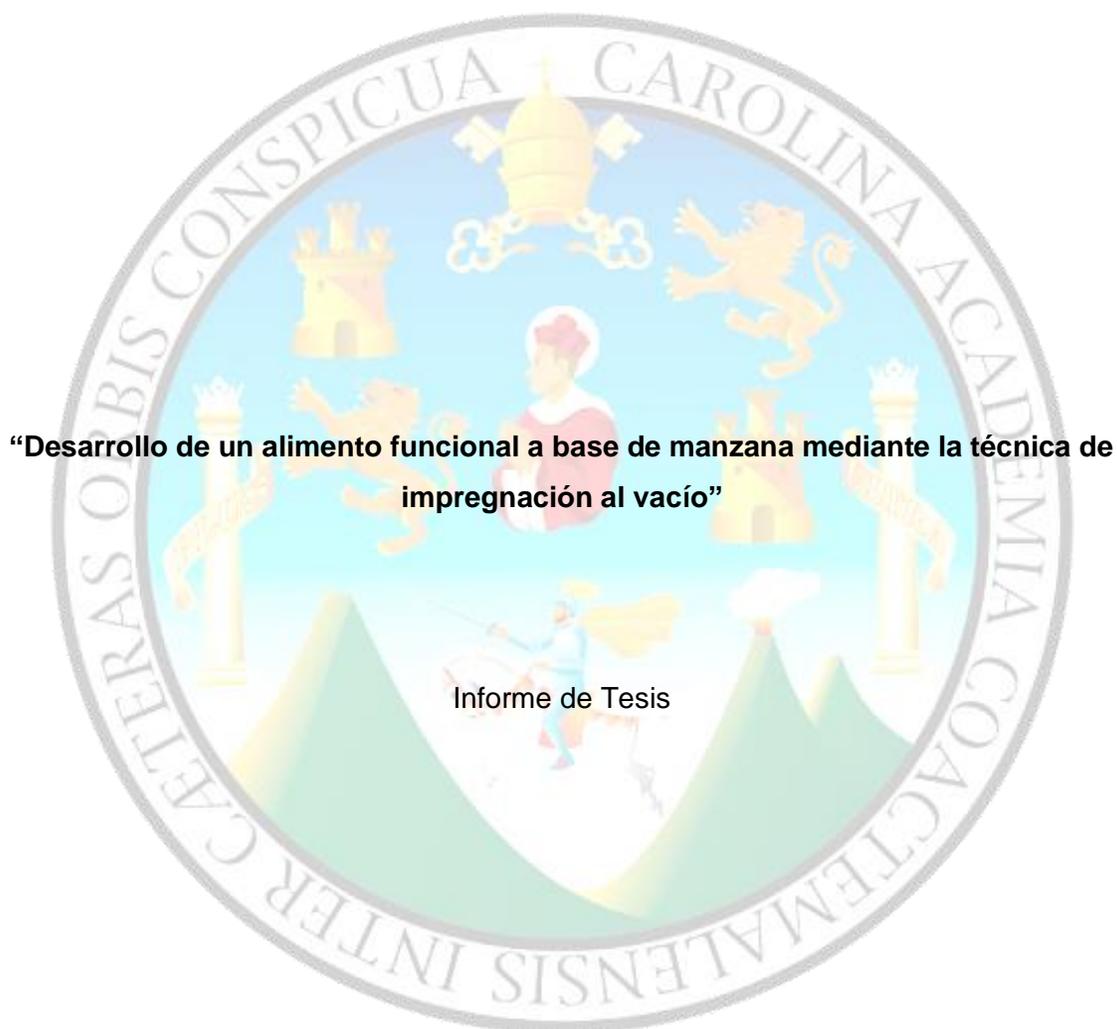


UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA



“Desarrollo de un alimento funcional a base de manzana mediante la técnica de impregnación al vacío”

Informe de Tesis

Presentado por
Steven Alexander Gil Pichillá

Para optar al título de
Químico Farmacéutico

Guatemala, 28 de junio de 2021

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA



“Desarrollo de un alimento funcional a base de manzana mediante la técnica de impregnación al vacío”

Steven Alexander Gil Pichillá
Químico Farmacéutico

Guatemala, junio de 2021



UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA



FORMATO OI-3
APROBACIÓN DEL TRABAJO DE GRADUACIÓN,
EVALUACIÓN TERMINAL DE LOS ESTUDIANTES DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y
FARMACIA, OPCIÓN: TESIS

Este formulario deberá adjuntarse al formulario de solicitud del estudiante para autorización de Acto de Graduación

POR ESTE MEDIO, EL DIRECTOR DE LA ESCUELA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA

Lic. / LicDA. LUCRECIA MARTÍNEZ DE HAASE, M.A.

HACE CONSTAR QUE:

HABIENDO CUMPLIDO CON TODOS LOS REQUISITOS DE EVALUACIÓN TERMINAL PARA LOS ESTUDIANTES DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA, Y CON EL AVAL DEL ASESOR(ES) CORRESPONDIENTE(S),

APRUEBA

EL TRABAJO DE GRADUACIÓN, **OPCIÓN TESIS**, QUE A CONTINUACIÓN SE DETALLA:

NOMBRE DEL ESTUDIANTE: STEVEN ALEXANDER GIL PICHILLÁ

CARNÉ No.: 201500342

CARRERA: QUÍMICA FARMACÉUTICA

NOMBRE DE LA TESIS: "DESARROLLO DE UN ALIMENTO FUNCIONAL A BASE DE MANZANA MEDIANTE

LA TÉCNICA DE IMPREGNACIÓN AL VACÍO"

PARTE	FECHA DE APROBACION
ANTEPROYECTO DE TESIS	09.04.2019
PROTOCOLO DE TESIS	22.04.2021
INFORME FINAL DE TESIS	17.08.2021
ARTICULO CIENTIFICO	08.09.2021

FIRMA Y SELLO DEL DIRECTOR(A) DE ESCUELA:

DADO EN LA CIUDAD DE GUATEMALA, A LOS DIEZ DÍAS DEL MES DE SEPTIEMBRE DE 2021.



DICTAMEN SOBRE LA REVISIÓN DE DOCUMENTOS DE EVALUACIÓN TERMINAL

Estudiante(s) Steven Alexander Gil Pichillá
Carrera QUIMICA FARMACÉUTICA
Título Desarrollo de un alimento funcional a base de manzana mediante la técnica de impregnación al vacío

Asesor(es) Licda. Aylín Santizo

Tipo de Investigación	Tesis <input checked="" type="checkbox"/>	Tipo de Documento	Protocolo <input type="checkbox"/>
	Seminario <input type="checkbox"/>		Plan <input type="checkbox"/>
	Proyecto <input type="checkbox"/>		Info. Final <input checked="" type="checkbox"/>

DICTAMEN:

Pase atentamente, MA Lucrecia Martínez de Haase directora de la Escuela de Química Farmacéutica, con la indicación que, después de haber revisado el documento arriba mencionado, me permito recomendar su **aprobación**.

Guatemala, 2 de agosto de 2021

Id, y Enseñad a Todos

Dr. Jorge Luis De León Arana

Dr. Jorge Luis De León Arana
Profesor Titular XI
Jefe Unidad de Estadística, Epidemiología y Salud Pública
Instituto de Investigaciones, Facultad de Farmacia, USAC.

Junta Directiva

M.A. Pablo Ernesto Oliva Soto	Decano
Licda. Miriam Roxana Marroquín Leiva	Secretaria
Dr. Juan Francisco Pérez Sabino	Vocal I
Dr. Roberto Enrique Flores Arzú	Vocal II
Lic. Carlos Manuel Maldonado Aguilera	Vocal III
Br. Carmen Amalia Rodríguez Ortíz	Vocal IV
Br. Paola Margarita Gaitán Valladares	Vocal V

Agradecimientos

A la Universidad de San Carlos de Guatemala, por ser mi casa de estudios alma máter y formarme en el ámbito profesional y personal.

A la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, por brindarme un sitio donde formarme en educación, valores y experiencias para afrontar la vida profesional.

A mis profesores, por brindarme y compartirme sus conocimientos y enseñarme cosas que van más allá de sus obligaciones dentro del aula.

A mi asesora Licda. Aylin Evelyn Santizo, por su apoyo y paciencia desde el momento en el que le platique ni anteproyecto de tesis y durante el desarrollo de la misma.

A mi revisor Lic. Julio Chinchilla, por su apoyo y corrección de la tesis.

Al Centro de Información y asesoría toxicológica -CIAT-, en especial a la Licda. Carolina Guzmán, por haberme abierto las puertas del departamento para realizar la fase experimental y a todos los profesionales que conforman la institución.

A mis padres, hermana y demás familia, por apoyarme en las distintas diligencias de la tesis y por estar al pendiente de los resultados.

Acto que dedico a

A Dios, a la fuerza que me permite estar hoy en día presente, por el don de la vida, amor y sabiduría que me ha entregado.

A mi madre, por su amor incondicional, su duro esfuerzo y su ejemplo de superación. Gracias por el amor que nunca faltó por y los sacrificios realizados para darme todo lo que tengo.

A mi padre, por su ejemplo de vida, principios y valores, por su esfuerzo y por enseñarme a ser el hombre que soy.

A mi madrina, por su lucha y apoyo tan desinteresado, por amar sin importar nada a cambio.

A mi hermana, por ser mi amiga y compañera, por aguantarme desde niño y en mis peores momentos. Gracias por ser mi ejemplo te amo.

A Cris, por ser mi fiel compañero, por darme fuerzas cuando siempre las necesite y por ser un ejemplo a seguir de constancia y superación.

Al resto de mi familia; tía Viviana, tía Roxana, abuelo Juan, abuela Concha, Fatima, Gristofer por estar también para mí en este camino.

A mis queridos amigos; Andrea, Caroline, Maylin, Sarita, Otto, Mariel y David por todo lo vivido juntos, por todos aquellos inolvidables momentos que juntos compartimos dentro y fuera de clase. Por ser esa fuerza que me impulsó durante los 5 años en la universidad a querer ser mejor persona y mejor amigo ¡Gracias!

ÍNDICE

1.	Resumen	1
2.	Introducción	3
3.	Antecedentes	5
3.1.	Alimento Funcional.....	6
3.1.1.	Producto fortificado.....	6
3.1.2.	Producto enriquecido.....	6
3.1.3.	Producto alterado.....	6
3.1.4.	Materia Prima mejorada.....	6
3.2.	Impregnación al vacío.....	8
3.3.	Mecanismo hidrodinámico.....	12
3.4.	Materias Primas.....	14
3.4.1.	Manzana.....	14
3.4.2.	Aloe Vera.....	15
3.4.3.	Prebióticos (Azúcares Reductores).....	16
3.4.3.1.	Inulina.....	17
3.4.3.2.	Oligofructosa.....	17
3.4.4.	Mandarina.....	18
4.	Justificación.....	20
5.	Objetivos.....	22
6.	Hipótesis.....	23
7.	Materiales y Métodos	24
8.	Resultados.....	38
9.	Discusión	46
10.	Conclusiones	50
11.	Recomendaciones.....	51
12.	Referencias.....	52
13.	Anexos.....	57

1. Resumen

Un alimento funcional es el que contiene componentes específicos que han sido adicionados, aumentados en concentración o del cual se han eliminado componentes perjudiciales para que estos ejerzan un efecto relevante y específico para la salud. Guatemala es un país del cual se pueden aprovechar una gran variedad de alimentos y recursos naturales para desarrollar uno de estos alimentos.

La técnica de impregnación al vacío es una operación unitaria relativamente sencilla que permite someter una matriz porosa inmersa en un líquido a presiones subatmosféricas para que por medio de este cambio de presiones se desplacen los gases dentro de la matriz hacia el exterior. La restauración de la presión atmosférica provocara por medio de otro gradiente de presión el movimiento del líquido dentro de los espacios libres luego de la desgasificación de la matriz. Y de esta manera es posible impregnar cualquier soluto de interés en una matriz sólida de alta porosidad como la manzana nacional seleccionada para la presente investigación.

Basados en estos principios y técnicas la presente investigación busco desarrollar un alimento funcional, utilizando la técnica de impregnación al vacío con base en una matriz porosa (manzana nacional), impregnando por medio de este gradiente de presiones, una solución de jugo de mandarina, extracto de aloe vera y azúcares reductores que pueden ejercer un efecto nutricional favorable.

El objetivo principal de la investigación fue probar que el proceso de impregnación al vacío permitía incorporar a la matriz de la manzana los elementos de interés y demostrar la presencia y/o la proporción de estos elementos en el alimento funcional desarrollado en relación a la manzana sin procesar.

Para desarrollar esta investigación y comprobar el éxito del proceso de impregnación se consideró cuantificar e identificar algunos de los componentes mayoritarios de los elementos a impregnar siendo la aloína la sustancia identificable por medio de cromatografía en placa fina para confirmar la impregnación del extracto de aloe vera; se cuantifico ácido ascórbico como elemento principal del jugo de mandarina utilizado la metodología de titulación yodimétrica descrita en la USP 23 y se identificaron y cuantificaron las azúcares reductores (inulina y oligofructosa) por medio del test de ácido 3,5 dinitrosalicílico (espectrofotométrico).

Adicional a estos análisis al desarrollar un alimento también se realizo el análisis proximal de los lotes producidos para establecer en que aspecto del mismo (proteína, carbohidratos, lípidos, fibra, minerales) se ve enriquecida la manzana luego del proceso de impregnación y de la misma manera determinar las características microbiológicas del alimento luego de la impregnación utilizando como referencia la norma RTCA 67.04.50:08.

Luego de la determinación y realización de cada una de las pruebas para la manzana impregnada, la manzana blanco y la solución de impregnación; se encontró que luego del proceso y tratamiento de las muestras, se logró identificar y cuantificar cada uno de los componentes antes mencionados en una proporción estadísticamente mayor y proporcional para confirmar que el proceso fue exitoso y el desarrollo del alimento funcional también.

Se determino por medio de análisis tercerizados para el control microbiológico que el alimento funcional desarrollado cumple con las pruebas establecidas por el RTCA y con el análisis bromatológico se encontró que aumentaron los porcentajes de proteínas, lípidos y minerales y materia inorgánica en el alimento impregnado.

La investigación demostró que el proceso de impregnación es eficiente para adicionar en la manzana guatemalteca una solución de jugo de mandarina, aloe vera y azúcares reductores; en base a las pruebas de identificación y cuantificación de los elementos principales de cada uno de los componentes de la solución de impregnación se concluyó que luego del proceso de impregnación se triplico aproximadamente la cantidad de ácido ascórbico (vitamina C) en relación a la manzana natural, se duplico en promedio la cantidad de azúcares reductores (inulina y oligofructosa) y se logró adicionar como nuevo elemento a la aloína que fue identificable en el alimento impregnado.

El análisis proximal de los lotes de estudio demostró que el alimento funcional aumento su porcentaje de proteínas, lípidos, minerales y materia inorgánica en relación a la manzana sin impregnar, confirmando que la manzana luego del proceso de impregnación puede aportar más de estos macronutrientes y micronutrientes en relación a la manzana sin impregnar que tiene mayor porcentaje de agua y fibra.

Y también se demostró que el alimento desarrollado por la técnica de impregnación al vacío conserva su calidad microbiológica según la normativa anteriormente descrita luego del tratamiento.

2. Introducción

Los alimentos funcionales, son alimentos naturales o elaborados que tienen mejores características nutricionales y están destinados a ejercer funciones específicas sobre la salud ya que han sido fortificados, enriquecidos, alterados o mejorados (Organización Médica Colegial de España, 2011).

En la presente investigación se diseñó un snack (alimento funcional) a partir de manzana nacional impregnada al vacío (fruta escogida por su alta porosidad, cualidad que se necesita en este tipo de estudios y su alta disponibilidad y fácil acceso para la población guatemalteca), con prebióticos, extractos de aloe vera y jugo de mandarina como elementos que mejoraran las características nutritivas de la manzana.

Se ha observado que la mandarina aporta a la dieta ricas cantidades de hisperidina, narirutina, didimina y vitamina C estas sustancias pueden ejercer efecto positivo contra la presión arterial, la hipercolesterolemia, actuando como antioxidante, protectores vasculares e inhibidores de la pérdida de densidad ósea; las sustancias prebióticas tienen un papel muy importante debido a que actúan modificando la composición de la flora intestinal haciendo que esta sea más beneficiosa, además que aumentan la absorción de minerales y mejoran la respuesta inmune (Betalleluz, 2015); el aloe vera es reconocido por su papel como antiinflamatorio, cicatrizante, inmunomodulador, antifúngico, antiprotozoario, hipoglucémico, reductor de los niveles de colesterol y gastroprotector (Sanzana, 2010).

