

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA



TRABAJO FIN DE MÁSTER

Estudio de la estabilidad de bebidas vegetales con
probióticos durante su vida útil

Paola Martínez Merina

Máster en Herramientas Químicas para la Empresa
Agroalimentaria y Medio Ambiental

Córdoba, a 12 de julio de 2023

ÍNDICE

1. Informe del tutor del Trabajo Fin de Máster	3
2. Resumen/Abstract.....	4
3. Introducción.....	6
4. Objetivos.....	11
5. Material y métodos.....	12
5.1. Material.....	12
5.2. Métodos.....	12
5.2.1. Estudio de la estabilidad del hierro en la nueva bebida.....	12
5.2.2. Fluorescencia de Rayos X.....	13
5.2.3. Estudio del contenido de polifenoles totales: Índice de Folin-Ciocalteu.....	13
5.2.4. Estudio de la actividad antioxidante.....	14
5.2.5. Análisis del espectro.....	15
5.2.6. Análisis sensorial.....	15
6. Resultados y discusión.....	18
6.1. Determinación del contenido total de hierro y estudio de su solubilidad en las muestras.....	18
6.2. Estudio del contenido de polifenoles totales.....	19
6.3. Estudio de la actividad antioxidante.....	21
6.4. Estudio del color.....	22
6.5. Análisis sensorial.....	24
6.5.1. Identificación vegetal.....	24
6.5.2. Evaluación organoléptica.....	27
6.5.3. Prueba triangular.....	27
7. Conclusiones.....	29
8. Bibliografía.....	30

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Bebidas vegetales con probióticos.....	8
Figura 2: Ejemplos de estructuras de compuestos fenólicos.....	9
Figura 3: Espectrómetro UV-visible usado durante el trabajo.....	12
Figura 4: Estructura del DPPH antes y después de la reacción con el antioxidante.....	14
Figura 5: Hoja de cata empleada en el primer análisis sensorial.....	16
Figura 6: Hoja de cata empleada en el segundo análisis sensorial (prueba triangular).....	17
Figura 7. Prueba triangular de la muestra: a) 158 y b) 497.....	17
Figura 8. Microcarry empleado para la determinación del hierro por Fluorescencia de Rayos X.....	19
Figura 9. Contenido en polifenoles totales durante la vida útil para Be Well: a) Energy, b) Inmunity, c) Skin, d) Antiox y e) Nuevo.....	20
Figura 10. Capacidad antioxidante durante la vida útil para Be Well: a) Energy, b) Inmunity, c) Skin, d) Antiox y e) Nuevo.....	22
Figura 11. Espectro obtenido para el Be Well: a) Energy, b) Inmunity, c) Skin, d) Antiox y e) Nuevo.....	23
Figura 12. Cambio de color producido en el Be Well durante su vida útil: a) Skin y b) Antiox.....	24
Figura 13. Representación de la identificación vegetal por sabor de la muestra de Be Well: a) 158 Energy, b) 249 Inmunity, c) 322 Skin, d) 497 Antiox y e) 584 Nuevo.....	25
Figura 14. Representación de la identificación vegetal por aroma de la muestra de Be Well: a) 158 Energy, b) 249 Inmunity, c) 322 Skin, d) 497 Antiox y e) 584 Nuevo.....	26

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Resultados obtenidos en la evaluación organoléptica.....	27
---	----

1. INFORME DEL TUTOR DEL TRABAJO FIN DE MÁSTER

Este documento será subido a la plataforma Moodle habilitado para ello.

El Tutor del TFM emitirá un informe que irá destinado al tribunal. El informe no tendrá carácter vinculante y será optativo.

Título:	Estudio de la estabilidad de bebidas vegetales con probióticos durante su vida útil	
Tutor	M. Azahara López Toledano	DNI: 30537776D
Director 2:	M ^a Ángeles Varo Santos	DNI: 30997883R
Estudiante:	Paola Martínez Merina	DNI: 49505868R

Valoración del proceso seguido por el estudiante. El tutor podrá valorar aquello que considere importante en el desarrollo del TFM (seguimiento del plan de trabajo previsto, iniciativa durante el desarrollo del trabajo, presentación formal del documento, conclusiones sustentadas por el trabajo, desarrollo de las competencias, etc.)

Las directoras de la alumna Paola Martínez Merina informan que el presente Trabajo de Fin de Máster se ha realizado utilizando la metodología adecuada y haciendo uso de las técnicas idóneas para culminar los objetivos previstos. Además, la alumna ha llevado a cabo las tareas encomendadas con una destacable dedicación e interés por el desarrollo de estas. Desde su incorporación, ha demostrado estar muy implicada en plan de trabajo, desarrollando las competencias necesarias para culminarlo, y tomando decisiones e incluso adaptándose a las complicaciones generadas de él. En definitiva, la alumna ha superado con creces los niveles de calidad científica exigibles para un Trabajo de Fin de Máster.

2. RESUMEN

En colaboración con la empresa Culinary Concepts Group se ha realizado un estudio sobre la estabilidad de bebidas vegetales con probióticos a lo largo de su vida útil, que tiene un plazo de 45 días. Se desea añadir a dicha bebida hierro formulado con vitamina C en un producto en forma de polvo soluble y estudiar su estabilidad y solubilidad con el tiempo y la temperatura. Para ello, se decidió utilizar una técnica basada en la espectroscopía UV-visible, utilizando el método colorimétrico del tiocianato, con la idea de que la empresa pudiera incorporarlo a su línea de control de calidad del producto. Para corroborar los resultados obtenidos con la primera técnica, se empleó Fluorescencia de Rayos X. Durante la realización de los ensayos, se obtuvieron resultados incoherentes que implicaba que la formulación del compuesto suministrado por un laboratorio externo a la empresa colaboradora para la adición de hierro a la bebida era incorrecta, motivo por el cual el objetivo del Trabajo Fin de Máster se tuvo que reenfocar en otros análisis.

Por ello, se plantea estudiar la estabilidad de bebidas vegetales con probióticos durante su tiempo de vida útil. Así se analiza la actividad antioxidante, el contenido total de polifenoles totales y el color de las muestras. Los resultados muestran que la actividad antioxidante de estas bebidas aumenta con el tiempo debido a la actuación de los probióticos que se añaden. También existe una modificación analítica del color de las bebidas.

Asimismo, se realizaron dos catas para el análisis sensorial de las muestras. En la primera, se deseaba conocer si los catadores eran capaces de identificar las frutas y vegetales utilizados para cada bebida. En la segunda cata, realizada al final de la vida útil de los productos, mediante una prueba triangular se demuestra que los cambios analíticos de las bebidas son apreciados por el consumidor, por lo que el tiempo de vida útil no solo hace referencia a los probióticos, sino también a la calidad sensorial.

Palabras clave: hierro, actividad antioxidante, polifenoles, color, análisis sensorial.

ABSTRACT

In collaboration with the company Culinary Concepts Group, a study has been carried out on the stability of vegetable drinks with probiotics throughout their shelf life, which has a term of 45 days. The aim was to add iron formulated with vitamin C in a soluble powder form to the drink in order to study its stability and solubility with time and temperature. For this purpose, it was decided to use a technique based on UV-visible spectroscopy, using the thiocyanate colorimetric method, with the idea that the company could incorporate it into its product quality control line. To verify the results obtained with the first technique, X-Ray Fluorescence was used. During the tests, inconsistent results were obtained, which implied that the formulation of the compound supplied by an external laboratory to the collaborating company for the addition of iron to the beverage was incorrect, which is why the objective of the Master's thesis had to be refocused on other analyses.

Therefore, the stability of vegetable drinks with probiotics during their shelf life was studied. The antioxidant activity, total polyphenol content and colour of the samples were analysed. The results reveal that the antioxidant activity of these beverages increases over time due to the action of the probiotics added. There is also an analytical change in the colour of the beverages.

Two tastings were also carried out for the sensory analysis of the samples. In the first one, the objective was to find out whether the tasters were able to identify the fruits and vegetables used for each drink. In the second tasting, held at the end of the shelf life of the products, a triangular test shows that the analytical changes of the beverages are appreciated by the consumer, so that the shelf life not only refers to the probiotics, but also to the sensory quality.

Keywords: iron, antioxidant activity, polyphenols, colour, sensory analysis.

3. INTRODUCCIÓN

Culinary Concepts Group S.L., conocida como La Salmoreteca, es una empresa dedicada a la gastronomía innovadora, presente en Córdoba y en Sevilla. Esta empresa enfoca su actividad productiva en dos proyectos. En 2019, abren el restaurante de “La Casa de Manolete Bistró”, ofreciendo a los clientes menús de degustación de alta cocina, de la mano del chef Juan José Álvarez Ruiz. Por otra parte, trabajan en el Polígono de las Quemadas, en cuya nave elaboran todos los productos que comercializan. Éstos pueden adquirirse de forma online mediante su página web, en supermercados, tiendas y en el Mercado Victoria de Córdoba. También realizan colaboraciones con otras empresas, como es el caso de AgroSevilla, para la elaboración de nuevos productos que sacar al mercado.

A partir del diagnóstico de esclerosis múltiple de la dueña de la empresa, se empezó a investigar acerca de una alimentación funcional que tuviera beneficios para el organismo. Con la colaboración de la Universidad de Córdoba, del CSIC (Consejo Superior de Investigaciones Científicas) y del IMIBIC (Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba), comenzaron a elaborar recetas de bebidas funcionales que contienen vitaminas, minerales y probióticos. Así es como nacen los Be Well: son bebidas no lácteas elaboradas con agua e ingredientes vegetales y con probióticos, que no contienen proteína animal¹.

