



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN
ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA
INGENIERÍA BIOQUÍMICA



Estudio preliminar de la estabilidad en tiempo real del suplemento alimenticio
Fakulti Uro Health

Trabajo de Titulación, modalidad: Sistematización de Experiencias Prácticas de Investigación y/o Intervención, previo a la obtención del Título de Ingeniero Bioquímico, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Autor: Diego Javier Rubio Ibarra

Tutor: Ph.D. Orestes Darío López Hernández

Ambato – Ecuador

Septiembre – 2022

APROBACIÓN DEL TUTOR

Ph.D. Orestes Darío López Hernández

CERTIFICA:

Que el presente trabajo de titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Trabajo de Titulación modalidad Sistematización de Experiencias Prácticas de Investigación y/o Intervención, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 25 de julio de 2022

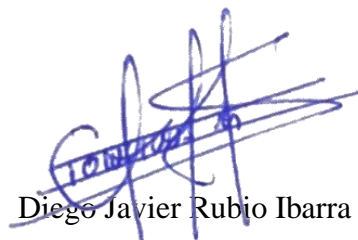
Ph.D. Orestes Darío López Hernández

C.I. 1754784864

TUTOR

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Diego Javier Rubio Ibarra, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Trabajo de Titulación, modalidad Sistematización de Experiencias Prácticas de Investigación y/o Intervención, previo a la obtención del Título de Ingeniero Bioquímico son absolutamente originales, auténticos y personales, a excepción de las citas bibliográficas.



Diego Javier Rubio Ibarra

C.I. 1803989100

AUTOR

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación, modalidad Sistematización de Experiencias Prácticas de Investigación y/o Intervención, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Por constancia firman

Dra. Liliana Alexandra Cerda Mejía

C.I. 1804148086

Presidente del Tribunal

Ph.D. Diego Manolo Salazar Garcés

C.I. 1803124294

Quim. Mg. Lander Vinicio Pérez Aldas

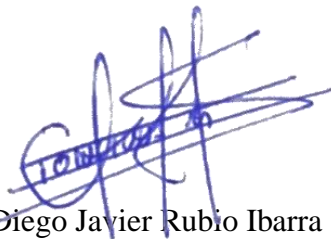
C.I. 1802706596

Ambato, 30 de agosto de 2022

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Trabajo de Titulación o parte de este un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la institución.

Cedo los derechos en línea patrimoniales de mi Trabajo de Titulación, con fines de difusión pública. Además, apruebo la reproducción de este trabajo dentro de las regulaciones de la universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'Diego Javier Rubio Ibarra', written over a faint blue stamp or watermark.

Diego Javier Rubio Ibarra

C.I. 1803989100

AUTOR

DEDICATORIA

El presente trabajo de titulación lo dedico a Dios, quien me ha dado el don de la vida, ha sido mi guía y mi fortaleza y me ha concedido la bendición de alcanzar este logro en mi vida.

A mi Señora de Guadalupe, que con su amor de madre me ha acompañado en mis tristezas y alegrías.

A mi padre, Diego Marcelo Rubio, que está en el cielo, que con su amor y su ejemplo he podido llegar a ser quién soy el día de hoy. Y que gracias a sus enseñanzas he sido capaz de afrontar las dificultades de la vida y a encarar con alegría y esperanza el futuro. Te extraño y te amo.

A mi madre Araceli Ibarra, que con su fortaleza y su dulzura me ha enseñado a tomar las decisiones correctas, a perseverar con paciencia y a no darme por vencido aun cuando todo parezca imposible.

A mi hermano Sebastián Rubio, que con su alegría me motiva a superarme y a ser mejor cada día.

A toda mi familia, quienes me han acompañado siempre en cada paso de mi vida.

AGRADECIMIENTO

Gracias en primer lugar a Dios por la vida, por el día a día, por su amor, por inspirar en mí corazón el anhelo de seguir mis sueños. Gracias Virgencita por mantenerme a tu lado como consagrado.

Gracias a mi familia. A mis padres Diego y Araceli, por su amor, apoyo incondicional, porque sin ellos no estaría aquí, por todo su esfuerzo, su dedicación y por su ejemplo, serán siempre mi mayor inspiración. Gracias a mi hermano Sebastián por acompañarme en la vida y darme siempre otra perspectiva de la misma. Gracias a mis abuelitos, tíos y primos por su confianza y su apoyo en los momentos más difíciles.

Gracias al Doctor Orestes López, tutor de este proyecto quién con su dedicación y grandeza de alma, ha permitido que este proyecto sea posible, gracias a todas sus enseñanzas como docente y por todas las oportunidades que me ha brindado para el desarrollo de mi vida profesional, por las que estaré eternamente agradecido.

Gracias a la empresa Andes Kinkuna que me ha abierto las puertas para poder desarrollar este proyecto, gracias por la oportunidad de aprender y de poder participar desde dentro del sector industrial. Gracias a Darwin, Nancy y Belén, por su apoyo en este proceso, por la gran experiencia que ha sido trabajar con ustedes.

Gracias a la Universidad Técnica de Ambato por la oportunidad de alcanzar este logro, por ofrecerme las herramientas que me han permitido adquirir las competencias y conocimientos para afrontar la vida profesional. Gracias a sus docentes quienes no solo han ofrecido sus conocimientos, sino que de cada uno de ellos he aprendido lecciones importantes de vida.

Gracias a mis compañeros de clase quienes hicieron de estos años, momentos que atesoraré por siempre en mi corazón. Gracias Cynthia, Esteban, Bryan, Nathy, Samy, Diego y Ricky, porque su amistad es un regalo.

Gracias a la comunidad Lazos de Amor Mariano y a todos mis amigos y personas quienes me han apoyado e incluso sin saberlo han permitido que no me rinda y pueda seguir adelante persiguiendo mis sueños.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL TUTOR.....	ii
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD.....	iii
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO	iv
DERECHOS DE AUTOR.....	v
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTO.....	vii
ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xiii
RESUMEN.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
CAPÍTULO I MARCO TEÓRICO.....	1
1.1. Antecedentes Investigativos	1
1.1.1. Suplementos Alimenticios	1
1.1.2. Mortiño.....	2
1.1.3. Antocianinas.....	3
1.1.4. Fakulti Uro Health®	5
1.1.4.1. Componentes	6
1.1.4.2. Cuadro nutricional	6
1.1.4.3. Condiciones de almacenamiento	7
1.1.4.4. Tiempo de vida útil.....	7
1.1.4.5. Empaque	7
1.1.4.6. Proceso de elaboración	8
1.1.5. Homogenización	8

1.1.6.	Centrifugación.....	8
1.1.7.	Microencapsulación	9
1.1.8.	Granulación.....	10
1.1.9.	pH.....	11
1.1.10.	Contenido de humedad.....	11
1.1.11.	Actividad de agua	12
1.1.12.	Isoterma de sorción.....	13
1.1.13.	Estabilidad.....	17
1.1.14.	Estudios de Estabilidad.....	18
1.1.15.	Estudios de estabilidad en tiempo real	18
1.2.	Objetivos.....	19
1.2.1.	Objetivo general.....	19
1.2.2.	Objetivos específicos	19
CAPÍTULO II METODOLOGÍA.....		20
2.1.	Materiales y equipos.....	20
2.1.1.	Materiales.....	20
2.1.1.1.	Determinación de antocianinas.....	20
2.1.1.2.	Determinación de pH.....	20
2.1.1.3.	Determinación de humedad	20
2.1.1.4.	Determinación de actividad de agua.....	21
2.1.1.5.	Determinación de la isoterma de sorción.....	21
2.1.1.6.	Análisis microbiológico.....	21
2.1.1.7.	Análisis sensorial	21
2.1.2.	Equipos.....	21
2.1.3.	Recursos informáticos.....	22
2.2.	Métodos	22
2.2.1.	Selección de muestras	22

2.2.2.	Determinación de antocianinas	23
2.2.2.1.	Método rápido para la determinación de antocianinas totales:.....	23
2.2.2.2.	Método del pH diferencial	23
2.2.2.3.	Cinética de degradación.....	24
2.2.2.4.	Límite de degradación	24
2.2.3.	Determinación de pH	25
2.2.4.	Determinación de humedad.....	25
2.2.5.	Análisis de actividad de agua.....	25
2.2.5.1.	Determinación de actividad de agua.....	25
2.2.5.2.	Determinación de la isoterma de sorción.....	25
2.2.6.	Análisis microbiológico	27
2.2.7.	Análisis sensorial	28
2.2.8.	Análisis estadístico.....	29
2.2.9.	Determinación de tiempo de vida útil	30
CAPÍTULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		32
3.1.	Análisis y discusión de los resultados	32
3.1.1.	Condiciones de almacenamiento.....	32
3.1.2.	Determinación de antocianinas	32
3.1.3.	Determinación de pH	37
3.1.4.	Determinación de humedad.....	39
3.1.5.	Isoterma de sorción	41
3.1.6.	Análisis de actividad de agua.....	46
3.1.7.	Análisis microbiológico	48
3.1.8.	Análisis sensorial	51
3.1.9.	Determinación de tiempo de vida útil	52
CAPÍTULO IV CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....		54
4.1.	Conclusiones.....	54

