound extraction of polysaccharides from mulberry fruits with antioxidant and hyperglycemic activity in vitro. *Carbohydrate Polymers*, 130, 122-132.

Cheng, C. X., Jia, M., Gui, Y., & Ma, Y. (2020). Comparison of the effects of novel processing technologies and conventional thermal pasteurisation on the nutritional quality and aroma of Mandarin (Citrus unshiu) juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 64, 102425.

Cheng, L. H., Soh, C. Y., Liew, S. C., & Teh, F. F. (2007). Effects of sonication and carbonation on guava juice quality. *Food chemistry*, 104(4), 1396-1401.

Cheng, X. F., Zhang, M., & Adhikari, B. (2013). The inactivation kinetics of polyphenol oxidase in mushroom (*Agaricus bisporus*) during thermal and thermosonic treatments. *Ultrasonics sonochemistry*, 20(2), 674-679.

Cheng, X.-F., Zhang, M., & Adhikari, B. (2014). Changes in quality attributes of strawberry purees processed by power ultrasound or thermal treatments. *Food Science and Technology Research*, 20(5), 1033-1041.

Cömert, E. D., & Gökmen, V. (2018). Evolution of food antioxidants as a core topic of food science for a century. *Food Research International*, 105, 76–93.

Contreras, C., Martín, M. E., Martínez-Navarrete, N., Chiralt, A. (2005). Effect of vacuum impregnation and microwave application on structural changes which occurred during air-drying of apple. *Lwt-Food Science and Technology* 38 471- 477.

Costa, M. G. M., Fonteles, T. V., de Jesus, A. L. T., Almeida, F. D. L., de Miranda, M. R. A., Fernandes, F. A. N., & Rodrigues, S. (2013). High-intensity ultrasound processing of pineapple juice. *Food and Bioprocess Technology*, 6(4), 997-1006.

Cruz-Cansino, N. del S., Ariza-Ortega, J. A., Alanís-García, E., Ramírez-Moreno, E., Velázquez-Estrada, R. M., Zafra-Rojas, Q. Y., Cervantes-Elizarrarás, A., Suárez-Jacobo, Á., & Delgado-Olivares, L. (2021). Optimal thermoultrasound processing of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* lam.) nectar: Physicochemical characteristics, antioxidant properties, microbial quality, and fatty acid profile comparison with pasteurized nectar. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45(1).

da Silva Pinto, M., Lajolo, F. M., & Genovese, M. I. (2008). Bioactive compounds and quantification of total ellagic acid in strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Food Chemistry*, 107(4), 1629-1635.

Davis, J. G., & Kendal, P. (2005). Preventing *E. coli* from garden to plate. *Food and nutrition series. Food safety; no. 9.369*.

Delgado, J. O. (2011). Application of Ultrasound in the Food Industry. *Ingeniería de Procesos en Alimentos y Biomateriales*.

Demir, H., & Kılınç, A. (2019). Effect of batch and continuous thermosonication on the microbial and physicochemical quality of pumpkin juice. *Journal of food science and technology*, 56(11), 5036-5045.

Dinçer, C., & Topuz, A. (2015). Inactivation of *Escherichia coli* and quality changes in black mulberry juice under pulsed sonication and continuous thermosonication treatments. *Journal of Food Processing and Preservation*, 39(6), 1744-1753.

do Amaral Souza, F. D. C., Moura, L. G. S., de Oliveira Bezerra, K., Aguiar, J. P. L., Mar, J. M., Sanches, E. A., & Campelo, P. H. (2019). Thermosonication applied on camu–camu nectars processing: Effect on bioactive compounds and quality parameters. *Food and Bioproducts Processing*, 116, 212-218.

Dubrović, I., Herceg, Z., Režek Jambrak, A., Badanjak, M., & Dragović-Uzelac, V. (2011). Effect of high intensity ultrasound and pasteurization on anthocyanin content in strawberry juice. *Food Technology and Biotechnology*, 49(2), 196-204.

Dürüst, N., Sümengen, D., & Dürüst, Y. (1997). Ascorbic acid and element contents of foods of Trabzon (Turkey). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(6), 2085-2087.

Draye, M., & Van Cutsem, P. (2008). Pectin methylesterases induce an abrupt increase of acidic pectin during strawberry fruit ripening. *Journal of Plant Physiology*, 165(11), 1152–1160.

Earnshaw, R. G., Appleyard, J., & Hurst, R. M. (1995). Understanding physical inactivation processes: combined preservation opportunities using heat, ultrasound and pressure. *International journal of food microbiology*, 28(2), 197-219.



Es-Safi, N.E., V. Cheynier y M. Moutounet, Effect of copper on oxidation of (+)-catechin in a model solution system, *Journal of food science and technology*. 38, 153-163 (2003).

FDA, U. (2004). Guidance for Industry, Juice HACCP Hazards and Controls Guidance. *Office of the Federal Register, National Archives and Records Administration*.

Feng, H., Yang, W., & Hielscher, T. (2008). Power ultrasound. *Food Science and Technology International*, 14, 433-436.

Fernández Escartín, E. (2000). Microbiología e inocuidad de los alimentos. *Universidad Autónoma de Querétaro*, 43-48.

Ferrario, M., Alzamora, S. M., & Guerrero, S. (2015). Study of the inactivation of spoilage microorganisms in apple juice by pulsed light and ultrasound. *Food Microbiology*, 46, 635–642.

Finley, J. W., deMan, J. M., & Lee, C. Y. (2018). Color and food colorants. In *Principles of food chemistry. Food Science Text Series*. (pp. 253–283). Springer.

Giusti, M. M., & Wrolstad, R. E. (2001). Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. *Current protocols in food analytical chemistry*, (1), F1-2.

Gómez Gómez, J. M., Medina, J., Hochberg, D., Mateo-Martí, E., Martínez-Frías, J., & Rull, F. (2014). Drying bacterial biosaline patterns capable of vital reanimation upon rehydration: novel hibernating biomineralogical life formations. *Astrobiology*, 14(7), 589-602.

Gómez, P. L., Welte-Chanes, J., & Alzamora, S. M. (2011). Hurdle technology in fruit processing. *Annual Review of Food Science and Technology*, 2, 447-465.

Guerrouj, K., Sánchez-Rubio, M., Taboada-Rodríguez, A., Cava-Roda, R. M., & Marín-Iniesta, F. (2016). Sonication at mild temperatures enhances bioactive compounds and microbiological quality of orange juice. *Food and Bioprocess Processing*, 99, 20-28.