Los probióticos son microorganismos vivos (bacterias o levaduras) que, tras ser ingeridos, permanecen activos en el intestino en cantidad suficiente como para producir un efecto beneficioso en las personas, además de competir con los microorganismos patógenos que dañan la salud. En el caso de los Be Well, el probiótico empleado es *Lactobacillus Pentosus LPG1*, de origen vegetal.

La microbiota, también conocida como flora intestinal, microflora o flora humana, es el conjunto de microorganismos vivos o bacterias que se encuentran en el intestino o tubo digestivo del organismo humano. La existencia de estas bacterias intestinales es muy beneficiosa para el desarrollo del sistema inmune, así como para la conducta humana y el estado de ánimo. Se adquiere desde el nacimiento y se mantiene estable hasta los 3 años. A partir de ese momento, se pueden producir modificaciones en la flora intestinal a causa de los diferentes cambios dietéticos mantenidos en el tiempo. Sin embargo, aunque la microbiota es relativamente estable, puede variar de un individuo a otro, o incluso en un mismo individuo. Esto se debe a distintos factores que pueden producir cambios transitorios, como el tipo de dieta, las infecciones, la ingesta de antibióticos o el estrés.

La microbiota está fuertemente relacionada con el desarrollo de diferentes enfermedades intestinales e inflamatorias, el estreñimiento o la celiaquía. Sin embargo, también se relaciona con otro tipo de patologías como la obesidad, el asma o diferentes enfermedades cardiovasculares. De hecho, existen múltiples enfermedades que tienen su origen en la existencia de un trastorno de la microbiota, a causa de una alteración en el tipo de alimentación o a causa de otros factores como la edad, el consumo de antibióticos, infecciones u otras patologías. Las principales enfermedades intestinales relacionadas directamente con la microbiota son las siguientes:

- La enfermedad celíaca, que es un trastorno que se produce a causa de una reacción a la ingesta de gluten.

- Enfermedades inflamatorias intestinales, como la enfermedad de Crohn o la colitis ulcerosa, que se producen a causa de la inestabilidad en la microbiota.
- Diarrea aguda, que puede ir acompañada de vómitos, fiebre, náuseas y deshidratación.
- La infección por *Helicobacter Pylori*, que es una enfermedad que, aunque suele ser asintomática, puede producir gastritis, cáncer de estómago y úlcera gástrica.
- La enterocolitis necrosante, patología común en recién nacidos que puede tener lugar a causa de la lactancia artificial o de la prematuridad.

Por todo ello, la empresa decide añadir el probiótico antes mencionado a sus bebidas vegetales. *Lactobacillus Pentosus LPG1* procede de la epidermis de las olivas después de su fermentación para la obtención de aceitunas de mesa. Está protegido y patentado por sus características probióticas y tecnológicas. Fue seleccionado de un total de 554 cepas aisladas tras 8 años de estudio por el CSIC. Las cepas están incluidas en la QPS (Qualified Presumption of Safety) de la EFSA (European Food Safety Authority) desde junio de 2020. Pueden consumirlo personas con intolerancia a la lactosa, puesto que no se emplea leche ni sus derivados como sustrato, así como veganos y vegetarianos, al no contener nada de origen animal.

Gracias a numerosos estudios científicos llevados a cabo in vitro, con *c. elegans*, en murinos, incluso con humanos en colaboración con el IMIBIC, se puede decir que *Lactobacillus Pentosus LPG1* presenta las siguientes ventajas:

- Reduce los niveles de colesterol hasta un 25 %.
- Retrasa la entrada en senescencia (envejecimiento).
- Presenta una alta actividad antiinflamatoria y antioxidante, además de actividad inmunomoduladora.
- Reduce la permeabilidad y mejora la integridad de la barrera intestinal.
- La administración de *LPG1* aumenta el número de secuencias y personas con *Lactobacillus* en heces, preserva la biodiversidad y modula favorablemente la microbiota intestinal.

En la actualidad, la empresa comercializa 4 bebidas vegetales, cuya composición se cita a continuación:

- Energy: formado por piña, coco y fruta de la pasión.
- Inmunity: con naranja, mango y zanahoria.
- Skin: con manzana, pepino, jengibre y espinaca.
- Antiox: compuesto por manzana, frutos rojos y remolacha.



Figura 1. Bebidas vegetales con probióticos.

Las 4 bebidas vegetales que la empresa comercializa, junto con la que se pretende formular enriquecida con hierro, se muestran en la figura 1.

El hierro es un mineral necesario para el crecimiento y desarrollo del cuerpo ya que lo utiliza para fabricar la hemoglobina, una proteína de los glóbulos rojos que transporta el oxígeno de los pulmones a distintas partes del cuerpo, además de la mioglobina, una proteína que suministra oxígeno a los músculos². El cuerpo también necesita hierro para fabricar las hormonas y el tejido conectivo. Los científicos estudian cómo este elemento afecta a la salud. La función más importante de consumir alimentos enriquecidos con hierro es la prevención de la anemia ferropénica y los problemas que ésta causa³. Según el Diario Oficial de la Unión Europea, la dosis media diaria recomendada de hierro son 14 mg. Por regla general, para que la bebida se considere enriquecida con hierro, debe contener como mínimo el 15 % de la cantidad recomendada, suministrada por 100 g, 100 mL o por envase, si éste contiene una única porción⁴.

En último lugar, también cabe destacar la importancia de la actividad antioxidante y del contenido de polifenoles totales que tienen estas bebidas. Los alimentos, además de sus funciones plásticas y energéticas, tienen la facultad de proteger estructuras ante la formación de radicales libres. Este proceso, que constituye la oxidación celular que deriva de la aparición de estos radicales, va ligado tanto al envejecimiento fisiológico en general como a una serie de enfermedades (cardiovasculares, degenerativas, Alzheimer, Parkinson, así como distintos tipos de cáncer). Los antioxidantes presentes en los alimentos pueden ayudar a prevenir algunos de estos procesos, pero también a paliar o enlentecer algunas de estas enfermedades. Frenan las reacciones de oxidación en las células a partir de las cuales se originan los nocivos radicales libres. Por tanto, su papel es clave en la reducción de enfermedades cardiovasculares, de tumores y de enfermedades neurodegenerativas, además de potenciar el sistema inmunológico⁵.

Algunos de los antioxidantes más comunes presentes en nuestra dieta son: vitamina E, C, A, betacaroteno y otros carotenoides, como licopeno, luteína o zeaxantina, minerales como el cinc, cobre, manganeso, selenio o hierro, coenzima Q (ubiquinona), ácido lipoico y compuestos fenólicos, flavonoides especialmente⁶.

El término “compuestos fenólicos” engloba a todas aquellas sustancias que poseen varias funciones fenol, nombre popular del hidroxibenceno, unidas a estructuras aromáticas o alifáticas. Únicamente, algunos compuestos fenólicos de la familia de los ácidos fenoles no son polifenoles, sino monofenoles.

Los compuestos fenólicos tienen su origen en el mundo vegetal. Son unos de los principales metabolitos secundarios de las plantas y su presencia en el reino animal se debe a la ingestión de éstas. Los fenoles son sintetizados por las plantas y regulados genéticamente, tanto a nivel cualitativo como cuantitativo, aunque a este nivel también existen factores ambientales. Además, actúan como fitoalexinas (las plantas heridas secretan fenoles para defenderse de posibles ataques fúngicos o bacterianos) y contribuyen a la pigmentación de muchas partes de la planta (p. ej. los antocianos son los responsables del color rojo, naranja, azul, púrpura o violeta que encontramos en las pieles de las frutas y hortalizas). Por otro lado, cuando los fenoles son oxidados, dan lugar a las quinonas que dan un color pardo que muchas veces es indeseable.

Los fenoles se encuentran casi en todos los alimentos de origen vegetal. Son alimentos ricos en fenoles la cebolla, el té, el vino tinto, el cacao, el aceite de oliva virgen, etc. Estas sustancias influyen en la calidad, aceptabilidad y estabilidad de los alimentos, ya que actúan como colorantes, antioxidantes y proporcionan sabor.

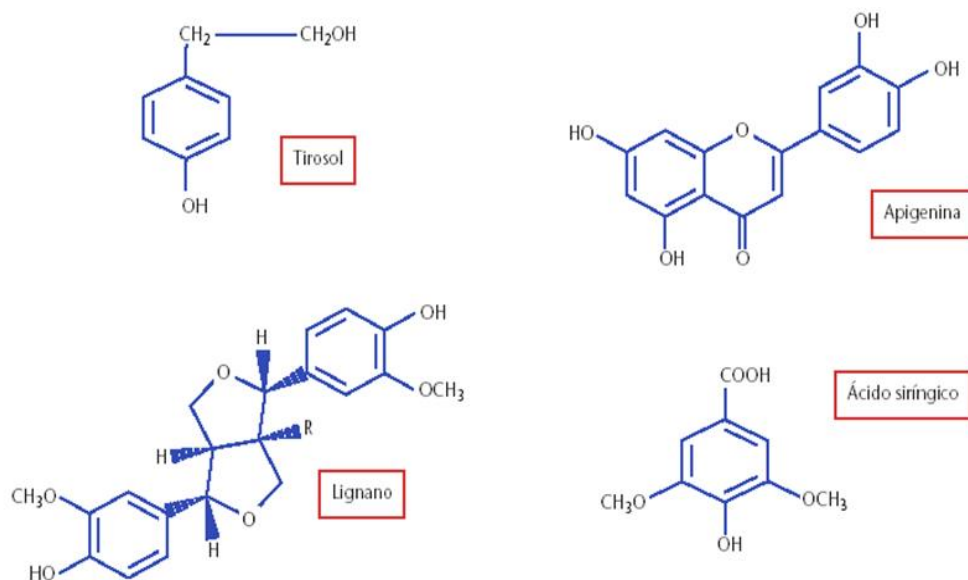


Figura 2. Ejemplos de estructuras de compuestos fenólicos.