4.2. Recomendaciones.....	56
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
ANEXOS.....	64

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición proximal, azúcares y componentes antioxidantes del mortiño ecuatoriano.....	2
Tabla 2. Información nutricional de Fakulti Uro Health®.....	6
Tabla 3. Ecuaciones para la determinación de las constantes de los diferentes modelos de sorción.....	17
Tabla 4. Fecha de elaboración para cada lote a utilizar.....	22
Tabla 5. Parámetros microbiológicos de calidad de Fakulti Uro Health®.....	28
Tabla 6. Parámetros organolépticos de calidad para Fakulti Uro Health®.....	28
Tabla 7. Escala de Likert para la conformidad de parámetros organolépticos de calidad.....	29
Tabla 8. Cuantificación de antocianinas totales para lotes en diferentes tiempos. ...	33
Tabla 9. Parámetros estadísticos de los modelos de regresión de antocianinas.....	35
Tabla 10. Valores de k y $t_{1/2}$ para la degradación de antocianinas.....	36
Tabla 11. Determinación de pH para lotes en diferentes tiempos.....	38
Tabla 12. Comparativa de modelos de regresión alternativos para el pH.....	38
Tabla 13. Determinación de humedad para lotes en diferentes tiempos.....	40
Tabla 14. Comparativa de modelos de regresión alternativos para la humedad.....	41
Tabla 15. Tratamientos de acondicionamiento de humedad aplicados para la determinación de la isoterma de sorción.....	41
Tabla 16. Valores de humedad y actividad de agua para las alícuotas acondicionadas.....	42
Tabla 17. Coeficientes de las ecuaciones de regresión cuadrática y cúbica.....	43
Tabla 18. Constantes para la determinación de la curva isoterma de sorción según los diferentes modelos.....	43
Tabla 19. Ecuaciones de la isoterma de sorción según los diferentes modelos.....	44
Tabla 20. Actividad de agua para lotes en diferentes tiempos.....	47

Tabla 21. Comparativa de modelos de regresión para el parámetro actividad de agua.	48
Tabla 22. Análisis microbiológico para lotes en diferentes tiempos.....	48
Tabla 23. Evaluación organoléptica para lotes en diferentes tiempos.	51
Tabla 24. Evaluación de los tiempos de vida útil estimados para cada parámetro. ..	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cation flavilio, con sus respectivos radicales cuyas sustituciones forman las antocianinas.....	3
Figura 2. Formas estructurales de las antocianinas predominantes a diferentes niveles de pH.	4
Figura 3. Fakulti Uro Health® en sus diferentes presentaciones.....	5
Figura 4. Diagrama de los procesos de elaboración de Fakulti Uro Health®.....	7
Figura 5. Actividad bioquímica referencial en alimentos según la actividad de agua.	13
Figura 6. Clasificación de Brunauer para los tipos básicos de curvas de isothermas de sorción.....	16
Figura 7. Diagrama del proceso de humidificación de las muestras.....	26
Figura 8. Árbol de decisiones para la determinación del tiempo de vida útil de cada parámetro.....	30
Figura 9. Espectro de la absorbancia de una muestra de extracto de antocianinas a pH y pH 4,5.....	32
Figura 10. Diagrama de cajas y bigotes de los valores de CAT obtenidos por los métodos rápido y de pH diferencial.	34
Figura 11. Modelo de regresión lineal para la evolución del CAT en el tiempo.....	35
Figura 12. Modelo de regresión logarítmica para la evolución del CAT en el tiempo.	35
Figura 13. Cinética de degradación de antocianinas determinada por otros autores.	37
Figura 14. Modelo de regresión $y^{-1} x^2$ para la evolución de la pH en el tiempo y pronóstico de su vida útil.	39
Figura 15. Modelo de regresión lineal para la evolución de la humedad en el tiempo y pronóstico de su vida útil.	41

Figura 16. Representación de los valores experimentales para la isoterma de sorción.	42
Figura 17. Modelos de regresión cuadrática y cúbica de $awMw$ (a_w)......	43
Figura 18. Curvas de la isoterma de sorción de Fakulti Uro Health® según los diferentes modelos a 25 °C y 60 % HR	44
Figura 19. Modelo de regresión y^2 para la evolución de actividad de agua en el tiempo y pronóstico de su vida útil.	46
Figura 20. Evolución de la cuantificación de mesófilos aerobios a través del tiempo.	49
Figura 21. Evolución de la cuantificación de E. coli a través del tiempo.....	49
Figura 22. Evolución de la cuantificación de coliformes a través del tiempo.	49
Figura 23. Evolución de la cuantificación de mohos y levaduras a través del tiempo.	50
Figura 24. Evolución de la cuantificación de Staphylococcus aureus a través del tiempo.....	50

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Espectro de absorbancia UV-vis de los extractos de antocianinas a pH 1 y pH 4,5.....	64
Anexo 2. Datos experimentales de absorbancia para la determinación de CAT.	65
Anexo 3. Valores de determinación de CAT con el método pH diferencial.	68
Anexo 4. Valores de determinación de CAT con el método rápido.	68
Anexo 5. Valores de determinación de humedad.	69
Anexo 6. Valores de determinación de pH.	70
Anexo 7. Prueba t de comparación de medias de los resultados obtenidos de los diferentes métodos de determinación de CAT.	71
Anexo 8. Análisis de varianza y parámetros de la regresión de CAT en el tiempo... 71	
Anexo 9. Análisis de varianza y parámetros de la regresión de humedad en el tiempo.	72
Anexo 10. Análisis de varianza y parámetros de la regresión de actividad de agua en el tiempo.....	72
Anexo 11. Análisis de varianza y parámetros de la regresión de pH en el tiempo... 72	

Anexo 12. Proceso de filtración del extracto de antocianinas para la determinación de CAT.....	73
Anexo 13. Comparación del extracto de antocianinas equilibrado a pH 4,5 y pH 1.	73
Anexo 14. Medición de la absorbancia de los extractos de antocianinas para la determinación de CAT.....	73
Anexo 15. Alícuotas acondicionadas para la determinación de la isoterma de sorción.	74
Anexo 16. Determinación de la actividad de agua de las alícuotas acondicionadas.	74
Anexo 17. Análisis visual para la evaluación de las propiedades organolépticas del líquido reconstituido.....	75
Anexo 18. Análisis visual para la evaluación de las propiedades organolépticas del producto en forma de polvo.	75
Anexo 19. Placas Petrifilm para el análisis microbiológico.	76

RESUMEN

La estabilidad es un factor importante para determinar la calidad de un producto alimenticio. La estabilidad de sus componentes y características se ve afectada por la exposición a factores ambientales y agentes externos. Por esto, es indispensable asegurar la estabilidad de los parámetros de calidad, especialmente en productos dirigidos al consumo humano. La determinación de la estabilidad de un producto alimenticio es importante no solamente desde el punto de vista de la calidad, sino también para establecer estrategias económicas y logísticas de producción, almacenamiento y distribución. Se evaluó la estabilidad en tiempo real del suplemento alimenticio Fakultí Uro Health, elaborado a partir de extracto de mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) microencapsulado, que posee un alto contenido de antocianinas. Se analizaron 8 lotes con hasta 40 meses de tiempo de almacenamiento. Se determinó el contenido de antocianinas totales, utilizando el método de pH diferencial y se estudió su degradación mediante un modelo cinético de orden I, obteniendo un tiempo de vida media de 148 meses. Se determinó la estabilidad del pH, el contenido de humedad y la actividad de agua y se estimaron sus tiempos de vida útil extrapolando modelos de regresión. Para el cálculo de la actividad de agua se determinó la curva isoterma de sorción, que se ajustó a un modelo GAB. En todas las muestras analizadas se encontró una actividad microbiológica nula y características organolépticas dentro de los parámetros de calidad. Finalmente, siguiendo el protocolo de la ACCSQ-PPWG, se propuso un tiempo de vida útil de 39 meses.

Palabras clave: Estudio de estabilidad, antocianinas, microencapsulado, vida útil alimentos, calidad alimentaria.