La relación alimento-salud, marca la tendencia evolutiva de la industria alimenticia y de los consumidores, por lo que se busca incorporar alimentos convencionales a la dieta que no solo cumplan con la nutrición básica, sino que también aporten un beneficio extra a la salud, este beneficio se ve reflejado en la incorporación de carbohidratos, proteínas, vitaminas, minerales, antioxidantes y en este caso prebióticos al alimento (Lattanzio, Kroonb, Linsalatac y Cardinalic, 2009).

La importancia de este trabajo de tesis radica en comprobar por medio de una técnica sencilla la capacidad de generar alternativas alimenticias de alto valor nutricional con elementos de fácil acceso, que se sabe han resultado exitosas en los sistemas tanto privados y públicos de salud e industria en otros países. De la misma manera se busca

utilizar la impregnación al vacío una técnica relativamente sencilla y eficaz para la incorporación de compuestos fisiológicamente activos (CFA) en la matriz porosa de un alimento dentro del marco de los alimentos mínimamente procesados; proporcionando información sobre productos funcionales que puedan responder a las necesidades nutricionales de ciertos individuos (Ostos, Díaz y Suarez, 2012).

3. Antecedentes

La ciencia de los alimentos funcionales se basa en la forma en que los nutrientes específicos y los componentes alimentarios afectan positivamente a las funciones selectivas (respuestas biológicas) del organismo. Pueden ser incluidos en la dieta habitual, pero están especialmente desarrollados para aquellos grupos de población con necesidades nutricionales especiales; como por ejemplo en las etapas del crecimiento para aumentar el rendimiento cognitivo o en niños malnutridos, como defensa contra el estrés oxidativo, para una gran cantidad de patologías crónicas como diabetes e hipertensión, patologías gastrointestinales y cardiovasculares, entre otras (Sanzana, 2010).

Por otro lado, las técnicas de impregnación al vacío (IV), son operaciones utilizadas en la fabricación de alimentos funcionales frescos debido a que permiten combinar con éxito componentes con actividad fisiológica a estructuras matriz (frutas y vegetales) exponiéndolos a ambientes de vacío (Gras et al., 2003).

En 2015, Indira Milagros Betalleluz Pallardel en el Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos para el desarrollo de la Universidad Politécnica de Valencia desarrollo un estudio de enriquecimiento de manzana con probióticos, prebióticos y zumos naturales con la finalidad de desarrollar un alimento funcional de bajo contenido calórico; donde demostró que la manzana puede ser enriquecida con las sustancias mencionadas y que la deshidratación del producto no implica disminución en el contenido de prebióticos y se logra un efecto simbiótico entre los zumos y los microorganismo probióticos (Betalleluz, 2015).

Sigrid Ximena Sanzana Ramos, perteneciente a la misma institución había realizado en el 2010 el proceso de impregnación al vacío con extractos de aloe vera en matrices como el brócoli, la coliflor, la zanahoria y la endibia; donde se demuestra que estas matrices estructurales también permiten la adherencia de componentes de aloe vera en una fase líquida y que se producen cambios significativos en las características de los alimentos. (Sanzana, 2010).

También se ha realizado este proceso para potenciar la capacidad de ciertos alimentos como en el caso del incremento de la capacidad antioxidante de la fresa por

incorporación de vitamina E utilizando la técnica de impregnación al vacío; esta investigación realizada en Medellín-Colombia por Ana María Restrepo, Misael Cortés y Benjamín Rojano en el año 2010 demostró que este proceso es efectivo para aumentar la capacidad antioxidante de la fresa y por ende la fortificación de los alimentos mínimamente procesados sin alterar la estabilidad de los mismos (Restrepo, Cortés y Rojano, 2010).

3.1. Alimentos Funcionales

El término alimento funcional fue introducido por primera vez en Japón a mediados de los 80's y son aquellos alimentos procesados que contienen ingredientes más allá de su contenido nutricional y que ayudan a una función específica del organismo humano (Araya y Lutz, 2003).

Los alimentos funcionales han sido desarrollados prácticamente en todas las categorías de los alimentos. El tipo de producto alimenticio dependerá de cómo se introdujo la propiedad funcional, por ejemplo:

3.1.1. Producto fortificado: considerado como que el alimento en que se aumenta la concentración o cantidad de un nutriente presente en forma natural.

3.1.2. Producto enriquecido: aquellos alimentos a los que se les añaden nutrientes o componentes no presentes de forma natural en él.

3.1.3. Producto alterado: alimento cuyo supuesto componente perjudicial se ha eliminado, reducido y/o sustituido por otro componente beneficioso.

3.1.4. Materia prima mejorada: alimento en el que uno de sus componentes aumenta a través de condiciones de cultivo, crianza animal, nueva composición de piensos o abonos o manipulación genética (Arvanitoyannis & Van Houwelingen-Koukaliaroglou, 2005).

Un alimento natural puede ser funcional si es que contiene componentes que modulen las funciones en el organismo y que sean relevantes para la salud. Un producto alimenticio se puede hacer funcional por muchas formas, una de ellas es incrementando

la concentración del componente que tenga más probabilidad de causar efectos positivos (fortificación), otra forma es agregar un componente que no se encuentre presente en la mayoría de alimentos pero que los efectos sean beneficiosos y que hayan sido demostrados, por ejemplo, el caso de los fructanos tipo inulina considerados como prebióticos. Otra forma de dar “funcionalidad” es reemplazando un componente, usualmente macronutriente, cuya ingesta es usualmente excesiva, por otro componente que sea beneficioso, por ejemplo, el reemplazo de las grasas por inulina de chicoria. (Roberfroid, 1999).

Tabla 1. Ejemplos de alimentos funcionales

Alimento Funcional	Componente funcional	Efectos en la salud
Leche enriquecida	Con omega 3	Reducción en el riesgo de enfermedades cardiovasculares riesgo de cierto tipos de cáncer mejorar el desarrollo del tejido nervioso y las funciones visuales
	Con vitaminas A y D	Favorece la funciones visuales y la adsorción del calcio, respectivamente
Yogures enriquecidos	Con calcio	Ayuda al desarrollo de huesos y dientes. Pueden prevenir la osteoporosis
	Con probiótico	favorece el funcionamiento del sistema gastrointestinal y reducen la incidencia en diarreas, mejoran las calidad de la flora intestinal
Jugos y néctares enriquecidos	Con vitaminas A y D	Favorece la funciones visuales y la adsorción del calcio, respectivamente
	Con hierro	Facilitan el transporte de oxígeno en la sangre. Pueden prevenir la aparición de anemia
Pan enriquecido	Con ácido fólico	Puede disminuir malformaciones congénitas relacionadas con el cerebro y la medula espinal
Cereal fortificado	Con fibra y probiótico	Ayuda a reducir el riesgo de cáncer de colon. Mejora la calidad de la flora intestinal.

Tabla 1. En la tabla se observan ejemplos de alimentos funcionales que han sido desarrollados a través del tiempo y su efecto a la salud (Reichert, 2002).

3.2. Impregnación al vacío.

También conocida como deshidratación osmótica es una operación unitaria que afecta las estructuras capilares de los alimentos y por lo tanto facilita la transferencia de masa entre la estructura del alimento y la solución de impregnación. El mecanismo de impregnación al vacío se atribuyó al mecanismo hidrodinámico y a las teorías de los fenómenos de deformación y relajación donde la presión cae y luego al restaurarla a la presión atmosférica se producen fuerzas impulsoras que permiten impregnar sustancias en las matrices alimenticias (Yilmaz y Bilek, 2018).

Aunque la impregnación al vacío fue desarrollada en principio para optimizar los procesos de deshidratación osmótica, luego fue aplicada a la fortificación de alimentos con sustancias minerales, vitaminas, probióticos, prebióticos, antimicrobianos, agentes reductores de pH, compuestos fenólicos y colorantes naturales (Yilmaz y Bilek, 2018).

La impregnación al vacío es una técnica muy interesante que permite introducir sustancias disueltas o suspendidas en la fracción vacía (es decir, los poros) de los alimentos de forma controlada esta técnica ocurre a temperatura ambiente, evitando la degradación térmica de los compuestos nutricionales y funcionales (Derossi, et. al., 2018).

La operación de impregnación a vacío utiliza los poros y/o espacios intercelulares que poseen los alimentos en general y en mayor grado los vegetales que poseen estructuras altamente compartimentadas. Dichos espacios, del interior de las matrices alimentarias, pueden estar llenos de gases o de líquidos extracelulares, que pueden ser eliminados de las estructuras mediante la aplicación de presiones negativas de vacío dejando ese espacio libre. Si el alimento se encuentra sumergido en un medio líquido en el momento en que se restaura la presión atmosférica, ésta actúa como fuerza impulsora produciendo la entrada de la disolución en la matriz ocupando el espacio disponible dejado por los gases y/o líquidos removidos (Sanzana, 2010).

Basándose en la estructura porosa de algunos alimentos y en la existencia de gas ocluido en ésta, se explicó en 1994 el mecanismo que se produce en la

impregnación a vacío (IV) y que denominaron Mecanismo Hidrodinámico y los fenómenos de deformaciones y relajaciones que lo acompañan cuando se producen en la estructura viscoelástica (Sanzana, 2010).

La aplicación de esta técnica se inició buscando incrementar la velocidad de transferencia de masa en la deshidratación osmótica a través de la impregnación de capilares con soluciones hipertónicas, desde ahí y en los últimos años se han planteado numerosas aplicaciones industriales que la ha alzado como una tecnología no destructiva alternativa en el desarrollo de productos en los que manteniendo la ventaja de la estructura porosa original de los alimentos frescos se modifica la composición de los mismos a través de la incorporación de líquidos que sirven de vehículo de componentes que evitan el oscurecimiento, agentes que dan firmeza, preservantes, anticongelantes, agentes antimicrobianos, ácidos, azúcares, depresores de la actividad de agua, vitaminas y compuestos bioactivos funcionales entre otros (Bellateluz, 2015).

En la Tabla 2 se presentan algunas investigaciones donde se emplean la impregnación a vacío en el desarrollo de alimentos demostrando el potencial de esta técnica.

Matriz Alimenticia	Metabolito impregnado	Funcionalidad	Referencia
Durazno	Pectinmetil esterasa Cl ₂ Ca	Incremento de la firmeza en duraznos enlatados	Javeri (1991)
Fresa	Solución de Cl ₂ Ca y espermine	Incremento de la firmeza	Ponappa et al.(1993)
Manzana	Extracto de uva ,sucrosa y pectina de alta metilación	Mejora de las propiedades mecánicas y estructurales del tejido. Reducción del agua congelable, mejora de la resistencia al daño por congelación	Martinez-Monzó, (1998)
Manzana	Solución de Cl ₂ Ca	Mejora de la textura	Del Valle, (1998)
Manzana	Solución isotónica de sucrosa	Incremento de la conductividad térmica	Martinez-Monzó, (2000)
Manzana, fresa, frambuesa	Pectina de alta metilación Cl ₂ Ca,	Reduce la pérdida de firmeza después de la pasteurización	Degrave et al.(2003)
Fresa, papaya	Soluciones de sacarosa	Reducción de la aw	Moreno et al. (2004); (2000)
Fresas	Jarabe de fructosa de maíz pectina de alta metilación calcio y zinc	Mejora de la calidad textural y reducción de la pérdida por goteo después de la descongelación	Zie y Zhao,(2004)
Berenjena	Pectinmetil esterada derivada de <i>aspergillus niger</i> extraída de manzana y pomelo y Cl ₂ Ca	Incremento de la firmeza	Banjongsinsiri et al., (2004)
Manzana	Miel	Prevención del oscurecimiento enzimático, mejora actividad antioxidante	Jeon y Zhao, (2005)
Fresa	Pectina de alta metilación Cl ₂ Ca, pectina de manzana	Reduce el daño estructural después de la congelación rápida	Van Buggenhout et al., (2006)
Manzana	Solución de sucrosa, ácido ascórbico, hexilresorcinol Cl ₂ Ca	Efectivo inhibidor del oscurecimiento y ablandamiento durante el almacenamiento	Bieganska-Marecik y Czapski, (2007).
Espinaca	Solución de trealosa	Mejora de la tolerancia a la congelación	Phoon et al. (2008)

Matriz Alimenticia	Metabolito impregnado	Funcionalidad	Referencia
Zanahoria	Solución acuosa de chitosan y ácido acético (film comestible)	Mejora la resistencia a la transmisión de vapor. Mejora la preservación de color y la resistencia mecánica durante el almacenamiento en frío	Vargas et al. (2009)
Berros	Proteínas anticongelantes	Estabilización de la estructura para prevención de problemas en procesos de congelación y la cadena de frío debido a fluctuaciones de temperatura.	Cruz et al. (2009)
Pomelo (impregnación a vacío+deshidratación osmótica)	Lactato de calcio	Extensión del tiempo de vida útil por reducción de la velocidad de respiración	Moraga et al. (2009)
Pimienta , cetas, calabacín	Soluciones ácido láctico	Incremento del grado de acidificación	Derossi et al. (2010), (2013), (2011).
Manzana	Solución isotónica de fructosa, ácido ascórbico, esencia de manzana verde	Mejora del sabor	Comandini et al.(2010)
Calabacín	Solución de maltodextrina NaCl Cl ₂ Ca	Mejora de la ganancia de soluto y agua, cambios texturales y microestructurales limitados	Oochino et al. (2011)
Peras minimamente procesadas	EDTA, 4-hexylresorcinol, citrato y ascorbato, lactato de calcio	Prevención del oscurecimiento enzimático. Preservación de propiedades mecánicas	Perez Cabrera et al. (2011)
Piña	Film formado por emulsión de caseinato	Extension de la vida útil	Talens et al. (2012)
Fresa	Solución de trealosa y extracto de trigo	Mejora de la tolerancia a la congelación	Velickova et al. (2013)
Aceitunas	Solución de NaCl NaOH	Acorta los tiempos de desamargado	Tamer et al. (2013)

Alimento	Componente incorporado	Funcionalidad	Referencia
Vegetales (berenjena, champiñones, zanahoria)	Calcio	Enriquecimiento con minerales	Grass et al. (2003)
Manzana	Solución isotónica con lactato de calcio y gluconato ferroso	Enriquecimiento con calcio y hierro	Barrera et al. (2004)
Manzana	Jarabe de fructosa de maíz, caseinato de calcio acetato de alfa tocoferol Gluconal y lactato de zinc	Enriquecimiento con vitamina E y calcio y zinc	Park et al. (2005)
Pera	Solución diluida de miel con alfa tocoferol	Enriquecimiento con vitamina E	Lin et al. (2006)
Papa entera	Vitamina C	Enriquecimiento antioxidante	Hironaka et al. (2011)
Broccoli, endivia, zanahoria, coliflor	Aloe Vera	Antioxidante	Sanzana et al. (2011)
Hojas de lechuga	Solución isotónica de sacarosa con lactogluconato de calcio	Enriquecimiento de minerales	Grass et al. (2011)
Manzana	Derivados de queretina de piel de manzana	Enriquecimiento con flavonoides	Eschulze et al., (2012)
Manzana	Jugo de mandarina	Flavanonas (hesperidina)	Betoret et al. (2012)
Manzana	Jugo de manzana comercial enriquecido con extracto de cáscara de manzana (alto contenido de flavonoides)	Flavonoides (quercitina)	Schulze et al. (2012)

Tabla 2. Ejemplos de la aplicación de la técnica de impregnación a vacío para modificar propiedades fisicoquímicas, saludables, funcionales y atributos sensoriales de frutas y verduras (Bellateluz, 2015).

3.3. Mecanismo Hidrodinámico

Al someter al producto, inmerso en un líquido (A-B), a presiones sub-atmosféricas, este gas sufre en primer lugar una expansión para equilibrarse con la presión impuesta al sistema, lo que implica por una parte un nivel de desgasificación de la estructura porosa del alimento, función de la presión aplicada (C), y por otra, una

penetración de líquido por capilaridad una vez alcanzado el equilibrio de presiones en el sistema (D) (Sanzana, 2010).