Los polifenoles se pueden clasificar de muchas maneras debido a su diversidad estructural. Algunos de ellos se observan en la figura 2. Según su estructura química existen dos grandes grupos:

- No flavonoides. Entre ellos hay dos subgrupos: fenoles no carboxílicos y ácidos fenoles (derivados del ácido benzoico y derivados del ácido cinámico).
- Flavonoides. Formados por 2 grupos bencénicos unidos por un puente tricarbonado. Los subgrupos son: antocianos; flaonas, flavononas, flavanoles y flavanonoles; taninos condensados y lignanos.

Lo más destacable de los compuestos fenólicos son sus propiedades antioxidantes. Por un lado, son muy susceptibles a ser oxidados y por otro, impiden que los metales catalicen las reacciones de oxidación. Así, los grupos hidroxilo, al estar unidos a un anillo bencénico, presentan la posibilidad de que el doblete del átomo de oxígeno interactúe con los electrones del anillo, lo que le confiere unas características especiales respecto al resto de alcoholes. Por otro lado, pueden actuar de quelantes (sobre todo los fenoles no flavonoides) y formar complejos con metales di o trivalentes, especialmente con el hierro y el aluminio, lo que puede tener también implicaciones nutricionales.

En cuanto a las propiedades organolépticas atribuidas a los compuestos fenólicos, se puede decir:

- Color: como las antocianidinas, responsables de los tonos rojos, azules y violáceos de muchas frutas, hortalizas y derivados, como fresas, ciruelas, uvas, col lombarda, vino tinto, etc.
- Sabor amargo: como las flavanonas de los cítricos o la oleuropeína en las aceitunas.
- Astringencia: como las proantocianidinas (taninos condensados) y los taninos hidrolizables, por ejemplo, en el vino. Estos compuestos son capaces de unirse a las proteínas lubricantes de la saliva por puentes de hidrógeno⁷.

Las propiedades sensoriales son uno de los parámetros de calidad fundamentales en los alimentos. Para las bebidas vegetales, el color es el primer atributo sensorial que percibe el consumidor, por lo que inicialmente es el mejor factor que define la calidad de los zumos. Por lo tanto, es de vital importancia el conocimiento de los componentes y procesos que influyen en el color de un alimento, y en las bebidas el proceso fundamental por el que se modifica su color es el pardeamiento, que puede ser de dos tipos: enzimático y no enzimático.

El pardeamiento enzimático se origina en una serie de reacciones químicas que afectan al sabor, al color y al valor nutricional de los alimentos. En estas reacciones químicas participan varios tipos de enzimas, como la polifenol oxidasa o la catecol oxidasa y se necesita la presencia de oxígeno. Se inicia con la oxidación de los fenoles catalizada por la enzima polifenol oxidasa para dar lugar a la formación de quinonas, en presencia de oxígeno. Las quinonas se caracterizan por su carácter electrófilo que le proporciona una elevada susceptibilidad para recibir un ataque nucleófilo. La polimerización de las quinonas da lugar a la formación de pigmentos de color marrón que son los causantes del característico color pardo que adquieren los alimentos al pardearse.

Por otro lado, el pardeamiento no enzimático se produce debido a un conjunto de reacciones químicas complejas que dan lugar a la aparición de melanoidinas y de otros pigmentos pardos o negros que oscurecen el color de los alimentos además de producir modificaciones, favorables o no, en su sabor y olor. El pardeamiento no enzimático puede organizarse en tres procesos químicos basados en: reacciones de caramelización, reacciones debidas a la oxidación del ácido ascórbico y las reacciones de Maillard, siendo las dos últimas las que también pueden generar fenómenos de pardeamiento en bebidas vegetales⁸.

4. OBJETIVOS

El objetivo principal de este Trabajo Fin de Máster era estudiar la estabilidad del hierro en una nueva bebida vegetal con probióticos durante toda su vida útil. Este objetivo principal se desarrollaba en los siguientes objetivos secundarios:

- Estudiar la cantidad máxima de adición del compuesto de hierro y vitamina C añadido a la bebida en función de su solubilidad.
- Estudiar el comportamiento de dicho compuesto en función del tiempo y la temperatura.

Sin embargo, a consecuencia de unos motivos que se explicarán posteriormente, el objetivo inicial del Trabajo Fin de Máster tuvo que cambiar, puesto que la empresa decidió no añadir hierro a la nueva bebida vegetal que se quería comercializar.

Por tanto, el nuevo objetivo principal del Trabajo Fin de Máster es estudiar la estabilidad de las bebidas Be Well comerciales y de la nueva formulación a lo largo de su vida útil. Este objetivo principal se desarrolla en los siguientes objetivos secundarios:

- Conocer la variación de los contenidos de polifenoles totales y de la actividad antioxidante de las bebidas.
- Analizar la variación del espectro UV-vis de las bebidas durante su tiempo útil.
- Evaluar si existen diferencias en aroma, sabor y color entre bebidas recién elaboradas y otras al final de su vida útil.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Material

Bebidas vegetales:

Para el estudio se han utilizado las bebidas vegetales de la línea Be Well proporcionados por la empresa Culinary Concepts Group S.L., los cuatro productos ya comerciales (Energy, Inmunity, Skin y Antiox) y un quinto que se quiere empezar a comercializar (Nuevo). Las bebidas fueron mantenidas en refrigeración a 4 °C.

SERPROMIX-Fe-C:

Para la incorporación del hierro en la nueva bebida se empleó un producto formulado por un laboratorio para la empresa. Este producto tenía la composición siguiente, según la ficha técnica del proveedor:

- Vitamina C: 12 mg (15 % VRN, valores de referencia de nutrientes), cuya fuente es el ácido ascórbico.
- Hierro: 1.19 mg (8.5 % VRN), cuya fuente es el pirofosfato férrico, el empleado en productos alimenticios.
- Dosificación: 22 mg en 100 mL de producto final contiene las cantidades indicadas.

5.2. Métodos

5.2.1. Estudio de la estabilidad del hierro en la nueva bebida

La toma de muestras se hizo a las 24 y 48 h, así como a los 22 y 45 días. Los análisis se realizaron por triplicado.

Para el estudio de la estabilidad del hierro en la nueva bebida vegetal con probióticos que la empresa desea comercializar durante toda su vida útil (45 días), se buscó en bibliografía un método fácil, accesible y reproducible para la empresa, por si quería incorporarlo para el control de calidad.



Figura 3. Espectrómetro UV-visible usado durante el trabajo.

Se empleó el **método colorimétrico del tiocianato**⁹, el cual se basa en la oxidación por peróxido de hidrógeno del hierro (II) a hierro (III) y combinación de éste con el tiocianato en medio clorhídrico, para la formación de un complejo de transferencia de carga con el anión sulfocianuro de color rojo que absorbe a 508 nm. Se utilizó el espectrofotómetro que aparece en la figura 3. El procedimiento experimental se modificó para la muestra de la bebida vegetal.

Procedimiento: se tomó una alícuota de 10 mL de muestra y se adicionaron 5 mL de la disolución EtOH, 1 mL de la disolución HCl, 1 mL de la disolución KSCN y 1 mL de H₂O₂ comercial. La disolución se enrasó con agua en un matraz de 25 mL, se centrifugó durante 10 minutos a 2000 rpm, se filtró a través de 0.45 µm y se midió su absorbancia en el espectrofotómetro. El blanco debía prepararse con 1 mL de la disolución HCl, 1 mL de H₂O₂ comercial y agua destilada hasta enrase en matraz de 25 mL.

La recta de calibración obtenida para la determinación del contenido total de hierro siguiendo el método colorimétrico fue:

$$A_{508 \text{ nm}} = 0.33318 \cdot [\text{Fe}^{+3}] + 0.06806 \quad R^2 = 0.9992$$

Se expresa la concentración de hierro como mg Fe⁺³/100 mL.

5.2.2. Fluorescencia de Rayos X

Se basa en el estudio de las emisiones de fluorescencia generadas después de la excitación de una muestra mediante una fuente de rayos X. La radiación incide sobre la muestra excitando los átomos presentes en la misma, que emiten a su vez radiación característica denominada fluorescencia de rayos X. Esta radiación, convenientemente colimada, incide sobre un cristal analizador (con espaciado interatómico d) que la difracta en un ángulo (θ) dependiente de su longitud de onda (λ) por la ley de Bragg ($\text{sen } \theta = n\lambda/2d$). Un detector, que puede moverse sobre un determinado rango de dicho ángulo, mide el valor de la intensidad de radiación en un ángulo determinado y, por tanto, para una longitud de onda específica, que es función lineal de la concentración del elemento en la muestra que produce tal radiación de fluorescencia. Para ello se ponen 100 µL de muestra en un microcarry, y se deja secar en estufa durante 24 h a 50 °C, antes de llevarlo al analizador¹⁰.

5.2.3. Estudio del contenido de polifenoles totales: Índice de Folin-Ciocalteu

Este método se basa en el empleo del reactivo de Folin-Ciocalteu, constituido por una mezcla de ácido fosfotungstico (H₃PW₁₂O₄₀) y de ácido fosfomolibdico (H₃PMo₁₂O₄₀). Este reactivo se reduce, después de la oxidación de los fenoles, a una mezcla de óxidos azules de tungsteno (W₈O₂₃) y de molibdeno (Mo₈O₂₃). La coloración azul producida posee un máximo de absorbancia en las proximidades de 750 nm, y es proporcional a la concentración de los compuestos fenólicos.