Guerrero, S., López-Malo, A., & Alzamora, S. M. (2001). Effect of ultrasound on the survival of *Saccharomyces cerevisiae*: Influence of temperature, pH and amplitude. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2(1), 31–39.

Guerrero-Beltrán, J. A., & Barbosa-Cénovas, G. V. (2006). Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* and polyphenoloxidase in mango nectar treated with UV light. *Journal of Food Protection*, 69(2), 362-368.

Hani, N. M., Torkamani, A. E., Abidin, S. Z., Mahmood, W. A. K., & Juliano, P. (2017). The effects of ultrasound assisted extraction on antioxidative activity of polyphenolics obtained from *Momordica charantia* fruit using response surface approach. *Food Bioscience*, 17, 7-16.

Hannum, S. M. (2004). Potential impact of strawberries on human health: a review of the science. *Critical reviews in food science and nutrition*, 44(1), 1-17.

Hashemi, S. M. G., Khaneghah, A. M., Fidelis, M., & Granato, D. (2018). Effects of pulsed thermosonication treatment on fungal growth and bioactive compounds of *Berberis vulgaris* juice. *International Journal of Food Science and Technology*, 1, 1–

Herceg Z, Lelas V, Jambrak AR, Vukusic T, Levaj B (2013) Influence of thermo-sonication on microbiological safety, color and anthocyanins content of strawberry juice. *J Hyg Eng Des* 1:26–37

Hsieh, C. W., & Ko, W. C. (2008). Effect of high-voltage electrostatic field on quality of carrot juice during refrigeration. *LWT-Food Science and Technology*, 41(10), 1752-1757.

Investigación y Formación Agraria y Pesquera (2016).

Islam, M. N., Zhang, M., & Adhikari, B. (2014). The inactivation of enzymes by ultrasound a review of potential mechanisms. *Food Reviews International*, 30(1), 1-21.

Jabbar, S., Abid, M., Hu, B., Hashim, M. M., Lei, S., Wu, T., & Zeng, X. (2015). Exploring the potential of thermosonication in carrot juice processing. *Journal of Food Science and Technology*, 52(11), 7002– 7013.

Jiménez-Sánchez, C., Lozano-Sánchez, J., Marti, N., Saura, D., Valero, M., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2015). Characterization of polyphenols, sugars, and other polar compounds in persimmon juices produced under different technologies and their assessment in terms of compositional variations. *Food chemistry*, 182, 282-291.

Jiménez-Vieyra, M. E., & Zambrano-Zaragoza, M. L. (2011). Cuantificación de cobre en polifenoloxidasas de frutas tropicales por espectrofotometría de absorción atómica. *Informacion Tecnologica*, 22(2), 15–22.

Kadkhodae R, Povey MJW (2008) Ultrasonic inactivation of Bacillus amylase. I. Effect of gas content and emitting face of probe. *Ultrasonics Sonochemistry* 15(2):133–142.

Kanjee, U., & Houry, W. A. (2013). Mechanisms of acid resistance in Escherichia coli. *Annual review of microbiology*, 67, 65-81.

Kiang, W. S., Bhat, R., Rosma, A., & Cheng, L. H. (2013). Effects of thermosonication on the fate of Escherichia coli O157: H7 and Salmonella Enteritidis in mango juice. *Letters in applied microbiology*, 56(4), 251-257.

Kim, Y. S., Park, S. J., Cho, Y. H., & Park, J. (2001). Effects of combined treatment of high hydrostatic pressure and mild heat on the quality of carrot juice. *Journal of Food Science*, 66(9), 1355-1360.

Kim, S. H., Park, M., Woo, H., Tharmalingam, N., Lee, G., Rhee, K. J., & Kim, J. B. (2012). Inhibitory effects of anthocyanins on secretion of Helicobacter pylori CagA and VacA toxins. *International journal of medical sciences*, 9(10), 838.

Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., García-Parilla, M. C., Troncoso, A. M., & Fett, R. (2004). Actividad antioxidante de pigmentos antocianicos. *Food Science and Technology*, 24(4), 691-693.

Knorr, D., Froehling, A., Jaeger, H., Reineke, K., Schlueter, O., & Schoessler, K. (2011). Emerging technologies in food processing. *Annual review of food science and technology*, 2, 203-235.

Maca, M. P., Osorio, O., & Mejía-España, D. F. (2013). Inactivación térmica de pectinmetilesterasa en tomate de árbol (Solanum betaceum). *Información tecnológica*, 24(3), 41-50.

Mañas, P., & Pagán, R. (2005). Microbial inactivation by new technologies of food preservation. *Journal of applied microbiology*, 98(6), 1387-1399.

Martínez-Flores, H. E., Garnica-Romo, M. G., Bermúdez-Aguirre, D., Pokhrel, P. R., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2015). Physico-chemical parameters, bioactive compounds and microbial quality of thermo-sonicated carrot juice during storage. *Food Chemistry*, 172, 650-656.

Mason, T. J. (2003). Sonochemistry and sonoprocessing: the link, the trends and (probably) the future. *Ultrasonics Sonochemistry*, 10(4-5), 175-179.

Mason TJ, Lorimer JP, Baters DM, Zhao Y (1994) Dosimetry in sonochemistry: the use of aqueous terephthalate ion as a fluorescence monitor. *Ultrasonics Sonochemistry* 1:91–95.

Menelli, G. S., Fracalossi, K. L., Lepaus, B. M., & De São José, J. F. B. (2021). Effects of high-intensity ultrasonic bath on the quality of strawberry juice. *CyTA-Journal of Food*, 19(1), 501-510.

McClements, D. J. (1995). Advances in the application of ultrasound in food analysis and processing. *Trends in Food Science & Technology*, 6(9), 293-299.

McEvily, A. J., Iyengar, R., & Otwell, W. S. (1992). Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 32(3), 253-273.

McMillan GP, Pérombelon MCM. Purification and characterization of a high pl pectin methyl esterase isoenzyme and its inhibitor from tubers of *Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum* cv. Katahdin. *Physiol Mol Plant Pathol* 1995; 46:413–27.

Miranda Chavarría, S. (2017). Determinación de escherichia coli en bebidas de frutas mixtas no pasteurizadas comercializadas en establecimientos especializados en san ramón, alajuela. *Revista Costarricense de Salud Pública*, 26(2), 189-198.

Montreau, F. R. (1972). Sur le dosage des composés phénoliques totaux dans les vins par la méthode Folin-Ciocalteu. *OENO One*, 6(4), 397-404.

Moreiras, O., Carbajal, Á., Cabrera, L., & Cuadrado, C. (2003). *Tablas de composición de alimentos*. Pirámide.

