



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO QUÍMICA

Trabajo de Tesis Doctoral

***OBTENCIÓN DE UNA BEBIDA FUNCIONAL INSTANTÁNEA A
BASE DE YERBA MATE Y CASSIS, CON ALTO CONTENIDO DE
ANTIOXIDANTES Y BUENA PALATABILIDAD***

Tesista: Ing. Juliana Marcela Orjuela Palacio

Director/a: Dra. María Cecilia Lanari

Director/a: Dra. María Clara Zamora

2017

El presente trabajo de Tesis para optar por el título de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata se realizó bajo la dirección de la Dras. María Cecilia Lanari y María Clara Zamora en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA-UNLP-CONICET) y en la Facultad de Cs Agrarias de la Pontificia Universidad Católica Argentina.

A MIS PADRES,

MI INSPIRACIÓN Y MI FUERZA PARA SEGUIR

SIEMPRE ADELANTE.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María Cecilia Lanari, por su participación y aportes relevantes durante el desarrollo de esta investigación.

A la Dra. María Clara Zamora, por introducirme en un mundo de investigación nuevo y fascinante, por las enseñanzas académicas y personales, por el apoyo y la formación.

Al CONICET (Concejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas) por la financiación brindada en la Beca Doctoral para la realización del mismo.

A la Universidad Nacional de la Plata (UNLP) por los espacios de formación durante estos años.

A la empresa Chacras Cuyen, El Bolsón, Chubut, Argentina, por su colaboración y buena disposición en la proporción de la pulpa y fruta de Cassis orgánico.

A todo el personal del CIDCA, Investigadores, Becarios, Personal de Apoyo, Técnicos, Administrativos y servicios generales; por participar y colaborar en las actividades requeridas para desarrollar el proyecto de investigación.

A mis grandes compañeras de trabajo y vida en Argentina:

A Ceci Doporto, por darme la bienvenida y recibirme siempre con esa sonrisa, por el entendimiento y el apoyo.

A Anita Gómez, por los mates con naranja, los disfraces y celebraciones, por las charlas y escapadas.

A Lau Batt por tu gran ayuda y confianza en mí, por esas charlas de los eneros desolados en el instituto.

A Naty Ranalli por tu calidez y alegría, por prestarme tu hombro tantas veces y por la linda Gretta y las tardes de juegos.

A Vicky Santos, por cuidarme y apoyarme siempre, por retarme cuando era necesario, por los mates orgánicos, por permitirme compartir con tu familia y acompañarme en momentos de lejanía.

A Belén, por los kilómetros recorridos y aguantarme siempre hablando de la tesis, por sacarme de la monotonía, escucharme y hacerme recordar que hay más cosas en la vida.

A Ceci Dini, por las charlas que siempre terminan en risas, por escucharme y acompañarme en los momentos no tan buenos.

A Andrea Miranda, por todo el cariño y apoyo sin importar las circunstancias, siempre presente en los momentos buenos y malos; por siempre creer en mí.

A los chicos, amigos y compañeros del CIDCA:

A Andrés, por ser siempre ese consejo sabio y tranquilo, por ayudarme a ver las cosas más claras, por escucharme y siempre estar dispuesto a ayudar.

A Lucas por los buenos consejos, charlas de box y los mates.

A John por escucharme las largas historias y acompañarme en los momentos de incertidumbre y dificultad.

A Alejo por distraerme con sus charlas y compañía.

A mis amigas de la vida Naty Villanueva, Naty Martínez, Nia Echeverry, Juli Morales, Margara Preciado; por estar siempre presentes sin importar cuantos años pasen y cuantos kilómetros nos separen, por cada noche de mensajes, consejos, fotos, risas, llantos, recuerdos. Por ser más que mis amigas las hermanas que no tuve.

A mi familia, en especial a mi madre Martha y padre John Jairo siempre presentes a pesar de la distancia, apoyando mis sueños, brindándome grandes consejos y palabras de aliento. Son mi motor para seguir adelante a pesar de las dificultades que se presenten.

Los resultados fueron divulgados a través de publicaciones en revistas internacionales, capítulos de libros y actas de congresos.

Trabajos publicados en revistas

- **Orjuela Palacio, J.M;** Zamora M.C.; Lanari M.C. Consumers' acceptance of a high-polyphenol Yerba mate/black currant beverage: Effect of repeated tasting. *FOOD RESEARCH INTERNATIONAL*. Amsterdam: ELSEVIER SCIENCE BV. 2014 vol.57. p 26 - 33. ISSN 0963-9969.
- **Orjuela Palacio, J.M;** Lanari, M.C. The impact of moisture sorption properties on the color and bioactives concentrations of black currant-Yerba mate instant drinks. *JOURNAL OF BERRY RESEARCH*. Amsterdam: IOS Press. ISSN online 1878-5123. In press.

Actas de congreso

- Desarrollo de bebidas saludables en polvo a base de extractos de Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) y de Cassis (*Ribus Nigrum*). Orjuela Palacio, J.M.; Lanari, M.C; Zamora M.C. *IV Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Córdoba, Argentina*. Noviembre 2012. Resumen. Congreso
- The effect of familiarity on consumer's acceptance of a Yerba mate / black currant beverage. Orjuela Palacio, J.M.; Zamora, M.C; Lanari, M.C. *10th Pangborn Sensory Science Symposium. Rio de Janeiro, Brazil*. Agosto 2013.

- Desarrollo de una nueva bebida en polvo con alto contenido de antioxidantes a partir de Yerba mate (*ilex paraguariensis*) y Cassis (*ribes nigrum*). Orjuela palacio, J.M; Zamora M.C; Lanari, M.C. *VI congreso sudamericano de Yerba mate. Instituto nacional de Yerba mate. Uruguay. Montevideo. 2014. Artículo completo. Congreso.*
- Estabilidad físico-química durante el almacenamiento de una nueva bebida saludable en polvo a base de extractos de Yerba mate (*ilex paraguariensis*) y Cassis (*ribes nigrum*). Orjuela palacio, J.M; Marino, D.; Zamora M.C; Lanari, M.C. *VI Congreso sudamericano de Yerba mate. Instituto Nacional de Yerba mate. Uruguay. Montevideo. 2014. Resumen. Congreso.*
- Análisis sensorial y fisicoquímico de bebidas en polvo a base de Yerba mate (*ilex paraguariensis*) y Cassis (*ribes nigrum*). Orjuela palacio, J.M; Marino, D.; Zamora M.C; Lanari, M.C., *International Conference on Food Innovation. Argentina. Concordía. 2014. Libro. Artículo completo. Congreso.*

Ponencia

- Propiedades de adsorción de agua de bebidas en polvo a base de Yerba mate (*ilex paraguariensis*) y Cassis (*ribes nigrum*). Orjuela palacio, J.M.; Zamora M.C; Lanari, M.C., *International Conference on Food Innovation. Universidad Nacional de Entre Rios, Argentina. Concordía. 2014. Libro. Artículo completo. Congreso. Ponencia*

Tabla de contenido

Capítulo I.

1.	Introducción	22
1.1	Yerba mate	22
1.1.1	Procesamiento.....	23
1.1.2	Producción	25
1.1.3	Formas de consumo	25
1.2	Cassis (Ribes Nigrum).....	26
1.2.1	Producción	27
1.2.2	Usos	27
1.3	Compuestos bioactivos y sus beneficios para la salud	28
1.3.1	Antocianinas	30
1.3.2	Ácido Ascórbico.....	31
1.4	Estabilidad y preservación de los alimentos.....	31
1.4.1	Contenido de agua	32
1.4.2	Actividad acuosa	32
1.5	Liofilización	34
1.6	Adición de coadyudantes.....	36
1.7	Bebidas en polvo	37
1.8	Isotermas de sorción de alimentos deshidratados	40
1.8.1	Tipos de isotermas	42
1.9	Transiciones de fase.....	43
1.9.1	Sólido amorfo	43

1.9.2	Transición vítrea	44
1.10	Diagrama de estado	46
1.11	Evaluación sensorial de alimentos	47
1.11.1	Ensayos de evaluación sensorial	49
1.11.1.1	Pruebas de discriminación	49
1.11.1.2	Pruebas descriptivas	50
1.11.1.3	Pruebas afectivas	52
1.11.1.4	Métodos dinámicos	53
1.12	Objetivo General	58

Capítulo II.

2.1	Introducción	61
2.2	Objetivos específicos	66
2.3	Materiales y métodos	67
2.3.1	Selección de la fruta y del aromatizante (ensayos preliminares):	67
2.3.2	Elaboración de la bebida en base a Yerba mate/ Cassis	69
2.3.2.1	Materias primas:	69
2.3.3	Etapa 1: Evaluación de la aceptabilidad de un nuevo producto y el efecto de la exposición repetida	70
2.3.3.1	Determinación de la relación de los componentes (YMI/Cs)	70
2.3.3.1.1	Liofilización:	71
2.3.3.2	Discriminación sensorial entre muestras	73
2.3.3.2.1	Test del triángulo - Caracterización de la diferencia	73
2.3.3.3	Pruebas hedónicas - Estatus emocional - Exposición repetida	75

2.3.3.3.1	Escala Hedónica de 9-puntos.....	75
2.3.3.3.2	La Escala de punto justo (JAR: Just about right).....	76
2.3.3.3.3	Intención de compra.....	77
2.3.3.3.4	Estatus emocional.....	78
2.3.3.3.5	Influencia de la exposición repetida.....	79
2.3.3.3.6	Diseño sensorial.....	79
2.3.4	Etapa 2: Ajuste del atributo de diagnóstico Astringencia (Selección de la concentración de Yerba mate en la infusión (YMI)).....	82
2.3.4.1	Agrupamiento con descripción.....	83
2.3.5	Etapa 3: Ajuste de la concentración de polvo liofilizado en la bebida y de los atributos dulzor y aroma.	85
2.3.5.1	Evaluación de la concentración final de polvo liofilizado YMI:Cs en la bebida en polvo	85
2.3.5.2	Ajuste de dulzor y aroma ideal.....	86
2.3.6	Etapa 4: Caracterización sensorial de la bebida en polvo final	88
2.3.6.1	Perfil descriptivo cuantitativo	88
2.3.6.1.1	Diseño y procedimiento.....	90
2.3.6.1.1.1	Orientación global y generación de atributos (Sesión inicial)	90
2.3.6.1.1.2	Reconocimiento de estándares y entrenamiento en uso de escalas (sesiones 2, 3).....	93
2.3.6.1.1.3	Evaluación de la bebida empleando soluciones estándar (sesiones 4 y 5)	95
2.3.6.1.1.4	Evaluación final del perfil sensorial de la bebida en polvo (sesiones 6, 7 y 8)	97

2.3.6.2	Ensayos dinámicos y efecto múltiple sorbo.....	97
2.3.6.2.1	Medición de la sensación temporal dominante (STD):.....	98
2.3.6.2.2	Evaluación de la aceptabilidad de la bebida en polvo a través de los registros Intensidad-Tiempo (IT).	100
2.3.7	Análisis estadístico	102
2.4	Resultados y Discusión:.....	103
2.4.1	Discriminación sensorial entre muestras:.....	104
2.4.2	Pruebas hedónicas: Sesión control (primera sesión)	105
2.4.2.1	Aceptabilidad global.....	105
2.4.2.2	Diagnóstico de atributos:	106
2.4.2.3	Intención de compra:	108
2.3.2.4	Evaluación a través de las cuatro sesiones:.....	109
2.4.3	Efecto de la exposición en el estatus emocional después de probar las muestras.....	114
2.4.4	Ajuste del atributo de diagnóstico astringencia (selección de la concentración final del extracto de Yerba mate (YMI)):.....	119
2.4.4.1	Agrupamiento por descriptores (sorting task).....	119
2.4.5	Ajuste final de la bebida en polvo	123
2.4.5.1	Evaluación de la concentración final de polvo liofilizado en la bebida	124
2.4.5.2	Ajuste del dulzor y aroma	127
2.4.6	Perfil descriptivo de la muestra seleccionada (método CATA).....	129
2.4.7	Medición de la sensación temporal dominante (STD)	131
2.4.8	Evaluación de la aceptabilidad de las muestras a través de los registros Intensidad-Tiempo.	137

2.5	Conclusiones	139
-----	--------------------	-----

Capítulo III.

3.1	Introducción	143
3.2	Objetivo	144
3.3	Materiales y métodos.....	145
3.3.2	Ensayos Físicos	147
3.3.3	Ensayos químicos.....	155
3.4	Resultados y discusión	161
3.4.1	Características fisicoquímicas de las materias primas.....	161
3.4.2	Variaciones en las características físicas de B3(b) durante el almacenamiento:	162
3.4.3	Contenidos de polifenoles totales (PT) y de antocianinas monoméricas (MAC) y actividad antioxidante.....	173
3.5	Conclusiones	178

Capítulo IV.

4.1	Introducción	181
4.2	Objetivos	183
4.3	Materiales y métodos.....	184
4.3.1	Isotermas de sorción de agua.....	184
4.3.2	Modelado matemático de las isotermas de sorción de agua y comparación estadística	185
4.3.3	Propiedades termodinámicas:	187
4.3.3	Efecto de la temperatura y la humedad relativa en el color y en la concentración de compuestos bioactivos.....	191

4.3.3.1	Determinación de polifenoles totales y antocianinas monoméricas	191
4.3.3.2	Determinación de ácido ascórbico	192
4.3.4	193
	Análisis del color	193
4.3.5	Análisis estadístico	193
4.4.	Resultados y discusión	194
4.4.1.	Isotermas de sorción	194
4.4.2	Propiedades termodinámicas.....	198
4.4.3	Efecto de la Temperatura y humedad relativa sobre diferentes compuestos bioactivos:.....	203

Capítulo V.

5.1	Introducción.....	211
5.2	Objetivos	214
5.3	Materiales y métodos.....	215
5.3.1	Caracterización de la bebida en polvo	215
5.3.1.1	Densidad volumétrica.....	215
5.3.1.2	Ángulo de reposo	216
5.3.2	Propiedades de sorción (isoterma a 20°C).....	217
5.3.3	Efecto de la humedad relativa	217
5.3.3.1	Color, la solubilidad y morfología.	217
5.3.3.2	Concentración de los compuestos bioactivos y actividad	217
5.3.4	Temperatura de transición vítrea:	218
5.3.5	Determinación de los Valores críticos de a_w y W_c	219

5.3.6 Biodigestibilidad in vitro.....	220
Preparación de muestra:.....	220
5.4 Resultados y discusión	223
5.4.1 Caracterización de la bebida en polvo B12.....	223
5.4.2 Propiedades de sorción (isoterma a 20°C)	224
5.4.3 Efecto de la humedad relativa: Cambios en el color, la solubilidad y la morfología de B12.	226
5.4.3.1 Variaciones en el color y la solubilidad.....	226
5.4.3.2 Cambios en la microestructura del polvo.....	232
5.4.4 Efecto de la humedad relativa: Compuestos bioactivos y actividad antioxidante	238
5.4.5 Relación entre la temperatura de transición vítrea, humedad de equilibrio y actividad acuosa en la bebida en polvo.	244
5.4.5.1 Temperatura de transición vítrea.....	244
5.4.5.2 Diagrama de estado y valores críticos de almacenamiento.....	247
5.4.6 Digestión in vitro: Efecto sobre PT, MAC y actividad antioxidante	251
5.5 Conclusiones.....	256

Capítulo VI.

<u>Conclusiones generales.....</u>	<u>257</u>
Referencias	261
ANEXO 1	285
ANEXO 2.....	287
ANEXO 3.....	288

ANEXO 4	289
ANEXO 5	290
ANEXO 6	291
ANEXO 7	293
ANEXO 8	295
ANEXO 9	296

Nomenclatura

a^*	Parámetro Ciel* a^*b^* indicador de la posición entre rojo y verde.
A, B	Constantes de los modelos Halsey y Oswin (Ec. 12 y 13).
a, b	Parámetros empíricos de la ecuación 28.
AA	Contenido de Ácido ascórbico.
Abs	Absorbancia.
AUC	Área bajo la curva.
a_w	Actividad acuosa.
a_wC	Actividad acuosa crítico.
b^*	Parámetro Ciel* a^*b^* indicador de la posición entre amarillo y azul.
C_{GAB}	Constante de Guggenheim (Ec. 11).
Cs	Pulpa de Cassis.
$CyGE$	Equivalentes de cianidin-3-glucosido/ g m.s.
$DPPH\bullet$	2,2-difenil-1-picril hidracilo
DUR	Duración total de la percepción.
ϵ	Coeficiente de extinción (Ec. 9).
FD	Factor de dilución.
FP	Fruto de la pasión.
$G(act)$	Etapa Gástrica con enzimas activas. Digestión in vitro.
$G(inact)$	Etapa Gástrica con enzimas inactivas. Digestión in vitro.
$GI(inact))$	Etapa Gastrointestinal con enzimas inactivas. Digestión in vitro.
GAE	Ácido gálico.
$GI(act)$	Etapa Gastrointestinal con enzimas activas. Digestión in

Nomenclatura

	vitro.
HA	Ángulo de matiz (Ec. 6).
I_{max}	Intensidad máxima para una sensación.
IS	Índice de saturación (Ec. 5).
K_{GAB}	Factor de corrección GAB (Ec. 11).
L^*	Parámetro Ciel*a*b*indicador del grado de luminosidad.
m.s	Materia seca.
MAC	Contenido de antocianinas monoméricas (Ec. 9).
MD DE₁₀	Maltodextrina Dextrosa equivalente 10.
P	Número de atributos evaluados (Ec. 2 y 3).
$P_{alimento}$	Presión de vapor de agua del alimento.
P_{H_2O}	Presión de vapor de agua pura.
p_l	Peso del producto liofilizado (Ec. 4 y 29; g).
PM	Peso molecular (g/mol).
P_o	Nivel de oportunidad (Ec. 2).
P_s	Valor proporcional de menor significancia ($\alpha= 0.05$; Ec. 3).
p_{ss}	Peso seco de sobrenadante (Ec. 4; g).
PT	Contenido de Polifenoles totales.
q_0	Calor isostérico neto de la primera molécula de agua (Ec. 21 y 22; kJ/mol).
Q_{st}	Calor total isostérico de sorción (Ec. 16; kJ/mol).
q_{stn}	Calor isostérico neto de sorción (Ec. 17; kJ/mol).
R	Constante de los gases ideales (kJ/mol·K).
rpm	Revoluciones por minuto.

Nomenclatura

SST	Sólidos solubles totales.
t_{50max}	Tiempo en que la percepción decae un 50%.
T_g	Temperatura de transición vítrea <ul style="list-style-type: none">• (onset)= valor inicial• (I)= valor Intermedio• (F)= valor final.
T_{gs}	Temperatura de transición vítrea de los sólidos amorfos (Ec. 30; °C).
T_{gw}	Temperatura de transición vítrea del agua amorfa (Ec. 30; °C).
T_{hm}	Temperatura media armónica (Ec. 24; K).
t_{max}	Tiempo para alcanzar I_{max} .
T_β	Temperatura isocinética (Ec. 23; K).
v	Constante del modelo Caurie (Ec. 14).
V	Volumen (Ec. 29).
W_0	Contenido de humedad característico del alimento (Ec. 21 y 22; kg agua/ kg m.s).
W_c	Contenido de agua de equilibrio (kg de agua/ kg m.s).
W_cC	Contenido de agua crítico (kg de agua/ kg m.s).
W_m	Contenido de agua de monocapa (kg de agua/ kg m.s).
X_s	Fracciones de sólidos (Ec. 30; kg de agua/kg m.s)
X_w	Fracciones de agua respectivamente (Ec. 30; kg de agua/kg m.s).
YMI	Infusión de Yerba mate.
ΔG	Energía libre de Gibbs (Ec. 18 y 19; kJ/mol).

Nomenclatura

ΔG_{β}	Energía libre de Gibbs (KJ/mol) a T_{β} .
ΔS_d	Entropía diferencial de sorción (Ec. 20; kJ/mol.K).
Δ_{vap}	Calor latente de vaporización del agua libre (Ec. 16; kJ/mol).
λ_{max}	Longitud de onda máxima (nm).
ρ	Densidad (Ec. 29).
%E	Porcentaje de error medio relativo (Ec. 15).
%H	Porcentaje de Humedad (Ec. 4).
%HR	Porcentaje de humedad relativa ($a_w * 100$).
%I	Porcentaje de Inhibición (Ec. 10).
%R	Porcentaje de reconstitución.



Capítulo I

Introducción general



1. Introducción

1.1 Yerba mate

La Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) es un árbol nativo de Sur América, que puede alcanzar una altura entre 12 y 16 metros, por consiguiente las plantas se podan a una altura de 3 metros para cosechar las hojas frescas. La cosecha se realiza en forma manual, iniciando en abril o mayo hasta septiembre; después de esta etapa, el árbol se regenera y produce más hojas (Burtnik; 2006).

Sus hojas se utilizan en la medicina popular para combatir diversas patologías como artritis, cefalea, constipación, reumatismo, obesidad, fatiga, retención de líquidos y desórdenes hepáticos. Su consumo en forma de infusión es de gran popularidad en Argentina, Brasil, Paraguay y Uruguay debido a sus características estimulantes y energizantes, así como otros beneficios para la salud (Calviño y col., 2012).



- Reino: Vegetal.
- División: Espermatofitas.
- Subdivisión: Angiospermas.
- Clase: Dicotiledóneas.
- Orden: Sapindales.
- Familia: Aquifoliáceas.
- Género: Ilex.
- Especie: paraguariensis.
- Nombre científico: Ilex paraguariensis.
- Nombre común: Yerba Mate.

Figura I. 1 Hojas de *Ilex paraguariensis* (Fuente: Instituto Nacional de Yerba mate, <http://www.inym.org.ar/inym/imagenes>).

1.1.1 Procesamiento

Las hojas frescas cosechadas de *Ilex paraguariensis* no son consumidas como producto crudo y requieren varias etapas de procesamiento antes de llegar al consumidor (Heck y González de Mejía, 2007).

Según el Código Argentino Alimentario (CAA), en el Artículo 1193 del Capítulo XV se denomina Yerba mate o Yerba “al producto formado por las hojas desecadas, ligeramente tostadas y desmenuzadas, de *Ilex paraguariensis* Saint Hilaire (Aquifoliácea) exclusivamente, mezcladas o no con fragmentos de ramas secas jóvenes, pecíolos y pedúnculos florales.

Para cumplir con el CAA las hojas frescas cosechadas pasan por un proceso de escaldado, secado, añejamiento y empaçado.

En la figura I.2 se muestra un diagrama generalizado del procesamiento de la Yerba mate. Las hojas frescas cosechadas son sometidas al proceso de zapecado en el cual pasando al proceso de escaldado donde son calentadas muy rápido sobre una llama para desactivar la enzima polifenoloxidasa, luego es secada muy lentamente, etapa donde a menudo se emplea humo de madera lo que le imparte características muy diferentes de sabor y contribuye a cambiar su composición fisicoquímica (Heck y González de Mejía, 2007). La yerba seca pasa por una molienda gruesa donde se obtienen trozos de 1 cm² aproximadamente para luego ser estacionada durante de forma natural por 6 a 12 meses o controlada en cámaras con atmosfera controlada entre 30 a 60 días (Valerga y Lanari, 2012).



Figura I. 2 Diagrama de procesamiento de la Yerba mate (Adaptado de Heck y González de Mejía, 2007).

1.1.2 Producción

Argentina es el principal productor mundial de Yerba mate con más de 165.000 hectáreas de superficie cultivada, seguido por Brasil con 85 mil hectáreas y Paraguay con 35.000 hectáreas; dentro de la Argentina la planta se cultiva únicamente (por su clima y suelo rojo) en las provincias de Misiones y nordeste de Corrientes (INYM, 2015).

La producción de Yerba mate molida y empaquetada para el mercado interno en todas sus presentaciones es de alrededor de 256 millones de toneladas por año, lo que implica cosechar alrededor de 775 millones de kilogramos de hoja verde de Yerba mate. Esto quiere decir que para producir 1 kg de Yerba mate, se necesitan 3 kg de hoja verde, porque durante el proceso de elaboración la Yerba mate pierde peso por evaporación de agua en la etapa de secado (INYM, 2015).

Se exporta a Europa, USA, Siria y Japón donde se comercializa en forma de extractos para ser usados en formulaciones de productos fitoterapéuticos y en alimentos funcionales con acción estimulante, diurética, antioxidante, adelgazante y suplemento vitamínico y de minerales (Heck y González de Mejía, 2007; Filip y col., 2009).

1.1.3 Formas de consumo

Existen varias formas en las que la Yerba mate es consumida, la más común es el **Mate cebado** y consiste en colocar dentro de un recipiente llamado mate cierta cantidad de yerba, añadiendo agua caliente y mediante una bombilla se succiona el extracto resultante.

Otra forma de consumo similar a la anterior pero usando agua fría o jugos de fruta natural (naranja, pomelo, etc.) se denomina Tereré.

Alternativamente, se consumen infusiones en taza donde la yerba es empacada en saquitos similares al Té y se adiciona agua caliente, esta forma de consumo es usada en países importadores como Estados Unidos.

1.2 Cassis (*Ribes nigrum*)

El Cassis (*Ribes nigrum*) también conocido como grosellero negro o grosella negra, pertenece a la familia de la Glossulariaceae y es originaria de Europa Central y Oriental, además de algunas partes de Asia. La variedad sin espinas del arbusto de grosellero negro crece hasta los dos metros de altura y produce varias moras sin semillas de hasta 1 cm de tamaño (Figura I.3).



Figura I. 3 Fruto de grosella negro o Cassis (*Ribes Nigrum*).

(Fuente: <https://herbalpicnic.blogspot.com.ar/2013/08/black-currant.html>)

Ha sido incluido en el grupo de “Frutas finas” (denominación que se vincula al aspecto comercial y no al botánico) que incluye a un conjunto de especies caracterizadas por su corta vida útil, que requieren condiciones muy específicas de manejo post-cosecha y transporte (Ministerio de Agroindustria, SAGPyA, 2007).

1.2.1 Producción

Las 4.5 millones de toneladas de frutos rojos producidos en el mundo representan aproximadamente el 2% de la producción mundial de frutas; de los cuales el 13% corresponde a grosellas. En Argentina la superficie cultivada con frutos rojos se distribuye en diversas provincias, pero en el caso de frambuesas, moras y grosellas, algo más del 70% se concentra en territorio patagónico: Comarca Andina del Paralelo 42°2, Valle Inferior del Río Chubut, Alto Valle del Río Negro y Neuquén, Neuquén (Plottier, Senillosa, San Martín de los Andes), Los Antiguos (Santa Cruz) (Ministerio de Agroindustria, SAGPyA, 2007).

1.2.2 Usos

El principal canal de comercialización es la industria de alimentos, que demanda el fruto congelado para transformarlos en dulces, mermeladas, jaleas, conservas, salsas, jugos concentrados, licores y aguardientes, entre los productos más importantes.

Son cada vez más las industrias que incorporan frutos rojos en sus alimentos, como sucede con los lácteos, golosinas, cereales en barra, bebidas sin alcohol y té, entre otros (Ministerio de Agroindustria, SAGPyA, 2007).

No solamente se utilizan estas bayas como alimento, sino también por sus beneficios para la salud, debido a que los brotes, semillas y hojas contienen muchos principios activos.

1.3 Compuestos bioactivos y sus beneficios para la salud

Diversos autores han reportado que la Yerba mate tiene propiedades antioxidantes y hepatoprotectoras (Filip y Ferraro, 2003; Filip y col., 2000), así como la capacidad de mejorar el sistema cardiovascular (Heck y González de Mejía, 2007) y el sistema nerviosos central (González y col., 1993).

Algunas de las propiedades farmacológicas atribuidas a la infusión de mate han sido relacionadas con su alto contenido de antioxidantes fenólicos, especialmente ácido clorogénico y flavonoides como la Quercetina, Rutina y Kaempferol (Heck y col, 2008) y también por las antinas como la Cafeína y Teobromina (Heck y González de Mejía, 2007).

En la tabla I.1 se presentan los compuestos bioactivos de mayor importancia identificados en la Yerba mate y los beneficios para la salud asociados.

Tabla I. 1 Compuestos identificados en hojas de Yerba mate y algunas actividades biológicas.

COMPUESTO	ACTIVIDAD BIOLÓGICA
Cafeína	Anticarcinogénica, antiobesidad, antioxidante, antitumoral, diurético, energizante 20 a 200 mg, estimulante, inhibidor de Topoisomerasa 0.1M, vaso dilatador.
Ác. Clorogénico	Antioxidante, analgésico, antiateroesclerótico, antibacterial, antidiabético, antitumoral, clorético
Clorofila	Antibacterial, anticancerígeno
Colina	Antidiabético, colinérgico, lipotrópico
Ác. Nicotínico	Clorético, hipocolesterolémico 1 a 6.
Ác. Pantoténico	g/día, antialérgico 100 a 500 mg/día, antiartrítico 500 a 2000 mg/día, antifatiga
Rutina	Antioxidante, antitumoral, antiulceroso, vasodilatador
Taninos	Antioxidante, antitumoral, inhibidor de la lipoxigenasa
Teobromina	Inhibidor de cAMP, inhibidor de fosfodiesterasa, diurético, estimulante, miorelajante
Teofilina	Inhibidor de cAMP, inhibidor de fosfodiesterasa, diurético, estimulante, miorelajante
Ác. Ursólico	Analgésico, antioxidante, inhibidor de proteasa, inhibidor de topoisomerasa, antiarrítmico, anticancerígeno.

Adaptada de Heck y González de Mejía (2007).

El Cassis (*Ribes nigrum*) tiene un alto contenido de ácido ascórbico (Casati y col., 2012) y es una excelente fuente de compuestos bioactivos como antocianinas, flavonoles, procianidinas y ácidos fenólicos.

1.3.1 Antocianinas

Las antocianinas son pigmentos hidrosolubles con una amplia gama de actividades biológicas, incluyendo antioxidantes, antimicrobianas, anticancerígenas y neuroprotectoras; mejoran la visión y la inducción de la apoptosis (Han y col., 2007; Neto, 2007; Ramos, 2008; Soobrattee, y col., 2006).

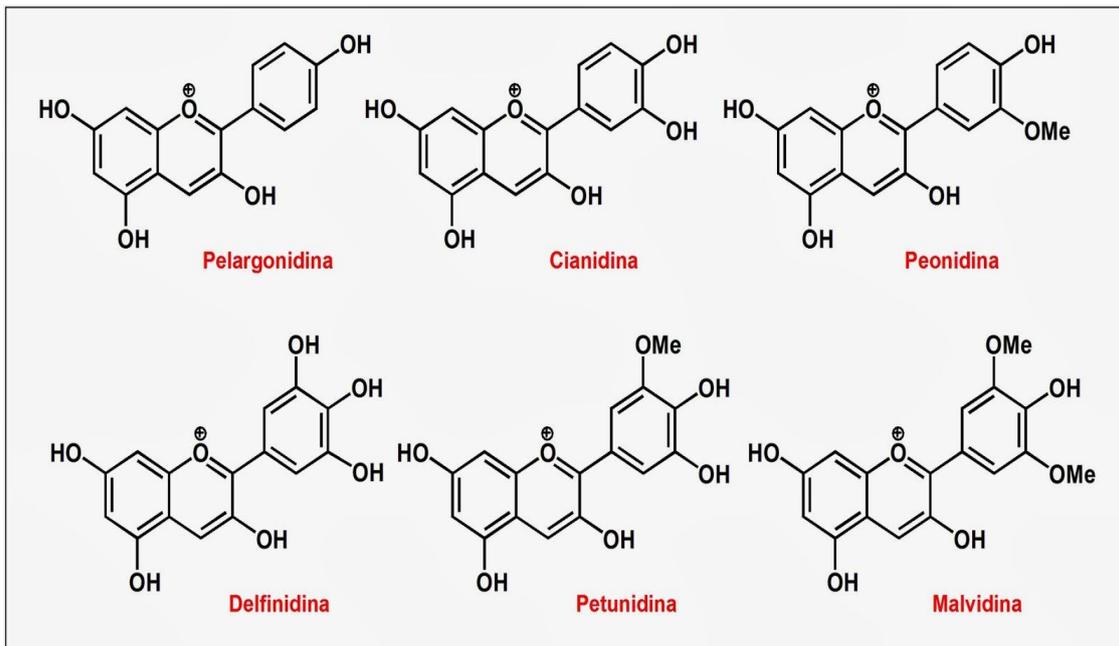


Figura I. 4 Estructuras de algunas antocianinas. (ubuscientia, 2014)

Las antocianinas son responsables de color morado, pero tienen la desventaja de ser inestables y susceptibles a la degradación (Määttä y col., 2001; Slimestad y Solheim, 2002), su baja estabilidad térmica es un aspecto importante a considerar cuando se selecciona la técnica de secado.

1.3.2 Ácido Ascórbico

La vitamina C es de gran importancia para la nutrición del hombre, cumple un rol beneficioso para la salud (antioxidante, biosíntesis de colágeno, respuesta inmune, absorción de metales) (Spínola y col., 2012). Comprende un grupo de compuestos con actividad biológica; el ácido L-ascórbico (AA) es la forma mayoritaria biológicamente activa de AA es un nutriente altamente inestable presentando pérdidas inmediatamente después de la cosecha, degradándose reversiblemente a la forma L-Dehidroascorbico (DHA) y luego al ácido diketogulónico (DKG) (Figura I.5; Spínola y col., 2012).

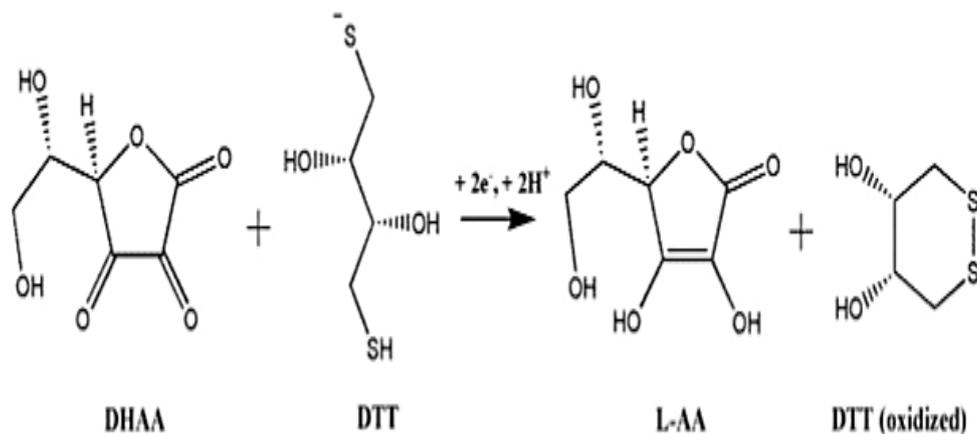


Figura I. 5 Reducción del ácido Dehidroascórbico (DHA) a ácido L-ascórbico (L-AA) por ditiotreitolo (DTT) (Spínola y col., 2012).

1.4 Estabilidad y preservación de los alimentos

Los alimentos son considerados sistemas que interactúan con el entorno y se modifican con el tiempo, su estabilidad física, química y microbiológica está íntimamente ligada a su contenido de agua.

1.4.1 Contenido de agua

El contenido de agua de un alimento se refiere a toda el agua presente, comprendiendo el agua libre que es la fracción de agua congelable, tiene movilidad molecular y está disponible para participar en las reacciones de deterioro de los alimentos; y el agua ligada que corresponde a la porción de agua no congelable a -40°C y está fuertemente unida al alimento por puentes de hidrógeno. Debido a las diferencias existentes en las interacciones entre el agua y los componentes no acuosos, se ha observado que alimentos con el mismo contenido de agua presentan una estabilidad diferente (Fennema, 2000).

1.4.2 Actividad acuosa

La actividad acuosa (a_w) es una de las herramientas más importantes en la predicción de la calidad y estabilidad de los alimentos (Tonon y col., 2009) y se define como la relación entre presión de vapor de agua pura (P_{H_2O}) y la presión de vapor de agua del alimento ($P_{alimento}$) a la misma presión (Ec. I.1).

$$a_w = \frac{P_{alimento}}{P_{H_2O}} \quad (I.1)$$

Esta igualdad se presenta en condiciones ideales y equilibrio termodinámico. Para alcanzar el equilibrio, hay una transferencia de masa de agua entre el alimento y el entorno, llegando a valores iguales de a_w a temperatura y presión constante (Roos, 1995).

La figura I.6 muestra la variación de la estabilidad de los alimentos con a_w . (Adaptado de Labuza y Altunakar, 2007). La mayoría de las bacterias crecen a $a_w = 0.9$ mientras que las levaduras y los hongos lo hacen a 0.87 y 0.80 respectivamente. Las velocidades de reacción mínimas durante la desorción se encuentran en el límite de las zonas I y II de la isoterma (a_w 0.20-0.30), siendo esta la zona de mayor estabilidad de los alimentos; todas las reacciones excepto las oxidativas, se mantienen en dicho mínimo si los valores de a_w disminuyen (Labuza y Altunakar, 2007). Durante la desorción, el contenido de agua en que la velocidad es mínima, que se encuentra en primer lugar, es el contenido de agua de la «monocapa BET» (Fenemma, 2000).

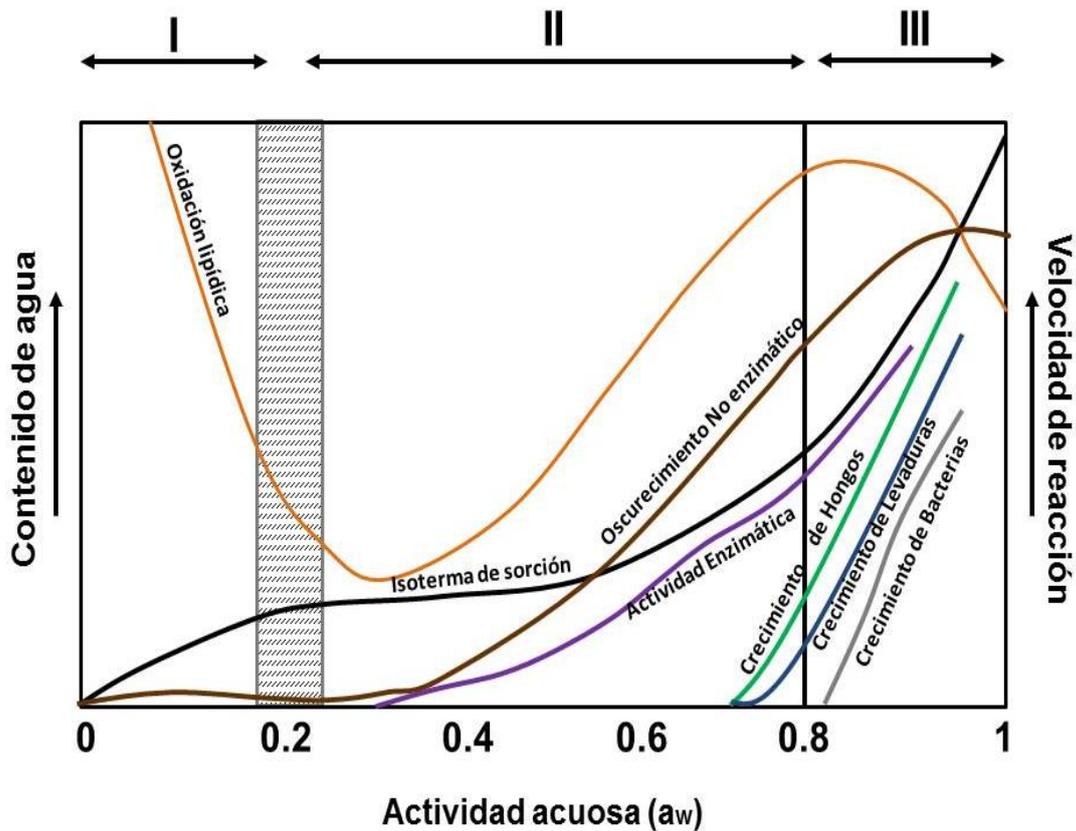


Figura I. 7. Mapa de estabilidad de los alimentos en función de a_w . (I; II; III) zonas de la isoterma de sorción. (Adaptado de Labuza y Altunakar, 2007).

1.5 Liofilización

Es un método de secado que permite la producción de estructuras de carbohidratos completamente amorfas; involucra la congelación del agua presente en el material, seguido de la deshidratación por sublimación del hielo (Roos, 2010); minimizando las reacciones de deterioro como consecuencia de la reducción de la actividad acuosa, permitiendo obtener productos de excelente calidad, mejor que los obtenidos por otros tipos de secado (Pérez, 2010)

Las bajas temperaturas del proceso menores a la temperatura ambiente permiten obtener productos termolábiles (propensos a cambios de estructura, textura y pérdida de aromas debido a altas temperaturas) con un daño mínimo. (Barbosa-Cánovas y col., 2000). La figura I.7 muestra un esquema de las etapas del proceso de liofilización.

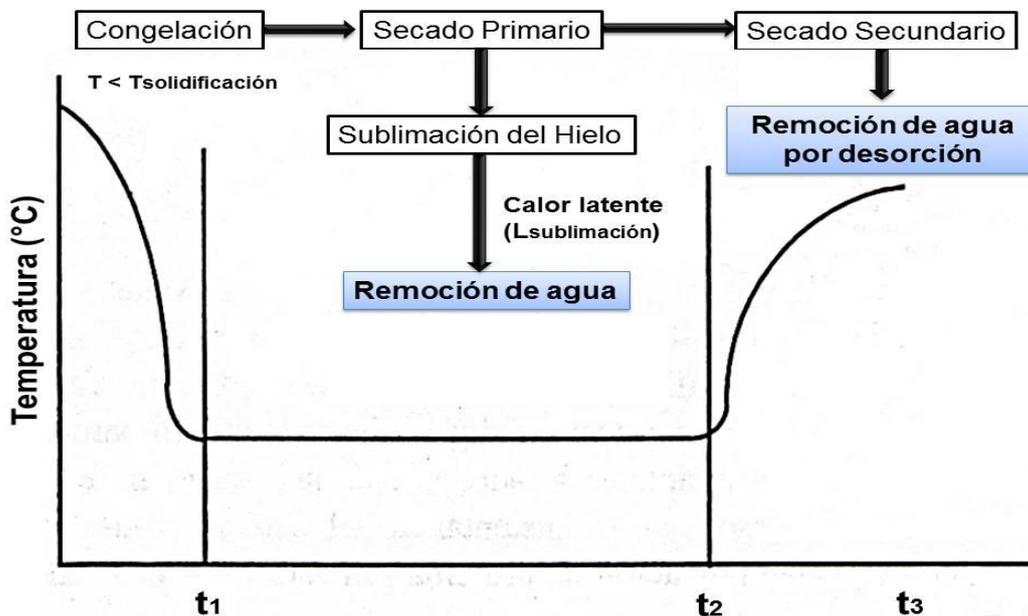


Figura I. 8. Etapas del proceso de liofilización (Adaptado de Barbosa-Cánovas y col., 2000; Pérez; 2010).

a) *Congelación:*

Los materiales son congelados por debajo de la temperatura de solidificación, formando cristales de hielo.

b) *Secado primario:*

Se consume gran cantidad de calor latente de sublimación durante el cambio de estado; las moléculas subliman y pasan a la fase vapor, disminuyendo la temperatura del producto congelado. Durante esta etapa el secado es rápido, se elimina el agua libre congelada que constituye la mayoría del agua presente en el alimento fresco. La sublimación del hielo genera una capa porosa.

c) *Secado secundario:*

Una vez que se eliminó el hielo del alimento se inicia el secado secundario, donde el agua parcialmente ligada al material será removida por desorción. El producto debe mantenerse a temperaturas por debajo de los 30°C para evitar el colapso, proteger los compuestos bioactivos y mantener sus características organolépticas.

La liofilización del alimento se termina cuando toda el agua libre y ligada ha sido removida, obteniendo productos con 1-3% de humedad. En la figura I.8 se muestra la estructura formada durante el proceso de liofilización. En el paso de pre-liofilización una fase sólida vítrea concentrada por congelación con partículas atrapadas (componentes sólidos, fase dispersa, células, etc.).

La estructura sólida vítrea se mantiene durante el proceso de deshidratación con el fin de evitar el flujo viscoso y el colapso. El sólido deshidratado forma membranas alrededor de los espacios vacíos dejados por los cristales de hielo que retienen los componentes atrapados (Figura I.8; Roos, 2010).

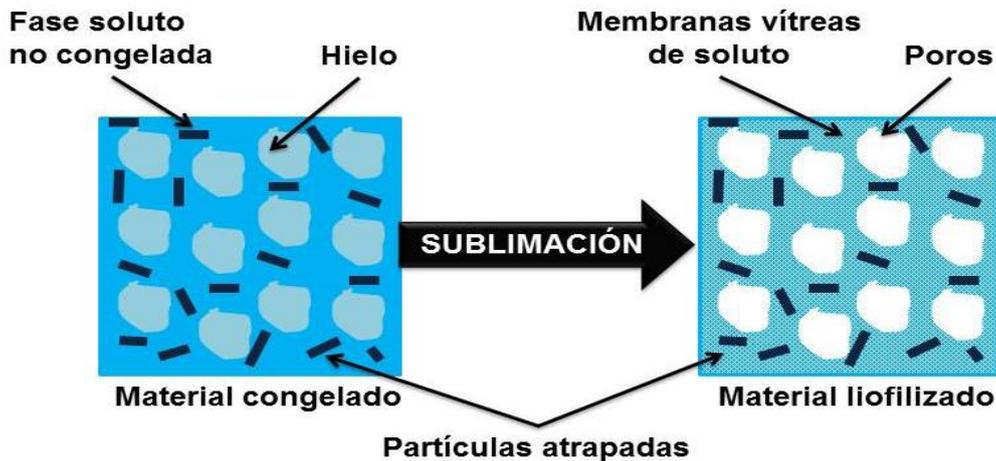


Figura I. 9. Formación de la estructura durante la liofilización (Adaptado de Roos, 2010).

1.6 Adición de coadyudantes

Son sustancias, excluidos aparatos y utensilios, que no se consume como ingrediente alimenticio por sí misma y que se emplea intencionadamente en la elaboración de materias primas, alimentos o sus ingredientes, para lograr alguna finalidad tecnológica durante el tratamiento o la elaboración, pudiendo dar lugar a la presencia no intencionada, pero inevitable, de residuos o derivados en el producto final (FAO, 2008). Las maltodextrinas son productos de que se obtienen a partir de la hidrólisis del almidón, consiste en unidades de α -D-Glucosa unidas principalmente por enlaces glucosídicos 1-4 y se caracterizan por su equivalente de dextrosa (DE) (Tonon y col., 2009); parámetro que expresa el grado de hidrólisis.

Los polisacáridos como maltodextrina MD pueden ayudar a mejorar la palatabilidad como agente enmascarador del amargor y reducir la sensación de astringencia inducida por los compuestos polifenólicos de los alimentos y bebidas (Ley, 2008; Troszynska y col., 2010).

Estupiñan y col. (2011), reportaron que la adición de MD DE₂₀ a polvos liofilizados de Cassis mejora la estabilidad del color y los antioxidantes presentes. La maltodextrina es el carbohidrato más común usado como matriz para encapsulación, protegiendo contra los cambios fisicoquímicos indeseables (Roos, 1995; Galmarini y col., 2009; Sánchez y col., 2013).

1.7 Bebidas en polvo

El jugo en polvo es una bebida con sabor a frutas, originalmente formulado en Estados Unidos por General Foods Corporation (Ablin, 2013). El Código Alimentario Argentino (Res. Conjunta SPyRS N° 009 y SAGPA N° 106 del 6.03.00), define los jugos en polvo como:

“Se entiende por bebidas sin alcohol o bebidas analcohólicas, las bebidas gasificadas o no, listas para consumir, preparadas a base de uno o más de los siguientes componentes: jugo, jugo y pulpa, jugos concentrados de frutas u hortalizas, leche, extractos, infusiones, maceraciones, percolaciones de sustancias vegetales contempladas en el presente Código, así como aromatizantes /saborizantes autorizados.”

En el caso específico del jugo en polvo, se describe al producto como: *“Preparaciones de los tipos utilizados para la elaboración de bebidas analcohólicas elaboradas con un 20% como mínimo de jugos o zumos de fruta sus equivalentes en jugos concentrados o adicionados en forma de polvo o cristales (R.2289/92 ex-ANA)”*.

Los jugos en polvo son la categoría de bebidas sin alcohol que más han crecido. Desde el 2004, la categoría tuvo un alza promedio del 18% anual, y se esperaba un crecimiento a dos dígitos en el año 2015 (Ablin, A., 2013).

1.7.1 Propiedades de los productos en polvo

El término polvos alimentarios representa una gama muy amplia de productos que difieren en su composición química y características físicas (Peleg, 1977); las propiedades como la forma y densidad de las partículas, junto con la viscosidad y densidad, la concentración y el estado de dispersión, gobiernan la tasa de rehidratación de los polvos (Barbosa-Cánovas y col., 2005) y afectan la fluidez de cualquier polvo (Peleg, 1977).

El flujo de un polvo es el movimiento del seno de partículas sobre partículas vecinas o a lo largo de la pared del recipiente que las contiene; involucra fuerzas gravitatorias, de fricción, cohesivas y adhesivas (Peleg, 1977). Los polvos pueden ser *no-cohesivos (de flujo libre)* donde las fuerzas entre partículas son consideradas insignificantes o *cohesivos donde estas* tienen un papel importante en el comportamiento mecánico del lecho del polvo.

La mayoría de los polvos alimenticios pueden considerarse no-cohesivos cuando están secos y su tamaño de partícula es mayor a 100 μm ; si no están protegidos evitando la absorción de humedad principalmente, se convierten en cohesivos con facilidad (Peleg, 1977). Bajo condiciones especiales como absorción de humedad, temperaturas elevadas o presión estática podrían desarrollarse fuerzas reduciendo la fluidez.

1.7.2 Deterioro de productos en polvo

El fenómeno de deterioro a bajos contenidos de humedad, donde un polvo fluido forma un material pegajoso resultando en una pérdida de funcionalidad y calidad del producto, ha sido denominado “Caking” (Aguilera y col., 1995).

Se inicia con la deformación de la superficie y la aparición de puentes entre partículas, formando grumos que se desintegran fácilmente; seguido de la consolidación irreversible de los puentes y la presencia de estructuras aglomeradas.

Posteriormente hay una pérdida pronunciada de estructura con un engrosamiento de los puentes entre partículas, pasando al colapso total del producto donde desaparecen los puentes como resultado de la licuefacción de la muestra y solubilizan de fracciones de bajo peso molecular (Aguilera y col., 1995).

1.8 Isotermas de sorción de alimentos deshidratados

El estado del agua en los alimentos es de gran importancia ya que afecta su estabilidad microbiológica y química. Las isotermas de sorción de agua son herramientas termodinámicas importantes para predecir las interacciones entre el agua y los componentes de un alimento; describen la relación entre la actividad acuosa (a_w) y el contenido de humedad de equilibrio (W_c), proporcionando información útil para operaciones como el secado, envasado y almacenamiento de alimentos (Lomauro y col., 1985). Pueden ser de dos tipos (Figura I.9):

- *Isotermas de adsorción:* se obtienen exponiendo un material seco a varias atmósferas de creciente humedad relativa y midiendo la ganancia de peso debido a la adsorción de agua.
- *Isotermas de desorción:* se parte de un material húmedo expuesto a las mismas humedades relativas y se registra la pérdida de peso (Al-Muhtaseb y col., 2002).

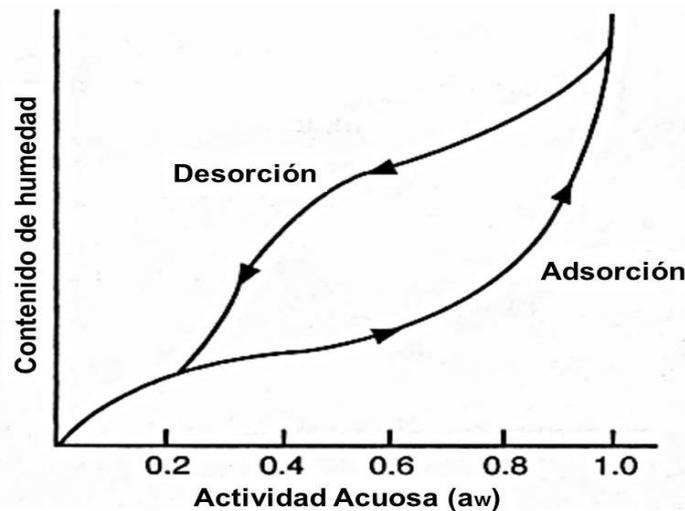


Figura I. 10 Isoterma de sorción generalizada para alimentos
(Adaptado de Al-Muhtaseb y col., 2002).

Estos procesos no son completamente reversibles y pueden tomar caminos diferentes, es decir, para un contenido de humedad determinado el valor de actividad acuosa es menor para la desorción que para la adsorción, este fenómeno recibe el nombre de histéresis (Fennema, 2000).

Las isothermas de sorción pueden ser divididas en tres zonas (Fennema, 2000):

- a) *Zona de monocapa (I)*: donde se presenta la máxima velocidad de oxidación de lípidos ($a_w = 0-0.2$). El agua presente en esta zona es la más fuertemente sorbida y la de menor movilidad (agua ligada). Se comporta como parte integrante del sólido.

En el límite entre las zonas I y II corresponde al contenido de humedad de la “monocapa de BET”, corresponde aproximadamente a la cantidad de agua necesaria para formar una monocapa sobre los grupos altamente polares y accesibles de la materia seca.

- b) *Zona multicapa (II)*: Se presentan interacciones agua-agua y agua-sólido. El agua añadida ocupa sitios de la primera capa que aún permanecen libres.

El agua añadida en el límite de I y II ejerce una significativa acción plastificante, asociada con el comienzo del proceso de solubilización y el aumento en la velocidad de la mayoría de las reacciones de deterioro.

- c) *Zona (III)*: Aparición del agua libre $a_w \geq 0.8$, tiene capacidad solvente y es fácilmente utilizable por los microorganismos para su actividad biológica, crecimiento y multiplicación.

1.8.1 Tipos de isotermas

Brunauer y col., (1940) clasificaron las isotermas de sorción en 5 tipos. El tipo I es la isoterma de Langmuir y el tipo II es la isoterma de forma sigmoideal, no hay nombres específicos para los otros 3 tipos (Figura I.10). Las isotermas de la mayoría de los alimentos presentan una forma sigmoideal y se clasifican como isotermas de tipo II.

La mayor parte del agua en los alimentos frescos ejerce una presión de vapor cercana a la del agua pura; este nivel de presión de vapor se mantiene hasta que el contenido de humedad disminuye cerca del 22%, donde ya no es suficiente para mantener la presión de vapor aproximada a la del agua y se observa una caída de presión como si estuviera en solución (Al-Muhtaseb y col., 2002).

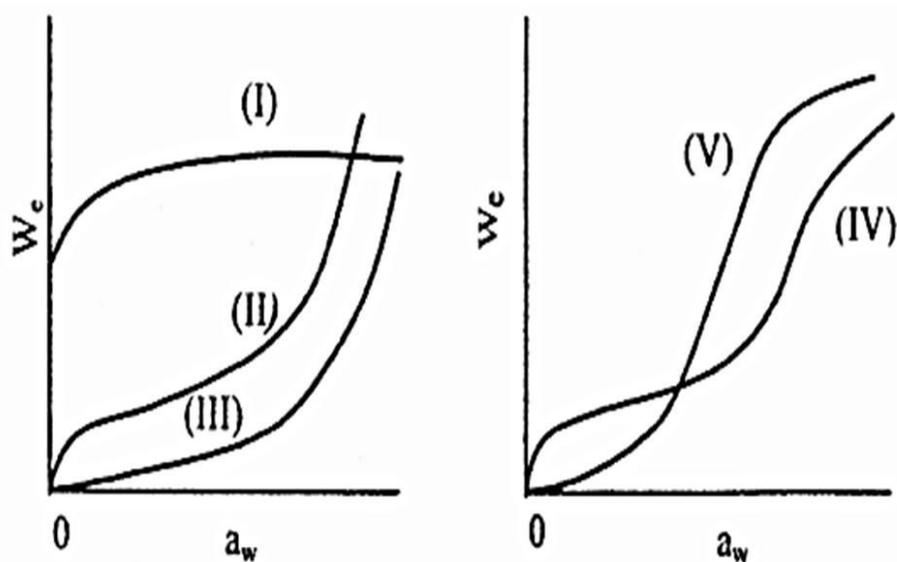


Figura I. 11 Tipos de Isotherma de sorción (Al-Muhtaseb y col., 2002).

Los cambios en la humedad relativa de esta última fracción de agua (22%) en los alimentos deshidratados resulta en la forma sigmoideal característica de la isoterma. En los alimentos ricos en componentes solubles, como los azúcares, se observa un comportamiento tipo III, debido a la solubilidad en agua (Al-Muhtaseb y col., 2002).

1.9 Transiciones de fase

Los alimentos son estructuras complejas con características fisicoquímicas dependientes de su composición (agua, lípidos, hidratos de carbono y proteínas), de las interacciones entre los componentes y agentes externos como la temperatura y presión durante el procesamiento y del almacenamiento al que sean sometidos. Las transiciones de fase son cambios de estado en la movilidad molecular de los materiales que tienen efectos significativos sobre las propiedades físicas (Roos, 2010).

1.9.1 Sólido amorfo

Un sólido amorfo se obtiene cuando las moléculas del soluto se inmovilizan mediante un congelamiento o deshidratación rápidos (liofilización y secado spray); el sistema experimenta un rápido aumento en la viscosidad y disminución en la movilidad molecular. Las moléculas no pueden reordenarse y alcanzar configuraciones de equilibrio, permaneciendo de forma desordenada y amorfa. Dependiendo de la temperatura, el sólido amorfo puede encontrarse en estado vítreo o gomoso, el pasaje de un estado a otro depende de una temperatura denominada transición vítrea (T_g) (Galmarini; 2009).

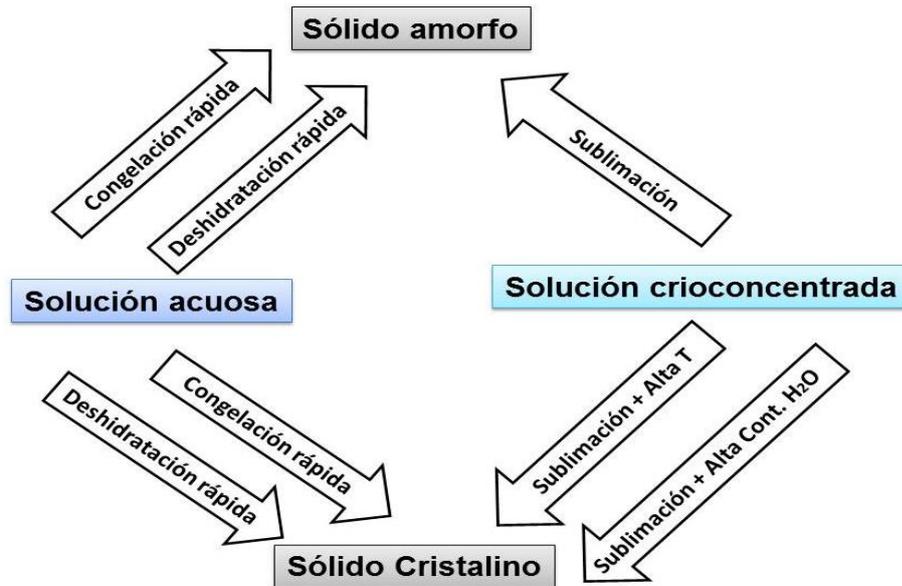


Figura I. 12 Esquema obtención sólidos amorfos.

1.9.2 Transición vítrea

La transición vítrea es una de las características fisicoquímicas más importante de los sólidos amorfos; de gran importancia en el control del procesamiento y estabilidad de alimentos deshidratados. Es una transición de segundo orden siendo un proceso reversible, en el cual un sólido en estado vítreo de alta viscosidad se calienta por encima de un rango de temperatura donde se comporta como un líquido subenfriado (estado gomoso) de menor viscosidad (Roos, 2010).

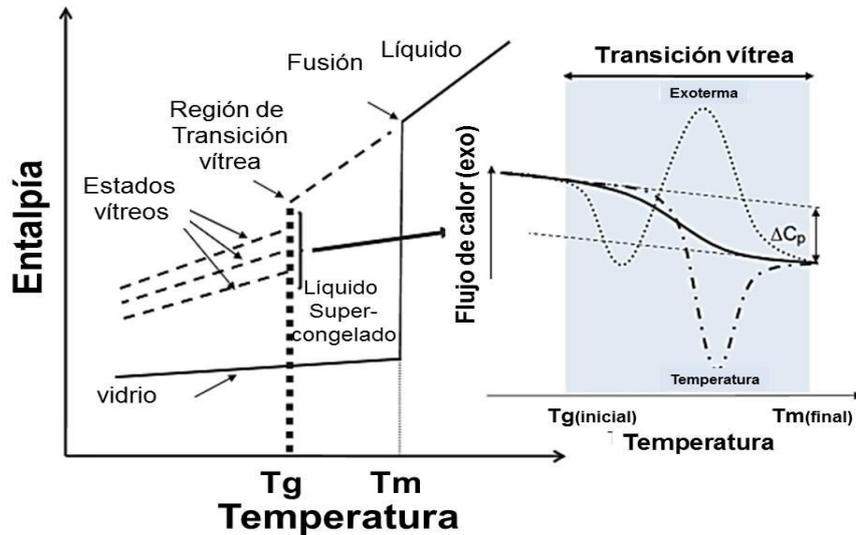


Figura I. 13 Transición vítrea. Entalpía de varios estados de los materiales y cambios en la capacidad calorífica (Adaptado de Roos, 2010).

Las variaciones en la entalpía con la temperatura para los estados vítreos y gomosos muestran que la transición vítrea está asociada a los cambios en la capacidad calorífica (Figura I.12); sin embargo, no se puede identificar una sola temperatura para el cambio de capacidad calorífica (Roos, 2010). El rango de temperatura al en el que ocurre el cambio de estado vítreo-gomoso se denomina *Temperatura de transición vítrea* (T_g). Pequeños aumentos por encima de T_g resultarán en cambios apreciables en las características fisicoquímicas y sensoriales como la textura y el color del producto (Roos, 2010; Tonon y col., 2010). Los plastificantes son pequeñas relativamente pequeñas (no volátiles) que disuelven las sustancias. El agua ejerce un efecto plastificante en los alimentos, se ha observado que la T_g disminuye con el aumento del contenido de agua.

1.10 Diagrama de estado

El diagrama de estado representa la relación entre el contenido de agua del alimento, la temperatura de transición vítrea y la actividad acuosa; se obtiene representando en forma conjunta los resultados predichos por modelos matemáticos de la relación T_g /humedad y a_w /humedad (Figura I.13).

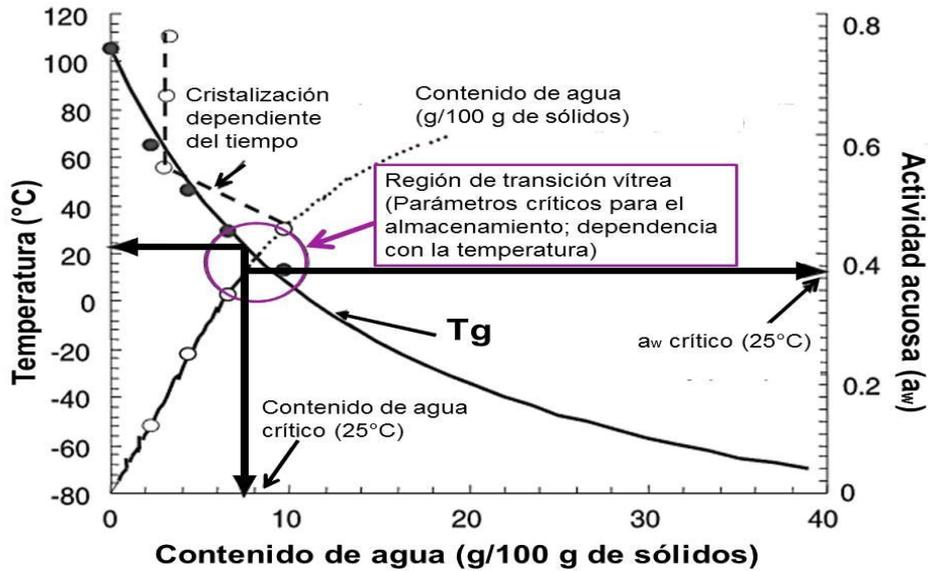


Figura I. 14 Diagrama de estado de lactosa a 25°C. Representación conjunta de Gordon & Taylor y el modelo de GAB (Adaptado de Roos, 2010).

Usando este diagrama para una temperatura de almacenamiento determinada se puede conocer los valores de actividad acuosa crítica (a_wC) y contenido de humedad crítico (W_cC) que delimitan el proceso de transición del estado vítreo al gomoso y por ende la humedad relativa ambiente del producto a dicha temperatura. Los diagramas de estado son de utilidad para la selección de los parámetros del proceso y la evaluación de las condiciones de almacenamiento de polvos alimenticios (Rahman, 2006).

1.11 Evaluación sensorial de alimentos

Las características sensoriales de los alimentos pueden ser percibidas por los órganos sensoriales (oído, ojos, nariz, lengua y piel) cuando interactúan con el medio o el objeto, permitiendo establecer criterios de selección y evaluación como la calidad global de un alimento. Cada sentido se encuentra vinculado a sus propios receptores y vías neurales que los asocian a la más compleja estructura del cerebro. En la periferia los receptores para un sentido determinado responden a un específico tipo de estimulación que es único a cada sistema; transmitiendo la información adquirida al cerebro donde ocurre la integración (Stone y col., 2004).

Los alimentos son complejas fuentes de estimulación y esta no será exclusiva de un solo sentido como la visión o el gusto. (Stone y col., 2004; Kemp y col., 2009).

El proceso sensorial se inicia por la presencia de un estímulo externo (agente físico o químico) que actúa sobre los órganos sensoriales generando una respuesta o sensación, seguido de su posterior interpretación por parte del evaluador (Figura I.14); este proceso ha sido definido como percepción sensorial (Sancho y col., 1999).