En una cubeta se colocaron 1.250 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu diluido 1:5 en agua destilada y se le añadieron 50 µL de la muestra filtrada por 0.45 µm. Tras una vigorosa agitación y reposo de 1 minuto a temperatura ambiente (25°C), se añadió 1 mL de carbonato sódico al 10 %. La mezcla se agitó de nuevo y se dejó reaccionar durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Tras este tiempo, se midió la absorbancia a 760 nm usando el espectrofotómetro UV-vis¹¹.

Los datos se expresaron como mg ácido gálico/mL. Para ello, se realizó una curva de calibrado de ácido gálico usando diferentes concentraciones de estándar del patrón (1, 0.75, 0.5, 0.25, 0.1, 0.05 y 0.01 mg ácido gálico/mL). La curva de calibrado obtenida fue:

$$\text{TPC (g ácido gálico/L)} = 0.4198 \cdot A_{760 \text{ nm}} - 0.0288 \quad R^2 = 0.9997$$

5.2.4. Estudio de la actividad antioxidante

La actividad antioxidante se mide mediante la decoloración del radical DPPH[•], según el método de Katalinic et al. (2006), con algunas modificaciones. La molécula 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH) es conocida como un radical libre estable debido a la deslocalización de un electrón desapareado sobre la molécula completa, por lo cual la molécula no se dimeriza, como es el caso de la mayoría de los radicales libres. La deslocalización del electrón también intensifica el color violeta intenso típico del radical, el cual absorbe en metanol a 517 nm. Cuando la solución de DPPH reacciona con el sustrato antioxidante que puede donar un átomo de hidrógeno (figura 4), el color violeta se desvanece. El cambio de color es monitoreado espectrofotométricamente y es utilizado para la determinación de los parámetros para las propiedades antioxidantes¹².

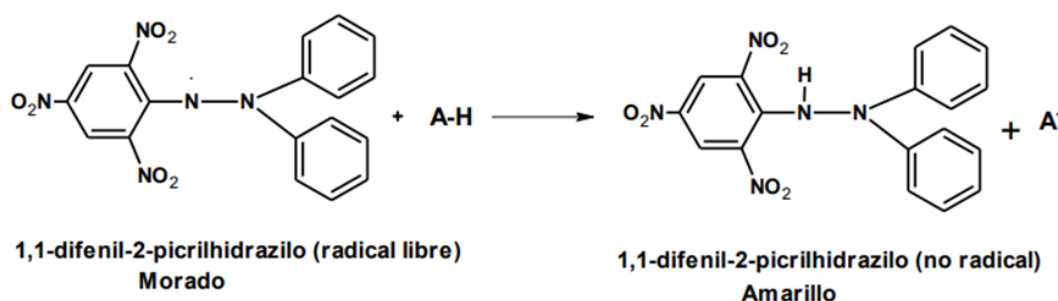


Figura 4. Estructura del DPPH antes y después de la reacción con el antioxidante.

Procedimiento: en primer lugar, se realizó un control, al que se añadieron 3 mL de disolución 45 mg/L de DPPH en metanol para la muestra junto con 200 µL de agua destilada. Se midió la absorbancia del control a 517 nm a tiempo cero.

Se continuó con las muestras, añadiendo a 3 mL de disolución 45 mg/L de DPPH en metanol, 200 µL de bebida vegetal diluido 1:10 en agua destilada. Se midió la absorbancia de la muestra tras 30 minutos de incubación a temperatura ambiente y en oscuridad, a 517 nm.

Los resultados se expresaron según el porcentaje de inhibición del DPPH, que se calculó con la siguiente expresión:

$$\% \text{ DPPH Inhibition} = \frac{\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{muestra}}}{\text{Abs}_{\text{control}}} * 100$$

Un aumento de este porcentaje indica una mayor actividad antioxidante en la muestra.

5.2.5. Análisis del espectro

Con el fin de comprobar si las bebidas sufrían cambios de color debido a, entre otras cosas, pardeamiento, pérdida de intensidad colorante, etc, a lo largo de su vida útil, se realizó un estudio espectrofotométrico del color y otras posibles variaciones. Para ello, se pipeteó 1 mL de cada bebida vegetal y se llevó a un matraz de 10 mL, enrasando con agua. La dilución de cada bebida vegetal se filtró con 0.45 μm y el filtrado se midió por espectroscopía UV-vis. Se tomó el espectro completo desde 200 hasta 800 nm.

5.2.6. Análisis sensorial

Se hizo un análisis sensorial según la Norma ISO 8586:2012, en la cual 17 catadores analizaron las bebidas al inicio de su vida útil (recién elaborados), y una vez transcurrido este tiempo (45 días).

En la figura 5 se puede ver la hoja de respuestas utilizada para la cata de las bebidas recién elaboradas. Para la prueba de identificación de la composición frutal y vegetal de las bebidas, se emplearon catavinos negros para evitar que el color de las mismas influyera en los resultados. Los ingredientes en las tablas aparecen ordenados por orden alfabético.

Para la prueba de evaluación de aroma y sabor se utilizó el método de escalas, conforme a la norma UNE-ISO 4121:2006. Para ello, se utilizó una escala de tres grados y seis puntuaciones: indeseable (1-2), aceptable (3-4) y deseable (5-6). Las bebidas se presentaron en catavinos negros, para evitar que el color de los mismos pudiera influir sobre la puntuación de aroma y sabor.

CATA BEBIDAS VEGETALES CON PROBIÓTICOS

Nombre:

Rango de edad: 18-25 26-40 41-60 +60

Fecha:

Prueba 1: Señale los aromas y sabores que detecte en las bebidas.

a) Aroma

	158	249	322	497	584
Coco					
Espinaca					
Fresa					
Fruta de la pasión					
Frutos rojos					
Jengibre					
Mango					
Manzana					
Melocotón					
Naranja					
Pepino					
Piña					
Remolacha					
Zanahoria					

b) Sabor

	158	249	322	497	584
Coco					
Espinaca					
Fresa					
Fruta de la pasión					
Frutos rojos					
Jengibre					
Mango					
Manzana					
Melocotón					
Naranja					
Pepino					
Piña					
Remolacha					
Zanahoria					

Prueba 2: Puntúe cada una de estas bebidas por su aroma y sabor.

a) Aroma

	Indeseable		Aceptable		Deseable	
158	1	2	3	4	5	6
249	1	2	3	4	5	6
322	1	2	3	4	5	6
497	1	2	3	4	5	6
584	1	2	3	4	5	6

b) Sabor

	Indeseable		Aceptable		Deseable	
158	1	2	3	4	5	6
249	1	2	3	4	5	6
322	1	2	3	4	5	6
497	1	2	3	4	5	6
584	1	2	3	4	5	6

Observaciones: Añadir en caso de detectar un aroma o sabor no recogido en las tablas anteriores.

Figura 5. Hoja de cata empleada en el primer análisis sensorial.

En la figura 6 se puede observar la ficha de cata utilizada en la prueba triangular para comparar bebidas recién elaboradas con otras que habían finalizado su vida útil. La prueba triangular se realizó según la norma UNE-EN ISO 4120:2008, donde los catadores fueron preguntados por la similitud entre muestras (encontrar la diferente) (figura 7).

CATA BEBIDAS VEGETALES CON PROBIÓTICOS

Nombre:

Rango de edad: 18-25 26-40 41-60 +60

Fecha:

Prueba 1: Señale si alguna bebida vegetal le resulta diferente al resto. En caso contrario, no marque ninguna casilla.

158	249	322	497	584
A	A	A	A	A
B	B	B	B	B
C	C	C	C	C

Prueba 2: En caso de haber detectado diferencias, indique dónde:

	158	249	322	497	584
Color					
Sabor					
Aroma					
Otros					

Figura 6. Hoja de cata empleada en el segundo análisis sensorial (prueba triangular).

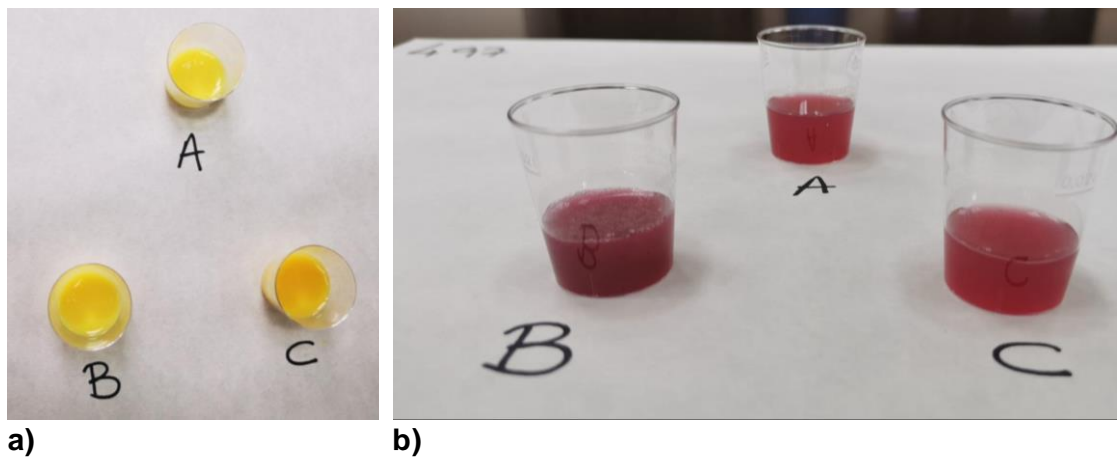


Figura 7. Prueba triangular de la muestra: a) 158 y b) 497.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Determinación del contenido total de hierro y estudio de su solubilidad en las muestras

Se deseaba lanzar al mercado un nuevo Be Well, empleando fresa y melocotón. Ante la demanda de los consumidores, se planteó la idea de enriquecer esta bebida con hierro, en forma de complejo (polvo soluble) de pirofosfato férrico con vitamina C, ya que la absorción del hierro se incrementa con la presencia de la vitamina C por la formación de un quelato soluble al pH intestinal. Como se indicó en la Introducción del presente estudio, la mínima cantidad de hierro que debe contener la bebida para considerarla enriquecida es el 15 % de la dosis diaria recomendada (14 mg).