Muzaffar, S., Ahmad, M., Wani, S. M., Gani, A., Baba, W. N., Shah, U., & Wani, T. A. (2016). Ultrasound treatment: effect on physicochemical, microbial and antioxidant properties of cherry (*Prunus avium*). *Journal of food science and technology*, 53(6), 2752-2759.

Nayak, P. K., Chandrasekar, C. M., & Kesavan, R. K. (2018). Effect of thermosonication on the quality attributes of star fruit juice. *Journal of food process engineering*, 41(7), e12857.

NOM-093-SSA1-1994 Norma Oficial Mexicana. Bienes y servicios. Prácticas de higiene y sanidad en la preparación de alimentos que se ofrecen en establecimientos fijos. *Diario Oficial de la Federación*.

NOM, N. O. M. (1994). NOM-092-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa. *Diario Oficial de la Federación*.

NOM, N. O. M. (1994). NOM-111-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos. *Diario Oficial de la Federación*.

NOM, N. O. M. (1994). NOM-112-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Determinación de bacterias coliformes. Técnica del número más probable. *Diario Oficial de la Federación*.

Lajolo, F., & Mercadante, A. Z. (2018). *Química y Bioquímica de Alimentos* (1st ed.). Rio de Janeiro, RJ: Atheneu.

Lee, H., Zhou, B., Liang, W., Feng, H., & Martin, S. E. (2009). Inactivation of *Escherichia coli* cells with sonication, manosonication, thermosonication, and manothermosonication: microbial responses and kinetics modeling. *Journal of Food Engineering*, 93(3), 354-364.

Lee, H., Kim, H., Cadwallader, K. R., Feng, H., & Martin, S. E. (2013). Sonication in combination with heat and low pressure as an alternative pasteurization treatment. Effect on *Escherichia coli* K12 inactivation and quality of apple cider. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(4), 1131–1138.

Liao, H., Jiang, L., Cheng, Y., Liao, X., & Zhang, R. (2018). Application of nisin-assisted thermosonication processing for preservation and quality retention of fresh apple juice. *Ultrasonics Sonochemistry*, 42, 244–249.

Lieu, L. N., & Le, V. V. M. (2010). Application of ultrasound in grape mash treatment in juice processing. *Ultrasonics Sonochemistry*, 17, 273-279.

Londoño Londoño, J. (2012). Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad. *In Desarrollo y transversalidad serie Lasallista Investigación y Ciencia*. Corporación Universitaria Lasallista.

López-Nicolás, N., (2015). Pardeamiento enzimático y no enzimático. 2020. *Productos vegetales*.

Lucas-Bautista J. A., (2017). *Actividad antimicrobiana in vitro de antocianinas de fresa contra bacterias fitopatógenas*. [Tesis de maestría]. Instituto politécnico nacional.

Odriozola-Serrano, I., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. (2008). Phenolic acids, flavonoids, vitamin C and antioxidant capacity of strawberry juices processed by high-intensity pulsed electric fields or heat treatments. *European Food Research and Technology*, 228(2), 239.

Oladunjoye, A. O., Adeboyejo, F. O., Okekunbi, T. A., & Aderibigbe, O. R. (2021). Effect of thermosonication on quality attributes of hog plum (*Spondias mombin* L.) juice. *Ultrasonics Sonochemistry*, 70, 105316.

Olsson, M. E., Gustavsson, K. E., Andersson, S., Nilsson, Å., & Duan, R. D. (2004). Inhibition of cancer cell proliferation in vitro by fruit and berry extracts and correlations with antioxidant levels. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(24), 7264-7271.

Ordóñez-Santos, L. E., Martínez-Girón, J., & Arias-Jaramillo, M. E. (2017). Effect of ultrasound treatment on visual color, vitamin C, total phenols, and carotenoids content in cape gooseberry juice. *Food Chemistry*, 233,96–100.

Osorio Mora, O. (2008). *Influencia de tratamientos térmicos en la calidad y estabilidad del puré de fresa (Fragaria x ananassa, cv Camarosa)* (Doctoral dissertation, Universitat Politècnica de València).

Özbek B, Ülgen K (2000) The stability of enzymes after sonication. *Process Biochemistry* 35(9):1037–1043.



Özkaya, O., Dündar, O., Scovazzo, G. C., & Volpe, G. (2009). Evaluation of quality parameters of strawberry fruits in modified atmosphere packaging during storage. *African Journal of Biotechnology*, 8(5), 789–793.

Park, J. J., Olawuyi, I. F., & Lee, W. Y. (2021). Influence of Thermo-sonication and Ascorbic Acid Treatment on Microbial Inactivation and Shelf-Life Extension of Soft Persimmon (*Diospyros kaki* T.) Juice. *Food and Bioprocess Technology*, 14(3), 429-440.

Patil, S., Bourke, P., Kelly, B., Frías, J. M., & Cullen, P. J. (2009). The effects of acid adaptation on *Escherichia coli* inactivation using power ultrasound. *Innovative food science & emerging technologies*, 10(4), 486-490.

Patras, A., Brunton, N. P., Donnell, C. O., & Tiwari, B. K. (2010). Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods: mechanisms and kinetics of degradation. *Trends in Food Science & Technology*, 21(1), 3–11.

Pérez, A. G. (2015). Elaboración de pulpas, zumos, néctares, deshidratados, osmodeshidratados y fruta confitada. *Grado Academico*.

Povey, M. J., & Mason, T. J. (Eds.). (1998). *Ultrasound in food processing*. Springer Science & Business Media.

Prior, R.L., Wu, X. & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4290–4302

Procuraduría Federal del Consumidor (2018). Jugos y néctares. *Revista del consumidor*.

Qureshi, T. M., Nadeem, M., Maken, F., Tayyaba, A., Majeed, H., & Munir, M. (2020). Influence of ultrasound on the functional characteristics of indigenous varieties of mango (*Mangifera indica* L.). *Ultrasonics sonochemistry*, *64*, 104987.

Ramteke, S. P., Desale, R. J., Kankhare, D. H., & Fulpagare, Y. G. (2020). Thermosonication Technology in the Dairy Industry: A Review. *Int. J. Adv. Res. Biol. Sci*, *7*(1), 82-89.

Rawson, A., Patras, A., Tiwari, B. K., Noci, F., Koutchma, T., & Brunton, N. (2011). Effect of thermal and non thermal processing technologies on the bioactive content of exotic fruits and their products: Review of recent advances. *Food Research International*, *44*(7), 1875-1887.