En segundo lugar, la restauración de la presión atmosférica provoca un nuevo gradiente de presiones que va a actuar como fuerza impulsora y que hará que los espacios intercelulares se llenen parcialmente de líquido (E). La cantidad de líquido que impregne la estructura, dependerá del nivel de desgasificación, y por tanto de la presión de trabajo. Esta penetración de líquido, producida por gradientes de presión, que actúan como fuerzas impulsoras, es reversible y está controlada por la compresión o expansión del gas ocluido en los espacios intercelulares. Los citados autores no sólo explican el procedimiento del mecanismo hidrodinámico (HDM), sino que proponen un modelo matemático que permite cuantificar los cambios inducidos en el alimento (Sanzana, 2010).

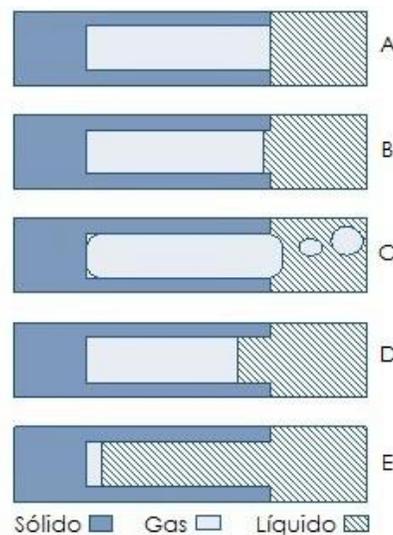


Figura 1. Mecanismo hidrodinámico en un poro ideal (Sanzana, 2010).

En el proceso de impregnación a vacío se produce una transferencia de materia desde y hacia la matriz porosa que es sujeto de la impregnación, básicamente un intercambio de materia del alimento con el entorno y la disolución de impregnación que se ve reflejado en ganancias y pérdidas de peso (Sanzana, 2010).

Cuando se hace vacío durante todo el proceso de deshidratación osmótica se da el mecanismo hidrodinámico de penetración que consiste en que el gas presente en los poros de la matriz se expande y sale gradualmente de la misma. Una vez restaurada la presión del sistema, el gradiente de presión actúa como fuerza impulsora provocando la compresión del gas remanente y permitiendo que la disolución exterior ocupe dicho espacio. La entrada masiva de disolución exterior provoca cambios en la composición y en el peso de la muestra, favoreciendo procesos de difusión en la fase líquida a través de los poros donde se ha sustituido gas por el líquido (Derossi, et. al., 2018).

3.4. Materias Primas

3.4.1. Manzana

La manzana es una fruta pomácea comestible obtenida del manzano doméstico (*Malus domestica*), otros manzanos (especies del género *Malus*) o híbridos de aquel; existen más de 7500 variedades conocidas de manzanas.

(Cáceres, 1999).

Es una de las frutas más cultivadas del mundo, así en 2005 se produjeron 55 millones de toneladas. De ellas, dos quintas partes fueron de China. Otros grandes productores son EE. UU., Turquía, Francia, Italia e Irán. La producción también es de importancia en Argentina, donde se producen más de 1 millón de toneladas, principalmente provenientes del Alto Valle del Río Negro, donde el clima y las características del suelo favorecen el cultivo. Las manzanas se han aclimatado en Ecuador a grandes altitudes sobre el nivel del mar, donde proveen cosecha dos veces al año debido a las temperaturas templadas constantes todo el año (Cáceres, 1999).

Es rica en sales minerales como potasio, fósforo, calcio y hierro, en vitaminas A, B, C, E, niacina y azúcares, principalmente glucosa y fructosa. El contenido en fibra de la manzana, y principalmente la pectina, se considera beneficioso para las funciones gastrointestinales, a la vez que ayuda a equilibrar el nivel de azúcar en la sangre y el colesterol. Recientes investigaciones han indicado que las manzanas contienen niveles elevados de compuestos biológicamente activos que actúan como

antioxidantes y pueden ayudar a proporcionar protección contra las enfermedades cardiovasculares y el cáncer. Entre estos compuestos, conocidos como fitoquímicos, se encuentran los compuestos fenólicos (Seipel, et.al, 2009).

La porosidad de un alimento es una característica importante en el proceso de impregnación al vacío pues las fracciones de gas en el poro serán ocupadas por el líquido a través del mecanismo hidrodinámico. Se menciona que la manzana no sólo presenta altos niveles de porosidad efectiva en comparación con otras frutas (mamey, plátano, durazno y mango) sino también una respuesta lineal a la impregnación al vacío lo que significa que la matriz sólida sufre deformaciones menores por lo cambios de presión (Mejía, 2015).

3.4.2. Aloe Vera

El aloe vera (*Aloe barbadensis* Mill.) es un xerofito perenne que pertenece a la familia de las liliáceas, que consta de unas 360 especies. La fracción interna de las hojas es un parénquima grande de paredes delgadas en el que el agua se mantiene como un gel. El gel de Aloe vera consiste en agua (99.5%) y sólidos (0.5%) como polisacáridos, vitaminas, minerales, enzimas, compuestos fenólicos y ácidos orgánicos. Sin embargo, una fracción en masa del 60% del total de sólidos está constituida por polisacáridos. Recientemente, el interés en el gel de Aloe vera ha aumentado debido a sus propiedades saludables. En el pasado, las personas usaban el Aloe vera por sus propiedades curativas y terapéuticas. Recientemente se ha demostrado que la ingesta del gel tiene efectos positivos en el tratamiento de enfermedades gastrointestinales, renales y cardiovasculares. Además, el gel se ha utilizado para reducir los niveles de colesterol y triglicéridos en la sangre humana. También se han reportado propiedades antiinflamatorias y antibióticas, así como efectos positivos contra varias enfermedades. Varios artículos científicos demostraron que la mayoría de los beneficios para la salud pueden atribuirse a los polisacáridos tales como celulosa, hemicelulosa, glucomananos, derivados de manosa y mananos acetilados (Derossi, et. al., 2018).

Dadas estas consideraciones, las industrias alimentarias se han visto atraídas por el uso de Aloe vera como ingrediente para mejorar las propiedades

funcionales de los productos alimenticios. Además, la FDA aprobó el uso de gel de Aloe vera extraído como un "suplemento dietético". Por lo tanto, una gran cantidad de alimentos enriquecidos con Aloe vera como yogurt, jugo y pasta están disponibles en el mercado (Derossi, et. al., 2018).

3.4.3. Prebióticos (Azúcares reductores)

Son ingredientes alimentarios no digeribles que afectan beneficiosamente al huésped estimulando selectivamente el crecimiento y/o actividad de una o un número limitado de bacterias en el colon, y por lo tanto mejora la salud. (Gibson y Roberfroid, 2010).

Originalmente se consideraban polisacáridos, extraídos de fuentes vegetales, los cuales eran resistentes a la hidrólisis enzimática a nivel del colon que posee el ser humano. Por lo tanto, algunos autores proponen la definición de prebiótico como un ingrediente fermentable que permite los cambios específicos tanto en su composición y/o actividad microbiana a nivel del tracto digestivo que beneficia la salud del individuo. De acuerdo a esta definición un prebiótico debe cumplir los siguientes criterios experimentales (Vrese y Schrezenmeir, 2008).

No digeribles: Algunos estudios han demostrado que los prebióticos no son digeribles por el huésped a nivel in vitro e in vivo, como lo demuestran estudios realizados en ratas sanas (Vrese y Schrezenmeir, 2008).

Fermentación microbiana intestinal: el prebiótico debe ser fermentado por la microflora benéfica del huésped. Un análisis experimental in vivo con ratas sanas, demostró que suministrando dosis pequeñas de carbohidratos prebióticos se favorecía la reducción de bacterias heteroxénicas en el intestino (Vrese y Schrezenmeir, 2008).

Algunas ventajas atribuidas con el consumo de prebióticos son la mejora en la absorción de calcio y magnesio, produciendo un fortalecimiento de huesos y dientes, mejoramiento del sistema inmune, fortalecimiento de la integridad intestinal, restricción de las bacterias patógenas y favorece la disminución de colesterol sérico (Vrese y Schrezenmeir, 2008).

Algunos prebióticos actualmente disponibles para el ser humano son los fructanos, considerados en el grupo de los fructooligosacaridos en donde destaca la inulina y la oligofruktosa.

3.4.3.1. Inulina

Este se produce por transfructosilación de la sacarosa, empleando β -fructosidasa o bien por hidrolisis de la inulina vía enzimática, y se emplea como sustituto de azúcar y grasa, para modificar la textura de ciertos alimentos, pero cumpliendo los criterios que permitan su uso como prebióticos (Roman et.al., 2009).

La inulina se considera fibra soluble no digerible y promueve el crecimiento de la flora bacteriana intestinal como las bifidobacterias y lactobacilos. Su extracción es obtenida de plantas para uso en la industria alimentaria como la patata (*Helianthus tuberosus*), cebolla (*Allium cepa L.*) ajo (*Allium sativum*), espárrago (*Asparagus officinalis L.*), centeno (*Secale cereale*) y achicoria (*Chichorium intybus*) (Roman et.al., 2009).

La actividad prebiótica que manifiesta la inulina ayuda a la flora intestinal a promover el desarrollo y estabilidad de las bacterias a nivel tracto digestivo llevando consigo a una mejor digestión. Es por ello que al ser ingerida no libera grandes cantidades de azúcar favoreciendo la estabilidad de la insulina en la sangre. También ayuda en el control de colesterol en sangre, fortaleciendo huesos y reduciendo la osteoporosis (Roman et.al., 2009).

Un reporte de la FAO determino que estos ingredientes cuando se ingieren adecuadamente pueden mejorar la salud humana. Sin embargo, algunas propiedades con las que cuenta la inulina no se han determinado detalladamente para el consumo humano (Roman et.al., 2009).

3.4.3.2. Oligofruktosa o Fructooligosacárido (FOS)

Es uno de los principales oligosacáridos bifidogénicos en cuanto a volumen de producción. Se elaboran mediante 2 procesos, que resultan en

productos finales ligeramente diferentes. En el primer método, los FOS se producen a partir del disacárido sacarosa usando la actividad transfructosilación del enzima β -fructofuranosidasa de *Aspergillus niger*. El segundo método es la hidrólisis enzimática o química de la inulina (Pérez, López y Ros, 2004).

Se caracteriza principalmente por su actividad bifidogénica que consiste en la estimulación selectiva de un grupo limitado de bacterias beneficiosas (principalmente bifidobacterias y lactobacilos) en el colon humano. Como consecuencia de la fermentación de los Oligosacáridos en el colon y el descenso de pH de su contenido se ha observado igualmente un descenso de otros géneros bacterianos (perjudiciales) (Pérez, López y Ros, 2004).

En distintos estudios se ha demostrado que la administración de FOS tiene efectos beneficiosos sobre individuos afectados de estreñimiento acompañado de un incremento en el peso de las deposiciones fecales (Pérez, López y Ros, 2004).

Se ha observado de la misma manera que la utilización de FOS en pacientes diabéticos descende los niveles de glucemia e insulinemia así como la disminución de los valores en los lípidos sanguíneos, ha sido descrito un descenso de los niveles de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y colesterol total en individuos con diabetes no insulino-dependiente mediante el empleo de oligofruktosa (Pérez, López y Ros, 2004).

3.4.4. Mandarina

Fruto del mandarino (*Citrus reticulata*), árbol de la familia de las rutáceas muy similar al naranjo, aunque algo más pequeño y delicado. Los frutos, llamados hesperidios, tienen la particularidad de que su pulpa está formada por numerosas vesículas llenas de jugo. Su pequeño tamaño, su sabor más aromático y la facilidad de quitar su piel, hacen de esta fruta una de las más apreciadas. Existen dudas respecto a su origen, aunque se sabe con certeza que se ha cultivado en China

durante varios milenios, remontándose la primera referencia de este fruto al siglo XII a.C. Su nombre se atribuye al color de las togas que utilizaban los altos gobernantes de la antigua China. Desde allí se extendió a gran parte del sureste asiático. En el sur de Europa, norte de África y Norteamérica se cultiva desde el siglo XIX (Mazariesgos, 2008).

La mandarina es fuente de vitamina C, aunque su contenido es menor que en las naranjas. El aporte de provitamina A es considerable y superior al de las naranjas. Es destacable su composición en criptoxantina (caroteno), un compuesto que además de transformarse en vitamina A en nuestro organismo, tiene propiedad antioxidante (843 µg/100 g porción comestible) (Mazariesgos, 2008).

También posee ácido cítrico y ácido málico, responsables del sabor ácido, pero en menor cantidad que la naranja. Además, la mandarina contiene flavonoides (hesperidina, neohesperidina, nobiletina, tangeritina). Al igual que otras frutas cítricas, la mandarina también posee sustancias volátiles responsables de su aroma (limonoides) localizadas en la corteza, un tipo de terpenos entre los que cabe destacar el d-limoneno (Mazariesgos, 2008).

El jugo de la mandarina puede utilizarse para tratar afecciones digestivas (diarrea, flatulencia, gastritis, tifoidea) y respiratorias (catarro, inflamación de la garganta, fiebre, resfrió, tos) y reumatismo. El jugo de la mandarina también puede utilizarse como tratamiento tópico de heridas, magulladuras, raspones, úlceras, tumores; en fricciones se usa para tratar reumatismo; la cáscara o corteza machacadas se aplican en cataplasma para tratar raspones y magulladuras, hemorroides y erisipela; con las flores se prepara un ungüento para afecciones de la piel (Mazariesgos, 2008).

4. Justificación

La necesidad de realizar este trabajo de investigación surge de la alta viabilidad que presenta el método de impregnación al vacío para desarrollar alimentos funcionales y aprovechar los recursos naturales que comúnmente tenemos a la mano y los nutrientes de los mismos. En este caso partir de prebióticos y extractos de aloe vera y mandarina e incorporarlos a la matriz porosa de la manzana. Con el fin de demostrar el enriquecimiento nutricional de este alimento en comparación a las manzanas normales.

Se presenta esta investigación debido a la poca evidencia que se tiene en el país de la aplicación de la técnica de impregnación al vacío en el desarrollo de alimentos funcionales (con características nutricionales mejoradas) y de esta manera demostrar la utilidad del mismo para aumentar la capacidad de retención de nutrientes o sustancias beneficiosas (probióticos) en matrices porosas.

A partir de esto se busca con la presente investigación introducir a la comunidad científica en el desarrollo de productos funcionales que incorporen sustancias biológicamente activas en matrices atractivas al consumidor y que los mismos en base a estudios posteriores puedan desarrollarse como propuestas que puedan distribuirse a nivel nacional; ya sea por parte de la industria privada o bien estas técnicas sean implementadas en el sistema de salud pública como suplemento en la dieta de pacientes.

Al utilizar extractos de origen natural para preparar la solución a impregnar se busca aprovechar los recursos agrícolas del país; de manera que abra la puerta para así utilizar otros productos locales, ya sea como matrices o extractos.

Esta investigación busca solamente demostrar que el método de impregnación al vacío es útil para realizar estos procesos de enriquecimiento y que las características del alimento funcional son mayores a las de la matriz original, por lo que se demostraran las características nutricionales de la matriz antes y después de ser sometidas al proceso de impregnación de la misma manera se demostraran las características nutricionales de la solución de impregnación y de esta forma observar que concentraciones de los tres nutrientes es capaz de absorber la matriz en relación al total teórico que se podría incorporar.

Como parte del proceso de realizar un alimento con características nutricionales mejoradas se le realizara al alimento análisis bromatológico o proximal para determinar en qué proporción como alimentos se ven mejoras o alteraciones en las proporciones de carbohidratos, lípidos, proteínas y grasas.

5. Objetivos

A. General

1. Evaluar manzanas impregnadas con una solución de extracto de aloe vera, jugo de mandarina y probióticos por medio de la técnica de impregnación al vacío contra manzanas convencionales y determinar que las características nutricionales, identificación de aloe vera, cuantificación de ácido ascórbico y azúcares reductores son mayores en el alimento funcional desarrollado.

B. Específicos

1. Determinar la calidad microbiológica de la solución enriquecedora a utilizar en el proceso de impregnación al vacío.
2. Establecer las características del alimento funcional mediante el análisis proximal del mismo.
3. Identificar la presencia aloe vera en el alimento funcional y en la solución de impregnación.
4. Cuantificar ácido ascórbico y azúcares reductores en el alimento funcional y la solución de impregnación.
5. Establecer que las características nutricionales, identificación de aloe vera, cuantificación de ácido ascórbico y azúcares reductores del alimento funcional desarrollado son mayores que las de la manzana común.