Cuando se inició este Trabajo Fin de Máster, la empresa estaba terminando de formular la composición final de la nueva bebida, por lo que el estudio inicial de la solubilidad del hierro se realizó con muestras de dos bebidas (Energy e Inmunity) ya comercializadas.

Antes de adicionar el producto con hierro y vitamina C, se comprobó que las muestras no contenían hierro. Para ello, se tomaron unas alícuotas de 10 mL de cada muestra y se realizó el análisis colorimétrico del tiocianato.

A continuación, se procedió a la adición de hierro a las muestras. El objetivo era primeramente utilizar la cantidad mínima del 15 % de la dosis diaria recomendada, continuar con el 25 % y, si el hierro no precipitaba, seguir aumentando su concentración en la muestra hasta comprobar cuál era la cantidad máxima que admitía la bebida vegetal sin precipitación en ese volumen.

Así se comenzó con el 15 % VRN, añadiendo 38.8 mg de producto a 100 mL de agua, para comprobar que en ella se disolvía. Se realizó el tratamiento de muestra y se midió su absorbancia a 508 nm. Tras comprobación de la disolución completa en agua, se repitió el procedimiento con las dos muestras de bebidas. Posteriormente, se realizó el mismo procedimiento añadiendo a las muestras el 25 % de la dosis diaria recomendada (64.7 mg de producto en 100 mL de agua inicialmente, para comprobar su disolución, y después se continuó con las muestras).

Ante la posibilidad de que el hierro estuviera formando un complejo con la vitamina C que dificultase la formación con el tiocianato y así su determinación, se añadió un nuevo paso en el procedimiento experimental. Según la bibliografía consultada¹³, se sabe que la vitamina C es termolábil y comienza a desnaturalizarse a temperaturas tan bajas como 30 °C. Los efectos negativos del calor aumentan significativamente a 60 y aún más a 77 °C. Es por esto que las muestras se calentaron antes de su tratamiento y análisis.

Se realizó el tratamiento de muestra descrito por el método, y los resultados mostraban que las bebidas inicialmente no contenían hierro. Así que se comenzó con el análisis del agua y de las bebidas vegetales enriquecidas con hierro al 15 % de la dosis diaria recomendada. Se realizaron las medidas del día 0, a las 24 y a las 48 horas. En todos los casos, se obtuvieron valores de absorbancia de 0 o despreciables. Estos valores se llevaron a la recta de calibrado, dando concentraciones de hierro también despreciables, lo cual resultaba incoherente ya que se estaba añadiendo el producto con una composición conocida de hierro.

Después de varias repeticiones y sin poder cumplir el objetivo, se decidió cambiar de técnica y empezar a medir por fluorescencia de Rayos X.

- Primer día: se dejaron secar 2 microcarries en estufa durante 24 horas a 50°C, uno contenía 100 µL de bebida enriquecida con hierro y otro sin enriquecer.
- Segundo día: se repitió el proceso del día anterior para comprobar resultados, añadiendo 200 µL.
- Tercer día: se dejaron secar 3 microcarries en estufa durante 24 horas a 50 °C, conteniendo 100 µL de disolución 100 ppm Fe, 100 µL de disolución 21 ppm Fe y bebida vegetal con 100 ppm Fe, respectivamente.



Figura 8. Microcarry empleado para la determinación del hierro por Fluorescencia de Rayos X.

En la figura 8 se muestran los microcarries empleados en la técnica empleada para la determinación de hierro en las bebidas vegetales. En esta ocasión, las concentraciones experimentales que se obtenían mediante Fluorescencia de Rayos X eran 1000 veces inferiores a las teóricas que se añadían. En la recta patrón, los resultados fueron correctos porque las disoluciones contenían como analito hierro metálico comercial, pero en las bebidas vegetales enriquecidas con el producto proporcionado por la empresa, estos resultados carecían de sentido analítico, ya que mostraban ausencia de hierro, pese a añadirlo a concentraciones conocidas.

Tras todos estos experimentos, se comunicó lo sucedido a la empresa dado que lo más probable es que el producto formulado con hierro y vitamina C realmente no tuviera hierro y estuviera produciéndose un **fraude** por parte del proveedor que suministra el compuesto a la empresa. El director contactó con dicho proveedor y, finalmente, decidió rescindir el contrato con la empresa suministradora y contratar otro. Este nuevo proveedor le vendía el mismo producto a un precio mucho mayor y su llegada se retrasaría varias semanas. Ante este escenario, la empresa decidió reenfocar la idea de la nueva bebida vegetal que querían comercializar, sin la adición de hierro suplementario. Es por ello que el objetivo de este Trabajo Fin de Máster debió adaptarse, realizando otros análisis, cuyos resultados se describen en los apartados siguientes.

6.2. Estudio del contenido de polifenoles totales

Los polifenoles son un grupo de compuestos que se encuentran en diversas fuentes naturales, como frutas y plantas. Para definir la calidad de una bebida, la concentración de estos compuestos es muy importante debido a que influyen en propiedades como el color, la

astringencia, el amargor, etc. Además, es conocido que confieren actividad antioxidante a los alimentos en los que estén presentes, siendo beneficiosos para la salud (Quiñones et al., 2012). En la figura 9, se muestran los resultados obtenidos en los ensayos.