Rawson, A., Tiwari, B. K., Patras, A., Brunton, N., Brennan, C., Cullen, P. J., & O'donnell, C. (2011). Effect of thermosonication on bioactive compounds in watermelon juice. *Food Research International*, *44*(5), 1168-1173.

Ray, B. (2019). *Food biopreservatives of microbial origin*. (57-80). EE. UU. CRC press.

Rithmanee T, Intipunya P (2012) Effects of high-power ultrasonic pretreatment on physicochemical quality and enzymatic activities of dried longan. *J Agric Sci* *4*:299

Rivera, J. A., Muñoz-Hernández, O., Rosas-Peralta, M., Aguilar-Salinas, C. A., Popkin, B. M., & Willett, W. C. (2008). Consumo de bebidas para una vida saludable: recomendaciones para la población mexicana. *Boletín médico del Hospital infantil de México*, *65*(3), 208-237.

Rojas, M. L., Miano, A. C., & Augusto, P. E. (2017). Ultrasound processing of fruit and vegetable juices. In *Ultrasound: Advances for food processing and preservation* (pp. 181-199). Academic Press.

Rojas, M. L., Leite, T. S., Cristianini, M., Alvim, I. D., & Augusto, P. E. (2016). Peach juice processed by the ultrasound technology: Changes in its microstructure improve its physical properties and stability. *Food Research International*, *82*, 22-33.

Santhirasegaram, V., Razali, Z., George, D. S., & Somasundram, C. (2015). Comparison of UV-C treatment and thermal pasteurization on quality of Chokanan mango (*Mangifera indica* L.) juice. *Food and Bioprocesses Processing*, *94*(March), 313–321.

Sasikumar, R., Pradhan, D., & Deka, S. C. (2019). Effects of thermosonication process on inactivation of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* and its survival kinetics modeling in khonphal (*Haematocarpus validus*) juice to extend its shelf life. *Journal of Food Processing and Preservation*, *43*(11), e14220.

Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. (2017).

Singh, R. P., & Heldman, D. R. C. (2009). *Introducción a la ingeniería de los alimentos* (No. 641.3 Si646i Ej. 1 022077). Editorial Acribia.

Sirisomboon, P., Tanaka, M., Fujita, S., Akinaga, T., Kojima, T. (2001). A Simplified Method for the Determination of Total Oxalate-Soluble Pectin Content in Japanese Pear. *Journal of Food Composition and Analysis* *14* (1): 83-91.

Tajkarimi, M., & Ibrahim, S. A. (2011). Antimicrobial activity of ascorbic acid alone or in combination with lactic acid on *Escherichia coli* O157: H7 in laboratory medium and carrot juice. *Food Control*, *22*(6), 801–804

Terefe, N. S., Gamage, M., Vilku, K., Simons, L., Mawson, R., & Versteeg, C. (2009). The kinetics of inactivation of pectin methylesterase and polygalacturonase in tomato juice by thermosonication. *Food Chemistry*, 117(1), 20-27.

Tiwari, B. K., O'donnell, C. P., Patras, A., Brunton, N., & Cullen, P. J. (2009). Stability of anthocyanins and ascorbic acid in sonicated strawberry juice during storage. *European Food Research and Technology*, 228(5), 717-724.

Tomadoni, B., L. Cassani, G. Viacava, M.D.R. Moreira, and A. Ponce. (2017). Effect of ultrasound and storage time on quality attributes of strawberry juice. *J. Food Process Eng.* 40(5)-12533.

Torkamani, A. E., Juliano, P., Ajlouni, S., & Singh, T. K. (2014). Impact of ultrasound treatment on lipid oxidation of Cheddar cheese whey. *Ultrasonics sonochemistry*, 21(3), 951-957.

Tournas, V. H., Heeres, J., & Burgess, L. (2006). Moulds and yeasts in fruit salads and fruit juices. *Food Microbiology*, 23(7), 684–688.

Ulloa, J. A., Rosas, P., Ramírez, J., & Ulloa, B. (2013). Ultrasonido: aplicaciones en el campo de los alimentos. *Revista: Nueva Época. Nayarit. México.*

Velázquez-Estrada, R. M., Hernández-Herrero, M. M., Rüfer, C. E., Guamis-López, B., & Roig-Sagués, A. X. (2013). Influence of ultra high pressure homogenization processing on bioactive compounds and antioxidant activity of orange juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 18, 89-94.

Vinatoru, M. (2001). An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8, 303– 313

Wang Z, Lin X, Li P, Zhang J, Wang S, Ma H (2012) Effects of low intensity ultrasound on cellulase pretreatment. *Bioresour Tech- nol* 117:222–227.

Wang, J., Wang, J., Ye, J., Vanga, S. K., & Raghavan, V. (2019). Influence of high-intensity ultrasound on bioactive compounds of strawberry juice: Profiles of ascorbic acid, phenolics, antioxidant activity and microstructure. *Food Control*, 96, 128-136.

Wang, W. D., & Xu, S. Y. (2007). Degradation kinetics of anthocyanins in blackberry juice and concentrate. *Journal of food engineering*, 82(3), 271-275.

Willats, W. G., McCartney, L., Mackie, W., & Knox, J. P. (2001). Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant molecular biology*, 47(1-2), 9-27.

Wordon, B.A., Mortimer, B., & McMaster, L.D. (2012). Comparative real-time analysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell viability, injury and death induced by ultrasound (20 kHz) and heat for the application of hurdle technology. *Food Research International*, 47(2), 134–139.

Yu, L., Reitmeier, C. A., and Love, M. H. (1996). Strawberry texture and pectin content as affected by electron beam irradiation. *J. Food Sci.* 61(4), 844-846.

Zhang YN, Zhang YN, Du XZ, Xian HZ (2015) Enhancement of heat and mass transfer by cavitation. *IOP Conf Ser Mater Sci Eng* 72:12002.

Zhang, L., Zhao, S., Lai, S., Chen, F., & Yang, H. (2018). Combined effects of ultrasound and calcium on the chelate-soluble pectin and quality of strawberries during storage. *Carbohydrate Polymers*, 200, 427–435.