6. Hipótesis

Se logrará desarrollar un alimento funcional por medio de Impregnación al Vacío a partir de manzanas con extractos naturales de Aloe Vera, Mandarina y prebióticos que presente mejores características nutricionales que las manzanas comunes.

7. Materiales y Métodos

7.1. Universo

Manzanas Nacionales con alta porosidad y alta capacidad de impregnación al vacío.

7.2. Población

5 costales de manzanas nacionales (cada costal obtenido de 1 puesto comercial distinto dentro del perímetro de muestreo Mercado la terminal).

7.3. Muestra

Se seleccionaron de cada costal perteneciente a la población 10 manzanas nacionales, haciendo un total de muestra de 50 manzanas en total.

7.4. Muestreo

Se realizó la compra de cada costal de manzanas en el Mercado la Terminal Zona 4, cada lote fue comprado por conveniencia.

Las manzanas (población y muestra) se seleccionaron de cada costal tomando en cuenta los siguientes criterios de inclusión:

- No estar podridas o con manchas
- No estar dañadas o golpeadas
- No tener cortes, mordidas o sin cascara
- Cada costal debe pertenecer a un distinto puesto comercial para garantizar diferencias entre lotes.
- No ser verdes
- No ser manzanas de variedades no nativas o de alguna marca.

Tabla No. 3 Detalles del muestre de los lotes de manzanas nacionales.

Lote	Coordenadas de muestreo	Lugar de cosecha / procedencia	Población	Muestra
Lote 01	14.615161, -90.520477	Jutiapa / Jutiapa	50 manzanas	10 manzanas
Lote 02	14.616875, -90.523384	Jutiapa / Jutiapa	50 manzanas	10 manzanas
Lote 03	14.618479, -90.521896	Salcajá / Totonicapán	50 manzanas	10 manzanas
Lote 04	14.617171, -90.520317	Santo Tomás Chichicastenango / Quiché	50 manzanas	10 manzanas
Lote 05	14.618547, -90.521843	Coatepeque / Quetzaltenango	50 manzanas	10 manzanas

En la tabla número 1 se observan las coordenadas de muestreo de cada lote de manzanas dentro del mercado la terminal zona 4 así como el lugar de procedencia de los lotes de muestra; se hizo compra de una población de 50 manzanas pertenecientes a cada lote y se seleccionaron 10 manzanas para las muestras tomando en cuenta los criterios de inclusión.

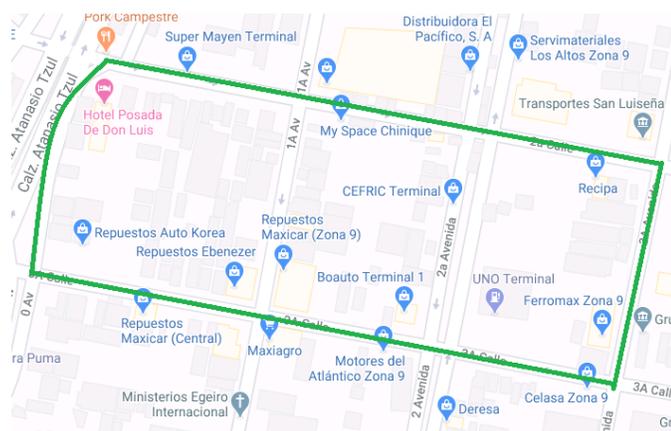


Figura 2. Perímetro de muestreo dentro del mercado la terminal zona 4, fuente: Google Maps.

7.5. Recursos Humanos

1. Steven Alexander Gil Pichillá (**Tesista**)
2. Licenciada Aylin Evelyn Santizo Juárez (**Asesora**)
3. Licenciado Julio Gerardo Chinchilla Vettorazzi (**Revisor**)

7.6. Materiales

7.6.1. Materiales

- Manzanas Nacionales con alta porosidad y alta capacidad de impregnación al vacío.
- Extracto de *Aloe Vera* (*Aloe barbadensis Mill.*) Nacional distribuido por Pronatt S.A.
- Jugo Natural de mandarina extraído de mandarinas nacionales.
- Sobres de Biosilat, Prebióticos (OLIGOFRUCTOSA 2G; INULINA 2G) cada unidad.

7.6.2. Equipos

- Bomba de vacío (GAST)
- Cámara de vacío / Desecadora
- Licuadora
- Campana de Flujo laminar
- Agitador
- Espectrofotómetro Genesys 10 UV-VIS
- Potenciómetro Orion Star A215
- Balanza Analítica Mettler Toledo AB104
- Estufa
- Mechero
- Lámpara UV-VIS onda corta (Mineralight compact 4)
- Lámpara UV-VIS onda larga (Mineralight modelo SL)

7.6.3. Cristalería e Instrumentos

- 7 Beakers de 50mL, 1000mL y 250mL

- 1 Beaker de 1000 mL
- 8 Erlenmeyers de 500 mL
- Varilla de Agitación
- 2 probetas de 10mL, 25mL, 50mL y 100 mL)
- Pinzas para tubos de ensayo
- Vidrio de Reloj
- Bureta de 25mL
- Pipetas volumétricas de 1mL, 3mL, 10mL.
- Goteros
- Cuchillos
- Peladores
- Descorazonador
- Tabla de picar
- Exprimidor
- Termómetro
- Temporizador
- Micropipetas
- Bulbos
- Pipeteador
- 50 tubos de Ensayo
- Gradilla
- Malla 2 mm / colador
- Baño maría
- Cámara cromatografía
- Soporte universal
- Pinza para bureta
- Agitadores magnéticos
- Embudo
- Embudo de buchner
- Kitasato
- 12 placas de silica gel
- 10 balones aforados de 50 ml

7.6.4. Reactivos

PA: Grado Reactivo Analítico

QP: Grado Químicamente Puro

- Ácido 3,5 dinitrosalisílico (DNS)
- Yodo titrisol TS 0.1N
- Metanol PA
- Acetato de Etilo PA
- Agua destilada
- Fenol
- Bisulfito de Sodio
- Hidróxido de sodio
- Fructosa o Glucosa
- Metanol
- Ácido Sulfúrico 2 N PA
- Hidróxido de sodio 1% PA
- Almidón de papá
- Yoduro de mercurio
- Glucosa 99%
- Acido ascórbico estándar
- Acido ascórbico materia prima

7.7. Metodología

7.7.1. Diseño de la investigación

- a) Etapa I: Se realizó el muestreo de 50 manzanas por lote (5 lotes de los cuales se seleccionaron 10 manzanas por lote) en mercado la terminal y el resto de materia prima (prebióticos, mandarina, aloe vera).
- b) Etapa II: Se realizó análisis proximal a 1 manzana sin tratamiento (%agua, % materia seca total, % extracto etéreo, % fibra cruda, %proteína, % de cenizas y % extracto libre de nitrógeno).

- c) Etapa III: Se preparo la solución enriquecedora a base de extracto de Aloe Vera, jugo de mandarina y prebióticos.
- d) Etapa IV: Se identifico (aloe vera) y cuantificaron (azucares reductores y acido ascórbico) para ver cantidades de los tres en la solución de impregnación.
- e) Etapa V: Se realizo análisis microbiológico de la solución a impregnar según RTCA 67.04.50:08.
- f) Etapa VI: Se preparo la materia prima y se impregno la matriz porosa de la manzana con la solución enriquecedora o de impregnación mediante una bomba y cámara de vacío.
- g) Etapa VII: Se realizo el análisis proximal de 5 manzanas tratadas 1 por lote (%agua, % materia seca total, % extracto etéreo, % fibra cruda, %proteína, % de cenizas y % extracto libre de nitrógeno).
- h) Etapa VIII: Se determino la presencia de los elementos impregnados en la matriz (aloe vera, jugo de mandarina y prebióticos) mediante pruebas confirmatorias; se determinó 5 veces la presencia de aloe vera por medio de cromatografía de capa fina (1 por lote) y 6 veces los ensayos de determinación de ácido ascórbico y azucares reductores (1 por lote y la sexta tomada al azar entre los 5 lotes).
- i) Etapa IX: Se analizó y comparó los resultados del enriquecimiento de la manzana antes y después del tratamiento y discutir la eficacia del proceso de impregnación y observar en que eje del análisis proximal se ve la mejora nutricional (%agua, % materia seca total, % extracto etéreo, % fibra cruda, %proteína, % de cenizas y % extracto libre de nitrógeno).

7.8. Métodos

7.8.1. Preparación de la Muestra y la solución a Impregnar

Preparar los discos de manzana justo antes de los tratamientos de impregnación al vacío con un pelador y descorazonador de manzanas. El diámetro externo promedio de los discos será de 6 cm, el diámetro interno del disco será de 1 cm y la altura de los discos serán de 0.5 cm aproximadamente.

En cada tratamiento sumergir los discos en una solución de impregnación de 1 L; volumen final que contiene 200 mL de prebióticos disueltos en agua (4 gramos oligofruktosa y 8 gramos de Inulina), 400 mL de jugo de mandarina y 400 mL de extracto natural de Aloe vera.

7.8.2. *Impregnación Al Vacío*

Sumergir los discos de manzana dentro de la solución a impregnar, colocar muestra dentro de la cámara de vacío y proceder a la impregnación utilizando presiones de 40 mbar – 30 mmHg durante un tiempo de vacío de 3 minutos; sacar la muestra y dejar dentro de la solución por un tiempo de reposo de 10 minutos.

Luego de los 10 minutos dejar escurrir el líquido excedente utilizando un colador.

Derossi, et. al. determina en estudios previos que mientras menor es la presión aplicada al momento de impregnar al vacío hay mayor porcentaje de impregnación de componentes y mientras mayor es el tiempo de tratamiento hay mayor daño en la matriz porosa de la manzana (Derossi, et. al., 2018).

7.8.3. *Determinación de Azúcares reductores (para Oligofruktosa e Inulina)*

Realizar la determinación de azúcares reductores por el método del ácido 3,5 dinitrosalisílico (DNS) que consiste en la óxido- reducción en medio alcalina del ácido 3,5 dinitrosalisílico con los azúcares reductores. El DNS reacciona con el grupo reductor de la glucosa y fructuosa para formar un compuesto rojo-marrón que tiene máxima absorción a 550nm.

7.8.3.1. *Preparación del reactivo ácido 3,5 dinitrosalisílico*

Disolver 10 gr de DNS, 2 gr de fenol y 0.5 gr de bisulfito de sodio y llevar a un litro con hidróxido de sodio al 1%, filtrar reactivo por gravedad, transferir a una botella oscura y conservar bajo refrigerar (Hurtado, 2015).

7.8.3.2. Curva de calibración

Preparar una curva de calibración usando glucosa 99% como patrón. Preparar soluciones estándar de glucosa de concentración entre rangos de 0.1 mg/ml - 3.0 mg/ml (0.1 mg/ml, 0.2 mg/ml, 0.3 mg/ml, 0.6 mg/ml, 0.8 mg/ml, 0.9 mg/ml, 1.2 mg/ml, 1.5 mg/ml, 1.6 mg/ml, 1.8 mg/ml, 2.1 mg/ml, 2.4 mg/ml, 2.7 mg/ml y 3.0 mg/ml) en balones aforados de 50mL, pesar el equivalente de glucosa 99% transferir a balón y llevar a aforo con agua purificada.

Tomar una alícuota de 1 mL de cada solución por triplicado y transferir a tubos de ensayo, agregar 3 mL de reactivo DNS y calentar en un baño por 5 minutos, retirar del baño de agua y enfriar a temperatura ambiente.

Observar un cambio de color de la solución de naranja a colores rojo-naranja o rojo-ladrillo; leer cada muestra con sus triplicados espectrofotométricamente a 550 nm. Utilizar agua destilada como blanco (Hurtado, 2015).

7.8.3.3. Cuantificación de azúcares reductores (inulina y oligofructosa)

Luego del proceso de impregnación al vacío de cada muestra, licuar los discos de manzana impregnados con 100 mL de agua ultra pura hasta llegar a una consistencia de pure, tomar el volumen final después de licuar para cada muestra.

Filtrar el contenido por vacío utilizando un embudo de buchner y Kitasato, tomar una alícuota de 0.25 a 1 mL del filtrado (esto depende del rango de lectura espectrofotométrico que tenga la muestra) y transferir a tubos de ensayo por triplicado, agregar 3 mL de reactivo DNS y calentar en un baño por 5 minutos, retirar del baño de agua y enfriar a temperatura ambiente.

Observar un cambio de color de la solución de naranja a colores rojo-naranja o rojo-ladrillo; leer cada muestra con sus triplicados espectrofotométricamente a 550 nm. Utilizar agua destilada como blanco (Hurtado, 2015).

Realizar la medición de azúcares reductores en un blanco (manzana pelada, descorazonada y cortada en discos sin impregnar) tomado de un lote al azar y en 1 mL de la solución de impregnación.

7.8.4. Determinación de Vitamina C

El método a utilizar para el análisis cuantitativo de las muestras, es el requerido por la farmacopea de los Estados Unidos (The United States Pharmacopeia XXIII). Cada mililitro de yodo titrisol TS gastado en la titulación equivale a 8.806 mg de Ácido Ascórbico.

7.8.4.1. Preparación de reactivos

Ácido sulfúrico 2N: En un frasco con capacidad de 1 litro ámbar agregar 112 cc de agua purificada y diluir al litro con 98 cc de ácido sulfúrico.

Almidón TS: pesar 0.2500 g de almidón de papa y 0.0025 g de yoduro de mercurio y disolver en 150 mL de agua caliente y esperar a que enfrié.

Yodo 0.1 N: utilizar yoduro comercial previamente estandarizado o realizar 0.1N.

7.8.4.2. Curva de Calibración cuantificación de ácido ascórbico.

Disolver 2m, 5mg, 10mg 15mg y 25 mg de ácido ascórbico (materia prima estandarizada) en un Erlenmeyer de 1000 mL con 100mL de agua y 25 mL de ácido sulfúrico 2N, agregar 3mL de almidón TS y valorar con yodo 0.1 N VS. Cada mL de yodo 0.1 N es equivalente a 8.806 m de ácido ascórbico. Realizar cada punto por quintuplicado.

7.8.4.3. Cuantificación de ácido ascórbico (vitamina C).

Luego del proceso de impregnación al vacío, licuar toda la muestra previamente con 75 mL de agua purificada y agregarla en un Erlenmeyer de 1000 mL hacer limpiezas de la licuadora con aproximadamente 25 mL de agua; agregar 25 mL de ácido sulfúrico 2N. Luego agregar 3mL de almidón TS y valorar con yodo 0.1 N VS. Cada mL de yodo 0.1 N es equivalente a 8.806 mg de ácido ascórbico.

Realizar la medición de una manzana de cada lote y una de otro lote al azar, de la misma forma medir un blanco de un lote al azar y medir la cantidad de ácido ascórbico que tienen 5 mL de la solución de impregnación.

7.8.5. Cromatografía de Capa Fina para determinar presencia de Aloína

Se realizó una prueba de cromatografía en capa fina para determinar la presencia del extracto de aloe vera (aloína) en la manzana impregnada, utilizando el Rf teórico de la aloína como marcador para determinar el control de presencia; se utilizó para el ensayo una fase estacionaria de Silica gel 60, una fase móvil de (Acetato de etilo: metanol: agua) 100:13.5:10. La distancia que recorrió el eluyente fue entre 7 - 8 cm y el tiempo de saturación de la cámara de desarrollo cromatográfico fue de una hora.

Licuar el alimento impregnado al vacío utilizando 100 mL de agua, filtrar la muestra licuada e impregnada utilizando un embudo de buchner y un kitasato, tomar 1 gramo del producto filtrado y extraer con 10 mL de metanol a ebullición. Repetir proceso con una muestra de cada lote, con un blanco, materia prima y con la solución de impregnación en cada placa.

Utilizar como compuesto de referencia teórico la Aloína con un Rf de 0.45, el sistema de detección será sin tratamiento químico observado a una longitud de onda UV-365 nm y a UV-254 nm.

Los compuestos principales como las aloínas, los aloinósidos y aloesinas se muestran en UV-254 nm con cierto grado de fluorescencia amarilla y azul (Wagner y Bladt, 1996).