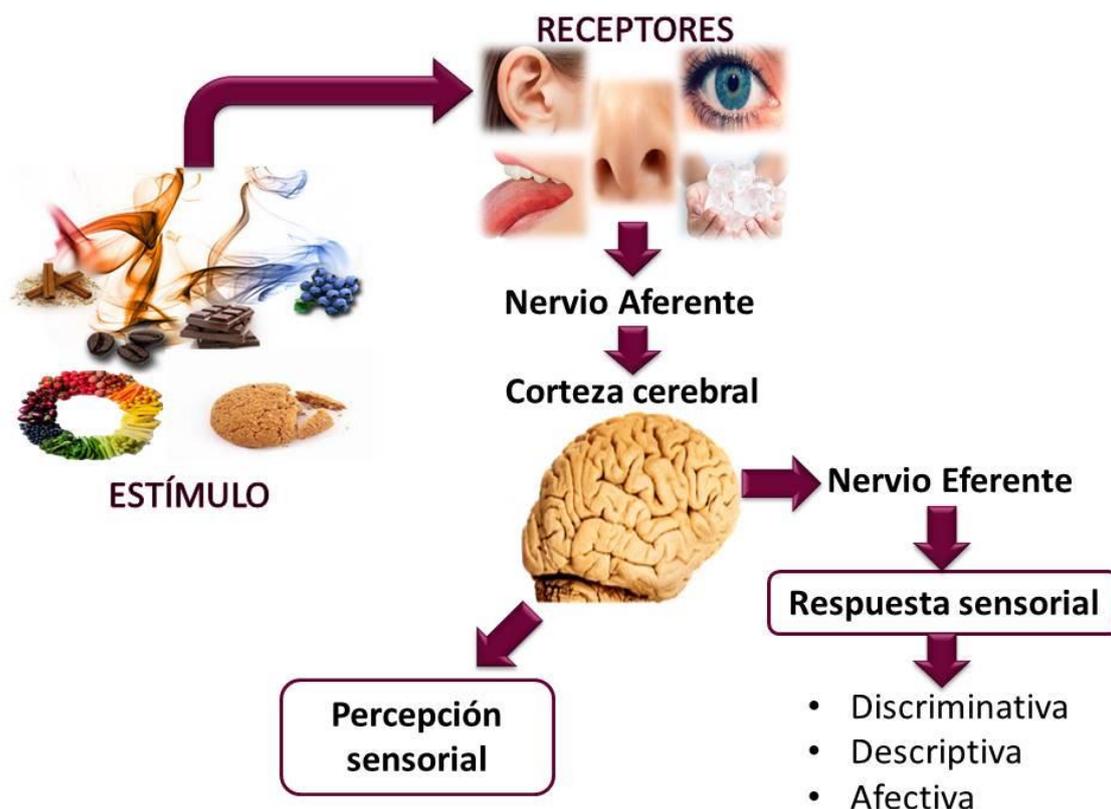


Figura I. 15 Esquema del sistema sensorial.

Varias definiciones se han establecido para el concepto de “Análisis sensorial”. Según la división de evaluación sensorial del Instituto de tecnólogos de los alimentos (1975): “Un método científico usado para evocar, medir, analizar e interpretar respuestas de productos percibidas a través de los sentidos de la vista, olfato, tacto, gusto y audición” (Anonymous, 1975; Kemp y col., 2009).

Otra definición es la dada por la norma UNE 87-001-86: “Es el examen de las propiedades organolépticas de un producto, realizable con los sentidos” (Ibáñez y Barcino, 2001).

1.11.1 Ensayos de evaluación sensorial

En la tabla I.2 se presentan los tres tipos de ensayos sensoriales más comúnmente usados, cada uno con diferente propósito y realizados por evaluadores seleccionados bajo distintos criterios (Lawless, y Heymann, 2010).

Tabla I. 2 Clasificación de los ensayos en la evaluación sensorial.

Clasificación	Pregunta de interés	Tipo de ensayo	Característica del panelista
Discriminación	¿Se perciben los productos diferentes de alguna forma?	Analítico	Seleccionados por agudeza sensorial, orientado a probar el método, algunas veces entrenado.
Descriptivo	¿Cómo los productos difieren en una característica sensorial específica?	Analítico	Seleccionados para agudeza sensorial y motivación, entrenados o altamente entrenados.
Afectivo	¿Qué tanto gusta un producto o cuál producto se prefiere?	Hedónico	Seleccionados por producto. No entrenados.

(Adaptado de Lawless y Heymann, 2010)

1.11.1.1 Pruebas de discriminación

Son métodos ampliamente usados para determinar si hay diferencia (o similitud) entre dos o más muestras que no presentan diferencias obvias y requieren ser investigadas.

Son rápidos y pueden ser realizados por asesores con o sin experiencia; sin embargo, el panel no debe estar conformado por una combinación de ambos (Kemp y col., 2009).

Uno de los ensayos clásicos en este grupo es el *Test de triángulo*, donde se enfrentan dos productos iguales y uno diferente; a los evaluadores se les pedirá seleccionar la muestra diferente. Otro ensayo de diferencia de selección múltiple es el *Duo-Trio*, en este caso una muestra de referencia es entregada junto a dos muestras para evaluar, siendo una de ellas igual a la referencia. Un tercer ensayo es el *ensayo de comparación pareada*, en el cual se les pide a los participantes que elijan cuál de los dos productos es más intenso para un atributo dado (Lawless y Heymann, 2010).

1.11.1.2 Pruebas descriptivas

Este conjunto de técnicas caracteriza las propiedades sensoriales de un producto, su intensidad y ocurrencia en el tiempo, pudiendo generar una descripción más precisa de un producto, a la vez de poder cuantificar diferencias sensoriales entre muestras (Kemp y col., 2009).

Stone y col., (2012) definieron estos métodos como “*Métodos que proporcionan una descripción cuantitativa de productos, obtenida desde las percepciones de sujetos calificados. Es una descripción sensorial completa, teniendo en cuenta todas las sensaciones que son percibidas (visuales, auditivas, olfatorias, cinestésicas, etc.) cuando el producto es evaluado*” (Stone y col., 2012; Stone H., 2015).

El método descriptivo de mayor aplicación es el Análisis Descriptivo Cuantitativo (QDA; *Quantitative Descriptive Analysis*) y está basado la habilidad que tienen los evaluadores para verbalizar las percepciones de un producto en forma confiable; incluye un procedimiento de entrenamiento formal, el desarrollo y uso de un lenguaje sensorial y la puntuación de productos en varias pruebas para obtener una descripción sensorial cuantitativa (Stone H., 1992).

Un método que requiere mayor entrenamiento y es usado cuando se quiere evaluar una sola muestra es el denominado **Spectrum**. La caracterización proporciona información sobre los atributos sensoriales percibidos y las intensidades de cada uno de ellos utilizando estándares para cada atributo. Las intensidades percibidas son registradas en escalas universales o absolutas, que permiten una comparación de intensidades relativas de diferentes atributos con un producto evaluado (Muñoz y Civille; 1992).

El propósito de este método es que los perfiles obtenidos sean entendidos y usados universalmente; proporciona atributos estándar (vocabulario), cada uno con un conjunto de estándares que definen una escala de intensidades, usualmente de 0 a 15, que puede ser medida con una escala lineal de 15 cm o registrando como números consecutivos (Meilgaard y col., 1991). El panel de **Spectrum** es entrenado en apariencia, aroma/fragancia, sabor y textura para la evaluación en cada modalidad; describiendo detalladamente cada atributo para un producto y sus intensidades (Muñoz y Civille; 1992). La selección de los atributos a medir no es realizada por consenso de los evaluadores, sino que ha sido previamente definida.

1.11.1.3 Pruebas afectivas

Las pruebas afectivas más comúnmente utilizadas son la hedónica que proporciona una medida de cuanto gusta y la de preferencia que determina cuál producto es preferido (Stone, 2015), aplicando para su medición la escala hedónica de 9-puntos y la comparación por pares, respectivamente (Stone, 2004).

Escala Hedónica:

Esta escala de 9-puntos (la más usada) es uno de los métodos sensoriales de mayor utilidad para medir la preferencia de un producto; es fácilmente entendida por los consumidores inexpertos con una instrucción mínima y los resultados son reproducibles con diferentes grupos de sujetos (Stone, 2004).

La escala hedónica asume que las preferencias de los consumidores existen como un continuo y que la preferencia puede ser categorizada por respuestas basadas en el gusto o disgusto (Lawless y Heymann, 2010). Este método tiene como ventaja que proporciona una indicación temprana y poco costosa acerca del potencial del producto; sin embargo, requiere un gran número de evaluadores (mayor a 75) y la respuesta obtenida es un juicio pasivo dado que el nivel de aceptabilidad no significa que haya intención de compra (Stone, 2015).

Atributos de diagnóstico:

La recopilación de información adicional sobre la percepción de los consumidores acerca de los atributos sensoriales permite esclarecer porqué les gusta o no un producto. Una de las herramientas comúnmente usadas para este fin es la escala JAR (Just about right) que combina juicios hedónicos y de intensidad; es de tipo bipolar con dos marcas opuestas (muy poco/demasiado) en los extremos y un punto central que permite estimar el punto óptimo de un atributo (Lawless y Heymann, 2010). Su desventaja es que la percepción de “Óptimo” varía para cada individuo (Kemp y col., 2009).

1.11.1.4 Métodos dinámicos

La percepción de la intensidad de los atributos sensoriales de los alimentos cambia a través del tiempo, la naturaleza dinámica de las sensaciones de los alimentos surge de los procesos de masticación, salivación, deglución y respiración (Lawless y Heymann, 2010).

La mayoría de las técnicas empleadas en la evaluación sensorial son mediciones estáticas, en las cuales se le exige al evaluador que integre la evolución de la sensación percibida y la resuma en un valor único; la información obtenida permite evaluar y caracterizar un determinado alimento en la mayoría de los casos (Galmarini, 2009). Sin embargo, algunos productos presentan modificaciones notorias en sus características en función del tiempo, siendo necesario el conocimiento de la cinética de aumento de la sensación, decrecimiento de la percepción y persistencia en el tiempo (Zamora y col., 1998).

Teniendo en cuenta la dinámica de la percepción, el método de Intensidad vs Tiempo (IT) fue desarrollado por Larson-Powers y Pangborn (1978) para medir la intensidad y duración de diferentes soluciones dulces, amargas, ácida y sabores; las sensaciones persistentes inducidas por los endulzantes (Ujikawa y Bolini; 2004), compuestos amargos (Pangborn y col., 1983), y compuestos trigeminales como el mentol (Gwartney y Heymann, 1996) han sido investigados usando esta técnica (Labbe y col., 2009). Estos métodos proporcionan la posibilidad a los evaluadores de calificar la sensación percibida a través del tiempo; la mayoría de las intensidades de las sensaciones percibidas aumenta y eventualmente algunas de estas disminuyen (Lawless y Heymann, 2010).

Cuando se hace un estudio IT se obtiene información detallada para una muestra en particular; incluyendo la intensidad máxima (I_{max}), el tiempo máximo en alcanzar I_{max} (t_{max}), el de duración total de la percepción (**DUR**), el tiempo en que la percepción decae en un 50% (t_{50max}), velocidad y forma del incremento de la intensidad hasta el punto máximo o pendiente de aumento de la intensidad (R_{inc}), la pendiente de decrecimiento de la misma (R_{dec}) y el área bajo la curva (**AUC**).

En la figura I.15 se ejemplifica una curva de Intensidad vs tiempo y los parámetros comúnmente usados.

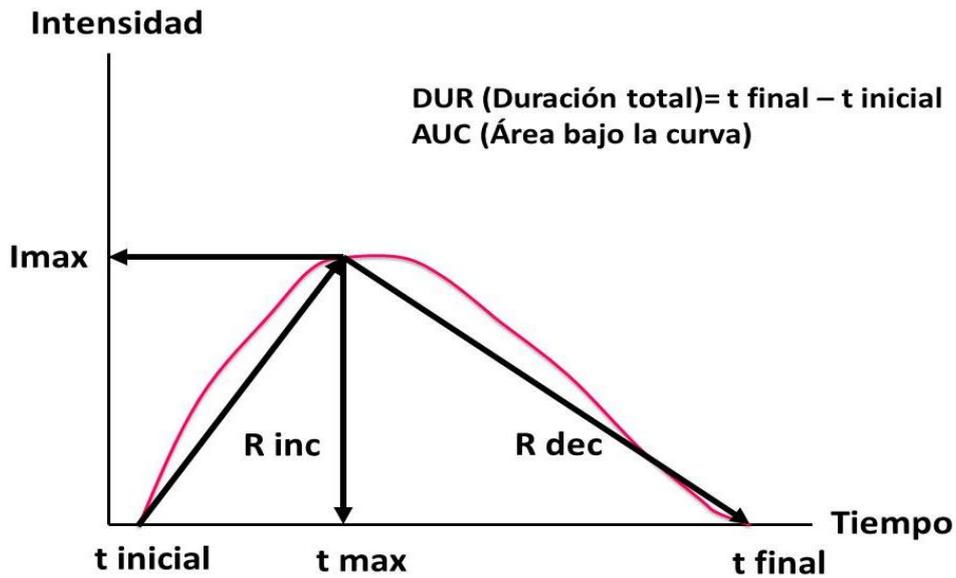


Figura I. 16 Ejemplo de una Curva de Intensidad vs tiempo (Adaptada de Lawless y Heymann, 2010).

La evaluación por la metodología IT está limitada a uno o dos atributos sensoriales al tiempo, por esta razón otras técnicas han sido propuestas (Labbe y col., 2009).

La metodología de Sensación Temporal Dominante (STD) fue desarrollada en el “*Centre des Sciences du Goût et de l’Alimentation*” en el laboratorio LIRIS en 1999 (Pineau y col., 2009). Estos estudios se realizan en un periodo de tiempo determinado, consisten en la identificación y en algunos casos la puntuación de la intensidad de las sensaciones percibidas como dominantes hasta que la percepción termina.

Los evaluadores deben seleccionar cual es el nuevo atributo dominante que perciben cuando cambia la sensación (Di Monaco y col., 2014). Se definió “**Dominante**” como la sensación que captura la mayor atención o la nueva

sensación que aparece a un tiempo dado, sin ser necesariamente la más intensa (Labbe y col, 2009; Pineau y col, 2009; Di Monaco y col, 2014).

El método de STD hace posible obtener información temporal para más de 10 atributos durante una evaluación; por encima de este límite es difícil para el evaluador mantener en mente todos los atributos simultáneamente durante la evaluación (Pineau y col, 2009).

Pineau y col., (2009) observaron que el tiempo necesario para familiarizar al panelista con el procedimiento de STD fue de tres sesiones.

En el cálculo de las curvas de STD se considera cada atributo por separado; para cada valor de tiempo se registra la proporción de la corrida (*Evaluador*replicado*) correspondiente al atributo elegido como dominante (Pineau y col., 2009). Estas proporciones son suavizadas y graficadas en función del tiempo para obtener las curvas STD (Figura I.16).

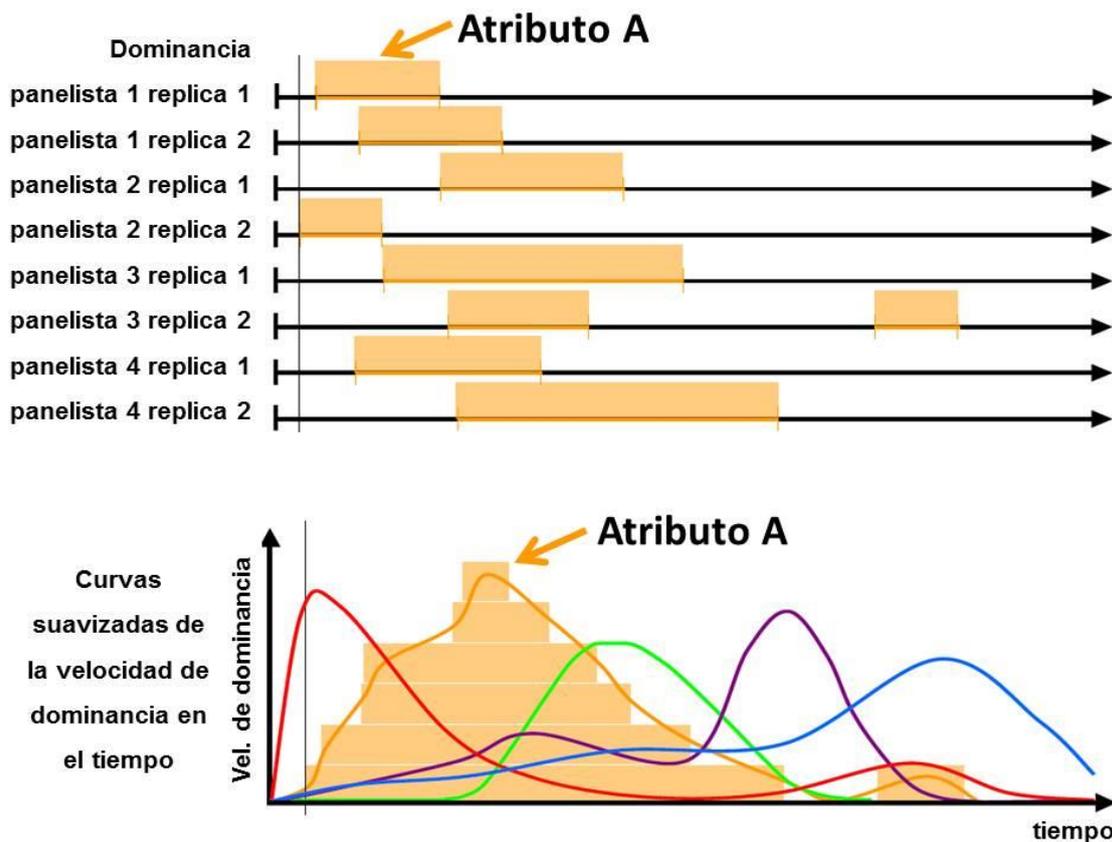


Figura I. 17 Ejemplo de metodología para cuantificar curvas STD. (Adaptado de Schlic, 2012; Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation).

La superposición de las curvas SDT de todos los atributos de un producto determinado, corresponde a la representación del perfil de STD de dicho producto (Schlic, 2012).

1.12 Objetivo General

Un análisis general acerca de las tendencias del mercado de bebidas en los últimos años, marca un cambio en las preferencias del consumidor hacia productos no alcohólicos, naturales y saludables, con aromas y sabores innovadores.

Las infusiones de Yerba mate y los jugos de frutas como Cassis contienen altos niveles de polifenoles, flavonoides, vitamina C y antocianinas que proporcionan beneficios para la salud y por consiguiente podrían ser utilizados como ingredientes en la elaboración de bebidas con propiedades funcionales.

El objetivo de este proyecto es desarrollar una bebida instantánea saludable de alta palatabilidad a partir de infusiones de Yerba mate y Cassis de manera de que las ventajas nutricionales de estos ingredientes lleguen a un gran número de consumidores.

Para cumplir con el objetivo propuesto se desarrollaron diferentes formulaciones y se evaluaron sus características sensoriales y fisicoquímicas, en la figura I.17 se presenta el esquema guía de las etapas desarrolladas durante este estudio.

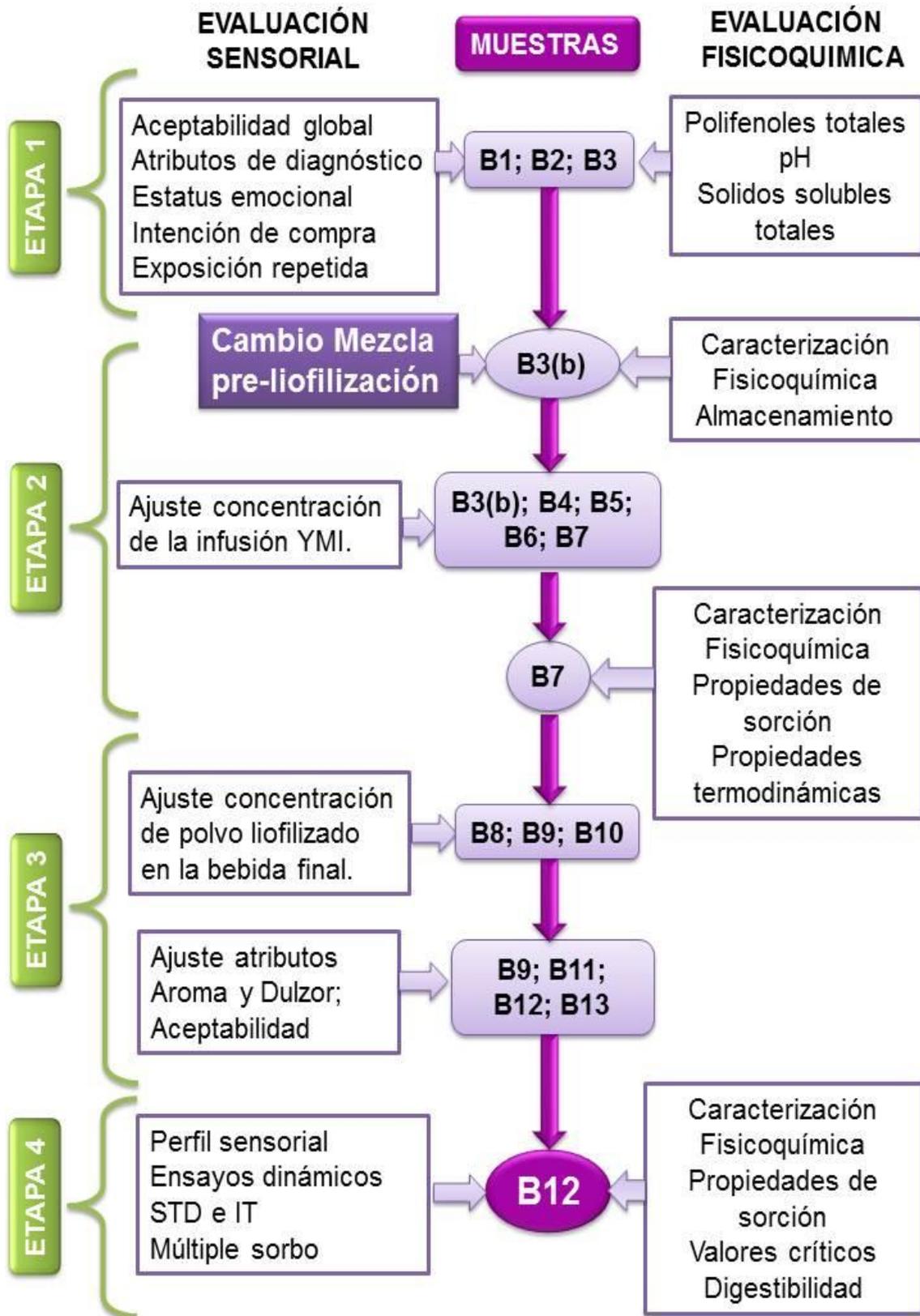


Figura I. 18 Esquema de evaluación sensorial y fisicoquímico; y selección de la bebida en polvo a base de Yerba mate y Cassis.



Capítulo II

Obtención de bebidas en polvo Análisis sensorial



2.1 Introducción

La Yerba mate y el Cassis son considerados fuentes de compuestos bioactivos como los polifenoles, antocianinas, ácido ascórbico, entre otros; los potenciales beneficios para la salud de dichos compuestos han impulsado nuevos desarrollos en la industria alimentaria, aumentando la demanda de productos con alta palatabilidad, requisito crítico para cualquier alimento con alto contenido de polifenoles.

El sabor amargo de la infusión de Yerba mate y la sensación de astringencia provocan una reacción negativa en el consumidor cuando se percibe a altas intensidades (Jaeger y col., 2009; Lesschaeve y Noble, 2005). La intensidad percibida de ambos atributos aumenta con el contenido del material herbáceo presente en la infusión (Calviño y col., 2012).

A pesar del gran valor nutricional del Cassis, su consumo se dificulta por las altas intensidades de los atributos acidez y astringencia. Tanto los ácidos orgánicos como la relación entre el azúcar y los componentes ácidos afecta la intensidad de acidez; otros compuestos como algunos glucósidos de flavonol (Kaempferol-3-O-(6"-manlonyl) glucósido; Miricetina-3-O-galactosido y un glucósido de kaempferol desconocido) contribuyen a la intensidad de la astringencia (Samdell y col., 2009). Otros compuestos presentes en el Cassis son las antocianinas, responsables del intenso color morado característico del fruto; sin embargo, son inestables y altamente susceptibles a la degradación (Määttä y col., 2001; Slimestad y Solheim, 2002).

En los estudios de calificación con consumidores es importante identificar las propiedades que mejoran la aceptabilidad para una futura optimización del producto. La escala de punto justo (JAR) puede ser aplicada para obtener información acerca de atributos específicos (dulzor, acidez, amargor, astringencia, etc.), brindando una idea de la porción de consumidores que perciben una muestra de cierto modo y permite la determinación de la intensidad de un atributo considerado ideal para un producto dado (Costell y col., 2010).

Otros autores han indicado que la escala JAR puede ser usada junto con la escala hedónica en pruebas de consumidores para proporcionar información para la optimización de alimentos (Gacula y col., 2008; Xiong y Meullenet, 2006). Sin embargo, tiene algunas limitaciones porque los consumidores no están entrenados para describir propiedades sensoriales y pueden asignar la misma palabra para diferentes significados. El uso de esta escala asume que todos los consumidores entienden a qué se refiere el atributo citado. En otras palabras los consumidores deben de conocer o tener idea del atributo en cuestión (Lawless y Heymann, 2010). Por esta razón en este estudio la escala JAR fue usada combinándola con la definición exacta del atributo para aumentar la comprensión.

La exposición repetida puede incrementar la preferencia por un alimento en particular (Lesschaeve y Noble, 2005). Stein y col., (2003) reportaron que un cambio positivo se presentó después de la exposición a una bebida agridulce por 7 días y este proceso puede facilitarse por un gusto apetecible como el dulzor.

El poder de la exposición repetida para cambiar las preferencias de los niños por algunos alimentos fue establecida por (Cooke y col., 2007), hay poca información en la literatura sobre la influencia de la repetición en la intención de compra.

Las expectativas de los consumidores para un nuevo alimento o bebida pueden ser también exploradas teniendo en cuenta las emociones que estos productos generan. Es generalmente conocido que las elecciones de alimentación humana son afectadas y asociadas a las emociones (Desmet y Schifferstein, 2008; Hanoch y col., 2007). Manzocco y col., (2013) estudiaron la respuesta emocional a ensaladas de fruta con diferentes niveles de calidad visual analizando el pardeamiento de la fruta, contenido microbiano, y aceptabilidad global visual. Las ensaladas de fruta más desagradables cambiaron el estado emocional de los participantes, que se sintieron menos tranquilos, amigables y mientras más agresivos, tristes y disgustados en la presencia de ensaladas podridas.

Diferentes procesos involucrados en la descomposición de los alimentos como la masticación, salivación, movimientos de la lengua, y la deglución están relacionados con la naturaleza dinámica de las sensaciones percibidas durante el consumo de los alimentos (Lawless y Heymann 2010). Algunos estudios han reportado que pequeñas diferencias en el perfil sensorial de un producto solo se observan después de degustaciones repetidas (Zorn y col., 2014).

Las metodologías dinámicas como los ensayos Intensidad-tiempo (IT) permiten identificar la percepción sensorial de la intensidad para atributo específico y el monitoreo de los cambios en dicha percepción durante la evaluación de un producto determinado (Lee y Pangborn, 1986; Pineau y col.,

2009; Lawless y Heymann 2010; Cadena y Bolini, 2011); ha sido aplicada en una gran variedad de productos como bebidas (Larson-Powers y Pangborn, 1978; François y col., 2006; Le Révérend y col., 2007) goma de mascar (McGowan y Lee, 2006; Galmarini y col., 2015), helados de vainilla (Cadena y col., 2010), endulzantes (Zamora y col., 1998; Calviño y col., 2000).

Otra metodología dinámica reciente es el análisis de la Sensación Temporal Dominante (STD), que permite evaluar simultáneamente varios atributos en un tiempo dado y obtener la secuencia de las sensaciones, permitiendo establecer la dinámica de la percepción tras consumir un producto (Le Révérend y col., 2007; Labbe y col., 2009).

Ha sido aplicada en el estudio de los perfiles dinámicos de bebidas a base de frutas como el Cassis (Ng y col., 2012) y de naranja endulzadas con diferentes tipos de edulcorantes (Zorn y col., 2014).

Durante este trabajo se realizaron diferentes etapas, la primera de estas incluyó la evaluación de la aceptabilidad, atributos de diagnóstico e intención de compra de diferentes formulaciones de una nueva bebida en polvo. Se analizó el efecto de la exposición repetida, basado en la hipótesis de que el consumo repetido puede contribuir a una calificación más positiva de la bebida y a un aumento en la intención de compra.

Una aproximación preliminar fue realizada para correlacionar los niveles de aceptabilidad de la nueva bebida con la identificación de los consumidores de su estado emocional en relación a la exposición repetida.

En una etapa posterior, se aplicaron diferentes metodologías sensoriales para lograr los ajustes en la formulación para satisfacer los requerimientos del consumidor, mejorando la aceptabilidad y optimizando los atributos sensoriales. Finalizando con la caracterización sensorial de la bebida en polvo, por medio de técnicas de cuantificación estáticas, perfiles dinámicos y el análisis del efecto de la ingesta múltiple sobre su aceptabilidad simulando condiciones de un consumo habitual.

2.2 Objetivos específicos

- I. Seleccionar el tipo de fruta, formulación y liofilización de bebidas en polvo.
- II. Determinar del nivel de aceptabilidad global, el punto óptimo para los atributos y la intención de compra de una nueva bebida en polvo a base de Yerba mate y Cassis con propiedades saludables y alta palatabilidad.
- III. Medir el efecto de la exposición repetida sobre la aceptabilidad y la percepción de los atributos de las bebidas. La hipótesis planteada fue si la ingesta repetida podía contribuir a una evaluación más positiva de la bebida incrementando la intención de compra.
- IV. Determinar qué atributos contribuyen en mayor medida al gusto/disgusto del consumidor provocando un cambio emocional evocado después de haber probado la bebida.
- V. Evaluar la actitud de los consumidores frente a un producto novedoso teniendo en cuenta la edad de los participantes.
- VI. Determinar la concentración ideal de la infusión de yerba usada en la formulación de bebidas en polvo.
- VII. Ajustar la concentración de polvo liofilizado en la formulación de bebidas en polvo; mejorar los atributos de aroma y dulzor por medio del agregado de aromas en polvo y edulcorante.
- VIII. Analizar el perfil sensorial del producto final; determinar el perfil dinámico del producto final usando la metodología “Sensación Temporal Dominante” (STD); estudiar el efecto de la múltiple ingesta sobre la aceptabilidad usando la metodología dinámica “Intensidad vs Tiempo”.

2.3 Materiales y métodos**2.3.1 Selección de la fruta y del aromatizante (ensayos preliminares):**

Para seleccionar la fruta a utilizar se consideraron (a) sabores ya utilizados por los consumidores en la elaboración del “terere” tales como: pomelo rosado, o mezclas de naranja-banana-frutilla y (b) otras con sabores no convencionales (arándano, cassis y sauco) de manera de obtener productos novedosos que permitan aumentar las posibilidades de comercialización de la Yerba mate.

Se preparó una infusión de Yerba mate comercial (120 g/L I. paraguariensis, St. Hil; La Unión Suave, Argentina) mediante calentamiento a 100°C durante 15 min. Luego de un periodo de decantación (15 min, 25°C) el sobrenadante filtrado se mezcló con uno de los siguientes jugos de fruta comerciales en una relación 1:1:

- a) Pomelo rosado (2 g/ 0.1L)
- b) Naranja-Banana-Frutilla (2.5 g/ 0.1L)
- c) Jugo de Arándano sin diluir
- d) Jugo de Cassis (54 g / 0.1L)
- e) Jugo de Sauco (54 g / 0.1L)

Se realizó una evaluación preliminar con el fin de analizar las mezclas y descartar las que provocaran algún nivel de rechazo en los atributos de color, textura, viscosidad, sabor y aroma. La evaluación se llevó a cabo con un panel de 20 participante no entrenados.

Los resultados indicaron que, aunque el color de la bebida preparada con una mezcla de naranja/banana/frutilla era bueno, tenía poco cuerpo (viscosidad) y el predominio del sabor de la infusión de Yerba mate era excesivo. Las combinaciones con jugo de pomelo se descartaron porque el color fue rechazado por los evaluadores.

Las mezclas preparadas con jugo de Arándano (c), de Cassis (d) o de Sauco (e), se caracterizaron por tener muy buen aspecto y un color llamativo, que enmascaró el tono de la infusión de Yerba mate. Sin embargo, los productos elaborados con (c) y (e) resultaron insípidos y de bajo dulzor. En base a estos resultados se concluyó que el Cassis era la mejor materia prima para el desarrollo de las bebidas en polvo.

Para definir un aroma que complementara la formulación de las bebidas, la combinación de la infusión de Yerba mate y Cassis se mezcló con aromas comerciales (Lavanda, Menta y fruto tropical; 0.01% v/v). El análisis sensorial del sabor y aroma de estas mezclas indicó que los mejores puntajes correspondieron a bebidas de Yerba mate/Cassis aromatizadas con “Frutos tropical ” seguido por aquellas conteniendo “Lavanda” mientras que las bebidas aromatizadas con Menta presentaron los niveles más bajos.

2.3.2 Elaboración de la bebida en base a Yerba mate/ Cassis**2.3.2.1 Materias primas:**

Cassis (*Ribes Nigrum*): Para la preparación de las bebidas se utilizó Cassis producido en condiciones orgánicas (**Cs**; *Ribes nigrum* cv. Silvergieter) proveniente de Chacras Cuyen, El Bolsón, Chubut, Argentina, cosechada en enero de 2012 almacenadas a -20°C por 270 días. La fruta fue descongelada 24 h antes de la preparación de la bebida y procesada en una pulpera industrial (Filtro con diámetro de poro: 2mm).

Yerba mate (*Ilex paraguariensis*, *St. Hil.*): Las infusiones de Yerba mate (**YMI**; se prepararon calentando distintas concentraciones de hojas (La Unión Suave, Argentina) a 100°C durante 15 min. El sobrenadante se decantó por 15 min a 25°C, filtró y almacenó a 4°C hasta la preparación de las mezclas (el mismo día).

Otros ingredientes: Se usó Maltodextrina dextrosa equivalente 10 (MD DE₁₀; Productos de Maíz, Buenos Aires, Argentina) como coadyuvante de la liofilización, azúcar comercial (LEDESMA, Argentina); edulcorante artificial (HILERET Clásico; ciclamato 5700 mg/100 g; sacarina 2000 mg/100 g); aromas comerciales fruto tropical y frutos rojos (Firmenich, Argentina).

2.3.3 Etapa 1: Evaluación de la aceptabilidad de un nuevo producto y el efecto de la exposición repetida

Aunque consumir infusiones de Yerba mate es un hábito en Argentina, su combinación con Cassis no se encuentra actualmente en el mercado. Por este motivo para obtener una bebida en polvo con buena palatabilidad a partir de esa combinación fue necesario realizar un desarrollo en varias etapas.

Este estudio se inició evaluando la relación óptima entre las materias primas YMI/Cs por medio de un análisis sensorial. Debido a que el producto a desarrollar es innovador en el mercado, se evaluó la aceptabilidad global, los atributos de diagnóstico, la intención de compra y el impacto sobre el estatus emocional de los consumidores. Además, se investigó el efecto del consumo repetido (exposición repetida) sobre la aceptabilidad del producto.

2.3.3.1 Determinación de la relación de los componentes (YMI/Cs)

Para seleccionar la relación de YMI/Cs se consideró que esta era una bebida a base de Yerba mate con agregado de Cassis. Por lo tanto, YMI era el ingrediente principal y la cantidad de Cs incorporada estaba limitada por su bajo pH que imparte una acidez excesiva en el producto.

La suma de los dos componentes (base húmeda) tenía que ser 80% ya que el 20% restante corresponde a la Maltodextrina (MD DE₁₀) usada como coadyuvante para la liofilización, aroma, azúcar y edulcorante.

En la figura 1 se presenta el diagrama de obtención de las bebidas en polvo a base de infusiones de Yerba mate (120 g/L) y pulpa de Cassis (B1, B2 y B3). Los rangos usados para las mezclas de YMI/Cs fueron de 50-70% y de 30-10% para YMI y Cs respectivamente.

La combinación 70:10 fue descartada debido a su baja viscosidad y su color verde-café que resultó poco atractivo durante los ensayos preliminares. Los consumidores percibieron la bebida como un jugo en función de su viscosidad y color. Las proporciones YMI/Cs (% p/v) de las mezclas fueron: M1= 50/30, M2= 60/20, M3= 60/20. El nivel de azúcar de M1 y M2 fue 5% p/v, en el caso de M3 se utilizó 4.95% p/v de azúcar y 0.05% p/v de edulcorante comercial. Todas las muestras tenían 15% de MD DE₁₀ y 0.01% v/v de aroma comercial fruto tropical (Figura 1).

2.3.3.1.1 Liofilización:

Las muestras M1, M2 y M3 se congelaron 24 horas a -20°C antes de ser liofilizadas a temperatura ambiente en un equipo liofilizador FIC L1-1-E300-CRT (Buenos Aires, Argentina) operado a -35 °C y vacío por debajo de 100µm. Los polvos obtenidos (B1, B2 y B3) se envasaron en películas de poliamida/polietileno (70 µm) y se almacenaron a -18°C hasta su uso (Figura 1).

Este mismo protocolo de liofilización se utilizó para obtener todas las bebidas en polvo durante este estudio. Para calcular el rendimiento de liofilización (%R), se usó la siguiente expresión:

$$\%R = \left[\frac{P_l}{P_m} \right] * 100 \quad \text{Ec. 1.}$$

Donde, P_l es el peso del polvo liofilizado (g) obtenido a partir de 100 mL de muestra y P_m es el peso de 100 mL de muestra (g).

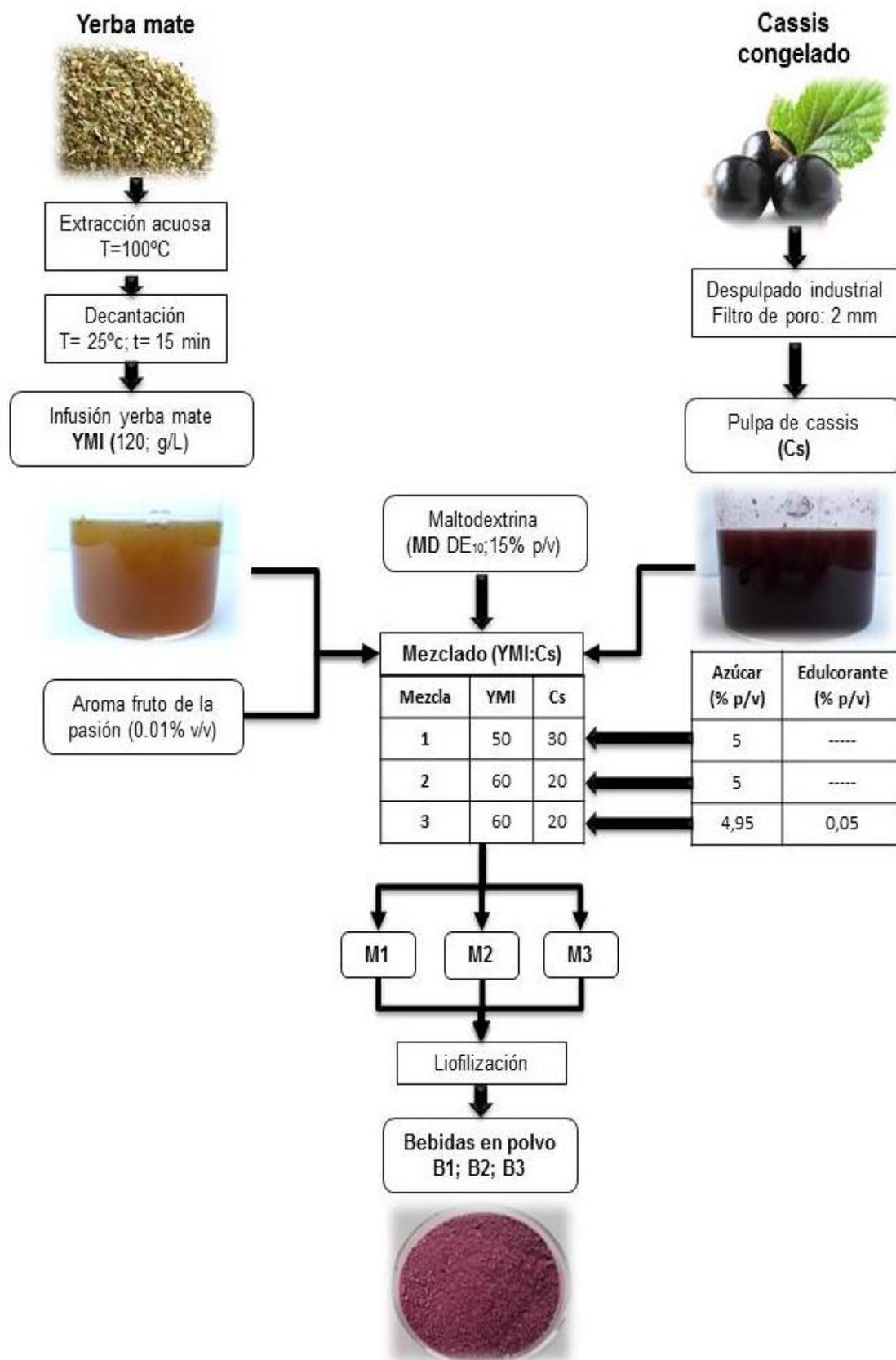


Figura 1. Diagrama de proceso de obtención de las bebidas en polvo a base de Yerba mate y Cassis (B1, B2, B3).

2.3.3.2 Discriminación sensorial entre muestras

Las pruebas de discriminación son fundamentales antes de un ensayo con consumidores. De tal manera, que sólo sean evaluadas las formulaciones que se perciben sensorialmente diferentes (Lawless y Heymann, 2010).

2.3.3.2.1 Test del triángulo - Caracterización de la diferencia

Con el propósito de determinar si las muestras se percibían diferentes y poder identificar la causa de esas diferencias, se aplicó el **Test del triángulo con caracterización de la diferencia** según la descripción de ASTM (1977). Este método combina el método básico del triángulo con técnicas de caracterización sensorial que pueden proporcionar información sobre la naturaleza de las diferencias encontradas. El método consiste en presentar las tres muestras codificadas indicando que dos de ellas son iguales y una diferente. Los evaluadores, además de elegir la muestra diferente, tienen que seleccionar los atributos que percibieron distintos a partir de una lista de descriptores sensoriales que caracterizan el producto a evaluar.

Procedimiento

Este estudio se realizó con un panel de 30 personas no entrenadas (10 hombres y 20 mujeres; 20-23 años de edad; estudiantes de Ingeniería de Alimentos de la Facultad de Ciencias Agrarias, Pontificia Universidad Católica Argentina, UCA). Se presentaban las tres muestras (B1, B2 y B3) y una lista de características sensoriales con su correspondiente definición (tabla 1).

Tabla 1. Definiciones de los atributos usados para el Test del triángulo -
Caracterización de la diferencia.

Atributo	Definición
<i>Acidez</i>	Sensación de gusto estimulada por el contenido de ácidos en frutas cítricas como el limón.
<i>Dulzor</i>	Sensación dulce estimulada por azúcares como sacarosa y otras sustancias edulcorantes (sacarina).
<i>Astringencia</i>	Sensaciones de contracción, arrugamiento, secado, y aspereza de la mucosa bucal provocadas por la precipitación de las proteínas de la saliva al combinarse con los compuestos fenólicos presentes en infusiones de té, mate y el vino.
<i>Aroma nasal</i>	Olor percibido por olfateo de la muestra.
<i>Cuerpo/Viscosidad</i>	Consistencia, peso o densidad percibida al colocar la muestra en la boca.

La tarea consistía en elegir la muestra diferente y seleccionar los atributos que caracterizaban la diferencia. Cada evaluador realizó tres triángulos por duplicado, enjuagándose la boca entre triángulos. Las evaluaciones se realizaron en cabinas individuales con iluminación de luz blanca (6500 K; figura. 2).

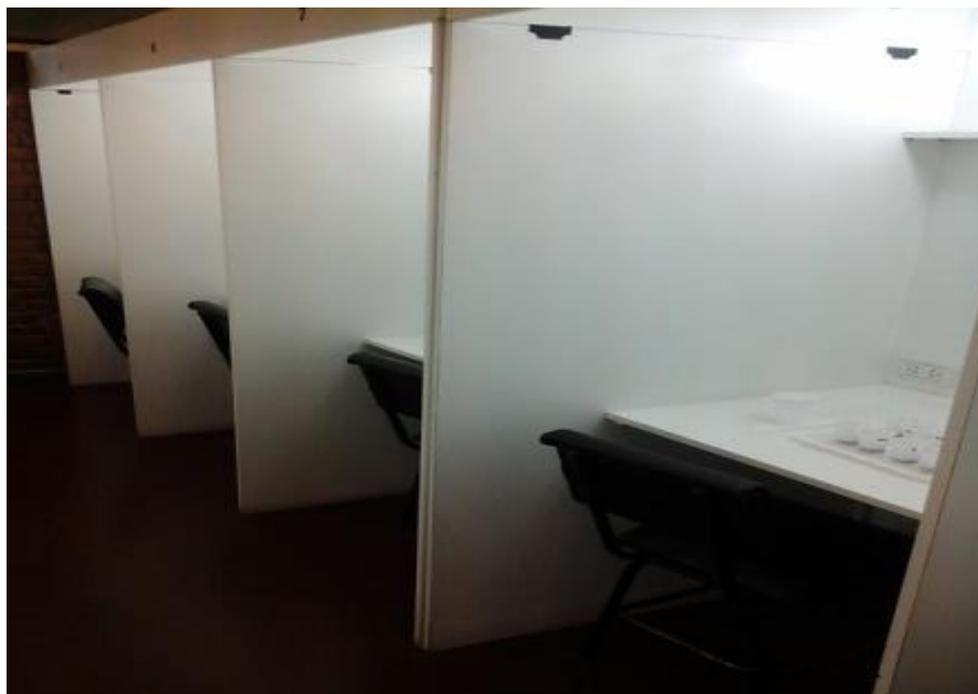


Figura 2. Cabinas individuales para evaluaciones sensoriales. Laboratorio de análisis sensorial de alimentos, Facultad de Ciencias Agrarias, UCA.

2.3.3.3 Pruebas hedónicas - Estatus emocional - Exposición repetida

Diferentes metodologías en análisis sensorial son usadas con el fin de evaluar la aceptabilidad y preferencia de los consumidores, siendo la escala hedónica una de las más conocidas (Lawless y Heymann, 2010).

2.3.3.3.1 Escala Hedónica de 9-puntos

En la **escala Hedónica de 9-puntos** se usan las palabras “Gusta” y “Disgusta” modificadas por los adverbios *ligeramente*, *moderadamente*, *muchísimo* y *extremadamente*, para indicar los grados de aumento de la respuesta. El punto central “*Me es indiferente*”, es el punto neutro que marca la inflexión de la respuesta (Lawless y Heymann, 2010). Un ejemplo de este tipo de escala se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Escala Hedónica de 9-puntos para evaluar agrado o desagrado.

<i>Me gusta extremadamente</i>	9
<i>Me gusta mucho</i>	8
<i>Me gusta moderadamente</i>	7
<i>Me gusta ligeramente</i>	6
<i>Me es indiferente</i>	5
<i>Me disgusta ligeramente</i>	4
<i>Me disgusta moderadamente</i>	3
<i>Me disgusta mucho</i>	2
<i>Me disgusta extremadamente</i>	1

2.3.3.3.2 La Escala de punto justo (JAR: *Just about right*)

La escala de punto justo o punto óptimo se usa generalmente en las etapas iniciales del desarrollo de un producto, con el fin de optimizar los niveles de ingredientes claves como por ej. el azúcar (Lawless, 2013).

Esta escala tiene dos marcas semánticamente opuestas (ej. Demasiado dulce/Poco dulce) y un punto central que corresponde al punto justo o nivel ideal del atributo para cada consumidor (Lawless, 2013).

La definición de un producto ideal tiene dos componentes: uno relacionado con la percepción sensorial (ej. el ideal usado como referencia) y otro con la connotación hedónica (ej. el ideal como el producto más satisfactorio) (Varela y Ares, 2014). En esta escala, el consumidor califica la intensidad de cada atributo para un determinado producto, indicando si es poco, ideal o demasiado intenso comparado con su concepto de intensidad ideal (Varela y Ares, 2014).

A partir de los resultados obtenidos se puede modificar la intensidad de algún atributo, aumentando su nivel si es percibido como “Muy poco” o disminuirlo si es percibido como “Muy intenso”, siendo reconocida como una herramienta direccional (Moskowitz, 2004).

La escala JAR asume que todos los consumidores comprenden las características del atributo a evaluar; por esta razón, en este trabajo se utilizó combinada con una lista de las definiciones de los atributos (Tabla 1) a fin de aumentar el consenso entre los consumidores.

2.3.3.3 Intención de compra

La evaluación de la intención de compra permite entrever la posibilidad de que el producto sea adoptado por el consumidor conociendo cuál sería su decisión luego de probar la muestra (Hussain y col., 2011).

La elección de un producto depende de su capacidad para suscitar consecuencias deseables en el consumidor. Los atributos de un producto no son relevantes por sí mismos, sino sólo en la medida en que generen en el consumidor deseos de volver o no a consumirlo.

Krutulyte y col., (2011) demostraron que los consumidores están más interesados en la compra de alimentos enriquecidos donde la combinación de ingredientes parezca más natural que artificial.

La estrategia de proporcionar información relacionada con la salud puede contribuir a una evaluación más positiva de algunos productos, particularmente en relación con la intención de compra (Casati y col., 2012;

Tuorila y Cardello, 2002). La medición de la intención de compra de las bebidas en polvo se realizó empleando una escala de intervalos de 5-puntos (tabla 3).

Tabla 3. Escala de 5-puntos para evaluar intención de compra.

<i>Seguramente lo compraría</i>	5
<i>Probablemente lo compraría</i>	4
<i>Tal vez si, tal vez no lo compraría</i>	3
<i>Probablemente no lo compraría</i>	2
<i>Seguramente no lo compraría</i>	1

La medida tuvo un carácter orientativo, debido a que no representó una situación real de compra para los consumidores, ya que no existe una bebida similar en el mercado para comparar precios, empaque y lugar de compra.

2.3.3.3.4 Estatus emocional

Las expectativas de los consumidores frente a nuevos alimentos o bebidas pueden ser exploradas teniendo en cuenta las emociones que estos generan (Desmet y Schifferstein, 2008; Hanoch, y col., 2007).

Una emoción es cualquier evaluación a corto plazo, afectiva, intencional, psicológica, incluyendo la felicidad, tristeza, disgusto y otros sentimientos internos; mientras que el estatus emocional o estado de ánimo, es un estado afectivo generalizado temporal pero relativamente prolongado (Edwards y col., 2013; Gibson, 2006).

Las emociones pueden ser observadas en dos dimensiones: como positivas versus negativas, y placentero versus no placentero (King y Meiselman, 2010).

Desmet y Schifferstein (2008) y King y Meiselman (2010) mostraron que los consumidores califican sus experiencias con alimentos con emociones positivas más que con negativas. Esto se atribuye a la disposición afectiva positiva hacia la degustación de comida y al hecho de que los productos alimenticios están diseñados para atraer a los consumidores.

2.3.3.3.5 Influencia de la exposición repetida

El consumo repetido de un alimento puede aumentar su nivel de preferencia (Lesschaeve y Noble, 2005). Stein y col., (2003) obtuvieron un incremento en el nivel de aceptabilidad después de siete días de exposición a bebidas agrídulces, y que este proceso podía ser facilitado por modificadores de la palatabilidad como endulzantes.

En este estudio se realizó una aproximación preliminar para correlacionar el nivel de aceptabilidad con la identificación del estatus emocional y la exposición repetida.

2.3.3.3.6 Diseño sensorial

Se evaluó la aceptabilidad global, los atributos de diagnóstico, la intención de compra y estatus emocional de las bebidas en polvo B1, B2 y B3, a través de cuatro sesiones (Se), tomándose la primera sesión como control.

Preparación y presentación de muestras:

Las formulaciones de bebidas en polvo B1, B2 y B3 se reconstituyeron a su peso original con agua potable (180 g/L) y acondicionaron a una temperatura final de 10°C. Las bebidas (10 mL) se sirvieron en vasos plásticos de 5 cm de diámetro, codificados con combinaciones de tres dígitos al azar y presentados a los participantes en orden aleatorio por sujeto y sesión. Adicionalmente, se proporcionó agua mineral para enjuagarse la boca entre muestras.

Participantes:

Cien participantes (70 mujeres, 30 hombres) con edades entre 25 y 63 (M= 38.1, SD=10.9) de la facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de la Plata y el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de los Alimentos (CIDCA), La Plata, Argentina, participaron voluntariamente en el experimento.

Se informó a los consumidores de que *“La nueva bebida saludable contenía un alto nivel de compuestos con capacidad antioxidante”* y de sus beneficios para mantener la buena salud.

Esta información pretendía promover una sensación de bienestar físico y mental sin connotaciones medicinales (Stein y col., 2003). Los participantes informaron cuál era su frecuencia de consumo de jugos de fruta y Yerba mate, y cuán importante era para ellos incluir bebidas saludables en su dieta.

Aunque todos los participantes consumían infusiones de Yerba mate diariamente y jugo de fruta una vez por semana, los de mayor edad mostraron mayor interés por las bebidas saludables.

Procedimiento

Las determinaciones se hicieron durante cuatro semanas consecutivas y en cada sesión todos los participantes evaluaron las muestras utilizando una planilla individual para cada muestra (ANEXO A1), sin el conocimiento de que las tres bebidas eran las mismas en cada sesión. Los participantes evaluaron secuencialmente las bebidas **B1, B2 y B3** con el siguiente procedimiento:

- a) Grado de aceptabilidad global utilizando una escala hedónica de 9-puntos, donde los extremos y el punto neural corresponden a “me disgusta mucho” (1), “me gusta mucho” (9), y “ni me gusta ni me disgusta” (5).
- b) Atributos de diagnóstico (acidez, dulzor, astringencia, aroma y viscosidad/cuerpo) (Tabla 1) con una escala de punto justo (JAR), con marcas en ambos extremos: +4= demasiado y -4= muy poco, y un punto central (0, óptimo).
- c) Intención de compra utilizando una escala de 5-puntos partiendo de “Ciertamente no lo compraría” (1) a “ciertamente lo compraría” (5).
- d) Descripción del estatus emocional después de probar las muestras: seleccionar al menos tres términos de una lista de 12 palabras (*bienestar, disgusto, familiaridad, tristeza, miedo, fresca, angustia, simpleza, relax, enojo, alegría y sorpresa*). La palabra bienestar fue seleccionada por que está relacionada con la salud y su definición contiene varios términos usados por King y Meiselman (2010) para describir las emociones relacionadas con alimentos (activo, energético, bueno, feliz, interesante, satisfecho y seguro).

- e) Los otros términos fueron relacionados con emociones básicas y con las principales características de las bebidas.

El orden de las palabras fue el mismo para todos los participantes, a quienes se les pidió indicar como se sentían después de consumir las muestras. La medida se llevó a cabo al final de la evaluación de aceptabilidad global, diagnóstico de atributos e intención de compra.

2.3.4 Etapa 2: Ajuste del atributo de diagnóstico Astringencia (Selección de la concentración de Yerba mate en la infusión (YMI))

Dado que la astringencia puede provocar reacciones negativas en los consumidores cuando se percibe a intensidades altas, se buscó disminuir esta sensación analizando el efecto de la concentración de Yerba mate en la aceptabilidad y el perfil de atributos de la bebida (Calviño y col., 2012).

Para mejorar la calidad del polvo liofilizado obtenido en la etapa anterior, se decidió liofilizar la mezcla de las infusiones de Yerba mate y la pulpa de Cassis (YMI/Cs) con la adición de 15% (p/v) de MD₁₀ y de aroma (FT; 0.01% v/v) e incorporar el azúcar y edulcorante al polvo liofilizado.

Este cambio permitió obtener productos con mejores características físicas, fácil manipulación y flexibilidad para modificar las formulaciones. En el caso de B4, B5 y B6 las muestras se utilizaron sin liofilizar en estudios sensoriales comparativos. En la tabla 4 se muestran las formulaciones.

Tabla 4. Modificaciones realizadas en la formulación de la bebida en polvo a base de Yerba mate y Cassis.

	Liofilizado	Concentración de la infusión YMI [g/L]	Reconstitución (%) [*]	Sacarosa (% p/v) ^{**}	Edulcorante (% p/v) ^{**}
B3(b)	SI	120	18	4.95	0.05
B4	NO	120	-----	4.95	0.05
B5	NO	90	-----	4.95	0.05
B6	NO	60	-----	4.95	0.05
B7	SI	60	18	4.95	0.05

* g de polvo YM/Cs liofilizado/ 100mL.

** g de azúcar:edulcorante/ 100 mL YMI/Cs reconstituido.

2.3.4.1 Agrupamiento con descripción

Los métodos de agrupamiento (Sorting Task) son un procedimiento simple para la recolección de información, en los cuales los asesores agrupan las muestras que se perciben en forma similar. Se basan en el proceso cognitivo natural de clasificación usado en la vida diaria, que no requieren una respuesta cuantitativa (Chollet y col., 2011). Para realizar el ajuste del atributo diagnóstico “Astringencia”, se aplicó el método de agrupamiento con descripción (Sorting task with description); los participantes reciben una serie de muestras y se les pide que las agrupen de acuerdo a características que posean en común formando diferentes grupos (Lawless y Heymann, 2010).

Procedimiento

Cuarenta estudiantes (24 mujeres, 16 hombres; entre 23 y 30 años) de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de la Plata participaron del estudio. Se les presentaban cinco muestras por duplicado: B3(b) ([YMI]= 120 g/L liofilizada); B4 ([YMI]= 120 g/L sin liofilizar); B5 ([YMI]= 90g/L sin liofilizar); B6 ([YMI]= 60 g/L; sin liofilizar) y B7 ([YMI]= 60 g/L liofilizada) (véase tabla 4). La tarea consistió en agrupar las muestras según alguna característica que tuvieran en común (ANEXO A3). Para esto se les proporcionó una lista de descriptores con su definición (tabla 5).

Tabla 5. Lista de descriptores y su definición usada durante el ensayo de agrupamiento.

Descriptor	Definición
Acidez	Sensación producida por soluciones acuosas de sustancias ácidas como el ácido cítrico.
Amargor	Sensación producida por soluciones acuosas de sustancias como la cafeína.
Dulzor	Sensación producida por soluciones acuosas de azúcares como la sacarosa.
Astringencia	Combinación de sensaciones como contracción, sequedad y aspereza en la boca.
Frutos rojos	Asociado al Arándano, Cassis, Moras.
Cítrico	Asociado a una impresión general a frutos cítricos.
Compota	Asociado a frutas cocidas.
Especiado	Asociado a especias (vainilla, anís, clavo, canela, pimienta).
Frutal	Asociado a frutas como melón, pera, manzana. No cítrico.
Fruto tropical	Asociado al maracuyá (fruto de la pasión).
Hierbas	Asociado a hierbas que se perciben pero no se pueden identificar individualmente.
Yerba mate	Asociado a la infusión de Yerba mate.
Color	Intensidad de color.
Brillo	Que refleja la luz.
Viscosidad	Consistencia o densidad en la boca provocada en la lengua por la bebida.

Todas las muestras fueron preparadas con agua potable (Tabla 4) y acondicionadas a una temperatura final de 10°C; servidas en vasos plásticos de 5 cm de diámetro codificados con combinaciones de tres dígitos al azar y presentados en orden aleatorio.

2.3.5 Etapa 3: Ajuste de la concentración de polvo liofilizado en la bebida y de los atributos dulzor y aroma.

A través de los ensayos sensoriales y fisicoquímicos se observó que era necesario realizar diferentes ajustes para obtener la bebida en polvo final y optimizar el rendimiento del proceso. El primer ajuste a realizar fue la concentración de polvo liofilizado a usar en la formulación, seguido de un cambio en el dulzor y aroma.

2.3.5.1 Evaluación de la concentración final de polvo liofilizado YMI:Cs en la bebida en polvo

Para la determinación de la concentración ideal de la mezcla en polvo liofilizada YMI/Cs en la bebida final, ochenta consumidores evaluaron tres formulaciones preparadas con 90 (B8), 60 (B9) y 45 (B10) g polvo liofilizado/L, manteniendo constantes los porcentajes (p/v) de aroma, azúcar y edulcorante. La tabla 6 muestra las formulaciones utilizadas.

Tabla 6. Variación en la concentración de polvo (YMI/Cs) en la bebida.

Muestra	Concentración Del polvo en la bebida (g/L)	Sacarosa (% p/v)*	Edulcorante (% p/v)*	Aroma F.P (% p/v)*
B8	90	4.95	0.05	0.010
B9	60	4.95	0.05	0.010
B10	45	4.95	0.05	0.010

* g / 100 mL YMI/Cs reconstituido.

Cada consumidor recibió las tres bebidas codificadas al azar con combinaciones de tres dígitos y presentadas en orden aleatorio. La medición se realizó empleando una escala de punto justo de 9-puntos, donde se consideró el centro como el punto óptimo o ideal.

Los atributos evaluados fueron dulzor, aroma, cuerpo (viscosidad en boca) y color (ANEXO A3).

2.3.5.2 Ajuste de dulzor y aroma ideal

A partir de los resultados del ensayo anterior se procedió a mejorar el dulzor y aroma de la muestra con la concentración ideal de polvo liofilizado.

Un panel de 40 consumidores (25 a 50 años; 12 hombres y 18 mujeres) evaluó la aceptabilidad global de 3 formulaciones (B8, B9 y B10) con modificaciones en el tipo de aroma (*Frutos tropical /Frutos Rojos*) y en los niveles de edulcorante y aromatizante (Tabla 7) usando una escala hedónica de 9 puntos (1= me disgusta mucho; 9= Me gusta mucho).

El dulzor y aroma se analizaron mediante una escala de punto justo (JAR); ubicando las tres muestras en cada escala de acuerdo a sus preferencias (ANEXO A4).

Tabla 7. Variación en la concentración de aroma y edulcorante para la bebida en polvo.

Muestra	Concentración polvo en la bebida (g/L)	Sacarosa (% p/v)*	Aroma (%)	Edulcorante (% p/v)*
B9	60	4.95	Fruto tropical (0.01% v/v previo liofilización)	0.05
B11	60	4.95	Frutos rojos (0.10 p/v)*	0.05
B12	60	4.95	Frutos rojos (0.10 p/v)*	0.10

* g / 100 mL YMI/Cs reconstituido.

Los resultados obtenidos para el atributo aroma, se corroboraron mediante una evaluación donde los 40 consumidores probaron la muestra seleccionada sin modificar y con una variación en la concentración de aroma (B13; 0.12% (p/v)), usando las mismas escalas (ANEXO A4).

2.3.6 Etapa 4: Caracterización sensorial de la bebida en polvo final**2.3.6.1 Perfil descriptivo cuantitativo**

El perfil descriptivo cuantitativo se realizó aplicando el método **Spectrum** dado que sólo se caracterizó la formulación final de la bebida en polvo. Este método de análisis descriptivo se ha empleado en la evaluación de una gama de productos que incluye alimentos, bebidas y cuidado personal.

Consiste en una caracterización descriptiva completa y detallada de los atributos sensoriales y sus intensidades, que son registradas en comparación a estándares diseñados para cada atributo (Muñoz y Civille, 1992).

Las características sensoriales son medidas usando términos seleccionados de un vocabulario predefinido y estandarizado. La intensidad percibida se cuantifica usando escalas de 15 cm que pueden ser universales o específicas para un determinado producto, con señales en varios puntos definidas por referencias que incluyen productos de marcas conocidas en el mercado. Los panelistas reciben un entrenamiento usando referencias previamente cuantificadas para cada atributo.

Líder del panel

El líder del panel es la persona responsable de la preparación y administración de las sesiones de entrenamiento y evaluación, incluye la preparación de la muestra y zona de evaluación, el liderazgo del grupo, monitoreo del progreso del panel, y recolección, análisis e interpretación de los datos descriptivos (Muñoz y Civille, 1992).

Evaluadores:

La selección de los evaluadores se hizo basada en el interés, actitud positiva, salud, disponibilidad y habilidad en evaluación sensorial. Todos los panelistas tenían conocimiento previo en técnicas de evaluación sensorial y de la muestra a evaluar (participación en ensayos anteriores).

El líder entrevistó personalmente cada panelista para investigar su interés y compromiso con el proyecto, disponibilidad horaria, problemas de salud que puedan afectar las pruebas, habilidades verbales y capacidad de trabajo en equipo.

El panel se integró con 20 participantes (11 hombres y 9 mujeres; 25 a 36 años, $M = 30.1$, $SD = 3,37$) del Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA) con conocimientos en áreas de desarrollo y análisis de alimentos.

Preparación y presentación de la muestra:

La bebida fue preparada con agua potable y acondicionada a 10°C en el mismo día en el que se realizaba la evaluación. Todos los participantes recibieron inicialmente 15 mL de muestra en vasos plásticos de 5 cm de diámetro, y agua para realizar enjuagues bucales cuando fuera necesario.

En algunas sesiones fue necesario brindar a los panelistas más volumen de bebida y agua para finalizar la medición.

2.3.6.1.1 Diseño y procedimiento

Los panelistas seleccionados en la entrevista participaron voluntariamente en ocho sesiones durante cuatro semanas, en las cuales se definieron los atributos sensoriales característicos de la bebida final, se entrenaron en el uso de escalas, reconocimiento y cuantificación de atributos utilizando estándares.

2.3.6.1.1.1 Orientación global y generación de atributos (Sesión inicial)

En la primera sesión, el líder de panel realizó una orientación global para todos los panelistas, donde se presentó la muestra a evaluar, se expusieron los fundamentos técnicos de los principales atributos (dulzor, acidez, amargor, astringencia) y otra terminología. Adicionalmente, se consideraron los tiempos y cronogramas de medidas y discusión necesarios para el desarrollo de los ensayos. En la segunda etapa de la sesión se buscó definir los atributos característicos de la bebida en polvo, partiendo del conocimiento de algunos atributos sensoriales registrados durante el desarrollo de las formulaciones anteriores. Para obtener un perfil aproximado de la muestra y que los panelistas se familiaricen con el producto, se aplicó la metodología semi-cuantitativa perfil CATA (Check All That Apply, por sus siglas en inglés) (Ares y Jaeger, 2015), utilizando términos que solo describieran la muestra y no estuvieran asociados a respuestas hedónicas. Los evaluadores reciben una lista con términos y se les pide que tilden todos los atributos que describen mejor su experiencia con la muestra.

Todos los participantes recibieron la muestra, una planilla y una lista informativa con diferentes descriptores y sus definiciones (Tabla 8), con el fin de guiarlos y unificar conceptos. Se informó que podían usar cualquier otro descriptor que no estuviera presente en las planillas si lo consideraban necesario.

Los panelistas debían marcar todos los atributos que consideraran correspondientes y adicionalmente estimaran la intensidad de los mismos en una escala de 3-puntos (poco, medio y mucho) (ANEXO A5).