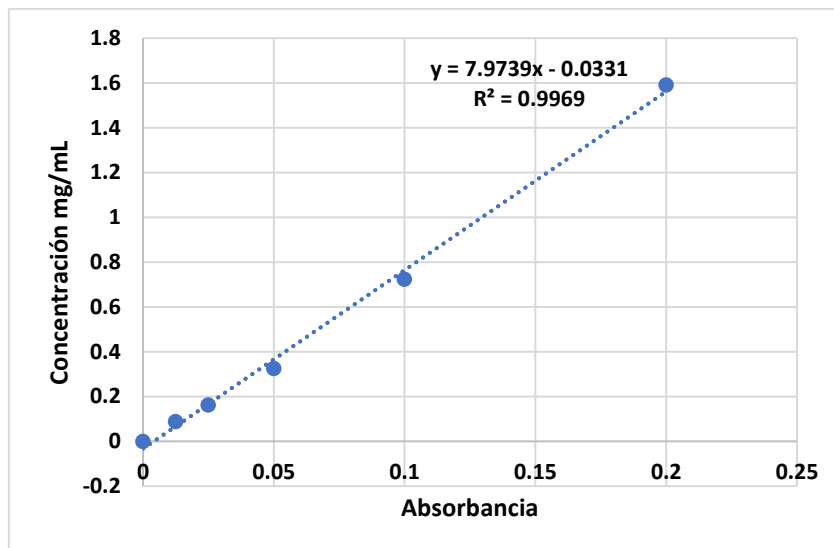
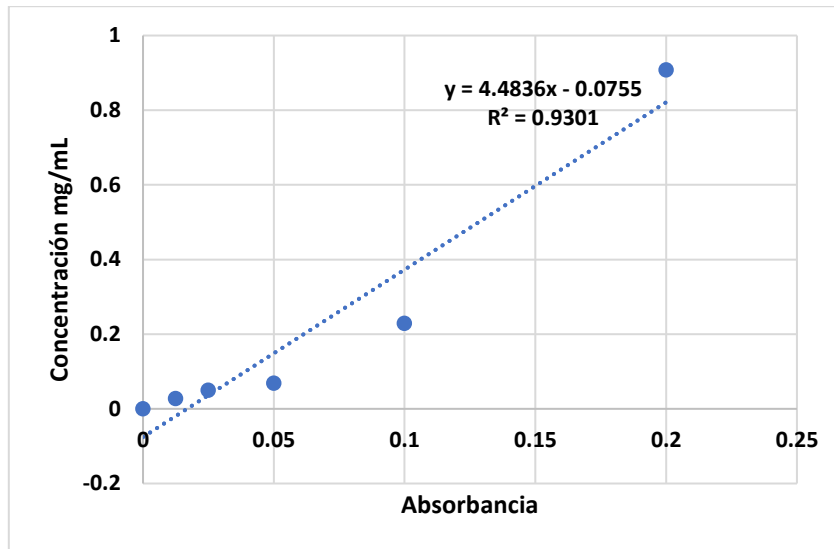
Zhou, L., Zhang, Y., Leng, X., Liao, X., & Hu, X. (2010). Acceleration of precipitation formation in peach juice induced by high-pressure carbon dioxide. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(17), 9605-9610.

Zoran, H. (2016). Effects of the High Power Ultrasound on Microorganisms in Fruit Juices. *MOJ Food Processing & Technology*, 2(5), 176–177.

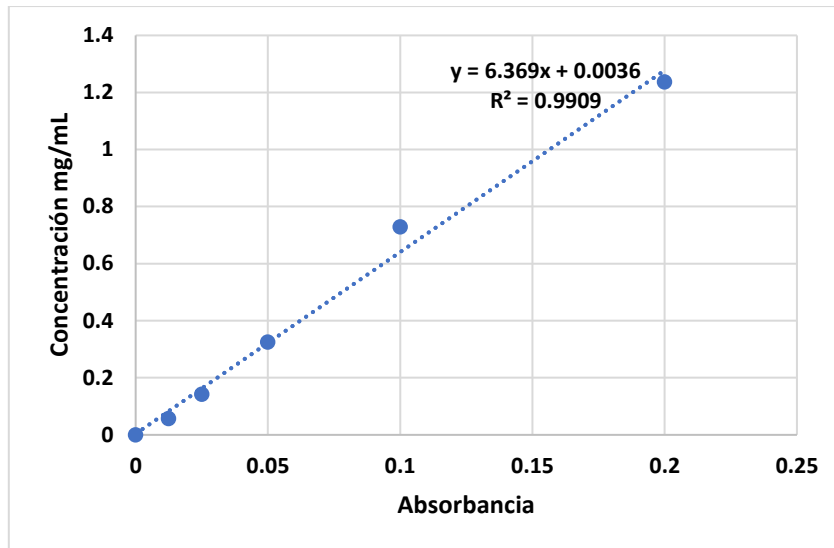
## **CAPÍTULO 10. ANEXOS**

## CAPÍTULO 10. ANEXOS

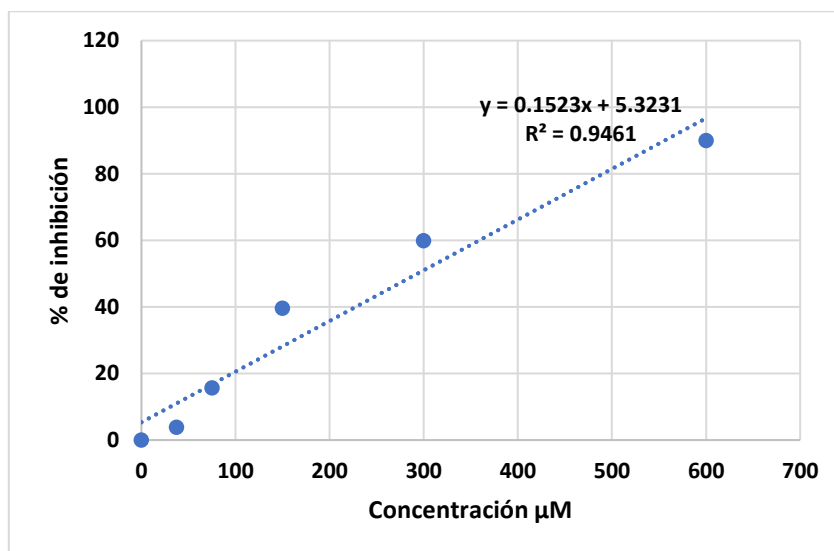
Anexo A. Curvas de calibración de ácido gálico para fenoles solubles totales.