ABSTRACT

Stability is an important factor to assess quality in a food product. The stability of its components and characteristics is affected by the exposure to environmental factors and external agents. Because of this, keeping stable parameters of quality is key, especially when products are intended for human consumption. The determination of a food product stability is important, not only from a quality standpoint, but also to establish economical and logistical strategies for production, storage, and distribution. Real time stability of the food supplement Fakulti Uro Health was evaluated, this product is made of microencapsulated mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) extract that contains a high level of anthocyanins. Eight lots were analyzed, with shelf times of up to 40 months. Total anthocyanin content was determined using pH-differential method and its degradation fitted a first-order kinetics model. a half-life time of 148 months was obtained. Stability of pH, moisture content and water activity was determined and estimated shelf lives were extrapolated from regression models. For water activity calculation, the sorption isotherm curve was determined, which fitted the GAB model. No microbiological activity was found, and organoleptic characteristics remained within quality parameters in all tested samples. Finally, a shelf life of 39 months was proposed according to ACCSQ-PPWG protocol.

Key words: Stability study, anthocyanins, microencapsulated, foods shelf life, food quality.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes Investigativos

1.1.1. Suplementos Alimenticios

El estatuto *Dietary Supplement Health and Education Act of 1994 (DSHEA)* define el término “suplemento alimenticio” como: **“un producto (diferente al tabaco) destinado a suplementar la dieta que contiene uno o más ingredientes alimenticios, incluyendo vitaminas, minerales, hierbas u otros componentes botánicos [...] o un concentrado, metabolito, constituyente, extracto, o una combinación de cualquiera de los anteriormente mencionados”**.

La Normativa Sanitaria Para Control De Suplementos Alimenticios del ARCSA (2016) define a los suplementos alimenticios, o también llamados “complementos nutricionales”, como: **“productos alimenticios no convencionales destinados a complementar la ingesta dietaria mediante la incorporación de nutrientes en la dieta de personas sanas, en concentraciones que no generen indicaciones terapéuticas o sean aplicados a estados patológicos”**.

Los suplementos alimenticios buscan corregir deficiencias nutricionales, mantener una ingesta adecuada de determinados nutrientes o apoyar funciones fisiológicas específicas. No deben ser considerados productos medicinales y en consecuencia no deben realizar ninguna función farmacológica, inmunológica o metabólica. De manera que su propósito no es prevenir ni el de tratar patologías (Directiva 2002/46/CE, 2002). Pueden ser comercializados en distintas presentaciones, sean estas sólidas en forma de comprimidos, cápsulas, granulados, polvos, etc.; semisólidas en forma de jaleas o geles; o líquidas en forma de gotas, jarabes, soluciones, entre otros (Sanzini et al., 2011).

1.1.2. Mortiño

El mortiño es el fruto de la especie *Vaccinium floribundum* Kunth, una baya perteneciente a la familia Ericaceae, nativa de los Andes septentrionales. Conocida también como uva de monte o *andean blueberry*, se encuentra en los páramos andinos de Ecuador, casi exclusivamente de forma silvestre (Ortiz et al., 2013). Su forma es esférica y su color azul oscuro, alcanza entre los 5 y 8 mm de diámetro. Es usada ampliamente en la gastronomía, siendo consumida fresca o como ingrediente en postres, jaleas, vinos y brebajes, particularmente en Ecuador es uno de los principales componentes de la “colada morada” una bebida típica elaborada para la conmemoración del “día de los difuntos” (Coba et al., 2012).

Tabla 1. Composición proximal, azúcares y componentes antioxidantes del mortiño ecuatoriano.

Componente	Proporción (g/100 g)
Análisis proximal	
Agua	81,0
Grasa	1,0
Proteína	0,7
Cenizas	0,4
Carbohidratos totales	16,9
Azúcares solubles	
Fructosa	4,4
Glucosa	2,6
Componentes antioxidantes	
Ácido ascórbico (mg/100 g)	9,0
β -caroteno (μ g/100 g)	36,0
Polifenoles solubles (mg GA/100 g)	882
Antocianinas (mg Cn3G/100 g)	345
TEAC (mg TE/100 g)	1203

Nota: Obtenido de (Vasco et al., 2009b)

Como se muestra en la Tabla 1, el mortiño es una fruta rica en azúcares, vitaminas B y C, además posee una alta concentración de compuestos bioactivos como polifenoles y antocianinas, que representan una alta capacidad antioxidante (Vasco et al., 2009b). Del contenido de antocianinas totales, las cianidinas representan aproximadamente un

89 %. El perfil de antocianinas del mortiño difiere significativamente con los perfiles de otras bayas similares como el arándano (*V. corymbosum*) o el mirtilo (*V. myrtillus*), los cuales contienen menos del 50 % de glucósidos de cianidina (Lätti et al., 2008; Määttä-Riihinen et al., 2004). Además, comparte únicamente glucósidos de cianidina y de delphinidina, mientras que las bayas mencionadas anteriormente y similares contienen además glucósidos de petunidina, peonidina y malvidina.

Montoya et al. (2012) indican que el contenido de antocianinas totales (CAT) varía según su estado de madurez, reportando un CAT de 0,42 – 271,9 mg Cn3G /100 g, Cajiao & Luna (2019) reportan 140,27 mg Cn3G/100 g, Vasco et al. (2009) obtuvo un CAT de 345 mg Cn3G/100 g. En comparación otras bayas similares como la mora andina poseen un CAT de 71,4 mg Cn3G/100 g (Vasco et al., 2009a) y el mirtilo finlandés posee 350 - 525 mg Cn3G/100 g (Vasco et al., 2009b).

Según Jaakola et al. (2004), el alto contenido de antocianinas y flavonoides se debe a la fuerte exposición de los frutos a la radiación solar. En respuesta, se activa la biosíntesis de dichos compuestos actúa como mecanismo de defensa ante la radiación solar.

1.1.3. Antocianinas

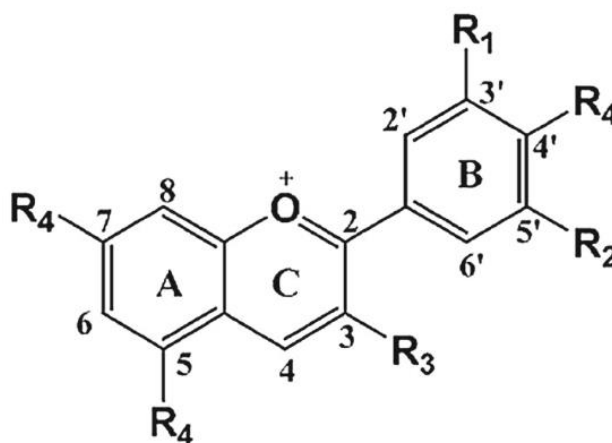


Figura 1. Cation flavilio, con sus respectivos radicales cuyas sustituciones forman las antocianinas.

Nota: Obtenido de Lakshmanakumar et al. (2018).

Las antocianinas son moléculas halocromicas, es decir poseen la capacidad de cambiar de color en respuesta a un cambio de pH, por lo que a menudo son utilizados como indicadores de pH. Este cambio se debe a la manera en que interactúan con la luz los diferentes radicales ionizados. Cuando la molécula se encuentra en un medio ácido, esta se encuentra protonada y exhibe un color rojizo, a medida que el pH aumenta la coloración pasa a un color violeta hasta que finalmente la molécula se transforma en un anión y su color se vuelve azul (Wahyuningsih et al., 2017).

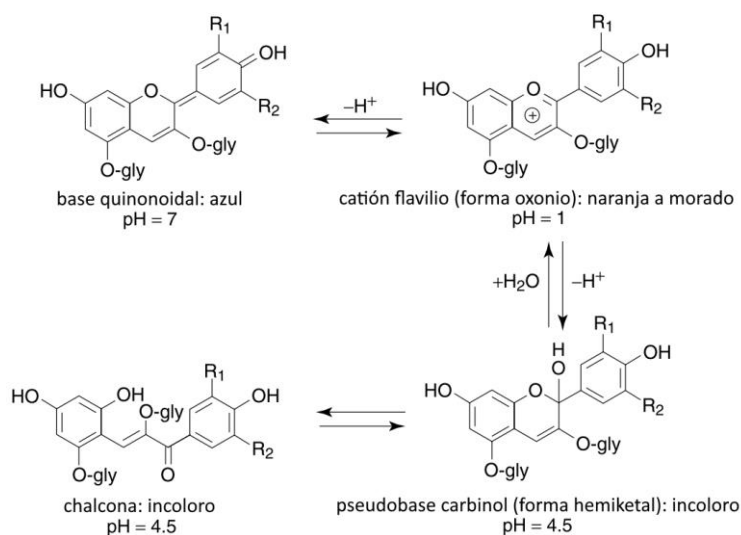


Figura 2. Formas estructurales de las antocianinas predominantes a diferentes niveles de pH.

Nota: Modificado de Giusti & Wrolstad, (2001).