Tabla 8. Descriptores y sus definiciones usados durante la evaluación CATA de la bebida en polvo final.

<u>Apariencia</u>	
<i>Descriptor</i>	<i>Definición</i>
<i>Color</i>	Intensidad de color.
<i>Viscosidad</i>	Consistencia o densidad en la boca por la sensación producida por la muestra.
<i>Brillo</i>	Que refleja la luz
<i>Uniformidad</i>	No presencia de partículas en suspensión; separación de fases (precipitado)
<u>Gustos básicos y sensaciones bucales</u>	
<i>Dulce</i>	Sensación producida por soluciones acuosas de azúcares como la sacarosa.
<i>Ácido</i>	Sensación producida por soluciones acuosas de sustancias ácidas como el ácido cítrico.
<i>Amargo</i>	Sensación producida por soluciones acuosas de sustancias como la cafeína.
<i>Astringencia</i>	Combinación de sensaciones como contracción, arrugamiento, sequedad y aspereza en la boca.

<u>Sabores y aromas</u>	
<i>Aroma total (retronasal)</i>	Intensidad de aroma percibido con el producto en boca.
<i>Frutos rojos (nasal)</i>	Asociado al Arándano, Frutilla, Moras.
<i>Cassis (nasal)</i>	Asociado a pulpa fresca de Cassis
<i>Yerba mate (nasal)</i>	Asociado a la infusión de Yerba mate.
<i>Cítrico (nasal)</i>	Asociado a una impresión general a frutos cítricos.
<i>Compota (nasal)</i>	Asociado a frutas cocidas.
<i>Frutal (nasal)</i>	Asociado a frutas como melón, pera, manzana. No cítrico.
<i>Fruto tropical (nasal)</i>	Asociado al maracuyá (fruto de la pasión).
<i>Frutos rojos (retronasal)</i>	Asociado al Arándano, Cassis, Moras.
<i>Cassis (retronasal)</i>	Asociado a pulpa fresca de Cassis producto en boca
<i>Yerba mate (retronasal)</i>	Asociado a la infusión de Yerba mate producto en boca
<i>Cítrico (retronasal)</i>	Asociado a una impresión general a frutos cítricos producto en boca
<i>Dulce (edulcorante) (retronasal)</i>	Sensación producida por soluciones acuosas de edulcorantes producto en boca.
<i>Frutal (retronasal)</i>	Asociado a frutas como melón, pera, manzana. No cítrico. Producto en boca.
<i>Fruto tropical (retronasal)</i>	Asociado al maracuyá (fruto tropical). Producto en boca
<u>Regusto</u>	
<i>Regusto amargo</i>	Gusto amargo que deja la muestra después de ser tragada
<i>Regusto astringente</i>	Gusto astringente que deja la muestra después de ser tragada

2.3.6.1.1.2 Reconocimiento de estándares y entrenamiento en uso de escalas (sesiones 2, 3)

En una segunda sesión, se presentó al panel una serie de estándares que representan algunos de los atributos sensoriales del producto. Entre ellos se incluyeron sustancias características de los gustos básicos y astringencia, así como las materias primas utilizadas en la bebida “*pulpa de Cassis y extracto de Yerba mate*”.

Los panelistas fueron familiarizados con la escala usada en el método Spectrum, la cual consistió en una línea de 15 cm (extremos “0= Nada” o “15= Máximo”; Muñoz y Civille, 1992).

Cada panelista recibió diferentes concentraciones de las soluciones estándar y se les indicó que cada concentración correspondía a un valor marcado en las escalas de 0 a 15 cm para los diferentes atributos (ANEXO A6). Los panelistas debían probar cada solución y asociar su ubicación en la escala con ayuda de la información presentada en la tabla 9. Esta sesión se repitió con el fin de asegurar la unificación de puntuación de todos los panelistas.

Para la ubicación de las intensidades sobre las escalas se utilizaron soluciones de sustancias estándares de los gustos básicos y astringencia (sacarosa, ácido cítrico y cafeína grado alimentario y una solución de té comercial). Asimismo, se presentaron las planillas con los valores de intensidad correspondientes según las sugerencias de Meilgaard y col., (1991).

Para definir las intensidades de los aromas se ubicó a las concentraciones de los componentes usados durante el desarrollo de la bebida (YMI/Cs) en el valor máximo de la escala. En el caso del color, la intensidad más alta (15) correspondía al de la pulpa de Cassis concentrada. Los atributos propios de la apariencia de la bebida reconstituida se definieron a partir de la información recopilada con el grupo de panelistas y de resultados de sesiones anteriores.

Tabla 9. Valores de intensidad (0 a 15) de los atributos comunes en las bebidas en polvo a base de Yerba mate y Cassis.

Atributo	Estándar	Valor en la escala
Dulce	Solución sacarosa (p/v)	
	2%	2
	10%	10
Ácido	Solución ácido cítrico (p/v)	
	0.05%	2
	0.15%	10
Amargo	Solución cafeína (p/v)	
	0.05%	2
	0.15%	10
Astringencia	Solución de Te	
	1 bolsita de Té sumergida 1 h	6.5
Dulce (edulcorante)	Solución edulcorante (p/v)	
	0.10%	15

Aromas		
Frutos rojos (nasal)	Aroma Frutos rojos (p/v)0.10%	15
Cassis (nasal)	Pulpa de Cassis concentrada	15
Yerba mate (nasal)	Infusión Yerba mate 60g de yerba /L	15
Cítrico (nasal)	Aroma cítrico (p/v) 0.10%	15
Fruto tropical (nasal)	Aroma FP (p/v) 0.01%	15
Apariencia		
Color	Intensidad de color.	Claro (0) Oscuro (15)
Viscosidad	Consistencia o densidad en la boca por la sensación producida por la muestra.	Poco (0) Mucho (15)
Brillo	Que refleja la luz	Opaco (0) Brillante(15)
Uniformidad	Ausencia/Presencia de partículas en suspensión; separación de fases.	No uniforme (0) Uniforme (15)

2.3.6.1.1.3 Evaluación de la bebida empleando soluciones estándar (sesiones 4 y 5)

Durante la sesión 4 los panelistas evaluaron individualmente la bebida final empleando las soluciones estándar. Inicialmente se les pidió que probaran la bebida y puntuaran cada atributo en las escalas de 0 a 15 cm (ANEXO A6).

Además se les brindó información sobre los atributos (Tabla 8) y la lista con atributos y forma de evaluar (Tabla 9), indicándoles que podían hacer uso de los estándares si fuese necesario (Figura 3). Se proporcionó agua suficiente para enjuagar la boca entre pruebas.

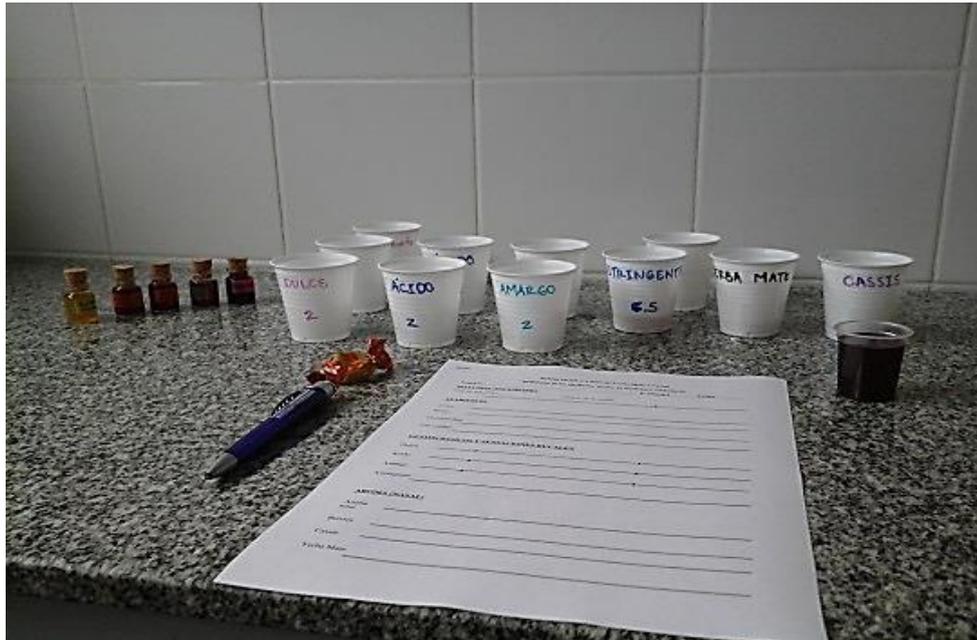


Figura 3. Evaluación de la bebida final reconstituida usando estándares, CIDCA 2015.

En la sesión 5 los panelistas probaron la bebida y evaluaron los atributos en las escalas nuevamente (ANEXO A6); esta vez no disponían de ninguna información ni de las soluciones estándar.

A partir de los resultados recopilados en esta sesión, se obtuvieron las puntuaciones promedio para cada atributo evaluado y se marcaron en las escalas de 0 a 15 cm eliminando las marcas correspondientes a los estándares (ANEXO A7). Esta nueva planilla se usaría en la última sesión de evaluación de la bebida en polvo.

2.3.6.1.1.4 Evaluación final del perfil sensorial de la bebida en polvo**(sesiones 6, 7 y 8)**

En las sesiones 6, 7 y 8, los panelistas evaluaron nuevamente la bebida usando la nueva planilla que incluía las marcas correspondientes a los valores promedio (ANEXO A7) para cada atributo, con el fin de obtener los puntajes finales para definir el perfil sensorial de la bebida. Las evaluaciones se realizaron por triplicado sin informar a los panelistas que se trataba de la misma muestra.

2.3.6.2 Ensayos dinámicos y efecto múltiple sorbo

La percepción del aroma, sabor y textura de los alimentos y bebidas es un fenómeno dinámico (Varela y Ares, 2014); la intensidad percibida de los diferentes atributos sensoriales va cambiando a medida que los alimentos son transformados en la boca. En general, las evaluaciones sensoriales son estáticas (una sola puntuación), sin embargo, los ensayos dinámicos permiten a los consumidores evaluar las sensaciones percibidas durante un rango de tiempo.

De esta forma se puede obtener una información más completa de lo que va ocurriendo durante la ingesta (Lawless y Heymann, 2010).

En la vida real los productos son consumidos en ingestas rápidas y repetidas, pudiendo causar cambios en la percepción debido en principio a la adaptación sensorial (Zorn y col., 2014).

La primera ingesta puede no ser suficiente para percibir todas las características sensoriales de un producto. En esta etapa se evaluó la formulación final de la bebida en polvo por medio de las metodologías dinámicas “Sensación Temporal Dominante (STD)” e “Intensidad vs Tiempo (IT)”, con la modalidad de ingestas repetidas.

2.3.6.2.1 Medición de la sensación temporal dominante (STD):

Una sensación dominante puede definirse como la que llama más la atención en un tiempo determinado, sin ser necesariamente la más intensa (Zorn y col. 2014). El método para medir la sensación dominante (STD) permite la evaluación de varios atributos simultáneamente y el estudio de la secuencia de las sensaciones dominantes de un producto durante cierto período de tiempo (Meyners y Pineau 2010; Varela y Ares, 2014).

Consiste en presentar a los panelistas un conjunto de atributos sensoriales predeterminados en la pantalla de la computadora y pedirles que seleccionen cual es en cada momento la sensación dominante (Lawless y Heymann 2010).

Esta medición se realizó con el fin de evaluar el perfil dinámico durante la ingestión de múltiples sorbos, y adicionalmente evaluar si la astringencia mostraba un efecto acumulativo durante el consumo de tres sorbos sucesivos.

Procedimiento:

Una lista de ocho atributos (**dulzor, acidez, amargor, aroma total, aroma a frutos rojos, aroma a Cassis, aroma a Yerba mate y regusto astringente**) que fueron seleccionados a partir de los resultados obtenidos en el perfil descriptivo cuantitativo de la formulación final, fue presentada a los 20 panelistas entrenados y se les pidió que evaluaran la bebida mediante la aplicación de la metodología Sensación Temporal Dominante (STD, Pineau y col. 2009). Una primera sesión se realizó con el fin de ajustar las variables (cantidad de sorbos, tiempo entre ingestas, tiempo total, cantidad de muestra, consigna a preguntar) y familiarizar a los panelistas con el uso del software y la metodología. Posteriormente, se realizó una segunda y tercera sesión para obtención de los datos.



Figura 4. Evaluación de la sensación temporal dominante usando el software Sensomaker v1.8. CIDCA 2015.

La evaluación consistió en la ingesta de la bebida en tres sorbos consecutivos (15 mL servidos en vasos separados), inicial (0), 20 y 40 segundos en el transcurso de 60 segundos. Para cada sorbo/tiempo el panelista debía marcar cual(es) de los atributos sensoriales listados era el dominante (Figura 4), usando el menú Sensación Temporal Dominante del software SensoMaker v1.8 (Federal University of Lavras, Brazil).

2.3.6.2.2 Evaluación de la aceptabilidad de la bebida en polvo a través de los registros Intensidad-Tiempo (IT).

Dentro de la metodología dinámica, el más utilizado es el registro de la intensidad de un atributo en función del tiempo (método Intensidad-Tiempo (IT); (Lawless y Heymann 2010), el cual consiste en registrar la evolución de la intensidad de un atributo sensorial a lo largo de un tiempo determinado (Pineau y col., 2009).

Consumidores:

El panel fue conformado por 75 consumidores (33 hombres y 42 mujeres, $M = 32$ $SD = 10.6$), estudiantes y docentes de las Facultades de Ingeniería y Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP).

Procedimiento:

Cada consumidor evaluó de manera individual la aceptabilidad de la bebida final YMI/Cs, se familiarizó con las escalas que iba a usar y con el software antes de iniciar la evaluación.

El procedimiento se llevó a cabo en cuatro etapas con el fin de contrastar los puntajes de la evaluación estática y dinámica. Además, se comparó con un producto de aceptabilidad conocida por los consumidores (galletita con chocolate). Entre etapas, los consumidores se enjuagaban la boca con agua y descansaban unos minutos antes de continuar.

a) *Evaluación del grado de aceptabilidad global de la bebida usando una escala hedónica de 9-puntos* con marcas de me disgusta mucho (1), a me gusta mucho (9), y un punto neutral (5) (ni me gusta ni me disgusta). Cada consumidor recibió 15 mL de bebida, se le pidió que la probara y puntuara en la escala (ANEXO A8).

b) *Evaluación del grado de aceptabilidad global de un alimento comercial con aceptabilidad general alta (Galletas)*. El consumidor recibió una (10 g) galleta con chips de chocolate marca TODDY, se le pidió que la probara y consumiera lo que quisiera, para luego calificarla usando una escala igual a la usada para evaluar la bebida en (a) (ANEXO A8).

c) *Evaluación de la evolución de la aceptabilidad de la bebida a través del tiempo (IT)*. Este ensayo se realizó usando el menú **Intensidad versus Tiempo** del software SensoMaker v1.8 (Federal University of Lavras, Brazil); los consumidores debían ingerir cuatro sorbos sucesivos (inicial (0), 20, 40 y 60 segundos (s)) de la bebida en un transcurso de 80 s. Cada sorbo de 15 mL se sirvió en vasos separados y debían consumirse por completo.

El consumidor debía ubicar el puntero del mouse en el extremo izquierdo de una escala de cero (0) (me disgusta mucho) a 10 (me gusta mucho) en el cuadro de evaluación (IT) antes de ingerir el primer sorbo y empezar a calificar la aceptabilidad moviendo el puntero sobre la escala.

Para cada sorbo debía realizar la calificación sin regresar al valor inicial de la escala (0); después de ingerir el último sorbo (60 s) la puntuación seguía hasta los 80 s. El tiempo de duración del ensayo se fijó previamente en el programa.

d) Cada consumidor evaluó nuevamente la bebida como en el inciso (a).

2.3.7 Análisis estadístico

La distribución binomial fue usada para calcular el nivel de significancia para el test de triángulo, basado en el número de respuestas correctas. El análisis de conglomerados de K-medias fue usado para agrupar los consumidores en tres grupos de edades. Las diferencias entre las formulaciones, sesiones y grupos de edad se analizaron con el comando Modelo General del programa SPSS v.13.0 (Inc. Chicago, IL.). Se realizaron los análisis de varianza mediante el uso del software Infostat v. 2008 (Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). Las diferencias se compararon con la prueba de Tukey usando como nivel de significación $p < 0.05$. Para cada ensayo en la escala JAR se usó la frecuencia de las respuestas de los consumidores. La frecuencia de las emociones se analizó con la distribución de chi-cuadrado y Análisis factorial por Correspondencia (AFC). La concentración de la infusión se identificó mediante el análisis por componentes principales (ACP).

Para los estudios dinámicos se usó software SensoMaker v1.8 (Federal University of Lavras, Brazil).

2.4 Resultados y Discusión:

Durante el desarrollo de este trabajo, se obtuvieron bebidas en polvo a base de Yerba mate y Cassis usando el método de deshidratación por liofilización. Las bebidas en polvo fueron ajustadas a partir de los resultados obtenidos en los análisis tanto fisicoquímicos como sensoriales, buscando obtener un producto con alto contenido de compuestos bioactivos, estable durante el almacenamiento y con buena aceptabilidad sensorial por parte del consumidor.

En la figura 5 se presenta un diagrama de contenido de las diferentes etapas realizadas durante el análisis sensorial.

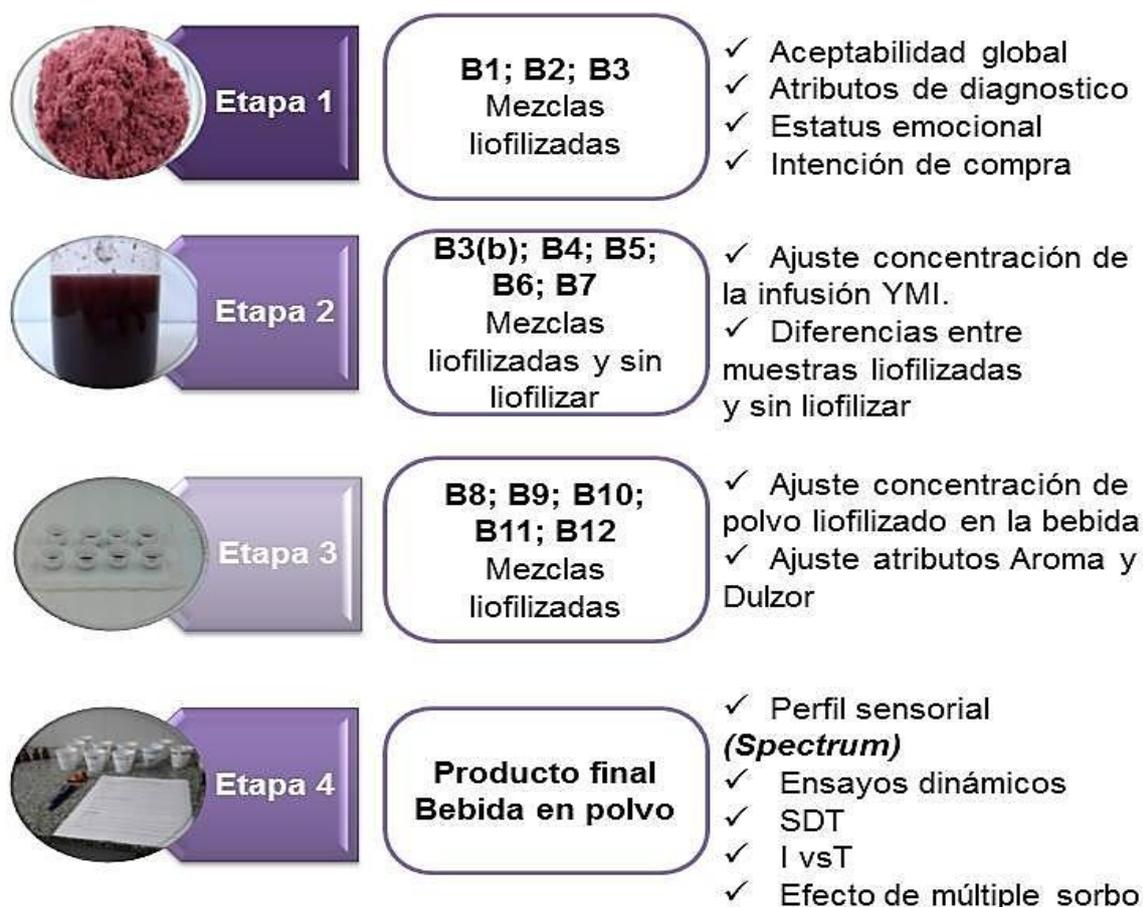


Figura 5. Diagrama de contenido del Análisis sensorial de bebidas en polvo

YMI/Cs.

2.4.1 Discriminación sensorial entre muestras:

Las formulaciones B1 (pH=3.45; 26°Brix; 68.65±1.46 mg GAE/g m.s) B2 (pH= 3.64; 25°Brix; 72.92±2.03 mg GAE/g m.s) y B3 (pH= 3.64; 25°Brix; 74.07±0.63 mg GAE/g m.s), se reconstituyeron según el porcentaje de rendimiento de liofilización (18% p/v) para la evaluación sensorial.

En la tabla 10 se muestran los resultados obtenidos con el Test del Triángulo. Las tres formulaciones (B1; B2; B3) fueron percibidas sensorialmente diferentes ($p < 0.001$). Los descriptores seleccionados de la lista total de atributos solo se tomaron como guía para los siguientes ensayos.

Las variaciones en el pH y en SST entre B1 y B2/B3 se reflejaron en los resultados sensoriales, mostrando a B1 como la más ácida, astringente y de mayor cuerpo. Los asesores identificaron a B2 como menos dulce y aromática que B3, indicando un efecto de interacción del edulcorante adicionado a B3 con la percepción del aroma.

Tabla 10. Valores obtenidos de en la evaluación con el test de triangulo-
Caracterización de la diferencia.

Muestras comparadas	Respuestas correctas	Descriptores diferenciales
B1/B2	23/30*	Mayor acidez, astringente y cuerpo (B1)
B2/B3	25/30*	Menos dulzor y aroma (B2)
B3/B1	20/30*	Mayor dulzor (B3)

* $p < 0.001$

2.4.2 Pruebas hedónicas: Sesión control (primera sesión)

2.4.2.1 Aceptabilidad global

En este primer ensayo sensorial 100 participantes evaluaron las tres bebidas en polvo reconstituidas (B1, B2 y B3) por duplicado en una escala hedónica de **9-puntos**. Los resultados obtenidos para la aceptabilidad global fueron 5.0, 5.0 and 5.6 para B1, B2 y B3 respectivamente, reflejando una mayor preferencia por la formulación B3 ($F [2, 299] = 5.037, p = 0.007$).

La inspección de los datos individuales reveló que el 57% de los consumidores evaluaron B3 con valores entre 6-9 en la escala hedónica, pero solo el 37% y 40% de los consumidores dieron los mismos valores a B2 y B1 respectivamente (Figura 6).

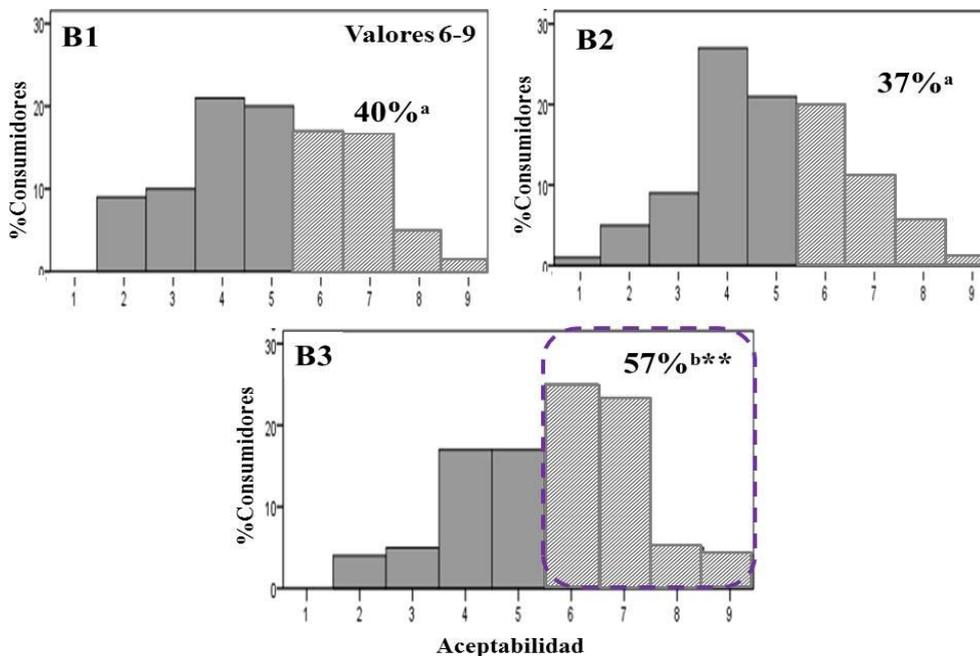


Figura 6. Frecuencia de consumidores (%) para Aceptabilidad global (sesión control) de las bebidas B1, B2 y B3.

2.4.2.2 Diagnóstico de atributos:

La figura 7 muestra los atributos “*acidez, dulzor, astringencia, aroma y cuerpo*” que fueron medidos usando la escala de punto justo (JAR; ANEXO A1). La formulación B3 presentó la combinación de ingredientes de mayor aceptabilidad global de las tres muestras y con la mayor frecuencia de consumidores en el punto ideal (0, en la mitad de la escala) para los cinco atributos evaluados.

El 52% de los consumidores ($p < 0.001$) estimaron que B3 presentó el punto óptimo para acidez, 46% para dulzor ($p < 0.01$), 34% para astringencia ($p < 0.05$), 42% para aroma ($p < 0.01$) y 53% para cuerpo ($p < 0.01$). Sin embargo, la formulación B3 requiere un mejoramiento que podría consistir en un aumento en el dulzor y aroma, y una reducción en la astringencia. Para las muestras B1 y B2, el 26% y el 37% de los consumidores consideraron que la acidez estaba en el punto óptimo, 36% y 20% para dulzor, 21% y 30% para astringencia, 39% y 32% para aroma, y 42% (en ambas muestras) para cuerpo.

B1 fue percibida como la bebida más ácida, 54% de los consumidores estimaron que esta presentaba valores superiores a cero (0) en la escala JAR (Figura 7). La misma comparación para B2 y B3 indicó que el 33% y 20% de los consumidores consideraron que la acidez era más alta que cero, respectivamente. En cuanto al dulzor, el 55% de los consumidores estimaron que B1 mostró puntajes más bajos que cero (0) en la escala JAR y 74% para B2.

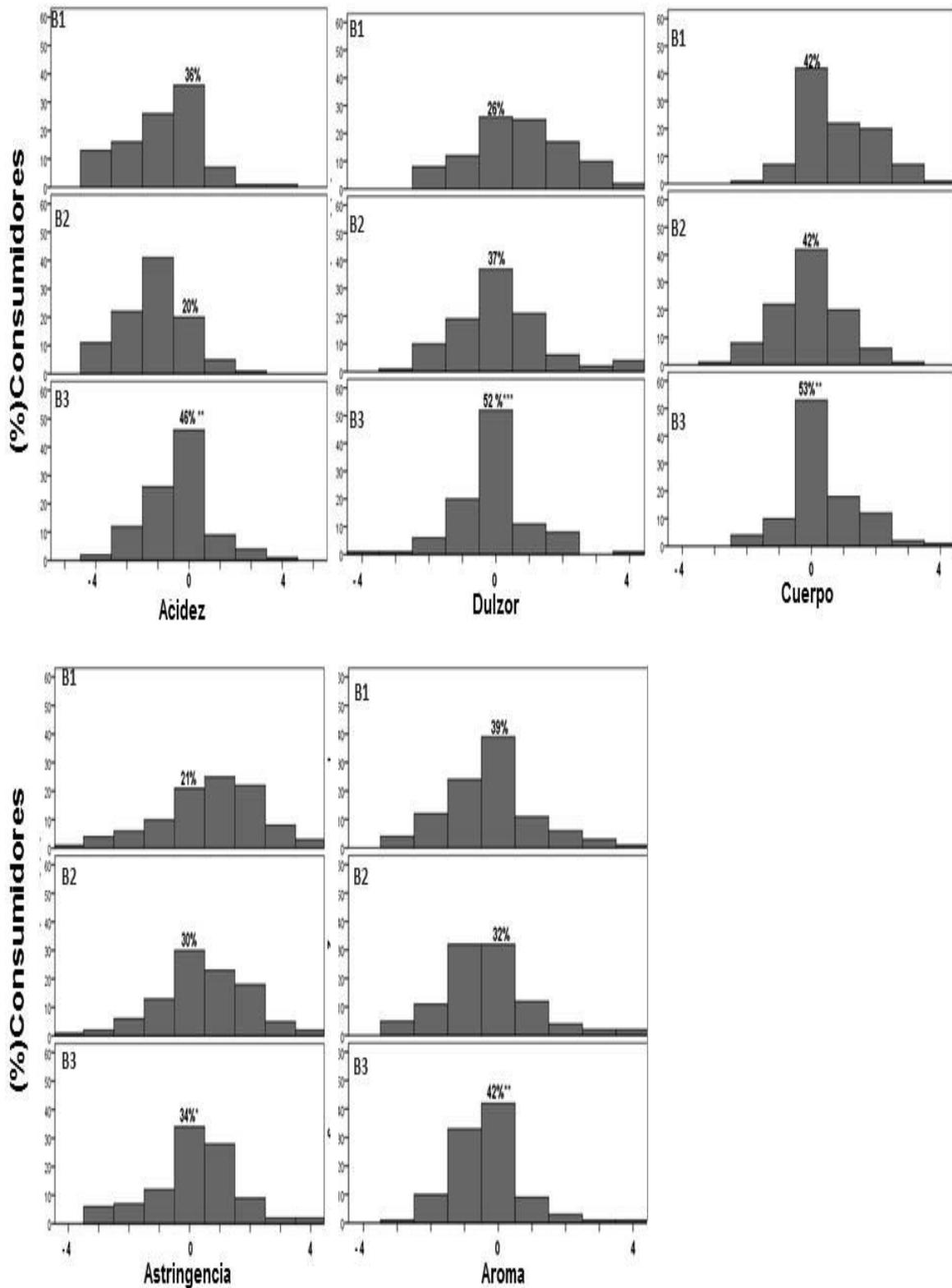


Figura 7. Frecuencia de consumidores (%) en cada categoría para la escala de punto justo (JAR) para los atributos de diagnóstico (acidez, dulzor, astringencia, aroma y cuerpo) medidos en la sesión control.

Es de hacer notar que B2 y B3 tienen la misma composición, excepto por el nivel de edulcorante el cual es suficiente para cambiar la percepción de la acidez, aroma y cuerpo. En cuanto a la astringencia el 58, 48 y 41% de los participantes detectaron valores superiores a cero (0) en B1, B2 y B3 respectivamente. Sin embargo, B1 que tenía el mayor contenido de sólidos solubles (26°Brix) fue percibida como la más astringente. Quizás el alto nivel de acidez de B1 contribuyó a esta percepción (Figura 7). Las interacciones de acidez-astringencia fueron reportadas por varios autores como Guinard y col., (1986); Bajec y Pickering (2008); y Goldner y Zamora (2010).

2.4.2.3 Intención de compra:

Los puntajes medios para la intención de compra de las tres bebidas evaluadas (usando una escala de 5-puntos) en la primera sesión fueron 2.9, 2.8 y 3.4 respectivamente. Los puntajes de la escala variaron entre las muestras ($F [2.297] = 5.748$, $p = 0.004$) (Figura 8.A), reflejando altos valores para la formulación B3. La inspección individual de los datos reveló que el 48% de los consumidores “Ciertamente o probablemente comprarían” B3 (valores en la escala de 4 y 5), pero escasamente el 30% y 31% de los consumidores tienen la misma opinión de B1 y B2 (Figuras 8.B1; B2; B3).

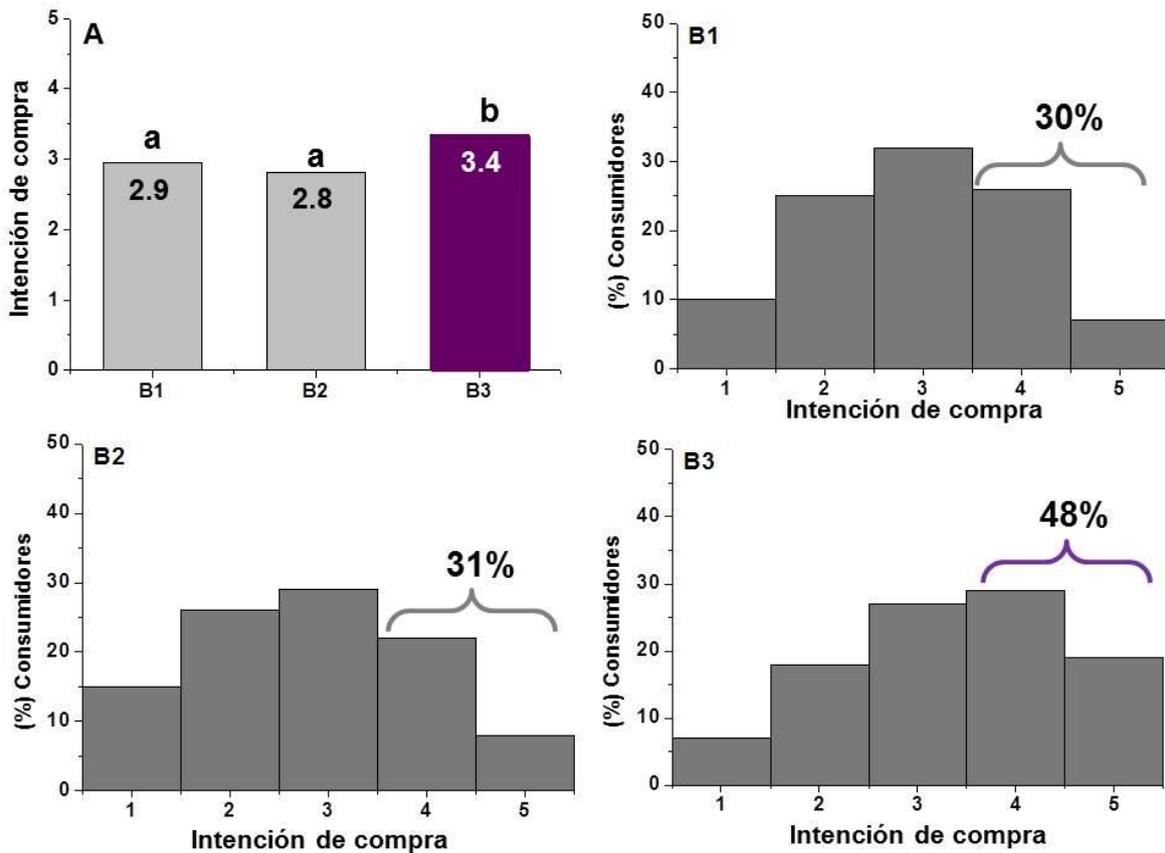


Figura 8. Intención de compra (sesión control) de las bebidas en polvo (B1, B2 y B3). Puntajes promedio. Diferentes letras en cada columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$; prueba de Tukey). B1, B2, B3. Frecuencia de consumidores (%) en cada categoría de la escala de 5-puntos.

2.3.2.4. Evaluación a través de las cuatro sesiones:

Con el fin de detectar la influencia de la edad de los consumidores, estos se agruparon en 3 grupos (E1: 25-35 años (40 consumidores); E2: 36-49 años (30 consumidores); E3: 50-63 años (30 consumidores). Esta segmentación por edad se realizó en función del interés por las bebidas saludables demostrado por los participantes de mayor edad.

Como se puede ver en la tabla 11, las fuentes de variación fueron muestra (B), sesión (Se) y edad (E), mientras las interacciones entre estas no fueron significativas. El efecto de la muestra y de la edad ($p < 0.001$) fue más significativo que el número de sesiones para la aceptabilidad ($p < 0.01$) y para la intención de compra (no significativa).

De acuerdo con los resultados de la sesión control, B3 presentó los puntajes medios más altos (para las cuatro sesiones) tanto para la aceptabilidad como para la intención de compra, indicando que B3 fue la combinación de ingredientes que más gustó.

Como los resultados no mostraron grandes diferencias, se realizó un análisis de rango (valores entre paréntesis en la tabla 11) con los factores de variación muestra, sesión y edad. En cuanto al número de sesiones, la última (Se4), tuvo el valor máximo para la aceptabilidad demostrando un efecto por la exposición repetida.

Tabla 11. Valores de F para ANOVA. Puntajes medios totales y análisis de rango (cuatro sesiones) para aceptabilidad e intención de compra.

Atributo	Muestras (B1,B2,B3)			Sesión (Se1,Se2,Se3,Se4)				Edad (E1, E2, E3) ¹			B*Se	B*E	Se*E
	Grados de libertad												
	2			3				2			6	4	6
Aceptabilidad	12.442**			3.799*				12.004**			0.654 ^{ns}	0.472 ^{ns}	0.112 ^{ns}
Intención de compra	9.612**			0.737 ^{ns}				25.697**			0.501 ^{ns}	0.321 ^{ns}	0.568 ^{ns}
	Puntuaciones medias totales (rango) ²												
	B1	B2	B3	Se1	Se2	Se3	Se4	E1	E2	E3			
Aceptabilidad	5.1 ^a (1.9) ^a	5.0 ^a (1.8) ^a	5.7 ^b (2.3) ^b	5.2 ^a (2.3) ^b	5.1 ^a (2.3) ^b	5.3 ^a (2.6) ^b	5.7 ^b (2.8) ^b	5.5 ^b (2.1) ^b	5.4 ^b (2.1) ^b	4.6 ^a (1.7) ^a			
Intención de compra	3.0 ^a (1.9) ^a	2.8 ^a (1.8) ^a	3.3 ^b (2.3) ^b	3.0 ^a (2.4) ^b	3.0 ^a (2.5) ^b	3.0 ^a (2.6) ^b	3.1 ^a (2.1) ^b	3.3 ^b (2.1) ^b	3.1 ^b (2.1) ^b	2.5 ^a (1.8) ^a			

ns: no hay diferencia significativa. Diferentes letras en cada columna indican diferencias para cada atributo, p<0.05, prueba de Tukey.¹E1: 25-35 años (40 consumidores); E2: 36-49 años (30 consumidores); E3: 50-63 años (30 consumidores).

²Prueba de Friedman

*p<0.01

**p<0.001

La figura 9 muestra los valores medios de la aceptabilidad por muestra y por sesión. Es de notar que las muestras con menor aceptabilidad (B1 y B2) en la sesión control (1) fueron aquellas con el incremento más alto de los valores en la sesión 4. La aceptabilidad de B1, B2 y B3 aumentó en la última sesión un 12.2, 9.3 y 5.5%, respectivamente.

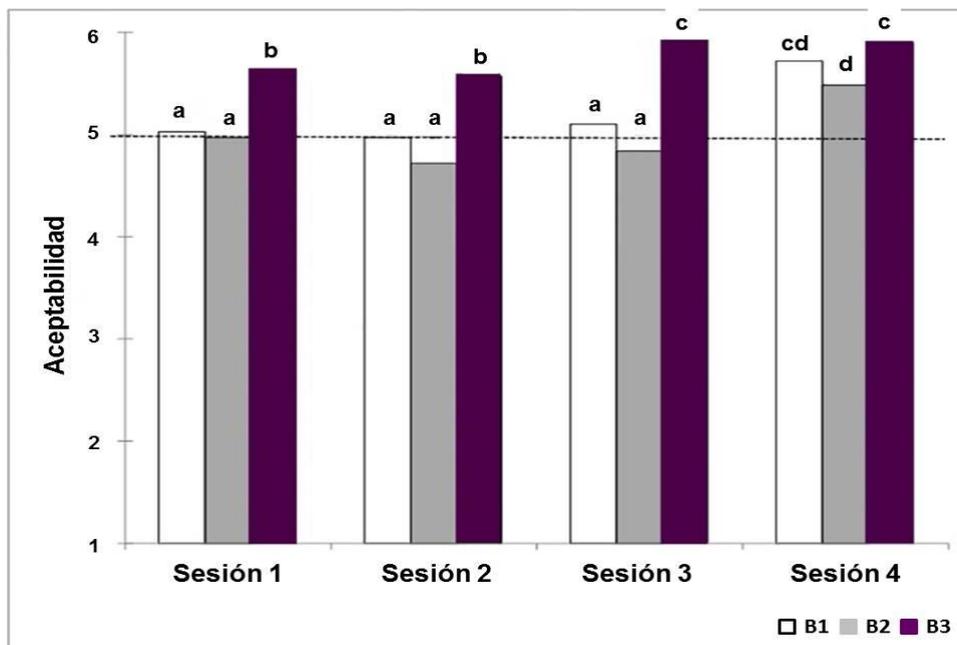


Figura 9. Valores promedios para la aceptabilidad de consumidores por muestra y sesión. Diferentes letras en cada columna indican diferencias en la aceptabilidad entre muestra y sesión. Prueba de Tukey ($p < 0.05$)

Esto evidencia que el efecto de la exposición repetida en bebidas con un nivel de aceptabilidad inicial neutra lleva a un incremento en los puntajes de aceptabilidad para mezclas novedosas. El efecto de la exposición repetida fue evidente en la Se4 para B1 y B2, y en Se3 para B3 ($p < 0.05$), indicando el nivel de exposición necesario para desarrollar tal efecto.

Las muestras que gustaron más inicialmente, requieren menos exposición para incrementar la aceptabilidad.

La intención de compra no se vio afectada por la exposición, no se presentaron diferencias significativas entre los valores medios de cada sesión (tabla 11). Este resultado sugiere que cuatro evaluaciones de las muestras repetidas no son suficientes para mejorar la intención de compra.

Una opinión inesperada se obtuvo del grupo de consumidores de mayor edad (E3), quienes mostraron los valores más bajos para aceptabilidad e intención de compra sugiriendo una actitud más conservadora frente a la recepción favorable de un nuevo producto. Esta explicación es una hipótesis basada solo en 30 consumidores. Sin embargo, debido a experiencias previas con otras bebidas, se esperaba una respuesta diferente.

La evaluación de los atributos de diagnóstico no cambió a través de las sesiones indicando que la opinión de los consumidores acerca del punto óptimo de acidez, dulzor, astringencia, aroma y cuerpo se mantuvo a los mismos niveles de la primera impresión. Esta observación sugiere que la exposición aumentó la aceptabilidad por efecto de familiaridad con la muestra, pero la percepción de los atributos no cambia con la exposición. Este resultado concuerda con lo expresado por Stolzenbach y col., (2013) quienes encontraron que los consumidores no cambiaron su percepción sensorial con el consumo repetido, y también enfatizaron la importancia de la impresión inicial del producto.

2.4.3 Efecto de la exposición en el estatus emocional después de probar las muestras

Como se esperaba, el análisis de la frecuencia de citación de las palabras (emociones) para todas las muestras y las sesiones mostró que **Frescura** (20% frecuencia) fue la palabra más mencionada por los consumidores, este término es ampliamente relacionado con bebidas. *Familiaridad* (14.4%), *sencillez* (14%), *bienestar* (12.5%) y *sorpresa* (12.0%) fueron los términos seguidos más seleccionados; mientras que los términos menos mencionados fueron *miedo* (1.5%), *angustia* (2.3%), *enojo* (2.4%) y *Alegría* (3.4%).

Un Análisis Factorial de Correspondencia (AFC) fue aplicado teniendo en cuenta las palabras mencionadas por muestra y por sesión. Como se puede observar en la figura 10, las muestras están identificadas con dos números, el primero corresponde a la muestra y el segundo al número de sesión. Por ejemplo, número 11 se refiere a la muestra B1 en la Se1 y el número 34 identifica a B3 en Se4. Aunque las muestras B1 y B2 en la sesión 1 (11 y 21 respectivamente) tuvieron la misma puntuación para la aceptabilidad fueron etiquetadas con diferentes términos; “Sorpresa” fue asociada a B1 y “Desagrado” con la muestra B2. El nivel óptimo de dulzor más bajo de B2 pudo haber influenciado la elección de los términos por parte de los consumidores. Los términos “Frescura”, “Sencillez” y “Bienestar” fueron mencionados con una frecuencia similar para las tres muestras, por esta razón se sitúan cerca del centro de coordenadas.

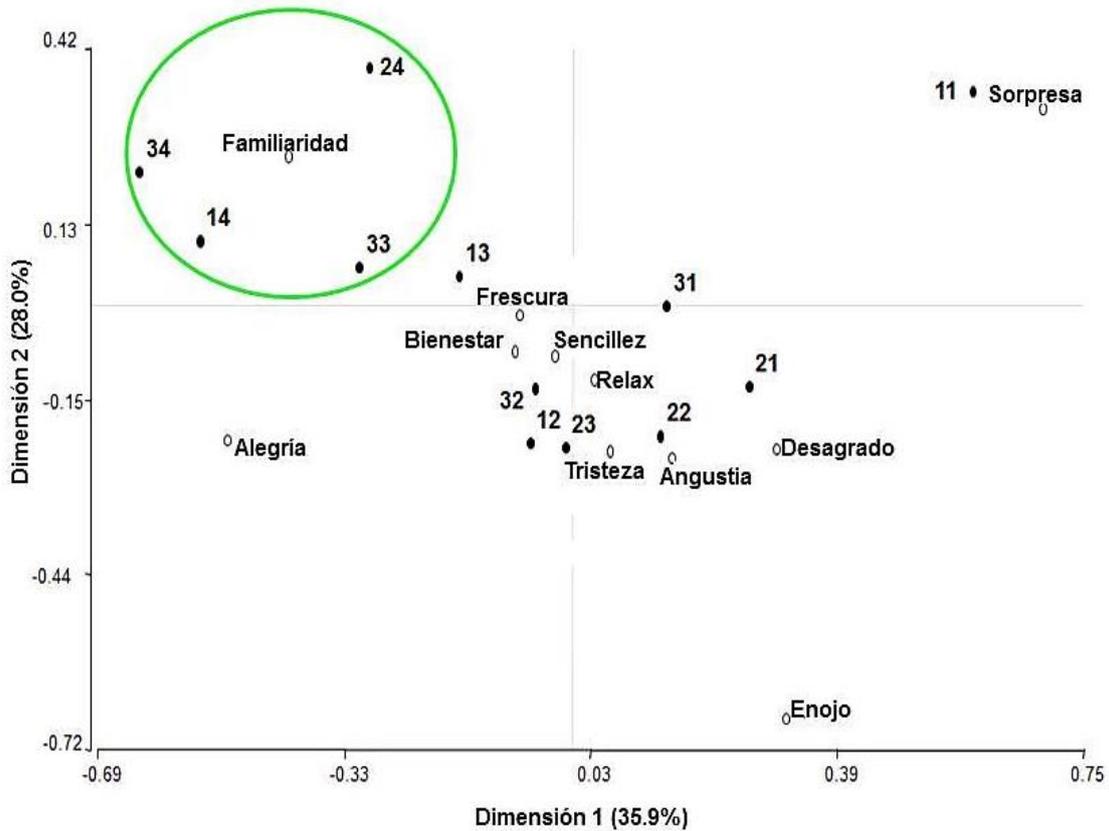


Figura 10. Análisis Factorial de Correspondencia (AFC) de las palabras seleccionadas después de probar las muestras (1-3) en cada sesión (1-4). Los códigos de 2 dígitos corresponden a la combinación de muestra/sesión: El primero dígito se refiere al número de muestra y el segundo a la sesión (11, 12, 13, 14 (B1); 21, 22, 23, 24 (B2); 31, 32, 33, 34 (B3)).

La palabra familiaridad fue seleccionada para todas las muestras en la Se4 y también para B3 en Se3, confirmando el impacto del efecto de la exposición repetida e indicó el nivel de exposición necesario con el fin de desarrollarlo (Figura 10).

La secuencia de las palabras mencionadas con mayor frecuencia durante todas las sesiones para B2 fue muy clara, está fue asociada con emociones negativas; comenzó con “*Desagrado*” (21) seguido por “*Angustia*” (22) y “*Tristeza*” (23). Sin embargo, el término inicial para B1 fue “*Sorpresa*” (11), cambiando a una mezcla de emociones negativas (*Tristeza*) y positivas (*Relax, Sencillez y Bienestar*) en Se2. Las emociones generadas por B3 fueron siempre positivas; por lo tanto, el nivel de aceptabilidad afectó los términos seleccionados.

Con respecto a las palabras seleccionadas por cada grupo de edad, fueron similares y diferentes. Por ejemplo, “*Sorpresa*” fue seleccionada por 30.2, 31.9 y 38.7% y “*Sencillez*” por 35.8, 44.0 y 37.0% por los grupos de edad E1, E2 y E3 respectivamente. Sin embargo, los porcentajes para “*Desagrado*” fueron 18.4, 26.7 y 51.3% y “*Bienestar*” 40.5, 26.7 y 10.9%, respectivamente para E1, E2 y E3. Estos resultados confirman los ya obtenidos con la evaluación de la aceptabilidad, en la cual los consumidores más jóvenes otorgaron a las muestras los valores promedio más altos y presentaron una actitud más positiva con la nueva bebida.

Los resultados descritos en este punto de la investigación mostraron el efecto de la ingesta repetida de una nueva bebida sobre la aceptabilidad, los atributos de diagnóstico, la intención de compra y el estatus emocional de los consumidores.

La relación entre los resultados obtenidos por la escala hedónica y la escala JAR ayudaron a explicar las preferencias de los consumidores.

Fue evidente que el dulzor tuvo una alta influencia en la percepción de los otros atributos. Aunque B2 y B3 tenían similares composiciones, excepto por un 0.05% adicional de edulcorante para B3, los consumidores establecieron que B3 tuvo mejor acidez, aroma y cuerpo. Mattes (1994) mostró que las calificaciones favorables para alimentos ácidos y amargos no fueron afectadas por 10 exposiciones, mientras que para dulzor y salado fueron más altas. La percepción del dulzor para B1, B2 y B3 pudo contribuir a mejorar los valores de aceptabilidad obtenidos después de cuatro exposiciones. Con respecto a la astringencia, hubo una tendencia a percibir altos niveles en todas las muestras por los consumidores. Probablemente, el nivel de MD y/o el de azúcar no fueron suficientes para enmascarar esta sensación, y será necesario aumentar el dulzor o disminuir la concentración de YMI ya que este compuesto está altamente relacionado con la astringencia. Aunque B1 fue percibida como más astringente que B2, sus niveles de aceptabilidad son similares, sugiriendo que esta sensación no afecta la preferencia. Dinnella y Monteleone (2011) reportaron que la intensidad de la astringencia no necesariamente maneja la aceptabilidad de los productos.

La evaluación de los atributos de diagnóstico a través de las cuatro sesiones no cambió la opinión de los consumidores respecto del punto óptimo de acidez, dulzor, astringencia, aroma y cuerpo. Este resultado puede indicar que la aceptabilidad de los consumidores puede ser incrementada con la exposición repetida, sin cambiar la evaluación analítica de la primera impresión.

Delwiche y Warnock (2008) reportaron que la aceptabilidad de cualquier gusto y sabor está dirigida por un mínimo de tres factores. El primero de estos es la *sensibilidad*, porque en orden de aceptar o rechazar un producto es necesario percibirlo; seguido por la *familiaridad*, ya que una exposición previa dará forma al efecto provocado por la subsecuente exposición, y el tercer factor es la *personalidad*. Mientras algunos individuos buscan activamente nuevas experiencias y sensaciones, otros prefieren limitar su contacto con lo desconocido y su exposición a nuevas sensaciones. El factor *personalidad* no fue evaluado en este trabajo; sin embargo, algunas interpretaciones acerca del mismo pueden ser hechas en relación con el grupo de mayor edad (E3) que mostró los valores más bajos de aceptabilidad e intención de compra, y un estatus emocional negativo. Según datos de literatura (Bower y col, 2003; Sabbe y col., 2009), se esperaba que los consumidores de mayor edad tuvieran mayor interés por las bebidas saludables.

Las emociones generadas después de ingerir las muestras pueden explicar la actitud del grupo E3. Todos los participantes fueron sorprendidos en la primera sesión por el nuevo sabor, pero el sentimiento producido fue diferente. Verbeke (2006) reportó un decrecimiento incondicional en la aceptabilidad de alimentos funcionales, especialmente en el gusto.

2.4.4 Ajuste del atributo de diagnóstico astringencia (selección de la concentración final del extracto de Yerba mate (YMI)):

En los resultados obtenidos en la etapa anterior se determinó que la bebida B3 con mayor aceptabilidad y mejor perfil de atributos de diagnóstico, presentaba altas puntuaciones para el atributo “Astringencia”. Como este atributo ha sido altamente relacionado con la concentración del material herbáceo (Jaeger y col., 2009) se decidió evaluar tres concentraciones de la infusión de yerba (60; 90 y 120 g/L) usada en la preparación de la bebida. También se observó que durante la liofilización podrían perderse compuestos volátiles que posiblemente serían percibidos por los consumidores.

Las muestras B3(b), B4, B5, B6 y B7 fueron evaluadas sensorialmente para seleccionar la nueva concentración y confirmar si la pérdida de compuestos volátiles durante el proceso de liofilización era percibida por el consumidor.

2.4.4.1 Agrupamiento por descriptores (sorting task)

Los resultados del agrupamiento de las bebidas en polvo fueron codificados en una matriz individual (por consumidor), donde las filas y columnas corresponden a B3(b), B4, B5, B6 y B7 y donde valores 1 indicaban que el asesor ubicó las muestras en el mismo grupo; mientras que un valor de 0 indicó que no fueron agrupadas.

En la tabla 12 se presentan las frecuencias absolutas de los descriptores que más se asociaron con las diferentes bebidas. El descriptor de mayor frecuencia para todas las muestras fue Frutos rojos con porcentajes entre 14.20% (23) a 25.92% (42); seguido del Dulce el cual presentó altos valores de frecuencia para todas las muestras excepto B4.

Los descriptores asociados a la concentración de la infusión de Yerba mate como aroma a Yerba mate y Astringencia fueron asociados a todas las muestras, pero en un porcentaje mucho menor para B7 con 7.44% y 10.43%, respectivamente.

Tabla 12. Frecuencias absolutas de los atributos más frecuentes por muestra.

Agrupamiento por descriptores

Muestra	Descriptores más frecuentes						
	Ácido	Astringente	Amargo	Frutos rojos	Dulce	Viscoso	Yerba mate
B3(b)	20	22	6	32	35	13	21
B4	30	37	25	23	6	7	35
B5	19	22	10	27	31	8	31
B6	37	22	6	38	36	5	25
B7	3	12	3	42	39	24	9
Frecuencia total	109	115	50	162	147	57	121

En la figura 11 se muestra el Análisis de Correspondencia Factorial para los descriptores de las bebidas con diferente concentración de Yerba mate.

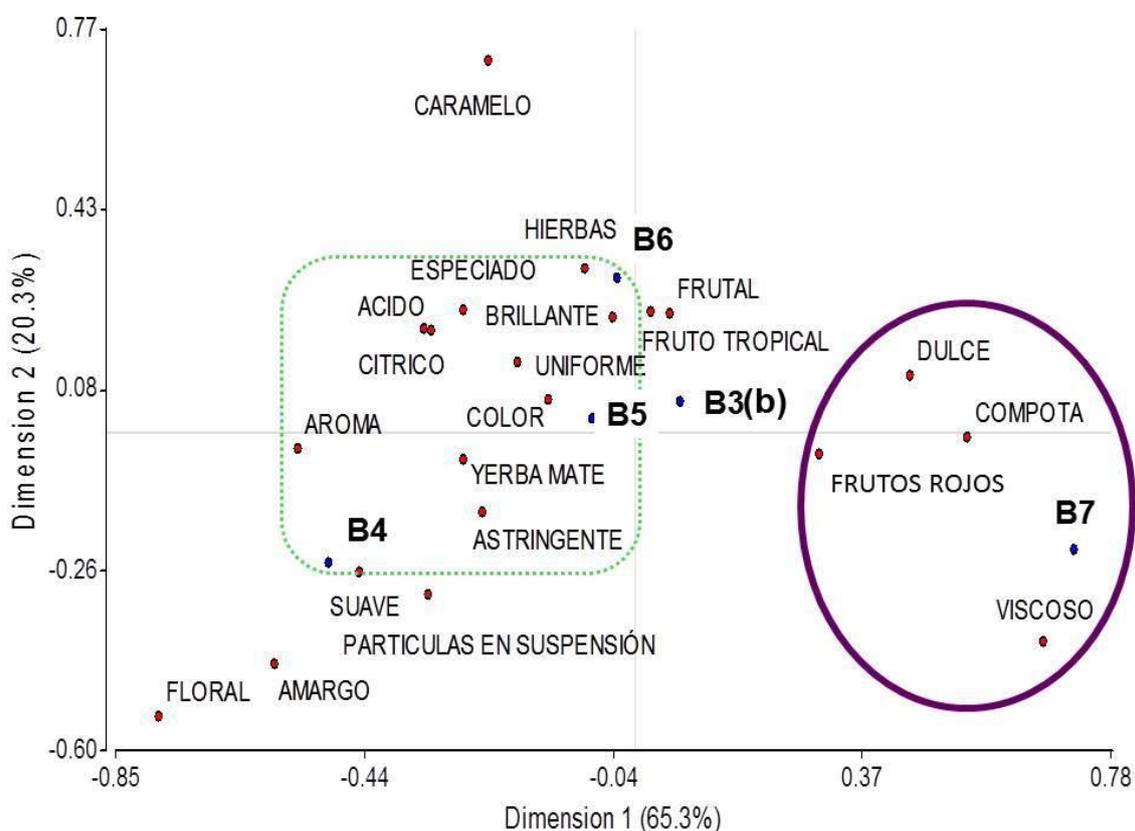


Figura 11. Análisis factorial de correspondencia (AFC) del agrupamiento por descriptores para las formulaciones B3(b), B4, B5, B6 Y B7.

Las muestras B4 y B5 fueron agrupadas por los descriptores de astringencia, aroma a Yerba mate, mientras B7 fue percibida como más dulce, con aroma a frutos rojos y compota, y más viscosa, ubicándose lejos de los descriptores de astringencia y Yerba mate y de las otras muestras. Se observó que las muestras liofilizadas fueron calificadas con pocos descriptores aromáticos, debido a una posible pérdida de aromas durante la liofilización (Figura 11).

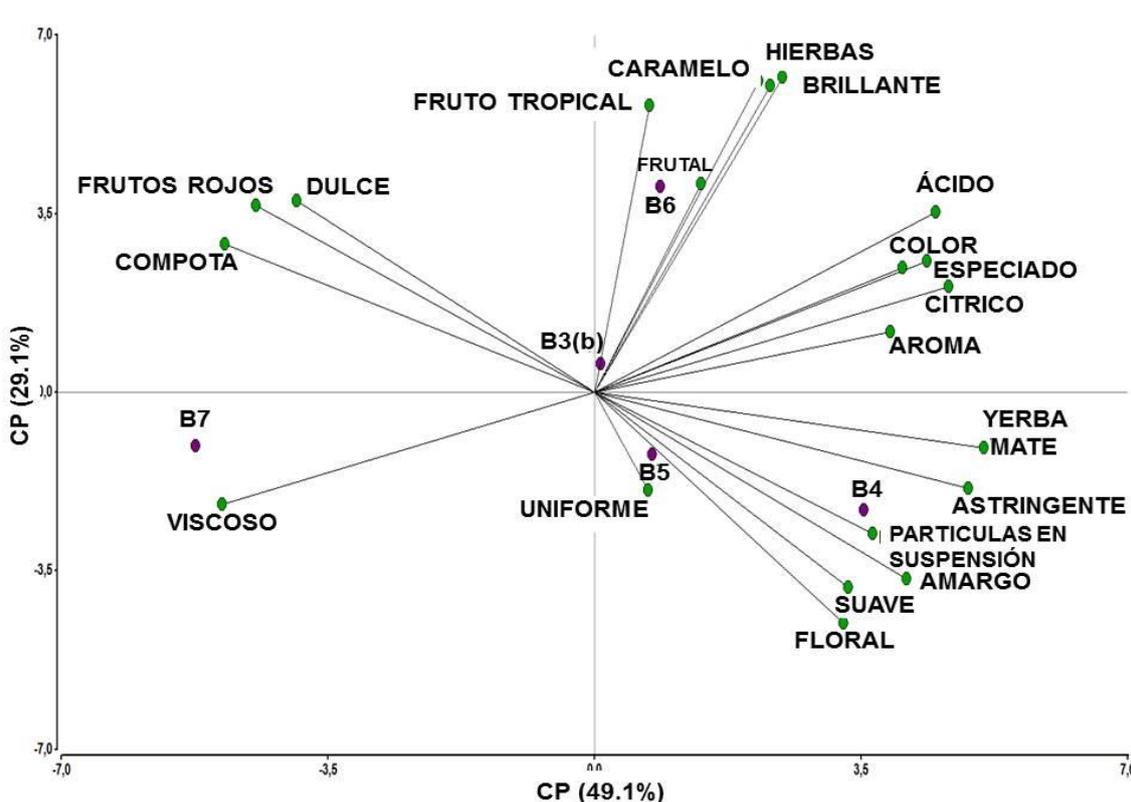


Figura 12. Análisis de Componentes Principales (ACP) del agrupamiento por descriptores para las formulaciones B3(b), B4, B5, B6 Y B7.

En el Análisis de Componentes Principales (ACP; figura 12) de las bebidas en polvo, los dos componentes (CP1 y CP2) explicaron el 78% de la variación total.

El componente 1 explica la mayor variabilidad entre las muestras (49.1%) y separa Viscoso, Compota, Frutos rojos y dulce del resto de descriptores, por lo tanto, la mayor variabilidad entre los agrupamientos de las bebidas se explica por estas variables (Figura 12).

B4 y B5 fueron asociadas con descriptores de *Astringencia*, *Yerba mate*, *Partículas en suspensión* y *Amargo*; mientras B3(b) a pesar de ser la misma formulación B4 liofilizada y reconstituida se ubicó en el centro del gráfico, mostrando una menor variación de los atributos sensoriales.

B6 está asociada por los descriptores aromáticos como *Frutal, Fruto Tropical, Hierbas*; B7 (misma formulación B6 liofilizada y reconstituida) se caracterizó por los descriptores *Viscoso, Frutos rojos, Dulce y Compota*. Con la inspección de los datos de frecuencia, AFC y ACP se comprobó que B7 (Concentración YMI: 60g/L) fue percibida como la bebida diferente de las otras y no fue caracterizada por los descriptores de *Astringencia, Yerba mate y Amargor*; debido a estos resultados se eligió como la concentración de la infusión de Yerba mate final.

2.4.5 Ajuste final de la bebida en polvo

En las etapas anteriores de evaluación sensorial de una nueva bebida en polvo a base de Yerba mate y Cassis, se definió la relación de los materiales principales para la mezcla, la concentración de YMI y la formulación de la mezcla polvo *liofilizado/azúcar/edulcorante*. Estos cambios llevaron a una muestra menos astringente y amarga, con menor aroma a Yerba mate y mayor a frutos rojos, más dulce y viscosa, además el producto fue percibido por los consumidores como un “Jugo concentrado”.

La cantidad de polvo liofilizado por litro (180 g de polvo liofilizado/L agua potable) fue considerada muy alta para una bebida en polvo, haciendo los rendimientos de producción muy bajos. Por estos motivos, se decidió evaluar concentraciones del polvo inferiores y realizar el ajuste requerido para obtener una muestra con buena aceptabilidad sensorial.

2.4.5.1 Evaluación de la concentración final de polvo liofilizado en la bebida

En la figura 13 se muestran los resultados de la escala de punto justo (JAR) para la concentración ideal. La bebida B9 con una concentración de polvo liofilizado de 60 g/L obtuvo el mayor porcentaje de calificación en el punto justo (53.75%), seguida de B8 (90 g/L) con un 32.5% y finalmente B10 (45 g/L) con 11.25%. Mostrando una marcada preferencia entre la concentración de B9 y B10. La bebida B10 fue considerada por el 82.5% como poco concentrada (valores entre -1 y -4) y el 53.75% calificaron a B8 como muy concentrada (valores entre 1 y 4).

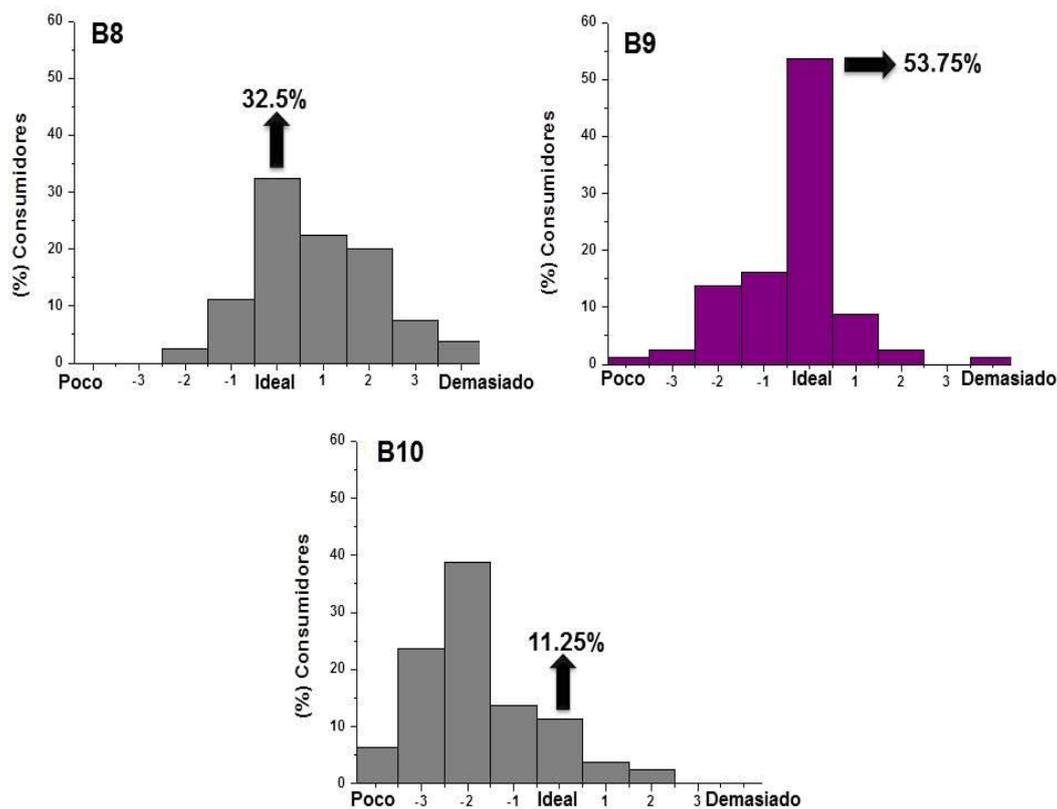


Figura 13. Frecuencia de consumidores (%) para cada puntuación en la escala de punto justo para concentración ideal (JAR) por bebida B8 (90 g/L), B9 (60 g/L) y B10 (45 g/L).