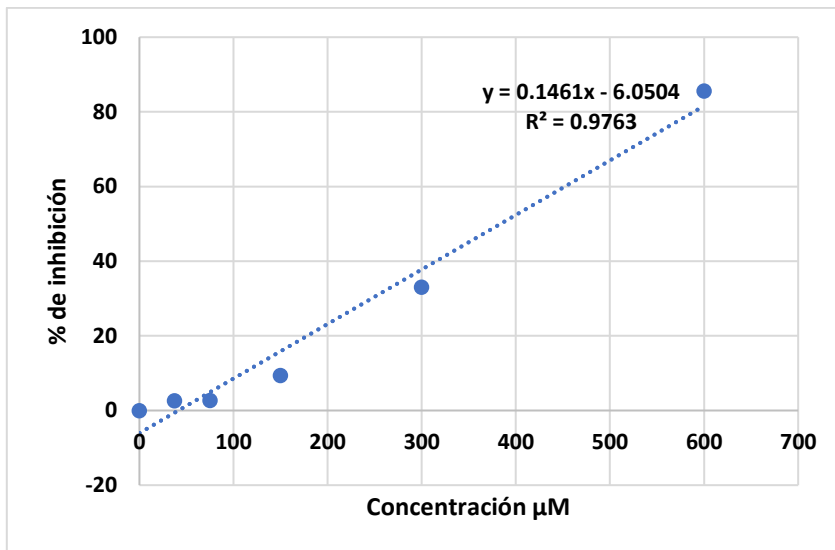
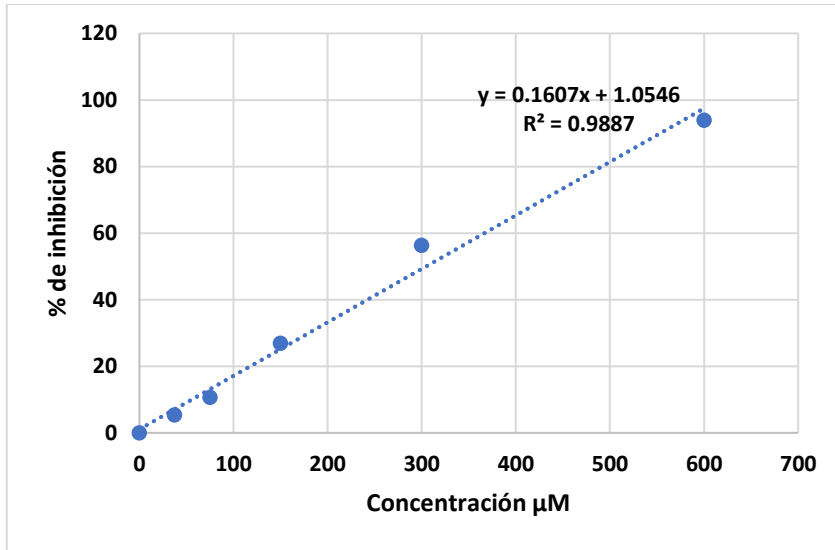




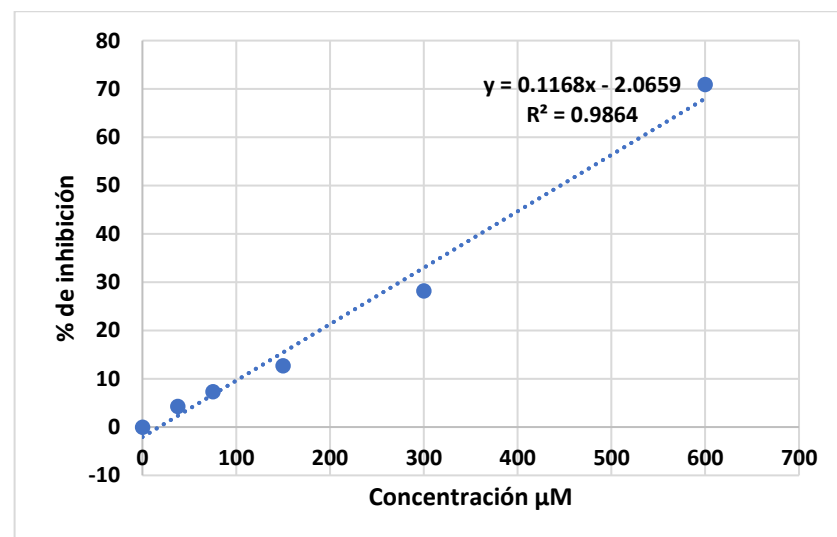
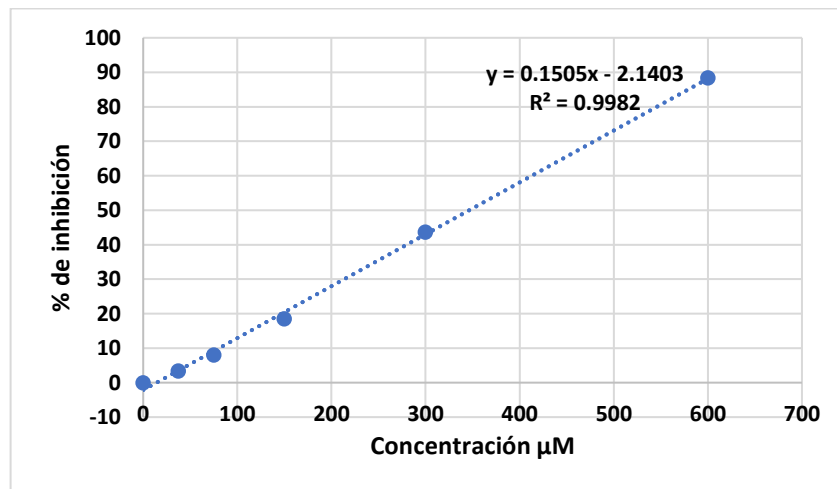
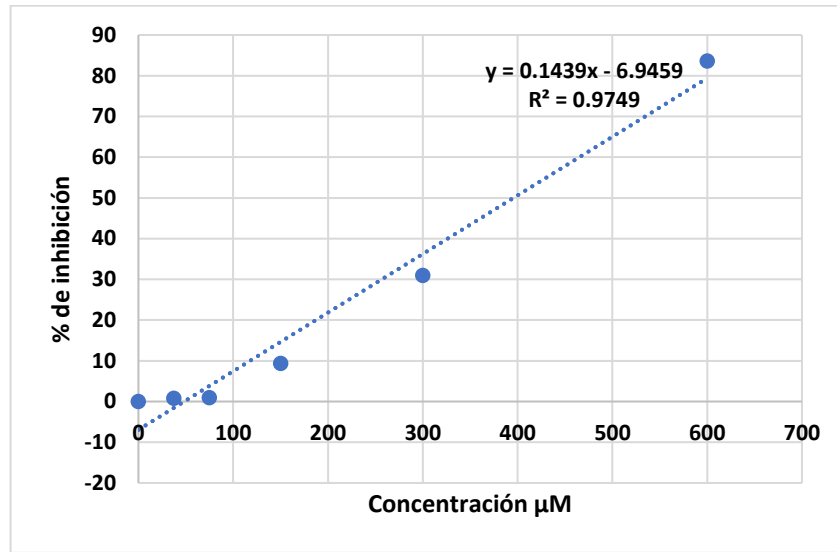


Anexo B. Curvas de calibración de trolox para ABTS.