Esta particularidad es especialmente útil para la determinación analítica de antocianinas. El método del pH diferencial, posteriormente tratado en la parte metodológica, aprovecha el comportamiento de las antocianinas para determinar de manera confiable y reproducible el contenido de antocianinas en una muestra, eliminando el sesgo generado por interferencias. Como se puede observar en la Figura 2, cuando las antocianinas se encuentran en un medio de pH 1 predomina el catión flavilio (forma oxonio) que exhibe una coloración brillante que varía de naranja a morado que a su vez se refleja en una mayor absorbancia de luz, generalmente en el rango de 510-540 nm (espectro visible). En contraposición cuando se encuentran en un medio de pH 4,5 predominan la pseudobase carbinol (forma hemiketal) y su isómero chalcona, ambas incoloras e indetectables en el rango antes mencionado (Giusti & Wrolstad, 2001).

Se ha evidenciado que las antocianinas ofrecen muchos beneficios para la salud, estas poseen una gran capacidad antioxidante (Smeriglio et al., 2016), son agentes neuroprotectores (Tsuda, 2012), inhiben el crecimiento de células tumorales (Jing et al., 2008; Riaz et al., 2016), poseen actividad antiinflamatoria (Riaz et al., 2016). Presentan capacidad antimicrobiana, inhibiendo la actividad enzimática de diferentes bacterias grampositivas y gramnegativas. (Llvisaca et al., 2018). Se ha demostrado también que su consumo ayuda a combatir y prevenir las infecciones en las vías urinarias al prevenir la adhesión de bacterias en las células uroepiteliales (Dadkhah et al., 2016).

1.1.4. Fakulti Uro Health®

Fakulti Uro Health® es un suplemento alimenticio biotecnológico desarrollado por laboratorios Fakulti. Este producto definido como una “mezcla en polvo para preparar bebida de mortiño” consiste de microcápsulas de extracto de mortiño (*V. floribundum* Kunth), contiene altas concentraciones de antocianinas, su componente funcional. Debido al alto poder antioxidante de las antocianinas, Fakulti Uro Heath® es comercializado como un suplemento alimenticio dirigido a la salud femenina, particularmente a la prevención de infecciones en las vías urinarias (Dadkhah et al., 2016).



Figura 3. Fakulti Uro Health® en sus diferentes presentaciones.

Al ser un producto destinado al consumo humano, este cumple con los parámetros de calidad fisicoquímicos y biológicos establecidos por la Normativa Sanitaria Para Control De Suplementos Alimenticios del ARCSA (2016) que garantizan su inocuidad y aptitud para el consumo. Adicionalmente para garantizar su desempeño óptimo y la satisfacción del usuario, se manejan parámetros de calidad de las características organolépticas.

1.1.4.1. Componentes

Maltodextrina, pulpa de mortiño (*V. floribundum* Kunth), sabor idéntico al natural frutos rojos.

1.1.4.2. Cuadro nutricional

Tabla 2. Información nutricional de Fakulti Uro Health®.

Información Nutricional		
Tamaño por porción: 10 g		
Porciones por envase: 16		
Cantidad por porción		
Energía (Calorías) 147 kJ (35 kcal)		
Energía de grasa (Cal. grasa) 0 kJ (0 kcal)		
	*% valor diario	
Grasa total	0 g	0 %
Ácidos grasos saturados	0 g	0 %
Colesterol	0 g	0 %
Sodio	0 g	0 %
Carbohidratos Totales	0 g	0 %
Fibra	0 g	0 %
Azúcares	1 g	
Proteína	0 g	0 %
*Porcentaje de Valores Diarios basados en una dieta de 8380 g 0 kJ (2000 kcal)		

1.1.4.3. Condiciones de almacenamiento

Fakulti Uro Health® debe ser almacenado en una temperatura entre 15-30 °C y una humedad relativa inferior a 65 %.

1.1.4.4. Tiempo de vida útil

El tiempo de vida útil registrada por el ARCSA para el producto Fakulti Uro Health® es de 729 días, 24 meses o 2 años.

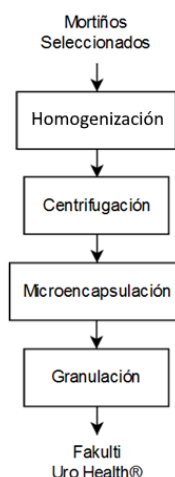


Figura 4. Diagrama de los procesos de elaboración de Fakulti Uro Health®.

1.1.4.5. Empaque

El envase primario que consiste de un sachet que contiene 10 g de producto. Está elaborado a partir de un complejo trilaminado que contiene: un film de polipropileno adherido a un film de polipropileno metalizado con aluminio mayor al 90 % de pureza, este adherido a su vez a un film de polietileno de baja densidad transparente apto para el contacto con alimentos. Los componentes del empaque quedan encerrados en el interior del film garantizando un empaque seguro para cualquier tipo de alimentos. Todos sus componentes cumplen con las regulaciones de inocuidad de la FDA (CFR Title 21 Foods and Drugs, 2022). Posee un gramaje de 65,6 g/m² y un valor de transmisión de vapor de agua de inferior a 0,3 g/m²/24 h (38 °C, 90 % HR).

1.1.4.6. Proceso de elaboración

El proceso de elaboración de Fakulti Uro Health® consta de las siguientes operaciones: homogenización, centrifugación, microencapsulación y granulación (Figura 4).

1.1.5. Homogenización

La homogenización es el proceso en el que se distribuye de manera homogénea el tamaño de las partículas suspendidas en un líquido (Patrignani & Lanciotti, 2016). Para la homogenización de materias primas de gran tamaño, como las frutas, se utiliza el proceso llamado homogenización de alto cizallamiento que es capaz reducir el tamaño de partícula de sustancias sólidas. Utilizado en diversas industrias, es particularmente útil en la industria alimenticia para el procesamiento de materias primas. Gracias a este proceso es posible aprovechar los componentes internos que de otra manera no se encuentran disponibles, debido a la constitución física de la materia prima, generalmente membranas vegetales.(Patiño et al., 2021).

La homogenización de alto cizallamiento puede ser de disposición vertical o de fondo. Para el procesamiento del mortiño (*V. floribundum* Kunth) se utiliza la homogenización vertical debido a su practicidad y versatilidad. A través de este proceso se obtiene la pulpa de mortiño como un producto intermedio, que contiene ya, junto con otras sustancias, las antocianinas disueltas disponibles en el medio.

1.1.6. Centrifugación

La centrifugación es una operación unitaria de separación de materiales de distintas densidades, generalmente separaciones sólido – líquido. Consiste en la aceleración artificial del proceso de sedimentación mediante la aplicación de una fuerza centrífuga, generada por una rotación a altas velocidades (Castelló Gómez et al., 2021). De este modo se logra concentrar todo el material en suspensión, separándolo de la fase líquida. Es un método no intrusivo y debido a su alta eficiencia y escalabilidad es ampliamente utilizada en diversas industrias, incluyendo la alimenticia (Morales Ramírez, 2017).

Las técnicas de centrifugación se dividen según el diseño de su tambor y la forma en que se descarga el material sedimentado. Existen los métodos filtrantes y los métodos por sedimentación. En el proceso de elaboración de Fakulti Uro Health® se utiliza un método de centrifugación por filtración de canasta en el que la materia sólida: cascara, semillas y demás residuos vegetales; se mantiene dentro de la canasta y la parte líquida, el jugo de mortiño, atraviesa la membrana o los agujeros de la canasta para ser recuperada en la parte exterior (Castelló Gómez et al., 2021).

1.1.7. Microencapsulación

La microencapsulación es una técnica de empaquetamiento en miniatura, que consiste en el recubrimiento de materiales sólidos, líquidos o gaseosos con una membrana polimérica semipermeable. Como resultado se forman microesferas esféricas que contienen la sustancia activa en su interior. El tamaño de las microesferas puede variar entre 5 y 300 μm (Aranda Núñez, 2018).

Este proceso permite preservar su contenido, limitando su interacción con factores externos como los ambientales y con factores internos como otros componentes del producto. A través de este mecanismo es posible incrementar la estabilidad, viabilidad y biodisponibilidad de un producto (López Hernández, 2010). En la industria alimentaria ayuda a que los materiales alimenticios soporten mejor los procesos de producción, empaque y transporte, mejorando su sabor, olor, valor nutritivo y apariencia. Además, en dependencia del polímero, puede permitir su liberación controlada en el tiempo bajo determinadas condiciones (Parra Huertas, 2010).

Existen diferentes técnicas de microencapsulación que se recogen en dos categorías: procesos químicos y procesos mecánicos. Dentro de los procesos químicos se encuentran las técnicas de coacervación, polimerización, cocrystalización, inclusión molecular, entre otros. Los procesos mecánicos pueden ser las técnicas de secado por aspersión, secado por congelamiento-enfriamiento o la extrusión (Madene et al., 2006).