En la evaluación de los atributos sensoriales para las tres bebidas (Figura 14) se observó que para B9 todos los atributos presentaron los porcentajes más altos en el valor ideal de la escala (JAR). Comparando los puntajes para B8 y B9, solo el atributo aroma fue considerado por menos consumidores (40%) como ideal para B9. Las puntuaciones para el atributo dulzor variaron solo entre el 1.25 y 6.25%, debió a que la concentración de los compuestos endulzantes (azúcar y edulcorante) se mantuvo constante para las tres formulaciones.

Los consumidores percibieron a B10 como diluida (mayor porcentaje para valores entre -1 y -4), poco dulce (56.25%), con poco aroma (67.5%), poco cuerpo (80%) y color (80%); indicando que la concentración de 45 g/L de polvo liofilizado en la bebida era insuficiente (Figura 14).

Basados en los resultados obtenidos, se eligió como como concentración ideal de polvo en la mezcla a B9 (60 g/L) y se propuso continuar con un ajuste en los atributos de aroma y dulzor.

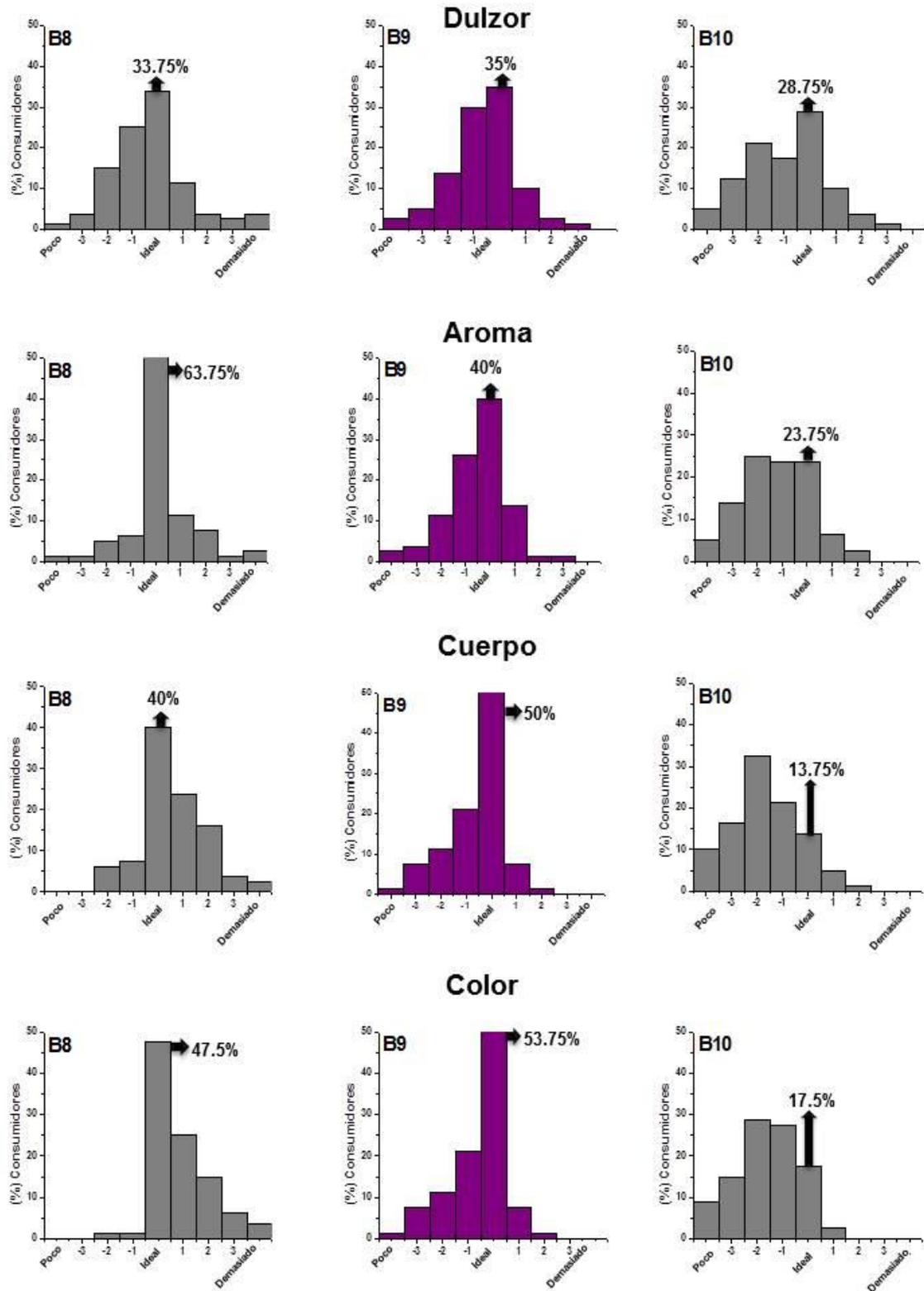


Figura 14. Frecuencia de consumidores (%) para cada puntuación en la escala de punto justo (JAR) para atributos sensoriales por bebida B8 (90 g/L), B9 (60 g/L) y B10 (45 g/L).

En el apartado 2.4.4.1 se observó que los consumidores describieron a la bebida en polvo con pocos descriptores aromáticos, lo cual puede ser atribuido a una posible pérdida de aromas durante la liofilización; además en el ajuste de la concentración de polvo liofilizado (*apartado 2.4.5*) solo el 40% de los consumidores consideraron a dicho atributo como ideal para la muestra seleccionada. Por este motivo, se decidió probar un nuevo aroma y adicionarlo tras la liofilización.

2.4.5.2 Ajuste del dulzor y aroma

Cuarenta consumidores evaluaron los atributos dulzor y aroma para la bebida B9 y dos modificaciones, la primera (B11) incluyó solo un cambio por el aroma “Frutos rojos”, y la segunda (B12) adicional al cambio de aroma un cambio en la relación de azúcar/edulcorante (Véase tabla 7). Además, se incluyó la evaluación de la aceptabilidad global. En la tabla 13 se presentan los datos obtenidos para los atributos dulzor y aroma (% Consumidores) y para aceptabilidad global (Valores medios).

Tabla 13. Valores obtenidos para ajuste de dulzor y aroma ideal.

Muestra	Aceptabilidad** (escala hedónica 9-pts)	Dulzor ideal (%Consumidores)*	Aroma ideal (%Consumidores)
B9	6.10±1.95 ^{ns}	17.5	25
B11	5.65±1.78 ^{ns}	17.5	45
B12	6.55±1.74 ^{ns}	47.5	30

*El porcentaje restante no eligió ninguna de las muestras.

**Prueba de Tukey (P<0.05). (ns) No presenta diferencia significativa.

B12 tuvo la mayor aceptabilidad (6.55 en una escala hedónica de 9 puntos) y dulzor ideal, sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre las muestras. En comparación con la aceptabilidad obtenida en la primera etapa (*apartado 2.4.2.1*) se aprecia un aumento de casi un punto en la escala hedónica (0.95). El 70% de los consumidores puntuó a B12 con valores entre 6 a 9 frente a un 57% registrado para B3 en la primera etapa de evaluación sensorial, mostrando una mayor preferencia por la formulación lograda.

Basados en estos resultados se eligió para la bebida en polvo final el aroma final de “Frutos Rojos” (0.10% p/p) y 0.10% (p/p) de edulcorante. Por lo tanto, B12 fue seleccionada como formulación final de la bebida en polvo, ya que presentó una mejora notoria en las calificaciones de aceptabilidad con respecto a las muestras anteriores, además de ser calificada con aroma, dulzor, cuerpo y color ideal por los consumidores.

Con el fin de confirmar el porcentaje final de aroma en la bebida se realizó un segundo ensayo sensorial, donde se evaluó nuevamente la aceptabilidad global, el dulzor y aroma ideal de la formulación B12 contra una nueva formulación (B13) que incluía solo una variación en el componente aroma (0.12% p/p).

B13 tuvo una puntuación para aceptabilidad de 6.7 ± 1.4 y B12 de 6.9 ± 1.1 . El 42.5% de los consumidores consideraron a B12 con el dulzor ideal, mientras que el 30% a B13. Sin embargo, el 55% puntuó a B13 con el aroma ideal y 40% a B12.

Un aumento en el porcentaje de aroma del 0.02% no favoreció la aceptabilidad y disminuyó la calificación para el atributo dulzor (previamente ajustado), confirmando la selección del porcentaje 0.10% de aroma frutos rojos.

2.4.6 Perfil descriptivo de la muestra seleccionada (método CATA)

El perfil descriptivo obtenido por la metodología **Spectrum** para B12 seleccionada se muestra en la figura 15. Los atributos de mayor intensidad fueron el color y el aroma a frutos rojos, mostrando un buen balance entre el dulce y el ácido, dado que ambos están presentes con predominio del dulce. Asimismo, la astringencia no es un atributo predominante y la muestra presenta una apariencia atractiva manifestada por la intensidad de los atributos de brillo y color.

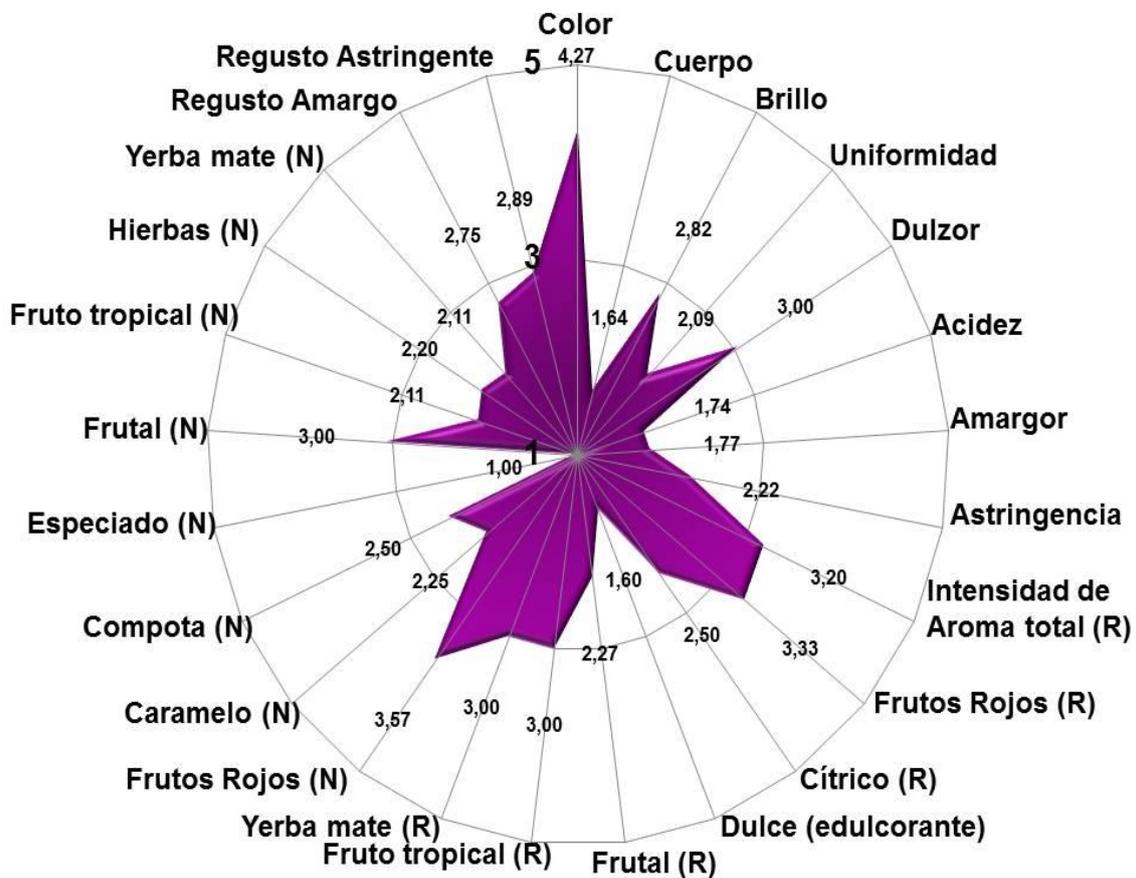


Figura 15. Gráfico araña para el perfil descriptivo obtenido por el método CATA semi-cuantitativo para B12 (Nasal (N); Retronasal (R)).

Los resultados obtenidos con el uso de escalas por los mismos evaluadores se presentan en la figura 16. Se observó que el atributo de mayor intensidad fue el aroma y sabor a Frutos rojos, seguido por el dulzor, los puntajes obtenidos tanto para brillo como para color confirman que la bebida presenta una apariencia atractiva para el consumidor.

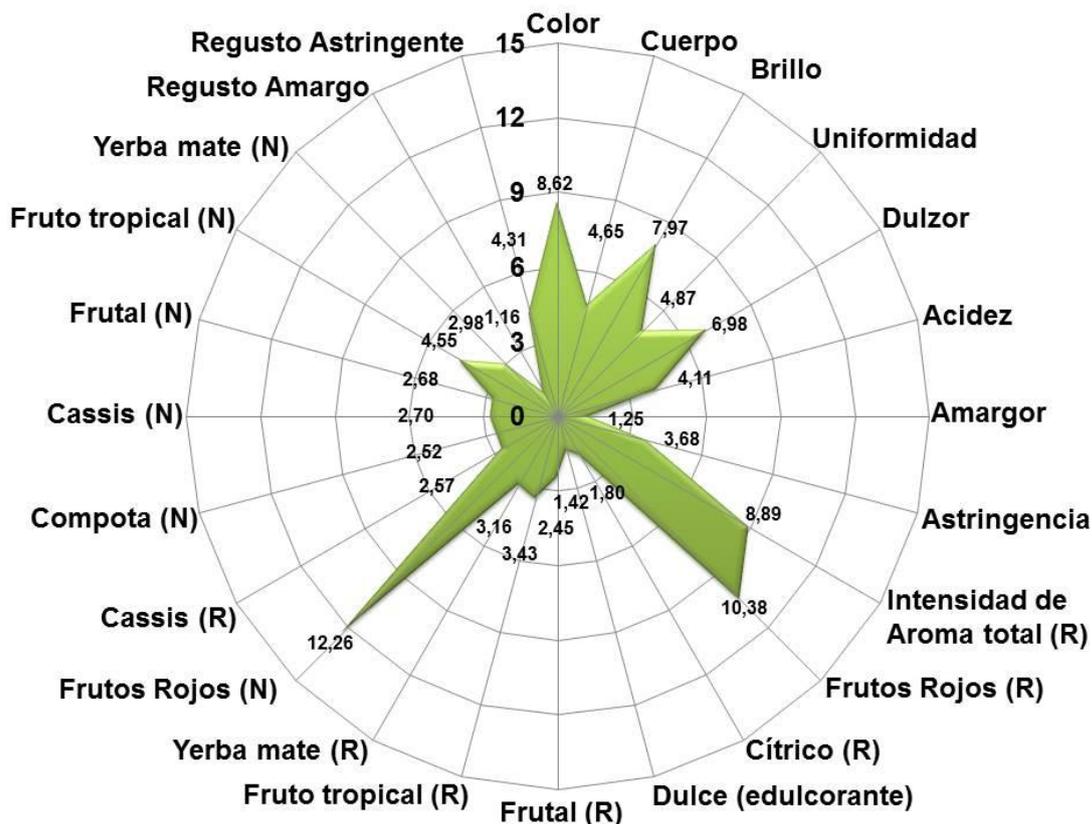


Figura 16. Gráfico araña para el perfil descriptivo obtenido con el uso de escalas (0 a 15) (Cuantitativo) para B12 (Nasal (N); Retronasal (R)).

B12 se caracterizó por la percepción mínima de regustos amargos y astringente, además de la baja percepción del atributo *Yerba mate*; estos influyeron negativamente en las puntuaciones de aceptabilidad de las formulaciones anteriores (B3; B3(b) y B7).

2.4.7 Medición de la sensación temporal dominante (STD)

La información recolectada durante el ensayo con panelistas entrenados corresponde al atributo seleccionado como dominante en el tiempo y la duración de la dominancia; solamente un atributo puede ser seleccionado por el panelista en un tiempo determinado.

En la tabla 14 se presentan los parámetros obtenidos con el software Sensomaker v1.8; donde DUR_{max} corresponde a la velocidad máxima de la dominancia para cada atributo evaluado, t_{max} el tiempo de duración de DUR_{max} y $t_{max 90\%}$ es el intervalo en el cual la velocidad de dominancia es mayor o igual al 90% de DUR_{max} . Los valores presentados corresponden a la evaluación de la Bebida B12 durante 60 s.

Tabla 14. Valores de DUR_{max} , t_{max} y $t_{max 90\%}$ para B12

Atributos	DUR max	Tmax	tmax 90%
<i>Dulce</i>	0.373	9.00	25.20
<i>Ácido</i>	0.217	60.00	24.00
<i>Amargo</i>	0.149	60.00	0.00
<i>Astringente</i>	0.253	58.80	3.00
<i>Aroma Total (R)</i>	0.165	18.60	36.00
<i>Frutos Rojos (R)</i>	0.607	27.00	8.00
<i>Cassis (R)</i>	0.000	0.00	0.00
<i>Yerba mate (R)</i>	0.109	28.20	27.60

El atributo *Dulce* es el primero en ser percibido y en alcanzar su valor de DUR_{max} con un tiempo de 9 segundos seguido de *Frutos rojos*, el cual presenta una dominancia intensa con el valor más alto de DUR_{max} alcanzado a los 27 segundos del ensayo (tabla 14). Los atributos de *Astringente*, *Ácido* y *Amargo* presentan sus correspondientes valores de velocidad máxima de dominancia cerca del final de la medición. Los atributos Yerba mate (R) y Cassis (R) no son significativos para la muestra evaluada, en el casos del segundo de estos no presentó valores máximos durante el ensayo.

Se calculó el nivel de oportunidad (P_o) que corresponde a la velocidad de dominancia que un atributo puede obtener por el azar (Pineau y col., 2009; Di Monaco y col., 2014). Este valor es inversamente proporcional al número de atributos evaluados (P) (Ec. 2)

$$P_o = \frac{1}{P} \quad \text{(Ec. 2)}$$

El nivel de significancia es el valor mínimo que debe tener la velocidad de dominancia para ser considerada significativamente mayor que P_o y se calcula para el intervalo de confianza de la proporción binomial basado en una aproximación normal (Ec. 3).

$$P_s = P_o + 1.645 * \sqrt{\left[P_o * \frac{(1-P_o)}{n} \right]} \quad \text{(Ec. 3)}$$

Donde P_s es el valor proporcional de menor significancia ($\alpha= 0.05$) a cualquier valor de tiempo para las curvas STD y n es el número de corridas (panelistas*replicado). Los valores de P_o y P_s para este ensayo fueron de 0.125 y 0.199 respectivamente.

En la figura 17 se presentan las curvas de STD para los ocho atributos durante 60 segundos y por sorbos en función del tiempo para B12. El eje *y* hace referencia al porcentaje de selecciones para cada atributo a un punto particular de tiempo, se calcula dividiendo el número de citaciones de cada atributo entre el número de corridas *n* (panelistas*replicado); dichas velocidades pueden verse como un reflejo de un consenso de los panelistas y del comportamiento del panel, a mayor velocidad mayor fue el consenso (Pineau y col., 2009). Los niveles de oportunidad (P_o) y significancia (P_s) se representaron en el gráfico.

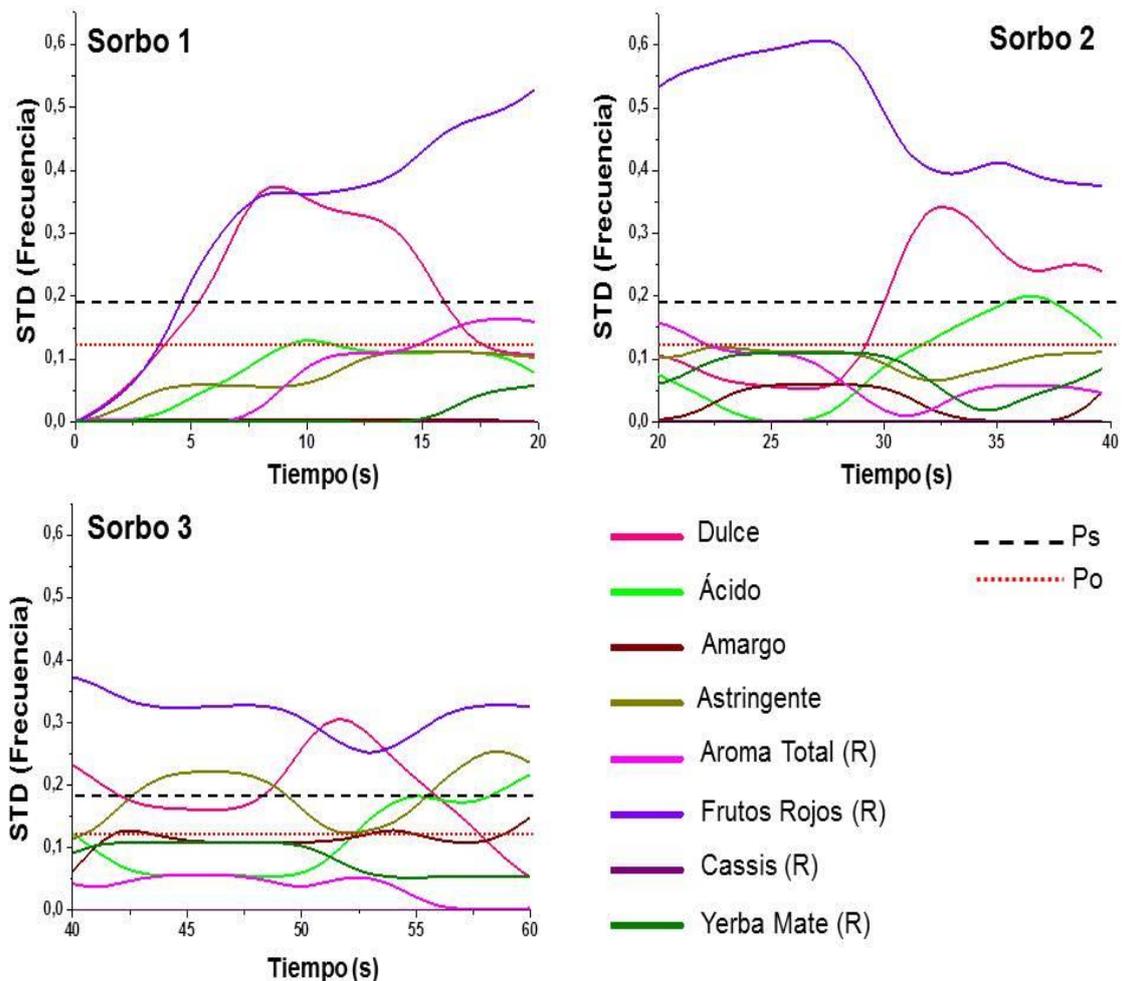


Figura 17. Curvas STD para los ocho atributos durante tres sorbos (inicial, 20 y 40 segundos) para B12.

Durante los tres sorbos, el perfil temporal de la muestra se caracterizó por las dominancia de los atributos *Dulce* y *Frutos rojos*; primero se percibió el dulce, seguido de una dominancia intensa del atributo Frutos rojos (R), cuando este último disminuye se percibe nuevamente el dulce y finalmente aparece la astringencia.

El sorbo 1 se caracterizó por una fuerte percepción del atributo Frutos rojos con una tendencia al aumento durante los 20 s; mientras que el Dulce mostro un comportamiento similar hasta los 10 s con un posterior decaimiento (Figura 17), cayendo por debajo de P_s y P_o a los 20 s. Las intensidades de los otros seis atributos no fueron significativas durante este sorbo.

En los primeros segundos (21 al 27 s) tras la ingesta del segundo sorbo, la muestra fue caracterizada por una alta dominancia de Frutos rojos (R) alcanzando su valor de **DURmax**; durante esta fracción de tiempo los 7 atributos restantes no fueron significativos. A partir de los 28 s aparece nuevamente el Dulce aumentando por encima de P_o , P_s y alcanzando a los 32 s la **DURmax** en el sorbo 2; durante este intervalo de tiempo el atributo Frutos Rojos (R) presento un comportamiento inverso (Figura 17). Al disminuir la percepción de la dominancia de Frutos Rojos (R) aumento el atributo *Dulce*. La aparición de la acidez se observa entre los 35 a 37 s, decayendo rápidamente por debajo del nivel de significancia.

Frutos Rojos (R) también fue dominante durante el sorbo final con valores de dominancia menores a los obtenidos en los sorbos previos y una leve disminución (8%) con una recuperación rápida de la dominancia reflejada en el pico formado entre los 50 y 57 s (Figura 17).

Una recuperación de la dominancia del dulzor se observó 8 s después de la ingesta del sorbo final, alcanzando a los 51 s la DUR_{max} en el sorbo. Este comportamiento fue similar al observado en el sorbo 2.

El atributo astringencia alcanza valores significativos en este sorbo, en un primer rango desde los 42 s hasta el inicio del aumento de la dominancia del dulzor; posteriormente alcanzo su valor de dominancia máxima $DUR_{max} = 0.253$ a los 58.80 s. Por lo tanto, la astringencia recién aparece cuando la intensidad de los otros atributos decae y no hay evidencias de efectos acumulativos en los diferentes sorbos.

En estudios similares para jugo de naranja endulzado con azúcar, Zorn y col., (2014) reportaron una dominancia del dulzor en los 3 sorbos (0 a 60 s), siendo el único atributo significativamente dominante durante los primeros dos sorbos (0 a 20 s y 21 a 40 s). El atributo *Sabor Naranja* mostro dominancias inferiores a P_s y P_o durante toda la evaluación y la presencia de la acidez tan solo fue observada al final del último sorbo.

En la bebida B12 primo el atributo *Frutos rojos (R)* sobre el *dulce*, esto puede ser atribuido a la adición del aroma. Los atributos *Yerba mate (R)* y *Cassis (R)* relacionados directamente con las materias primas empleadas en la producción de la bebida, presentaron valores de dominancia inferiores a P_s y P_o , siendo no significativos durante toda la evaluación.

Ng y col., (2014) estudiaron el perfil temporal para diferentes formulaciones de jugo de Cassis con diferentes tipos de edulcorantes, encontrando que las mezclas se caracterizaban por la dominancia de 3 atributos: *dulzor*, *Cassis natural* y *acidez*, además que los cambios temporales en la dominancia del dulzor y el atributo afrutado (Fruitiness) podían ser afectados por la complejidad en la combinación de ingredientes de la composición del jugo de Cassis en lugar del tipo de edulcorante.

En el caso del atributo *Cassis* para B12, la baja dominancia pudo deberse al poco consumo del producto fresco o mínimamente procesado, su inclusión en la categoría de frutos rojos que no facilita su diferenciación y a la adición del aroma “Frutos Rojos” en la formulación B12.

El perfil temporal dominante de B12 mostró que el atributo Frutos Rojos (R) fue la sensación temporal dominante durante el rango de tiempo evaluado y para los 3 sorbos; también evidencio el aumento en la dominancia del dulzor después de cada ingesta durante los tres sorbos, seguido de un decrecimiento más lento en la velocidad de dominancia; esta tendencia fue similar a la observada por Zorn y col., (2014) para jugos endulzados con azúcar.

2.4.8 Evaluación de la aceptabilidad de las muestras a través de los registros Intensidad-Tiempo.

La evaluación en el tiempo de la aceptabilidad de B12 con consumidores se representa en la curva promedio de IT para los cuatro sorbos (Figura 18). La aceptabilidad presenta un rápido incremento durante los primeros 10 s del primer sorbo, continuando con un leve aumento durante los sorbos posteriores. Es de destacar el alto nivel de aceptabilidad de B12 y su incremento en los sucesivos sorbos, indicando una alta probabilidad de que la bebida sea adoptada por los consumidores.

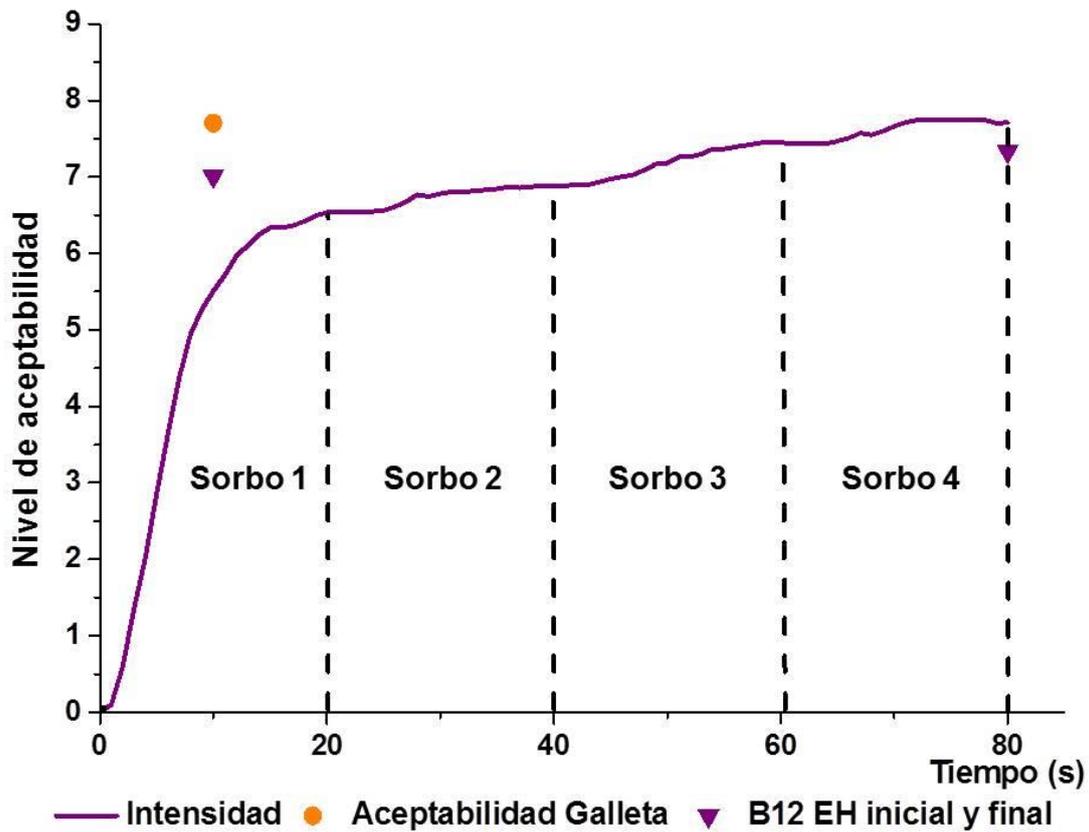


Figura 18. Curva intensidad –Tiempo (IT) promedio de aceptabilidad durante la ingestión de cuatro sorbos por un período de 80 segundos.

▼ Escala hedónica (EH) antes y después del ensayo dinámico de B12.

Con el fin de comparar las mediciones dinámicas (IT) con las medidas estáticas tradicionales (escala hedónica, EH), se midió la aceptabilidad inicial (antes de comenzar con el registro IT) y al finalizar, estas mediciones están incluidas en la figura 18. El valor de aceptabilidad inicial fue de 7.0 ± 1.2 por EH y el final 7.3 ± 1.0 , la variación no fue significativa ($p > 0.05$; prueba de Tukey).

Los valores de aceptabilidad por medio de los registros IT se analizaron para cada sorbo. En el sorbo 1 la aceptabilidad de B12 alcanzó un valor de aceptabilidad de 6.7 ± 1.5 , aumentando progresivamente con cada sorbo (Sorbo 2= 7.1 ± 1.3 ; Sorbo 3= 7.5 ± 1.3) hasta un aumento del 18.3% al finalizar la medición (Sorbo 4= 7.9 ± 1.2). Durante el tiempo evaluado con sorbos sucesivos no se observó decrecimiento de la aceptabilidad, sugiriendo que la bebida B12 mantiene su aceptabilidad tras sucesivas ingestas.

Para cotejar el nivel de agrado de B12 con algún producto de aceptabilidad conocida, se midió con los mismos consumidores la preferencia de una galleta de chocolate usando una escala hedónica (EH) (Figura 18). La aceptabilidad de la galleta comercial fue de 7.7 ± 1.3 y no presento diferencias significativas con los valores de aceptabilidad iniciales y finales (EH), ni con la intensidad máxima del último sorbo evaluado por IT para B12, evidenciando la potencial aceptabilidad de la nueva bebida en el mercado.

La aceptabilidad de B12 se puede relacionar con la combinación de los atributos dominantes Frutos rojos y dulzor y la notoria disminución de la astringencia, la cual aparece cuando baja el dulzor del último sorbo pero no afecta la aceptabilidad final.

2.5 Conclusiones

- Se evaluaron diferentes combinaciones de sabores de frutas (tanto artificiales como naturales) con infusiones de Yerba mate, eligiendo el Cassis como el material más llamativo por su sabor y color que permitió enmascarar la infusión de Yerba mate. Las mezclas obtenidas de YMI/Cs se liofilizaron para obtener las bebidas en polvo.
- Los análisis sensoriales iniciales arrojaron que la formulación B3 obtuvo mayor aceptabilidad, mejor perfil de atributos de diagnóstico e intención de compra, indicando que los consumidores “Ciertamente o probablemente comprarían la bebida. Sin embargo, el atributo “*Astringencia*” fue característico de todas las muestras, siendo necesario aumentar el dulzor y disminuir la concentración de la infusión de yerba usada.
- La aceptabilidad de una nueva bebida puede ser mejorada a través de la exposición repetida y este proceso puede ser facilitado por un gusto hedónicamente positivo como el dulzor. El efecto de la exposición repetida (cuatro veces) de la nueva bebida no fue suficiente para incrementar la intención de compra. La aceptabilidad por parte de los consumidores puede incrementarse con la exposición repetida, sin cambiar la evaluación analítica de la primera impresión.

- El atributo de diagnóstico “Dulzor” tuvo una alta influencia en la percepción de los otros atributos “Acidez, Aroma y Cuerpo”; pudiendo contribuir a mejorar los valores de aceptabilidad obtenidos después de cuatro exposiciones. El nivel óptimo de dulzor afectó la elección de los términos por parte de los consumidores, dado que las emociones generadas por la muestra más dulce fueron siempre positivas.
- Los consumidores más jóvenes otorgaron los valores más altos y presentaron una actitud más positiva cuando probaron la nueva bebida, mientras que el grupo de mayor edad mostraron los valores más bajos de aceptabilidad e intención de compra, demostrando un estatus emocional negativo hacia sabores innovadores.
- Por medio del Análisis de Correspondencia factorial y el Análisis de Componentes Principales, se determinó la concentración ideal de la infusión de Yerba mate (B7 Concentración YMI: 60g/L) para que los atributos astringencia y amargor no afecten la aceptabilidad de la bebida en polvo.
- Tras los ajustes en la concentración de polvo, azúcar, edulcorante y aroma se obtuvo el producto final (B12). Los análisis sensoriales realizados para determinar el grado de aceptabilidad de esta bebida mostraron que, la combinación de sus dos principales componentes Yerba mate/ Cassis fue ampliamente aceptada por los consumidores.

- Su perfil descriptivo se caracterizó por una apariencia atractiva manifestada por la intensidad de los atributos de brillo y color, un intenso aroma a frutos rojos, con un buen balance entre el dulzor y la acidez, dado que ambos están presentes con predominio del dulzor. Asimismo, la astringencia no es un atributo predominante. El balance aroma a frutos rojos/dulzor dio realce al sabor final de la bebida. Es de señalar que los atributos de astringencia y amargor, que generalmente tienen un tono hedónico negativo, presentaron niveles bajos y no incidieron en la aceptabilidad global de la bebida.
- El uso de la metodología STD permitió conocer el perfil sensorial dinámico de la bebida en polvo final, caracterizándose por dos atributos dominantes en el tiempo “Frutos rojos y Dulce” también determinados en el perfil sensorial por el método descriptivo cuantitativo ***Spectrum***.
- Los ensayos de intensidad-tiempo evidenciaron un aumento en la aceptabilidad de la bebida durante las diferentes ingestas; junto con la información obtenida por STD permitió verificar la probable adopción de esta nueva bebida por los consumidores. Esto ocurre en algunas ocasiones debido a que los gustos o aromas residuales que se perciben luego de consumos sucesivos llevan a que los consumidores rechacen el producto inicialmente aceptado. Por lo tanto, se puede concluir que la aceptabilidad de la bebida es altamente promisorio como una nueva alternativa de bebidas saludables en polvo con un amplio perfil de polifenoles provenientes de la Yerba mate y del Cassis.

Capítulo III

Efecto de las condiciones de almacenamiento en las características fisicoquímicas de polvos correspondientes a la formulación preliminar



Capítulo III. Efecto de las condiciones de almacenamiento en las características fisicoquímicas de polvos correspondientes a la formulación preliminar.

3.1 Introducción

Las propiedades fisicoquímicas de los jugos instantáneos tales como el color, solubilidad, fluidez, composición de compuestos bioactivos y la actividad antioxidante pueden sufrir alteraciones indeseables durante el almacenamiento.

Los compuestos polifenólicos, en especial las antocianinas pierden estabilidad por factores como el pH, la exposición a la luz, los cambios de temperatura, la presencia de oxígeno y las actividades enzimáticas (Bakowska y col., 2008); el contenido de agua presente en el alimento puede favorecer el deterioro de dichos compuestos (Syamaladevi y col., 2011). La velocidad con que se producen estos cambios depende fuertemente de la temperatura de almacenamiento ($T_{\text{almacenamiento}}$), de la humedad del polvo y del estado físico en el cual se encuentre el producto.

La temperatura de transición vítrea (T_g) está definida como la temperatura a la cual un sistema amorfo cambia del estado vítreo (alta viscosidad; 10^{12} Pa.s) a un estado gomoso (Roos y col., 2010).

Algunos de los componentes de los jugos en polvo tales como azúcares de bajo peso molecular y ácidos orgánicos, poseen bajos valores de T_g ; y sumado su alta higroscopicidad pueden generar problemas de fluidez y pegajosidad durante el almacenamiento (Ferrari y col., 2012).

Capítulo III. Efecto de las condiciones de almacenamiento en las características fisicoquímicas de polvos correspondientes a la formulación preliminar.

Para proporcionar un estado vítreo metaestable los valores de $T_{\text{almacenamiento}}$ deben ser inferiores a los valores de T_g del producto, evitando cambios apreciables en las características fisicoquímicas y sensoriales como la textura y el color del producto (Roos, 1991) y la ocurrencia de reacciones químicas de deterioro de difusión controlada (Tonon y col., 2009).

Sin embargo, algunos autores han demostrado que algunas reacciones como el pardeamiento no enzimático ocurren durante dicho estado (Shebor y col., 1999; Miao y Roos, 2004).

Estudiar la interacción de la $T_{\text{almacenamiento}}$, la humedad de almacenamiento y los valores de T_g en las características fisicoquímicas, es de fundamental importancia para minimizar la degradación de los compuestos bioactivos y evitar el deterioro de la calidad del polvo por apelmazamiento, pegajosidad, colapso y aparición de coloraciones indeseables.

3.2 Objetivo

Evaluar la interacción entre las condiciones de almacenamiento (tiempo, y temperatura) y humedad de polvos correspondientes a la formulación B3(b) en sus propiedades físicas (temperatura de transición vítrea, color, solubilidad y microestructura) y químicas (composición de compuestos bioactivos y capacidad antioxidante).

Capítulo III. Efecto de las condiciones de almacenamiento en las características fisicoquímicas de polvos correspondientes a la formulación preliminar.

3.3 Materiales y métodos

En los resultados obtenidos en la etapa 1 (Véase *Capítulo 2, apartado 2.4.2*), se determinó que la bebida B3 tenía mayor aceptabilidad y mejor perfil de atributos de diagnóstico; sin embargo, las muestras obtenidas eran altamente higroscópicas y de difícil manipulación. Para solucionar esto, la mezcla YMI:Cs /maltodextrina/aroma se liofilizó sola y los endulzantes en forma sólida se incorporaron al polvo resultante.

Esta nueva formulación se denominó **B3(b)** y su relación de componentes sólidos fue : [Mezcla **YMI** (120 g/L hojas yerba)/**Cs**/**MD**(15%p/v)/**Aroma FP**(0.01% p/v) 77.4% p/p, **Azúcar** 22.4% p/p; **Edulcorante** 0.2% p/p (**ANEXO 9**).

3.3.1 Almacenamiento

Para analizar el efecto de la temperatura de almacenamiento y la humedad ambiente en las propiedades fisicoquímicas de B3(b), las muestras se envasaron en frascos color ámbar (5g/frasco; figura 19) y se expusieron a cuatro tratamientos (Trt):

- **Trt 1** (20°C; sellado hermético; H₁)
- **Trt 2** (40°C; sellado hermético; H₂)
- **Trt 3** (20°C; 33% HR; H₃)
- **Trt 4** (40°C; 33% HR; H₄)
- **Control** (-20°C; sellado hermético; H_i)

Capítulo III. Efecto de las condiciones de almacenamiento en las características fisicoquímicas de polvos correspondientes a la formulación preliminar.

Donde, H_i corresponde a la humedad inicial del polvo y H_1 , H_2 , H_3 y H_4 la humedad final adquirida durante el almacenamiento para cada tratamiento.



Figura 19. Frascos usados durante el almacenamiento de B3(b).

Para Trt 1 y Trt 2 los frascos fueron sellados herméticamente para preservar la humedad inicial de la muestra (Rocha y col., 2016). En el caso de Trt 3 y Trt 4 los frascos se almacenaron abiertos en desecadores herméticos que contenían una solución saturada de Cloruro de Magnesio ($MgCl_2$) para proporcionar una humedad relativa (%HR) de 33%.

Las muestras se almacenaron en estufas a $20^\circ C$ (Trt 1 y Trt 3) o $40^\circ C$ (Trt 2 y Trt 4) durante 90 días; los resultados se compararon con los de una muestra control almacenada en frascos herméticos a $-20^\circ C$. En la tabla 15 se presentan los tiempos de muestreo y los ensayos físicos y químicos empleados durante el estudio.

Capítulo III. Efecto de las condiciones de almacenamiento en las características fisicoquímicas de polvos correspondientes a la formulación preliminar.

Tabla 15. Días de toma de muestra para los ensayos físicos y químicos durante el almacenamiento de B3(b).

Muestreo (días)	0	3	7	10	15	30	65	90
Ensayos físicos								
Color	x		x		x	X	x	X
Solubilidad	x		x		x	X	x	X
Humedad	x							X
DSC (T _g)	x							X
Microestructura (SEM)	x							X
Ensayos químicos								
Polifenoles Totales	x							X
Antocianinas	x	X	x	X	x	X	x	X
Actividad antioxidante	x	X	x	X	x	X	x	X

3.3.2 Ensayos Físicos

Para la determinación de sólidos solubles totales (SST) y solubilidad, el polvo de B3(b) se reconstituyó según lo expuesto en el *Capítulo 2, apartado 2.3.4, Tabla 4*.

3.3.2.1 Sólidos solubles totales (SST):

El principio de medición se basa en la refracción de la luz creada por el tipo y concentración de los solutos (por ejemplo el azúcar). La unidad de medida es grados Brix, donde 1°Brix correspondería a un índice de refracción de una solución de sacarosa en agua al 1%.

Capítulo III. Efecto de las condiciones de almacenamiento en las características fisicoquímicas de polvos correspondientes a la formulación preliminar.

La escala Brix expresa entonces, el contenido de azúcar en g de sacarosa por 100 g de solución acuosa, así 20 °Brix ~ 20% p/p de sacarosa en solución (Bakker y Clarke, 2011).

El contenido de SST de las infusiones de Yerba mate, pulpa de Cassis y las bebidas reconstituidas se determinó con un refractómetro manual Atago N2 (Tokyo, Japan).

3.3.2.2 Actividad acuosa (a_w)

La actividad acuosa (a_w) del polvo fue determinada con un equipo Aqualab serie 3 (Decagon Device, Pullman, Washington, USA), previamente calibrado con soluciones salinas saturadas con actividades acuosas en el rango de interés.

3.3.2.3 Humedad:

El contenido de humedad del polvo se midió mediante secado en estufa (Sanjor serie SL DB; Buenos Aires, Argentina) a $105 \pm 1^\circ\text{C}$ hasta alcanzar peso constante. Todas las determinaciones se hicieron por triplicado. El porcentaje de humedad (**$H(\%)$**) se calculó mediante la ecuación (4):

$$H(\%) = \left[\frac{(P_l - P_s)}{P_l} \right] * 100 \quad \text{(Ec. 4)}$$

Donde, **P_l** es el peso del producto liofilizado (g) y **P_s** es el peso seco final (g).

Capítulo III. Efecto de las condiciones de almacenamiento en las características fisicoquímicas de polvos correspondientes a la formulación preliminar.

3.3.2.4 Comportamiento térmico

La calorimetría Diferencial de Barrido (DSC; Differential Scanning Calorimetry) es una técnica basada en la medición de la capacidad calorífica relativa de un sistema determinado cuando este sufre una transición inducida por un cambio térmico (Beldarraín, 2001). Consiste en calentar simultáneamente una cápsula que contiene la muestra enfrentada a una de referencia vacía a la misma velocidad. Al calentar la muestra se produce una transición inducida por la temperatura que absorbe parte del calor suministrado, por lo tanto la temperatura de la muestra será menor que la de la cápsula referencia. Para mantener las temperaturas constantes el sistema suministra una potencia de calentamiento adicional proporcional a la diferencia de capacidades caloríficas entre la muestra y la referencia. En el caso de la transición vítrea, el aumento de movilidad molecular y de volumen libre cuando el polvo pasa al estado gomoso provocan un cambio endotérmico en la capacidad calorífica detectable por DSC (Haque y Roos, 2006).

En la figura 20 se muestra un termograma típico de un azúcar liofilizado y sus transiciones de fase; este se obtiene de la representación de la potencia de calentamiento vs temperatura. El cambio en el calor específico de un sólido que ocurre a la temperatura de transición vítrea (T_g), se evidencia como un cambio en la pendiente de la línea de base del termograma (Roos, 1992).

Capítulo III. Efecto de las condiciones de almacenamiento en las características fisicoquímicas de polvos correspondientes a la formulación preliminar.

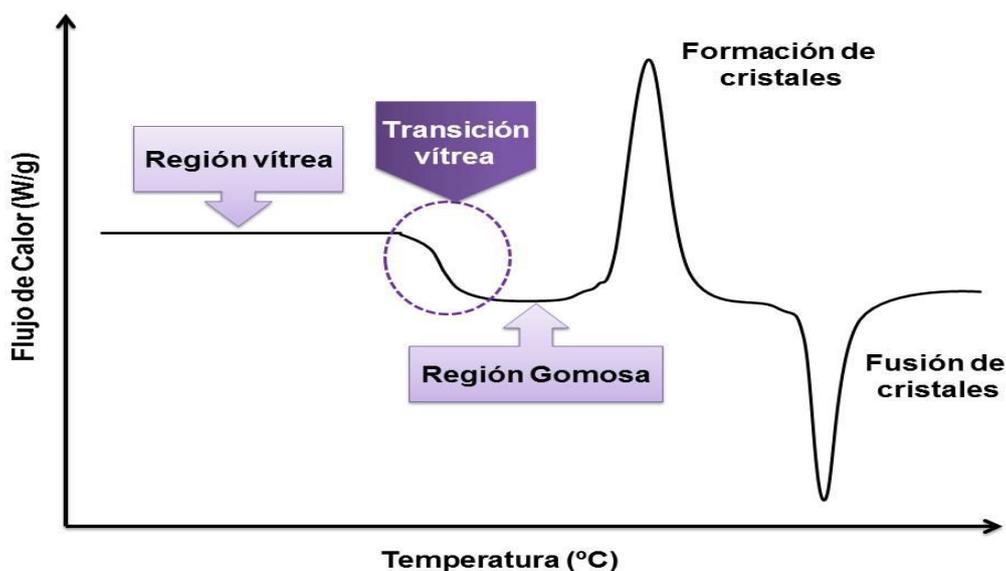


Figura 20. Termograma de un azúcar liofilizado (Adaptado de Roos, 1992).

La transición vítrea transcurre en un rango de temperaturas cuya amplitud varía entre 10 y 30°C; el punto inicial ($T_{g(\text{onset})}$) y el valor medio ($T_{g(l)}$) son comúnmente referidos como la temperatura de transición vítrea (T_g) (Roos, 1995; Moraga y col., 2012). En este estudio la temperatura de transición vítrea (T_g) se determinó con un equipo Q-100 controlado por el módulo TA 5000 (TA Instruments; Estados Unidos), con accesorio de calentamiento-enfriamiento bajo atmosfera de nitrógeno (N_2 ; 20 mL/min).

Se pesaron 2-4 mg de muestra en cápsulas de aluminio y se sellaron herméticamente, como referencia se utilizó una cápsula vacía. Las muestras se calentaron a 5°C/min hasta 110°C, aplicando el método modulado ($\pm 0.20^\circ\text{C}$ cada 40 segundos). Las determinaciones se hicieron por duplicado y los valores de $T_{g(\text{onset})}$, $T_{g(l)}$ y $T_{g(\text{final})}$ se calcularon a partir de los termogramas obtenidos mediante el software TA Universal Analysis 2000 (Estados Unidos).

Capítulo III. Efecto de las condiciones de almacenamiento en las características fisicoquímicas de polvos correspondientes a la formulación preliminar.

3.3.2.5 Análisis de color de las bebidas en polvo

Las variaciones de color se determinaron con un colorímetro triestímulo (Chroma Meter Minolta CR-400; Minolta Co., Ramsey, New Jersey, USA). Se registraron las coordenadas de la escala CIE-L*a*b*; donde L* corresponde a la luminosidad en una escala de 0 (negro) a 100 (blanco); a* a la variación entre (+) rojo y (-) verde y b* a la existente de (+) amarillo a (-) azul (Figura 21).

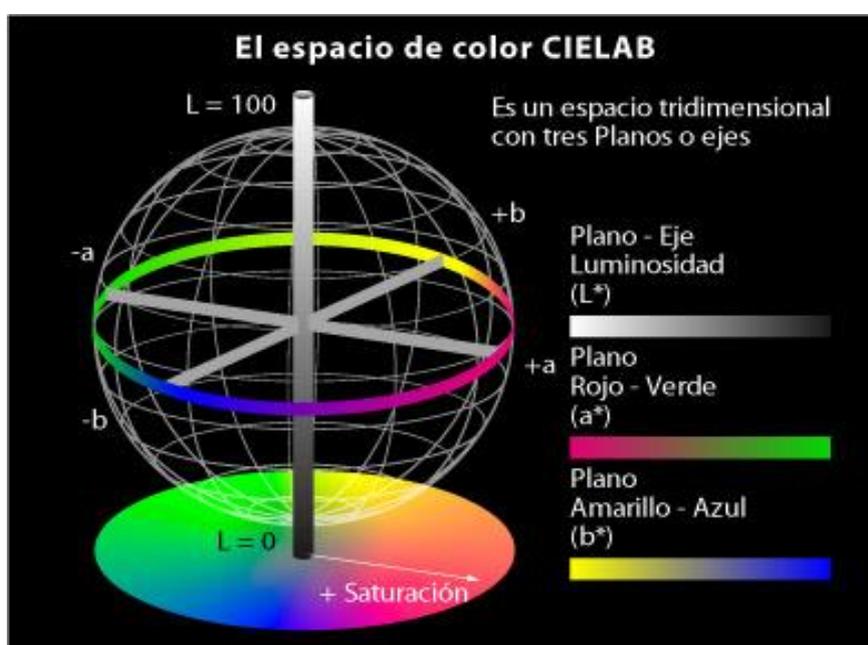


Figura 21. Espacio de color CIE-L*a*b*.

Se depositaron 1.5 g de cada muestra en una cápsula de vidrio de 1 cm de altura y 50 mm de diámetro, las mediciones se realizaron en muestras triplicadas y cada valor fue el promedio de 9 medidas/muestra. El índice de saturación (IS) y el ángulo de matiz (HA) representan el grado de intensidad del color y su tono respectivamente, ambas coordenadas se calcularon a partir de las ecuaciones (5) y (6) (Minolta, 1993).

Capítulo III. Efecto de las condiciones de almacenamiento en las características fisicoquímicas de polvos correspondientes a la formulación preliminar.

Un incremento en HA indicaría un crecimiento del aporte del amarillo, mientras que una reducción representaría una mayor proporción del azul.

$$IS = \sqrt{(a^{*2} + b^{*2})} \quad \text{Ec. 5}$$

$$HA = \tan^{-1} \left(\frac{b^*}{a^*} \right) \quad \text{Ec. 6}$$

3.3.2.6 Solubilidad:

La solubilidad de la muestra en polvo se determinó según el método de Chen y Jane (1994) con modificaciones. Las muestras reconstituidas en agua destilada se agitaron durante 5 minutos a 25°C; las dispersiones obtenidas se centrifugaron a 3000 rpm por 5 minutos en una centrifuga Rolco CM 2036, (Buenos Aires, Argentina).

Una alícuota de 5 mL del sobrenadante se transfirió a cajas de Petri de vidrio (50 mm de diámetro) previamente pesadas e inmediatamente se secaron en estufa (Sanjor serie SL DB (Buenos Aires, Argentina) a 105 ± 1°C por 5 horas. La solubilidad en agua se calculó mediante la ecuación 7:

$$\% \text{ Solubilidad} = \frac{(p_{ss} * FD * 100)}{p_l} \quad \text{Ec.7}$$

Donde, p_{ss} es el peso seco de sobrenadante (g), p_l es el peso del producto liofilizado (g) y FD es el factor de dilución. Las determinaciones se hicieron por duplicado.

Capítulo III. Efecto de las condiciones de almacenamiento en las características fisicoquímicas de polvos correspondientes a la formulación preliminar.

3.3.2.7 Determinación de la microestructura mediante microscopía electrónica de barrido

La microscopía electrónica de barrido (SEM: Scanning electron microscopy) permite estudiar las características microestructurales de la superficie de diferentes materiales. Su alta resolución (de 20 a 50 Å) y gran profundidad de foco (aproximadamente entre 100 y 1000 veces mayor que la de un microscopio óptico a la misma magnificación) brinda imágenes con apariencia tridimensional. En alimentos en polvo, las imágenes SEM pueden detallar la forma de las partículas y el aspecto de la superficie (Kang y col., 2013).

El microscopio está compuesto por el sistema de vacío, la columna de electrones, la cámara portamuestras y el sistema de adquisición y procesamiento de imágenes (Figura 22) y emplea un haz de electrones en lugar de uno de luz para formar la imagen. En algunos casos es necesario cubrir las muestras con una capa delgada de carbón u oro para proporcionar características conductoras.

Las micrografías SEM de B3(b) se obtuvieron con un microscopio FEI, modelo Quanta 200, Holanda (Figura 22.D) en condiciones de alto vacío.

Capítulo III. Efecto de las condiciones de almacenamiento en las características fisicoquímicas de polvos correspondientes a la formulación preliminar.

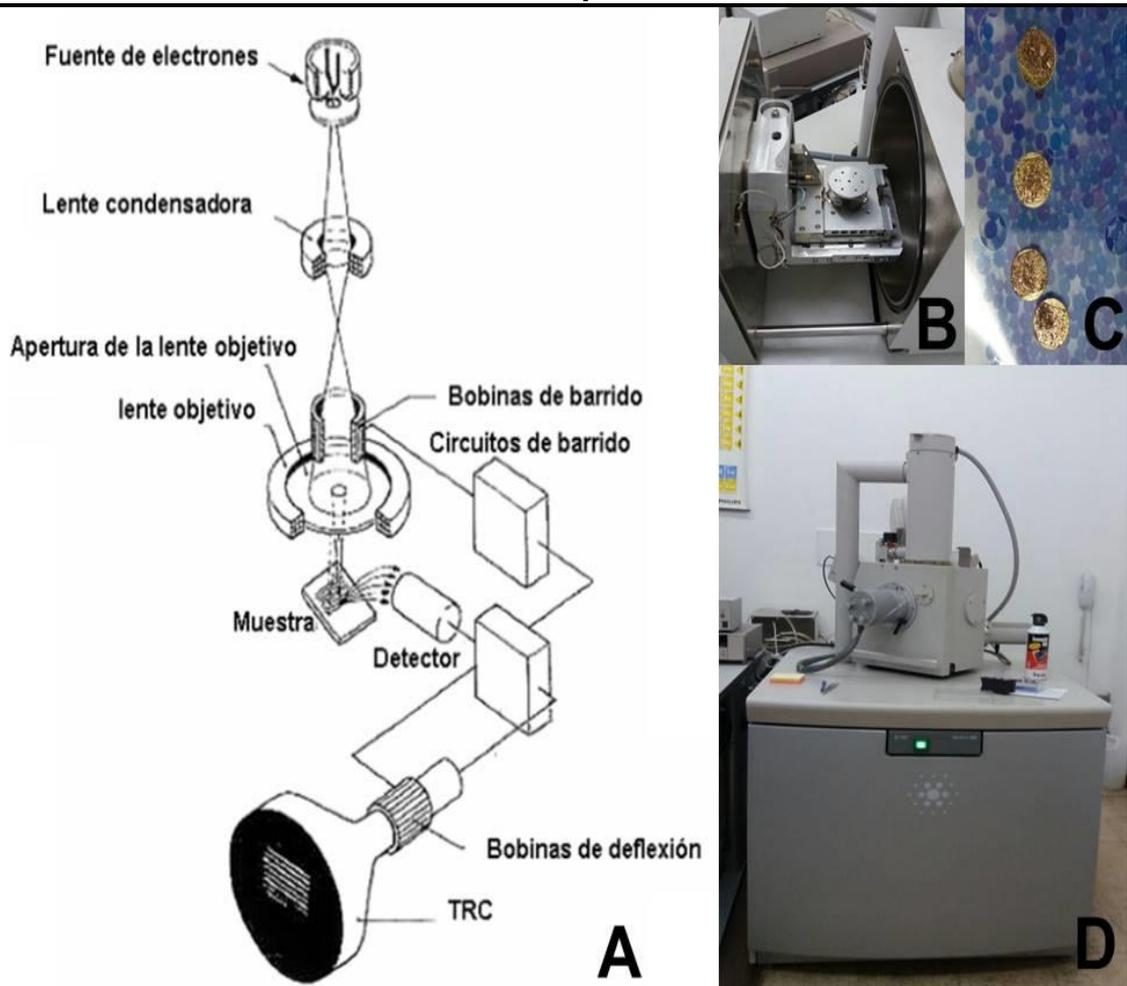


Figura 22.A. Diagrama esquemático de un microscopio electrónico de barrido (Kang y col., 2013). **B.** Cámara portamuestras **C.** Muestras de bebidas en polvo (YM/Cs) recubiertas con oro. **D.** microscopio electrónico de barrido FEI, modelo Quanta 200 (LIMF, UNLP).

Las muestras adheridas a los portamuestras cilíndricos con cinta adhesiva de doble cara se metalizaron con una capa de oro (Figura 22.C). Las determinaciones se realizaron con un voltaje de aceleración de 20 kV.

Capítulo III. Efecto de las condiciones de almacenamiento en las características fisicoquímicas de polvos correspondientes a la formulación preliminar.

3.3.3 Ensayos químicos

En las determinaciones de pH, así como en los análisis de los contenidos de polifenoles, antocianinas monoméricas totales y la actividad antioxidante, los polvos liofilizados de B3(b) se reconstituyeron según lo descrito en el *Capítulo 2, apartado 2.3.4, tabla 4*.

3.3.3.1 pH

El pH de las bebidas reconstituidas se midió con un pHmetro Hach Sension+ pH3 Lab (Hach Company, Lovely, CO, USA) a 25°C. Las mediciones se hicieron por duplicado.

3.3.3.2 Polifenoles totales

El contenido de polifenoles totales (PT) se determinó con el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (Schlesier y col., 2002), basado en la medición de la absorbancia entre 725 - 750 nm del complejo coloreado (verde-azul) que se forma como resultado de la oxidación de los grupos fenólicos con los ácidos fosfomolibdénico y fosfotungsténico.

La muestra B3(b) reconstituida se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos en una centrífuga Rolco CM 2036 (Buenos Aires, Argentina). El sobrenadante se filtró y almacenó a 4°C protegido de la luz hasta ser analizado en el mismo día (Figura 23).

Capítulo III. Efecto de las condiciones de almacenamiento en las características fisicoquímicas de polvos correspondientes a la formulación preliminar.

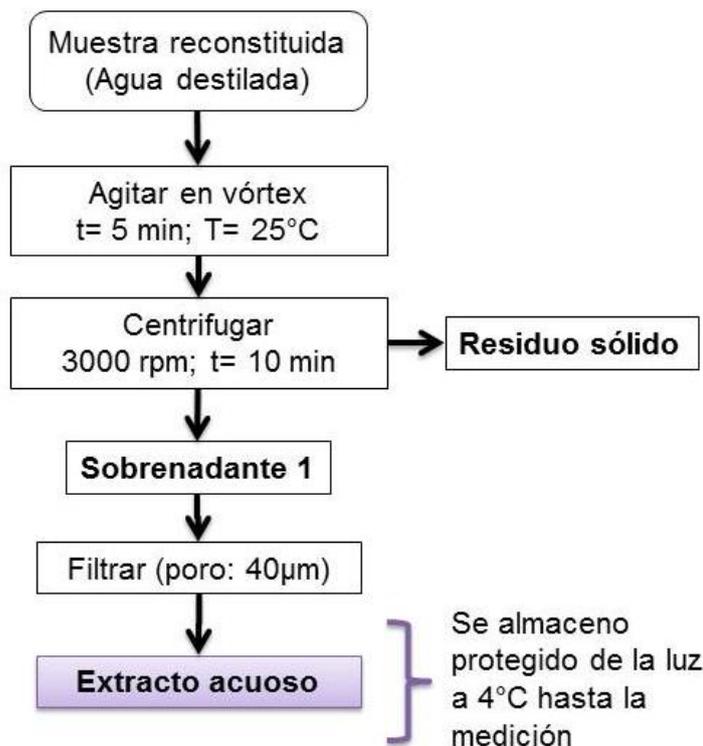


Figura 23. Diagrama de extracción acuosa para las bebidas en polvo.

0.2 mL del extracto acuoso se mezclaron con 2 mL de Na_2CO_3 2% (p/v), después de 2 minutos se agregó 0.2 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu (1:1), se agitó mediante vórtex y se dejó reaccionar durante 30 minutos. La absorbancia se midió a 725 nm en un espectrofotómetro UVmini-1240 UV-Vis (Shimadzu Scientific Instruments, Japón). Los resultados se expresaron en mg equivalentes de ácido gálico (GAE) /g polvo.

La curva de calibración se determinó con concentraciones de ácido gálico entre 0 y 0.2 mg GAE/mL (Figura 24).

Capítulo III. Efecto de las condiciones de almacenamiento en las características fisicoquímicas de polvos correspondientes a la formulación preliminar.

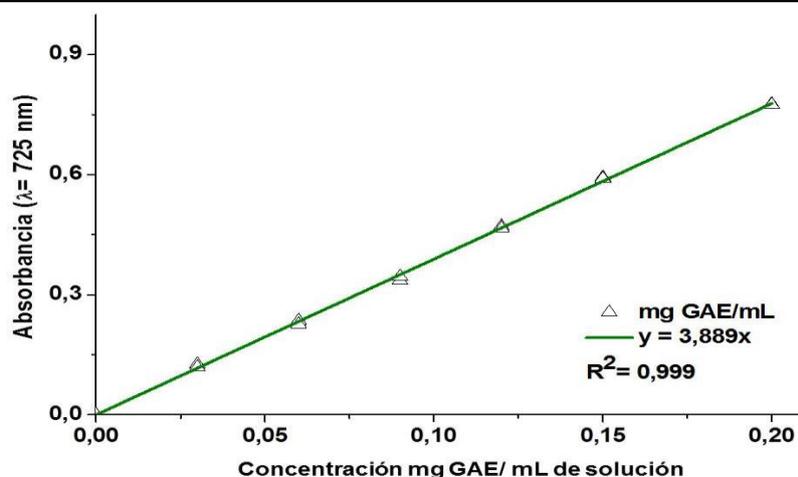


Figura 24. Curva de calibración polifenoles totales (mg ácido gálico equivalente (GAE) / mL solución).

3.3.3.3 Antocianinas monoméricas:

Las antocianinas sufren una transformación estructural reversible con los cambios de pH que se pone en evidencia a través de notables cambios en el espectro de absorbancia. La forma *oxonium* (coloreada) predomina a pH 1.0 y la *hemiacetal* a pH 4.5 (Figura 25).

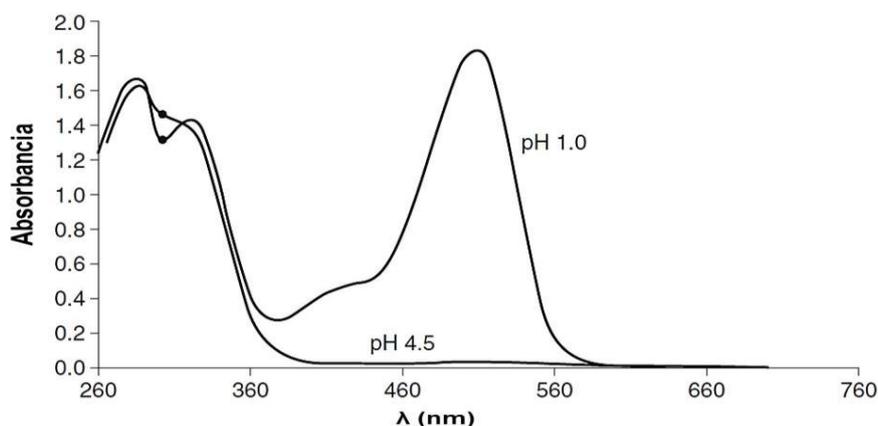


Figura 25. Espectro representativo de las formas oxonium y hemiacetal. (Giusti y Wrolstad, 2001).

Capítulo III. Efecto de las condiciones de almacenamiento en las características fisicoquímicas de polvos correspondientes a la formulación preliminar.

El contenido de antocianinas monoméricas totales (MAC) de las bebidas en polvo YMI/Cs se determinó por el método de pH diferencial, que está basado en la reacción antes mencionada y permite medir antocianinas totales incluso en presencia de pigmentos degradados polimerizados y de otros compuestos interferentes (Giusti y Wrolstad, 2001).

Las antocianinas se extrajeron con etanol acidificado (Figura 26), el extracto se diluyó con buffers a pH 1.0 y 4.5 con el fin de lograr el rango de concentración adecuado; las absorbancias se midieron a 520 (λ_{\max}) y 700 nm con un espectrofotómetro U-1900 (HITACHI, Japón).