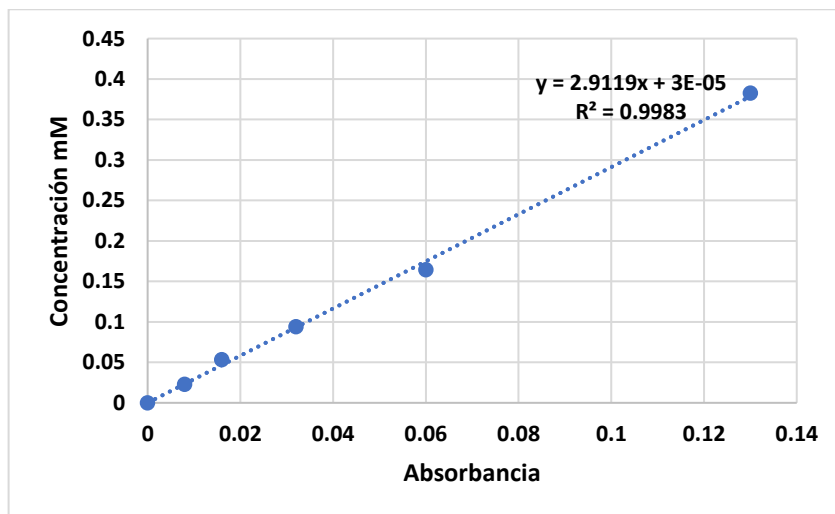
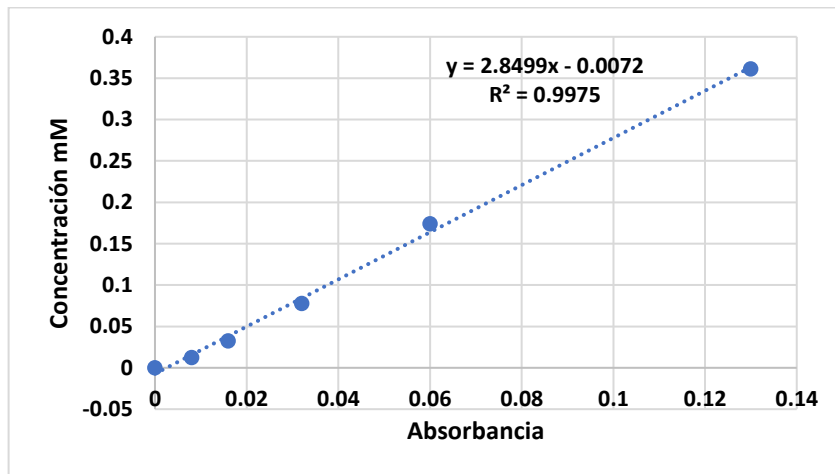
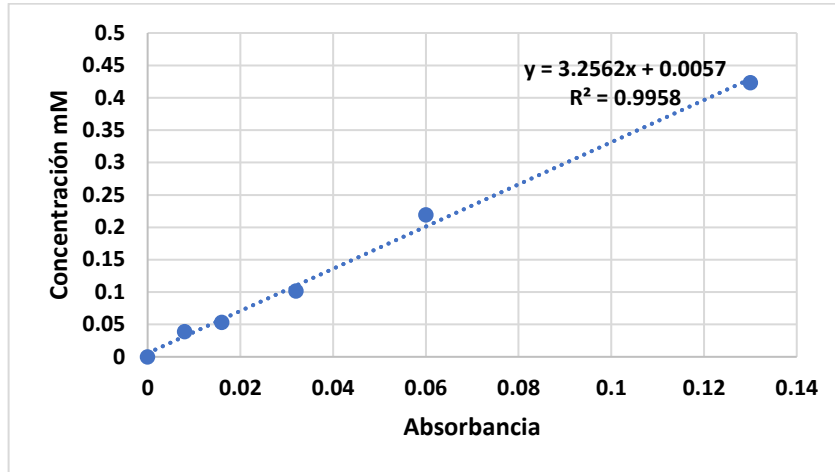




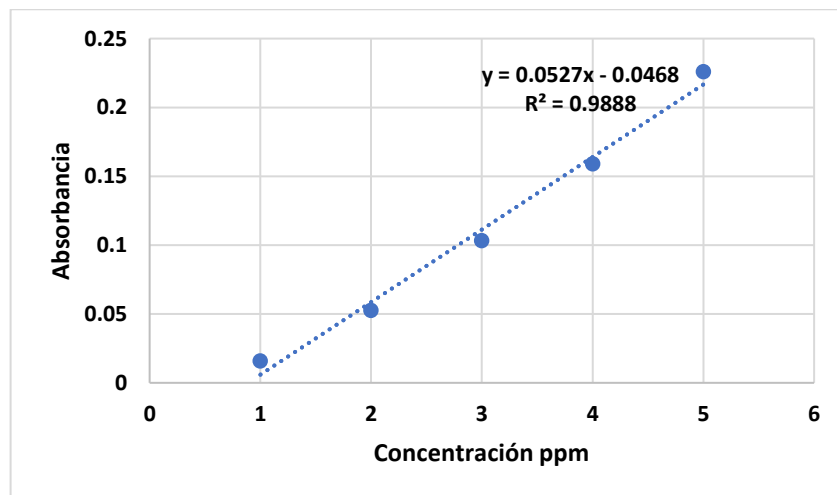
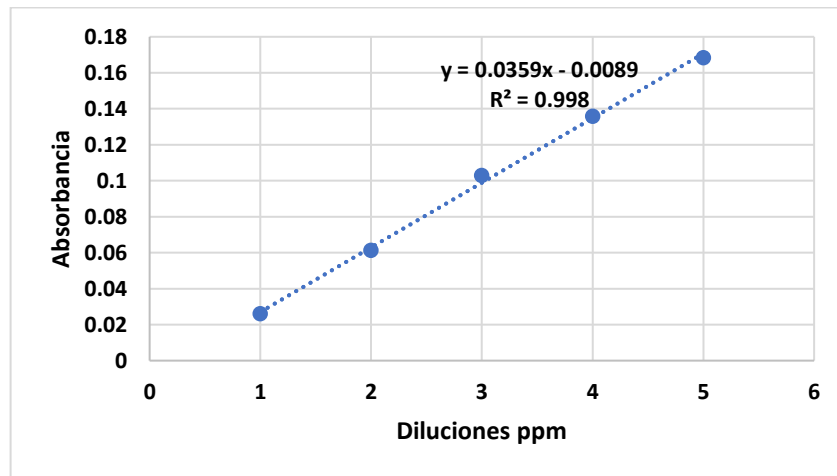
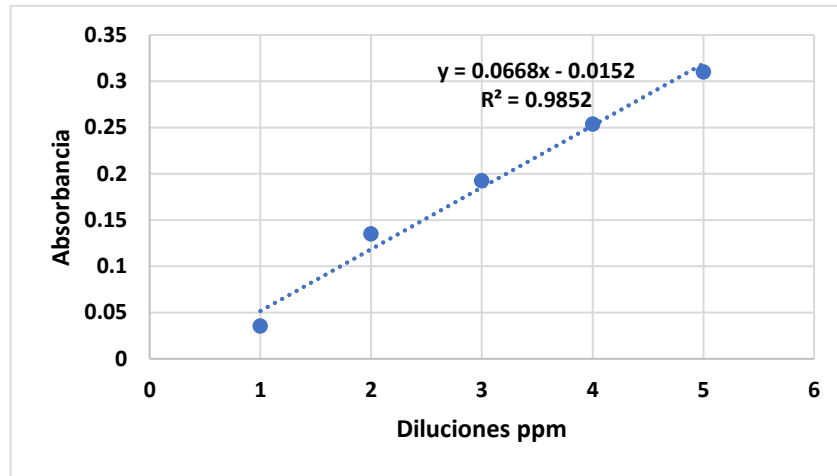
ANEXO C. Curvas de calibración de trolox para DPPH.