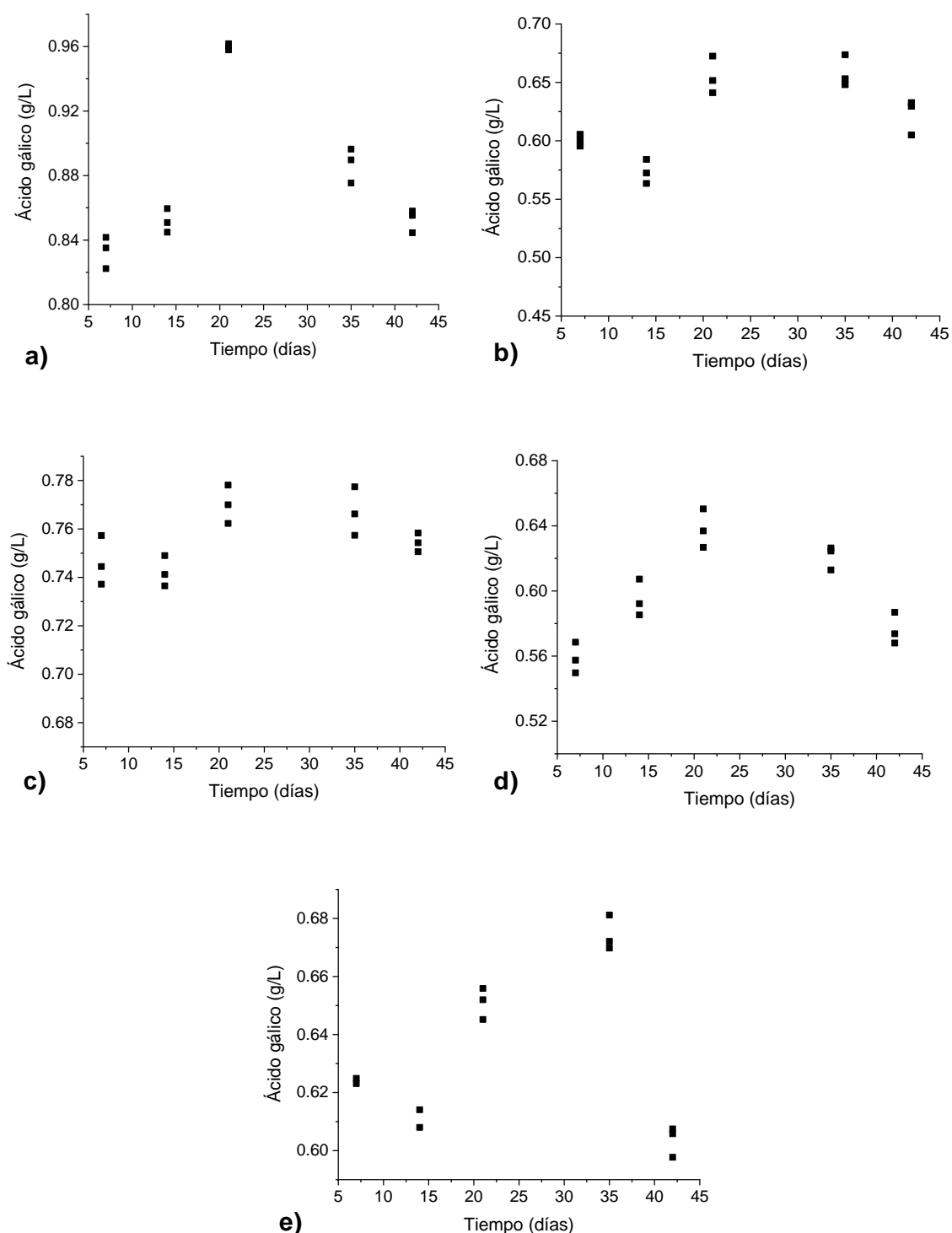


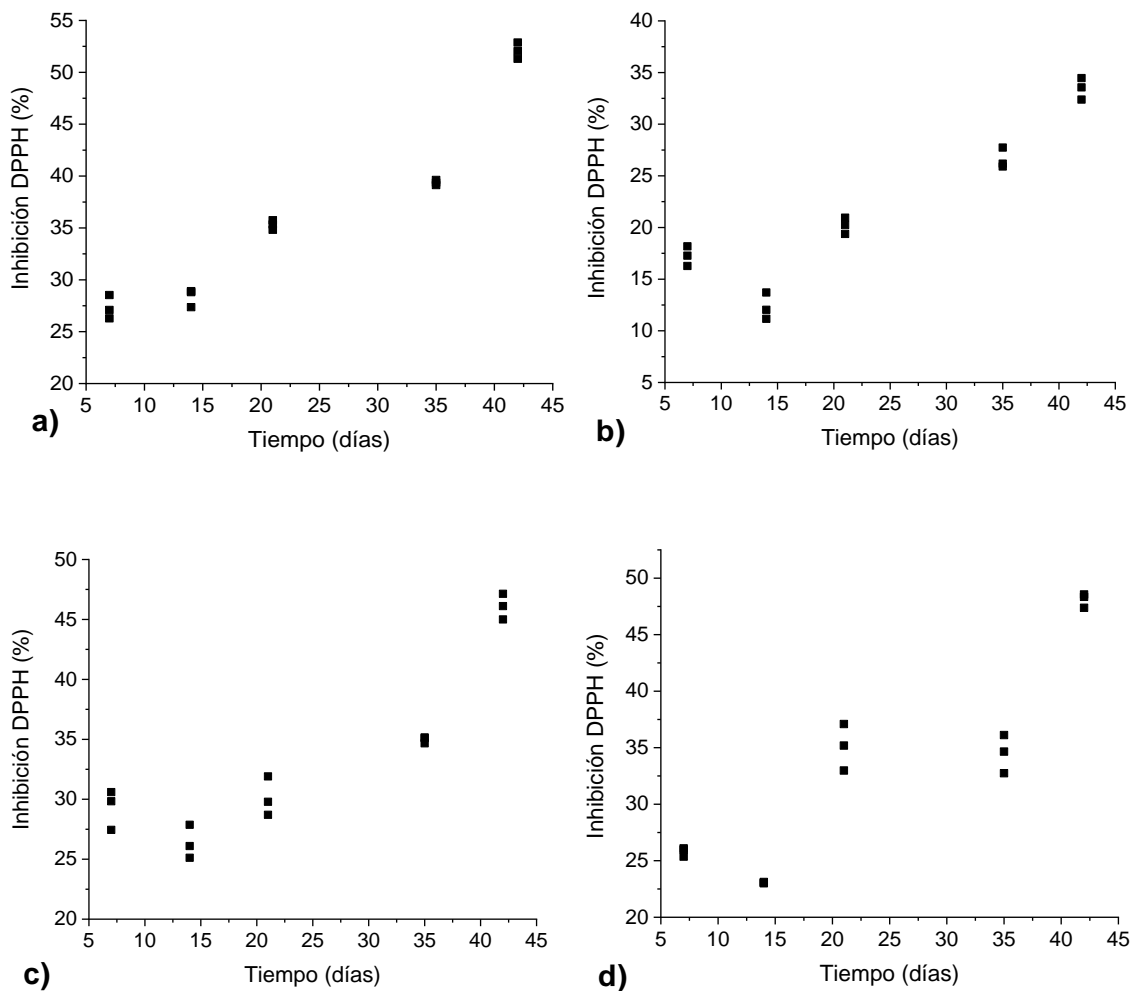
Figura 9. Contenido en polifenoles totales durante la vida útil para Be Well: a) Energy, b) Inmunity, c) Skin, d) Antiox y e) Nuevo.

Como se observa en los gráficos, el contenido de polifenoles totales se mantuvo prácticamente constante en todas las bebidas vegetales durante toda su vida útil y, aunque existen ligeras variaciones entre sus valores, resultaron insignificantes porque su desviación

estándar fue inferior al 5 %. Aunque visualmente puede llevar a la conclusión de que el contenido en polifenoles disminuyó, no hay que perder de vista la escala de trabajo.

6.3. Estudio de la actividad antioxidante

La actividad antioxidante se refiere a la capacidad que tiene una sustancia, en este caso las bebidas vegetales, para neutralizar los radicales libres perjudiciales para el organismo, como se ha comentado anteriormente. Como se indicó, un aumento del porcentaje de inhibición de DPPH corresponde con un aumento de la actividad antioxidante en la muestra. La figura 10 presenta la evolución de la actividad antioxidante de las bebidas vegetales durante el tiempo de estudio.



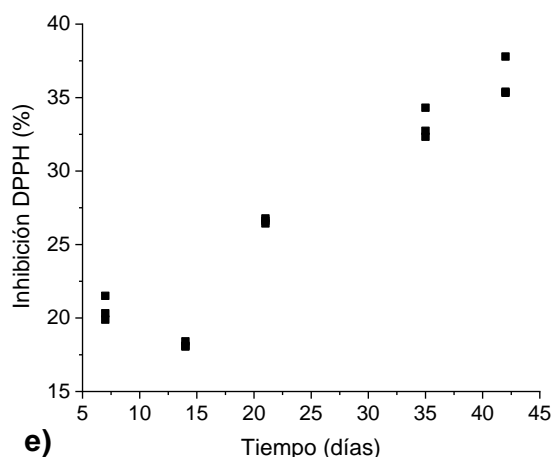


Figura 10. Capacidad antioxidante durante la vida útil para Be Well: a) Energy, b) Inmunity, c) Skin, d) Antiox y e) Nuevo.

Lactobacillus Pentosus LPG1 presenta unas capacidades tecnológicas notables para llevar a cabo la fermentación ácido-láctica en determinados alimentos y bebidas, pudiendo ser utilizada como cultivo iniciador. Por todos estos motivos, el microorganismo ha sido protegido intelectualmente por el CSIC, y su explotación licenciada a Oleica, una spin-off, o empresa de base tecnológica, del CSIC y la Universidad de Córdoba, que se está encargando de su desarrollo y comercialización en el tejido productivo

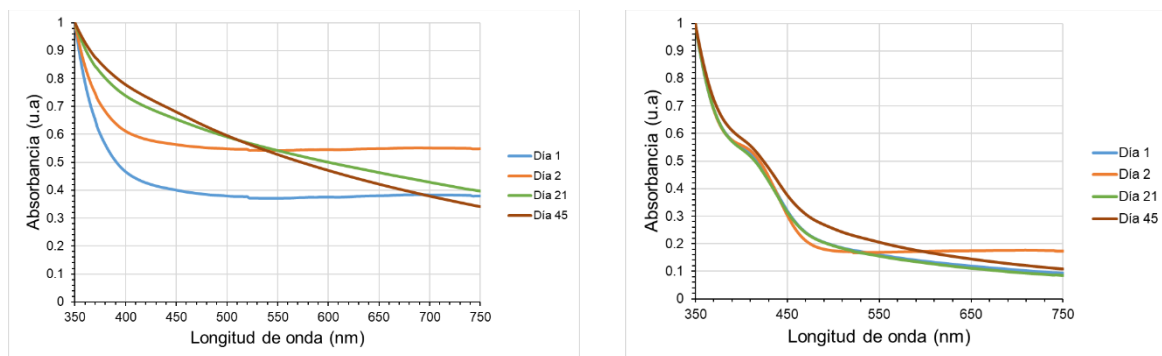
Una característica importante del género *Lactobacillus* es su capacidad de producir ácido láctico, siendo éste un potente antioxidante. Por esta razón, a lo largo de la vida útil de la bebida vegetal, la actividad antioxidante aumenta debido a que el probiótico empleado es capaz de generar sustancias con poder antioxidante durante su metabolismo, según indica un artículo publicado por el CSIC/DICYT. Este probiótico es una bacteria láctica que ha mostrado tener un alto poder antiinflamatorio en mamíferos. La investigación ha aparecido recientemente publicada en la prestigiosa revista *Probiotics and Antimicrobial Proteins*¹⁴.

6.4. Estudio del color

El color está relacionado con las cualidades sensoriales, la composición química y, por lo tanto, uno de los factores que define la calidad de un producto alimentario.

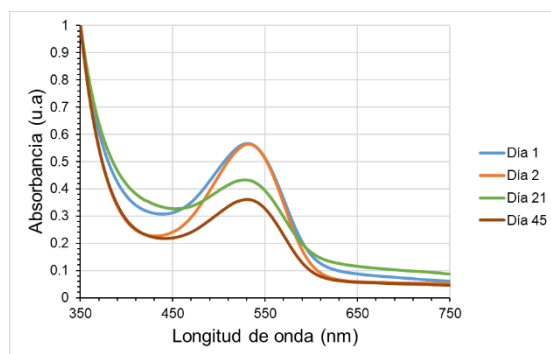
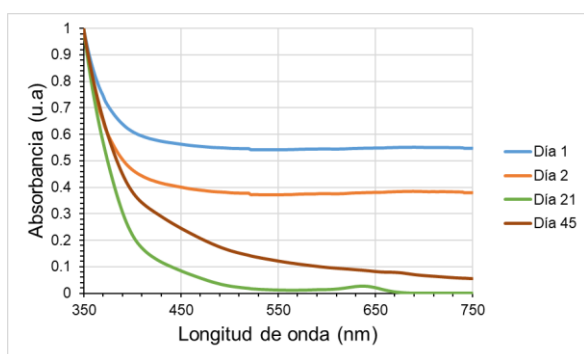
A continuación, se muestran los espectros obtenidos a lo largo de la vida útil, en la figura 11. Estos espectros están normalizados, pudiendo comprobar si se desplazaba el máximo de absorción. Aunque se buscaba estudiar el pardeamiento visible de las bebidas, los espectros se midieron de 200 a 800 nm, con una región en el ultravioleta, ya que existen azúcares que absorben en dicha zona.