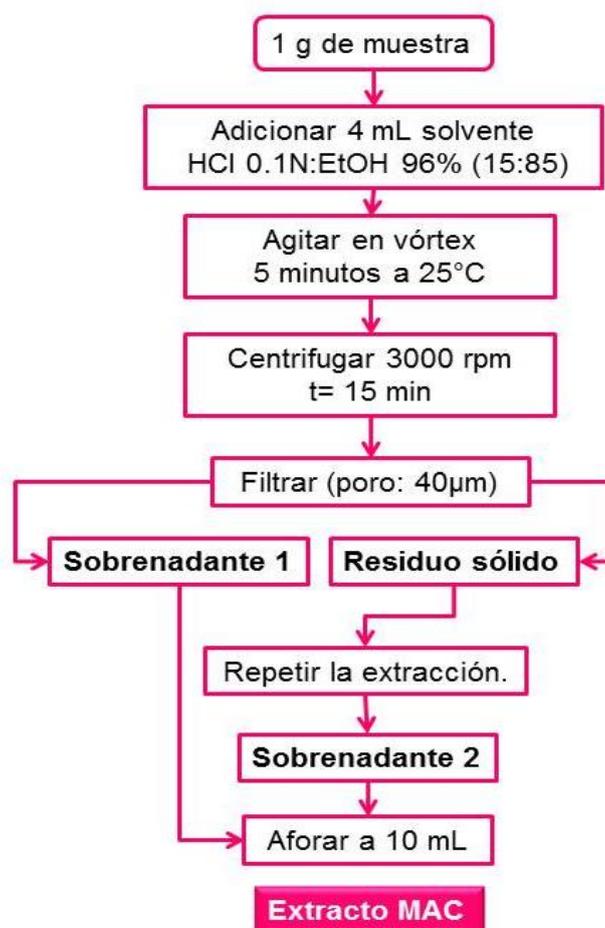


Figura 26. Diagrama de obtención del extracto de antocianinas.

Capítulo III. Efecto de las condiciones de almacenamiento en las características fisicoquímicas de polvos correspondientes a la formulación preliminar.

La concentración de antocianinas monoméricas (MAC) se calculó mediante las ecuaciones 8 y 9; se expresó en mg CyGE (equivalentes de cianidin-3-glucosido)/ g m.s:

$$A = (A_{\lambda_{\text{vis-max}}} - A_{\lambda_{700}})_{\text{pH } 1.0} - (A_{\lambda_{\text{vis-max}}} - A_{\lambda_{700}})_{\text{pH } 4.5} \quad \text{Ec. 8}$$

$$MAC(\text{mg/L}) = (A * PM * FD * 1000) / (\epsilon * 1) \quad \text{Ec. 9}$$

Peso molecular (PM) = 449.2 g/mol; coeficiente de extinción (ϵ)= 26900 L/cm.mol; FD= dilución factor (Giusti y Wrolstad, 2001).

3.3.3.4 Actividad antioxidante (DPPH):

La técnica se basa en la reacción de compuestos con supuesta actividad antioxidante con el radical libre 2,2-difenil-1-picril hidracilo (DPPH•) en una solución metanólica (Brand Williams y col., 1995). La forma estable del DPPH• (violeta) absorbe a una longitud de onda de 515 nm, al ser reducido por un compuesto antioxidante (AH) u otra especie radical (R•) la absorción disminuye (amarillo), representando la capacidad antioxidante total del compuesto ensayado (Figura 27). En este estudio se usó el protocolo de Brand Williams y col., (1995) con modificaciones. Se empleó como solvente y medio de reacción etanol (96%) en lugar de Metanol ya que otros autores demostraron que no existían mayores diferencias entre ambos solventes.

Capítulo III. Efecto de las condiciones de almacenamiento en las características fisicoquímicas de polvos correspondientes a la formulación preliminar.

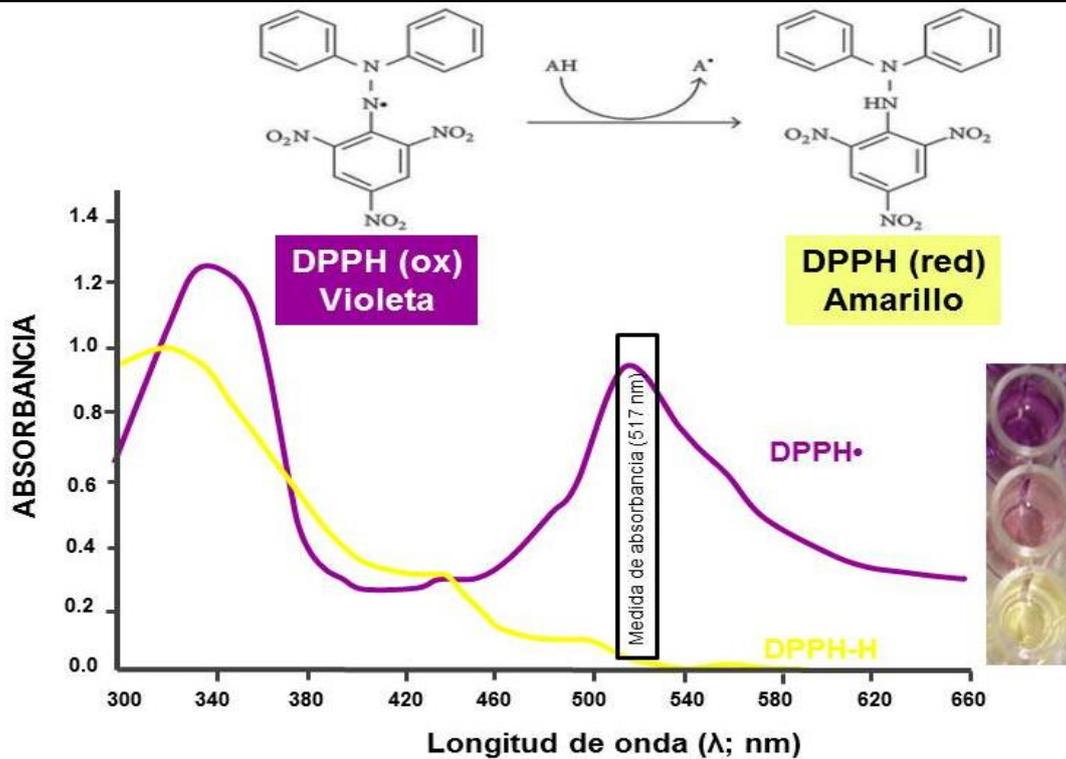


Figura 27. Reacción del radical libre (DPPH•) con una sustancia con actividad antioxidante (AH).

Una alícuota (0.1 mL) del extracto acuoso se mezcló con 3.9 mL de la solución DPPH•-etanol (25 mg DPPH•/L). El curso de la reacción se siguió determinado la caída de la absorbancia a 517 nm con un tiempo de reacción de 120 minutos (Valerga y col, 2010). Los resultados se expresaron como porcentaje de Inhibición (%I; Ec. 10):

$$\%I = \left[\frac{(Abs_b - Abs_m)}{Abs_b} \right] * 100 \quad \text{Ec. 10}$$

Capítulo III. Efecto de las condiciones de almacenamiento en las características fisicoquímicas de polvos correspondientes a la formulación preliminar.

3.3.5 Análisis estadístico

Se realizó el correspondiente análisis estadístico de varianza mediante ANOVAS de dos y una vía con el software Infostat v. 2013 (Grupo InfoStat, FCA, Argentina), las diferencias se compararon mediante el test de Tukey usando un nivel de significancia $p < 0.05$.

3.4 Resultados y discusión

3.4.1 Características fisicoquímicas de las materias primas.

Los valores de SST, pH así como el contenido de polifenoles totales (PT) y de antocianinas monoméricas (MAC) de las materias primas fueron:

- Infusión de yerba mate

SST = 4°Brix; pH= 5.44±0.01; PT = 100.60 ± 6.21 mg GAE/g m.s.

- Pulpa de Cassis

SST = 80°Brix; pH= 3.0 ± 0.01; 134.14±4.94 mg GAE/g m.s

MAC = 581.1 ± 1.4 mg CyGE/100 g m.s.

Capítulo III. Efecto de las condiciones de almacenamiento en las características fisicoquímicas de polvos correspondientes a la formulación preliminar.

3.4.2 Variaciones en las características físicas de B3(b) durante el almacenamiento:

3.4.2.1 Contenido de humedad y comportamiento térmico

El contenido de humedad del B3(b) en polvo antes del almacenamiento fue 3.58%, cercano a valores informados para polvos de pomelo liofilizado (4.77%; Moraga y col., 2012) y de mora procesada con secado spray (3.25 - 4.42%; Ferrari y col., 2013). El nivel de actividad acuosa de las muestras $a_w = 0.089$ ($a_w < 0.2$; Zona I de la Isoterma de sorción) estaba dentro del rango apropiado para favorecer la estabilidad del polvo según lo indicado por Labuza y Altunakar (2007) (Figura 1.6, Capítulo 1), ya que representa una menor cantidad de agua disponible para el crecimiento microbiano ($a_w \geq 0.8$; Zona III de la Isoterma de sorción) y reacciones bioquímicas ($a_w \geq 0.5$; Zona III), prolongando su vida útil (Fennema, 2000).

El rango de temperatura correspondiente a la zona de transición vítrea fue: $T_{g(\text{onset})} = 72.33 \pm 2.04^\circ\text{C}$, $(T_{g(l)}) = 79.77 \pm 2.04^\circ\text{C}$ y $(T_{g(f)}) = 84.28 \pm 2.37^\circ\text{C}$ (Figura 28).

Capítulo III. Efecto de las condiciones de almacenamiento en las características fisicoquímicas de polvos correspondientes a la formulación preliminar.

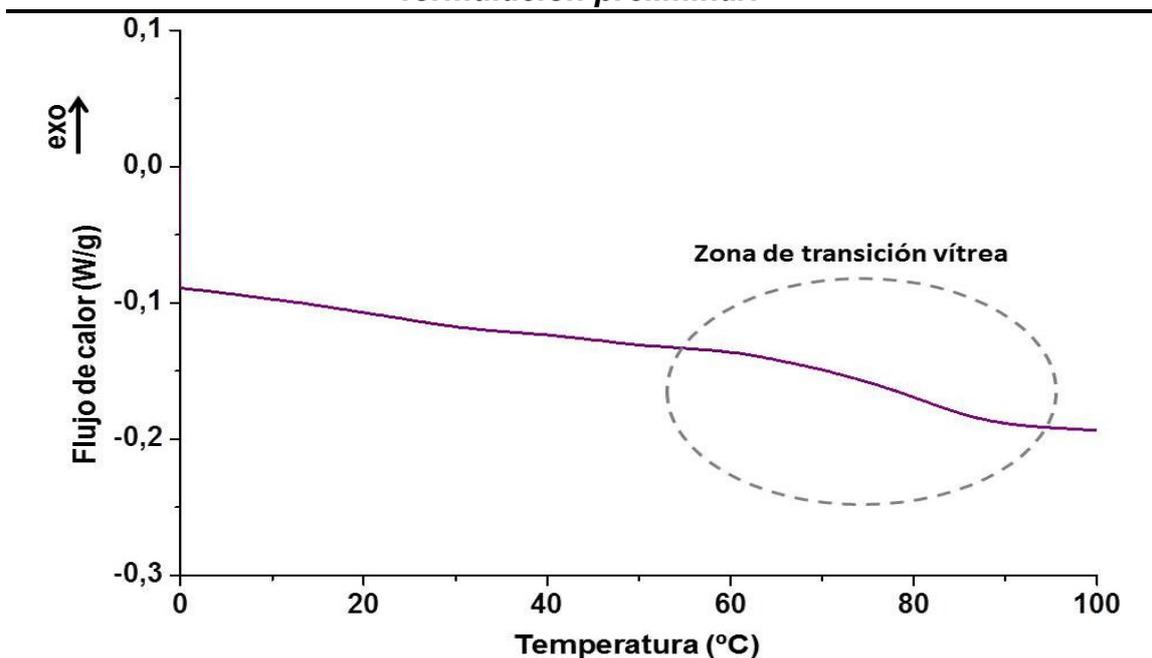


Figura 28. Termograma de B3(b) previo almacenamiento.

Ferrari y col., (2013) informaron valores de T_g de 60.23°C para polvos de Cassis con 7% MD deshidratados por secado spray considerablemente menores que los obtenidos en este estudio. Estas diferencias se deben probablemente al menor contenido de MD (15% vs 7%), y a la presencia del extracto de yerba en el polvo. Bhandari y col., (1999) concluyeron que la incorporación de solutos de alto peso molecular como la maltodextrina a las mezclas previo a la deshidratación aumentaba los valores de T_g , proporcionando mayor estabilidad a los polvos.

La tabla 16 muestra los rangos de T_g y el %H para las diferentes condiciones de T y %HR al principio y al final del almacenamiento así como el estado del polvo.

Capítulo III. Efecto de las condiciones de almacenamiento en las características fisicoquímicas de polvos correspondientes a la formulación preliminar.

Tabla 16. Efecto de las condiciones de almacenamiento en la humedad (%H), temperatura de transición vítrea ($T_{g(\text{onset})}$, $T_{g(l)}$ y $T_{g(f)}$) y estado de los polvos.

t (días)	T(°C)	Muestra	%H	$T_{g(\text{onset})}$	$T_{g(l)}$	$T_{g(f)}$	Estado a $T_{\text{almacenamiento}}$
0	-	Inicial	(Hi) 3.58 ± 0.26^a	72.33 ± 2.04^c	79.77 ± 2.04^c	84.28 ± 2.37^c	Vítreo
90	20	Trt 1	(H1) 4.42 ± 1.01^a	65.38 ± 1.28^c	74.29 ± 4.05^c	79.20 ± 3.66^c	Vítreo
90	40	Trt 2	(H2) 3.54 ± 0.99^a	54.54 ± 1.0^b	55.74 ± 1.2^b	56.74 ± 1.1^b	Vítreo
90	20	Trt 3	(H3) 6.02 ± 0.16^b	30.44 ± 4.34^a	32.76 ± 3.08^a	37.14 ± 5.71^a	Vítreo
90	40	Trt 4	(H4) 5.41 ± 0.20^c	32.46 ± 0.48^a	35.74 ± 2.36^a	38.07 ± 4.41^a	Gomoso

Resultados expresados como el promedio \pm desviación estándar de muestras duplicadas. Para cada columna valores con superíndices diferentes son significativamente diferentes ($p < 0.05$) con la prueba de Tukey.

Capítulo III. Efecto de las condiciones de almacenamiento en las características fisicoquímicas de polvos correspondientes a la formulación preliminar.

Los resultados del análisis estadístico indicaron que a temperatura constante, el incremento de la humedad ambiente entre Trt 1/Trt 3 y Trt 2/Trt 4 acrecentó la humedad de los polvos entre 36 y 53% ($p < 0.05$). El aumento de 20°C a 40°C causó una caída en el %H ($H1 > H2$ y $H3 > H4$) del 10%.

Al-Muhtaseb y col., (2004) postularon que este comportamiento podría deberse a que al aumentar la temperatura se incrementa la evaporación induciendo a una merma en la humedad del producto; Ferrari y col., (2012) y Mosquera y col., (2012) reportaron resultados similares para polvos de mora secados por spray-dry y polvos liofilizados de fresa respectivamente.

Para garantizar que las condiciones de temperatura y humedad del polvo correspondiesen a la zona de máxima estabilidad del mismo se consideró a $T_{g(\text{onset})}$ como el valor de la temperatura de transición vítrea.

Luego de 90 días de almacenamiento se detectó una caída significativa ($p < 0.05$) de $T_{g(\text{onset})}$ en todas las condiciones de almacenamiento. Las muestras expuestas a altos niveles de humedad ambiente (33%HR; Trts 3 y 4) tuvieron el descenso más pronunciado, 55-58% ($p < 0.05$). En el caso de muestras almacenadas a bajos niveles de HR (Trt 1 y 2), la disminución de T_g fue mucho menor y la influencia de la temperatura (20/40°C) más marcada ya que las reducciones de T_g detectadas fueron 9.61% (Trt 1; 20°C) y 24.59% (Trt 2; 40°C) (Tabla 16).

Capítulo III. Efecto de las condiciones de almacenamiento en las características fisicoquímicas de polvos correspondientes a la formulación preliminar.

Al final del almacenamiento, las muestras correspondientes a Trt 1, Trt 2 y Trt 3 estaban en estado vítreo ($T_{almacenamiento} < T_{g\ onset}$); sin embargo, en los polvos almacenados de acuerdo a Trt 4 se estaría iniciando la transición al estado gomoso ($T_{almacenamiento} > T_{g(onset)}$) que explicaría el ligero apelmazamiento observado únicamente en estas condiciones (Figura 29.B).

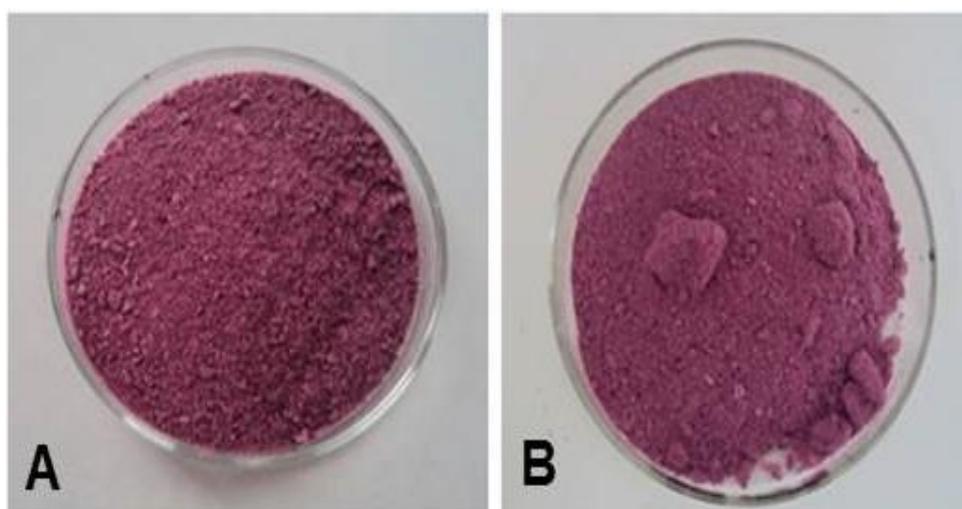


Figura 29. B3(b) **A**) Día 0 (C); **B**) Día 90 (Trt 4: 33%HR; 40°C).

3.4.2.2 Color y solubilidad

La tabla 17 muestra las variaciones de L^* , a^* y b^* durante los 90 días de almacenamiento para los 4 tratamientos.

Se observaron fluctuaciones en todos los parámetros de color durante el almacenamiento; sin embargo, para a^* y L^* no eran significativas ($p > 0.05$). El efecto de T y %H del polvo se vio reflejado en mayor medida en b^* donde las variaciones fueron significativas para todos los tratamientos evaluados ($p < 0.05$).

Capítulo III. Efecto de las condiciones de almacenamiento en las características fisicoquímicas de polvos correspondientes a la formulación preliminar.

Tabla 17. Efecto de las condiciones de almacenamiento en la luminosidad (L^*), grado de rojo (a^*) y grado de amarillo (b^*).

t(días)	T(°C)	Muestra	Parámetros		
			L^*	a^*	b^*
0	-	Inicial	52.46±1.51 ^a	21.5±0.60 ^a	-2.83±0.13 ^b
90	20	Trt 1	52.67±1.03 ^a	22.02±0.34 ^a	-3.15±0.06 ^a
90	40	Trt 2	53.19±1.18 ^a	21.49±0.59 ^a	-2.68±0.1 ^b
90	20	Trt 3	53.93±1.51 ^a	22.14±0.72 ^a	-2.38±0.08 ^c
90	40	Trt 4	55.23±1.54 ^a	22.35±0.60 ^a	-1.89±0.07 ^d

* Resultados expresados como el promedio \pm desviación estándar de triplicados. Para cada columna valores con superíndices distintos difieren significativamente ($p < 0.05$).

b^* aumentó 33.21% comparado con el valor inicial registrado (día 0), para los polvos correspondientes a Trt 4 (40°C y 33%HR), la influencia de Trt 2 y Trt 3 siguió un comportamiento similar, aunque el incremento detectado fue menor (**Trt 4 > Trt 3 > Trt 2**).

Las figuras 30.A y B muestran las variaciones del índice de saturación (IS) y del ángulo de matiz (HA) durante el almacenamiento para los diferentes tratamientos.

El análisis de varianza indicó una interacción significativa ($p < 0.05$) *Trt/tiempo* de almacenamiento. Las diferencias estadísticas en las variaciones de IS y HA no se muestran en la figura 30, debido a que la complejidad del gráfico dificultaba su comprensión

Capítulo III. Efecto de las condiciones de almacenamiento en las características fisicoquímicas de polvos correspondientes a la formulación preliminar.

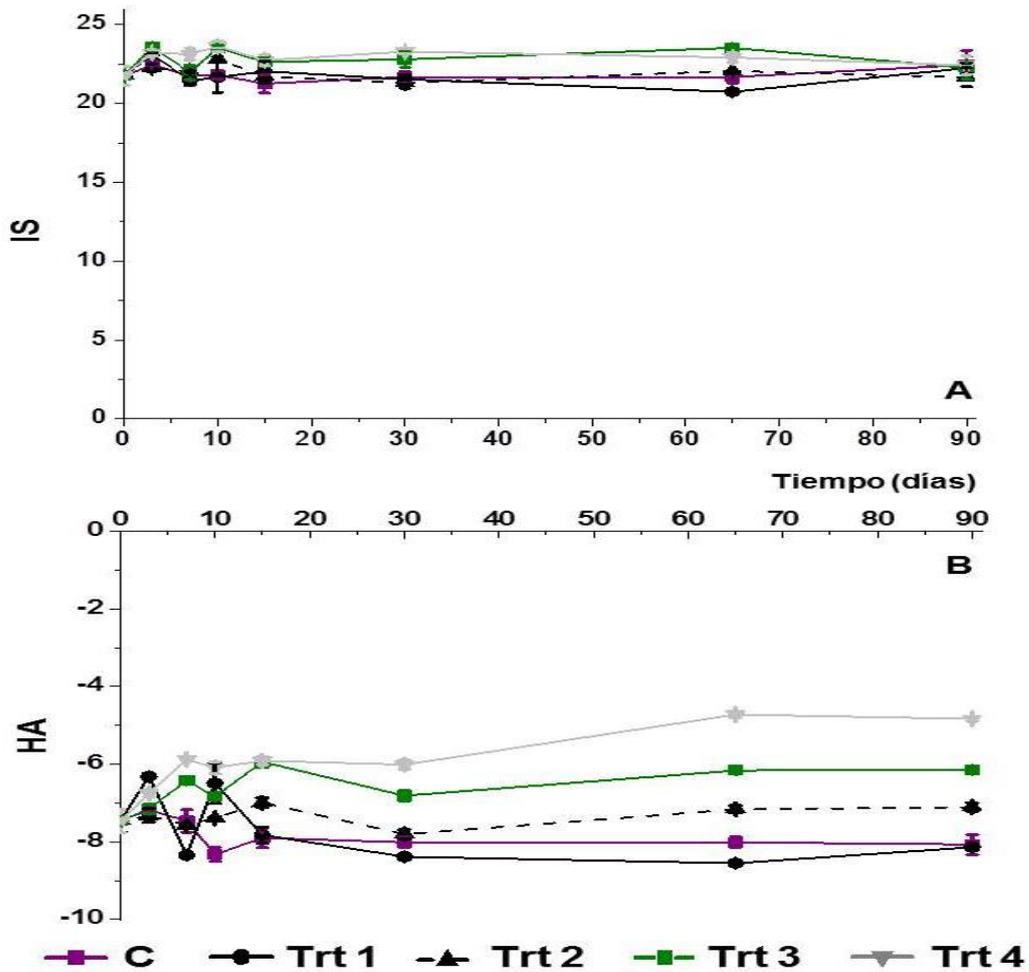


Figura 30. Variaciones de IS (A) y HA (B) durante los 90 días de almacenamiento. (C= control; Trt 1= 20°C/H1; Trt 2= 40°C/H2; Trt 3= 20°C /33% HR, Trt 4=40°C /33% HR).

Durante los primeros 15 días de almacenamiento se detectaron fluctuaciones no significativas ($p > 0.05$) en ambos parámetros para todos los tratamientos incluido la muestra control. A $t = 90$ días la influencia de los tratamientos en IS era marginal ($p > 0.05$) (Figura 30.A.); sin embargo, HA aumentó ($p < 0.05$; figura 30.B) en el siguiente orden: 35% (Trt 4) > 17% (Trt 3) > 4.7 (Trt 2); Trt 1 no presentó diferencias significativas de la muestra control ($p < 0,05$).

Capítulo III. Efecto de las condiciones de almacenamiento en las características fisicoquímicas de polvos correspondientes a la formulación preliminar.

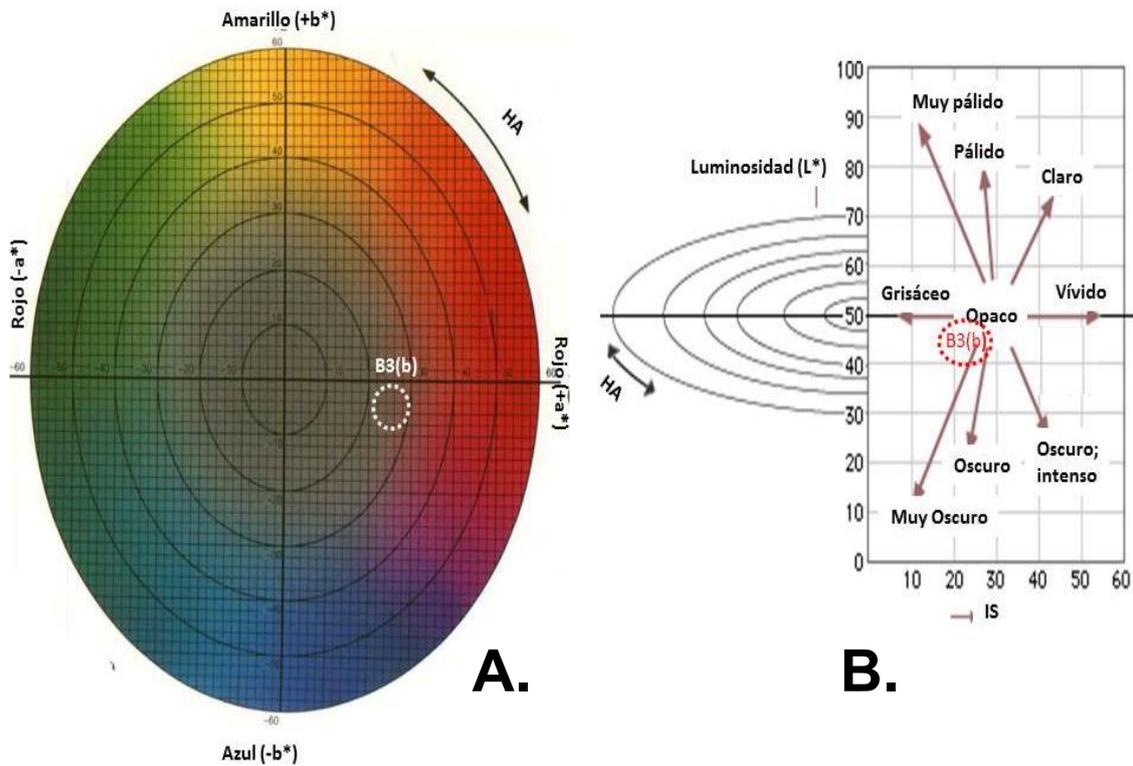


Figura 31. A. Diagrama de cromaticidad a^* y b^* . **B.** Luminosidad vs IS. (Adaptados de Minolta, 1993).

Las muestras control y almacenadas estarían ubicadas en el cuarto cuadrante del plano en la zona de color marcada en la figura 31.A; además en el gráfico de Luminosidad vs IS se ubicarían cerca de la zona de opacidad (Figura 31.B), siendo polvos oscuros y opacos.

Los resultados obtenidos indicaron que $T > 20^{\circ}\text{C}$ y humedades relativas $\geq 33\%$ favorecen el deterioro del color del polvo aunque estos no serían detectados por el ojo humano.

Capítulo III. Efecto de las condiciones de almacenamiento en las características fisicoquímicas de polvos correspondientes a la formulación preliminar.

Las condiciones de temperatura y humedad aplicados durante los 90 días no afectaron ($p > 0.05$) la solubilidad de B3(b) (Figura 32), manteniendo valores superiores al 80%; lo cual podría atribuirse a la gran solubilidad de la maltodextrina (MD DE₁₀) en agua, en concordancia con los resultados obtenidos por Mosquera y col., (2010), que confirmaron que el uso de cualquiera de las maltodextrinas mejora la solubilización del borrojó liofilizado en polvo a temperatura ambiente (20°C) alcanzando cerca de un 90% de solubilidad.

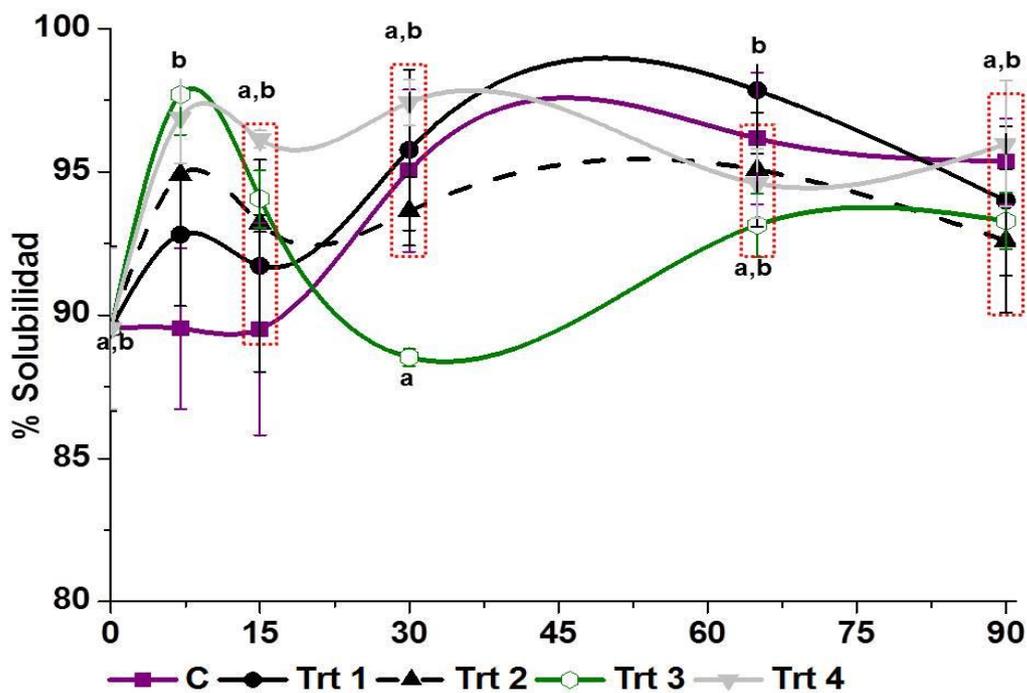


Figura 32. Cambios en la solubilidad de B3(b) durante el almacenamiento. (C= control; Trt 1= 20°C/H1; Trt 2= 40°C/H2; Trt 3= 20°C /33% HR; Trt 4=40°C /33% HR).

Capítulo III. Efecto de las condiciones de almacenamiento en las características fisicoquímicas de polvos correspondientes a la formulación preliminar.

3.4.2.3 Morfología de la formulación preliminar

La figura 33 muestra las características morfológicas observadas en B3(b) en polvo. Las partículas presentaron una estructura porosa de forma irregular similar a vidrios rotos o en forma de escamas, Haque y Roos, (2006) encontraron estructuras similares en productos liofilizados como lactosa y mezclas de lactosa/proteína de suero.

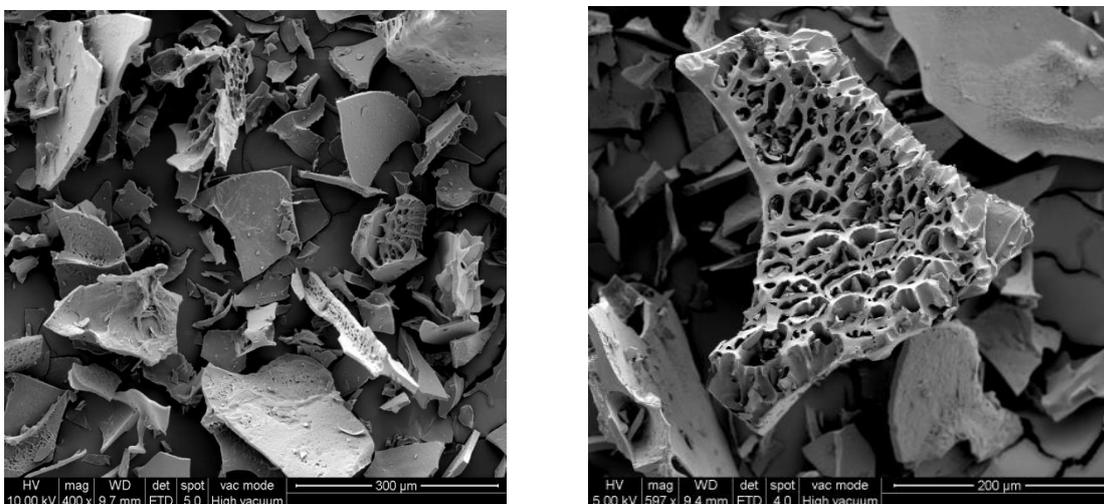


Figura 33. Micrografía de la bebida en polvo B3(b) (muestra control).

La magnificación se indica en la micrografía.

Se estudió el efecto de las condiciones de almacenamiento ($T= 20-40^{\circ}\text{C}$; 33%HR) sobre la microestructura de B3(b) almacenada 90 días. En la figura 34 se muestran las micrográficas con diferentes magnificaciones para los 4 tratamientos. La transición al estado gomoso detectada en las muestras correspondientes a Trt 4 no se evidenció con esta técnica, la estructura característica de los polvos obtenidos por liofilización se mantuvo en todos los casos.

Capítulo III. Efecto de las condiciones de almacenamiento en las características fisicoquímicas de polvos correspondientes a la formulación preliminar.

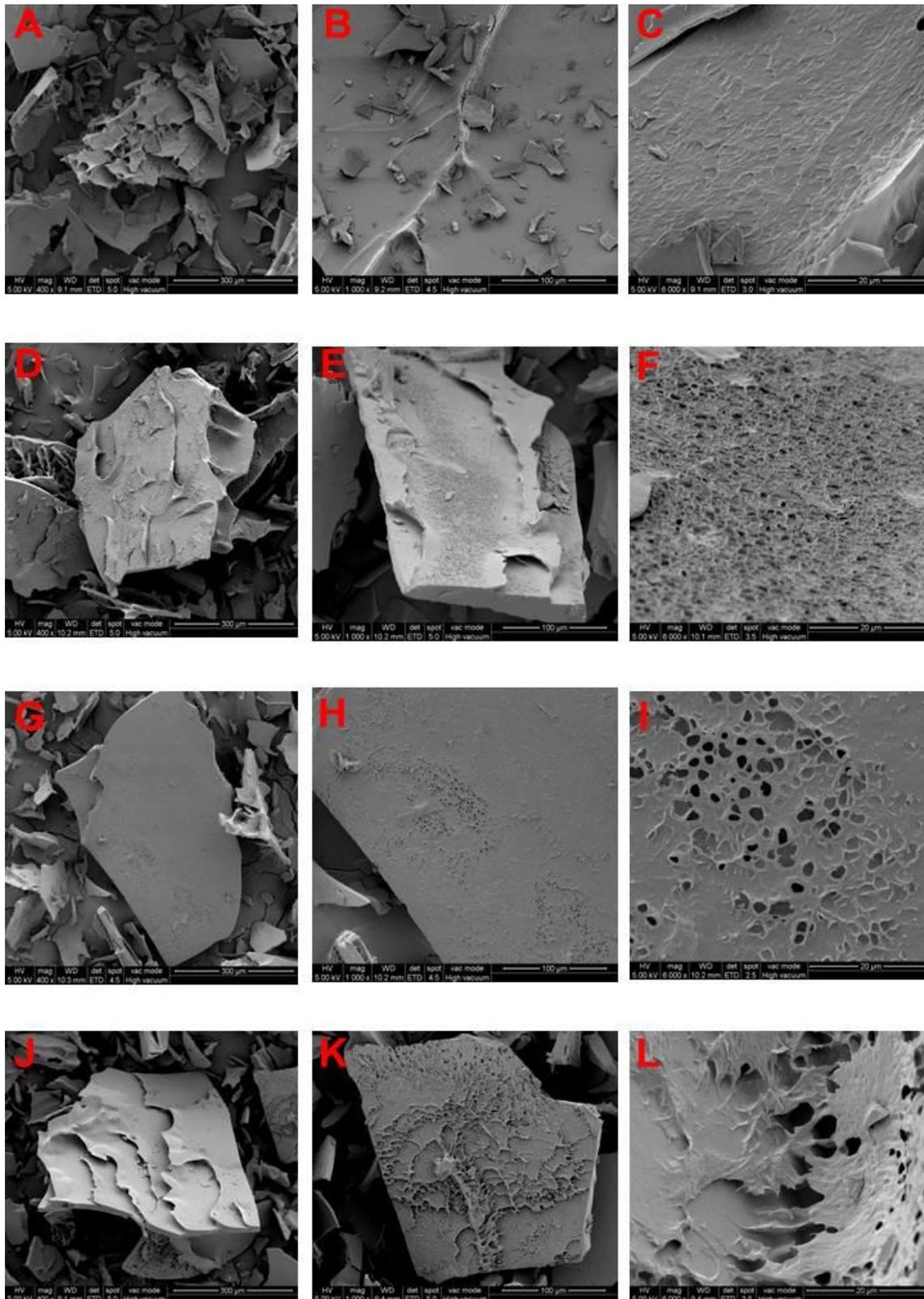


Figura 34. Micrografías electrónicas de barrido B3(b) en el día 90. **Trt 1;** magnificación 400x (A), 1000x (B) y 6000x (C). **Trt 2;** magnificación 400x (D), 1000x (E) y 6000x (F). **Trt 3;** magnificación 400x (G), 1000x (H) y 6000x (I). **Trt 4;** magnificación 400x (J), 1000x (K) y 6000x (L).

Capítulo III. Efecto de las condiciones de almacenamiento en las características fisicoquímicas de polvos correspondientes a la formulación preliminar.

3.4.3 Contenidos de polifenoles totales (PT) y de antocianinas monoméricas (MAC) y actividad antioxidante

El contenido de PT se cuantificó al inicio (día 0) y final del almacenamiento (día 90), la pérdida de PT luego de 90 días fue 30-43% ($p < 0.05$; Figura. 35).

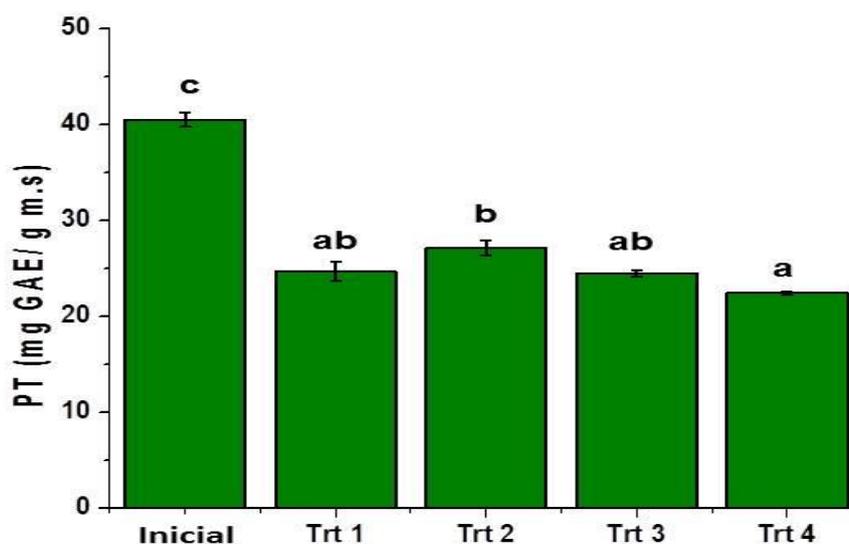


Figura 35. Contenido de polifenoles ((Inicial día 0; Trt 1= 20°C/Hi; Trt 2= 40°C/Hi; Trt 3= 20°C/ 33%; Trt 4= 40°C/33% para día 90). Letras diferentes representan diferencias significativas ($p < 0.05$) por la prueba de Tukey.

Los resultados indicaron que a humedad del polvo constante el incremento de temperatura de 20 a 40°C no influyó en la concentración de PT final ($p > 0.05$) mientras que a temperatura constante, el efecto de la humedad fue significativo únicamente a 40°C ($p < 0.05$). El contenido de PT para el día 90 en orden decreciente fue: **Trt 1 \approx Trt 3 \approx Trt 2 $>$ Trt 4.**

Capítulo III. Efecto de las condiciones de almacenamiento en las características fisicoquímicas de polvos correspondientes a la formulación preliminar.

Este comportamiento puede explicarse teniendo en cuenta que las condiciones de temperatura y humedad ambiente utilizadas en Trt 4 indujeron la transición de los polvos al estado gomoso, aumentando la movilidad molecular y favoreciendo la aceleración de las reacciones químicas (Tonon y col., 2010).

La figura 36 presenta la variación de las antocianinas monoméricas durante los 90 días de almacenamiento.

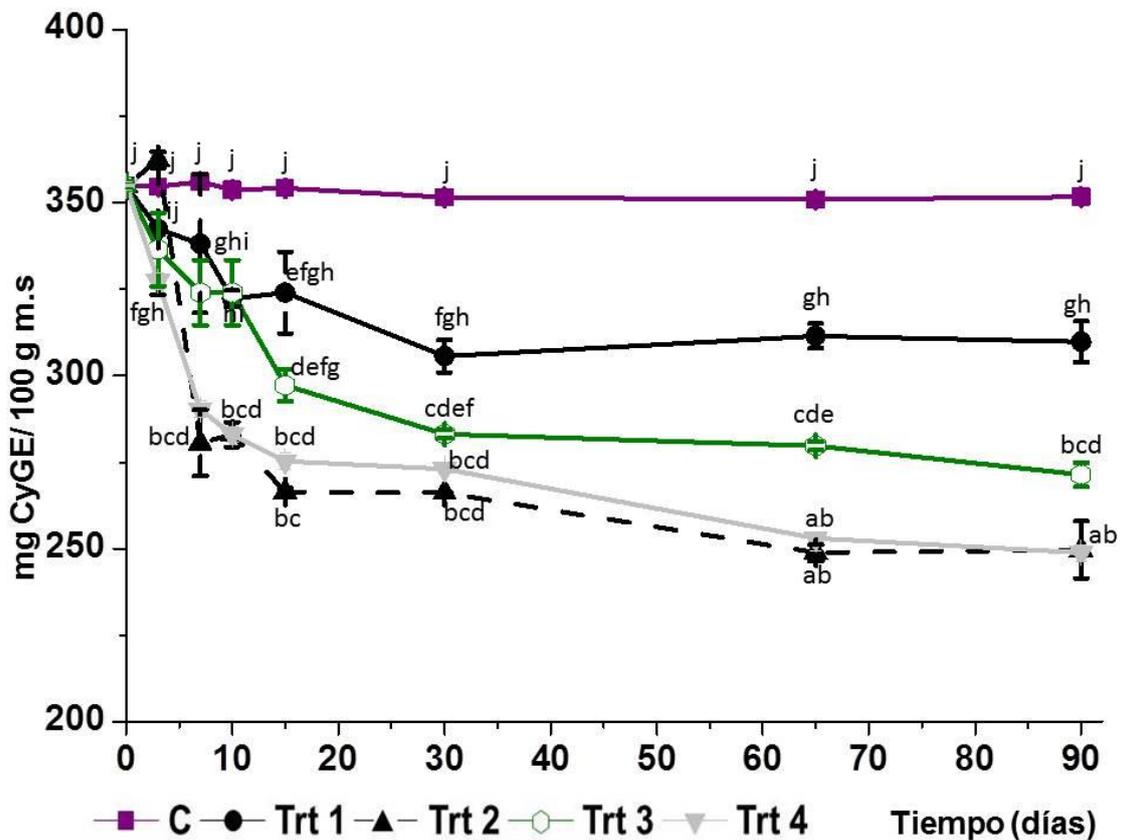


Figura 36. Variación en la concentración de antocianinas monoméricas (MAC) durante el almacenamiento ((C= control; Trt 1= 20°C; Trt 2= 40°C; Trt 3= 33% HR y 20°C; Trt 4= 33% HR y 40°C para día 90). Letras diferentes representan diferencias significativas ($p < 0.05$).

Capítulo III. Efecto de las condiciones de almacenamiento en las características fisicoquímicas de polvos correspondientes a la formulación preliminar.

La pérdida de MAC durante el almacenamiento puede dividirse en 2 etapas, inicialmente (0 - 15 días) fue muy pronunciada ($p < 0.05$), 12% (Trt 1), 16% (Trt 3), 25% (Trt 2) y 22% (Trt 4), mientras que en la segunda fase, la caída fue significativa ($p < 0.05$) solo en las muestras a 40 °C (Trts 2 y 4). De 30 a 90 días y para cada tratamiento las diferencias detectadas en los niveles de MAC eran no significativas ($p > 0.05$; Figura 36).

Al final del almacenamiento (65–90 días) la retención de MAC por tratamiento fue: 87 (Trt 1), 76 (Trt 3) y 70 % (Trt 2 y 4). Estos resultados muestran la fuerte interacción entre humedad del polvo y temperatura, a 20°C (Trts 1 y 3) la retención de antocianinas monoméricas era 11% mayor en las muestras con menor contenido de humedad (Trt 1) mientras que a 40°C (Trt 2 y 4) no se detectaron diferencia significativas ($p > 0.05$) a pesar de que las diferencias de humedades entre ambos tratamientos era mayor que en el caso de Trts 1/3.

El impacto de la temperatura de almacenamiento fue más pronunciado que el de la humedad ya que al contrastar las retenciones de MAC finales en las muestras correspondientes a los tratamientos 1 y 2, esta era 17% menor en el segundo mientras que cuando se examinaron los tratamientos 3 y 4, la diferencia fue 8%. Ferrari y col., (2013) demostraron que el aumento en la temperatura de almacenamiento incrementaba la degradación de las antocianinas en polvos de Cassis (Cs) con MD (7%) obtenidos por secado spray debido a la alta sensibilidad de dichos compuestos al calor.

Capítulo III. Efecto de las condiciones de almacenamiento en las características fisicoquímicas de polvos correspondientes a la formulación preliminar.

La rápida degradación de antocianinas a altas temperaturas también puede estar relacionada con la presencia de azúcares y proteínas, que favorecen reacciones de pardeamiento no enzimático que generalmente ocurren a altas temperaturas durante el procesamiento y almacenamiento prolongado de alimentos (Tonon y col., 2009)

La figura 37 muestra las variaciones de la actividad antioxidante (%I) de B3(b) durante el periodo de almacenamiento para los 4 tratamientos. El porcentaje de inhibición inicial del radical DPPH• fue de 88.61%.

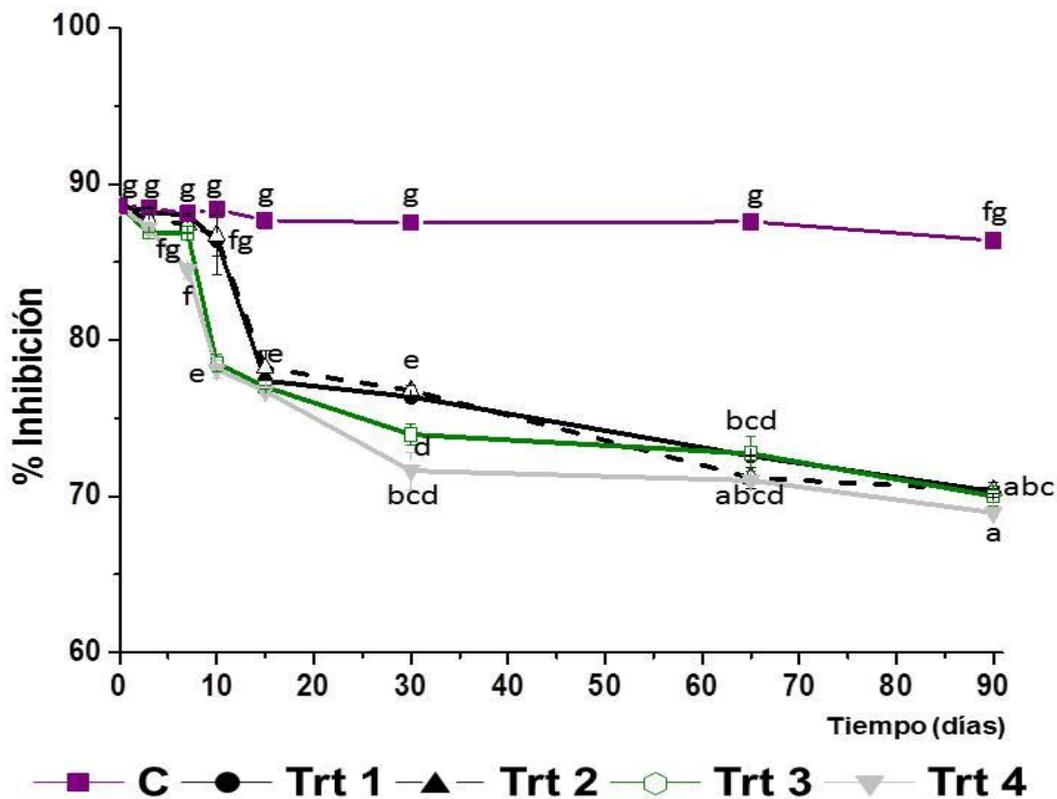


Figura 37. Variación durante el almacenamiento en porcentaje de inhibición (%I). ((C= control; Trt 1= 20°C; Trt 2= 40°C; Trt 3= 33% HR y 20°C; Trt 4= 33% HR y 40°C para día 90). Letras diferentes representan diferencias significativas ($p < 0.05$).

Capítulo III. Efecto de las condiciones de almacenamiento en las características fisicoquímicas de polvos correspondientes a la formulación preliminar.

Al igual que en el caso de las antocianinas, la variación de la capacidad de inhibición del radical DPPH• durante el almacenamiento puede dividirse en una fase rápida con una duración de 10 (Trt 3 y 4) o 15 días (Trts 1 y 2) y una pérdida de actividad entre 10 -13% para los 4 tratamientos. En la 2ª etapa la disminución de actividad fue mucho más lenta, luego de 90 días de almacenamiento, la reducción de actividad con respecto al valor inicial para todos los tratamientos fue 20-23% (Figura 37).

La pérdida de MAC y de actividad antioxidante más pronunciada en la etapa inicial del almacenamiento podría atribuirse a que en ese período la absorción de humedad ambiente es mayor lo que favorece un aumento en la movilidad molecular y en consecuencia una aceleración de las reacciones químicas (Ferrari y col., 2013).

Los resultados de estos estudios indicaron que las pérdidas de PT, MAC y de actividad antioxidante eran significativas aún en polvos en estado vítreo (Trts 1, 2, 3) o en transición al estado gomoso (Trt 4). Shebor y col. (1999) informaron que factores como el envejecimiento del material vítreo, movilidad rotacional y la difusión a través de poros preexistentes, así como la heterogeneidad de los sistemas alimentarios, pueden explicar la ocurrencia de las reacciones químicas en alimentos, incluso en estado vítreo. Tonon y col., (2010) informaron una situación similar para muestras de polvo de açai almacenadas a 25 y 35°C y 32.8-52.9% HR por 120 días, las cuales presentaron reacciones de degradación tanto en antocianinas como en polifenoles.

Capítulo III. Efecto de las condiciones de almacenamiento en las características fisicoquímicas de polvos correspondientes a la formulación preliminar.

3.5 Conclusiones

- La formulación intermedia B3(b) tenía alto contenido de polifenoles totales (PT), antocianinas (MAC) y capacidad de inhibición del radical DPPH•. Sus niveles de a_w y humedad indicaron que el producto es estable y con larga vida útil, con buena fluidez a temperatura ambiente y un alto porcentaje de solubilización en agua fría.

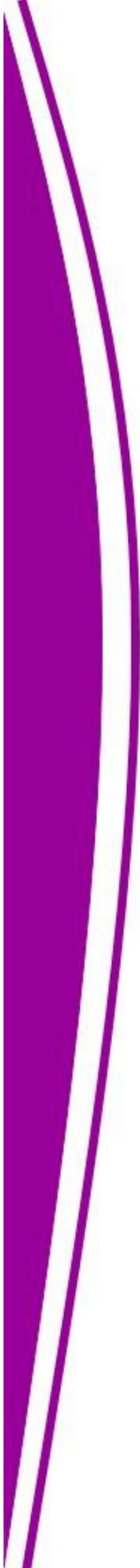
- Para obtener un producto con propiedades fisicoquímicas óptimas por 90 días las muestras deben ser expuestas a temperaturas y humedades relativas iguales o inferiores a 20°C y 33% respectivamente; garantizando que el estado vítreo y minimizando las reacciones de deterioro, así como el apelmazamiento y pérdida de fluidez visual del producto en polvo. Superando dichos valores de T y %HR se favorece el deterioro del color del polvo, las pérdidas en el contenido de compuestos bioactivos y la disminución de la actividad antioxidante; mientras que la solubilidad no se vio afectada negativamente debido al contenido de maltodextrinas presente en B3(b).

- Las antocianinas exhibieron un mayor deterioro durante los primeros 15 días de almacenamiento, seguido de una menor velocidad de degradación en el periodo de 30 a 90 días. La temperatura influyó negativamente la estabilidad debido a la alta sensibilidad térmica de dichos compuestos; el incremento del contenido de humedad resultó en un mayor deterioro, debido al aumento de la movilidad molecular que favoreció las reacciones de degradación. De la misma manera la actividad antioxidante disminuyó con el aumento de la temperatura y el contenido de agua durante el almacenamiento.

Capítulo III. Efecto de las condiciones de almacenamiento en las características fisicoquímicas de polvos correspondientes a la formulación preliminar.

- Las pérdidas de PT, MAC y de actividad antioxidante fueron significativas al final del almacenamiento para todos los tratamientos, sugiriendo que aún en estado vítreo pueden suceder reacciones de descomposición en almacenamientos prolongados.

- Se obtuvieron las micrografías (SEM) donde se observó la estructura del producto liofilizado con forma de cristales rotos y de superficie porosa; para las condiciones del ensayo no se apreciaron cambios drásticos en la microestructura durante el almacenamiento.



Capítulo IV

***Propiedades de sorción de agua
de los polvos correspondientes a
la formulación intermedia B7.
Efecto en la concentración de
bioactivos y el color***



4.1 Introducción

Los jugos en polvo tienen varias ventajas con respecto al producto fresco (Carvalho y col., 2011), incluyendo menores costos de transporte y distribución, mayor vida útil a temperatura ambiente (Iglesias y Chirife, 1976) y mayor aplicabilidad, ya que pueden consumirse como producto final o usados como ingredientes o aditivos (agentes colorantes y saborizantes) en otros alimentos.

La deshidratación del cassis es dificultosa ya que es altamente perecedero y sensible a la temperatura, para solucionar este problema deben aplicarse métodos de preservación que permitan aumentar la vida útil sin deteriorar sus propiedades sensoriales y nutricionales como la liofilización (Moraga y col., 2012). Esta tecnología podría aplicarse a la bebida de YMI/Cs para obtener polvos fáciles de envasar y transportar que pueden ser utilizados como aditivos o en la elaboración de bebidas energizantes.

La liofilización de jugos de fruta con altos contenido de azúcar es técnicamente difícil, las bajas temperaturas de transición vítrea de algunos componentes (azúcares de bajo peso molecular y ácidos orgánicos) y la alta higroscopicidad genera pegajosidad, colapso y problemas de fluidez durante el procesamiento y almacenamiento (Bhandari y Howes; 1999). La adición de agentes coadyuvantes como la maltodextrina antes del secado puede ayudar a reducir dichos problemas.

Capítulo IV. Propiedades de sorción de agua y efectos sobre los compuestos bioactivos de B7

Para obtener productos en polvo de óptima calidad y estables durante el almacenamiento, es fundamental determinar las propiedades de sorción del mismo (Vega-Gálvez y col., 2009). Las isotermas de sorción describen la relación entre la actividad de agua y el contenido de humedad de equilibrio de un alimento a presiones y temperaturas específicas. Son importantes en el cálculo del contenido de humedad correspondiente a la estabilidad óptima del producto (Mosquera y col., 2012) y las funciones termodinámicas como el calor isostérico de sorción, la entropía diferencial y los mecanismos que controlan este proceso (Vega-Gálvez y col., 2009). Estas propiedades se utilizan en el diseño, modelado y optimización del proceso de secado, así como en la predicción de la estabilidad y calidad del producto durante el envasado y almacenamiento (Gabas y col., 2007). La variación del calor de sorción con la humedad proporciona información valiosa para el cálculo de los requerimientos energéticos y el conocimiento de las interacciones entre moléculas de agua/sorbente y agua/agua.

El color y su estabilidad son un factor importante en la aceptabilidad sensorial de jugos de frutos rojos. El atractivo color del Cassis se debe principalmente a la presencia de antocianinas (Casati y col., 2012); estos compuestos junto con el ácido ascórbico y los polifenoles son los antioxidantes más importantes de esta bebida y su estabilidad es altamente afectada por la temperatura y el contenido de humedad del polvo. (Mazza y col., 1993). Por consiguiente para obtener una bebida instantánea en base a YM y Cs de alta calidad se debe analizar exhaustivamente la relación del color y la concentración de bioactivos (polifenoles, antocianinas y ácido ascórbico) con la temperatura y las propiedades de sorción del polvo.

4.2 Objetivos

- I. Determinar y modelar las isotermas de sorción a tres temperaturas (10, 20 y 40°C).
- II. Calcular las propiedades de sorción (calor isostérico de sorción, la entalpía y entropía diferencial).
- III. Determinar el mecanismo que controla el proceso de sorción de las bebidas instantáneas.
- IV. Analizar la relación entre la capacidad de sorción de agua con el color y los contenidos de polifenoles totales, antocianinas y ácido ascórbico.

Capítulo IV. Propiedades de sorción de agua y efectos sobre los compuestos bioactivos de B7

4.3 Materiales y métodos

A partir los resultados sensoriales y fisicoquímicos obtenidos en etapas anteriores (Capítulo 2; Etapa 1, 2 y 3; Capítulo 3, apartado 3.4.2 y 3.4.3), se realizaron ajustes en la formulación de las bebidas en polvo para obtener **B7**: [Mezcla **YMI** (60 g/L hojas yerba)/ **Cs**/ **MD** (15%p/v)/ **Aroma FP**(0.01% p/v) 77.4% p/p, **Azúcar** 22.4% p/p; **Edulcorante** 0.2% p/p (**ANEXO A9**).

4.3.1 Isotermas de sorción de agua

Las isotermas de sorción de B7 se determinaron por el método gravimétrico estático a 10, 20 y 40°C (Rahman y Sablani, 2008; Demarchi y col., 2013). Las muestras (1.5 g) se equilibraron en recipientes herméticos que contenían soluciones saturadas de sales que proporcionaban humedad relativa (HR) ambiente constante [Cloruro de Litio ($LiCl$; 11.3%); Acetato de Potasio (CH_3COOK ; 23.4%); Cloruro de Magnesio ($MgCl_2$;33%); Carbonato de Potasio (K_2CO_3 ; 43.2%); Nitrato de Magnesio ($Mg(NO_3)_2$;54.4%); Cloruro de Sodio ($NaCl$; 76%)] (Figura 38).

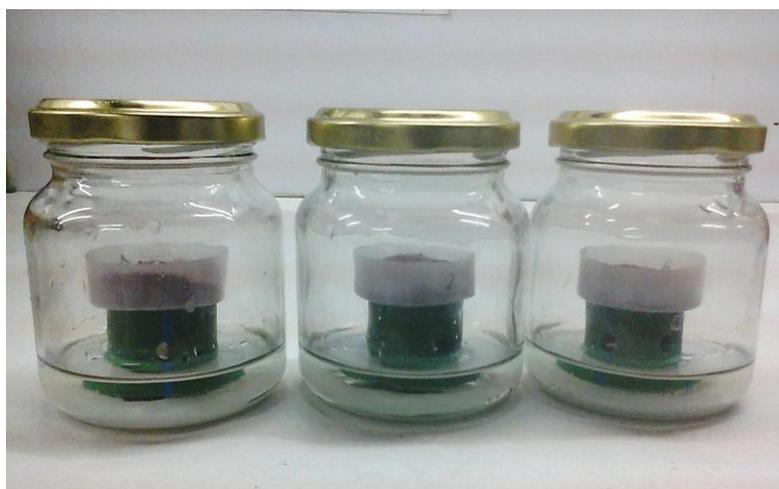


Figura 38. Recipientes herméticos con soluciones saturadas de sales para humedad relativa (HR) ambiente constante.

Capítulo IV. Propiedades de sorción de agua y efectos sobre los compuestos bioactivos de B7

Los pesos de las muestras se midieron cada tres días hasta alcanzar un valor constante (diferencia entre 2 pesadas consecutivas $< \pm 0.003$ g), donde se asume que se alcanzó el equilibrio; en estas condiciones la actividad acuosa (a_w) de la muestra equilibrada puede considerarse igual a su correspondiente HR/100 (Lomauro y col., 1985; Demarchi y col., 2013). Cada punto de la isoterma se hizo por triplicado.

La actividad acuosa y la humedad de las muestras se determinaron según lo descrito en el apartado 3.3.2 del capítulo 3.

4.3.2 Modelado matemático de las isotermas de sorción de agua y comparación estadística

La relación entre el contenido de humedad de equilibrio (W_c) y a_w de B7 se predijo mediante ecuaciones de 2 (Caurie; Halsey y Oswin) y 3 parámetros (Guggenheim-Yerson-de Boer (GAB)), comúnmente usados en alimentos (Tabla 18). En estas ecuaciones, W_c , W_m , X_s representan las humedades de equilibrio, monocapa y de seguridad respectivamente; mientras C, K, A y B son constantes de los diferentes modelos (Vega-Gálvez y col. 2009).

Los parámetros se estimaron mediante regresión no lineal de los datos experimentales con los programas Origin Pro v 8.0 (OriginLab Corp., Northhampton, MA USA) y Systat 12 (Systat Software Inc; San Jose, CA USA).

Capítulo IV. Propiedades de sorción de agua y efectos sobre los compuestos bioactivos de B7

Tabla 18. Ecuaciones utilizadas para el modelado de las isotermas de sorción.

Modelo	Ecuación	Parámetros
GAB	$W_c = \frac{W_m K C a_w}{(1 - K a_w)[1 - K a_w + C K a_w]}$ <p align="center">Ec. 11</p>	<p>W_m, humedad del alimento que corresponde a la situación en que los puntos de adsorción primarios están saturados por moléculas de agua.</p> <p>C: constante de Guggenheim, característica del alimento y relacionada al calor de adsorción de la monocapa.</p> <p>K: factor de corrección relacionado con el calor de sorción de la multicapa.</p>
OSWIN	$W_c = A \left[\frac{a_w}{(1 - a_w)} \right]^B$ <p align="center">Ec. 12</p>	A y B: constantes del modelo, características para cada alimento.
HALSEY	$W_c = \left[\frac{A}{\ln(1/a_w)} \right]^{\frac{1}{B}}$ <p align="center">Ec. 13</p>	
CAURIE	$W_c = \exp \left[a_w * \ln(v) - \frac{1}{4.5 * W_s} \right]$ <p align="center">Ec. 14</p>	<p>v, constante característica del alimento.</p> <p>W_s, contenido de humedad de seguridad, proporciona la estabilidad máxima al alimento deshidratado durante el almacenamiento.</p>

La selección del modelo más apropiado se basó en su bondad de ajuste, evaluada mediante el porcentaje de error medio relativo (%E) que expresa la diferencia entre los datos predichos y experimentales (Ec. 15):

$$\%E = \frac{100}{n} \sum_{i=1}^n \frac{|W_{ci} - W_{cpi}|}{W_{ci}} \quad \text{Ec. 15}$$

Dónde “n” es el número de datos experimentales, W_{ci} y W_{cp} los valores de humedad experimentales y predichos respectivamente.

Capítulo IV. Propiedades de sorción de agua y efectos sobre los compuestos bioactivos de B7

Lomauro y col., 1984 concluyeron que %E < 10% para un determinado modelo el ajuste del mismo era bueno.

En el caso de la ecuación de GAB, Lewicki (1997), informó que para una adecuada descripción del comportamiento sigmoidal y para asegurar que la diferencia entre los valores de W_c reales y predichos sea menor al 15%; los valores de K_{GAB} y C_{GAB} deben cumplir las siguientes condiciones:

$$0.24 < K_{GAB} \leq 1 \text{ y } 5.67 \leq C_{GAB} \leq \infty.$$

4.3.3 Propiedades termodinámicas:

4.3.3.1 Calor total isostérico de sorción, calor isostérico neto y entropía diferencial

EL calor diferencial de sorción o calor total isostérico de sorción (Q_{st} , kJ/mol), es un indicador del estado del agua adsorbida por el material sorbente, el cual es una medida de la estabilidad física, química y microbiana de materiales biológicos durante el almacenamiento (Al-Muhtaseb y col., 2004b). Se calcula a partir de la ecuación 16:

$$Q_{st} = q_{stn} + \Delta H_{vap} \quad \text{Ec. 16}$$

Donde q_{stn} (kJ/mol) y ΔH_{vap} (kJ/mol) son respectivamente el calor isostérico neto de sorción y el calor latente de vaporización del agua libre calculado para la temperatura promedio entre 283 a 313K (298K; 44.05 kJ/mol).

Capítulo IV. Propiedades de sorción de agua y efectos sobre los compuestos bioactivos de B7

El calor isostérico neto de sorción (q_{stn}), es el calor total de sorción en el alimento (Q_{st}) menos el calor latente de vaporización del agua libre. Este parámetro puede ser determinado a partir de la siguiente ecuación (Ec. 17; (Al-Muhtaseb y col., 2004b)):

$$q_{stn} = -R \left[\frac{\partial(\ln a_w)}{\partial(1/T)} \right]_{W_c} \quad \text{Ec. 17}$$

a_w representa la actividad acuosa predicha para un contenido de humedad de equilibrio específico (W_c); R es la constante universal de los gases (0.008314 kJ/mol.K) y T la temperatura absoluta (K).

La ecuación 17 se deriva de la ecuación de Clausius-Clapeyron asumiendo que (Iglesias y Chirife, 1976):

- a) El calor latente de vaporización del agua libre y el calor total de sorción no cambian con la temperatura.
- b) El contenido de humedad del sistema permanece constante.