Fakulti Uro Health[®] es microencapsulado mediante la técnica del secado por aspersión, que consiste en la pulverización del líquido concentrado mezclado con el polímero, mediante su atomización en una corriente de aire caliente. Las condiciones de flujos y temperaturas son críticos para la conservación de las propiedades del producto, así como la homogeneidad y las características del polvo obtenido (López Hernández, 2010). El polímero utilizado es la maltodextrina $DE \leq 20$, un agente encapsulante ideal para la aplicación alimentaria, debido a su baja viscosidad, es incolora, inodora, forma polvos de libre flujo y no enmascara el sabor original del producto (Saénz et al., 2009).

Debido a la mejora en la estabilidad de las características del producto, otorgadas por la microencapsulación, se considera a esta técnica como un factor importante que incide directamente en el incremento del tiempo de vida útil del producto (Aizpurua-Olaizola et al., 2016).

1.1.8. Granulación

La granulación es una operación unitaria que consiste en el aumento del tamaño de partícula de un polvo, formando gránulos. Dentro de los beneficios que aporta el proceso de granulación podemos encontrar: la mejora de la velocidad de disolución del producto, la reducción de la volatilidad del polvo, la mejora de la apariencia física del producto, la mejora de la fluidez y la prevención de la segregación de los componentes del producto (Ochoa et al., 2006).

La granulación puede realizarse mediante el método húmedo o por el método sólido. El método húmedo consiste en el amasado del producto en presencia de agua o algún disolvente orgánico, provocando la aglomeración de las partículas entre sí, el proceso finaliza con una etapa de secado. El método seco consiste en una compresión mecánica del polvo y posteriormente su fragmentación y tamizado según el tamaño de partícula deseado. Como su nombre sugiere, este último no requiere de la presencia de ningún líquido ni solución (Summers & Aulton, 2004).

El proceso de granulación Fakulti Uro Health® emplea el método húmedo. Este favorece significativamente su apariencia física, su fluidez y su velocidad de disolución, impactando positivamente la percepción de calidad por parte del usuario y su facilidad de empleo.

1.1.9. pH

El potencial de Hidrógeno pH es un parámetro químico que indica la concentración de iones H^+ en un medio. Se determina en una escala del 1 al 14, siendo 7 el valor de pH neutro, donde se alcanza un estado de equilibrio entre los iones H^+ y OH^- , si es menor a 7 se considera ácido y si es mayor a 7 se considera alcalino. El pH juega un papel importante en la estabilidad de los alimentos, principalmente por ser un factor de crecimiento microbiano. La mayoría de microorganismos patógenos se desarrollan en ambientes con un pH de 5-8. Los alimentos ácidos tienden a poseer una mayor estabilidad debido a su poca actividad microbiana. En ambientes con un pH inferior a 4,5 se limita el crecimiento de *E. coli*, *Salmonella* y *C. botulinum*, en consecuencia, se inhibe la producción de toxina botulínica (Subramaniam & Wareing, 2016).

En el caso de las antocianinas mantener un pH ácido, asegura la estabilidad del compuesto, reduciendo su probabilidad de degradación (Akhavan Mahdavi et al., 2016).

1.1.10. Contenido de humedad

El contenido de humedad se define como la cantidad de agua que posee un material. Es un parámetro fundamental en la industria alimenticia, ya que es uno de los principales indicadores de calidad. La variación del contenido de humedad puede generar cambios de textura y valor nutricional, además de promover reacciones químicas de deterioro y cambios en la estabilidad molecular, afectando la estabilidad de los alimentos (Subramaniam & Wareing, 2016).

Los alimentos considerados de baja humedad (<10 %) son propensos a absorber humedad del ambiente, por lo que es indispensable un adecuado método de empaque

para evitar la exposición del alimento a la humedad del ambiente asegurando su estabilidad (Ergun et al., 2010).

1.1.11. Actividad de agua

La actividad de agua (a_w) es definida como la relación entre la presión de vapor parcial del agua en la muestra y la presión de vapor parcial del agua pura a una misma temperatura. Junto con la humedad temperatura es considerado como uno de los parámetros más importantes en la industria alimenticia, particularmente en la elaboración y preservación de alimentos. Está estrechamente relacionada a la cinética de las propiedades físicas, químicas y microbiológicas de los alimentos, aún más que el contenido de humedad (Chirife & Fontana, 2020).

Anteriormente se consideraba al contenido de humedad como el indicador de actividad bioquímica y principal responsable de la degradación de los alimentos, sin embargo, al estudiar diferentes muestras de alimentos, se observaban discrepancias en la correlación del contenido de humedad con la actividad microbiológica y enzimática. Fueron los estudios de Scott (1953), los cuales, tomando una perspectiva termodinámica, establecieron el concepto de la disponibilidad del agua para el crecimiento microbiano y la actividad enzimática, acuñando el término de “actividad de agua” (Cardona, 2019).

A través de la actividad de agua se puede determinar la actividad de diferentes fenómenos físicos, químicos y microbiológicos, como se muestra en la Figura 5. Gracias a este parámetro se puede garantizar que para un valor de a_w menor a 0,6 no existe actividad microbiológica (Fontana, 2008).

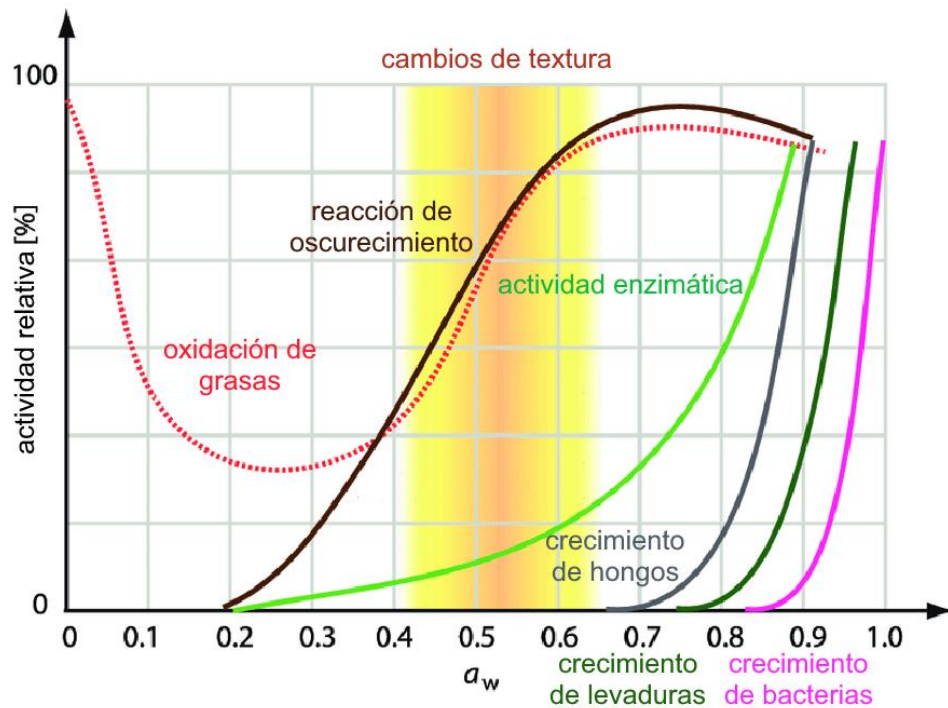


Figura 5. Actividad bioquímica referencial en alimentos según la actividad de agua.

Nota: Modificado de Cardona (2019).

1.1.12. Isoterma de sorción

La actividad de agua y el contenido de humedad de un determinado producto se relacionan de una manera no lineal, siendo esta relación descrita por la isoterma de sorción (IS). La comprensión de las isotermas de sorción ha beneficiado ampliamente la ciencia y tecnología de los alimentos, permitiendo diseñar y optimizar equipos, procedimientos, predicciones de estabilidad, vida útil y el cálculo de cambios de humedad durante el almacenamiento (Andrade et al., 2011).