ANEXO D. Curvas de calibración de trolox para FRAP.



ANEXO E. Curvas de calibración de ácido ascórbico para vitamina C.



#### ANEXO F. Análisis estadístico en pH

Effect	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	532.4300	1	532.4300	158744.2	0.000000
Tratamiento	0.0607	11	0.0055	1.6	0.148737
Error	0.0805	24	0.0034		

*Nota: números de color rojo indica diferencia significativa. Números de color negro indica que no hay diferencia significativa entre los tratamientos de  $p < 0.05$ .*

#### ANEXO G. Análisis estadístico de sólidos solubles totales

Effect	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	7259.892	1	7259.892	141052.5	0.000000
Tratamiento	0.459	11	0.042	0.8	0.629594
Error	1.235	24	0.051		

*Nota: números de color rojo indica diferencia significativa. Números de color negro indica que no hay diferencia significativa entre los tratamientos de  $p < 0.05$ .*

#### ANEXO H. Análisis estadístico de acidez

Effect	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	1.484336	1	1.484336	133590.3	0.00
Tratamiento	0.061297	11	0.005572	501.5	0.00
Error	0.000267	24	0.000011		

*Nota: números de color rojo indica diferencia significativa. Números de color negro indica que no hay diferencia significativa entre los tratamientos de  $p < 0.05$ .*

ANEXO I. Análisis estadístico de polifenoloxidasa

Effect	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	201.4507	1	201.4507	513.4683	0.000000
Tratamiento	14.3071	11	1.3006	3.3152	0.006811
Error	9.4160	24	0.3923		

*Nota: números de color rojo indica diferencia significativa. Números de color negro indica que no hay diferencia significativa entre los tratamientos de  $p < 0.05$*

ANEXO J. Análisis estadístico de hongos y levaduras

Effect	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	109.0284	1	109.0284	3337.320	0.00
Tratamiento	41.8048	11	3.8004	116.330	0.00
Error	0.7841	24	0.0327		

*Nota: números de color rojo indica diferencia significativa. Números de color negro indica que no hay diferencia significativa entre los tratamientos de  $p < 0.05$*

ANEXO K. Análisis estadístico de mesófilos aerobios

Effect	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	120.4506	1	120.4506	5242.048	0.00
Tratamiento	46.0666	11	4.1879	182.258	0.00
Error	0.5515	24	0.0230		

*Nota: números de color rojo indica diferencia significativa. Números de color negro indica que no hay diferencia significativa entre los tratamientos de  $p < 0.05$*

ANEXO L. Análisis estadístico de ácido ascórbico

Effect	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	1159717	1	1159717	15147.28	0.00
Tratamiento	333135	14	23795	310.80	0.00
Error	1838	24	77		

*Nota: números de color rojo indica diferencia significativa. Números de color negro indica que no hay diferencia significativa entre los tratamientos de  $p < 0.05$*

ANEXO M. Análisis estadístico de antocianinas

Effect	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	200353.2	1	200353.2	9586.015	0.00
Tratamiento	44245.8	14	3160.4	151.212	0.00
Error	501.6	24	20.9		

*Nota: números de color rojo indica diferencia significativa. Números de color negro indica que no hay diferencia significativa entre los tratamientos de  $p < 0.05$*

ANEXO N. Análisis estadístico de fenoles

Effect	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	15809.17	1	15809.17	4192.268	0.000000
Tratamiento	4374.30	14	312.45	82.855	0.000000
Error	90.50	24	3.77		

*Nota: números de color rojo indica diferencia significativa. Números de color negro indica que no hay diferencia significativa entre los tratamientos de  $p < 0.05$*



ANEXO O. Análisis estadístico de FRAP

Effect	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	259370.1	1	259370.1	10979.85	0.00
Tratamiento	120045.0	14	8574.6	362.99	0.00
Error	566.9	24	23.6		

*Nota: números de color rojo indica diferencia significativa. Números de color negro indica que no hay diferencia significativa entre los tratamientos de  $p < 0.05$*

ANEXO P. Análisis estadístico de ABTS

Effect	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	3610294	1	3610294	37036.37	0.00
Tratamiento	2941728	14	210123	2155.56	0.00
Error	2340	24	97		

*Nota: números de color rojo indica diferencia significativa. Números de color negro indica que no hay diferencia significativa entre los tratamientos de  $p < 0.05$*

ANEXO Q. Análisis estadístico de DPPH

Effect	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	58767.69	1	58767.69	5577.481	0.00
Tratamiento	36342.39	14	2595.89	246.368	0.00
Error	252.88	24	10.54		

*Nota: números de color rojo indica diferencia significativa. Números de color negro indica que no hay diferencia significativa entre los tratamientos de  $p < 0.05$*