La entropía diferencial de sorción se calcula a partir de la energía libre de Gibbs (ΔG ; Ec. 18):

$$\Delta G = RT \ln a_w \quad \text{Ec. 18}$$

Si, $\Delta G < 0$ adsorción de agua espontáneo

$\Delta G > 0$ el proceso no ocurre espontáneamente (Telis-Romero y col., 2005).

Los cambios en la entropía diferencial de sorción (ΔS_d) pueden ser calculados a partir de la ecuación de Gibbs-Helmholtz (Ec. 19):

$$\Delta G = \Delta h - \Delta S_d T \quad \text{Ec. 19}$$

El efecto de los cambios en la sorción de agua sobre la energía libre de Gibbs está acompañado por cambios tanto en la entalpía como en la entropía; sustituyendo la ecuación 18 en 19 y reacomodando términos y sabiendo que $q_{stn} = \Delta h$ se obtiene (Ec. 20):

$$\ln a_w \Big|_{W_c} = \frac{q_{stn}}{RT} - \frac{\Delta S_d}{R} \quad \text{Ec. 20}$$

A partir de Ec. 20, se grafican curvas isotericas $\ln a_w$ vs $1/T$ para ciertos valores de W_c . EL calor isostérico neto q_{stn} y ΔS_d se calcularon a partir de la pendiente (q_{stn}/R) y la ordenada al origen ($\Delta S_d/R$) (Telis-Romero y col. 2005).

La relación entre q_{stn} o Q_{st} y el contenido de humedad de equilibrio se determinó con la ecuación empírica propuesta por Tsami y col. (1990; Ec. 21).

$$q_{stn} = q_0 e^{\left(\frac{-W_c}{W_0}\right)} \quad \text{Ec. 21}$$

$$Q_{st} = q_0 e^{\left(\frac{-W_c}{W_0}\right)} + \Delta H_{vap} \quad \text{Ec. 22}$$

Capítulo IV. Propiedades de sorción de agua y efectos sobre los compuestos bioactivos de B7

Donde q_0 representa el calor isostérico neto (kJ/mol) de la primera molécula de agua y W_0 el contenido de humedad característico del alimento (kg agua/ kg m.s (materia seca)). Los parámetros de las ecuaciones 21 y 22 se calcularon por análisis de regresión no lineal con los programas OriginPro v 8.0 y Systat 12.

4.3.3.2 Teoría de la compensación. Relación entre la entalpía y la entropía.

La teoría de la compensación propone una relación lineal entre q_{stn} y ΔS_d de acuerdo a la siguiente ecuación 23 (Beristain y col. 1996).

$$q_{stn} = \Delta S_d T_\beta + \Delta G_\beta \quad \text{Ec. 23}$$

Donde T_β es la temperatura isocinética (K) y representa la temperatura a la cual todas las reacciones suceden a la misma velocidad y ΔG_β es la energía libre de Gibbs (KJ/mol) a T_β . Ambos parámetros se estimaron mediante regresión lineal de la ecuación 20 utilizando los valores de q_{stn} y ΔS_d calculados previamente.

Krug y col., (1976) concluyeron que una compensación química de tipo lineal requiere que T_β sea diferente de la temperatura media armónica (T_{hm} ; Ec. 24;), definida como:

$$T_{hm} = \frac{n}{\sum_{i=1}^n (1/T)} \quad \text{Ec. 24}$$

n = número total de isotermas

Capítulo IV. Propiedades de sorción de agua y efectos sobre los compuestos bioactivos de B7

Para calcular el intervalo de confianza aproximado $(1-\alpha)100\%$ para T_β se utilizaron las ecuaciones (25), (26) y (27) (McMinn y col., 2005):

$$T_\beta = \hat{T}\beta \pm t_{m-2,\alpha/2}\sqrt{\text{Var}(T_\beta)} \quad \text{Ec. 25}$$

$$\hat{T}\beta = \frac{\sum[(q_{\text{stn}})_T - (\overline{q_{\text{stn}}})_T][(\Delta S_d)_T - (\overline{\Delta S_d})_T]}{\sum[(\Delta S_d)_T - (\overline{\Delta S_d})_T]^2} \quad \text{Ec. 26}$$

$$\text{Var}(T_\beta) = \frac{\sum[(q_{\text{stn}})_T - \Delta G_\beta - T_\beta (\Delta S_d)_T]^2}{(m-2) \sum[(\Delta S)_T - (\overline{\Delta S_d})_T]^2} \quad \text{Ec. 27}$$

Donde m es el número de pares de datos de $q_{\text{stn}}/\Delta S$, t_m corresponde a $t_{(\text{Student})}$ para $(m-2)$ grados de libertad, $(\overline{q_{\text{stn}}})$ y $\overline{\Delta S_d}$ son valores promedios de q_{stn} (kJ/mol) y ΔS_d (kJ/mol.K). De acuerdo a los autores, la compensación ocurre solo si $T_\beta \neq T_{\text{hm}}$ (Krug y col., 1976).

4.3.3 Efecto de la temperatura y la humedad relativa en el color y en la concentración de compuestos bioactivos

4.3.3.1 Determinación de polifenoles totales y antocianinas monoméricas

El contenido de polifenoles totales (PT) y antocianinas monoméricas (MAC) en B7 antes y después del proceso de estabilización se determinó según lo descrito en el *Capítulo 3, apartado 3.3.3*.

4.3.3.2 Determinación de ácido ascórbico

La concentración de ácido ascórbico (AA) se midió mediante cromatografía líquida de alta performance (HPLC) (Aguas, modelo R-414, Milford, MA, USA). El método consistió en una elución socrática con detección UV-visibles a 245 nm usando como estándar ácido ascórbico (AA) grado alimenticio (Parafarm).

0.5 g de muestra en polvo se extrajeron con una solución de ácido metafosfórico (HPO_3 ; 50 g/L; Carlo Erba S.A, BCN, España) seguido de centrifugación a 2000 rpm (Rolco CM 2036, Buenos Aires, Argentina). Antes de la inyección, los extractos obtenidos se filtraron con membranas de nylon de poro 0.45 μm . Para prevenir la pérdida de AA, tanto las soluciones como los patrones se almacenaron protegidos de la luz a 4°C hasta el momento de la medición.

La separación se realizó a 5 mm RP en una columna C18 de 150 mm-4.6 mm (Symmetry, Aguas, Dublin, Irlanda) a 25°C. La fase móvil fue una mezcla de ácido metafosfórico (HPO_3 ; 5 g/L) y Acetonitrilo en una relación 93:7 (Novakova y col., 2008), con una velocidad de flujo de 1 mL/min.

La cuantificación se realizó por comparación del área de los picos con el estándar externo. La curva de calibración fue graficada en un rango de concentraciones de 0.002 a 0.4 mg/L y basado en 6 puntos de calibración (Figura 39).

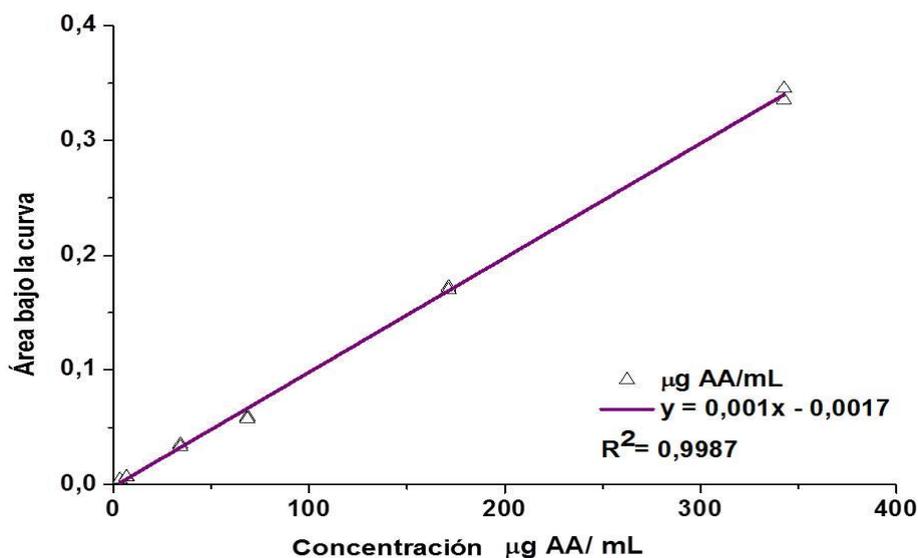


Figura 39. Curva de calibración ácido ascórbico (µg AA/mL solución).

4.3.4 Análisis del color

Debido a que el Color es un factor determinante en la aceptabilidad del producto por parte del consumidor y depende de la variación del contenido de antocianinas (Casati y col., 2012), se evaluaron los efectos de la temperatura y humedad relativa previamente mencionados para las muestras estabilizadas y sin estabilizar; se calculó el índice de saturación (IS; Ec. 5) y el ángulo de matiz (HA; Ec. 6) según lo descrito en el apartado 3.3.2.5 del capítulo 3.

4.3.5 Análisis estadístico

Se realizó el correspondiente análisis de varianza (ANOVA) de una vía y la comparación de medias mediante la prueba de Tukey con un nivel de significancia $p < 0,05$., se usó el software Infostat v. 2013 (Grupo InfoStat, FCA, Argentina). Los parámetros de los diferentes modelos empleados se estimaron por regresiones no lineales de los datos experimentales mediante el software Origin Pro v 8.0 (OriginLab Corp., Northampton, MA USA).

4.4. Resultados y discusión

4.4.1. Isotermas de sorción

Los valores iniciales de actividad acuosa (a_w) y contenido de humedad de B7 fueron 0.089 y 0.0354 kg agua/kg m.s respectivamente; en la tabla 19 se presentan los valores de humedad de equilibrio experimentales obtenidos luego del proceso de estabilización a 10°C, 20°C y 40°C.

Tabla 19. Contenido de humedad de equilibrio (W_c ; kg agua/kg m.s) a 10, 20 y 40°C.

Sal/ $a_w=(HR/100)^a$	10°C	20°C	40°C
LiCl (0.113) ^a	0.058±0.0004	0.055 ±0.0006	0.044±0.0005
KCH ₃ COO (0.234) ^a	0.071±0.0005	0.070 ±0.0010	0.050±0.0020
MgCl ₂ (0.33) ^a	0.089±0.0007	0.079 ±0.0008	0.059±0.0001
K ₂ CO ₃ (0.432) ^a	0.102±0.0005	0.097 ±0.0087	0.071±0.0016
Mg(NO ₃) ₂ (0.544) ^a	0.119±0.0029	0.116 ±0.0003	0.088±0.0008
NaCl (0.760) ^a	0.222 ±0.0048	0.20 ±0.0120	0.195±0.0090

^aHR (humedad relativa)

Los valores reportados corresponden a la media ± desviación estándar de muestras triplicadas.

Capítulo IV. Propiedades de sorción de agua y efectos sobre los compuestos bioactivos de B7

En concordancia con Al-Muhtaseb y col. (2004a), el aumento de la temperatura redujo el contenido de humedad de equilibrio de las muestras Ferrari y col. (2012) y Mosquera y col. (2012) obtuvieron resultados similares con polvos de mora secados por spray-dry y de fresa liofilizada. Pahlevanzadeh y Yazdani (2004) sugirieron que el aumento en la temperatura, incrementa la energía cinética asociada con las moléculas de agua, lo que produce una reducción de las fuerzas de atracción entre el material sorbente y el agua, y como consecuencia una caída en los niveles de higroscopicidad.

La tabla 20 muestra los parámetros de los modelos utilizados (GAB; Caurie; Halsey y Oswin), el coeficiente de determinación (R^2) y el porcentaje de error medio relativo (%E).

La ecuación de GAB fue la única que ajusto satisfactoriamente los datos experimentales de acuerdo al criterio de Lomauro y col. (1985; $E\% < 10$ y alto R^2) en todos los rangos de a_w y temperatura. Además, los valores de K_{GAB} y C_{GAB} calculados cumplen con las recomendaciones de Lewicki (1997), por lo tanto se consideró que este modelo era el más apropiado para analizar las propiedades termodinámicas del polvo.

Capítulo IV. Propiedades de sorción de agua y efectos sobre los compuestos bioactivos de B7

Tabla 20. Parámetros de regresión no lineal y pruebas estadísticas (R^2 ; %E) de las ecuaciones utilizadas para modelar las isotermas de sorción

Ecuaciones	Parámetros	10°C	20°C	40 °C
GAB	W_m	0.063	0.056	0.041
	K_{GAB}	0.946	0.95	1.04
	C_{GAB}	57.40	50.05	20
	R^2	0.9919	0.996	0.994
	E%	2.64	4.42	4.22
Oswin	A	0.1222	0.112	0.089
	B	0.488	0.477	0.637
	R^2	0.969	0.956	0.927
	E%	8.59	9.47	17.33
Halsey	A	0.029	0.024	0.04
	B	1.48	1.50	1.16
	R^2	0.991	0.977	0.963
	E%	4.03	5.26	11.78
Caurie	V	9.093	8.674	17.163
	Ws	0.069	0.068	0.058
	R^2	0.977	0.961	0.937
	E%	6.99	7.89	15.61

Capítulo IV. Propiedades de sorción de agua y efectos sobre los compuestos bioactivos de B7

La figura 40 muestra la dependencia de las isotermas de sorción con la temperatura.

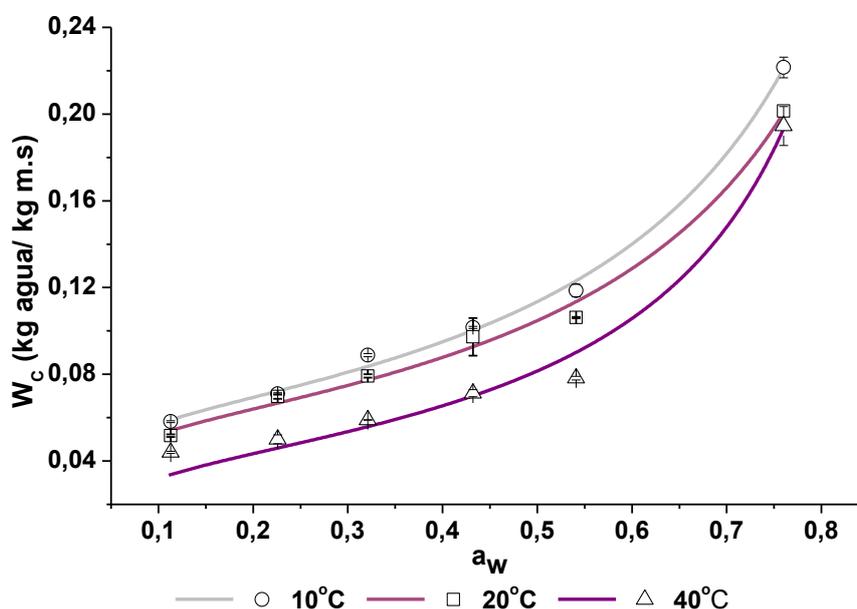


Figura 40. Influencia de la temperatura en las isoterma de sorción. Símbolos vacíos, las líneas representan el contenido de humedad de equilibrio predicho por el modelo de GAB para cada temperatura.

El contenido de humedad de monocapa (W_m) es de particular importancia ya que representa el nivel de humedad correspondiente al nivel óptimo de estabilidad del el alimento. (Mosquera y col., 2012); Labuza y Altunakar (2002) concluyó que valores de W_m mayores a 0.1 kg agua/kg m.s podrían comprometer la estabilidad del alimento.

Los resultados obtenidos muestran que para todas las temperaturas, los valores de W_m predichos fueron menores a dicho límite (Tabla 20), por lo tanto puede concluirse que la estabilidad de B7 es buena.

Capítulo IV. Propiedades de sorción de agua y efectos sobre los compuestos bioactivos de B7

El incremento de la temperatura redujo W_m (Tabla 20), Vega-Gálvez y col. (2009) y Pérez-Alonso y col. (2009) obtuvieron un efecto similar en arándanos y maltodextrina pura, respectivamente mientras que estudios realizados con jugo de limón secado al vacío (Martinelli y col., 2007) o pulpa liofilizada de ananá con 18% de MD como coadyuvante (Viganó y col., 2012) no mostraron una tendencia clara.

Los niveles de humedad de monocapa (W_m) de B7 a 20 y 40°C fueron menores que los obtenidos por Pérez-Alonso y col. (2009) para MD DE₁₀ pura (0.07-0.73 kg agua/Kg m.s) y por Gabas y col., (2007) y Carvalho y col., (2011) para Caqui o ananá con 18% MD DE₁₀ (0.06-0.069 kg agua/kg m.s) a las mismas temperaturas.

4.4.2 Propiedades termodinámicas

El calor isostérico neto diferencial (q_{stn}), el calor diferencial total de sorción y la entropía diferencial fueron estimados con las ecuaciones 16, 17 y 20 (*apartado 4.3.3.1*) y las concentraciones de humedad de equilibrio predichas por el modelo de GAB (*apartado 4.3.2, Tabla 18; Ec. 11*).

En concordancia con Gabas y col., (2007) y Mosquera y col., (2012); se observó una fuerte reducción en Q_{st} con el aumento de los niveles de W_c (Figura 41), que fue satisfactoriamente ajustado con la Ec. 21 ($R^2= 0.998$) propuesta por Tsami, (1990)).

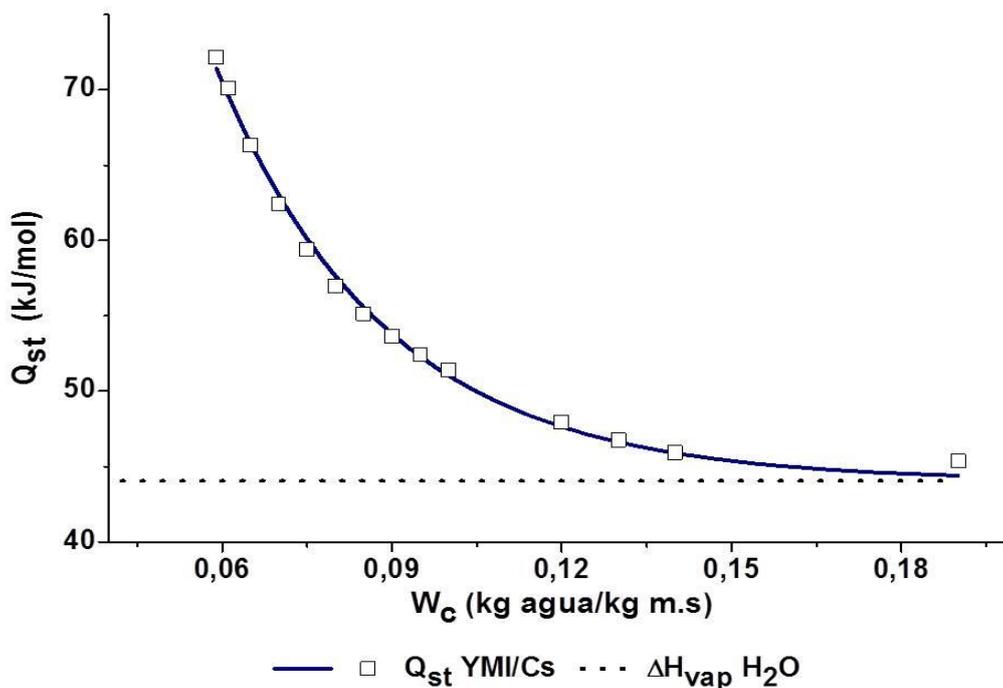


Figura 41. Cambios en el calor de sorción con el contenido de humedad de equilibrio. La línea continua representa los valores predichos por la Ec. (21).

La tabla 21 presenta los valores de calor isostérico neto de la primera molécula de agua (q_0 ; kJ/mol) y el contenido de humedad característico de la bebida en polvo (W_0 ; kg de agua/ kg m.s).

El aumento de W_c desde 0.059 a 0.1 kg agua/kg m.s disminuyó 4-5 veces el calor isostérico, debido a que este rango corresponde a la zona de humedad de monocapa de B7 (Tabla 21) y en estas condiciones la energía de enlace entre el sorbato y el sorbente es muy alta (Telis-Romero y col., 2005).

Los valores predichos de Q_{st} correspondientes a humedad de monocapa fueron: 93.82 (0.041 kg agua/kg m.s); 74.23 (0.056 kg agua/kg m.s) y 67.95 kJ/mol (0.063 kg agua/kg m.s). Las cifras entre paréntesis corresponden a los contenidos de humedad de monocapa (Tabla 21).

Capítulo IV. Propiedades de sorción de agua y efectos sobre los compuestos bioactivos de B7

Variaciones de W_c de 0.1 a 0.15 kg agua/kg m.s ocasionaron una caída adicional de Q_{st} pero sin sobrepasar ΔH_{vap} , indicando que en estas condiciones la energía sorbato/sorbente es mayor que la energía entre las moléculas de agua, lo que favorece la sorción de multicapa.

Para valores de W_c entre 0.18-0.3 kg agua/kg m.s., Q_{st} alcanzó un nivel asintótico similar a ΔH_{vap} ; por consiguiente este rango correspondería a los valores límites de agua ligada de B7 (Iglesias y Chirife, (1976) y Tsami y col., 1990). La entropía diferencial (ΔS_d ; kJ/mol.K) se calculó a partir de la ecuación (20) usando los valores de W_c predichos por la ecuación de GAB. La relación entre ΔS_d y W_c (Figura 42) se modeló satisfactoriamente ($R^2 = 0.996$) con la ecuación 28 usando el software SigmaPlot (Systat Inc).

$$\Delta S_d = a^{(-bW_c)} \quad \text{Ec. 28}$$

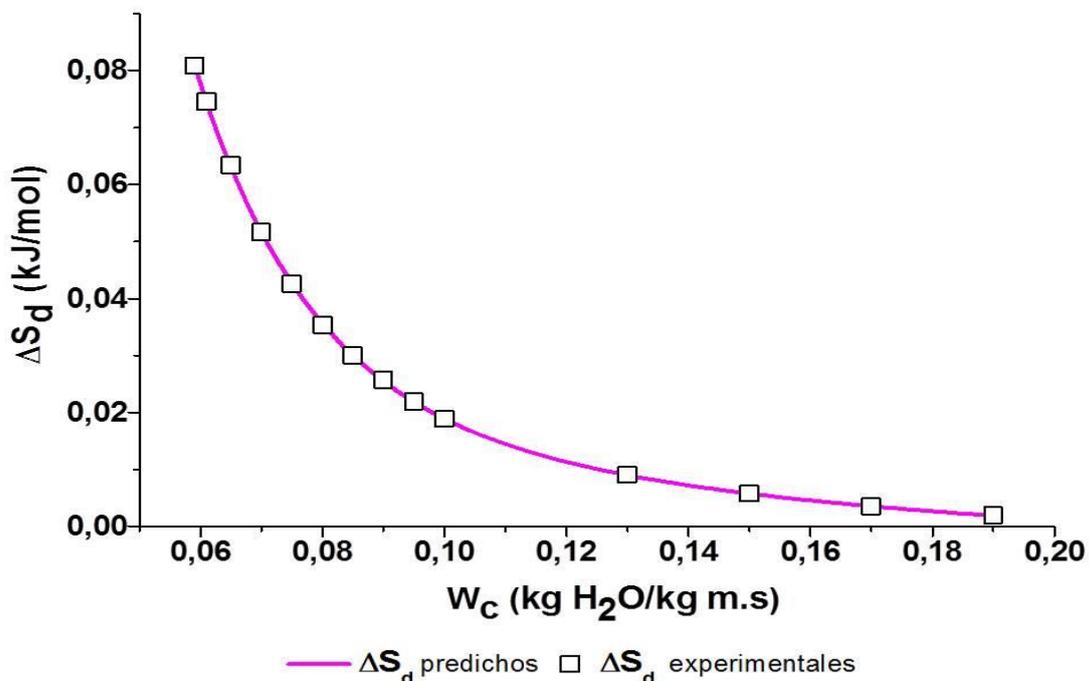


Figura 42. Efecto del contenido de W_c sobre ΔS_d de B7. La línea representa los valores predichos con la ecuación 29).

Capítulo IV. Propiedades de sorción de agua y efectos sobre los compuestos bioactivos de B7

Los parámetros de regresión “a” y “b” y los valores de la temperatura isocinética (T_{β}), la energía libre (ΔG_{β}) y el coeficiente de determinación (R^2) obtenidos se resumen en la Tabla 21. Para evaluar la aplicabilidad de la teoría isocinética en el proceso de sorción de humedad de B7, se ajustó la ecuación (23) a sus respectivos valores de q_{stn} y ΔS_d (figura 43).

Tabla 21. Parámetros de regresión de las ecuaciones (18), (23) y (28)

Parámetros	B7
q_0 (kJ/mol)	195.14
W_0 (kg agua/kg m.s)	0.03
R^2	0,991
A	0.68
B	36.47
R^2	0.996
T_{β} (K)	339.16
ΔG_{β} (kJ/mol)	0.83
R^2	0.999

La temperatura isocinética y los intervalos de confianza 95% para B7 fue ($339.99 \pm 0.02K$) significativamente diferente ($p < 0.05$) de la temperatura armónica media (301.52 K) usada en este estudio; este factor en conjunto con el alto grado de linealidad que presentó ($R^2 = 0.999$) confirma la existencia de una compensación entre q_{stn} y ΔS_d (Figura 43); por lo tanto, la teoría isocinética puede utilizarse para describir el mecanismo de sorción de agua en las condiciones experimentales usadas.

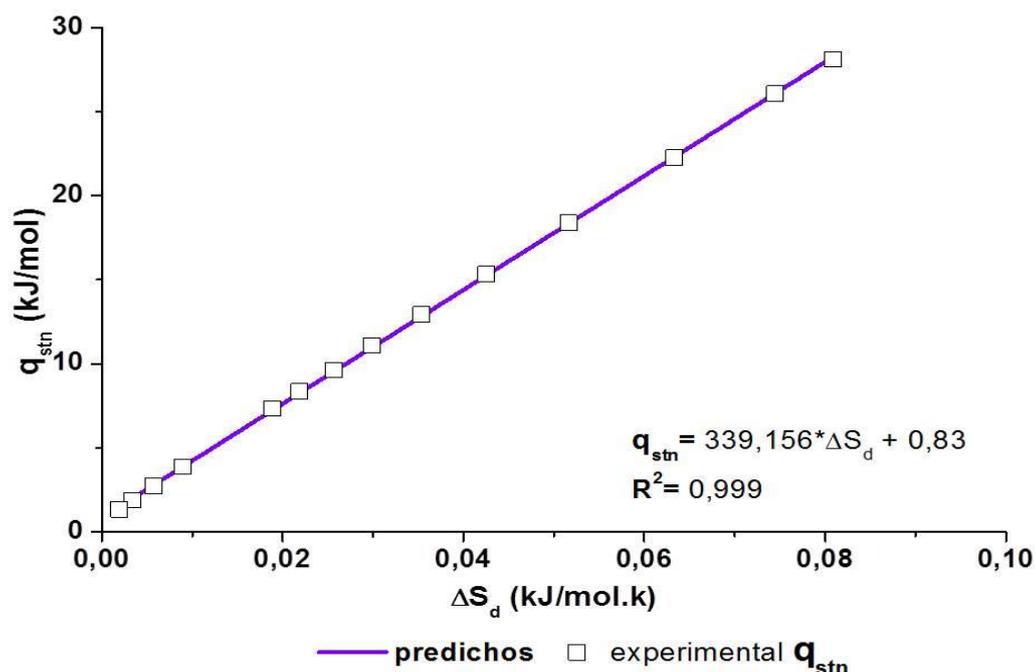


Figura 43. Relación entre la entalpía y la entropía para la bebida en polvo B7.

B7 presentó una sola línea de compensación (Figura 43), indicando que no hay cambio de mecanismo en todo el rango de temperatura estudiado. De acuerdo a Leffler (1955) si $T_\beta > T_{hm}$, el proceso es dirigido por la entalpía, mientras que la situación opuesta ($T_\beta < T_{hm}$) está controlado por la entropía.

Dado que los resultados obtenidos durante este estudio cumplen con la primera condición, se puede considerar que el proceso está controlado por la entalpía; es decir por interacciones relacionadas a la composición química de la bebida en polvo. Beristain y col. (1996) llegó a conclusiones similares para el proceso de sorción de higos, grosellas, albaricoques, ciruelas y pasas de uvas.

Capítulo IV. Propiedades de sorción de agua y efectos sobre los compuestos bioactivos de B7

4.4.3 Efecto de la temperatura y humedad relativa sobre diferentes compuestos bioactivos:

Los valores de concentración de bioactivos y color para B7 antes de la estabilización a las diferentes humedades relativas y temperaturas fueron:

PT = 33.56 mg GAE/g m.s; MAC = 354.02 mg CyGE/ 100 g m.s.

L* = 52.46; a* = 21.57; b* = -2.83; SI = 21.76; HA = -0.13°.

La estabilización disminuyó el contenido de PT entre un 20 y 33%. El análisis estadístico de la influencia de la humedad relativa y temperatura en el contenido de polifenoles totales (Tabla 22) demostró que a temperatura constante PT no dependía de HR ($p > 0.05$) y que tampoco era afectado por el incremento de la temperatura a una humedad relativa dada.

Tabla 22. Efecto de la temperatura y la humedad relativa sobre el contenido de polifenoles totales en la bebida en polvo B7.

HR (%)	10°C	20°C	40°C
11.3	21.78 ± 0.91 ^{ab}	22.71 ± 0.20 ^{ab}	21.85 ± 3.23 ^{ab}
23.4	22.78 ± 1.52 ^{ab}	23.50 ± 0.10 ^{ab}	26.85 ± 1.82 ^{ab}
33.0	24.14 ± 5.86 ^{ab}	26.14 ± 3.43 ^{ab}	28.21 ± 4.95 ^b
43.2	26.57 ± 4.04 ^{ab}	25.07 ± 2.93 ^{ab}	31.00 ± 0.20 ^b
54.4	20.78 ± 0.30 ^{ab}	25.43 ± 4.24 ^{ab}	29.07 ± 0.71 ^b
76.0	17.14 ± 0.20 ^{ab}	23.21 ± 0.51 ^{ab}	24.43 ± 0.20 ^{ab}

Resultados son el promedio ± desviación estándar de muestras triplicadas. Valores con diferentes letras por columna son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Capítulo IV. Propiedades de sorción de agua y efectos sobre los compuestos bioactivos de B7

La figura 44 muestra la relación del contenido de antocianinas (MAC) con la temperatura y la humedad relativa. Aunque inicialmente los valores de MAC a 40°C fueron los más altos ($p < 0.05$), el aumento de la humedad relativa (HR) por encima de 33% tiene un efecto extremadamente negativo, a HR= 54% y 76% los valores para MAC cayeron a 54% y 8.6% del valor original respectivamente. En cambio, para un rango de $11\% \leq HR < 54\%$ no se observaron pérdidas ($p > 0.05$) en las muestras a 10°C y 20°C; aunque los efectos de HR a 76% fueron tan perjudiciales como los detectados a 40°C.

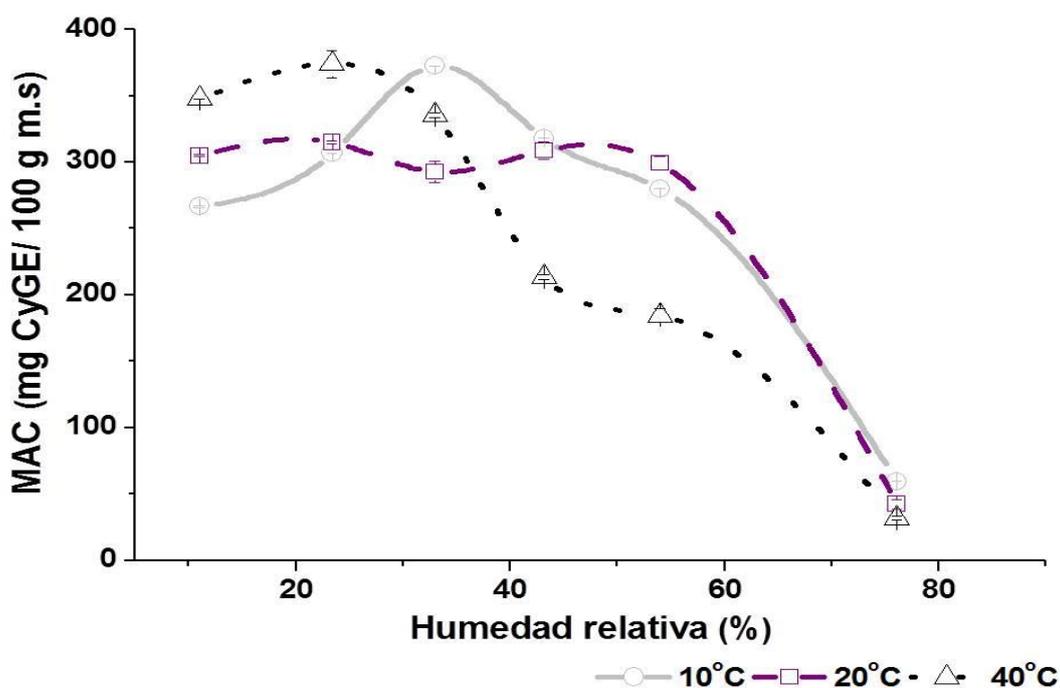


Figura 44. Cambios en el contenido de antocianinas monoméricas (MAC) con la temperatura y la humedad relativa (%).

Capítulo IV. Propiedades de sorción de agua y efectos sobre los compuestos bioactivos de B7

La figura 45 muestra la relación ácido ascórbico/HR a las tres temperaturas. Los procesos de estabilización produjeron una caída de AA entre el 80 y 83%. La temperatura y la humedad relativa tuvieron un efecto significativo ($p < 0.05$) en la concentración de AA. Los resultados indicaron que, conforme a lo informado por Sablani y col., (2007), la retención de AA disminuyó con el incremento de temperatura; para $23\% \leq HR < 76\%$, los valores fueron: $AA(10^{\circ}C) = AA(20^{\circ}C) \gg AA(40^{\circ}C)$ ($p < 0.05$).

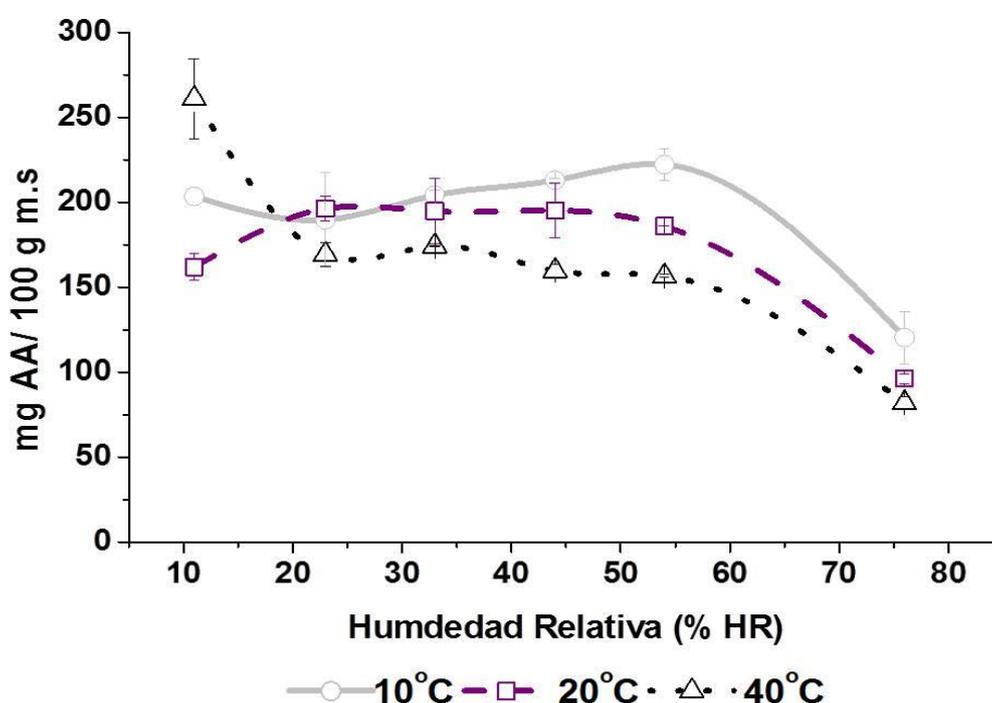


Figura 45. Cambios en la concentración de ácido ascórbico (AA) con la temperatura y la humedad relativa.

A $10^{\circ}C$ y $20^{\circ}C$ y HR entre 11- 54%, AA permaneció estable; mientras que a $40^{\circ}C$, variaciones de HR de 11 a 23% produjeron una pérdida de 37%, incrementos adicionales de HR hasta 54% no afectaron AA a $40^{\circ}C$ ($p > 0.05$). Para todas las temperaturas, la concentración de AA en B7 equilibrada a 76% de HR, cayó a un valor mínimo de 99.58 mg AA/ 100 g m.s.

Capítulo IV. Propiedades de sorción de agua y efectos sobre los compuestos bioactivos de B7

La figura 46.A, B y C muestra los parámetros L^* , IS y HA y su relación con la temperatura y la humedad relativa.

La luminosidad de B7 equilibrada a las 3 temperaturas con humedades relativas entre 11% - 54% aumento 5.8% a 14.2%; sin embargo, una humedad relativa de 76% fue extremadamente dañina, ya que L^* cayó 25-35% comparado con B7 sin equilibrar (Figura 46.A).

Los resultados del análisis estadístico indicaron que para un rango de 11- 54 %HR y a cada temperatura, el índice de saturación (IS) de B7 no varió significativamente (Figura 46.B; $p>0.05$). El efecto de la temperatura fue significativo solo a 40°C ($p<0.05$), donde se detectó una reducción del 7% que implicaría una pérdida en la intensidad del color. A 76% de HR para todas las temperaturas, los valores de IS disminuyeron en un 10% del valor previo a la estabilización.

Los aumentos de humedad entre 11 - 54% no modificaron los valores de HA a 10 y 20°C; sin embargo, cuando la temperatura aumenta a 40°C, el límite superior del rango de HR correspondiente a un valor constante de HA cayó de 54% a 33% HR (Figura 46.C). A 76% HR, el valor de HA a 10°C disminuyó ($p>0.05$) de -5.65° a -29.32° indicando un cambio hacia valores mayores de azul, HA(20°C) disminuyó hasta -14.63° ($p>0.05$) y HA(40°C) aumentó ($p<0.05$) de 5.79° a 40.26° , con una mayor contribución del amarillo. Estas diferencias pueden ser explicadas considerando que a 76% HR y para todas las temperaturas, los valores de b^* indicaron un aumento en la proporción de amarillo ($p<0.05$; datos no mostrados)), este efecto se vio sobrecompensado (10°C) o suprimido (20°C) por los correspondientes valores de a^* .

Capítulo IV. Propiedades de sorción de agua y efectos sobre los compuestos bioactivos de B7

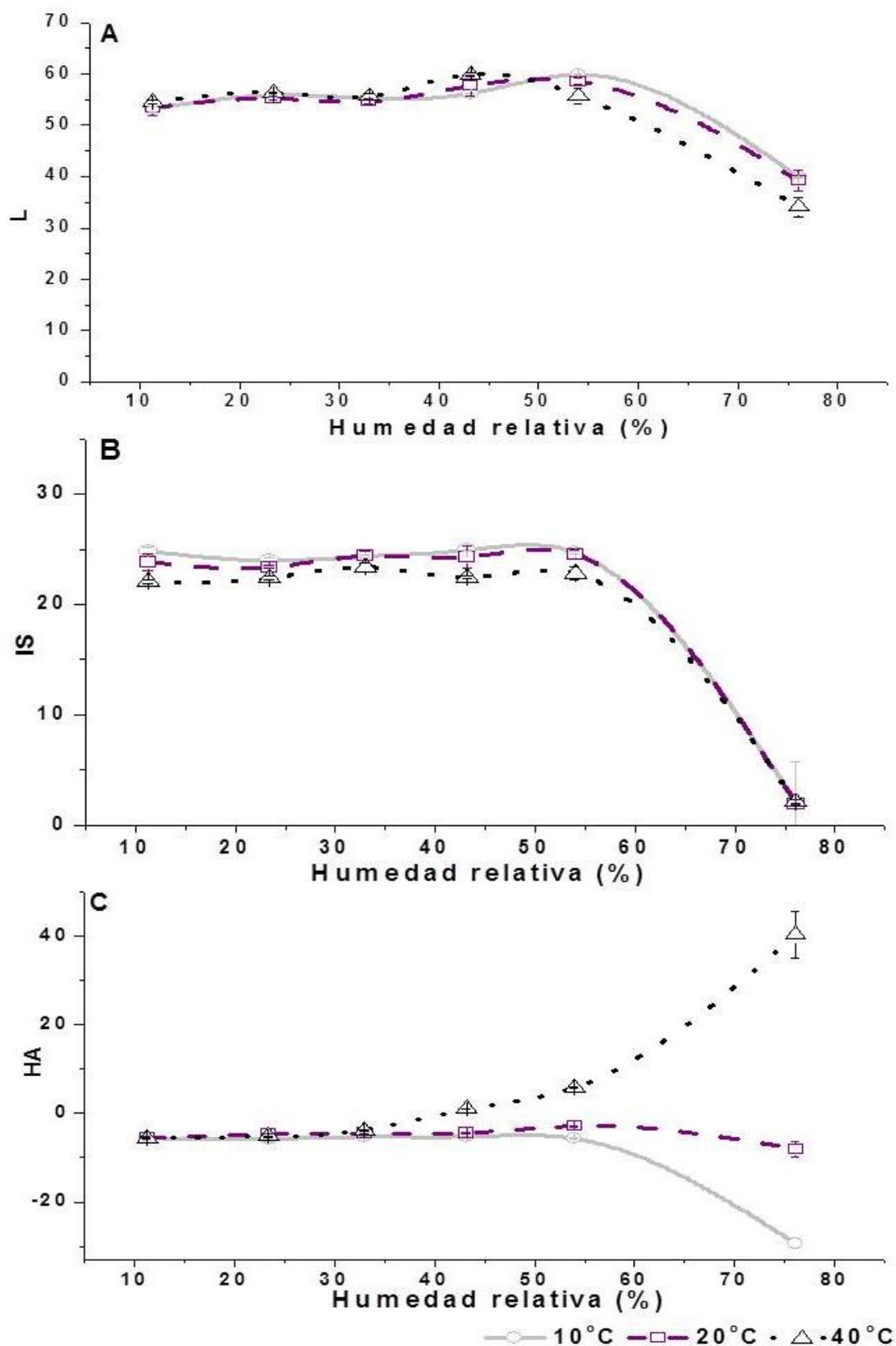


Figura 46. A, B, C. Dependencia de la Luminosidad (L^* ; A), Índice de Saturación (IS; B) y ángulo de matiz (HA, °; C) con la temperatura y humedad relativa (%).

Capítulo IV. Propiedades de sorción de agua y efectos sobre los compuestos bioactivos de B7

La comparación entre los resultados de estabilidad del color (Figura 46.A, B y C) y de MAC (Figura 45), muestra que para 285.76 - 299.94 mg CyGE/100 g m.s a 10°C/20°C y 347.72 - 335.25 mg CyGE/100 g m.s a 40°C; L*, IS y HA eran independientes de %HR. Una reducción en las concentraciones de MAC a 30-60 mg CyGE/100 g m.s, produjo alteraciones indeseables en los 3 parámetros.

La influencia de la humedad ambiente fue importante en otras propiedades físicas del polvo como la pegajosidad y el grado de aglomeración; inspecciones visuales demostraron que aumentos de %HR hasta 33% no generaba cambios notables en la pegajosidad y apelmazamiento de la muestra a ninguna de las 3 temperaturas ensayadas. Sin embargo, a 43.3% de HR se observó un ligero grado de pegajosidad que aumentaba con la temperatura, mientras que a 76% HR, la absorción de agua fue tan alta que la muestra colapsó adquiriendo un aspecto gomoso.

Para obtener los mejores resultados con respecto al color, contenido de antocianinas y de ácido ascórbico a las temperaturas seleccionadas, la humedad ambiente no debe superar el 33%. Numerosas publicaciones recomendaron que para lograr la máxima estabilidad en alimentos deshidratados su humedad de equilibrio (W_c) debe ser igual a la de monocapa ($W_c=W_m$); en el caso de B7 los valores calculados con GAB (Ec. 11) fueron:

- $HR(10^\circ C) = 9\%$ y $HR(20^\circ C / 40^\circ C) = 11.31\%$.

4.5 Conclusiones

La comparación de las bondades de ajuste de los modelos Caurie, Halsey, Oswin y GAB, indicó que este último era el que mejor predecía la humedad de equilibrio de B7 a las temperaturas y humedades relativas utilizadas.

La relación entre Q_{st} o ΔS_d y el contenido de humedad se modeló mediante ecuaciones exponenciales empíricas. Q_{st} alcanzó un nivel asintótico similar al de ΔH_{vap} a 0.18 - 0.3 kg H₂O/ kg m.s para B7.

En las condiciones experimentales usadas, la teoría isocinética es un medio adecuado para describir el mecanismo de sorción de humedad en las muestras. Los resultados demostraron que este proceso ocurre por mecanismos controlados por la entalpía.

Tanto la temperatura como la actividad acuosa tuvieron un fuerte impacto en la estabilidad del color, así como en las concentraciones de ácido ascórbico y antocianinas.

Para obtener un producto con propiedades óptimas a las temperaturas seleccionadas, las muestras deben ser expuestas a %HR menores o iguales a 33%. Sin embargo, los valores más altos de calidad y estabilidad requieren que W_c sea menor o igual a W_m ; para B7 esto corresponde a valores de humedad relativa de 9% (10°C) y 11.31% (20°C / 40°C).

Capítulo V

***Formulación final:
Efecto de la humedad en las
propiedades fisicoquímicas
relacionadas con la calidad y
estabilidad del polvo.
Digestión gastrointestinal y
actividad antioxidante del
producto final***



5.1 Introducción

La mayoría de los sólidos presentes en los jugos de fruta son azúcares de bajo peso molecular, ácidos orgánicos y aminoácidos libres, que al ser sometidos a una rápida remoción de agua tal como sucede durante el secado por liofilización, forman matrices que pueden estar en un estado termodinámicamente metaestable muy sensible a los cambios de temperatura y humedad (Telis y Martínez, 2009).

El contenido de agua (W_c) y la actividad acuosa (a_w) de alimentos deshidratados están relacionadas con su estabilidad durante el almacenamiento, ya que afectan las velocidades de las reacciones de deterioro y por consiguiente la calidad del producto (Labuza, 2007; Roos, 1995; Haque y Roos, 2006).

Aunque los jugos en polvo tienen bajos valores de W_c y a_w , son muy susceptibles al efecto plastificante del agua y consecuentemente a los cambios relacionados con la transición del estado vítreo al gomoso, tales como pegajosidad, apelmazamiento y colapso (Aguilera y col., 1995; Venir y col., 2004).

La predicción de la estabilidad de los alimentos basada solo en datos obtenidos por isotermas de sorción (humedad de monocapa) no es suficiente, porque no se tienen en cuenta ya que ciertas transformaciones fisicoquímicas, cambios estructurales y velocidades de pardeamiento no enzimático se correlacionan mejor con la variación de T_g a través de la plastificación del agua o la temperatura (Roos, 1995; Tonon y col., 2009).

Capítulo V. Formulación final: Efecto de la humedad relativa y digestión gastrointestinal in vitro.

Diferentes autores (Roos, 1993; Moraga y col., 2004; Fabra y col., 2009; Tonon y col., 2009) han acoplado los datos de las isoterms de sorción con los valores de T_g , con el fin de obtener las condiciones de almacenamiento para un determinado alimento. De esta manera se obtuvieron diagramas de estado modificados para la fase amorfa, que relacionan W_c , a_w y el estado físico con la temperatura de transición vítrea (T_g) (Moraga y col., 2012). Estos diagramas son de gran utilidad para la predicción del contenido de agua (W_cC) y la actividad acuosa (a_wC) correspondientes a la transición vítreo/gomoso ($T_{\text{almacenamiento}} = T_g$; Tonon y col., 2009). Si $T_{\text{almacenamiento}} > T_g$ los polvos están en estado gomoso y son más susceptibles al deterioro perdiendo estabilidad (Telis y Martínez-Navarrete; 2009).

Los compuestos bioactivos presentes en la yerba mate y el cassis requieren ser absorbidos por el cuerpo para efectivizar sus características beneficiosas para la salud; para esto es necesario conocer la bioaccesibilidad y biodisponibilidad de dichos compuestos. La bioaccesibilidad es un término usado para referirse al contenido de un nutriente liberado de una matriz alimentaria durante el proceso de digestión y usualmente evaluado mediante el modelo de digestión gastrointestinal estática (Hongyan y col., 2012). La biodisponibilidad es la fracción del nutriente ingerido disponible para ser utilizada por el cuerpo durante las funciones fisiológicas (Hongyan y col., 2012) y dependerá de su estabilidad durante el proceso de digestión, su liberación desde la matriz alimentaria (bioaccesibilidad) y la eficiencia del pasaje transepitelial (Tagliazucchi y col., 2010). Ha sido demostrado que la evaluación de la biodigestibilidad por medio de modelos in vitro puede correlacionarse con

Capítulo V. Formulación final: Efecto de la humedad relativa y digestión gastrointestinal in vitro.

los resultados en estudios con animales o con humanos (Biehler & Bohn, 2010).

Los compuestos polifenólicos pueden ser sensibles a las condiciones de digestión y algunos pueden ser modificados en estructuras que favorecen la salud (Chiang y col., 2013). Las antocianinas presentan baja bio-accesibilidad asociada a la inestabilidad de las moléculas en las condiciones alcalinas del intestino delgado (Pérez-Vicente y col., 2002).

El estudio de la bioaccesibilidad de compuestos antioxidantes es importante debido a que solo los compuestos que se mantienen tras la digestión gastrointestinal, están disponibles para la absorción (Chiang y col., 2013).

5.2 Objetivos

- I. Determinar las características físicas (densidad volumétrica, ángulo de reposo, color, solubilidad, microestructura y comportamiento térmico), químicas (concentración de los compuestos bioactivos incluyendo antocianinas, polifenoles totales y ácido ascórbico y la actividad antioxidante) y la capacidad de sorción del polvo correspondiente a la formulación final B12.
- II. Evaluar el efecto de la humedad relativa a 20°C en las propiedades anteriormente mencionadas; estimar los valores críticos de actividad acuosa ($a_{w,c}$) y el contenido de humedad ($W_{c,c}$) del producto con el fin de establecer las condiciones óptimas de almacenamiento.
- III. Estudiar la estabilidad bajo condiciones de digestión gastrointestinal simuladas de los polifenoles totales, las antocianinas y la variación en la actividad antioxidante de B12.

Capítulo V. Formulación final: Efecto de la humedad relativa y digestión gastrointestinal in vitro.

5.3 Materiales y métodos

Tras los análisis sensoriales (Capítulo 2, apartado 2.4.4 y 2.4.5), se eligió a B12 como la formulación de la bebida en polvo final, por consiguiente la composición de las muestras *por litro de bebida* utilizadas en este estudio era:

Mezcla **YMI** (60 g/L hojas yerba)/**Cs/MD**(15%p/v) 53.3% p/p, **Azúcar** 44.9% p/p; **Edulcorante** 0.9% p/p y **Aroma Frutos rojos** 0.9% p/p (**ANEXO 9**).

5.3.1 Caracterización de la bebida en polvo

5.3.1.1 Densidad volumétrica

Para la determinación de la densidad aparente, 40 g del polvo se colocaron en una probeta de 100 mL, golpeando la misma sobre una superficie plana hasta volumen constante (Norma Técnica Nicaragüense, 1999), luego se calculó la densidad como (Ec. 29):

$$\rho_{volumétrica} = \frac{P_i}{V} \quad \text{Ec. 29}$$

Donde, ρ es la densidad, P_i es el peso de la muestra en gramos y V el volumen medido en mL.

Capítulo V. Formulación final: Efecto de la humedad relativa y digestión gastrointestinal in vitro.

5.3.1.2 Ángulo de reposo

Para la determinación del ángulo de reposo de B12 se utilizó un dispositivo perteneciente al banco para el estudio de sólidos CEN (Armfield, Inglaterra). El mismo está compuesto por una cámara cilíndrica de acrílico transparente que puede rotar libremente, montada sobre un tablero con una escala de 0 a 360° que permite la medida de la rotación en grados (°) (Figura 47).



Figura 47. Dispositivo para determinar el ángulo de reposo (Adaptado de Armfield, Inglaterra).

La muestra se cargó dentro de la cámara a través de un orificio en su pared hasta alcanzar la mitad de su capacidad y se niveló la superficie; se prosiguió a rotar hasta que la primera partícula de muestra comenzara a deslizarse y se registró el ángulo formado. Se rota nuevamente en la dirección opuesta hasta que las partículas comiencen a deslizarse y se registró el ángulo formado. El promedio de las dos medidas representa el ángulo de reposo de la muestra. La prueba se repitió 10 veces y los resultados se promediaron para obtener una exactitud apropiada. Como control, se utilizó la medida para azúcar comercial y Maltodextrina (MD DE₁₀).

Capítulo V. Formulación final: Efecto de la humedad relativa y digestión gastrointestinal in vitro.

5.3.2 Propiedades de sorción (isoterma a 20°C)

Se determinó la isoterma a 20°C para un rango de humedad relativa de 11-76% (*Capítulo 4; apartado 4.3.1*). Los datos experimentales obtenidos se modelaron mediante las ecuaciones de Caurie, Halsey, Oswin y GAB (*Capítulo 4; Tabla 18*), los parámetros se estimaron mediante regresión no lineal de los datos experimentales con el software Origin Pro v 8.0 (OriginLab Corp., Northhampton, MA USA). Todas las mediciones se realizaron por triplicado. Para la selección del modelo más apropiado se usó el error medio relativo (%E; *Capítulo 4; apartado 4.3.1; Ec. 12*).

5.3.3 Efecto de la humedad relativa

5.3.3.1 Color, la solubilidad y morfología.

Los cambios en el color, la solubilidad y la morfología del polvo se determinaron para las muestras con y sin estabilización previa, siguiendo los protocolos mencionados en el *Capítulo 3, apartados 3.3.2.5, 3.3.2.6 y 3.3.2.8* respectivamente.

5.3.3.2 Concentración de los compuestos bioactivos y actividad

Se analizó la influencia de la humedad relativa en el equilibrio para el contenido de PT, MAC, AA y los cambios en la actividad antioxidante (%I) para las muestras con y sin estabilización previa, siguiendo los protocolos mencionados en el *Capítulo 3, apartado 3.3.3*. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

Capítulo V. Formulación final: Efecto de la humedad relativa y digestión gastrointestinal in vitro.

5.3.4 Temperatura de transición vítrea:

Se determinó la temperatura de transición vítrea para la bebida a diferentes contenidos de humedad relativa; de los termogramas obtenidos se analizaron los valores de $T_{g \text{ (onset)}}$; $T_{g \text{ (l)}}$ y $T_{g \text{ final}}$, tomando como valor de referencia a $T_{g \text{ (onset)}}$.

Las muestras (2-4 mg) en cápsulas de aluminio herméticas previamente pesadas, se equilibraron a diferentes humedades relativas (*LiCl*, 11.3%; *CH₃COOK*, 23.4%; *MgCl₂*, 33%; *K₂CO₃*, 43.2%; *Mg(NO₃)₂*, 54.4% y *NaCl*, 76%) en desecadores a 20°C durante 144 horas. Los termogramas de las muestras equilibradas se obtuvieron con un modulado a +/- 0.20°C cada 40 s y 2 corridas por cada muestra. Para la primera corrida, las muestras se calentaron primero a 10°C/min de -50 a 120°C y luego se enfriaron a 10°C/min, posteriormente se calentaron a 5°C/min repitiendo la rampa de temperatura previamente descrita (segunda corrida), dependiendo del contenido de humedad alcanzado se usaron diferentes temperaturas iniciales y finales para la rampa de calentamiento. La primera corrida era necesaria para reducir la entalpía de relajación del polvo en estado amorfo y mejorar la precisión de la medida de T_g realizada en la segunda corrida (Tonon y col., 2009; Haque y Roos, 2006). Todas las mediciones se realizaron por duplicado y como referencia fue una capsula vacía.

Capítulo V. Formulación final: Efecto de la humedad relativa y digestión gastrointestinal in vitro.

5.3.5 Determinación de los Valores críticos de a_w y W_c

Los valores críticos de a_w y W_c , se calcularon a partir de los modelos de GAB (*Capítulo 4; tabla 18*) y de Gordon & Taylor, que relacionan la transición vítrea, la plastificación por agua y la sorción del agua (Roos y col., 1993). El modelo de Gordon & Taylor relaciona W_c - T_g ; (Ec. 30), esta dependencia ha sido tomada como referencia en la predicción de la estabilidad de los alimentos a diferentes a_w y contenidos de humedad (Roos, 2010):

$$T_g = \frac{X_s T_{gs} + k X_w T_{gw}}{X_s + k X_w} \quad \text{Ec. 30}$$

Donde X_s y X_w representan las fracciones de sólidos y de agua respectivamente (kg de agua/kg m.s); T_g es la temperatura de transición vítrea ($^{\circ}\text{C}$); T_{gw} es la temperatura de transición vítrea del agua amorfa ($T_{gw} = -135^{\circ}\text{C}$); T_{gs} es la temperatura de transición vítrea de los sólidos amorfos ($^{\circ}\text{C}$) y K es la constante del modelo.

Esta ecuación ha sido usada para predecir la plastificación por el agua en sistemas binarios; se considera que todos los componentes sólidos que contribuyen a la observación de la transición vítrea son miscibles y forman una sola fase (Roos, 1995, Haque y Roos, 2006; Moraga y col., 2012).

Con el fin de obtener W_c y a_w , se graficaron conjuntamente los valores predichos por GAB para la isoterma a 20°C (a_w - W_c) y los valores predichos por Gordon & Taylor (T_g - W_c) obteniendo la relación T_g - W_c - a_w para una temperatura de almacenamiento $T = T_g = 20 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Capítulo V. Formulación final: Efecto de la humedad relativa y digestión gastrointestinal in vitro.

5.3.6 Biodigestibilidad in vitro

Se realizó la digestión in vitro para la bebida en polvo; el ensayo consistió en una fase de digestión con pepsina en medio ácido para simular la digestión gástrica; y una digestión con pancreatina y sales biliares.

Preparación de muestra:

B12 se reconstituyó emulando la forma de consumo determinada en las evaluaciones sensoriales (*Capítulo 2, apartado 2.3.5.2; Tabla 7*), el polvo se disolvió en agua milli-Q y se homogenizó con agitación constante por 5 minutos; simultáneamente se prepara una muestra control de ácido gálico (10 mg GAE/mL). Tanto la solución B12 como el patrón se almacenaron protegidos de la luz a 4°C hasta el momento de la digestión. Como blanco se usó agua milli-Q.

Procedimiento

Para la digestión in vitro se usó el protocolo propuesto por Chiang y col., (2013) con modificaciones. En la figura 48 se esquematiza los pasos seguidos durante la digestión in vitro. Se realizó una digestión control como referencia, donde se inactivaron las soluciones enzimáticas por calentamiento a 90°C por 15 minutos previo a la digestión.

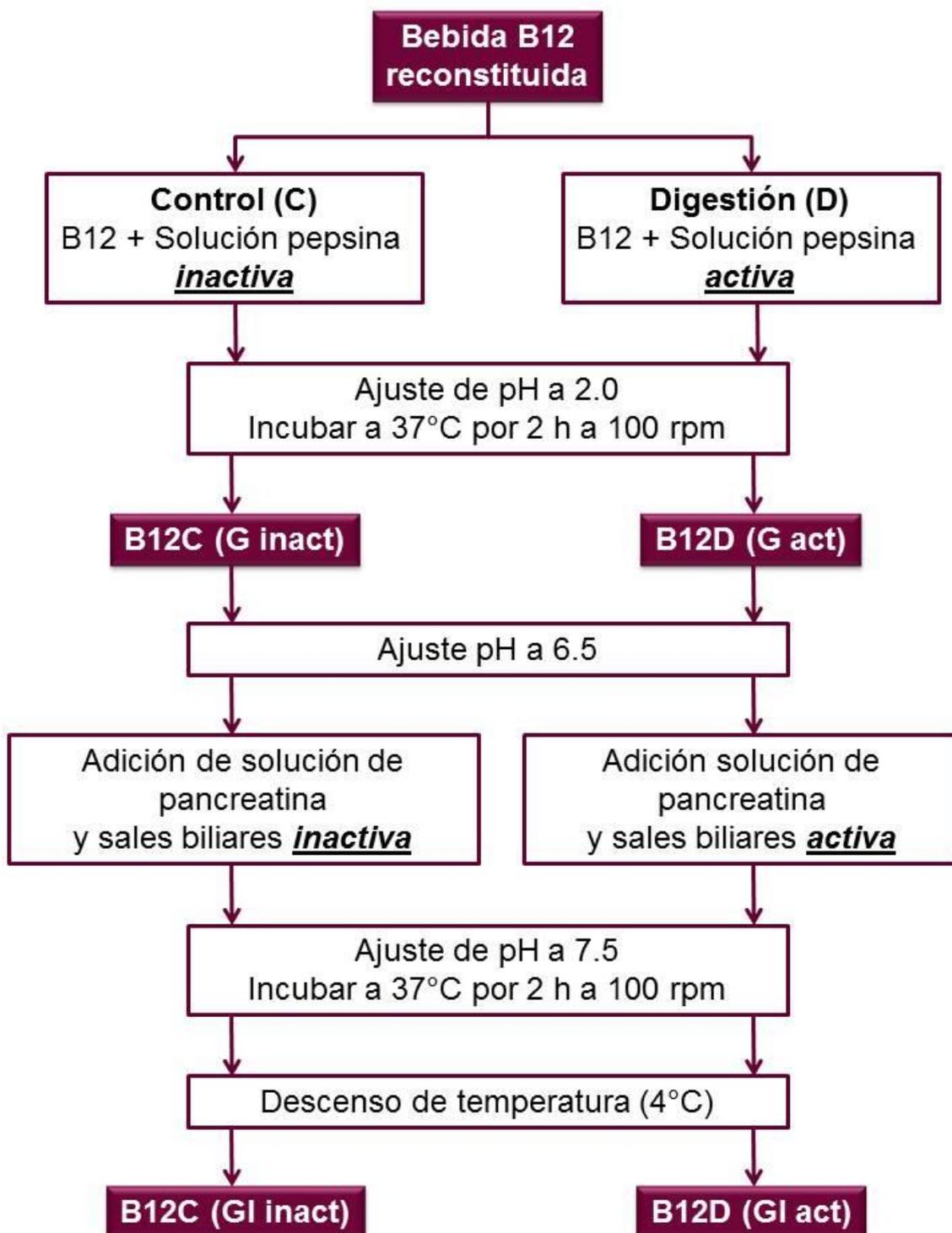


Figura 48. Diagrama de procedimiento para la digestión in vitro de la bebida en polvo B12.

Capítulo V. Formulación final: Efecto de la humedad relativa y digestión gastrointestinal in vitro.

Se tomaron 2.5 mL de B12 reconstituida y se adicionó 2.5 mL de una solución de pepsina (320 und/mL) acidificada con ácido clorhídrico 1N con el fin de simular el jugo gástrico ajustando el pH a 2.0 e incubando por una hora a 37°C a 130 rpm.

La etapa de digestión gástrica se detuvo subiendo el pH a 6.5 con NaOH 1N. Entonces, se adicionó una solución concentrada de jugo intestinal simulado (Pancreatina porcina 10mg/mL, sales biliares 20mg/mL). Finalmente se ajustó el pH a 7.5 con NaOH 1N y se incubó durante dos horas a 37°C a 130 rpm.

Las soluciones obtenidas se centrifugaron a 13000 rpm por 10 minutos a 25°C y el sobrenadante obtenido fue filtrado con membrana de nylon de poro 0.45 µm previo a las mediciones de PT, MAC y DPPH• realizadas.

5.3.7 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó el software Infostat v. 2013 (Grupo InfoStat, FCA, Argentina). Se realizó el correspondiente análisis de varianza (ANOVA) de una vía y la comparación de medias mediante el test de Tukey usando un nivel de significancia $p < 0.05$.

Los parámetros de los diferentes modelos empleados se estimaron por regresiones no lineales de los datos experimentales mediante el software Origin Pro v 8.0 (OriginLab Corp., Northampton, MA USA).

5.4 Resultados y discusión

5.4.1 Caracterización de la bebida en polvo B12

Tras los estudios fisicoquímicos y sensoriales se llegó al producto final de esta investigación, una bebida en polvo a base de Yerba mate y Cassis caracterizada por tener un $3.11 \pm 0.21\%$ de humedad, una densidad de $0.54 \pm 2 \cdot 10^{-3}$ g/mL y un ángulo de reposo de $52.75^\circ \pm 2.19^\circ$. Según Peleg (1977), los polvos con ángulos de reposo $\leq 40^\circ$ son no-cohesivos y los polvos con ángulos $\geq 50^\circ$ pueden presentar problemas de fluidez; en el caso de B12 podría deberse a la formas y tamaño irregulares (vidrios rotos) que tienen sus partículas liofilizadas; ya que la fluidez de un polvo depende de la forma, tamaño y distribución de partículas (Juliano y Barbosa-Cánovas, 2010; Murrieta-Pazos y col., 2012).

Los valores de solubilidad, luminosidad (L^*), grado de rojo (a^*) y de amarillo (b^*) de B12 fueron:

- %Solubilidad (agua fría) = $89.93 \pm 1.20\%$
- $L^* = 53.69 \pm 0.69$; $a^* = 21.83 \pm 0.26$; $b^* = -0.98 \pm 0.05$

En cuanto a las propiedades antioxidantes, los valores fueron:

- Polifenoles totales (PT) = 9.28 ± 0.07 mg GAE/g m.s;
- Antocianinas monoméricas (MAC) = 330.18 ± 1.17 mg CyGE/ 100g m.s y
- Ácido ascórbico (AA) = 104.35 ± 14.78 mg AA/ 100 g m.s;
- La actividad antioxidante mediada como la capacidad de inactivar el radical DPPH• fue %I = $87.61 \pm 0.21\%$

5.4.2 Propiedades de sorción (isoterma a 20°C)

En la figura 49 se presentan los datos experimentales de W_c (kg de agua/kg m.s) y los valores predichos por medio de los diferentes modelos.