Se han desarrollado numerosos modelos matemáticos que intentan describir el comportamiento de las isotermas de sorción. Para este efecto se han combinado enfoques empíricos y teóricos que contribuyan a la representación de los fenómenos termodinámicos que intervienen en este proceso. Un modelo que cimentó las bases para los modelos actualmente utilizados es el modelo de Langmuir. Este modelo se basa en la interacción de las fuerzas entre la superficie del producto y el agua condensada en forma de vapor como una capa monomolecular o monocapa.

$$a_w \left(\frac{1}{M_w} - \frac{1}{M_0} \right) = \frac{1}{C M_0} \quad (1)$$

Donde a_w es la actividad de agua, M_w es la humedad de equilibrio, M_0 es la humedad en la monocapa y C es una constante. Debido a que la ecuación de Langmuir considera únicamente la adsorción en monocapa, solamente es aplicable a bajas presiones y altas temperaturas (Alafnan et al., 2021). Al incrementar la presión o disminuir la temperatura comienzan a formarse capas adicionales de agua, considerando esto surgieron nuevos modelos como el modelo BET (Brunauer-Emmett-Teller), basados en el modelo de Langmuir pero introduciendo la idea de capas multimoleculares, interpretando de forma más precisa la influencia de las multicapas en el comportamiento de las isothermas. El modelo BET se describe con la siguiente ecuación:

$$M_w = \frac{M_0 C a_w}{(1-a_w)(1+(C-1)a_w)} \quad (2)$$

En este modelo, C hace referencia a la constante de energía de sorción de calor, que considera la diferencia de la absorción de energía de las moléculas de la primera capa y las demás capas. El modelo BET es capaz de representar la isoterma de sorción en un rango más amplio de presión y temperatura, sin embargo, solo provee resultados adecuados para una a_w inferior a 0,45. En consecuencia se desarrolló el modelo GAB (Guggenheim, Anderson and De Boer) que diferencia el comportamiento termodinámico del agua en las multicapas del comportamiento del agua libre, introduciendo una nueva constante K . Este modelo es el más utilizado en la actualidad y es recomendado por el proyecto European Cost 90, en comparación con el modelo BET representa adecuadamente la curva isoterma para valores de a_w menores a 0,9 por lo que es utilizada para describir una amplia variedad de alimentos y muestras. La ecuación del modelo GAB se encuentra descrita a continuación:

$$M_w = \frac{M_0 C K a_w}{(1-K a_w)(1-K a_w + C K a_w)} \quad (3)$$

Las constantes C y K representan variables termodinámicas:

$$C = c_0 e^{\frac{H_0 - H_n}{RT}} \quad (4)$$

$$K = k_0 e^{\frac{H_n - H_l}{RT}} \quad (5)$$

Para su determinación a partir de datos experimentales, se dispone la ecuación 3 en función de $\frac{a_w}{M_w}(a_w)$, resultando en una ecuación cuadrática:

$$\frac{a_w}{M_w} = \frac{K(1-C)}{M_0 C} a_w^2 + \frac{C-2}{M_0 C} a_w + \frac{1}{M_0 C K} \quad (6)$$

Mediante una regresión cuadrática con los valores experimentales $\frac{a_w}{M_w}$ contra a_w , se obtienen los coeficientes α , β y γ .

$$\frac{a_w}{M_w} = \alpha a_w^2 + \beta a_w + \gamma \quad (7)$$

$$\alpha = \frac{K(1-C)}{M_0 C} \quad (8a)$$

$$\beta = \frac{(C-2)}{M_0 C} \quad (8b)$$

$$\gamma = \frac{1}{M_0 C K} \quad (8c)$$

A partir de los coeficientes encontrados, se puede determinar el valor de M_0 y de las constantes C y K , utilizando las ecuaciones de la Tabla 3, en el caso de la constante K , será necesario resolver la ecuación cuadrática indicada.

Con el valor de las constantes ya asignado, reemplazándolos en la ecuación 3, se obtiene la representación gráfica de la curva isoterma de sorción para el producto analizado. De este modo se pueden interpolar los valores de humedad obtenidos para obtener su correspondiente de actividad de agua (Blahovec & Yanniotis, 2010).

La representación gráfica de las isothermas de sorción puede ser identificada con uno de los 5 tipos de la clasificación de Brunauer (Figura 6), esta clasificación ayuda a determinar las características y el comportamiento de la actividad de agua en función de la humedad. Los tipos de curva más frecuentes son del tipo I y III, siendo el tipo II una mezcla de las características de ambos. Las curvas de tipo IV y V son derivadas de los tipos I y III respectivamente, poseen un comportamiento especial que dificulta su representación matemática, este comportamiento se debe a fenómenos de sorción generados por la superficie porosa de las muestras analizadas (Blahovec & Yanniotis, 2010).

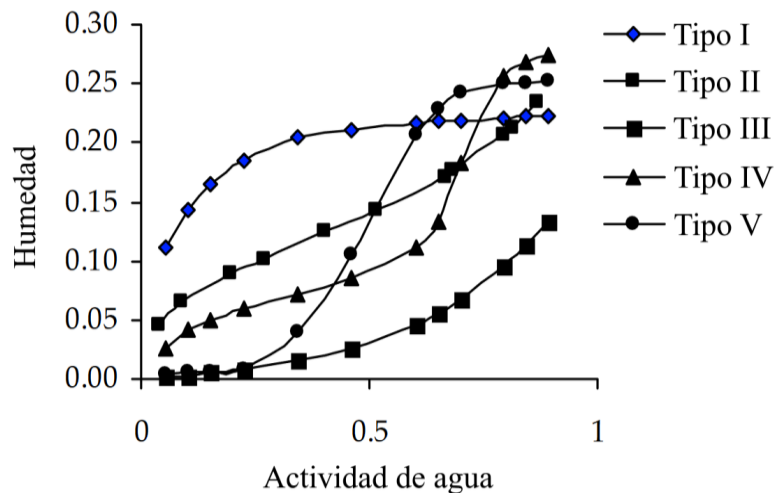


Figura 6. Clasificación de Brunauer para los tipos básicos de curvas de isothermas de sorción.

Nota: Modificado de (Blahovec & Yanniotis (2010)).

La representación de los modelos de BET y GAB para curvas del tipo IV y V resultan limitados y no explican todo el comportamiento de la curva, especialmente en valores elevados de actividad de agua. Para solucionar este problema Blahovec y Yanniotis (2007) proponen un modelo al que llama GAB generalizado. Este método sugiere la consideración de diferentes órdenes para la ecuación GAB, siendo el modelo original de segundo orden.

Según el orden analizado, se realiza una regresión polinómica del respectivo orden. Así como para el modelo GAB convencional se realiza una regresión cuadrática

(ecuación 7), si se desea realizar un modelo GAB generalizado de tercer orden, se realizará una regresión cúbica de $\frac{a_w}{M_w}$ contra a_w (ecuación 9) y así en adelante.

$$\frac{a_w}{M_w} = \alpha a_w^3 + \beta a_w^2 + \gamma a_w + \delta \quad (9)$$

En la Tabla 3 se resumen las ecuaciones para determinar las constantes K , C y M_0 , con los cuales, a partir de los coeficientes obtenidos de las regresiones cuadráticas y cubica correspondientes, se pueden determinar las ecuaciones de la isoterma de sorción según el modelo BET (ecuación 2), el modelo GAB estándar (ecuación 3) y el modelo GAB generalizado de tercer orden (ecuación 3). Nótese que la constante C en el modelo GAB generalizado de tercer orden, se vuelve una variable definida en función de a_w . Esto es también cierto para los modelos GAB generalizados de orden superior.

Tabla 3. Ecuaciones para la determinación de las constantes de los diferentes modelos de sorción.

Constante	BET	GAB	GAB III
K	-	$\alpha + \beta K + \gamma K^2 = 0$	$\alpha + \beta K + \gamma K^2 + \delta K^3 = 0$
C	$C = \frac{3\gamma - \alpha + \beta}{2\gamma}$	$C = \frac{\beta}{\gamma K} + 2$	$C = \frac{K}{M_0(\delta K^2 + \alpha a_w)}$
M_0	$M_0 = \frac{2}{3\gamma - \alpha + \beta}$	$M_0 = \frac{1}{\beta + 2\gamma K}$	$M_0 = \frac{K^2}{2\delta K^3 + \gamma K^2 - \alpha}$

1.1.13. Estabilidad

La estabilidad de un producto alimenticio es definida como el estado en el cual se mantienen sus propiedades físicas, químicas y microbiológicas, sin ningún cambio significativo durante la producción, y almacenamiento. En el caso de productos en forma de polvo se analizan además propiedades físicas como el tamaño de partícula, forma, porosidad, densidad, solubilidad, higroscopicidad, entre otros. (Castro Callejas et al., 2018)

Al analizar la estabilidad de los alimentos funcionales, uno de los factores más importantes a considerar es la estabilidad del principio activo o el componente funcional del mismo. (Zokti et al., 2016) En el caso de Fakulti Uro Health[®], el componente funcional son las antocianinas. Debido a la naturaleza catiónica del flavilio, las antocianinas son más estables en pH ácidos y tienden a degradarse en medios alcalinos. Además del pH, la estabilidad de las antocianinas es afectada por factores como: la temperatura, la luz, el oxígeno, iones metálicos, asociaciones intermoleculares e intramoleculares. Por lo que el aislamiento y la preservación de las antocianinas representa un verdadero reto (Akhavan Mahdavi et al., 2016).