Las medidas se realizaron en los días 1, 2, 3, 7, 14, 21, 35 y 45, pero se representaron los resultados de los días 1, 2, 21 y 45 y solo en la región del visible (350-750 nm) para mejor visualización, ya que el resto de espectros dificultaban la lectura del gráfico y no había variaciones significativas.



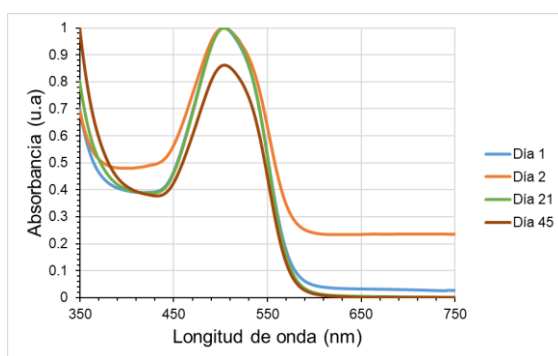
a)

b)



c)

d)



e)

Figura 11. Espectro obtenido para el Be Well: a) Energy, b) Inmunity, c) Skin, d) Antiox y e) Nuevo.

Como se puede observar en la figura 11, en el caso del Be Well Energy se comprobó que la absorbancia aumentó con el tiempo en la zona del amarillo (420 nm), pasando de tener un color amarillo fluorescente intenso a un amarillo más apagado, ligeramente anaranjado, debiéndose al pardeamiento de flavonoles.

En el caso del Be Well Inmunity, la absorbancia no varió mucho con el tiempo y esto se vio reflejado en el color de la bebida, que es la que menos se pardeó. Lo contrario ocurrió en el Be Well Skin, visualmente es el que presentó un cambio más relevante de color, pues pasó de un verde intenso a un verde muy apagado, y ello se mostró en los resultados, pues la absorbancia disminuyó considerablemente.

Con respecto al Be Well Antiox y al nuevo que se desea comercializar, que también es rojo, el máximo de absorción entre 450-550 nm, que corresponde precisamente con la zona del color rojo, disminuyó a lo largo de su vida útil, lo que implica una menor intensidad colorante de las bebidas.

En la figura 12 puede observarse el pardeamiento de algunas bebidas. Los microorganismos se alimentaron del sustrato, produciendo como metabolitos ácidos grasos de cadena corta, entre otros y descendió el pH, aumentando la acidez del medio. El microorganismo agotó el sustrato, no había material fermentable y murió por falta de alimento, quedando el alimento estéril y estable, pero cambiaron sus propiedades organolépticas, por lo que el tiempo de vida útil del producto estaba bien establecido.



Figura 12. Cambio de color producido en el Be Well durante su vida útil: a) Skin y b) Antiox.

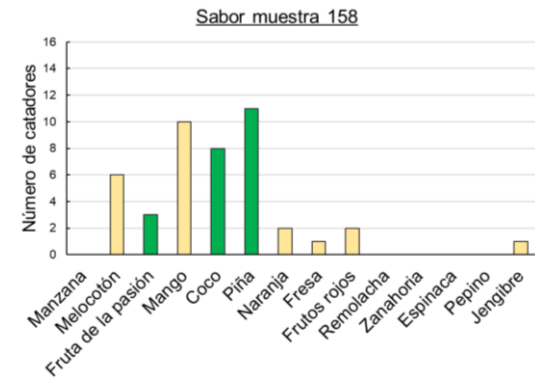
6.5. Análisis sensorial

6.5.1. Identificación vegetal

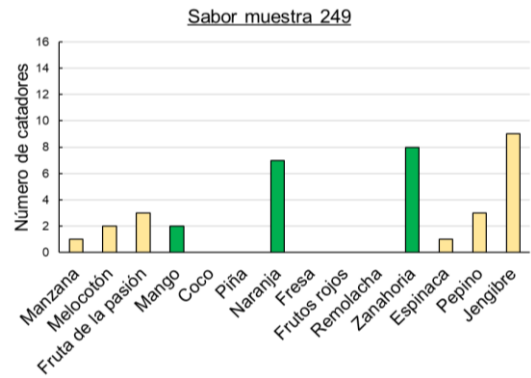
En la primera prueba, se buscaba conocer si los catadores eran capaces de identificar las frutas y/o vegetales presentes en las bebidas, en sabor y en aroma. Este material vegetal se organizó en categorías:

- Frutas de árbol: manzana y melocotón.
- Frutas tropicales: fruta de la pasión, mango, coco y piña.
- Cítricos: naranja.
- Frutos rojos: fresa y frutos rojos.
- Vegetales: remolacha, zanahoria, espinaca y pepino.
- Especiado: jengibre.

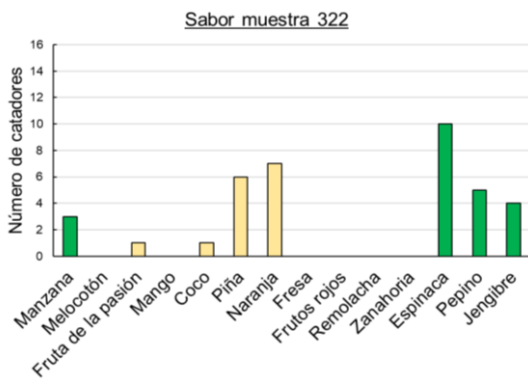
Los resultados obtenidos mediante el sabor se representan en la figura 13, empleando el color verde para aquellas frutas que presentaba la bebida y que, por tanto, los catadores debían identificar.



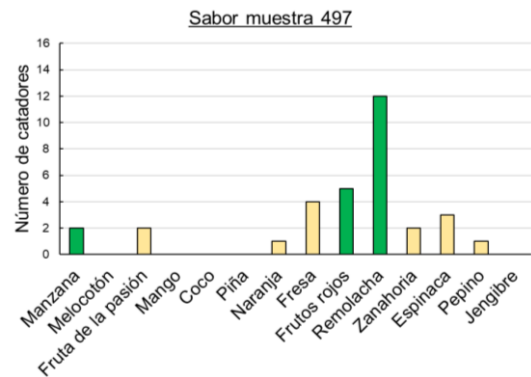
a)



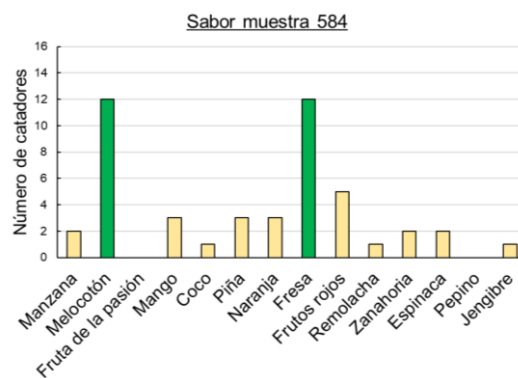
b)



c)



d)



e)

Figura 13. Representación de la identificación vegetal por sabor de la muestra de Be Well: a) 158 Energy, b) 249 Inmunity, c) 322 Skin, d) 497 Antiox y e) 584 Nuevo.

En los Be Well Energy, Inmunity, Skin, Antiox y el nuevo que se quiere comercializar, el porcentaje de catadores que consiguieron acertar su composición completa mediante el sabor, fue de 45.83 %, 35.42 %, 34.38 %, 39.58 % y 75 %, respectivamente.

Los resultados obtenidos mediante el aroma se representan en la figura 14, empleando el color verde para aquellos vegetales que presentaba la bebida y que, por tanto, los catadores debían identificar.