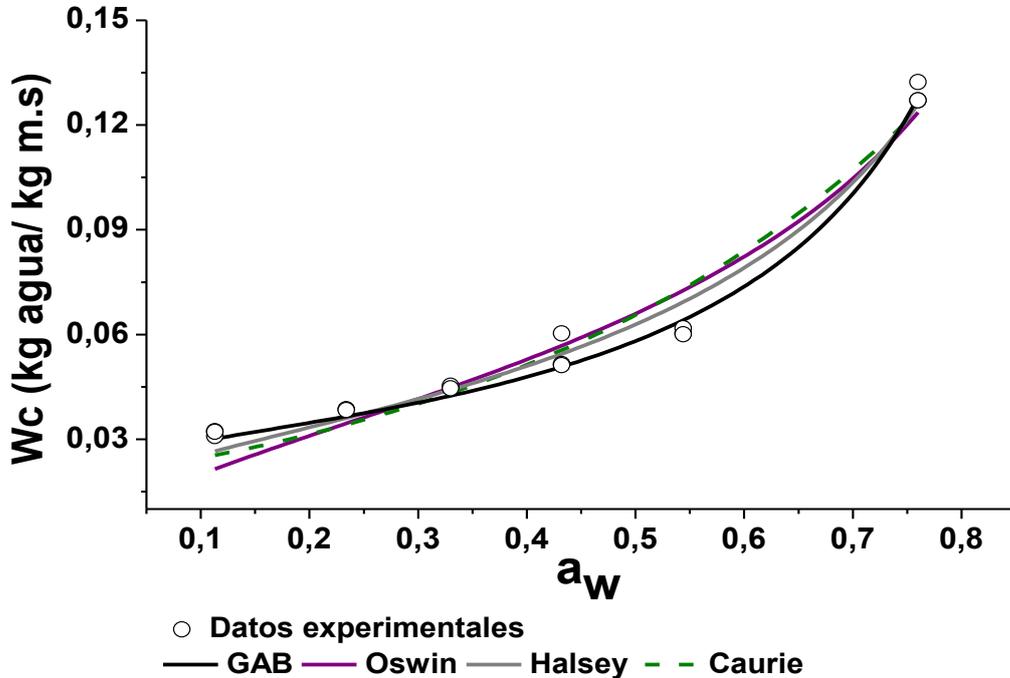


Figura 49. Isotermas de sorción a 20°C. Símbolos representan los valores experimentales. Líneas representan valores predicho por los diferentes modelos.

Se observó que B12 absorbió pequeñas cantidades de agua a bajos contenidos de a_w , con un aumento en la cantidad absorbida a valores altos de a_w ; este comportamiento es característico de compuestos con alto contenido de azúcares y se debe al predominante efecto de las interacciones de solubilización asociados a la disolución del azúcar (Tsami y col., 1990; Fabra y col., 2009). Diferentes autores han informado resultados similares para productos en polvo: piña (Gabas y col., 2007), açai (Tono y col., 2009); pomelo (Fabra y col., 2009), fresa (Mosquera y col., 2012).

Capítulo V. Formulación final: Efecto de la humedad relativa y digestión gastrointestinal in vitro.

La tabla 23 muestra los parámetros para los diferentes modelos (GAB; Caurie; Halsey y Oswin), el coeficiente de determinación (R^2) y el porcentaje de error medio relativo (%E) de B12 estabilizada. El modelo de GAB fue el que presentó los mejores valores de error medio relativo (%E = 4.93%) y $R^2 = 0.989$ Lomauro y col. (1985).

Tabla 23. Parámetros de regresión, pruebas estadísticas (R^2 ; %E) para las isotermas de sorción a 20 °C para B12.

	GAB		Oswin		Halsey		Caurie
	Valores		Valores		Valores		Valores
W_m	0.028	A	0.066	A	0.017	V	11.643
K	1.022	B	0.545	B	1.331	Xs	0.056
C	100						
R²	0.989	R²	0.946	R²	0.976	R²	0.956
E%	4.931	E%	10.165	E%	8.141	E%	11.406

De acuerdo al modelo de GAB, el valor de W_m para B12 fue de 0.028 kg agua/Kg m.s a 20°C; dicho parámetro fue inferior a los informados por Tonon y col., (2009) en polvo de açai por secado spray con MD₁₀ a 25°C (0.050 Kg agua/ Kg m.s); Moraga y col., (2012) en polvo liofilizado de pomelo sin coadyuvante a 20°C (0.077 Kg agua/ Kg m.s) y Mosquera y col., (2012) en fresa liofilizada con MD a 20°C (0.075 kg agua/kg m.s).

Capítulo V. Formulación final: Efecto de la humedad relativa y digestión gastrointestinal in vitro.

El valor de W_m de B12 fue un 50% menor al presentado por B7 (Tabla 20; *Capítulo 4, apartado 4.4*) a la misma temperatura; además de ser menor al valor indicado por Labuza y Altunakar (2002) (0.1 kg agua/kg m.s) como límite para no comprometer la estabilidad del alimento; sugiriendo que la nueva formulación posee una buena estabilidad.

5.4.3 Efecto de la humedad relativa: Cambios en el color, la solubilidad y la morfología de B12.

5.4.3.1 Variaciones en el color y la solubilidad

El efecto del %HR sobre el color y la solubilidad se evaluó para las muestras equilibradas en un rango de 11 a 76% HR a 20°C. Los parámetros a^* , b^* , L^* se presentan en la tabla 24.

Para a^* las muestras hasta el 33% HR no presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$); el parámetro b^* presentó más variabilidad con %HR, mientras que para L^* se observó un efecto marcado solo por encima de 54.4% HR. Para un valor de 76% HR todos los parámetros fueron afectados, a^* disminuyó en más de un 70% ($p < 0.05$) y L^* en un 33% respecto de B12 (control) ($p < 0.05$).

Capítulo V. Formulación final: Efecto de la humedad relativa y digestión gastrointestinal in vitro.

Tabla 24. Parámetros de color en la escala CIEL*a*b* para B12(C) control y estabilizada a diferentes %HR a 20°C.

Muestra (%HR)	L*	a*	b*
B12 (C)	53.69±0.69 ^b	21.83±0.26 ^b	-0.98±0.05 ^{b,c}
11.3	50.80±0.83 ^b	22.11±1.19 ^b	-0.77±0.14 ^{c,d}
23.4	52.31±0.16 ^b	23.28±1.32 ^{b,c}	-0.54±0.08 ^e
33	52.66±2.18 ^b	23.01±0.23 ^{b,c}	-0.59±0.06 ^{d,e}
43.2	51.55±0.66 ^b	24.70±1.06 ^c	-1.07±0.04 ^b
54.4	53.00±1.41 ^b	24.00±0.51 ^{b,c}	-1.45±0.10 ^a
76	35.94±0.90 ^a	5.96±0.14 ^a	0.32±0.07 ^f

Resultados son expresados como el promedio ± desviación estándar de muestras triplicadas. Valores con diferentes letras son significativamente diferentes por columna. Tukey (p<0.05).

Los aumentos de HR entre el 11 y 54% no modificaron significativamente los valores de IS a (p>0.05); sin embargo, para 76% HR se registró una drástica caída de un 73.9% (p<0.05; figura 50.A); esta variación en IS junto con la disminución en L* indicaría el oscurecimiento pronunciado del producto. Este comportamiento fue similar al presentado por B7 a 20°C, el cual a 76%HR y 20°C disminuyó un 90% respecto del valor previo a la estabilización (Capítulo 4, apartado 4.4.4; Figura 46).

Capítulo V. Formulación final: Efecto de la humedad relativa y digestión gastrointestinal in vitro.

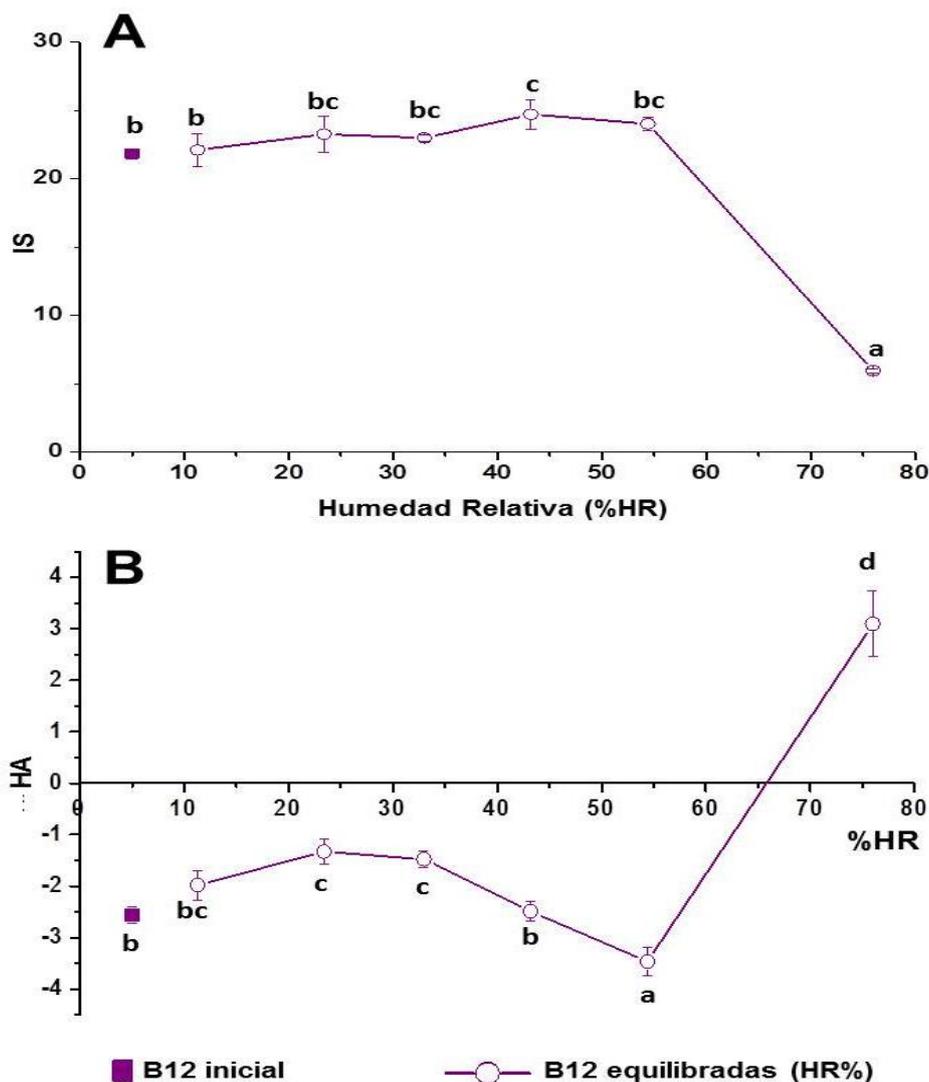


Figura 50. A. Índice de Saturación (IS) y **B.** Ángulo de matiz (HA) y la relación con la humedad relativa (%) a 20°C. Valores con diferentes letras son significativamente diferentes por la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

Para HA se observó un ligero ($p < 0.05$) aumento hasta 33% HR, para luego disminuir nuevamente en 43.2 y 54.4% HR ($p < 0.05$). A 76% HR el valor aumento de -2.65° a 3° , lo que implicaría una mayor contribución del amarillo (figura 50.B), contrario a lo reportado para B7 (Capítulo 4; apartado 4.4.4) en el cuál se presentó un mayor aporte de azul con una variación de -5.57° a -14.63° a 76%HR.

Capítulo V. Formulación final: Efecto de la humedad relativa y digestión gastrointestinal in vitro.

Las variaciones entre las formulaciones B3(b); B7 y B12 iniciales no afectaron los parámetros de color (a^* , b^* , L^* , IS, HA). En la figura 51 (A;B) se ubican aproximadamente los valores obtenidos para cada muestra sin estabilizar (círculos rellenos); estabilizadas a 33% HR (estrellas rellenas) y a 76% HR (triángulos vacíos).

B3(b), B7 y B12 sin estabilizar y expuestas a 33% HR y 20°C presentaron similar contribución de rojo y azul (Figura 51.A), y similar intensidad de color (Figura 51.B); estas diferencias pueden no ser apreciadas por el ojo humano. Por otra parte, la exposición a 76% HR provocó una disminución drástica en los valores de a^* y variaciones significativas para b^* , L^* e IS tanto para B7 como B12; resultando en muestras apreciablemente más oscuras.

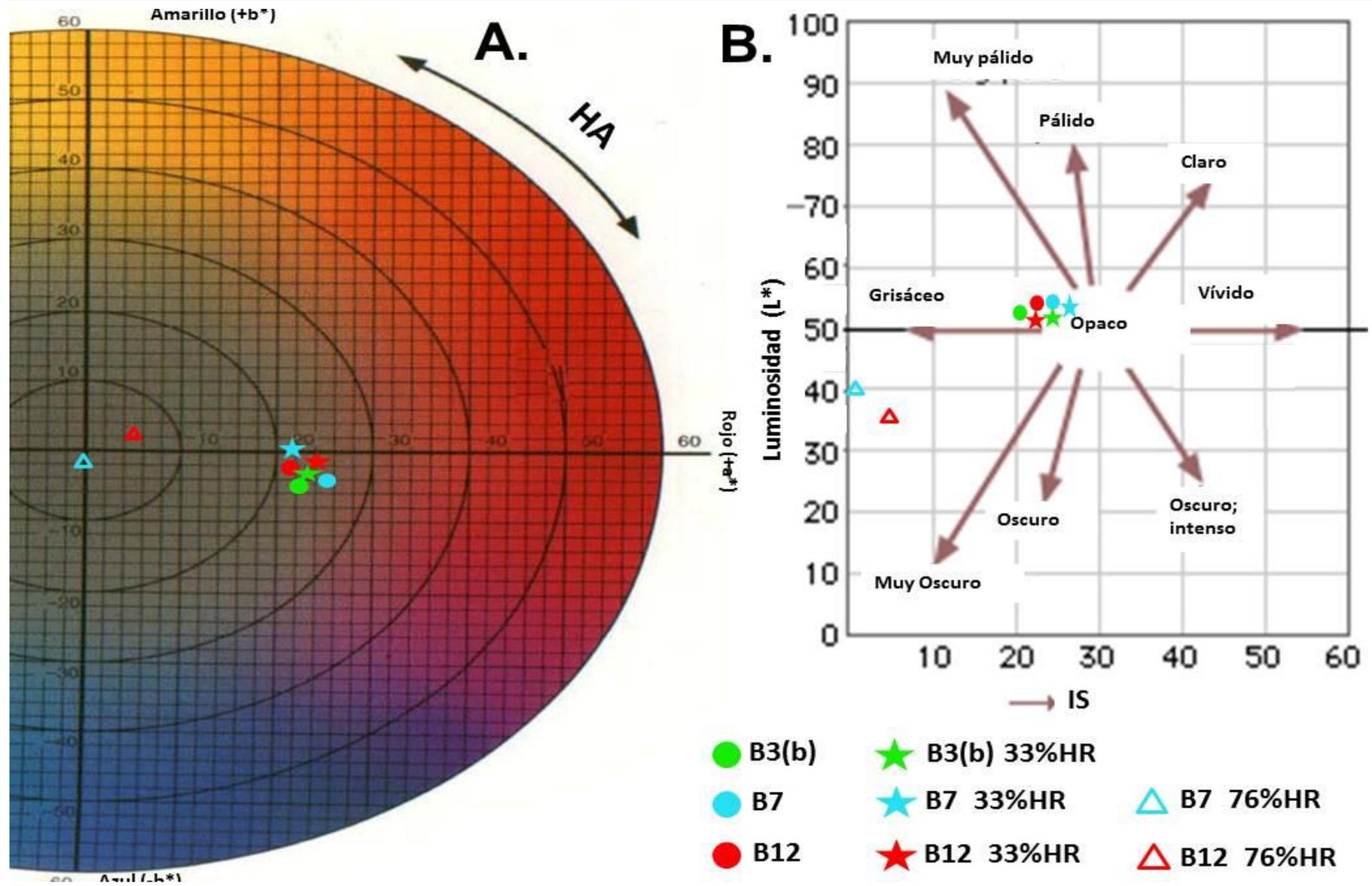


Figura 51. Ubicación aproximada de las formulaciones B3(b); B7 y B12. **A.** Diagrama de cromaticidad a^* y b^* . **B.** Luminosidad vs IS (Gráfico adaptado de Minolta 1990).

Capítulo V. Formulación final: Efecto de la humedad relativa y digestión gastrointestinal in vitro.

En la figura 52 se presenta la bebida en polvo B12 antes (A) y tras la exposición a diferentes %HR (B) donde se observa el gran deterioro provocado por el 76%HR; evidenciando la variación de color informada previamente y la pérdida total de la estructura del polvo, asemejándose a una goma.

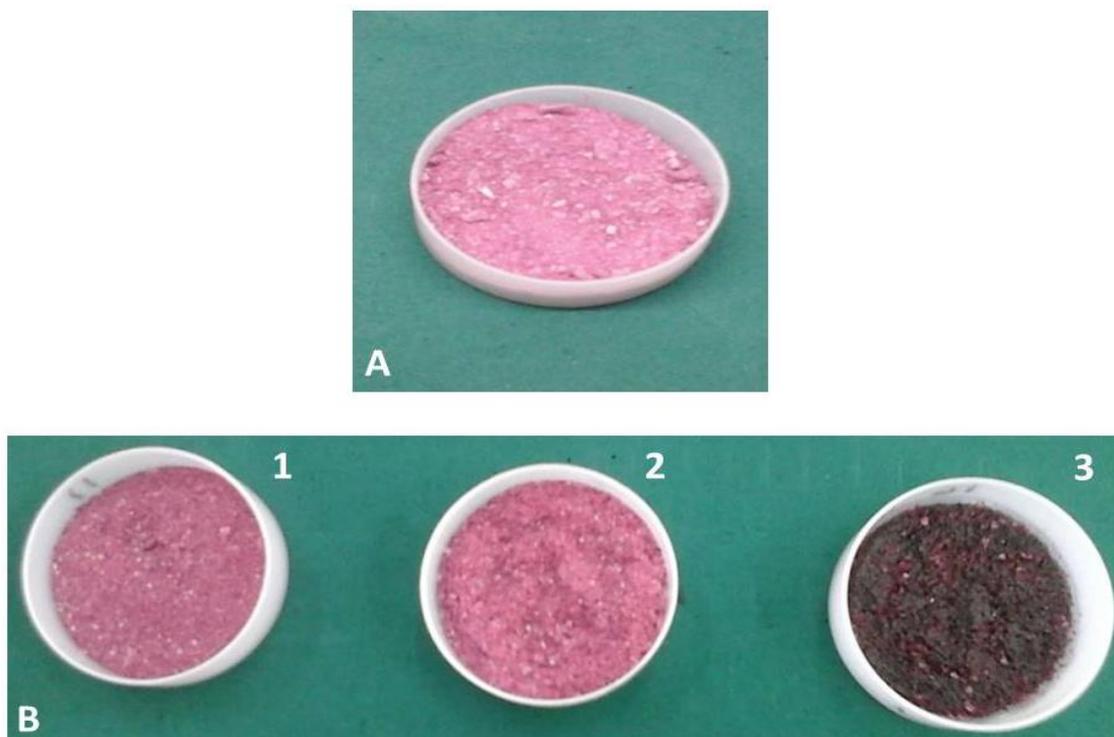


Figura 52. A. B12 sin estabilizar. **B.**B12 estabilizada a 1) 43.2%HR; 2) 54.4%HR y 3) 76%HR a 20°C.

Hasta 33%HR la pérdida de la solubilidad no fue significativa ($p>0.05$); a mayores %HR se detectó la caída significativa ($p<0.05$) hasta su valor mínimo (donde la solubilidad fue cercana al 40%) (Figura 53). Este comportamiento coincide con el colapso total de la muestra (Figura 52.B.3).

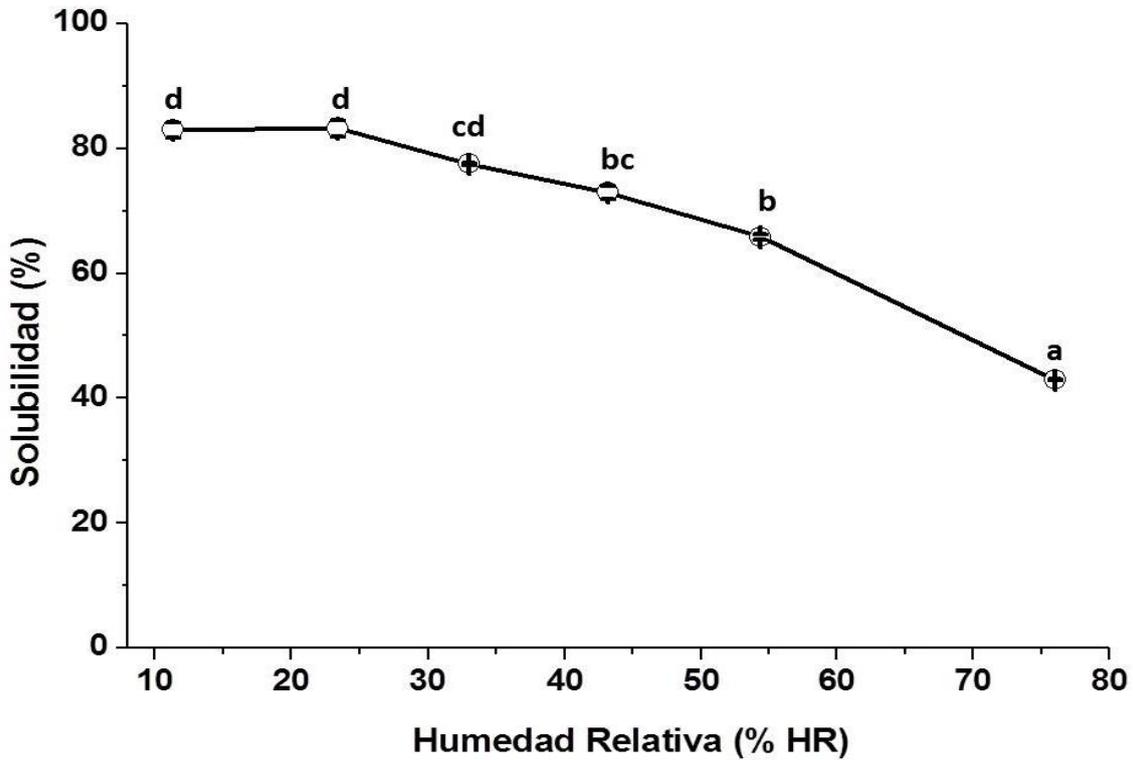


Figura 53. Efecto de la humedad relativa sobre la solubilidad de la bebida en polvo.

5.4.3.2 Cambios en la microestructura del polvo

En la figura 54.A se observa el polvo liofilizado caracterizado por su forma de cristales rotos de diversos tamaños, así como su estructura porosa. En la figura 54.B puede verse la estructura de un cristal de azúcar, caracterizado por tener bordes bien definidos, sobre su superficie algunos fragmentos de polvo liofilizado.

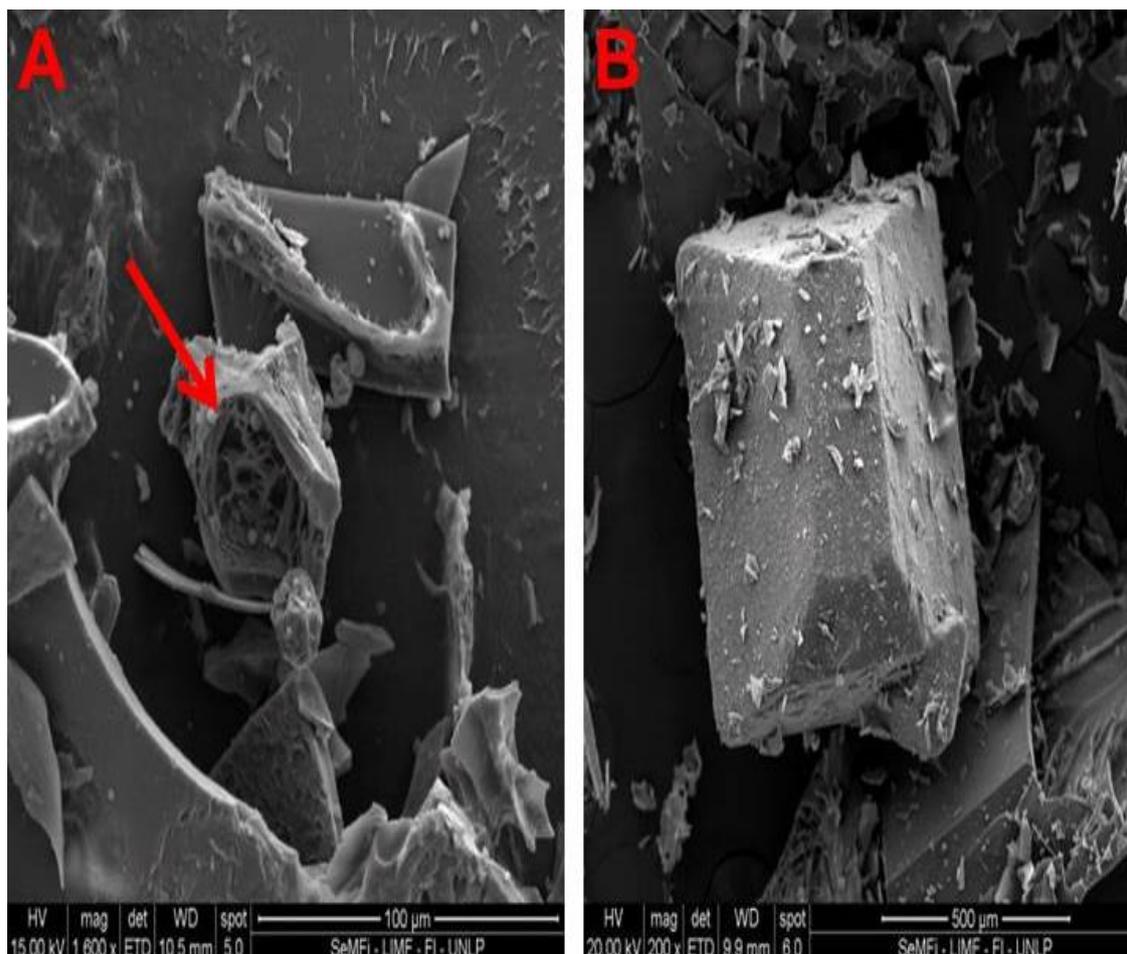


Figura 54. Micrografías electrónicas de barrido de la Bebida en polvo B12.
A. Polvo liofilizado; **B.** Cristal de azúcar. La magnificación se indica en la micrografía.

Es conocido que la captación de agua puede alterar significativamente las propiedades fisicoquímicas de los alimentos en polvo; en el caso de polvos que incluyan carbohidratos, está genera cambios en las propiedades de flujo del polvo como apelmazamiento y aglomeración, y cambios en la retención de compuestos volátiles (Rosenberg, y col, 1985). La microscopía electrónica de barrido (SEM) permite seguir los cambios en la microestructura del polvo durante el proceso de apelmazamiento.

Capítulo V. Formulación final: Efecto de la humedad relativa y digestión gastrointestinal in vitro.

En la figura 55 se presentan las micrografías electrónicas para B12 a 11.3 a 33% HR y 20°C. En dicho rango de bajas humedades relativas no se detectan cambios drásticos en la microestructura.

Se pueden observar algunas microestructuras con forma esférica definida similar a la observada para mezclas en polvo de lactosa/proteína (Haque y Rooss, 2006) y polvo de mora (Ferrari y col., 2012) obtenidos por secado spray, las cuales podrían corresponder al aroma en polvo comercial (Secado spray) utilizado en la formulación final de la bebida (Figura 55 B; D; F; círculo rojo).

Rosenberg, y col, (1985), informaron que la morfología de microencapsulados de metilantrolinato obtenidos por secado spray con goma arábica y maltodextrina no se alteró drásticamente para un rango de bajas e intermedias humedades relativas, manteniendo su forma y tamaño original.

Capítulo V. Formulación final: Efecto de la humedad relativa y digestión gastrointestinal in vitro.

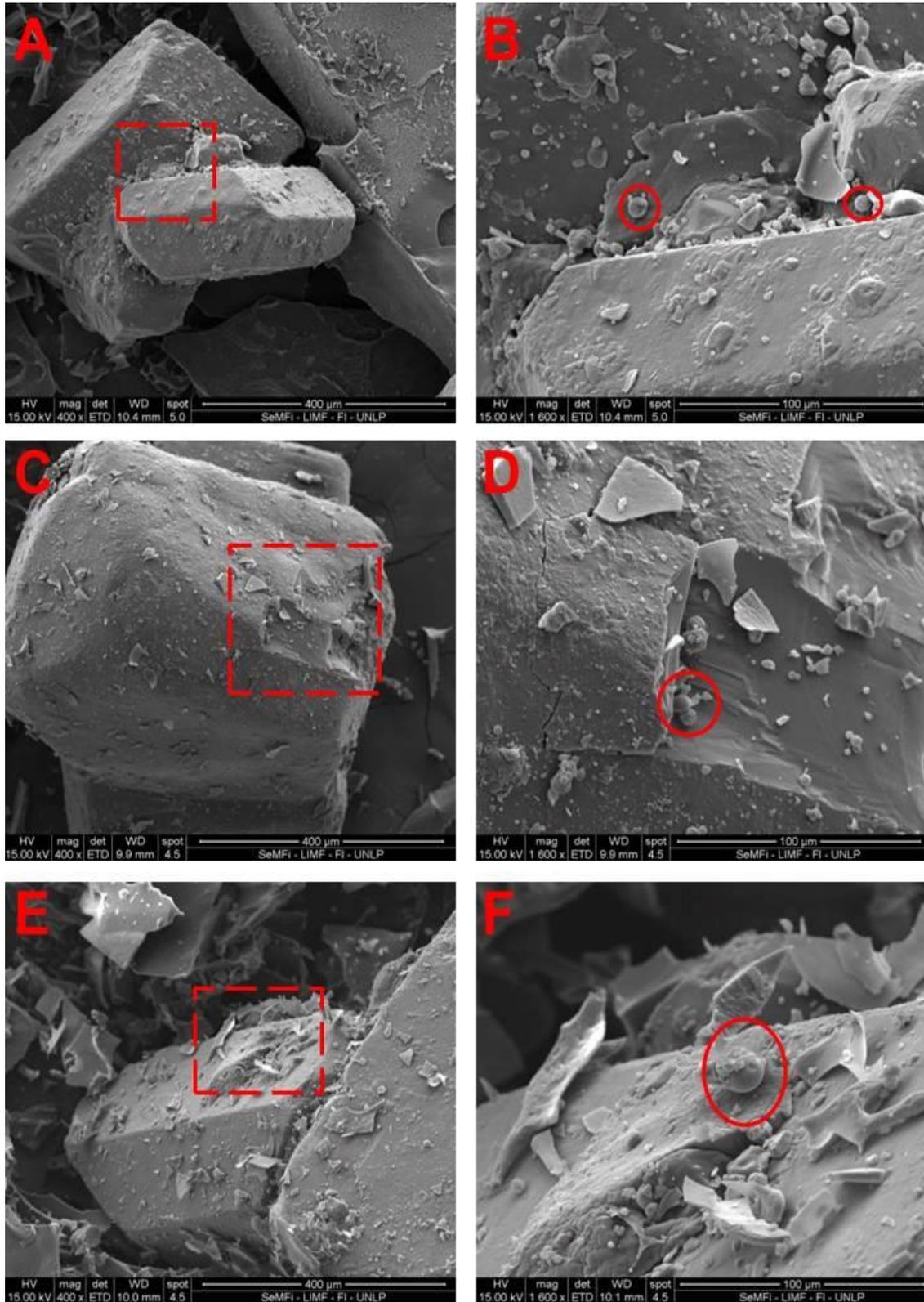


Figura 55. Micrográficas electrónicas de barrido de la Bebida en polvo B12.
A. 11.3% HR, 400x; **B.** Magnificación 1600x recuadro punteado en A.
C. 23.4% HR, 400x; **D.** Magnificación 1600x recuadro punteado en C.
E. 33% HR, 400x; **F.** Magnificación 1600x recuadro punteado en E.

Capítulo V. Formulación final: Efecto de la humedad relativa y digestión gastrointestinal in vitro.

La exposición de B12 a 43 y 54% HR causó cambios más notorios, observándose estructuras con bordes menos definidos, paredes de superficie más rugosa, además de la formación de agregados entre el polvo liofilizado y los cristales de azúcar (figura 56).

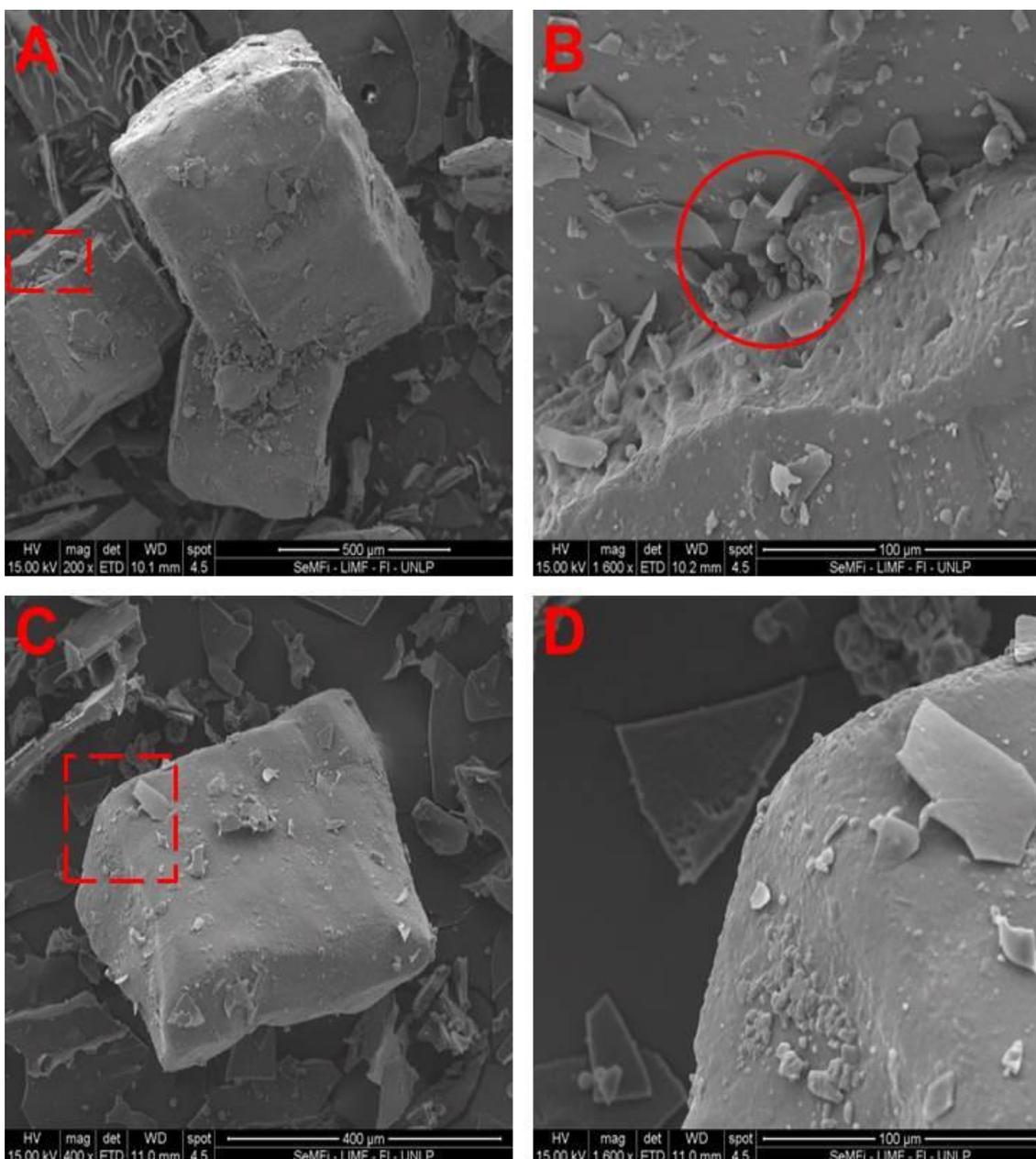


Figura 56. Micrográficas electrónicas de barrido de la Bebida en polvo B12.

A. 43.2% HR, 200x; **B.** Magnificación 1600x recuadro punteado en A.

C. 54.5% HR, 400x; **D.** Magnificación 1600x recuadro punteado en C.

Capítulo V. Formulación final: Efecto de la humedad relativa y digestión gastrointestinal in vitro.

Un comportamiento similar fue reportado en microencapsulados de maltodextrina, donde se evidenció la formación de puentes sólidos formados por disolución de las capas más externas de las cápsulas (Rosenberg, y col, 1985).

Haque y Roos (2006) y Aguilera y col., (1995), reportaron un fuerte efecto de la humedad relativa mayor a 54.5% sobre la microestructura de mezclas lactosa/proteína obtenidas por liofilización y en leche en polvo, respectivamente.

A pesar de los cambios en la microestructura de B12 en dicho rango de HR, aún se puede diferenciar la estructura de sus componentes (Figura 56.B).

A 76%HR se observó la completa destrucción del polvo, la muestra se solubilizó para formar lo que se asemeja a una goma, debido a la cantidad de agua captada para este nivel de HR. Para %HR superiores a 74% la microestructura de mezclas lactosa/proteína sufrió cambios drásticos y en leche en polvo Haque y Roos (2006).

Para dichas condiciones fue necesario usar ESEM (modo ambiental) para observar los cambios. En la figura 57 se puede ver los cristales de azúcar parcialmente fundidos, en una fase continua formada por el polvo liofilizado que perdió totalmente su estructura de vidrios rotos, no se aprecian las formas esféricas atribuidas al aroma en polvo presente en la formulación.

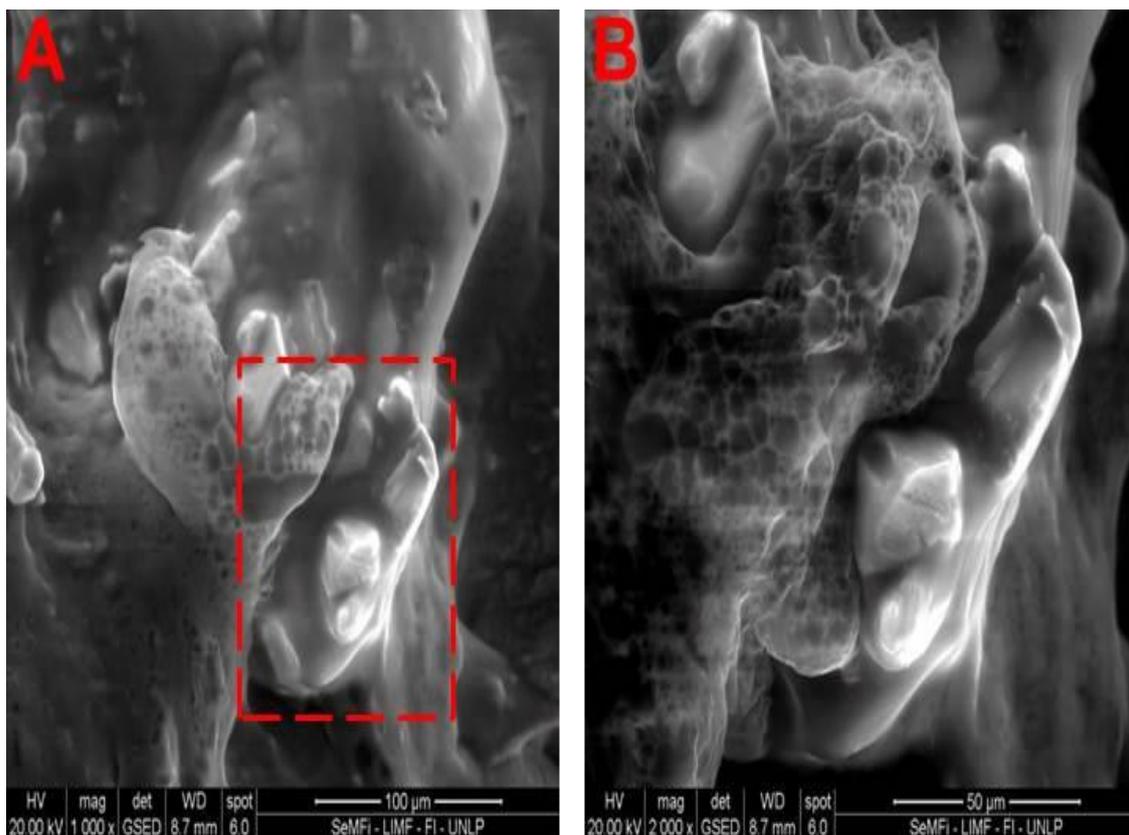


Figura 57. Micrografías electrónicas de barrido modo ambiental (ESEM) de B12. **A.** 76% HR, 1000x; **B.** Magnificación 2000x recuadro punteado en A.

5.4.4 Efecto de la humedad relativa: Compuestos bioactivos y actividad antioxidante

La concentración de PT no varió significativamente ($p > 0.05$) en el rango de 11 a 43%HR, superando dicho rango se apreció un leve aumento ($p < 0.05$) tras el equilibrio a 56%HR y para un 76%HR la concentración disminuyó en un 9.34% respecto del valor de B12 sin equilibrar (Figura 58).

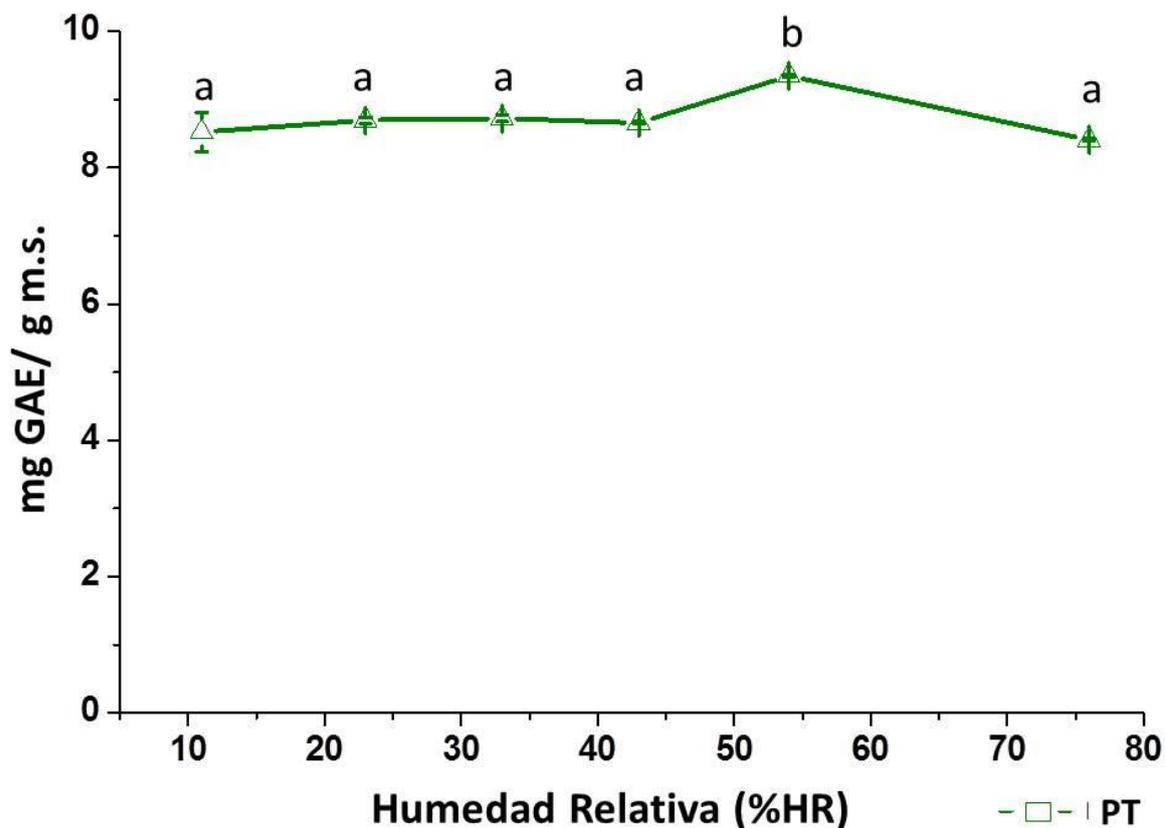


Figura 58. Variación de la concentración de PT a diferentes %HR y 20°C. Valores con diferentes letras son significativamente diferentes. Prueba de Tukey ($p < 0.05$).

La baja disminución en la concentración de PT se puede atribuir a la presencia de maltodextrina, que actúa como material de barrera protegiendo compuestos bioactivos. Bakowska y col. (2011) reportaron que los polvos de Cassis obtenidos por secado spray usando maltodextrina presentaban un mayor contenido de polifenoles totales frente a aquellos obtenidos con inulina, Sáenz y col. (2009) observaron la misma tendencia para polvos de Cactus de pera obtenidos por secado spray.

Capítulo V. Formulación final: Efecto de la humedad relativa y digestión gastrointestinal in vitro.

En el caso de la concentración de antocianinas (MAC) en el rango de 11-33% HR, las variaciones no fueron significativas ($p>0.05$), por encima de estos valores se observó un efecto negativo sobre la estabilidad (Figura 59).

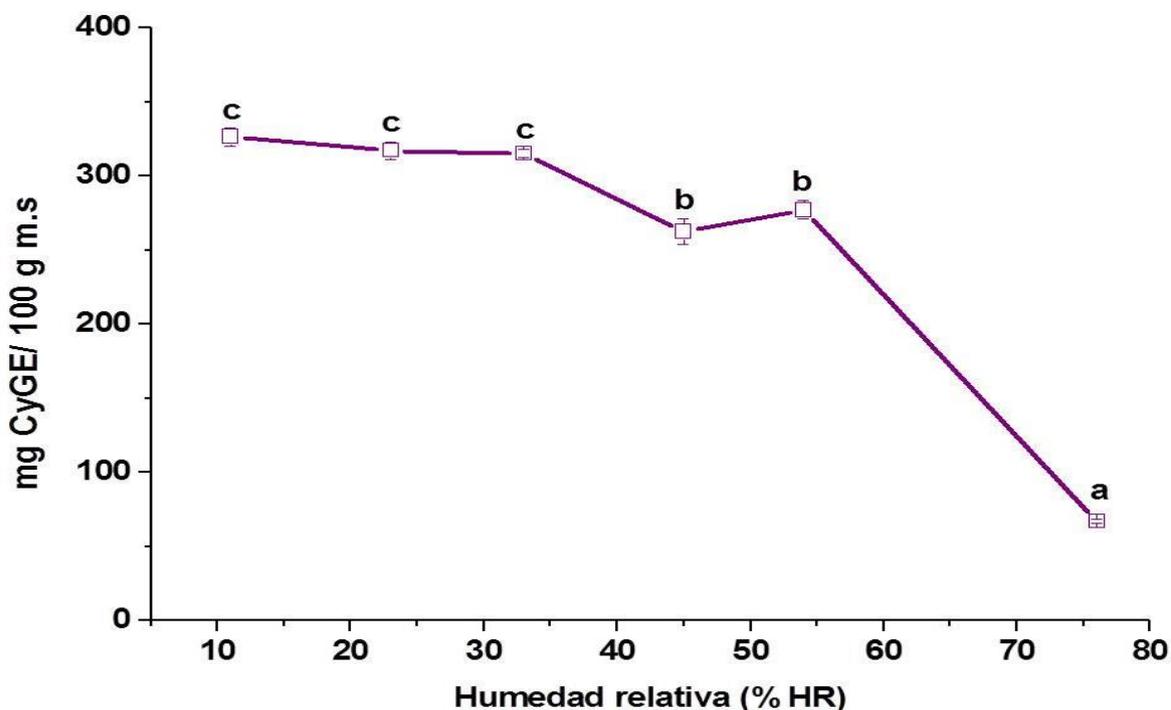


Figura 59. Cambios en el contenido de antocianinas monoméricas (MAC) con la humedad relativa (%) a 20°C. Diferentes letras representan diferencias significativas ($p<0.05$) con la prueba de Tukey.

La concentración de MAC disminuyó un 20% a 44%HR respecto de B12 sin humidificar ($p<0.05$), el aumento a 54%HR no implicó variación significativa ($p>0.05$); mientras que la muestra sometida al equilibrio con un 76% HR disminuyó significativamente un 79.76% ($p<0.05$), alcanzando la concentración mínima de 66.83 mg CyGE/ 100 g m.s.

Capítulo V. Formulación final: Efecto de la humedad relativa y digestión gastrointestinal in vitro.

A diferencia de lo observado para la concentración de PT (Figura 58), la concentración de MAC decreció significativamente ($p < 0.05$) en la condición más extrema; siendo insuficiente el efecto de barrera que podría proporcionar MD al no lograrse la protección de dicho compuesto. Esta diferencia en la tendencia puede ser atribuida a la alta degradación de las antocianinas frente a la exposición al oxígeno, humedad relativa del ambiente y temperatura (Bakawska-Barczak y col., 2003; Syamaladevi y col., 2011).

Para B7 en un rango de 11% a 54% no se observaron pérdidas ($p > 0.05$) en las muestras a 20°C; aunque los efectos de HR a 76% fueron tan perjudiciales como los detectados para B12. Este efecto puede deberse a que son productos higroscópicos y el aumento en el contenido de agua facilita la movilidad molecular, actuando como un favorecedor de la degradación de antocianinas (Tonon y col., 2010; Syamaladevi y col., 2011).

Thakur y Arya, (1989) y Duangmal y col., (2008), demostraron que en la estabilidad de las antocianinas de uva azul (*Jaboticaba*) y extractos de flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) eran más estables en a bajas a_w .

La concentración de ácido ascórbico (AA) disminuyó significativamente ($p < 0.05$) con el aumento del %HR para todo el rango evaluado respecto de B12 sin estabilizar (control; 104.35 mg AA/ 100 g m.s).

Capítulo V. Formulación final: Efecto de la humedad relativa y digestión gastrointestinal in vitro.

Las variaciones entre 11-54.1%HR no fueron significativas ($p>0.05$), presentando el mayor deterioro por encima de dicho rango, con el valor mínimo de 61.00 ± 1.97 mg AA/ 100 g m.s correspondiente una disminución del 41.54% respecto del valor inicial a 76%HR (Figura 60), estos resultados concuerdan con lo reportado por Sablani y col. (2007), que informaron la disminución de la retención de AA para $23\% \leq HR \leq 76\%$.

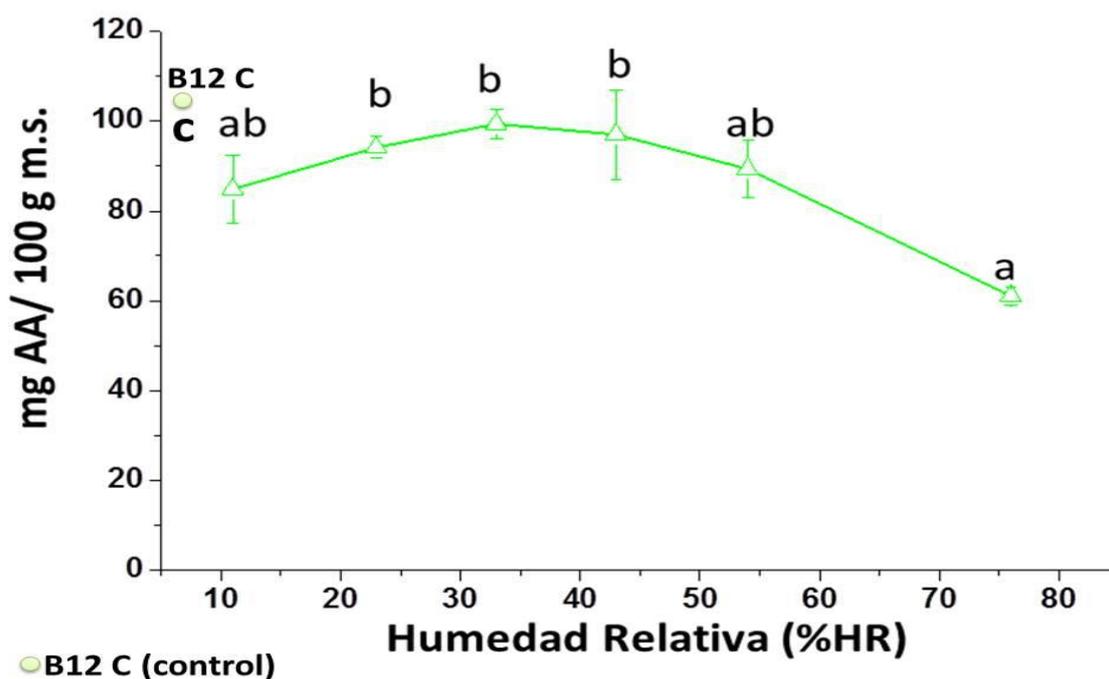


Figura 60. Cambios en el contenido de ácido ascórbico (AA) con %HR a 20°C. Diferentes letras representan diferencias significativas ($p<0.05$) con la prueba de Tukey.

Moraga y col., (2012) observaron que la degradación de AA para muestras de pomelo almacenadas durante 3 meses fue drástica a valores de HR de superiores al 58%. Al comparar entre B7 y B12 a 20°C, se observó que para valores entre 11 y 54.1% HR AA se mantuvo estable para cada muestra ($p>0.05$), superando dicho valor se presentó el deterioro drástico, disminuyendo entre un 34 y 41% de su concentración inicial, respectivamente.

Capítulo V. Formulación final: Efecto de la humedad relativa y digestión gastrointestinal in vitro.

El %I a bajas humedades relativas (11 a 33%) tuvo una disminución marginal ($p>0.05$; Figura 61); esta estabilidad de la actividad antioxidante se condice con lo reportado previamente en este capítulo para las concentraciones de PT; MAC y AA; los cuales se mostraron estables.

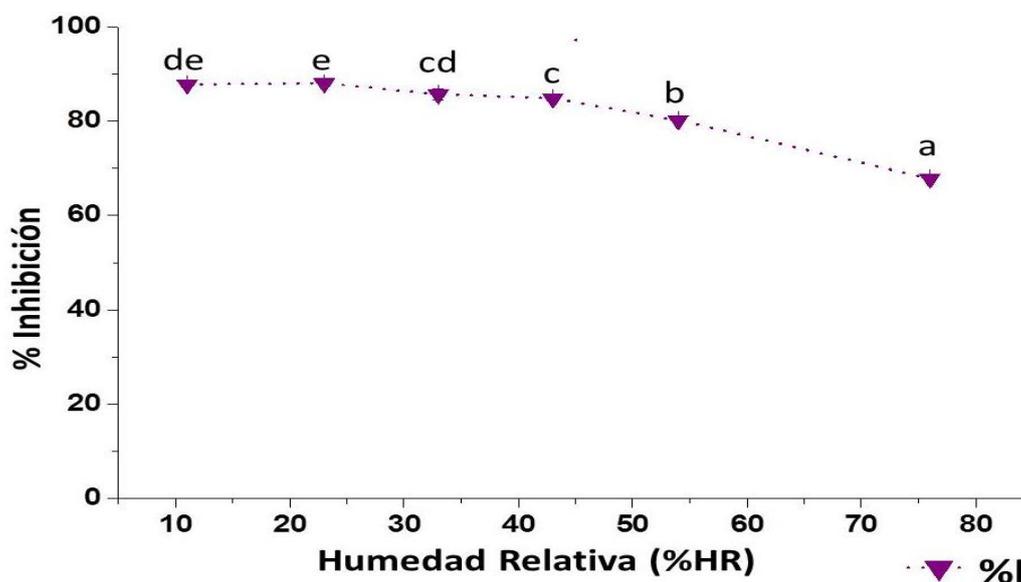


Figura 61. Variación del %I del radical DPPH• con %HR a 20°C. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p<0.05$) con la prueba de Tukey.

A pesar de que las concentraciones de MAC y AA alcanzaron las mayores pérdidas (79.76% y 41.54%, respectivamente) a 76%HR; la reducción en la actividad antioxidante fue solo del 20% (Figura 61).

Moraga y col., (2012), informaron para polvos de pomelo liofilizados sin la adición de coadyuvante, una alta estabilidad de los compuestos polifenólicos pero un decrecimiento significativo en la capacidad antioxidante (%I de DPPH•) tras ser almacenados durante 3 meses en un rango de 11 a 68% HR.

La disminución en la concentración de MAC, AA y %I indican un deterioro en la composición química de la muestra y la disminución de la calidad nutricional para valores $\geq 43\%$.

5.4.5 Relación entre la temperatura de transición vítrea, humedad de equilibrio y actividad acuosa en la bebida en polvo.

5.4.5.1 Temperatura de transición vítrea

El comportamiento térmico y su dependencia de la humedad relativa (%HR) a 20°C se analizaron por calorimetría diferencial de barrido (DSC). En la figura 62 se muestra el termograma correspondiente a B12 sin estabilizar. Los valores de temperatura de transición vítrea fueron: 55.64°C ($T_{g \text{ (onset)}}$); 60.59°C ($T_{g \text{ (i)}}$) y 66.45°C ($T_{g \text{ (f)}}$); garantizando el estado vítreo del producto ($T_{\text{almacenamiento}} < T_{g \text{ (onset)}}$) previo a los ensayos de sorción de agua.

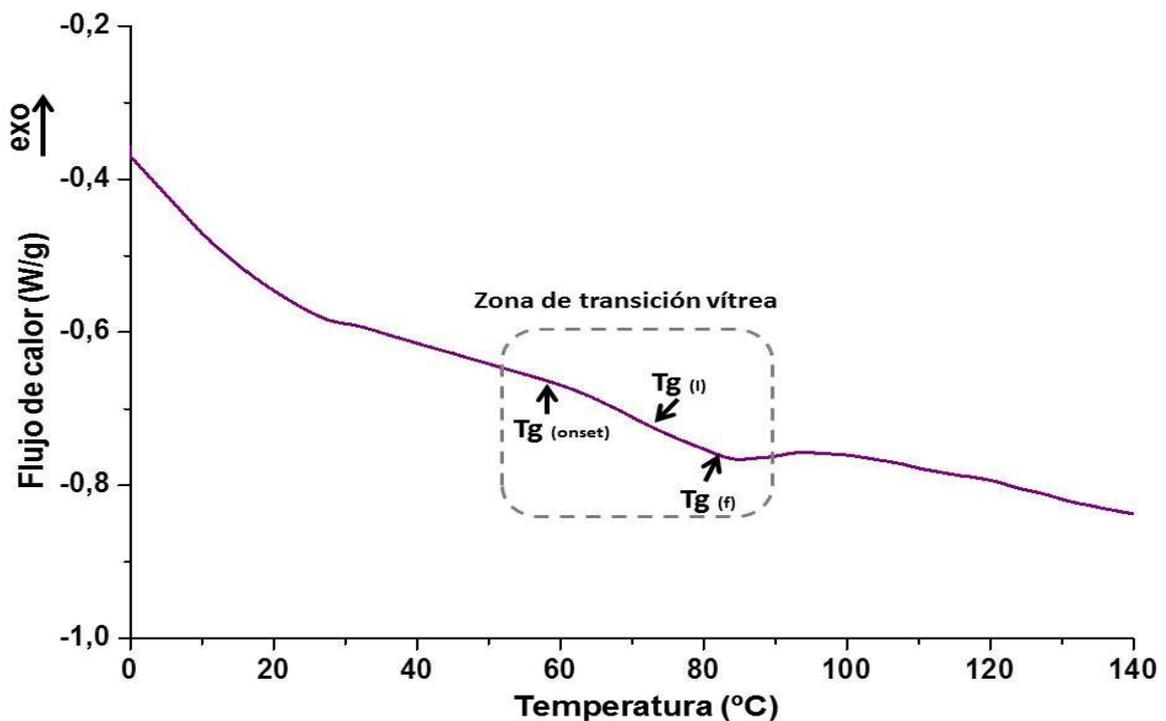


Figura 62. Termograma de B12 inicial (sin estabilizar).

Capítulo V. Formulación final: Efecto de la humedad relativa y digestión gastrointestinal in vitro.

En la tabla 25 se presentan los valores de T_g para B12 antes (control) y después de la estabilización a 11-76% HR y 20°C. Los polvos liofilizados pueden sufrir una transición del estado vítreo al gomoso con pequeñas variaciones en el contenido de agua o de temperatura (Fabra y col., 2009). Los valores de $T_{g(\text{onset})}$, $T_{g(l)}$ y $T_{g(f)}$ de las muestras equilibradas disminuyeron con el aumento en el contenido de agua ($p < 0.05$), demostrando el efecto plastificante del agua sobre la matriz amorfa.

Tabla 25. Valores experimentales de $T_{g(\text{onset})}$, $T_{g(l)}$ y $T_{g(f)}$ de B12 control y equilibradas a 20°C.

%HR	$T_{g(\text{onset})}$	$T_{g(l)}$	$T_{g(f)}$	%H	Estado a $T_{\text{almacenamiento}}$
B12 control	55.64±13.9 ^d	60.59±13.54 ^d	66.45±14.31 ^d	3.10±0.03 ^a	Vítreo
11.3	35.58±6.82 ^c	41.75±5.98 ^c	45.89±7.40 ^c	3.47±0.01 ^b	Vítreo
22.6	30.85±1.53 ^c	35.82±0.30 ^c	40.585±0.43 ^c	3.85±0.01 ^b	Vítreo
33	32.05±5.56 ^c	38.16±1.51 ^c	41.575±2.58 ^c	4.49±0.04 ^c	Vítreo
43.2	29.99±0.69 ^c	35.65±0.11 ^c	40.525±0.88 ^c	5.15±0.02 ^d	Vítreo
54.1	0.88±6.18 ^b	5.08±11.06 ^b	8.2±8.25 ^b	6.07±0.09 ^e	Gomoso
76.1	-33.58±7.47 ^a	-31.395±5.41 ^a	-24.825±1.61 ^a	12.88±0.30 ^f	Gomoso

Resultados son expresados como el promedio ± desviación estándar de muestras duplicadas. Valores con diferentes letras por columna son significativamente diferentes ($p < 0.05$) con la prueba de Tukey.

Para el rango de 11 a 43.2% HR la muestra estaba en estado vítreo con valores de humedad de 3.47 a 5.15% (Tabla 25); un aumento significativo del 15.16% en el contenido de humedad de las muestras almacenadas a 54.1% HR ($p < 0.05$), produce a un descenso de aproximadamente 30°C en los valores

Capítulo V. Formulación final: Efecto de la humedad relativa y digestión gastrointestinal in vitro.

de T_g , alcanzando valores inferiores a $T_{\text{almacenamiento}}$. Lo anterior podría indicar que se ha alcanzado el valor límite de agua absorbida en el cual la muestra permanece en estado vítreo. Un comportamiento similar fue informado por Tonon y col., (2009) en polvos de açai (6% p/p MD DE₁₀) almacenados en un rango de 11.2-84.3% HR a 25°C; presentando un descenso drástico de 35°C entre 52.9 ($T_g= 40.7^\circ\text{C}$) a 68.9% HR ($T_g= 5.35^\circ\text{C}$) y alcanzando el estado gomoso para dicha muestra. Syamaladevi y col., (2011) también informaron un descenso en los valores de T_g de aproximadamente 22°C durante el pasaje al estado gomoso entre 7 ($T_g= 38.9^\circ\text{C}$) a 11.2% HR ($T_g= 17.1^\circ\text{C}$) para polvos de frambuesa sin adición de coadyuvante almacenado a 23°C.

La estabilidad de las características físicas (color, solubilidad) y químicas (PT, MAC, AA y %I) en un rango de 11.2 a 43.2% HR y 20°C, puede ser atribuida al estado vítreo de B12. Superando dicho rango, las muestras presentaron el mayor deterioro con variaciones en el color y disminución en la solubilidad; además de cambios apreciables en la microestructura y en la concentración de bioactivos y %I, ya que las mayores reducciones ocurrieron a 54 y 76%.

Capítulo V. Formulación final: Efecto de la humedad relativa y digestión gastrointestinal in vitro.

5.4.5.2 Diagrama de estado y valores críticos de almacenamiento

Los valores predichos para una temperatura de almacenamiento $T=T_g=20^{\circ}\text{C}$ con los modelos GAB y Gordon & Taylor, se presentan en la tabla 26. El valor de T_{gs} fue 93.07°C similar a los informados para polvo de açai (6% p/p MD DE₁₀) con $T_{gs}=94^{\circ}\text{C}$ (Tonon y col., 2009) y en polvos de Borojó y frutilla con 98.72°C y 64°C respectivamente (Mosquera y col., 2010, 2012). Otros autores reportaron valores inferiores para polvo de pomelo (sin coadyuvante) con $T_{gs}=44.4^{\circ}\text{C}$ (Telis y Martínez-Navarrete, 2009) y $T_{gs}=41.1^{\circ}\text{C}$ (Moraga y col., 2012). Mostrando que la adición de agentes como MD conduce a aumentar considerablemente los valores de T_{gs} .

La figura 63 muestra la relación entre T_g - W_c - a_w correspondiente a B12. El valor máximo de actividad de agua a la que puede ser expuesta es 0.432 y un contenido de humedad de 0.051 Kg agua/Kg m.s; lo anterior indica que almacenar B12 por encima dichos valores a 20°C conllevaría al estado gomoso.

Tonon y col., (2009) obtuvieron valores críticos más altos para a_wC (0.574) y W_cC (0.086 Kg agua/ Kg m.s) para polvos de açai (6% p/p MD DE₁₀); Telis y Martínez-Navarrete, (2009) informaron valores para polvos de pomelo adicionados con maltodextrina de W_cC similar a W_cC de B12 pero un a_wC menor; estas diferencias probablemente se deben al diferente aporte de azúcares por las frutas y al porcentaje de coadyuvante adicionado a los polvos.

Capítulo V. Formulación final: Efecto de la humedad relativa y digestión gastrointestinal in vitro.