1.1.14. Estudios de Estabilidad

La estabilidad de los componentes de un producto está sujeta a la degradación o pérdida de sus propiedades debido a su exposición a factores físicos y/o químicos presentes en el ambiente o en otros componentes del producto (Subramaniam & Wareing, 2016). Para minimizar el impacto en la estabilidad existen diferentes tecnologías de empaque que aseguran la estabilidad del producto por un tiempo superior.

Los estudios de estabilidad permiten determinar la eficacia de las condiciones de almacenamiento empleadas y verificar la viabilidad del producto a largo plazo.

Los estudios de estabilidad pueden realizarse en dos modalidades: en tiempo real (EETR) y en tiempo acelerado (EETA). Los EETR se realizan manteniendo las condiciones de almacenamiento recomendadas, mientras que en los EETA se someten a condiciones de temperatura y humedad más elevadas para simular el paso del tiempo. Los EETR toman más tiempo, pero presentan resultados más fiables (Magari, 2003).

1.1.15. Estudios de estabilidad en tiempo real

Los estudios de estabilidad en tiempo real (EETR) son un conjunto de pruebas realizadas durante un periodo prolongado de tiempo, para permitir una degradación significativa del producto mientras se encuentra en condiciones reales manteniendo

los parámetros recomendados de almacenamiento (Magari, 2003). La duración de un EETR varía según la estabilidad del producto evaluado, lo suficiente para indicar que no existe una degradación significativa. Adicionalmente se recomienda realizar ensayos que permitan distinguir la degradación y obtener un marco de referencia.

Se recomienda analizar los datos con una frecuencia apropiada para delimitar una clara tendencia y descartar las variaciones en las mediciones ocasionales que no sean causadas directamente por la pérdida de la estabilidad de los parámetros medidos (Bajaj et al., 2012).

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo general

Evaluar de forma preliminar la estabilidad en tiempo real del producto Fakulti Uro Health[®].

1.2.2. Objetivos específicos

- Determinar el comportamiento en el tiempo de los indicadores fisicoquímicos y microbiológicos de calidad del producto Fakulti Uro Health[®] en 8 lotes de producto.
- Analizar la estabilidad del contenido de antocianinas en el producto Fakulti Uro Health[®] a través del tiempo.
- Proponer un tiempo de vida útil para el producto.

CAPÍTULO II METODOLOGÍA

2.1. Materiales y equipos

2.1.1. Materiales

2.1.1.1. Determinación de antocianinas

- Vasos de precipitación
- Probetas
- Papel filtro
- Toallas de papel
- Celdas de vidrio de 10 mm
- Varillas de agitación
- Agua destilada
- Alcohol etílico (96 %)
- HCl (0,1 y 1 mol/l)

2.1.1.2. Determinación de pH

- Vasos de precipitación
- Probetas
- Varillas de agitación
- Agua destilada

2.1.1.3. Determinación de humedad

- Plato de aluminio

2.1.1.4. Determinación de actividad de agua

- Recipiente plástico para muestras

2.1.1.5. Determinación de la isoterma de sorción

- Recipientes herméticos
- Agua destilada
- NaCl

2.1.1.6. Análisis microbiológico

- Vasos de precipitación
- Probetas
- Varillas de agitación
- Tubos de ensayo
- Agua destilada
- Agua peptonada
- Petrifilm (3M)

2.1.1.7. Análisis sensorial

- Vasos de precipitación
- Probetas
- Varillas de agitación
- Agua destilada

2.1.2. Equipos

- Balanza analítica (RADWAG WLC6A2)
- Balanza de Humedad (RADWAG MA 210 X2 A)
- Espectrofotómetro UV-vis (Hanon Instruments i3)

- Potenciómetro (Apera pH800)
- Incubadora (Biobase)
- Medidor de actividad de agua (Meter Aqualab 4TE)

2.1.3. Recursos informáticos

- Microsoft Excel
- UV Basic
- Statgraphics Centurion 19
- TI-Nspire™ CX CAS Computer Software

2.2. Métodos

2.2.1. Selección de muestras

Se seleccionarán 8 muestras correspondientes a los lotes 04821, 25320, 02720, 01119, 00419, 34718, 28218 y 20718 de Fakulti Uro Health®. Sus fechas de elaboración se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Fecha de elaboración para cada lote a utilizar.

Lote	Fecha de elaboración
L20718	26/07/18
L28218	09/10/18
L34718	13/12/18
L00419	04/01/19
L01119	11/01/19
L02720	27/01/20
L25320	09/09/20
L04821	17/02/21

2.2.2. Determinación de antocianinas

Para la cuantificación de antocianinas se utilizarán 2 métodos: el método rápido para la cuantificación de antocianinas totales utilizado por (Abdel-Aal & Hucl, 1999 y el método del pH diferencial (Garcia-Vaquero & Rajauria, 2018).

Para ambos métodos se realizará una misma preparación de la muestra. Se disuelven 5 g de muestra en 50 ml de agua destilada y posteriormente se añaden 95 ml de etanol (96 %). Se procederá a calentar la muestra a 37 °C por 1 hora y a filtrar la solución resultante hasta obtener una muestra sin turbidez. Se ajustará la solución filtrada a pH 1,0 con HCl 1 mol/l. Se realizará un barrido espectral para determinar la longitud de onda con mayor absorción (λ_{\max}).

2.2.2.1. Método rápido para la determinación de antocianinas totales:

Se mide la absorbancia de la muestra ajustada a pH 1 a λ_{\max} en un espectrofotómetro (Hanon), utilizando agua destilada como blanco. Se determina la concentración de antocianinas totales (CAT) mediante la siguiente ecuación:

$$C = \frac{A \times vol \times PM \times FD \times 100}{\epsilon \times l \times ms} \quad (10)$$

Donde C es la CAT (mg Cn3G/ 100g PS); A es la absorbancia obtenida a λ_{\max} ; vol el volumen total de disolvente utilizado en ml; PM el peso molecular de la cianidina-3-glucósido (449,2 g/mol); ϵ la absortividad molar de la cianidina-3-glucósido (Cn3G) (25965 l /mol cm) (Abdel-Aal & Hucl, 1999); l es la longitud del paso de luz en cm; ms el peso en seco de la muestra analizada en g y FD el factor de dilución (volumen de muestra/volumen total). (Subramaniam & Wareing, 2016)

2.2.2.2. Método del pH diferencial

Se toman 2 alícuotas del extracto filtrado, la primera de las cuales es ajustada a pH 4,5 con HCl 0,1 mol/l en caso de ser necesario, la segunda alícuota es ajustada a pH 1,0

con HCl 1 mol/l. Se determina la absorbancia de ambas alícuotas a λ_{\max} y a 700 nm en un espectrofotómetro (Hanon). La absorbancia final se calcula a partir de:

$$A = (A_{\lambda_{\max}} - A_{700})_{pH\ 1,0} - (A_{\lambda_{\max}} - A_{700})_{pH\ 4,5} \quad (11)$$

El valor de CAT se calcula con la ecuación 10, considerando la absorbancia final obtenida con la ecuación 11. En este caso se considerará un coeficiente de absorptividad molar (ϵ) de 26900 l cm⁻¹ mol/l⁻¹ (Garcia-Vaquero & Rajauria, 2018).

2.2.2.3. Cinética de degradación

Se evaluará la correlación de los modelos de regresión de una cinética de orden 0 (ecuación 12) y de orden 1 (ecuaciones 13 y 14), para calcular la constante de degradación k y el tiempo de vida media $t_{1/2}$. El criterio de selección del modelo estadístico será el coeficiente de determinación R^2 y el error estándar S.

$$C = C_0 - k * t \quad (12)$$

$$C = C_0 * e^{-k*t} \quad (13)$$

$$\ln C = \ln C_0 - k * t \quad (14)$$

El tiempo de vida media $t_{1/2}$ se calculará mediante la ecuación 15:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \quad (15)$$

2.2.2.4. Límite de degradación

La especificación del producto no establece un límite mínimo para el contenido de antocianinas, de hecho la FDA no regula el contenido, ni la dosificación de los componentes en suplementos alimenticios, en consecuencia tampoco regulan los límites permitidos ni las tasas de degradación de los mismos (FDA, 2022).

2.2.3. Determinación de pH

Se realiza una solución con la concentración recomendada de consumo del producto (5 % m/v). Se disuelven 2,5 g en 50 ml de agua destilada y se mide el pH en un potenciómetro (Apera). Se realizarán 3 réplicas registrando el pH una vez la lectura se haya estabilizado. Se considera como límite aceptable de calidad un pH de 2,8 – 3,8 (Especificación del producto).