Observar fluorescencia en muestra, materia prima y solución de impregnación y comparar Rf del punto relacionado a la Aloína.

7.8.6. Análisis Proximal del Alimento

Realizado por el Departamento de Bromatología

7.8.6.1. Determinación de Humedad:

Prueba de materia seca para determinar humedad utilizando métodos de referencia AOAC 930.15, Bateman 6.111 y AOAC 925.04.

7.8.6.2. Determinación de Cenizas:

Prueba de cenizas para determinar materia orgánica utilizando métodos de referencia AOAC 942.05.

7.8.6.3. Determinación de Fibra cruda:

Prueba para fibra cruda utilizando métodos de referencia Tecator 1010/1021 Fibertec System I y AOAC 962.09.

7.8.6.4. Determinación de Fibra ácido detergente:

Prueba para fibra ácido detergente utilizando método de referencia Tecator 1010/1021 Fibertec System I.

7.8.6.5. Determinación de Fibra neutro detergente:

Prueba para fibra neutro detergente utilizando método de referencia Tecator 1010/1021 Fibertec System I.

7.8.6.6. Determinación de Grasas:

Prueba para determinar extracto etéreo utilizando método de referencia Bateman 9.110.

7.8.6.7. Determinación de Proteína:

Prueba para determinar proteína cruda utilizando métodos de referencia AOAC 976.05 y Tecator Kjeltex Auto 1020 Analyzer.

7.8.6.8. Determinación de Carbohidratos:

Prueba para determinar el extracto libre de nitrógeno o carbohidratos utilizando método de referencia Bateman 10.200

7.8.7. Análisis Microbiológico

Análisis realizado por el Laboratorio de Análisis Físicoquímicos y microbiológicos
-LAFYM-

Muestreo: Se realiza muestreo bajo condiciones estériles de limpieza y en bolsa estéril con aproximadamente 75 g a 140 g (correspondiente a una o dos manzanas impregnadas).

Pruebas: Realizar análisis microbiológico según RTCA 67.04.50:08 para registro sanitario según clasificación 4.2.2. Frutos y hortalizas procesadas: frutas y hortalizas desecadas o deshidratadas; siendo este alimento riesgo tipo C (baja probabilidad de causar daño a la salud).

Realizar las pruebas de *Escherichia coli* y *Salmonella ssp/25g*, se deberán esperar los siguientes resultados de las pruebas:

*categoría 5: 3 clases (aceptable, medianamente aceptable y no aceptable); n=5 y c=3.

*categoría 10: 2 clases (aceptable y no aceptable); n=5 y c=0.

*n: número de muestras a ser analizadas

*c: número máximo de unidades de muestra que pueden contener algún tipo de microorganismo comprendido entre m y M para que el alimento sea aceptable.

*m: Criterio microbiológico por debajo del cual el alimento no representa un riesgo para la salud.

*M: Criterio microbiológico por encima del cual el alimento representa un riesgo para la salud.

(Reglamento Técnico Centroamericano, 2008).

4.2.2 Frutas y hortalizas desecadas o deshidratadas			
Parámetro	Categoría	Tipo de riesgo	Límite máximo permitido
<i>Escherichia coli</i>	5	C	< 3 NMP/g
<i>Salmonella ssp/25 g</i>	10		Ausencia

7.9. Análisis Estadístico y Selección de la muestra.

Las formas y proporciones (composición) del alimento diseñado se definen bajo criterios del investigador.

Realizar la producción por una cantidad n lotes, que será igual a la cantidad de análisis proximales a realizar siendo seleccionada una manzana al azar por lote.

Donde el n mínimo será de 5 lotes – 5 análisis proximales.

La cantidad de manzanas a impregnar por lote se definirán por el investigador bajo criterios económicos del mismo (10 manzanas por lote).

Sobre el control del producto:

7.9.1. Análisis Proximal: 1 análisis proximal a una manzana impregnada seleccionada al azar de cada lote y adicionalmente 1 análisis proximal a 1 manzana sin el proceso de impregnación.

7.9.2. Control Microbiológico: Realizar análisis microbiológico a un número igual de 5 manzanas (1 manzana seleccionada al azar por lote).

Con base en la prueba de hipótesis binomial, donde si las 5 réplicas son favorables según lo mencionado en la literatura (desfavorables = 0), se concluirá que el evento cumple significativamente con las características microbiológicas ($\alpha=0.05$).

$H_0: p = 0.5$ (No cumple)

$H_a: p > 0.5$ (Cumple)

0.5 es el 50% de probabilidad de éxito o fracaso.

7.9.3. Cromatografía:

La prueba se realizará a una cantidad n de 5 manzanas siendo una manzana al azar por cada lote, comparando contra mediciones de la manzana común. Similar al proceso realizado con el análisis proximal.

7.9.4. Determinación de Vitamina C y Azúcares Reductores:

Se tomaron los siguientes parámetros para el cálculo de muestra para los ensayos de determinación de Ácido Ascórbico y Azúcares Reductores.

Nivel de significancia: $\alpha=0.05$

Poder: 80% (error $\beta = 0.20$)

Diferencia mínima: 2 veces la desviación estándar.

Con estos datos el resultado de muestra para estos dos ensayos es de $n = 6$ muestras.

Por cada lote tomar 1 manzana impregnada y tomar al azar la otra dentro de los 5 lotes.

Realizar una prueba de hipótesis sobre la media de dos grupos donde se comparará cuantitativamente los lotes de producción del alimento funcional con la manzana común:

Ho: Promedio del alimento = Promedio de la manzana común.

Ha: Promedio del alimento > Promedio de la manzana común

(Prueba unilateral derecha con un $\alpha=0.05$).

7.9.5. Método de Análisis

Prueba T de student. Para cada uno de los nutrientes a evaluar cuantitativos, estadística descriptiva para el análisis proximal.

8. Resultados

Luego de realizar el proceso de impregnación al vacío para las muestras de los 5 lotes y preparar las muestras a analizar para blancos y solución de impregnación se obtuvieron los siguientes resultados del análisis microbiológico, análisis proximal y análisis de cada elemento impregnado a detectar.

Tabla 4. Análisis microbiológico de los lotes de alimento impregnado y de la solución de impregnación.

Muestra	Prueba	Parámetro	Resultado
Solución de impregnación	<i>Escherichia coli</i>	<10 UFC/g*	<10 UFC/g*
	<i>Salmonella</i>	Ausente	Ausente
Manzana impregnada lote 1	<i>Escherichia coli</i>	<10 UFC/g*	<10 UFC/g*
	<i>Salmonella</i>	Ausente	Ausente
Manzana impregnada lote 2	<i>Escherichia coli</i>	<10 UFC/g*	<10 UFC/g*
	<i>Salmonella</i>	Ausente	Ausente
Manzana impregnada lote 3	<i>Escherichia coli</i>	<10 UFC/g*	<10 UFC/g*
	<i>Salmonella</i>	Ausente	Ausente
Manzana impregnada lote 4	<i>Escherichia coli</i>	<10 UFC/g*	<10 UFC/g*
	<i>Salmonella</i>	Ausente	Ausente
Manzana impregnada lote 5	<i>Escherichia coli</i>	<10 UFC/g*	<10 UFC/g*
	<i>Salmonella</i>	Ausente	Ausente

UFC/g: Unidad formadora de colonia / gramo

*Donde <3 NMP/g o <10 UFC/g equivalen como ausente para el RTCA (COMIECO, 2009)

En la tabla número 4 se observa el resultado de los parámetros que se decidieron evaluar en el alimento funcional basándose en el RTCA 67.04.50:08 tomando el alimento como un fruto procesado, desecado o deshidratado; de riesgo tipo C (baja probabilidad de causar daño a la salud). Tanto la prueba para *Escherichia coli* y para *Salmonella ssp* cumplieron con el resultado esperado para las 6 muestras (Anexo 1), con base a las pruebas de hipótesis binomial se estableció que 5 réplicas (1 por lote de producción) son suficientes, siendo las 5 favorables para demostrar que la prueba cumple significativamente

($p > 0.5$); adicionalmente se realizó una prueba para la solución de impregnación para demostrar la calidad microbiológica de las materias primas en solución.

Tabla 5. Resultado del análisis proximal (contenido nutricional) de los lotes de alimento impregnado.

Muestra	Agua %	M.S.T. %	E.E. %	F.C. %	Proteína %	Cenizas %	E.L.N. %
Lote 1	90.59	9.41	0.18	7.41	5.74	2.77	83.89
Lote 2	90.34	9.66	1.53	6.94	6.63	3.37	81.83
Lote 3	90.27	9.73	1.50	6.80	7.74	3.30	80.65
Lote 4	89.36	10.64	1.36	6.67	7.21	2.45	82.30
Lote 5	89.40	10.60	6.19	6.97	7.81	2.74	76.29
Valor (-)	89.36	9.41	0.18	6.67	5.74	2.30	76.29
Valor (+)	90.59	10.64	6.19	7.41	7.78	3.37	83.39
Media	89.99	10.00	1.28	6.95	6.98	2.91	80.95
Geom (%)							
D.S. (±)	0.57	0.57	2.33	0.28	0.86	0.39	2.87

*M.S.T. %: porcentaje de materia seca total, E.E.%: porcentaje de extracto etéreo, F.C.%: porcentaje de fibra cruda, E.L.N.%: porcentaje de extracto libre de nitrógeno

En la tabla número 5 se observa la caracterización del contenido nutricional por medio del análisis proximal en una muestra correspondiente a cada lote de producción, para cada lote el análisis proximal se incluye la determinación de agua como marcador de contenido de humedad en el alimento, materia seca total como contenido luego de proceso de secado y del cual se calcularon el resto de componente (correspondiente al 100% del alimento), el extracto etéreo que corresponde a la cantidad de lípidos crudos y grasas extraídas de la muestra, fibra cruda como prueba que determina la cantidad de fibra no digerible del alimento, proteína determina el porcentaje de los insumos proteicos que pueden ser adquiridos en una porción del alimento, cenizas que evalúa la cantidad en porcentaje de minerales o materia inorgánica en la muestra y el extracto libre de nitrógeno que representa el valor en porcentaje del resto de nutrientes no considerados como los carbohidratos digeribles (Anexo 2). En las tablas se observa un resultado generalmente parejo en la medición de cada uno de los parámetros del análisis proximal con el extracto

etéreo y el extracto libre de nitrógeno para el lote 1 y 5 con mayor variación, pero al mismo tiempo se observa que la desviación estándar para cada uno de los elementos es D.S. < 5 lo que demuestra significativamente que las mediciones de cada uno de los componentes no varían entre sí.

Tabla 6. Comparación del análisis proximal (contenido nutricional) del blanco en relación a las manzanas sin tratamiento.

Muestra	Agua %	M.S.T. %	E.E. %	F.C. %	Proteína %	Cenizas %	E.L.N. %
Blanco	90.41	9.59	0.25	7.92	4.17	2.79	84.85
Valor Promedio	89.99	10.00	1.28	6.95	6.98	2.91	80.95
Lotes							
Media Aritmética (%)	90.20	9.795	0.765	7.435	0.60	2.85	82.9
D.S. (±)	0.296	0.296	1.345	0.680	2.019	0.096	2.728

*M.S.T. %: porcentaje de materia seca total, E.E.%: porcentaje de extracto etéreo, F.C.%: porcentaje de fibra cruda, E.L.N.%: porcentaje de extracto libre de nitrógeno, *El dato correspondiente al valor promedio de los lotes es tomado de la tabla 5 donde se ve el conjunto de datos de esta fila.

Como se describe en la tabla 5 a la muestra blanco se le realizaron las mismas pruebas de análisis proximal que a los lotes en estudio, al momento de comparar los valores entre en blanco sin tratamiento y el promedio de las manzanas impregnadas se puede observar que de la misma manera no hay diferencia significativa D.S. < 5 entre los valores nutricionales del blanco y de las muestras, aunque si hay un ligero aumento en el porcentaje de proteína, lípidos, minerales y materia inorgánica.

Tabla 7. identificación de aloína (componente del Aloe Vera) en el alimento funcional impregnado, blanco, solución de impregnación y materia prima.

Lote	Muestra	Frente Solvente (cm)	Distancia muestra (cm)	UV (larga)	UV (corta)	Rf
1	Blanco	8.0	0	-	-	0
	Jugo	8.0	3.5	Amarillo	Sin fluorescencia	0.44
	Sol Imp	8.0	3.6	Amarillo	Sin fluorescencia	0.45
	Lote 1	8.0	3.6	Amarillo	Sin fluorescencia	0.45
2	Blanco	8.0	0	-	-	0
	Jugo	8.0	3.5	Amarillo	Sin fluorescencia	0.44
	Sol Imp	8.0	3.4	Amarillo	Sin fluorescencia	0.43
	Lote 2	8.0	3.6	Amarillo	Sin fluorescencia	0.45
3	Blanco	8.0	0	-	-	0
	Jugo	8.0	3.5	Amarillo	Sin fluorescencia	0.44
	Sol Imp	8.0	3.6	Amarillo	Sin fluorescencia	0.45
	Lote 3	8.0	3.6	Amarillo	Sin fluorescencia	0.45
4	Blanco	8.0	0	-	-	0
	Jugo	8.0	3.5	Amarillo	Sin fluorescencia	0.44
	Sol Imp	8.0	3.4	Amarillo	Sin fluorescencia	0.43
	Lote 4	8.0	3.4	Amarillo	Sin fluorescencia	0.43
5	Blanco	8.0	0	-	-	0
	Jugo	8.0	3.6	Amarillo	Sin fluorescencia	0.45
	Sol Imp	8.0	3.6	Amarillo	Sin fluorescencia	0.45
	Lote 5	8.0	3.5	Amarillo	Sin fluorescencia	0.44

Rf: factor de retención (aloína 0.45)

En la tabla número 7 se observan los resultados para la identificación de aloína (componente de interés del Aloe Vera impregnado en la muestra) utilizando el método de cromatografía en placa fina utilizando placas de silica gel 60 como fase estacionaria y

acetato de etilo: metanol: agua (100:13.5:10) como fase móvil. Para cada cromatoplaaca se tomó una muestra impregnada del lote correspondiente, un blanco sin el proceso de impregnación, una muestra de la solución de impregnación y una muestra de la materia prima (extracto de aloe vera 99.9 %). Como se observa en la tabla para todos los blancos no hubo elución de la muestra sembrada y por ende no se observó coloración/fluorescencia bajo la luz UV, en cambio para la siembra de la muestra, la solución de impregnación y la materia prima utilizada se observaron Rf correspondientes entre 0.45 ± 0.02 ; que se encuentra en el punto donde se debería de encontrar el Rf teórico para la aloína 0.45. Las cromatoplaacas fueron observadas bajo lámparas UV visibles de onda larga y onda corta, al exponer las muestras a la lámpara de onda larga se observó fluorescencia amarilla/anaranjada en los puntos y con la lámpara de onda corta no se observó fluorescencia para otros aloinosidos; confirmando la identificación de forma cualitativa (coloración y Rf) (Anexo 3).

Tabla 8. Determinación cuantitativa de ácido ascórbico (componente del jugo de mandarina) y pH en el alimento funcional impregnado, blanco y solución de impregnación.

Muestra	pH de manzana	de Ácido ascórbico/ manzana (mg).	ml de solución de impregnación absorbidos / manzana (5ml =3.0821mg)
Lote 1	4.86	16.2911 mg	19.2857 ml
Lote 2	4.99	16.2911 mg	19.2857 ml
Lote 3	4.81	14.9702 mg	17.1429 ml
Lote 4	4.84	14.5299 mg	16.4285 ml
Lote 5	4.83	14.9702 mg	17.1429 ml
Lote 1.2	4.82	14.5299 mg	16.4286 ml
Solución de Impregnación (5 ml)	4.40	3.0821 mg	NA
Manzana blanco	3.96	4.403 mg	NA

N: normalidad, ml: mililitros, mg: miligramos.

En la tabla número 8 se observan los resultados obtenidos de la determinación de ácido ascórbico en miligramos para una manzana impregnada (6 muestras una por lote y la sexta tomada de un lote al azar), una manzana blanco y 5 ml de solución de impregnación (Anexo 4). Se puede observar que utilizando la metodología descrita en la USP 23 por medio de una titulación yodimétrica al cuantificar ácido ascórbico en las muestras en relación al blanco, en las muestras la concentración aumenta en 4 a 5 veces en comparación al blanco.