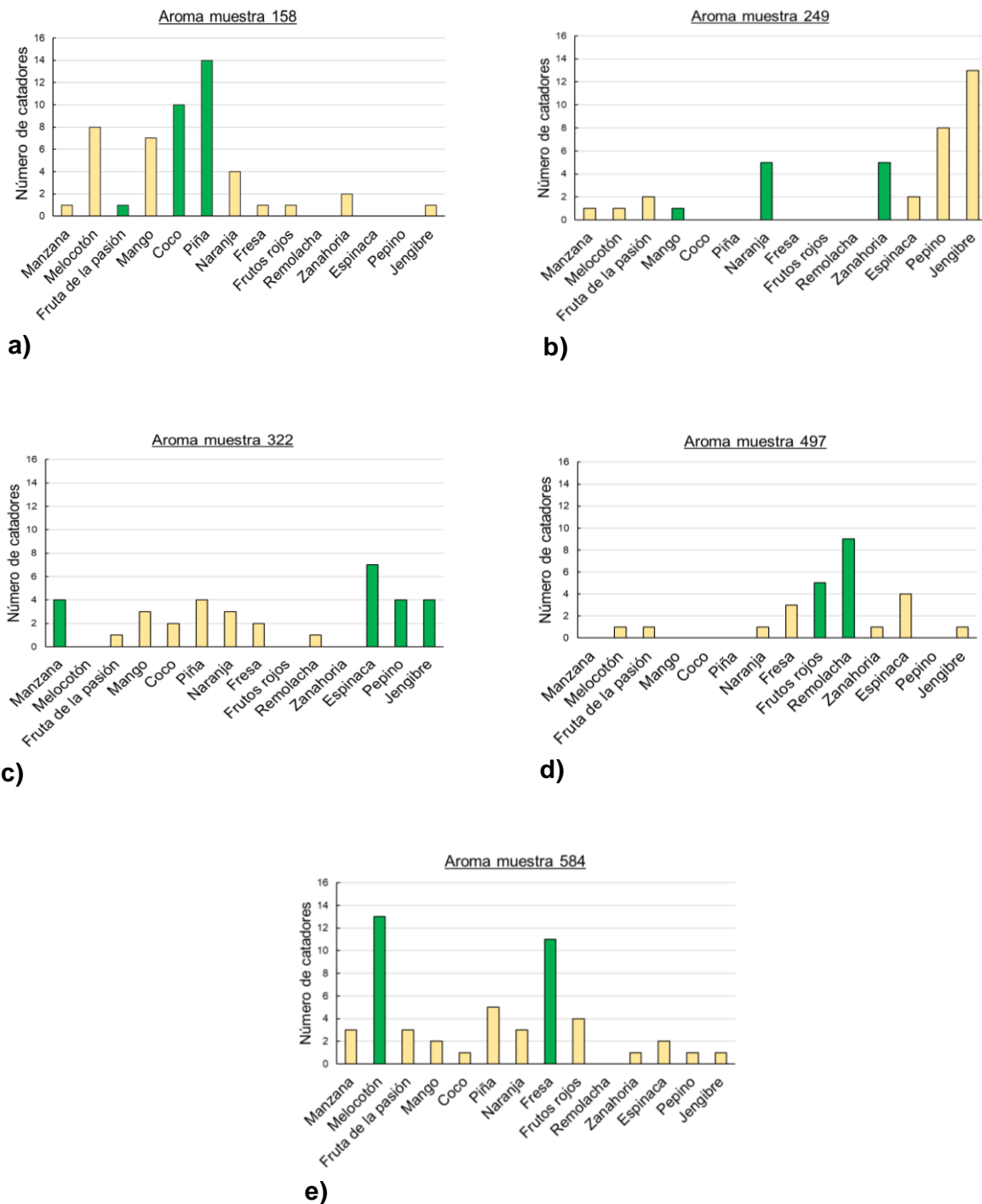


Figura 14. Representación de la identificación vegetal por aroma de la muestra de Be Well: a) 158 Energy, b) 249 Inmunity, c) 322 Skin, d) 497 Antiox y e) 584 Nuevo.

En los Be Well Energy, Inmunity, Skin, Antiox y el nuevo que se quiere comercializar, el porcentaje de catadores que consiguieron acertar su composición completa mediante el aroma, fue de 52.08 %, 22.62 %, 29.69 %, 43.75 % y 75 %, respectivamente.

Según los resultados, se puede afirmar que el Be Well nuevo resultó más sencillo para los catadores, pues un alto porcentaje consiguió conocer la composición completa de la bebida.

6.5.2. Evaluación organoléptica

Para la evaluación de la aceptación por los consumidores de las diferentes bebidas vegetales, se realizó un análisis sensorial de acuerdo a las normas ISO para evaluar sus características organolépticas. En primer lugar, se evaluó el sabor y el color de todas las bebidas. Para ello, se entregó a cada catador una hoja de cata con la que podrían evaluarlas mediante una prueba de escalas con tres grados y seis puntuaciones: indeseable (1-2), aceptable (3-4) y deseable (5-6), cuyos resultados se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Resultados obtenidos en la evaluación organoléptica.

Muestra	Aroma			Sabor	
	Puntuación total	Puntuación media		Puntuación total	Puntuación media
Be Well Energy	66	4.1		74	4.7
Be Well Inmunity	51	3.2		50	3.1
Be Well Skin	50	3.1		52	3.3
Be Well Antiox	52	3.3		49	3.1
Be Well Nuevo	85	4.7		90	5.0

En todos los casos, se obtuvieron puntuaciones en los rangos aceptable-deseable. La bebida que más satisfacción generó entre los catadores fue el nuevo Be Well que se quiere comercializar, con una composición de melocotón y fresa.

6.5.3. Prueba triangular

La primera prueba consistió en que los catadores fueran capaces de identificar la bebida diferente, mientras que en la segunda prueba debían marcar si encontraban diferencias en color, sabor o aroma.

- Be Well Energy: 88.24 % aciertos (15/17) y 100 % de catadores encontraron diferencias (17/17).
- Be Well Inmunity: 64.71 % aciertos (11/17) y 94.12 % de catadores encontraron diferencias (16/17).
- Be Well Skin: 100 % aciertos (17/17) y 100 % de catadores encontraron diferencias (17/17).
- Be Well Antiox: 88.24 % aciertos (15/17) y 100 % de catadores encontraron diferencias (17/17).

- Be Well Nuevo: 52.94 % aciertos (9/17) y 88.24 % de catadores encontraron diferencias (15/17).

Dado que las características organolépticas de las bebidas vegetales con probióticos cambiaron significativamente a lo largo de su vida útil, la mayoría de los catadores fueron capaces de identificar las diferencias. El cambio más significativo se encontró en el cambio de color y en la pérdida de intensidad aromática.

7. CONCLUSIONES

Del estudio de la estabilidad del hierro en las bebidas vegetales se concluye que es muy importante conocer la formulación y composición exacta del producto que se añade, para ello es necesario tener un proveedor de confianza que suministre los productos en buen estado.

Una bebida vegetal que tenga *Lactobacillus Pentosus LPG1* como probiótico en su composición va a aumentar su actividad antioxidante a lo largo de su vida útil, debido a que dicho microorganismo genera ácido láctico durante su metabolismo, el cual presenta potentes propiedades antioxidantes. En cuanto al contenido total de polifenoles totales, este se mantiene prácticamente constante con el tiempo.

Del estudio del color de las bebidas mediante espectroscopía UV-visible se puede afirmar que existen cambios en los espectros, aunque estos no siguen una tendencia lineal con el tiempo. Visualmente, el cambio se aprecia con facilidad si se compara una bebida recién hecha con otra al final de su vida útil.

En el análisis sensorial se puede concluir que la mayoría de los catadores participantes fueron capaces de identificar el contenido vegetal de las bebidas y que el grado de satisfacción de las mismas, respecto a su aroma y color, fue aceptable. De la prueba triangular se concluye que los catadores pudieron encontrar la muestra diferente y apreciar las diferencias de color, aroma y sabor entre las bebidas al inicio y al final de su vida útil.

Con el conocimiento adquirido en este Trabajo, en el futuro se puede retomar el estudio de la estabilidad de hierro, pero empleando un producto de correcta formulación, ya que, ante el aumento de casos de personas con déficit de hierro, la puesta en el mercado de esta nueva bebida enriquecida puede resultar muy exitosa. Por otra parte, gracias a las catas realizadas, se conoce que la composición elegida para este nuevo producto tiene una alta probabilidad de éxito en el mercado.

8. BIBLIOGRAFÍA

- ¹ La Salmoreteca: www.lasalmoreteca.com (Consultado 29/06/2023).
- ² Purificación Gómez Álvarez Salinas. "El hierro en la alimentación". Volumen 18, número 2, páginas 54-57. Febrero 2004.
- ³ National Institutes of Health. Office of Dietary Supplements.
- ⁴ Diario Oficial de la Unión Europea. Artículo 4, Anexo I.
- ⁵ Montse Vilaplana. "Antioxidantes presentes en los alimentos. Vitaminas, minerales y suplementos". Volumen 26, número 10, páginas 79-86. Noviembre 2007.
- ⁶ Eréndira Valencia Avilés, Iván Ignacio Figueroa, Erika Sosa Martínez, María Carmen Bartolomé Camacho, Héctor Eduardo Martínez Flores, Martha Estrella García Pérez. "Polyphenols: antioxidant and toxicological properties". Facultad de Químico-Farmacobiología. Universidad de México. Enero 2017.
- ⁷ Eva Gimeno Creus. "Compuestos fenólicos. Un análisis de sus beneficios para la salud". Volumen 23, número 6, páginas 80-84. Junio 2004.
- ⁸ Lorena Rojo Pérez. "Nanopartículas biocompatibles dopadas con antioxidantes: efecto sobre el pardeamiento de zumos de frutas". Biotecnología Alimentaria. Universidad de Oviedo. Julio 2019.
- ⁹ SKOOG, WEST, HOLLER. "Fundamentos de Química Analítica", 4ª edición. Editorial Reverté. Barcelona. 1997.
- ¹⁰ Salvador Azpeleta Izquierdo. "Análisis y técnicas. Espectrometría de Fluorescencia de Rayos X". Universidad de Valladolid. 2017.
- ¹¹ María de los Ángeles Varo Santos. "Bioactive compounds and antioxidant activity of red fruits and beverages produced from them". Universidad de Córdoba. Noviembre 2018.
- ¹² Jennifer Tovar del Río. "Determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS de 30 plantas recolectadas en la ecorregión cafetera". Universidad tecnológica de Pereira. 2013.
- ¹³ Beatriz Riverón. "Vitaminas y probióticos ante el calor, ¿se mantienen?". Actual Fruveg, bienestar y alimentación saludable. Redacción ANV. Junio 2019.
- ¹⁴ Benítez-Cabello, A., Torres-Maravilla, E., Bermúdez-Humarán, L. et al. Probiotic Properties of Lactobacillus Strains Isolated from Table Olive Biofilms. Probiotics & Antimicro. Prot. 2019.