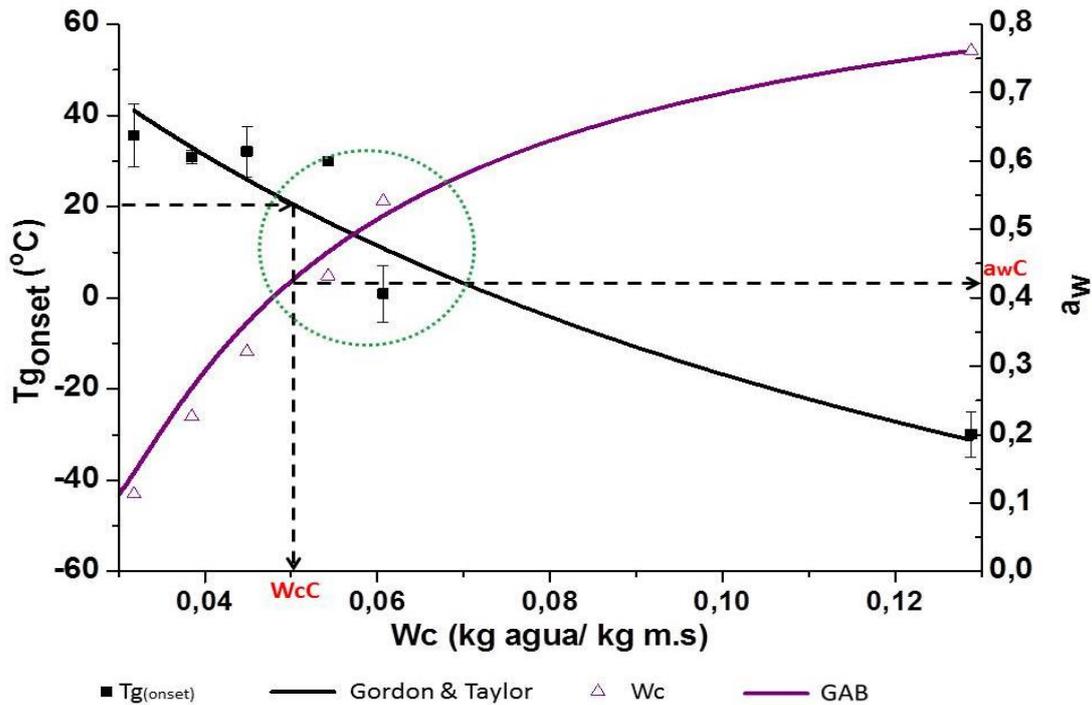


Figura 63. Relación entre $T_{g(\text{onset})}$ - W_c (símbolos rellenos) y a_w - W_c (símbolos huecos). Las líneas representan las predicciones de los modelos de GAB y Gordon y Taylor. Las flechas indican los valores críticos de humedad (W_cC) y actividad de agua crítica (a_wC) a 20 °C.

Polvos de fresa obtenidos por secado spray y liofilización con adición de goma arábica y maltodextrina, presentaron rangos de W_cC de 0.07 a 0.082 kg agua/ kg m.s con a_wC entre 0.093 y 0.331. Con la adición de maltodextrina no se consiguió aumentar el W_cC , aunque sí permitió desplazar la a_wC hasta un valor de 0.241 (Mosquera y col., 2010).

El valor calculado para W_cC fue mayor que el valor de humedad de monocapa (W_m) determinado por el modelo de GAB, en concordancia con lo informado por Tonon y col., (2009) y Moraga y col., (2012), siendo este último un valor de contenido de agua que aseguraría la máxima estabilidad durante el almacenamiento del producto liofilizado.

Capítulo V. Formulación final: Efecto de la humedad relativa y digestión gastrointestinal in vitro.

Sin embargo, algunos autores han reportado valores de W_cC inferiores a W_m para polvos liofilizados de pomelo (Fabra y col., 2004) y pomelo con adición de goma arábica y maltodextrina (Telis y Martínez-Navarrete, 2009).

Las características fisicoquímicas de B12 para los valores críticos a 20°C se resumieron en la tabla 26. La bebida final presentó una alta estabilidad por debajo de dichos valores; una vez alcanzado el equilibrio a 43.2%HR la solubilidad disminuyó el 10% respecto del producto sin equilibrar, mientras que las variaciones en los parámetros de color fueron de mayor importancia para $HR > 43.2\%$ (*Capítulo V, apartado 5.4.3.1*), mientras que algunas variaciones se aprecian en la morfología de los cristales de azúcar y el polvo liofilizado (SEM) (*Capítulo V, apartado 5.4.3.2*).

Capítulo V. Formulación final: Efecto de la humedad relativa y digestión gastrointestinal in vitro.

Tabla 26. Parámetros de los modelos Gordon & Taylor y GAB ajustados a la temperatura de transición vítrea de B12.

Valores críticos de W_cC y a_wC a $T_g = 20^\circ\text{C}$ y características fisicoquímicas.

Parámetros Modelos		Valores críticos a 20°C		Características físicas $a_w = 0.432$		Características químicas $a_w = 0.432$						
Gordon & Taylor	T_{gs}	93.07	W_cC^1	0.051	a^*	24.70	PT (mg GAE/ g m.s)	8.66±0.02				
	$K_{G\&T}$	0.335					a_wC	0.432	b^*	-1.07	MAC (mg CyGE/ 100 g m.s)	262.45±8.69
	R^2	0.90									L	51.55
GAB	W_m^1	0.028	IS	24.73	HA	-2.49	AA (mg AA/ 100 g m.s)	96.97±9.89				
							K_{GAB}	1.022	$\%S$	72.99	$\%I$ (DPPH•)	84.81±0.42
							T_g (onset)	29.99				

¹(kg de agua/ kg m.s)

Capítulo V. Formulación final: Efecto de la humedad relativa y digestión gastrointestinal in vitro.

Las concentraciones de los compuestos bioactivos (PT, MAC y AA) no presentaron variaciones significativas por debajo de $a_w C$, a partir de dicho valor tanto las concentraciones de MAC y AA como la actividad antioxidante disminuyeron significativamente (*Capítulo V; apartado 5.4.4*).

Un aumento ($p < 0.05$) del 15% en el contenido de humedad de B12 humidificada entre 43% (0.0515 kg de agua/ kg m.s) y 54.1% HR (0.0607 kg de agua/ kg m.s), conllevó a un decrecimiento en los valores de T_g (*Capítulo V, apartado 5.4.5, Tabla 25*) alcanzando valores inferiores a $T_{almacenamiento}$.

5.4.6 Digestión in vitro: Efecto sobre PT, MAC y actividad antioxidante

La figura 64 muestra los valores de concentración de PT obtenidos tras la digestión gastrointestinal in vitro (etapas Gástrica **G(act)** y Gastrointestinal **GI(act)** con enzimas activas; **G(inact)** y **GI(inact)** con las enzimas inactivas).

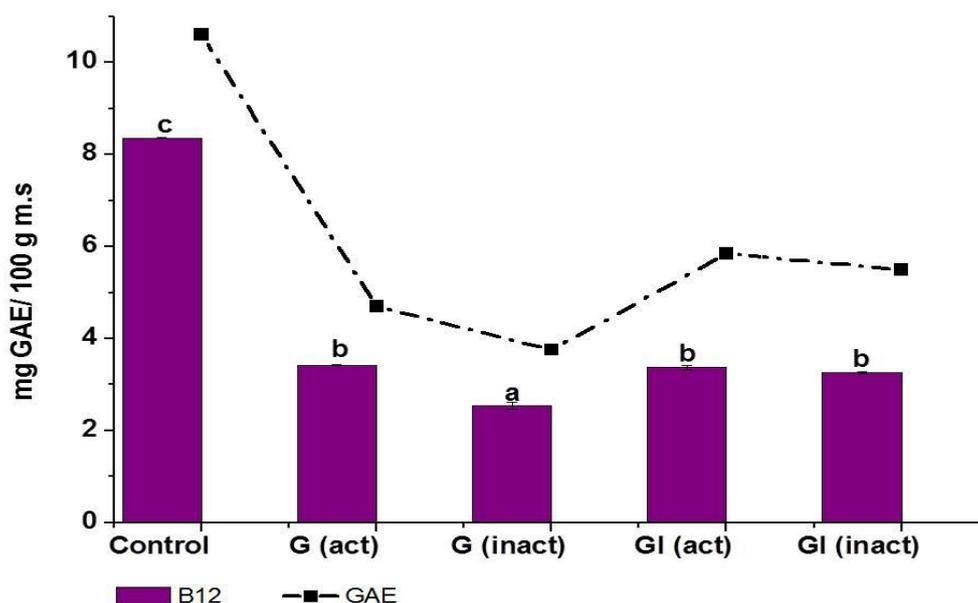


Figura 64. Cambios en la concentración de PT durante las etapas **G(act)** y **GI(act)** y con las enzimas inactivas **G(inact)** y **GI(inact)**. B12(Control) previo a la digestión. Línea punteada representa el comportamiento del estándar de ácido gálico (GAE) evaluado. Diferentes letras corresponden a muestras con diferencias significativas ($p < 0.05$) por la prueba de Tukey.

Capítulo V. Formulación final: Efecto de la humedad relativa y digestión gastrointestinal in vitro.

La concentración de PT disminuyó significativamente ($p < 0.05$) entre un 55 a 59%, una tendencia similar se observó para el estándar de ácido gálico (Figura 64; línea punteada); indicando que estos compuestos no serían estables bajo las condiciones gastrointestinales aplicadas. Cillia y col., (2009) y Tagliazucchi y col., (2010), demostraron que la digestión gastrointestinal disminuía el contenido de PT en un 47% para jugos de fruta y en un 38% para uvas, respectivamente. Siracusa y col., (2011) obtuvieron resultados similares en infusiones acuosas de alcaparra y de hinojo marino.

No se detectaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre **G(act)** y **GI(act)**, lo que indica que la etapa **G(act)** fue determinante en la disminución de la concentración de PT; durante **GI(act)** se mantuvo la bioaccesibilidad de PT. Los valores de concentración de PT obtenidos en la simulación con las enzimas previamente inactivadas fueron ligeramente menores que los obtenidos en con las enzimas activas, siendo solo significativo para **G(inact)** (Figura 64; $p < 0.05$); en concordancia con los resultados obtenidos por Chang y col. (2013) para grosellas, indicando que la digestión enzimática puede mejorar la bioaccesibilidad de los compuestos polifenólicos.

Capítulo V. Formulación final: Efecto de la humedad relativa y digestión gastrointestinal *in vitro*.

Las antocianinas fueron degradadas bajo las condiciones de digestión gastrointestinal aplicadas, alcanzando valores inferiores a 20 mg de CyGE/100 g m.s correspondiente a un 6% de MAC bioaccesibles. No se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las etapas gástrica e intestinal, atribuyéndose el mayor deterioro a **G(act)** (figura 65); resultados similares fueron informados por Bouayed y col., (2011) para la digestión de manzanas, donde las antocianinas no pudieron ser detectadas.

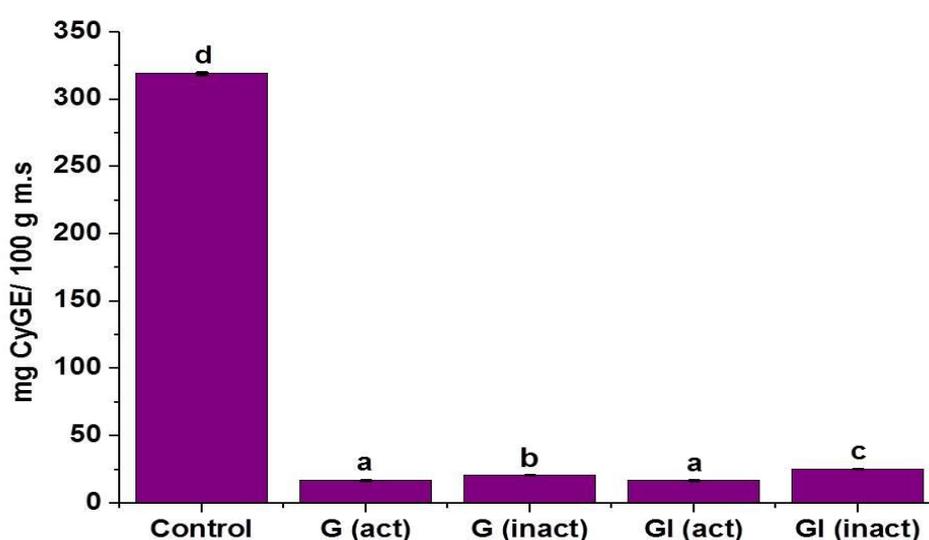


Figura 65. Cambios en la concentración de MAC durante la etapas **G(act)** y **GI(act)** y **G(inact)** y **GI(inact)**. Diferentes letras corresponden a muestras con diferencias significativas ($p < 0.05$) por la prueba de Tukey.

La baja bioaccesibilidad de las antocianinas ha sido vinculada a su alta inestabilidad frente a cambios de temperatura (Bakawska-Barczak y col., 2003) y a las variaciones en el pH a medio alcalino en el intestino delgado (Pérez-Vicente y col., 2002; Tagliacruzchi y col., 2010); sin embargo, se ha sugerido que bajo condiciones *in vivo*, estos compuestos podrían ser absorbidos directamente desde el estómago proporcionando sus características saludables (Manach y col., 2004; Bouayed y col., 2011). Esta condición no fue evaluada durante el presente estudio.

Capítulo V. Formulación final: Efecto de la humedad relativa y digestión gastrointestinal in vitro.

En la figura 66 se presenta la variación de la actividad antioxidante medida por DPPH• antes, durante y después de la simulación gastrointestinal con las enzimas activas e inactivas.

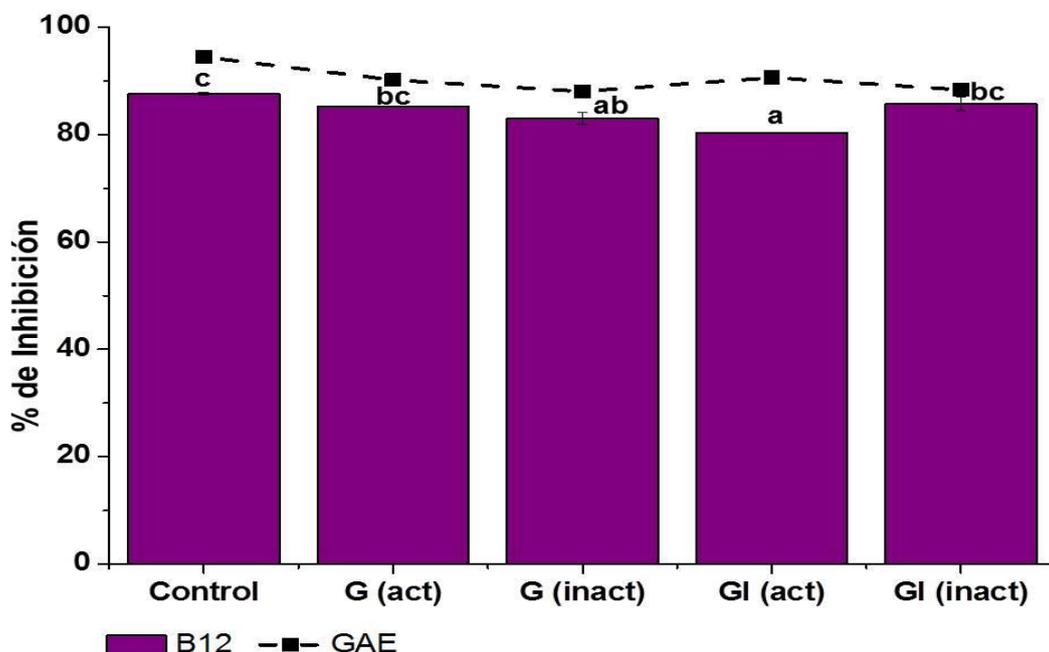


Figura 66. Cambios en la actividad antioxidante durante la etapas **G(act)** y **GI(act)** y con las enzimas inactivas **G(inact)** y **GI(inact)**. Para B12 y el estándar de ácido gálico (GAE). Diferentes letras corresponden a muestras con diferencias significativas ($p < 0.05$). Prueba de Tukey.

En el ensayo realizado con las enzimas activas se observó una reducción ($p > 0.05$) de 2% para **G(act)** y del 7% ($p < 0.05$) para **GI(act)** respecto del control; el %I de **GI(inact)** fue significativamente mayor que el de **GI(act)** ($p < 0.05$), sugiriendo una subsecuente reducción en el intestino delgado como efecto de la enzima. No se apreciaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre las fases **G(act)** y **G(inact)**.

Capítulo V. Formulación final: Efecto de la humedad relativa y digestión gastrointestinal in vitro.

Aunque los niveles bioaccesibles de PT y MAC previamente informados fueron muy bajos, los porcentajes de inhibición obtenidos tras la digestión in vitro fueron altos (80 al 85%), apreciándose una tendencia similar para el ácido gálico durante la misma simulación; sugiriendo que durante el proceso de digestión los compuestos bioactivos contenidos en la bebida pueden presentar cambios a formas que muestran una alta actividad antioxidante. Tarko y col., (2009) informaron alta capacidad antioxidante para ciruelas, manzanas y melón, además de la alta estabilidad capacidad antioxidante para bayas de *Aronia* a pesar de la disminución significativa de la fracción másica de polifenoles y antocianinas tras la digestión; Gil-Izquierdo y col., (2002), informaron la transformación de antocianinas a compuestos con actividad antioxidante durante la digestión de fresas; liberando ácido elágico en forma de elagitaninos provocando un aumento en 10 veces su concentración. Tagliazucchi y col. (2010) y Chang y col., (2013) determinaron el aumento en la actividad antioxidante tras la simulación gastrointestinal en uva y grosellas, respectivamente.

5.5 Conclusiones

- Se determinaron las propiedades de sorción de la bebida en polvo final; la comparación de la bondad de ajuste de los modelos ajustados indicó que GAB fue el que mejor predijo el comportamiento de sorción a 20°C y el rango de humedades relativas usado para B12.
- El producto de estudio presentó una alta estabilidad en sus características físicas (color, solubilidad; morfología) y químicas (contenido de polifenoles, antocianinas, ácido ascórbico y actividad antioxidante) cuando se expuso a humedades relativas entre 11 y 33%; superando el 43.2% HR fueron apreciados cambios de la microestructura y la disminución en la concentración de los compuestos bioactivos y la actividad antioxidante, provocando una pérdida de la calidad nutricional. La exposición a un 76%HR produjo la completa degradación de la estructura del polvo formando una goma.
- La relación $T_g-W_c-a_w$ permitió construir el diagrama de estado modificado para la fase amorfa y estimar los valores críticos (a_wC y W_cC) para una temperatura de 20°C.
- Los niveles bioaccesibles de PT y MAC después de la digestión gastrointestinal fueron muy bajos, sin embargo, la actividad antioxidante (80-85 %I) fue alta, sugiriendo que durante el proceso de digestión los compuestos bioactivos contenidos en la bebida pueden transformarse a formas con alta capacidad antioxidante.



Capítulo VI

Conclusiones



- Fue posible obtener una bebida instantánea saludable de alta palatabilidad a partir de infusiones de Yerba mate y Cassis, permitiendo que las ventajas nutricionales de estos ingredientes lleguen a un mayor número de consumidores. Esta combinación fue ampliamente aceptada por los consumidores; con un balance de aroma a **Frutos rojos/dulzor** que proporcione un realce al sabor final de la bebida; siendo un producto altamente promisorio.
- Por medio de herramientas de análisis sensorial se logró determinar la concentración óptima de la infusión YMI, ajustando el atributo astringencia; además de establecer el contenido de azúcar, edulcorante y aroma “Fruto rojos” comercial necesarios para potenciar los atributos de dulzor y aroma, de gran importancia para la aceptabilidad del producto final.
- Se determinó que la aceptabilidad global de una bebida con sabores no conocidos puede ser mejorada a través de la exposición repetida, este proceso se vería potenciado por un gusto hedónicamente positivo que en este caso correspondería al dulzor.
- Con la metodología **spectrum** se caracterizó el perfil sensorial del producto final, el cual se destacó por una apariencia atractiva, de color y brillo intensos, pronunciado aroma a frutos rojos y buen balance entre el dulzor y la acidez.
- El uso de las metodologías STD e IT permitieron conocer el perfil sensorial dinámico de la bebida final, caracterizada por dos atributos dominantes en el tiempo “**Frutos rojos y Dulzor**” y una alta aceptabilidad global sostenida durante las diferentes ingestas. Estos resultados indican una adopción exitosa por parte de los consumidores.

- Se realizaron estudios de almacenamiento a diferentes temperaturas y humedades relativas, determinando las propiedades de sorción por medio del modelado de diferentes ecuaciones; en los casos estudiados GAB fue el modelo que mejor representa el comportamiento de sorción de agua de las diferentes bebidas en polvo.
- Se evaluaron los cambios debidos a la humedad relativa de almacenamiento sobre las propiedades físicas del polvo. Tanto la temperatura como la actividad acuosa tuvieron un fuerte impacto sobre el color de la muestra, así como en las concentraciones de ácido ascórbico y antocianinas. Para las condiciones de 43%HR y 20°C el producto final mantiene sus características de color y solubilidad con poca variación, mientras que para el valor de 76%HR la captación de agua libre es muy elevada y solubiliza parte de los compuestos durante el almacenamiento generando un cambio de la macroestructura, perdiendo la conformación de polvo para formar una especie de goma.
- El producto de estudio presentó una alta estabilidad en sus características físicas (color, solubilidad; morfología) y químicas (contenido de polifenoles, antocianinas, ácido ascórbico y actividad antioxidante) cuando se expuso a humedades relativas entre 11 y 33%; superando el 43.2% HR fueron apreciados cambios de la microestructura y la disminución en la concentración de los compuestos bioactivos y la actividad antioxidante, provocando una pérdida de la calidad nutricional. Un almacenamiento a 76%HR produjo la completa degradación de la estructura del polvo formando una goma.

- Por medio del diagrama de estado modificado para la fase amorfa, fue posible determinar los valores de contenido de humedad y actividad acuosa críticos para el producto final.
- Las condición de almacenamiento para garantizar el estado vítreo y minimizar el deterioro físico del producto por apelmazamiento y la pérdida de la calidad nutricional debido al deterioro en los compuestos bioactivos y la baja en la actividad antioxidante.
- **$T \leq 20^{\circ}\text{C}$; %HR < 43.2% y $W_c < 0.051 \text{ kg agua/ kg m.s.}$**

Se sugiere el uso de un envasado con materiales de baja permeabilidad al vapor de agua para extender la vida útil del polvo.
- La simulación de digestión in vitro evidenció un fuerte efecto sobre los compuestos bioactivos, los cuales alcanzaron niveles muy bajos durante las fases gástrica e intestinal; sin embargo la actividad antioxidante permaneció alta, sugiriendo que durante el proceso de digestión pueden tener lugar transformaciones de los bioactivos a otras formas con alta actividad antioxidante.
- En el análisis realizado para PT, MAC y %I durante este estudio solo se expone las posibles concentraciones bioaccesibles para ser absorbidas; es necesario realizar ensayos que permitan conocer la biodisponibilidad de dichos compuestos y determinar la fracción que puede ser usada en procesos fisiológicos por el organismo humano.

Referencias

A

- Ablin, A. (2013). El Mercado del jugo en polvo. *Editorial Alimentos Argentinos, Buenos Aires*.
- Aguilera, J., del Valle, J., & Karel, M. (1995). Caking phenomena in amorphous food powders. *Trends in Food Science & Technology*, 6(5), 149-155.
- Al-Muhtaseb, A. H., McMinn, W. A. M., & Magee, T. R. A. (2002). Moisture sorption isotherm characteristics of food products: a review. *Food and Bioproducts Processing*, 80(2), 118-128.
- Al-Muhtaseb, A. H., McMinn, W. A. M., y Magee, T. R. A. (2004a). Water sorption isotherms of starch powders: part 1: mathematical description of experimental data. *Journal of food Engineering*, 61(3), 297-307.
- Al-Muhtaseb, A. H., McMinn, W. A. M., y Magee, T. R. A. (2004b). Water sorption isotherms of starch powders. Part 2: Thermodynamic characteristics. *Journal of Food Engineering*, 62(2), 135-142.
- Anonymous (1975) Minutes of Division Business Meeting. Institute of Food Technologists – Sensory Evaluation Division, IFT, Chicago, IL.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists) (1998). Official methods of analysis (16th ed.). Gaithersburg, USA.
- Ares, G., & Jaeger, S. R. (2015). Examination of sensory product characterization bias when check-all-that-apply (CATA) questions are

Referencias

used concurrently with hedonic assessments. *Food Quality and Preference*, 40, 199-208.

- Argentino, C. A. (2007). Capítulo XII: Bebidas analcólicas, bebidas hídricas, agua y agua gasificada.
- ASTM (1977). Manual on Sensory Testing and Methods, STP 434, pp. 39–40. Philadelphia, PA: American Society for Testing and Materials.

B

- Bajec, M. R., & Pickering, G. J. (2008). Astringency: mechanisms and perception. *Critical reviews in food science and nutrition*, 48(9), 858-875.
- Bakker, J., & Clarke, R. J. (2011). *Wine: flavour chemistry*. John Wiley & Sons.
- Bakowska-Barczak, A. M., & Kolodziejczyk, P. P. (2011). Black currant polyphenols: Their storage stability and microencapsulation. *Industrial Crops and Products*, 34(2), 1301-1309.
- Barbosa-Cánovas, G. V., & Vega-Mercado, H. (2000). *Deshidratación de alimentos*. Acribia.
- Barbosa-Cánovas, G. V., Ortega-Rivas, E., Juliano, P., & Yan, H. (2005). Particle properties. *Food Powders: Physical Properties, Processing, and Functionality*, 19-54.
- Beldarraín, A., López-Lacomba, J. L., Kutysenko, V. P., Serrano, R., & Cortijo, M. (2001). Multidomain structure of a recombinant streptokinase. A differential scanning calorimetry study. *Journal of protein chemistry*, 20(1), 9-17.

Referencias

- Beristain, C. I., Garcia, H. S., & Azuara, E. (1996). Enthalpy-entropy compensation in food vapor adsorption. *Journal of Food Engineering*, 30(3), 405-415.
- Bhandari, B. R., & Howes, T. (1999). Implication of glass transition for the drying and stability of dried foods. *Journal of Food Engineering*, 40(1), 71-79.
- Bouayed, J., Hoffmann, L., & Bohn, T. (2011). Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake. *Food Chemistry*, 128(1), 14-21.
- Bower, J. A., Saadat, M. A., & Whitten, C. (2003). Effect of liking, information and consumer characteristics on purchase intention and willingness to pay more for a fat spread with a proven health benefit. *Food Quality and Preference*, 14(1), 65-74.
- Brandt, M. A., Skinner, E. Z. y Coleman, J. A. (1963). Texture profile method. *Journal of Food Science*, 28(4), 404-409.
- Burtnik, O. J. (2006). Yerba mate: Manual de producción. *INTA, AER Santo Tomé, Corrientes, Argentina*. 52p.

C

- Cadena, R. S., y Bolini, H. M. A. (2011). Time–intensity analysis and acceptance test for traditional and light vanilla ice cream. *Food Research International*, 44(3), 677-683.
- Calviño, A., Garrido, D., y García, M. (2000). Potency of sweetness of aspartame, Dtryptophan and thaumatin evaluated by single value and

Referencias

- time–intensity measurements. *Journal of Sensory Studies*, 15(1), 47–64.
- Calviño, A. M., Tamasi, O.P., Drunday, F., Cossalter, R, y Garrido, D. (2012). Sensory analysis of bitterness and astringency of infusions of Yerba mate. In A.M. Calviño (Ed.), *Recent Contributions to Sensory Analysis of Foods* (pp. 131-150). Kerala, India: Research Signpost.
 - Carvalho P, Benedetti D, Marques-Pedro M, Telis-Romero J, Nicoletti-Telis VR. (2011). Influence of encapsulating materials on water sorption isotherms of vacuum-dried persimmon pulp powder. *Journal of Food Processing and Preservation*, 35(4), 423-431.
 - Casati, C. B., Sánchez, V., Baeza, R., Magnani, N., Evelson, P., & Zamora, M. C. (2012). Relationships between colour parameters, phenolic content and sensory changes of processed blueberry, elderberry and blackcurrant commercial juices. *International Journal of Food Science & Technology*, 47(8), 1728-1736.
 - Cilla, A., González-Sarrías, A., Tomás-Barberán, F. A., Espín, J. C., & Barberá, R. (2009). Availability of polyphenols in fruit beverages subjected to in vitro gastrointestinal digestion and their effects on proliferation, cell-cycle and apoptosis in human colon cancer Caco-2 cells. *Food Chemistry*, 114(3), 813-820.
 - Chen, J., & Jane, J. (1994). Properties of granular cold-water-soluble starches prepared by alcoholic-alkaline treatments. *Cereal chemistry*, 71(6), 623-626.

Referencias

- Chiang, C. J., Kadouh, H., & Zhou, K. (2013). Phenolic compounds and antioxidant properties of gooseberry as affected by in vitro digestion. *LWT-Food Science and Technology*, 51(2), 417-422.
- Chollet, S., Lelièvre, M., Abdi, H., & Valentin, D. (2011). Sort and beer: Everything you wanted to know about the sorting task but did not dare to ask. *Food Quality and Preference*, 22(6), 507-520.
- Cooke, L. (2007). The importance of exposure for healthy eating in childhood: a review. *Journal of human nutrition and dietetics*, 20(4), 294-301.
- Costell, E., Tárrega, A., & Bayarri, S. (2010). Food acceptance: the role of consumer perception and attitudes. *Chemosensory Perception*, 3(1), 42-50.

D

- Delwiche, J. F., & Warnock, A. R. (2008). Perception and acceptance of sweeteners. *Sweetness and Sweeteners Biology, Chemistry and Psychophysics*, DK Weerasinghe and G. DuBois, Eds. Oxford University Press/American Chemical Society, 476, 477-478.
- Demarchi, S. M., Ruiz, N. A. Q., & Giner, S. A. (2014). Sorptional behaviour of rosehip leather formulations added with sucrose or polydextrose. *Biosystems Engineering*, 118, 83-94.
- Desmet, P. M., & Schifferstein, H. N. (2008). Sources of positive and negative emotions in food experience. *Appetite*, 50(2), 290-301.

Referencias

- Dinnella, C., Recchia, A., Tuorila, H., & Monteleone, E. (2011). Individual astringency responsiveness affects the acceptance of phenol-rich foods. *Appetite*, 56(3), 633-642.
- Di Monaco, R., Miele, N. A., Volpe, S., Picone, D., & Cavella, S. (2014). Temporal sweetness profile of MNEI and comparison with commercial sweeteners. *Journal of Sensory Studies*, 29(6), 385-394.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2013. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Duangmal, K., Saicheua, B., & Sueeprasan, S. (2008). Colour evaluation of freeze-dried roselle extract as a natural food colorant in a model system of a drink. *LWT-Food Science and Technology*, 41(8), 1437-1445.

E

- Estupiñan, D. C., Schwartz, S. J., & Garzón, G. A. (2011). Antioxidant activity, total phenolics content, anthocyanin, and color stability of isotonic model beverages colored with Andes berry (*Rubus glaucus* Benth) anthocyanin powder. *Journal of food science*, 76(1), S26-S34.

F

- Fabra, M. J., Talens, P., Moraga, G., & Martínez-Navarrete, N. (2009). Sorption isotherm and state diagram of grapefruit as a tool to improve product processing and stability. *Journal of Food Engineering*, 93(1), 52-58.

Referencias

- FAO/OMS. Métodos de análisis y muestreo. (2008). Programa conjunto fao/oms sobre normas alimentarias comité del codex sobre contaminantes en los alimentos.
- Fennema, O. W. E. N. (2000). Química de los alimentos. Acribia. Zaragoza, España, 433-469.
- Ferrari, C. C., Germer, S. P. M., Alvim, I. D., Vissotto, F. Z., & de Aguirre, J. M. (2012). Influence of carrier agents on the physicochemical properties of blackberry powder produced by spray drying. *International Journal of Food Science & Technology*, 47(6), 1237-1245.
- Ferrari, C. C., Marconi Germer, S. P., Alvim, I. D., & de Aguirre, J. M. (2013). Storage stability of spray-dried blackberry powder produced with maltodextrin or gum arabic. *Drying Technology*, 31(4), 470-478.
- Filip, R., & Ferraro, G. E. (2003). Researching on new species of "Mate": *Ilex brevicuspis*. *European journal of nutrition*, 42(1), 50-54.
- Filip, R., Lotito, S. B., Ferraro, G., & Fraga, C. G. (2000). Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species. *Nutrition research*, 20(10), 1437-1446.
- François, N., Guyot-Declerck, C., Hug, B., Callemien, D., Govaerts, B., y Collin, S. (2006). Beer astringency assessed by time-intensity and quantitative descriptive analysis: Influence of pH and accelerated aging. *Food Quality and Preference*, 17, 445-452.

G

- Gabas, A. L., Telis, V. R. N., Sobral, P. J. A., & Telis-Romero, J. (2007). Effect of maltodextrin and arabic gum in water vapor sorption thermodynamic properties of vacuum dried pineapple pulp powder. *Journal of Food Engineering*, 82(2), 246-252.
- Gacula, M., Mohan, P., Faller, J., Pollack, L., & Moskowitz, H. R. (2008). Questionnaire practice: what happens when the JAR scale is placed between two “overall” acceptance scales?. *Journal of sensory studies*, 23(1), 136-147.
- Galmarini, M. V., Schebor, C., Zamora, M. C., & Chirife, J. (2009). The effect of trehalose, sucrose and maltodextrin addition on physicochemical and sensory aspects of freeze-dried strawberry puree. *International journal of food science & technology*, 44(10), 1869-1876.
- Galmarini, M. V. (2010). *Estudios sensoriales y fisicoquímicos del disacárido trehalosa en relación a su uso como ingrediente funcional en alimentos* (Disertación Doctoral, PhD tesis, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina).
- Galmarini, M. V., Symoneaux, R., Visalli, M., Zamora, M. C., & Schlich, P. (2015). Static vs. dynamic liking in chewing gum: A new approach using a background task and a natural setting. *Food Quality and Preference*, 40, 381-386.

Referencias

- Gil-Izquierdo, A., Gil, M. I., Ferreres, F., & Tomás-Barberán, F. A. (2001). In vitro availability of flavonoids and other phenolics in orange juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(2), 1035-1041.
- Giusti, M. M., & Wrolstad, R. E. (2001). Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. *Current protocols in food analytical chemistry*.
- Goldner, M. C., & Zamora, M. C. (2010). Effect of polyphenol concentrations on astringency perception and its correlation with gelatin index of red wine. *Journal of Sensory Studies*, 25(5), 761-777.
- González, A., Ferreira, F., Vázquez, A., Moyna, P., y Paz, E. A. (1993). Biological screening of Uruguayan medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 39(3), 217-220.
- Gordon, M., & Taylor, J. S. (1952). Ideal copolymers and the second-order transitions of synthetic rubbers. I. Non-crystalline copolymers. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2(9), 493-500.
- Guinard, J. X., Pangborn, R. M., & Lewis, M. J. (1986). Preliminary studies on acidity-astringency interactions in model solutions and wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 37(8), 811-817.

H

- Haque, M. K., & Roos, Y. H. (2006). Differences in the physical state and thermal behavior of spray-dried and freeze-dried lactose and lactose/protein mixtures. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 7(1), 62-73.

Referencias

- Han, X., Shen, T., & Lou, H. (2007). Dietary polyphenols and their biological significance. *International Journal of Molecular Sciences*, 8(9), 950-988.
- Hanoch, Y., Wood, S., y Rice, T. (2007). Bounded rationality, emotions and older adult decision making: Not so fast and yet so frugal. *Human Development*, 50(6), 333-358.
- Heck, C. I., & De Mejia, E. G. (2007). Yerba mate Tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. *Journal of food science*, 72(9), R138-R151.
- Heck, C. I., Schmalko, M., & Gonzalez de Mejia, E. (2008). Effect of growing and drying conditions on the phenolic composition of mate teas (*Ilex paraguariensis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(18), 8394-8403.
- Hongyan, L., Tsao, R., & Deng, Z. (2012). Factors affecting the antioxidant potential and health benefits of plant foods. *Canadian Journal of Plant Science*, 92(6), 1101-1111.
- Hootman, R. C. (1992). Manual on descriptive analysis testing for sensory evaluation. Philadelphia, PA: ASTM.
- Hussain, R., & Ali, M. (2015). Effect of store atmosphere on consumer purchase intention.

I

- Ibáñez, F.C & Barcino, Y. (2001). *Análisis sensorial de alimentos: métodos y aplicaciones*. Barcelona: Springer-Verlag.
- Iglesias, H. A., & Chirife, J. (1976). Isosteric heats of water vapor sorption on dehydrated foods. I. analysis of the differential heat curves. *LWT Lebensmittel Wissensch Technol.*

J

- Jaeger, S. R., Axten, L. G., Wohlers, M. W., & Sun-Waterhouse, D. (2009). Polyphenol-rich beverages: insights from sensory and consumer science. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(14), 2356-2363.
- Juliano, P., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2010). Food powders flowability characterization: theory, methods, and applications. *Annual review of food science and technology*, 1, 211-239.

K

- Kang, K. W., Echarri, J. M., & Llorente, C. L. (2013). Servicio de microscopía electrónica de barrido y microanálisis del LIMF-Facultad de Ingeniería-UNLP. In *II Jornadas de Investigación y Transferencia de la Facultad de Ingeniería*.
- Kemp, S.E., Hollowood, T., & Hort, J. (2009). *Sensory evaluation: a practical handbook*. United Kingdom: Wiley-Blackwell.

Referencias

- King, S. C., & Meiselman, H. L. (2010). Development of a method to measure consumer emotions associated with foods. *Food Quality and Preference*, 21(2), 168-177.
- Krug, R. R., Hunter, W. G., & Grieger, R. A. (1976). Enthalpy-entropy compensation. 1. Some fundamental statistical problems associated with the analysis of van't Hoff and Arrhenius data. *The Journal of Physical Chemistry*, 80(21), 2335-2341.
- Krutulyte, R., Grunert, K. G., Scholderer, J., Lähteenmäki, L., Hagemann, K. S., Elgaard, P., & Graverholt, J. P. (2011). Perceived fit of different combinations of carriers and functional ingredients and its effect on purchase intention. *Food Quality and Preference*, 22(1), 11-16.

L

- Labbe, D., Schlich, P., Pineau, N., Gilbert, F., & Martin, N. (2009). Temporal dominance of sensations and sensory profiling: A comparative study. *Food Quality and Preference*, 20(3), 216-221.
- Labuza, T.P., & Ball, L.N. (2000). Moisture Sorption: Practical Aspects of Isotherm Measurement y Use, 2nd ed. American Association of Cereal Chemists (MN). 2002. p. 35-45.
- Labuza, T. P., & Altunakar, B. (2007). Water activity prediction and moisture sorption isotherms. *Water activity in foods: fundamentals and applications*, 1.

Referencias

- Lawless, H.T. & Heymann, H. (2003/2010). Introduction: Introduction and Overview. *Sensory Evaluation of Food: Principles and Practices*. (pp. 1-17). New York: Springer.
- Larson-Powers, N., & Pangborn, R. S. (1978). Paired comparison and time–intensity measurements of the sensory properties of beverages and gelatins containing sucrose or synthetic sweeteners. *Journal of Food Science*, 43(1), 41–46.
- Lee III, W. E., & Pangborn, M. (1986). Time-intensity: the temporal aspects of sensory perception. *Food technology (USA)*.
- Leffler, J. E. (1955). The enthalpy-entropy relationship and its implications for organic chemistry. *The Journal of Organic Chemistry*, 20(9), 1202-1231.
- Lesschaeve, I., & Noble, A. C. (2005). Polyphenols: factors influencing their sensory properties and their effects on food and beverage preferences. *The American journal of clinical nutrition*, 81(1), 330S-335S.
- Lewicki, P. P. (1997). The applicability of the GAB model to food water sorption isotherms. *International journal of food science & technology*, 32(6), 553-557.
- Ley, J. P. (2008). Masking bitter taste by molecules. *Chemosensory Perception*, 1(1), 58-77.
- Le Révérend, F. M., Hidrio, C., Fernandes, A., & Aubry, V. (2008). Comparison between temporal dominance of sensations and time intensity results. *Food Quality and Preference*, 19(2), 174-178.

- Lomauro, C. J., Bakshi, A. S., & Labuza, T. P. (1985). Evaluation of food moisture sorption isotherm equations. Part I: Fruit, vegetable and meat products. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 18(2), 111-117.

M

- Määttä, K., Kamal-Eldin, A., & Törrönen, R. (2001). Phenolic compounds in berries of black, red, green, and white currants (*Ribes* sp.). *Antioxidants and Redox Signaling*, 3(6), 981-993.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*, 79(5), 727-747.
- Manzocco, L., Rumignani, A., y Lagazio, C. (2013). Emotional response to fruit salads with different visual quality. *Food Quality and Preference*, 28(1), 17-22.
- Martinelli, L., Gabas, A. L., & Telis-Romero, J. (2007). Thermodynamic and quality properties of lemon juice powder as affected by maltodextrin and arabic gum. *Drying Technology*, 25(12), 2035-2045.
- Mathlouthi, M. (2001). Water content, water activity, water structure and the stability of foodstuffs. *Food control*, 12(7), 409-417.
- Mattes, R. D. (1994). Influences on acceptance of bitter foods and beverages. *Physiology y Behavior*, 56(6), 1229-1236.
- Mazza, G., & Miniati, E. (1993). *Anthocyanins in fruits, vegetables, and grains*. CRC press.

Referencias

- McMinn, W. A. M., Al-Muhtaseb, A. H., & Magee, T. R. A. (2005). Enthalpy–entropy compensation in sorption phenomena of starch materials. *Food Research International*, 38(5), 505-510.
- Meilgaard, M. C., Carr, B. T., & Civille, G. V. (2006). Sensory evaluation techniques. CRC press.
- Meyners, M., & Pineau, N. (2010). Statistical inference for temporal dominance of sensations data using randomization tests. *Food quality and Preference*, 21(7), 805-814.
- Miao, S., & Roos, Y. H. (2004). Nonenzymatic browning kinetics of a carbohydrate-based low-moisture food system at temperatures applicable to spray drying. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(16), 5250-5257.
- Ministerio de Agroindustria, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos (SAGPyA). (2007). (http://www.minagri.gob.ar/SAGPyA/economias_regionales/frutas/cadenas/Frutas_finas_berrie_11_07.htm)
- Minolta, K. (2007). Precise color communication: color control from perception to instrumentation. *Japan: Konica Minolta Sensing Inc.*
- Mosquera, L. H., Moraga, G., & Martínez-Navarrete, N. (2010). Effect of maltodextrin on the stability of freeze-dried borojón (Borojoa patinoi Cuatrec.) powder. *Journal of Food Engineering*, 97(1), 72-78.
- Mosquera, L. H., Moraga, G., & Martínez-Navarrete, N. (2012). Critical water activity and critical water content of freeze-dried strawberry powder

- as affected by maltodextrin and arabic gum. *Food Research International*, 47(2), 201-206.
- Moskowitz, H. R. (2004). Just about right (JAR) directionality and the wandering sensory unit. In *Data analysis workshop: getting the most out of just-about-right data, Food Quality and Preference* (Vol. 15, pp. 891-899).
 - Moraga, G., Igual, M., García-Martínez, E., Mosquera, L. H., & Martínez-Navarrete, N. (2012). Effect of relative humidity and storage time on the bioactive compounds and functional properties of grapefruit powder. *Journal of Food Engineering*, 112(3), 191-199.
 - Muñoz, A. M., y Civille, G. V. (1992). The spectrum descriptive analysis method. *Manual on descriptive analysis testing for sensory evaluation*, 22-34.
 - Muñoz A.M. y Civille, G. V. (1998). Universal, product and attribute specific scaling and the development of common lexicons in descriptive analysis. *Journal of Sensory Studies*, 13(1), 57-75.
 - Murrieta-Pazos, I., Gaiani, C., Galet, L., Calvet, R., Cuq, B., & Scher, J. (2012). Food powders: surface and form characterization revisited. *Journal of food engineering*, 112(1), 1-21.

N

- Neto, C. C. (2007). Cranberry and blueberry: evidence for protective effects against cancer and vascular diseases. *Molecular nutrition & food research*, 51(6), 652-664.

- Ng, M., Lawlor, J. B., Chandra, S., Chaya, C., Hewson, L., & Hort, J. (2012). Using quantitative descriptive analysis and temporal dominance of sensations analysis as complementary methods for profiling commercial blackcurrant squashes. *Food Quality and Preference*, 25(2), 121-134.
- Nováková, L., Solich, P., & Solichová, D. (2008). HPLC methods for simultaneous determination of ascorbic and dehydroascorbic acids. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 27(10), 942-958.

P

- Pahlevanzadeh, H., & Yazdani, M. (2005). Moisture adsorption isotherms and isosteric energy for almond. *Journal of Food Process Engineering*, 28(4), 331-345.
- Peleg, M., (1977). Flowability of food powders and methods for its evaluation – A review. *Journal of Food Process and Engineering*, 1, 303-328.
- Pérez-Alonso, C., Beristain, C. I., Lobato-Calleros, C., Rodríguez-Huezo, M. E., & Vernon-Carter, E. J. (2006). Thermodynamic analysis of the sorption isotherms of pure and blended carbohydrate polymers. *Journal of Food Engineering*, 77(4), 753-760.
- Pérez-Vicente, A., Gil-Izquierdo, A., & García-Viguera, C. (2002). In vitro gastrointestinal digestion study of pomegranate juice phenolic compounds, anthocyanins, and vitamin C. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(8), 2308-2312.

Referencias

- Pineau, N., Schlich, P., Cordelle, S., Mathonnière, C., Issanchou, S., Imbert, A., & Köster, E. (2009). Temporal Dominance of Sensations: Construction of the TDS curves and comparison with time–intensity. *Food Quality and Preference*, 20(6), 450-455.
- Pinheiro, A. C. M., Nunes, C. A., & Viotoris, V. (2013). SensoMaker: a tool for sensorial characterization of food products. *Ciência e Agrotecnologia*, 37(3), 199-201.

R

- Rahman, M. S. (2006). State diagram of foods: Its potential use in food processing and product stability. *Trends in Food Science & Technology*, 17(3), 129-141.
- Rahman, M. S., & Sablani, S. S. (2009). Water activity measurement methods of foods. *Food properties handbook*, 9-32.
- Ramos, S. (2008). Cancer chemoprevention and chemotherapy: dietary polyphenols and signalling pathways. *Molecular nutrition & food research*, 52(5), 507-526.
- Rocha-Parra, D. F., Lanari, M. C., Zamora, M. C., & Chirife, J. (2016). Influence of storage conditions on phenolic compounds stability, antioxidant capacity and colour of freeze-dried encapsulated red wine. *LWT-Food Science and Technology*, 70, 162-170.
- Roos, Y. H. (1992). Water activity and physical state effects on amorphous food stability. *Journal of Food Processing and Preservation*, 16(6), 433-447.

Referencias

- Roos, Y. H. (1995). *Phase Transitions in Foods (Food science and technology international series)*. Academic Press.
- Roos, Y. H. (2010). Glass transition temperature and its relevance in food processing. *Annual Review of Food Science and Technology*, 1, 469-496.
- Rosenberg, M., Kopelman, I. J., & Talmon, Y. (1985). A scanning electron microscopy study of microencapsulation. *Journal of Food Science*, 50(1), 139-144.

S

- Sabbe, S., Verbeke, W., Deliza, R., Matta, V., & Van Damme, P. (2009). Effect of a health claim and personal characteristics on consumer acceptance of fruit juices with different concentrations of açai (*Euterpe oleracea* Mart.). *Appetite*, 53(1), 84-92.
- Sablani, S. S., Al-Belushi, K., Al-Marhubi, I., & Al-Belushi, R. (2007). Evaluating stability of vitamin C in fortified formula using water activity and glass transition. *International Journal of Food Properties*, 10(1), 61-71.
- Sáenz, C., Tapia, S., Chávez, J., & Robert, P. (2009). Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*). *Food Chemistry*, 114(2), 616-622.
- Sánchez, V., Baeza, R., Galmarini, M. V., Zamora, M. C., & Chirife, J. (2013). Freeze-drying encapsulation of red wine polyphenols in an amorphous matrix of maltodextrin. *Food and Bioprocess Technology*, 6(5), 1350-1354.

Referencias

- Sancho, J.; Bota, E. & De Castro, J.J. (1999). Conceptos generales del análisis sensorial. *Introducción al análisis sensorial de los alimentos*. (pp. 23-30). Barcelona: Edicions de la Universitat de Barcelona.
- Schlesier, K., Harwat, M., Böhm, V., & Bitsch, R. (2002). Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free radical research*, 36(2), 177-187.
- Schlich, P., Schwartz, C., & Monnery-Patris, S. (2012). Des préférences alimentaires aux actes de consommation. Pourquoi mangeton ce que l'on mange?. *Grain de Sucre*, (27), 6-9.
- Schebor, C., del Pilar Buera, M., Karel, M., & Chirife, J. (1999). Color formation due to non-enzymatic browning in amorphous, glassy, anhydrous, model systems. *Food Chemistry*, 65(4), 427-432.
- Siracusa, L., Kulisic-Bilusic, T., Politeo, O., Krause, I., Dejanovic, B., & Ruberto, G. (2011). Phenolic composition and antioxidant activity of aqueous infusions from *Capparis spinosa* L. and *Crithmum maritimum* L. before and after submission to a two-step in vitro digestion model. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(23), 12453-12459.
- Spínola, V., Mendes, B., Câmara, J. S., & Castilho, P. C. (2012). An improved and fast UHPLC-PDA methodology for determination of L-ascorbic and dehydroascorbic acids in fruits and vegetables. Evaluation of degradation rate during storage. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 403(4), 1049-1058.
- Slimestad, R., & Solheim, H. (2002). Anthocyanins from black currants (*Ribes nigrum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(11), 3228-3231.

Referencias

- Soobrattee, M. A., Bahorun, T., & Aruoma, O. I. (2006). Chemopreventive actions of polyphenolic compounds in cancer. *Biofactors*, 27(1-4), 19-35.
- Stein, L. J., Nagai, H., Nakagawa, M., & Beauchamp, G. K. (2003). Effects of repeated exposure and health-related information on hedonic evaluation and acceptance of a bitter beverage. *Appetite*, 40(2), 119-129.
- Stolzenbach, S., Bredie, W. L., Christensen, R. H., & Byrne, D. V. (2013). Impact of product information and repeated exposure on consumer liking, sensory perception and concept associations of local apple juice. *Food research international*, 52(1), 91-98.
- Stone, H. y Sidel, J.L. (2004). Sensory Evaluations practices- 3rd ed. (Food science and technology, International series). San Diego, California: Elsevier Academic Press.
- Stone, H. (2004). Affective testing. Stone, H. y Sidel, JL (Eds.), Sensory evaluation practices 3rd Edn. New York: Academic Press. Cap, 2, 247-277.
- Stone, H., Bleibaum, R., y Thomas, H. A. (2012). Sensory evaluation practices. Academic press.
- Stone, H., Bleibaum, R. N., y Thomas, H. A. (2012). Introduction to Sensory Evaluation. Stone, R. N. Bleibaum, y H. A. Thomas (Eds.), Sensory Evaluation Practices 4ta Edn. San Diego: Academic Press. Cap 1, 1-21.

- Stone, H. (2015). Alternative methods of sensory testing: advantages and disadvantages. Delarue, J. Ben Lawlor, y M. Rogeaux (Eds.), *Rapid Sensory Profiling Techniques*. Woodhead Publishing. Cap 2, 27–51.
- Syamaladevi, R. M., Sablani, S. S., Tang, J., Powers, J., & Swanson, B. G. (2011). Stability of anthocyanins in frozen and freeze-dried raspberries during long-term storage: in relation to glass transition. *Journal of food science*, 76(6), 414-421.
- Szajdek, A., & Borowska, E. J. (2008). Bioactive compounds and health-promoting properties of berry fruits: a review. *Plant Foods for Human Nutrition*, 63(4), 147-156.

T

- Tagliazucchi, D., Verzelloni, E., Bertolini, D., & Conte, A. (2010). In vitro bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. *Food Chemistry*, 120(2), 599-606.
- Tarko, T., Duda-Chodak, A., Sroka, P., Satora, P., & Michalik, J. (2009). Transformations of phenolic compounds in an in vitro model simulating the human alimentary tract. *Food Technology and Biotechnology*, 31(4), 456.
- Telis-Romero, J., Kohayakawa, M. N., Silveira Jr, V., Pedro, M. A., & Gabas, A. L. (2005). Enthalpy-entropy compensation based on isotherms of mango. *Food Science and Technology (Campinas)*, 25(2), 297-303.
- Thakur, B. R., & Arya, S. S. (1989). Studies on stability of blue grape anthocyanins. *International Journal of Food Science & Technology*, 24(3), 321-326.

Referencias

- Tonon, R. V., Baroni, A. F., Brabet, C., Gibert, O., Pallet, D., & Hubinger, M. D. (2009). Water sorption and glass transition temperature of spray dried açai (*Euterpe oleracea* Mart.) juice. *Journal of Food Engineering*, 94(3), 215-221.
- Tonon, R. V., Brabet, C., & Hubinger, M. D. (2010). Anthocyanin stability and antioxidant activity of spray-dried açai (*Euterpe oleracea* Mart.) juice produced with different carrier agents. *Food Research International*, 43(3), 907-914.
- Troszyńska, A., Narolewska, O., Robredo, S., Estrella, I., Hernández, T., Lamparski, G., & Amarowicz, R. (2010). The effect of polysaccharides on the astringency induced by phenolic compounds. *Food quality and preference*, 21(5), 463-469.
- Tsami, E., Maroulis, Z. B., Marinos-Kouris, D., & Saravacos, G. D. (1990). Heat of sorption of water in dried fruits. *International Journal of Food Science & Technology*, 25(3), 350-359.
- Tuorila, H., & Cardello, A. V. (2002). Consumer responses to an off-flavor in juice in the presence of specific health claims. *Food Quality and Preference*, 13(7), 561-569.

V

- Valerga, J., Reta, M., & Lanari, M. C. (2012). Polyphenol input to the antioxidant activity of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extracts. *LWT-Food Science and Technology*, 45(1), 28-35.
- Varela, P., & Ares, G. (Eds.). (2014). *Novel techniques in sensory characterization and consumer profiling*. CRC Press.

Referencias

- Vega-Gálvez, A., López, J., Miranda, M., Di Scala, K., Yagnam, F., & Uribe, E. (2009). Mathematical modelling of moisture sorption isotherms and determination of isosteric heat of blueberry variety O'Neil. *International journal of food science & technology*, 44(10), 2033-2041.
- Verbeke, W. (2006). Functional foods: Consumer willingness to compromise on taste for health?. *Food Quality and Preference*, 17(1), 126-131.
- Vigano, J., Azuara, E., Telis, V. R., Beristain, C. I., Jiménez, M., & Telis-Romero, J. (2012). Role of enthalpy and entropy in moisture sorption behavior of pineapple pulp powder produced by different drying methods. *Thermochimica Acta*, 528, 63-71.

X

- Xiong, R., & Meullenet, J. F. (2006). A PLS dummy variable approach to assess the impact of jar attributes on liking. *Food Quality and Preference*, 17(3), 188-198.

Z

- Zamora, M. C., Buratti, F. M., & Otero-Losada, M. E. (1998). Temporal study of sucrose and fructose relative sweetness. *Journal of sensory studies*, 13(2), 213-228.
- Zorn, S., Alcaire, F., Vidal, L., Giménez, A., & Ares, G. (2014). Application of multiple-sip temporal dominance of sensations to the evaluation of sweeteners. *Food Quality and Preference*, 36, 135-143

ANEXO 1. Evaluación del Grado de Aceptabilidad, atributos de diagnóstico, intención de compra y estatus emocional (B1, B2 y B3)

Nombre: _____ Fecha: _____ Evaluador #: _____

Estamos desarrollando una nueva bebida saludable y queremos saber cuánto le gusta.

MUESTRA #: _____

1. Pruebe la muestra y marque sobre la escala su nivel de agrado



Me disgusta
Mucho

Me gusta
Mucho

2. Evalúe la intensidad de cada atributo considerando el centro de la escala como el punto justo, el óptimo que le gustaría encontrar

Acidez



Poco

Ideal

Demasiado

Dulzor



Poco

Ideal

Demasiado

Astringencia



Poco

Ideal

Demasiado

Aroma



Poco

Ideal

Demasiado

Cuerpo



Poco

Ideal

Demasiado

3. Con cuáles de las siguientes palabras podría definir la sensación que le provocó probar esta bebida; elija tres como mínimo.

- | | | |
|---------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Bienestar | <input type="checkbox"/> Miedo | <input type="checkbox"/> Relax |
| <input type="checkbox"/> Desagrado | <input type="checkbox"/> Frescura | <input type="checkbox"/> Enojo |
| <input type="checkbox"/> Familiaridad | <input type="checkbox"/> Angustia | <input type="checkbox"/> Alegría |
| <input type="checkbox"/> Tristeza | <input type="checkbox"/> Sencillez | <input type="checkbox"/> Sorpresa |

4. Si existiera en el mercado la volvería a comprar?

- Seguramente lo compraría**
- Probablemente lo compraría**
- Tal vez si, tal vez no lo compraría**
- Probablemente no lo compraría**
- Seguramente no lo compraría**

ANEXO 2. Agrupamiento por atributos (Sorting Task; B3, B4, B5, B6, B7)

Nombre: _____ **#Evaluador** ____ **Fecha** _____

Método: agrupamiento; evaluar si las muestras se perciben iguales o distintas

1. Pruebe todas las muestras
2. Agrupe las muestras que se perciben iguales
3. La cantidad de grupos no es fija, puede hacer tantos grupos como crea conveniente
4. Una vez que organizó los grupos descríbalos con al menos tres descriptores que identifiquen las características de las muestras del grupo.
- 5. Puede elegir descriptores de la lista adjunta o describir las muestras con sus propias palabras**

**Grupo 1: Muestras
Descriptores**

**Grupo 5: Muestras
Descriptores**

**Grupo 2: Muestras
Descriptores**

**Grupo 6 Muestras
Descriptores**

**Grupo 3: Muestras
Descriptores**

**Grupo 7: Muestras
Descriptores**

**Grupo 4: Muestras
Descriptores**

**Grupo 8: Muestras
Descriptores**

ANEXO 3. Determinación de la concentración ideal de polvo liofilizado, evaluación de los atributos.

Bebidas a base de Yerba mate y Cassis. Concentración ideal

Nombre: _____ Evaluador # _____ Fecha: _____

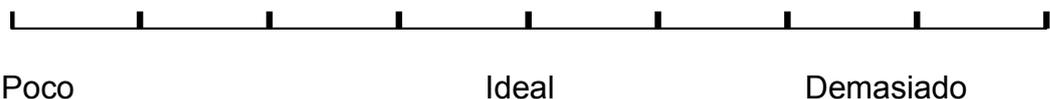
Estamos desarrollando una nueva bebida saludable y queremos saber cuánto le gusta. Ud. Recibirá 3 muestras. Por favor, evalúe las muestras ubicándolas en las siguientes escalas.

Cuál es la concentración ideal?

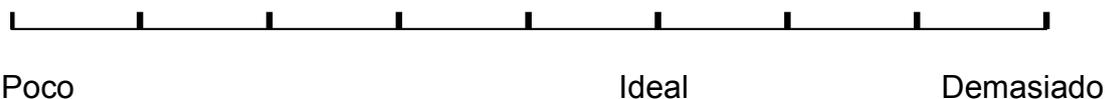


Evalúe la intensidad de cada atributo considerando el centro de la escala como el punto justo, el óptimo que le gustaría encontrar

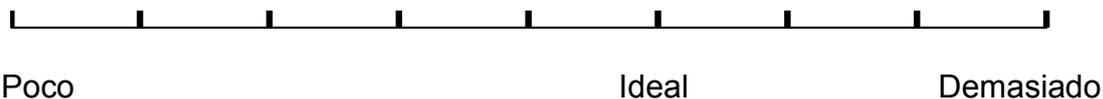
Dulzor



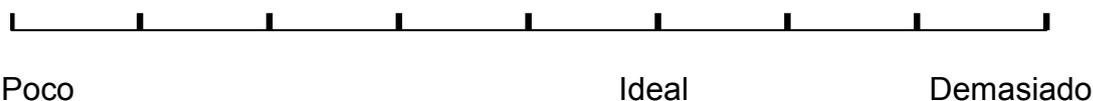
Aroma



Cuerpo (viscosidad)



Color



ANEXO 4. Ajuste de atributos dulzor y aroma

Bebidas a base de Yerba mate y Cassis

Nombre: _____ Evaluador # _____ Fecha: _____

Estamos desarrollando una nueva bebida saludable y queremos encontrar el punto óptimo de algunos atributos. Ud. Recibirá 3 muestras.

Pruebe la muestra y marque sobre la escala su nivel de agrado



Me disgusta

Me gusta Mucho
Mucho

Evalúe la intensidad de cada atributo considerando el centro de la escala como el punto justo, el óptimo que le gustaría encontrar. Ubique las tres muestras en cada escala de acuerdo a sus preferencias.

Dulzor



Poco

Ideal

Demasiado

Aroma



Poco

Ideal

Demasiado

ANEXO 5. Perfil descriptivo semi cuantitativo. Bebida en polvo a base de Yerba mate y Cassis

Nombre: _____ **Evaluador:** _____ **Fecha:** _____

Método tildar todo lo que corresponde:

Pruebe la muestra y tilde todos los atributos que percibe evaluando la intensidad como:

poco, medio, mucho

Atributo	poco	medio	mucho
Color			
Viscosidad			
Brillo			
Uniformidad			
Dulce			
Ácido			
Amargo			
Astringente			
Intensidad de aroma total (retronasal)			
Frutos rojos (retronasal)			
Cítrico (retronasal)			
Dulce (edulcorante) (retronasal)			
Frutal (retronasal)			
Fruto tropical (retronasal)			
Yerba mate (retronasal)			
Frutos rojos (nasal)			
Caramelo (nasal)			
Compota (nasal)			
Especiado (nasal)			
Frutal (nasal)			
Fruto tropical (nasal)			
Hierbas (nasal)			
Yerba mate (nasal)			
Regusto amargo			
Otros			

Anexos

ANEXO 6. Planilla entrenamiento con estándares. Las marcas en las escalas corresponden a los valores expresados en la Tabla (5)

Bebida en polvo a base de Yerba mate y Cassis

Definición de los atributos, forma de medirlos y estándares

Nombre: _____ Evaluador: _____ Fecha: _____

MATCHING ESTÁNDARES

Cuál es más dulce? ____

Ubique en la escala

_____ | _____

APARIENCIA

Color _____

Brillo _____

Uniformidad _____

Viscosidad _____

GUSTOS BÁSICOS Y SENSACIONES BUCALES

Dulce _____ | _____

Ácido _____ | _____

Amargo _____ | _____

Astringente _____ | _____

AROMA (NASAL)

Aroma total _____

Frutos rojos _____

Cassis _____

Yerba mate _____

Anexos

Compota

Frutal

Fruto tropical

SABOR (RETRONASAL)

Frutos rojos

Cassis

Yerba mate

Dulce
edulcorante

Cítrico

Frutal

Fruto Tropical

REGUSTO

Amargo

Astringente

ANEXO 7. Planilla entrenamiento con valores promedio. Las marcas en las escalas corresponden a los valores promedio

Bebida en polvo a base de Yerba mate y Cassis

Definición de los atributos, forma de medirlos y estándares

Nombre: _____ Evaluador: _____ Fecha: _____

APARIENCIA

Color _____

Brillo _____

Uniformidad _____

Viscosidad _____

GUSTOS BÁSICOS Y SENSACIONES BUCALES

Dulce _____

Ácido _____

Amargo _____

Astringente _____

AROMA (NASAL)

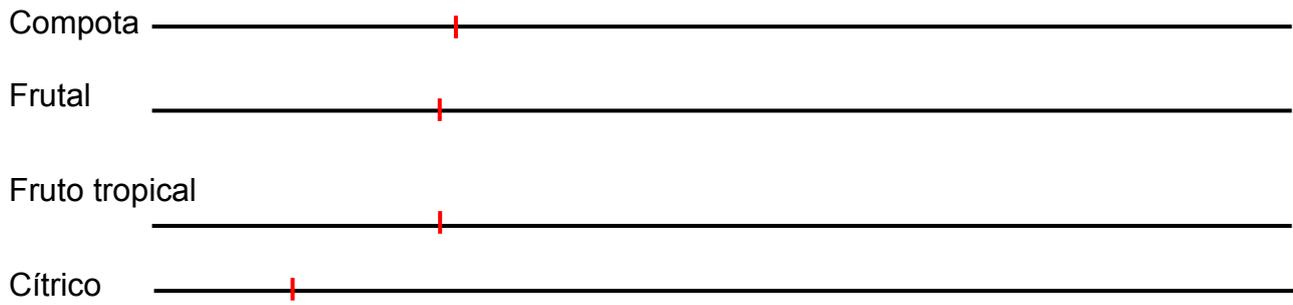
Aroma total _____

Frutos rojos _____

Cassis _____

Yerba mate _____

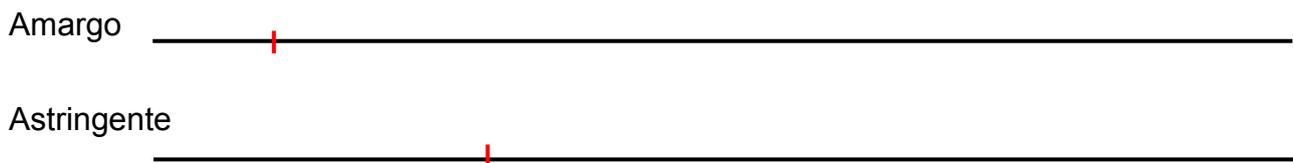
Anexos



SABOR (RETRONASAL)



REGUSTO



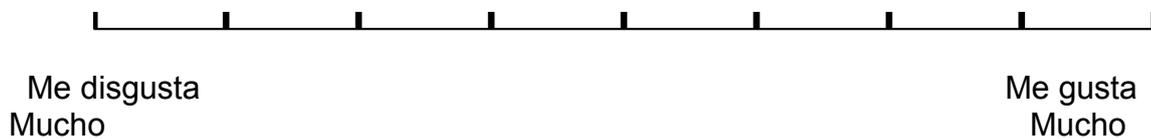
ANEXO 8. Aceptabilidad global de bebida en polvo y galleta TODDY

Bebidas a base de Yerba mate y Cassis

Nombre: _____ **Evaluador #** _____ **Fecha:**

Cuánto le gusta la bebida?

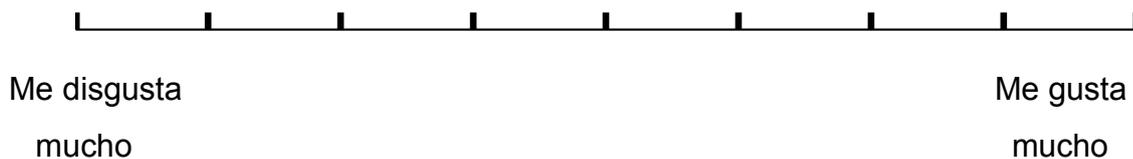
Pruebe la muestra y marque sobre la escala su nivel de agrado



Nombre: _____ **Evaluador #** _____ **Fecha:**

Cuánto le gusta la galleta?

Pruebe la muestra y marque sobre la escala su nivel de agrado



Anexos

Anexo 9. *Formulación de la bebida en polvo a base de yerba mate y cassis.*

Relación de compuestos sólidos en porcentaje p/p para las formulaciones B3(b), B7 y B12.

(%) p/p	Mezcla liof YMI/Cs/MD*	Azúcar	Edulcorante	Aroma	Total
B3(b)	77.4	22.4	0.2	0	100
B7	77.4	22.4	0.2	0	100
B12	53.3	44.9	0.9	0.9	100