Al calcular cuánto ácido ascórbico hay en 5 ml de solución de impregnación se pudo calcular que durante el proceso de impregnación cada manzana dependiendo de su peso inicial luego de pelarla y cortarla absorbe entre 16 a 19 ml de solución de impregnación que aportan entre 14 a 16 mg de ácido ascórbico a una manzana.

Para validar los resultados de la cuantificación de ácido ascórbico se realizó una curva de calibración con ecuación de la recta: $y = 8.806x + 4E-06$ y $R^2 = 1$ (Anexo 5).

Como dato informativo se midió el valor de pH tanto de los lotes de alimento funcional, la solución de impregnación y la manzana sin impregnar.

Tabla 9. Prueba T Student para la determinación de ácido ascórbico.

	<i>Muestra</i>	<i>Blanco</i>
Media	15.05826	4.403
Varianza	0.523433043	0
Observaciones	6	6
Diferencia hipotética de las medias	0.05	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	32.77749462	
P(T<=t) una cola	0.00000258302	
Valor crítico de t (una cola)	2.131846786	
P(T<=t) dos colas	0.00000516604	
Valor crítico de t (dos colas)	2.776445105	

Para el análisis estadístico de la determinación de ácido ascórbico se determinó una prueba t student unilateral derecha con un nivel de significancia de $\alpha=0.05$, en la cual se desea comprobar si el proceso de impregnación al vacío aumento la concentración de ácido

En la tabla número 8 se observan los resultados de la cuantificación e identificación utilizando el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico para las azúcares reductoras (inulina y oligofruktosa), en las muestras impregnadas de cada lote (6 muestras una por lote y la sexta tomada de un lote al azar), en una muestra de manzana blanco y en una muestra de solución de impregnación (Anexo 6). Se observa en la tabla del resultado obtenido en mg de la muestra tomada para el ensayo y de los mg de azúcares del total de la manzana impregnada, para que el cálculo fuese validado se construyó una curva de 10 punto medidos por triplicado con curva: $y = 1.7249x - 0.0183$ y $R^2 = 0.996$ (Anexo 7). Se puede observar que la manzana impregnada puede llegar casi a duplicar la cantidad azúcares reductores que tiene la manzana blanco siendo el aumento en estos luego del proceso significativo al igual que cada ml de solución de impregnación puede llegar a aportar casi 2 mg de estas azúcares reductoras.

Tabla 11. Prueba T Student para la determinación de azúcares reductores.

	Muestra	Blanco
Media	1044.73	611.27
Varianza	6341.0349	0
Observaciones	6	6
Diferencia hipotética de las medias	0.05	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	12.17037214	
P(T<=t) una cola	0.0001308	
Valor crítico de t (una cola)	2.131846786	
P(T<=t) dos colas	0.0002616	
Valor crítico de t (dos colas)	2.776445105	

Para el análisis estadístico de la determinación de azúcares reductores se determinó una prueba t student unilateral derecha con un nivel de significancia de $\alpha=0.05$, en la cual se desea comprobar si el proceso de impregnación al vacío aumento la concentración de azúcares reductores en las muestras en relación al blanco. Siendo la H_0 : Concentración en alimento = concentración en manzana y H_a : concentración en alimento > concentración en manzana.

En la tabla se observa que el p-valor obtenido para la prueba de dos colas 0.0002616 es menor que 0.05 (lo que explica que hay una diferencia mayor al $\pm 5\%$ de la concentración de azúcares reductores entre las muestras y el blanco).

9. Discusión

Luego de realizar el muestreo, preparación y tratamiento de las muestras por medio de impregnación al vacío como se describe en la metodología y en el (Anexo 8) se procedió a realizar pruebas de control microbiológico, determinación de características nutricionales e identificación de elementos impregnados.

Este estudio buscó demostrar que por medio del proceso de impregnación al vacío se pueden aumentar las concentraciones de ciertos nutrientes o incorporar nuevos en aquellos alimentos que poseen características propias y de esta manera crear un alimento funcional; tal es el caso de la manzana utilizada en este estudio y los nutrientes incorporados a ella: jugo de mandarina, azúcares reductores y extracto de aloe vera; por medio de un gradiente en cambios de presión generados por el vacío.

Los resultados de los análisis de control microbiológico realizados sobre los lotes de producción y la solución de impregnación son parámetros determinantes para garantizar la inocuidad de alimentos de consumo humano según el RTCA 67.04.50:08 y sus límites de aceptación para el registro y comercialización; aunque no es el objeto del estudio es importante demostrar que el proceso de impregnación se realizó en condiciones adecuadas para conservar la inocuidad de los alimentos. Para el alimento desarrollado específicamente de riesgo tipo C clasificado como frutas y hortalizas procesadas, desecadas o deshidratadas se cumplió con el análisis microbiológico para *Escherichia coli* y *Salmonella spp.* luego del proceso de producción e impregnación al vacío.

Para la determinación de las características nutricionales del alimento funcional se decidió realizar el análisis proximal o bromatológico de los lotes de producción para luego compararlos con las características del blanco. El análisis proximal es aquel que determina las características del alimento en cuanto a la composición porcentual de los mismos, estas características son críticas para el entendimiento del valor nutricional del alimento para el consumidor y de la misma manera determinar un uso específico basados en los componentes del mismo.

Para el resultado obtenido del análisis proximal del alimento y del blanco de manzana sin tratamiento se entiende que ambos mantienen sus características

nutricionales en un alto porcentaje de carbohidratos (> 80%) y fibra (> 6%), se observa así mismo un aumento en la retención de las proteínas, lípidos y material inorgánico como minerales en las muestras en comparación con el blanco esto siendo aportados por los componentes extras agregados al impregnarlas con aloe vera, jugo de mandarina y azúcares reductores. El porcentaje de carbohidratos y fibra a pesar de ser elevado en ambos grupos es ligeramente menor en las muestras impregnadas esto se debe a que al aumentar el % de proteínas, lípidos y material inorgánico se compensa con una disminución en estos componentes que forman básicamente la matriz sólida del alimento; determinando con esto que la manzana sin tratamiento no deja de ser nutritiva y la manzana impregnada de la misma manera lo es pero el proceso de impregnación no influye lo suficiente para aumentar en un 5% algún eje de los componentes evaluados en el análisis proximal.

Para el análisis de identificación del aloe vera, se identificó uno de los componentes incorporados dentro del alimento impregnado por medio de la cromatografía en capa fina descrita por Ceniceros, L. y tomada de la Farmacopea herbolaria mexicana al correr los extractos metanolicos de las muestras, la solución de impregnación y la materia prima utilizada en las condiciones metodológicas se encontró que todas presentaban elución de un compuesto bajo luz UV-vis de longitud de onda larga a un Rf promedio de 0.45 ± 0.02 y presentaron fluorescencia amarilla; el compuesto descrito e identificado de interés es la aloína como marcador de identificación de aloe vera en las muestras, en la solución de impregnación y en la materia prima pero negativo en el blanco.

Al comparar las cromatoplasmas obtenidas (Anexo 3) con la cromatoplasma de referencia en la farmacopea herbolaria mexicana (Anexo 9) se observa que se encontraron puntos para la aloína similares a los de las muestras en la investigación con el Rf correspondiente de 0.45 lo que confirma la identificación de el componente Aloe Vera dentro del alimento funcional. No se logró identificar ningún otro aloinosido descrito en la metodología ni otro compuesto perteneciente a los otros elementos incorporados en la manzana ni elementos de la manzana propia esto posiblemente a que estos compuestos no eran compatibles con la polaridad de la fase móvil y estacionaria utilizada.

La impregnación y caracterización exitosa de aloe vera dentro del alimento funcional permite ver las características que este alimento desarrollado pueden tener en la salud del paciente que lo reciba como el potencial efecto antiinflamatorio, reparador de tejidos internos

dañados, su efecto antihiper glucémico, el efecto inmunomodulador y potenciando el efecto antioxidante de la vitamina C mejorando la absorción de esta vitamina. Todas estas funciones son demostradas en investigaciones previas como lo son las de Sanzana, S y Derrosi, et.al. (Sanzana, S., 2010) y (Derrosi, A, et.al., 2018).

El ácido ascórbico como marcador del segundo de los elementos incorporados al alimento funcional por medio de la técnica de impregnación al vacío (jugo de mandarina) fue determinado por titulación yodimétrica en la cual el ácido ascórbico presente en las muestras, el blanco y la solución de impregnación es oxidado por el yodo y en presencia de almidón y un exceso de yodo se determina la concentración del ácido ascórbico cuando este se ha oxidado a ácido dehidroascórbico. En los resultados de la tabla 8 se observa que la cantidad cuantificada en las muestras es representativamente mayor a las que se cuantifican en la manzana blanco, la manzana tiene en su composición cierta cantidad de vitamina C pero al exponerla al proceso de impregnación al vacío esta puede impregnarse en su matriz de suficiente solución de impregnación para aumentar 4 veces su cantidad de vitamina C, asimismo el jugo de mandarina (componente de la solución de impregnación) es una fuente propia y estable conservada bajo refrigeración y lejos de la luz para aportar suficiente ácido ascórbico en el proceso de fabricación de lotes. La diferencia estadística cuantificada de este componente es mayor al 5% por lo que se puede determinar que el estudio cumple con la determinación de este componente y con la comprobación estadística del mismo.

En investigaciones previas como la de Codoñer-Franch et,al, se observó que se logró incorporar con éxito jugo de mandarina en manzanas por medio de impregnación al vacío y probar el efecto antiinflamatorio y antioxidante de este alimento en la población pediátrica infantil. El efecto sinérgico de la manzana con sus compuestos fenólicos de alto poder antioxidante y la vitamina C de las frutas cítricas en el caso de la presente investigación y la de Codoñer-Franch et,al el jugo de mandarina, en base a estas características se podría decir que la vitamina C en el alimento funcional desarrollado pueden tener un efecto en la salud del paciente específicamente en estados de hipercolesterolemias, obesidad, enfermedad gastrointestinal, afecciones respiratorias, enfermedades cardio metabólicas y sus comorbilidades (Codoñer-Franch, y otros, 2013).

Para los últimos componentes incorporados dentro del alimento, los azúcares reductores, que se identificaron y cuantificaron por el método de detección espectrofotométrico utilizando ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) para calcular la concentración de azúcares reductores (no específica) en la cual ocurre una reacción de oxido-reducción entre el reactivo DNS y los azúcares con un grupo terminal carbonilo libre (inulina, glucosa, fructosa, oligofructosa entre otros) generando un cambio de color en estos que son posteriormente cuantificables en un espectrofotómetro UV-vis, en la tabla 10 se observa que en comparación al blanco la cantidad de azúcares reductores en las muestras es mayor esta vez el blanco tiene suficientes azúcares reductores pero de la misma forma en el análisis estadístico realizado el aumento en la concentración de las mismas en las muestras es mayor al 5% en relación al blanco siendo este un aumento significativo para demostrar la presencia de (inulina y oligofructosa) en el alimento.

La presencia de azúcares reductores (inulina y oligofructosa) en el alimento funcional impregnado presentan la característica principal de aportar al mantenimiento de la salud digestiva, al aumento, enriquecimiento y renovación de la flora bacteriana, ayuda al proceso de absorción de minerales y nutrientes, efecto inmunomodulador y control de alergias alimenticias como se ha observado en otros estudios de desarrollo como lo son las de Mejía, R y Betalleluz, I (Betalleluz, I., 2015) y (Mejía, R., 2015).

Por ende, como resultado del estudio se logra comprobar que la técnica de impregnación al vacío que hace uso del mecanismo hidrodinámico para incorporar elementos extra en la matriz porosa de la manzana es eficaz para el desarrollo de un alimento funcional; que aporte nutriente extra a los que naturalmente contiene y pueda así servir para uso nutricionales para públicos específicos debido a sus componentes como usos gastrointestinales, aumento de defensas, ulceraciones y combatir cierto tipo de infecciones basándose en los usos de estos por separado.

10. Conclusiones

- Tanto los lotes de producción de manzanas impregnadas al vacío como la solución utilizada para la impregnación cumplen con los parámetros microbiológicas evaluadas según el RTCA 67.04.50:08.
- Tanto las manzanas impregnadas como las manzanas sin impregnar poseen características nutricionales similares, pero en el alimento funcional luego del proceso de impregnación posee el % de proteínas, lípidos, minerales y materia inorgánica mayor en relación a la manzana sin impregnar.
- Se identificó aloína (componente del Aloe vera) con fluorescencia a longitud de onda larga y Rf similar al teórico tanto en el alimento funcional como en la solución de impregnación.
- Se cuantificó ácido ascórbico (componente del jugo de mandarina) en el alimento funcional en una relación del 330% – 370% en relación al 100% de la manzana sin impregnar.
- Se cuantificaron azúcares reductores (inulina y oligofruktosa) en el alimento funcional en una relación del 155% - 185% en relación al 100% de la manzana sin impregnar.
- Se demostró que el método de impregnación al vacío permite desarrollar un alimento funcional que aumenta o agrega nuevas características nutricionales a la matriz porosa de la manzana nacional.

11. Recomendaciones

- Utilizar metodologías de análisis más novedosas y con equipos de mayor uso en la actualidad como metodologías compéndiales que utilicen HPLC, o cuantificación UV-vis.
- Extender el estudio a pruebas clínicas del alimento desarrollado para comprobar su uso en algún estado de salud/nutricional específico en el cual el tratamiento necesite alguno de los nutrientes incorporados o aumentados.
- Realizar una propuesta de empaque y comercialización basándose en los requisitos del RTCA y de las características nutricionales del mismo.
- Realizar un control microbiológico con respecto al tiempo desde la producción para determinar el tiempo de uso ya que el contenido de agua elevado puede servir como medio de crecimiento de microorganismos patógenos y no patógenos.
- Utilizar la técnica propuesta en distintas matrices (frutas, vegetales) para comparar cuál de ellas retiene los nutrientes de mejor manera y luego de la cuantificación e identificación determinar concentraciones en las mismas.

12. Referencias

- Alarcón, F. (2014). *Impregnación de Lactobacillus rhamnosus en placas de manzana utilizando una emulsión doble del tipo W1/O/W2* (Tesis de Maestría). Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Veracruzana. Veracruz, México.
- Alvídrez-Morales, A., González-Martínez, B., y Jiménez-Salas, Z., (2002). *Tendencias en la producción de alimentos: alimentos funcionales*. Revista Salud Pública y Nutrición, Volumen 3. Páginas 250-320.
- Araya, H. y Lutz, A., (2003). *Alimentos funcionales y saludables*. Revista Chilena de Nutrición. Volumen 30: Páginas 717-751.
- Arvanitoyannis, I. & Van Houwelingen-Joukaliaroglou, M. (2005). *Functional Foods: A Survey of Health Claims, Pros and Cons, and Current Legislation*. Critical reviews in Food Science and Nutrition, Volume 45: Página 385-404.
- Betalleluz, I. (2015). *Estudio del enriquecimiento de manzana con prebióticos, probióticos y componentes antioxidantes provenientes de zumo de mandarina por impregnación a vacío para el desarrollo de aperitivos altamente funcionales y con bajo contenido calórico* (Tesis Doctoral). Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo, Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España.
- Cáceres, A. (1999). *PLANTAS DE USO MEDICINAL EN GUATEMALA*. Editorial Universitaria. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Ceniceros, L. (2006). *Análisis de Productos herbales por CCF como parte del Proceso de Control de Calidad*. Tesis de Grado. Universidad Autónoma de Nuevo León. Mexico.
- Consejo de Ministros de Integración Económica (COMIECO). (2009). *Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 11.03.56.09 PRODUCTOS FARMACÉUTICOS. PRODUCTOS NATURALES MEDICINALES PARA USO HUMANO. VERIFICACIÓN DE CALIDAD*, Centro América.

- Derossi, A., Ricci, I., Fiore, A.G. y Severini, C. (2018). *Apple slices enriched with Aloe Vera by vacuum impregnation*. Italian Journal of Food Science, 30, 256-267.
- Fito, P., Andrés, A., Chiralt, A. y Pardo, P. (1996). *Coupling of Hydrodynamic Mechanism and Deformation-Relaxation Phenomena During Vacuum Treatments in Solid Porous Food-Liquid Systems*. Journal of Food Engineering, 27, 229-240.
- Gibson, R. y Roberfroid, B. (2010) *Dietary Modulation of the Human Colonie Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics*. The Journal of Nutrition. Volume 125: 1401-1412.
- Gras, M. L., Vidal-Brotons, D., Betoret, N., Chiralt, A. y Fito, P. (2003). *Calcium Fortification of vegetables by vacuum impregnation Interactions with cellular matrix*. Journal of Food Engineering, 56, 279-284.
- Grijalva, O. (2009). *Análisis del efecto de la impregnación de cloruro de calcio con deshidratación osmótica por vacío en rebanadas de pimiento para conservas* (Tesis de Grado). Facultad de Ingeniería en Mecánica y ciencias de la Producción, Escuela superior politécnica del Litoral. Guayaquil, Ecuador.
- Lattanzio V., Kroonb P., Linsalatac V., Cardinalic A. (2009). *Globe artichoke: A functional food and source of nutraceutical ingredients*. J Funct Foods; 1 (2).
- Mazariegos, J. (2008). *Identificación y cuantificación de los componentes principales del aceite esencial del flavedo (cáscara) de Citrus reshni (Mandarina Cleopatra), Citrus reticulata (Mandarina común) y Citrus reticulata Blanco o Citrus tangerina (Mandarina Dancy) por medio de Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas* (Tesis de Grado). Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala.

- Mejía, R. (2015). *Impregnación al vacío de fructooligosacáridos de yacón (Smallanthus sonchifolius Poepp & Endl.) en manzana* (Tesis de Grado). Facultad de Industrias alimentarias, universidad agraria la Molina, Perú.
- Ostos, S., Díaz, A. y Suares, H. (2012). *Evaluación de diferentes condiciones de proceso en la fortificación de mango (tommy atkins) con calcio mediante impregnación a vacío*. Revista Chilena de Nutrición Vol. 39, No 2, 181-190.
- Organización Médica Colegial de España. (2011). *BUENA PRÁCTICA CLÍNICA en Alimentos Funcionales*. Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad: España.
- Pérez Conesa, D., López Martínez, G., & Ros Berruezo, G. F. (2004). Principales prebióticos y sus efectos en la alimentación humana. *Anales de veterinaria Murcia*, vol. 20, 2004.
- Reglamento Técnico Centroamericano. (2008). RTCA 67.04.50:08 Alimentos. Criterios microbiológicos para la inocuidad de alimentos.
- Reichert, D. (2002) *Oilseed medicinals: in natural drugs, dietary supplements and in new functional foods*. Trends in Food Science and Technology. Volumen 13.
- Restrepo, A., Cortés, M. y Rojano, B. (2010). *POTENCIACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE FRESA (Fragaria ananassa Duch.) POR INCORPORACIÓN DE VITAMINA E UTILIZANDO LA TÉCNICA DE IMPREGNACIÓN A VACÍO*. Revista de la Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. Volumen 17 número 2.
- Roberfroid, M. (1999). *Concepts in Functional Foods: The Case of Inulin and Oligofructose*. American Society for Nutritional Sciences. J. of Nutrition. 129: 1398S–1401S.
- Román, D., Aller, R., Izaola, o., de la Fuente, B., (2009). *Prebióticos tipo inulina: efectos sobre diferentes patologías*. Nutrición Clínica en medicina. Volumen 3: Páginas 122-132.

- Salvatierra, D. (2011). *DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA PROXIMAL, CARBOHIDRATOS TOTALES, AZÚCARES LIBRES Y FRUCTANOS DEL TIPO INULINA – FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS DEL YACÓN (Smallanthus sonchifolius (Poepp. et Endl.) H. Robinson)*. Tesis de Grado. Universidad Peruana Cayetano Heredia. Lima, Perú.
- Sandoval, S. (2010). *Cuantificación de Ácido Ascórbico (Vitamina C) en Néctares de Melocotón y Manzana Comercializados en Supermercados de la Ciudad Capital*. Tesis de Grado, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Sanzana, S. (2010). *Viabilidad del desarrollo de alimentos funcionales frescos por incorporación de aloe vera a la matriz estructural de endibia (Cichorium intybus L. var. foliosum), brócoli (Brassica oleracea var. itálica), coliflor (Brassica oleracea var. botrytis) y zanahoria (Daucus carota L.) mediante la técnica de impregnación a vacío* (Tesis Doctoral). Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo, Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España.
- Seipel, M. & Pirovani, Maria & Güemes, D. & Gariglio, N. & Piagentini, Andrea. (2009). *Características Fisicoquímicas de los Frutos de Tres Variedades de Manzanas Cultivadas en la Región Centro-Este de la Provincia de Santa Fe*. FAVE Sección Ciencias Agrarias.
- United States Pharmacopeial Convention. (1995). *U.S. Pharmacopeia 23 National Formulary 18*. United States.
- Vrese, M. y Schrezenmeir, J. (2008). *Probiotics, Prebiotics and Synbiotics*. *Biochemical Engineering/biotechnology*. V 111: 1–66.
- Wagner, H. y Bladt, S. (1996). *Plant Drug Analysis: a thin layer chromatography atlas*. Springer.

Yilmaz, F., Bilek, S. (2018). *Ultrasound-assisted vacuum impregnation on the fortification of fresh.cut Apple with calcium and black carrot phenolics*. *Ultrasound Sonochemistry* 48, 509-516.

13. Anexos

Anexo 1. Certificados de Análisis microbiológico realizado a lotes de alimento funcional y solución de impregnación



Laboratorio de Análisis Físicoquímicos
y Microbiológicos - LAFYM

3a. Calle 6-47, Zona 1
Centro Histórico, Guatemala Ciudad
Tel: 2253-1319
Email: lafymusac@gmail.com

Empresa : STEVEN GIL
N° de la muestra : 11342 (Protocolo firmado)
Temperatura : Ambiente
Muestra : ALIMENTO
Captación : Captado por personal ajeno a LAFYM en un envase de LAFYM
Nota : JUGO DE MANDARINA, INULINA Y EXTRACTO DE ALOE VERA

Fecha de toma de la muestra : 10/05/2021 08:50
Fecha de recepción : 10/05/2021 09:52
Número de lote : SOLUCION DE IMPREGNACION

ALIMENTOS

ANÁLISIS	RESULTADO	Límites permitidos RTCA
Aislamiento e Identificación de <i>Escherichia coli</i>	< 10 UFC/g	< 10 UFC/g
Aislamiento e Identificación de <i>Salmonella</i> sp/25 g.	Ausencia	Ausencia

*Métodos de Referencia: BAM: Capítulos 4, 5 APHA 5ta. ed.: Capítulos 9, 35

Conclusión:

La muestra recibida y analizada satisface los criterios de calidad del RTCA.

Nomenclatura utilizada:

UFC/g Unidades Formadoras de Colonia por gramo
NMP/g Número Más Probable por gramo

Licda. Ana Rojas de García, QB.

Licda. Ana E. Rojas García
QUÍMICA BIÓLOGA
COL. 2323

Este Resultado se refiere únicamente a la muestra analizada.
El informe de ensayo no debe ser reproducido total o parcialmente, sin la aprobación escrita del Laboratorio.

Resultado microbiológico solución de impregnación (LAFYM, 2021).



**Laboratorio de Análisis Físicoquímicos
y Microbiológicos - LAFYM**

3a. Calle 6-47, Zona 1
Centro Histórico, Guatemala Ciudad
Tel: 2253-1319
Email: lafymusac@gmail.com

Empresa : STEVEN GIL
N° de la muestra : 11337 (Protocolo firmado)
Temperatura : Ambiente
Muestra : ALIMENTO
Captación : Captado por personal ajeno a LAFYM en un envase de LAFYM

Fecha de toma de la muestra : 10/05/2021 08:50
Fecha de recepción : 10/05/2021 09:46
Número de lote : MANZANA 1

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE ALIMENTOS

ANÁLISIS	RESULTADO	Límites permitidos RTCA
Aislamiento e Identificación de <i>Escherichia coli</i>	< 10 UFC/g	< 10 UFC/g
Aislamiento e Identificación de <i>Salmonella</i> sp/25 g.	Ausencia	Ausencia

*Métodos de Referencia: BAM: Capítulos 4, 5 y 10

APHA 5ta. ed.: Capítulos 9, 35 y 36

Conclusión:

La muestra recibida y analizada satisface los criterios de calidad del RTCA.

Nomenclatura utilizada:

UFC/g Unidades Formadoras de Colonia por gramo

NMP/g Número Más Probable por gramo

Licda. Ana Rosas de García, QB.

Licda. Ana E. Rosas García
QUÍMICA BIÓLOGA
COL. 2323

Este Resultado se refiere únicamente a la muestra analizada.

El informe de ensayo no debe ser reproducido total o parcialmente, sin la aprobación escrita del Laboratorio.

Resultado microbiológico muestra manzana impregnada Lote 1 (LAFYM, 2021).



**Laboratorio de Análisis Físicoquímicos
y Microbiológicos - LAFYM**

3a. Calle 6-47, Zona 1
Centro Histórico, Guatemala Ciudad
Tel: 2253-1319
Email: lafymusac@gmail.com

Empresa : STEVEN GIL
N° de la muestra : 11338 (Protocolo firmado)
Temperatura : Ambiente
Muestra : ALIMENTO
Captación : Captado por personal ajeno a LAFYM en un envase de LAFYM

Fecha de toma de la muestra : 10/05/2021 08:50
Fecha de recepción : 10/05/2021 09:46
Número de lote : MANZANA 2

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE ALIMENTOS

ANÁLISIS	RESULTADO	Límites permitidos RTCA
Aislamiento e identificación de <i>Escherichia coli</i>	< 10 UFC/g	< 10 UFC/g
Aislamiento e identificación de <i>Salmonella</i> sp/25 g.	Ausencia	Ausencia

*Métodos de Referencia: BAM: Capítulos 4, 5 y 10

APHA 5ta. ed.: Capítulos 9, 35 y 36

Conclusión:

La muestra recibida y analizada satisface los criterios de calidad del RTCA.

Nomenclatura utilizada:

UFC/g Unidades Formadoras de Colonia por gramo

NMP/g Número Más Probable por gramo

Licda. Ana Rosas de García, QB.
Jefatura

Licda. Ana E. Rojas García
QUÍMICA BIÓLOGA
COL. 2323

Este Resultado se refiere únicamente a la muestra analizada.
El informe de ensayo no debe ser reproducido total o parcialmente, sin la aprobación escrita del Laboratorio.

Resultado microbiológico muestra manzana impregnada Lote 2 (LAFYM, 2021).


**Laboratorio de Análisis Físicoquímicos
y Microbiológicos - LAFYM**

3a. Calle 6-47, Zona 1
Centro Histórico, Guatemala Ciudad
Tel: 2253-1319
Email: lafymusac@gmail.com

Empresa : STEVEN GIL
N° de la muestra : 11339 (Protocolo firmado)
Temperatura : Ambiente
Muestra : ALIMENTO
Captación : Captado por personal ajeno a LAFYM en un envase de LAFYM

Fecha de toma de la muestra : 10/05/2021 08:50
Fecha de recepción : 10/05/2021 09:49
Número de lote : MANZANA 3

ALIMENTOS

ANÁLISIS	RESULTADO	Limites permitidos RTCA
Aislamiento e Identificación de <i>Escherichia coli</i>	< 10 UFC/g	< 10 UFC/g
Aislamiento e Identificación de <i>Salmonella</i> sp/25 g.	Ausencia	Ausencia

*Métodos de Referencia: BAM: Capítulos 4, 5 APHA Sta. ed.: Capítulos 9, 35

Conclusión:

La muestra recibida y analizada satisface los criterios de calidad del RTCA.

Nomenclatura utilizada:

UFC/g Unidades Formadoras de Colonia por gramo
NMP/g Número Más Probable por gramo

Licda. Ana Rojas de García, QB.
Firma

Licda. Ana E. Rojas García
QUÍMICA BIÓLOGA
COL. 2323

Este Resultado se refiere únicamente a la muestra analizada.
El informe de ensayo no debe ser reproducido total o parcialmente, sin la aprobación escrita del Laboratorio.

Resultado microbiológico muestra manzana impregnada Lote 3 (LAFYM, 2021).


**Laboratorio de Análisis Físicoquímicos
y Microbiológicos - LAFYM**

3a. Calle 6-47, Zona 1
Centro Histórico, Guatemala Ciudad
Tel: 2253-1319
Email: lafymusac@gmail.com

Empresa : STEVEN GIL
N° de la muestra : 11340 (Protocolo firmado)
Temperatura : Ambiente
Muestra : ALIMENTO
Captación : Captado por personal ajeno a LAFYM en un envase de LAFYM

Fecha de toma de la muestra : 10/05/2021 08:50
Fecha de recepción : 10/05/2021 09:49
Número de lote : MANZANA 4

ALIMENTOS

ANÁLISIS	RESULTADO	Límites permitidos RTCA
Aislamiento e Identificación de <i>Escherichia coli</i>	< 10 UFC/g	< 10 UFC/g
Aislamiento e Identificación de <i>Salmonella</i> sp/25 g.	Ausencia	Ausencia

*Métodos de Referencia: BAM: Capítulos 4, 5 APHA Sta. ed.: Capítulos 9, 35

Conclusión:

La muestra recibida y analizada satisface los criterios de calidad del RTCA.

Nomenclatura utilizada:

UFC/g Unidades Formadoras de Colonia por gramo
NMP/g Número Más Probable por gramo

Licda. Ana Rojas de García, Q.B.
Firma

Licda. Ana E. Rojas García
QUÍMICA BIÓLOGA
COL. 2323

Este Resultado se refiere únicamente a la muestra analizada.
El informe de ensayo no debe ser reproducido total o parcialmente, sin la aprobación escrita del Laboratorio.

Resultado microbiológico muestra manzana impregnada Lote 4 (LAFYM, 2021).


**Laboratorio de Análisis Físicoquímicos
y Microbiológicos - LAFYM**

3a. Calle 6-47, Zona 1
Centro Histórico, Guatemala Ciudad
Tel: 2253-1319
Email: lafymusac@gmail.com

Empresa : STEVEN GIL
N° de la muestra : 11341 (Protocolo firmado)
Temperatura : Ambiente
Muestra : ALIMENTO
Captación : Captado por personal ajeno a LAFYM en un envase de LAFYM

Fecha de toma de la muestra : 10/05/2021 08:50
Fecha de recepción : 10/05/2021 09:51
Número de lote : MANZANA 5

ALIMENTOS

ANÁLISIS	RESULTADO	Límites permitidos RTCA
Aislamiento e Identificación de <i>Escherichia coli</i>	< 10 UFC/g	< 10 UFC/g
Aislamiento e Identificación de <i>Salmonella</i> sp/25 g.	Ausencia	Ausencia

*Métodos de Referencia: BAM: Capítulos 4, 5 APHA 5ta. ed.: Capítulos 9, 35

Conclusión:

La muestra recibida y analizada satisface los criterios de calidad del RTCA.

Nomenclatura utilizada:

UFC/g Unidades Formadoras de Colonia por gramo
NMP/g Número Más Probable por gramo

Licda. Ana Rosas de García, QB.
Firma

Licda. Ana E. Rosas García
QUÍMICA BIÓLOGA
COL. 2323

Este Resultado se refiere únicamente a la muestra analizada.
El informe de ensayo no debe ser reproducido total o parcialmente, sin la aprobación escrita del Laboratorio.

Resultado microbiológico muestra manzana impregnada Lote 5 (LAFYM, 2021).

Anexo 2. Certificados de Análisis proximal (bromatológico) realizado a lotes de alimento funcional y muestra blanco.



Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Escuela de Zootecnia
Unidad de Alimentación Animal

FORMULARIO BROMATO 7 INFORME DE RESULTADO DE ANÁLISIS



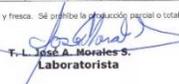
Edificio M6, 2° Nivel, Ciudad Universitaria
Ciudad de Guatemala
Teléfax: 24188307 Teléfono: 24188300
E-mail: bromato2000@yahoo.es

Solicitado por: **STIVEN GIL** Dirección: **CIUDAD, GUATEMALA** No. **142**
 Fecha de recibida la muestra: **12-05-2021** Fecha de realización: **DEL 17 AL 21-05-2021**

Reg.	Descripción de la muestra	BASE	Agua %	M.S.T. %	E.E. %	F.C. %	PROTEÍNA %	Cenizas %	E.L.N. %	Calcio %	Fósforo %	F.A.D. %	F.N.D %	Lignina %	Dig. En KOH %	E.M. Mcal/Kg	NITROGENO	TND %
143	MANZANA IMPREGNADA # 5	SECA	89.40	10.60	6.19	6.97	7.81	2.74	76.29	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	COMO ALIMENTO	---	---	---	0.96	0.74	0.63	0.29	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
144	MANZANA IMPREGNADA # 4	SECA	89.36	10.64	1.36	6.67	7.21	2.45	82.30	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	COMO ALIMENTO	---	---	---	0.14	0.71	0.77	0.26	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
145	MANZANA IMPREGNADA # 3	SECA	90.27	9.73	1.50	6.80	7.74	3.30	80.66	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	COMO ALIMENTO	---	---	---	0.15	0.66	0.75	0.32	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
146	MANZANA IMPREGNADA # 2	SECA	90.34	9.66	1.53	6.94	6.63	3.37	81.83	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	COMO ALIMENTO	---	---	---	0.15	0.67	0.64	0.33	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

OBSERVACIONES: Dichos resultados fueron calculados en base a materia seca total y fresco. Se prohíbe la reproducción parcial o total de este informe, para mayor información comunicarse al teléfono 24188307.

TOTAL DE MUESTRAS REPORTADAS EN ESTA HOJA 4



T. L. José A. Morales S.
Laboratorista





Lic. Miguel Ángel Rodenas
Jefe Laboratorio de Bromatología



Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Escuela de Zootecnia
Unidad de Alimentación Animal

FORMULARIO BROMATO 7 INFORME DE RESULTADO DE ANÁLISIS



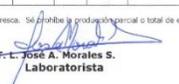
Edificio M6, 2° Nivel, Ciudad Universitaria
Ciudad de Guatemala
Teléfax: 24188307 Teléfono: 24188300
E-mail: bromato2000@yahoo.es

Solicitado por: **STIVEN GIL** Dirección: **CIUDAD, GUATEMALA** No. **150**
 Fecha de recibida la muestra: **12-05-2021** Fecha de realización: **DEL 17 AL 21-05-2021**

Reg.	Descripción de la muestra	BASE	Agua %	M.S.T. %	E.E. %	F.C. %	PROTEÍNA %	Cenizas %	E.L.N. %	Calcio %	Fósforo %	F.A.D. %	F.N.D %	Lignina %	Dig. En KOH %	E.M. Mcal/Kg	NITROGENO	TND %
147	MANZANA IMPREGNADA # 1	SECA	90.59	9.41	0.18	7.41	5.74	2.77	83.89	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	COMO ALIMENTO	---	---	---	0.02	0.70	0.54	0.26	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
148	BLANCO MANZANA SIN IMPREGNADA	SECA	90.41	9.59	0.25	7.92	4.17	2.79	84.85	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	COMO ALIMENTO	---	---	---	0.02	0.76	0.40	0.27	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
---	-----	SECA	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
---	-----	COMO ALIMENTO	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
---	-----	SECA	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
---	-----	COMO ALIMENTO	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

OBSERVACIONES: Dichos resultados fueron calculados en base a materia seca total y fresco. Se prohíbe la reproducción parcial o total de este informe, para mayor información comunicarse al teléfono 24188307.

TOTAL DE MUESTRAS REPORTADAS EN ESTA HOJA 4



T. L. José A. Morales S.
Laboratorista





Lic. Miguel Ángel Rodenas
Jefe Laboratorio de Bromatología

(Departamento de Bromatología USAC, 2021).

Anexo 3. Determinación de Aloína por medio de metodología de cromatografía en capa fina.



Extracción metanólica de muestras



Elución en cámara cromatográfica



Cromatoplasmas en lampara onda larga



Cromatoplasmas en lampara onda corta

Anexo 4. Determinación de ácido ascórbico por medio de metodología de titulación yodimétrica.



Preparación de las muestras



Sistema de titulación



Muestras preparadas antes de titular

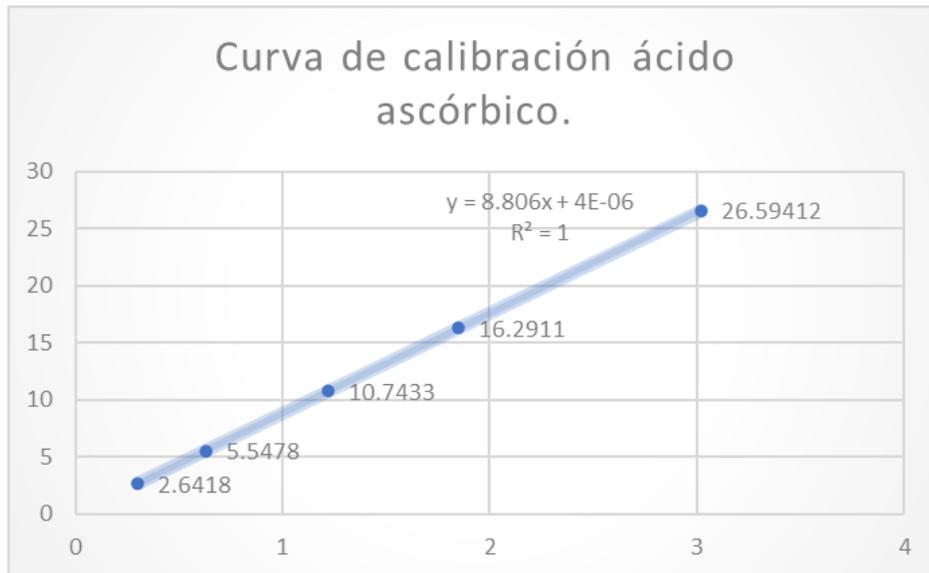


Muestras luego de titular

Anexo 5. Curva de calibración para la determinación de ácido ascórbico por medio de metodología de titulación yodimétrica.

Peso	Volumen teórico	Pesaje (mg)	Volumen Real gastado (ml)	Media	Concentración
2 mg	0.387 ml	1. 2.0	1. 0.3	0.3	2.6418 mg
		2. 2.0	2. 0.3		
		3. 2.0	3. 0.3		
		4. 2.0	4. 0.3		
		5. 2.0	5. 0.3		
5 mg	0.6175	1. 5.1	1. 0.6	0.63	5.5478 mg
		2. 5.0	2. 0.6		
		3. 5.0	3. 0.65		
		4. 5.1	4. 0.7		
		5. 5.0	5. 0.6		
10 mg	1.2350	1. 10.0	1. 1.20	1.22	10.7433 mg
		2. 10.0	2. 1.20		
		3. 10.0	3. 1.20		
		4. 10.1	4. 1.25		
		5. 10.2	5. 1.25		
15 mg	1.8525	1. 15.1	1. 1.80	1.85	16.2911 mg
		2. 15.0	2. 1.85		
		3. 15.1	3. 1.90		
		4. 15.0	4. 1.85		
		5. 15.0	5. 1.85		
25 mg	3.0876	1. 25.0	1. 3.00	3.02	26.59412
		2. 25.1	2. 3.05		
		3. 25.0	3. 3.05		
		4. 25.0	4. 3.00		
		5. 25.1	5. 3.05		

*Se construyo una curva con 5 puntos de concentración 2 mg, 5mg, 10 mg, 15 mg y 25 mg de materia prima de ácido ascórbico estandarizada desde un estándar secundario (99.5%), las mediciones de los puntos se realizar por quintuplicado y se obtuvo la siguiente ecuación de la curva de calibración.

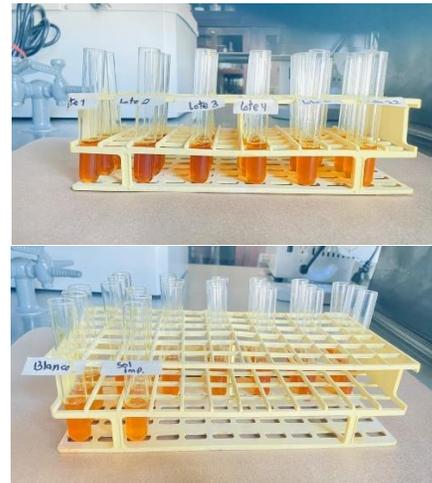


Gráfica 1. Curva de calibración para la cuantificación de ácido ascórbico.

Anexo 6. Determinación de azúcares reductores por medio de metodología del ácido 3,4 dinitrosalicílico.



Preparación de las muestras



Muestras sin reacción de DNS



Muestras al reaccionar con el DNS



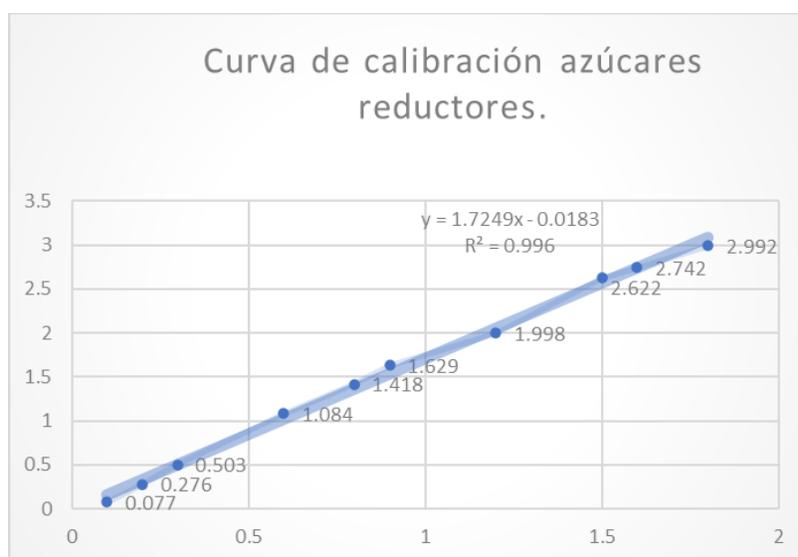
Determinación de azúcares reductores espectrofotométricamente.

Anexo 7. Curva de calibración para la determinación de azúcares reductores por medio de metodología del ácido 3,4 dinitrosalicílico.

Concentración y peso teórico	Pesaje glucosa 99%	Cambio color	Absorbancia	Promedio
0.1 mg/ml $\frac{5\text{ mg}}{x\text{ mg}} \times \frac{99\%}{100\%} = 5.05\text{ mg}$	5.1 mg	Naranja a	1. 0.076 2. 0.071 3. 0.078	0.057
0.2 mg/ml $\frac{10\text{ mg}}{x\text{ mg}} \times \frac{99\%}{100\%} = 10.10\text{ mg}$	10.1 mg	Naranja	1. 0.273 2. 0.279 3. 0.276	0.276
0.3 mg/ml $\frac{15\text{ mg}}{x\text{ mg}} \times \frac{99\%}{100\%} = 15.15\text{ mg}$	15.1 mg	Ambar	1. 0.504 2. 0.506 3. 0.498	0.503
0.6 mg/ml $\frac{30\text{ mg}}{x\text{ mg}} \times \frac{99\%}{100\%} = 30.3\text{ mg}$	30.3 mg	Ambar	1. 1.138 2. 1.172 3. 1.125	1.145
0.8 mg/ml $\frac{40\text{ mg}}{x\text{ mg}} \times \frac{99\%}{100\%} = 40.40\text{ mg}$	40.4 mg	Corinto	1. 1.418 2. 1.409 3. 1.428	1.418
0.9 mg/ml $\frac{45\text{ mg}}{x\text{ mg}} \times \frac{99\%}{100\%} = 45.45\text{ mg}$	45.5 m	Rojo ladrillo	1. 1.609 2. 1.617 3. 1.662	1.629
1.2 mg/ml $\frac{60\text{ mg}}{x\text{ mg}} \times \frac{99\%}{100\%} = 60.61\text{ mg}$	60.6 mg	Rojo ladrillo	1. 1.882 2. 1.955 3. 2.057	1.998
1.5 mg/ml $\frac{75\text{ mg}}{x\text{ mg}} \times \frac{99\%}{100\%} = 75.76\text{ mg}$	75.8 mg	Rojo ladrillo	1. 2.654 2. 2.654 3. 2.564	2.622

1.6 mg /ml $\frac{80mg}{x mg} \times \frac{99\%}{100\%} = 80.81mg$	80.8 m	Rojo ladrillo	1. 2.741 2. 2.744 3. 2.743	2.742
1.8 mg /ml $\frac{90mg}{x mg} \times \frac{99\%}{100\%} = 90.91mg$	90.9 mg	Rojo ladrillo	1. 2.997 2. 2.993 3. 2.988	2.992
2.1 mg /ml $\frac{105mg}{x mg} \times \frac{99\%}{100\%} = 106.06mg$	106.1 mg	Casi negro	> 3 A fuera de rango	-
2.4 mg /ml $\frac{120mg}{x mg} \times \frac{99\%}{100\%} = 121.21mg$	121.2 mg	Casi negro	> 3 A fuera de rango	-
2.7 mg /ml $\frac{136mg}{x mg} \times \frac{99\%}{100\%} = 136.36g$	136.4 mg	Casi negro	> 3 A fuera de rango	-
3.0 mg /ml $\frac{150mg}{x mg} \times \frac{99\%}{100\%} = 151.52g$	151.4 mg	Casi negro	> 3 A fuera de rango	-

*Para la construcción de la curva de calibración utilizada para la determinación de azúcares reductores se utilizaron 10 punto de glucosa al 99% (0.1, 0.2, 0.3, 0.6, 0.8, 0.9, 1.2, 1.5, 1.6 y 1.8), se pesó el equivalente de glucosa para el 100% en la solución y se realizó el proceso para determinar azucares reductores y mediciones espectrofotométricas por triplicado para cada punto. Debido al rango espectrofotométrico se dejaron las muestras de 2.1, 2.4, 2.7 y 3.0 como muestras cualitativas ya que salían del rango espectrofotométrico del equipo y por eso de se llevo la muestra a alícuotas menos a 1 ml, para que quedaran dentro del rango de la curva. Se obtuvo la siguiente curva de calibración.



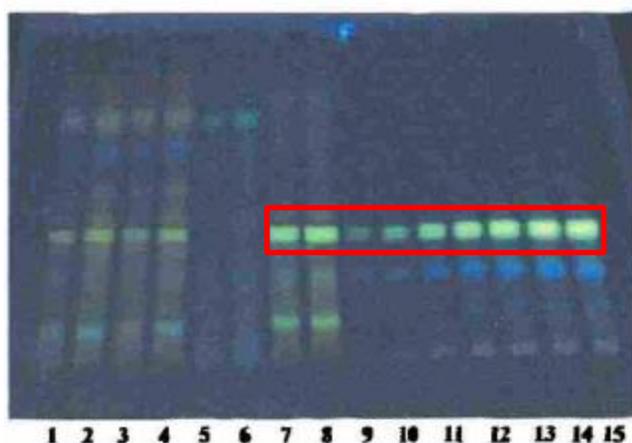
Gráfica 2. Curva de calibración para la cuantificación de azúcares reductores.

Anexo 8. Proceso de preparación e impregnación de la muestra.



Anexo 9. Cromatopla de referencia para la identificación de aloína de la farmacopea herbolaria mexicana.

Cromatograma obtenido13.- Sábila



Carriles	
1-8 Extractos de productos adquiridos	
1-	0.300 mg Producto 13a1
2-	0.375 mg Producto 13a1
3-	0.300 mg Producto 13a2
4-	0.375 mg Producto 13a2
5-	0.300 mg Producto 13b1*
6-	0.375 mg Producto 13b1*
7-	0.300 mg Producto 13b2*
8-	0.375 mg Producto 13b2*
* Cápsulas de Sábila: Marca Malibu Fitnesol.	
9-15 Sustancias de referencia. Aloína	
9-	0.001 mg de cada marcador
10-	0.002 mg de cada marcador
11-	0.005 mg de cada marcador
12-	0.010 mg de cada marcador
13-	0.015 mg de cada marcador
14-	0.020 mg de cada marcador
15-	0.025 mg de cada marcador

(Ceniceros, 2006).



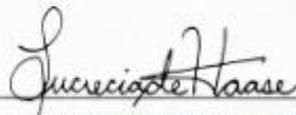
Br. Steven Alexander Gil Pichillá
Autor



M.A. Aylin Evelyn Santizo Juárez
Asesor



Lic. Julio Gerardo Chinchilla Vettorazzi
Revisor



M.A. Lucrecia Martínez de Haase
Directora de Escuela



M.A. Pablo Ernesto Oliva Soto
Decano