2.2.4. Determinación de humedad

Se colocan 3 g de muestra en una balanza de humedad (RADWAG) y se realiza un programa de secado con un perfil de calentamiento estándar y un criterio de finalización de 1 mg en 10 s. Se realizan ensayos por triplicado. Se considera como límite aceptable de calidad un porcentaje de humedad menor o igual a 10 % (Especificación del producto (Vera Zambrano et al., 2019)).

2.2.5. Análisis de actividad de agua

2.2.5.1. Determinación de actividad de agua

Se coloca aproximadamente 1 g de muestra en el recipiente plástico para muestras, tratando que la muestra cubra por completo la superficie del recipiente. Se espera un periodo de 30 minutos para que la muestra se estabilice con el ambiente. Se tapan los envases y se los introduce en el equipo de medición de actividad de agua (AQUALAB). Se inicia el proceso y se espera hasta que los resultados se estabilicen. Se realizarán 3 réplicas de cada ensayo.

2.2.5.2. Determinación de la isoterma de sorción

Para la determinación de la isoterma de sorción se emplea el método sugerido por Zhang (2016), el método AWM que consiste en la variación acelerada del contenido de agua de una muestra a diferentes niveles. Para asegurar una correcta distribución de la humedad en la muestra se realiza un proceso donde se llevan todas las muestras con

diferentes contenidos de humedad a un estado homogéneo en términos de temperatura y humedad ambiental.

Para esto, se toman diferentes alícuotas de una misma muestra que serán sometidas a diferentes condiciones para variar su contenido de humedad y construir un perfil de diferentes humedades. Para disminuir el contenido de humedad se lleva la alícuota a 45 °C por 30 minutos. Se mantiene una alícuota con las condiciones de humedad iniciales. Y para aumentar el nivel de humedad se almacenan las alícuotas con una solución saturada de NaCl en un recipiente sellado herméticamente como muestra la Figura 7, por diferentes intervalos de tiempo (Zhang et al., 2016).

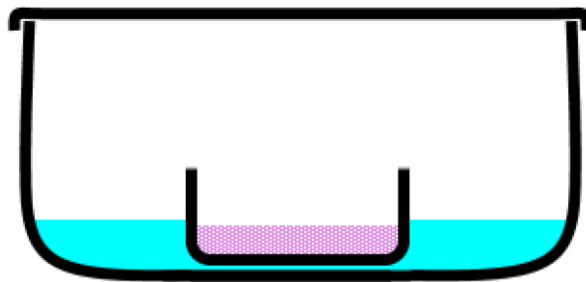


Figura 7. Diagrama del proceso de humidificación de las muestras.

Nota: El color celeste representa la solución salina y el color rosa representa la muestra.

Las muestras ya acondicionadas necesitan ser almacenadas y selladas individualmente durante un periodo de 5 días para completar la redistribución de la humedad en toda la muestra. Una vez finalizado este proceso las muestras alcanzan un estado de equilibrio hidrostático y se asegura un resultado confiable en la determinación de a_w (Schmidt & Lee, 2012).

Se registra la humedad y la temperatura a la que las muestras fueron estabilizadas. Finalmente se procede la determinación de humedad y actividad de agua (Zhang et al., 2016).

Con los datos obtenidos de humedad y actividad de agua, se modelará la isoterma de sorción mediante los modelos BET, GAB estándar y GAB generalizado de tercer orden. Realizando una regresión cuadrática (ecuación 8) y una regresión cúbica

(ecuación 9) de $\frac{a_w}{M_w}$ contra a_w , se determinan las constantes (Tabla 3) y se reemplazan en la ecuación 2 para el modelo BET y en la ecuación 3 para los modelos GAB convencional y GAB generalizado de tercer orden. Con las ecuaciones se representarán gráficamente las curvas isotermas de sorción (Blahovec & Yanniotis, 2010).

Se determinará el mejor modelo considerando el error estándar de estimación S y mediante la ecuación de la isoterma de sorción, se interpolan los valores de humedad obtenidos experimentalmente para determinar los valores correspondientes de actividad de agua.

Se considera como límite aceptable de calidad un valor inferior a 0,6 que es el límite de proliferación microbiológica (Fontana, 2008).

2.2.6. Análisis microbiológico

El análisis microbiológico es realizado mediante placas Petrifilm. Se realizan 4 ensayos por cada muestra: microorganismos aerobios mesófilos, coliformes y *Escherichia coli*, mohos y levaduras y *Staphilococcus aureus*. Se pesa 1 g de muestra en condiciones estériles y se introduce en una bolsa hermética. Se mezcla la muestra con 9 ml de medio de cultivo (agua peptonada estéril), asegurando que toda la muestra se encuentre disuelta. Se realiza una dilución 1:10 tomando una alícuota de 1 ml y depositándola en un tubo con 9 ml de agua destilada estéril. Obteniendo una dilución final de 1:100. Se homogeniza el tubo y se coloca 1 ml de solución en cada placa Petrifilm. Se incuba a 36 °C durante el tiempo establecido para cada ensayo y se cuenta el número de colonias formadas. Para la determinación de la concentración de microorganismos en UFC/g se utiliza la siguiente ecuación:

$$UFC/g = \frac{N.de\ colonias * FD}{volúmen\ sembrado} \quad (16)$$

Se consideran los límites establecidos por la INEN 2983 para complementos nutricionales tipo II expresados en la Tabla 5.

Tabla 5. Parámetros microbiológicos de calidad de Fakulti Uro Health®

Requisito	Unidad	Límite
Aerobios totales, máx.	UFC/g	1 x 10 ⁴
Mohos y levaduras, máx.	UFC/g	1 x 10 ³
Enterobacterias, máx.	UFC/g	1 x 10 ²
<i>Escherichia coli</i> , máx.	-	ND
<i>Staphylococcus aureus</i> , máx.	-	ND

2.2.7. Análisis sensorial

Las propiedades organolépticas son analizadas en función de los parámetros de calidad del producto, mostrados en la Tabla 6 (Especificación del producto). La conformidad de las características organolépticas con sus respectivos parámetros de calidad es evaluada en las muestras en su forma de polvo y en su forma reconstituida en agua. Se establecen siete niveles de conformidad según la escala de Likert expuesta en la Tabla 7. La evaluación es realizada con la ayuda de personal calificado, del área de control de calidad.

Tabla 6. Parámetros organolépticos de calidad para Fakulti Uro Health®

Requisito de calidad	Criterio de aceptación
Color del polvo	Rosado característico
Apariencia del polvo	Granulado, fluido, homogéneo, sin grumos
Solubilidad del polvo	Solubilización rápida sin esfuerzo
Color del producto reconstituido en agua	Rojo característico
Olor del producto reconstituido en agua	Característico a frutos rojos
Sabor del producto reconstituido en agua	Característico a frutos rojos

Tabla 7. Escala de Likert para la conformidad de parámetros organolépticos de calidad.

Escala de Conformidad	
7	Cumple ampliamente con los parámetros de calidad
6	Cumple satisfactoriamente con los parámetros de calidad
5	Cumple moderadamente con los parámetros de calidad
4	Cumple marginalmente con los parámetros de calidad
3	No cumple marginalmente con los parámetros de calidad
2	No cumple con los parámetros de calidad
1	Lejos de cumplir con los parámetros de calidad

2.2.8. Análisis estadístico

Los análisis y mediciones son realizados periódicamente cada mes y cada 6 meses en el caso de la determinación de antocianinas. Cada ensayo es realizado por triplicado, según la disponibilidad de muestras y reactivos, y promediados.

Para el pronóstico de la vida útil según cada parámetro se analizan los datos mediante la función estudio de estabilidad en el software Statgraphics Centurion 19. Se considera un nivel de confianza del 95 % y se toma en cuenta el percentil 90 para el pronóstico del tiempo de vida útil. Para cada parámetro se evalúan diferentes modelos de regresión y se selecciona aquel que se ajuste mejor a los datos experimentales utilizando como criterio aquel que posea un mayor coeficiente de determinación (R^2).

Cada lote es considerado independientemente de modo que para el modelo de regresión el intercepto varía para cada lote, mientras que los demás coeficientes se mantienen constantes para todos los lotes analizados. Esto se realiza debido a la variabilidad de las materias primas empleadas y de las condiciones de elaboración y empaque, que influyen en las condiciones iniciales de cada lote.

Para determinar si existe una variabilidad significativa de una variable respecto al tiempo se realiza un análisis de varianza con un 95 % de confianza y se analiza el estadístico P , si este es menor a 0,05 se considera que la variable analizada varía significativamente a través del tiempo y es posible estimar un tiempo de vida útil. Si

el estadístico P resulta mayor a 0,05, se concluye que el parámetro no permite la determinación de un tiempo de vida útil.

Para determinar diferencias significativas entre 2 muestras se realiza una prueba t de Student con un intervalo de confianza del 95 % (Serris & Biliaderis, 2001).

2.2.9. Determinación de tiempo de vida útil

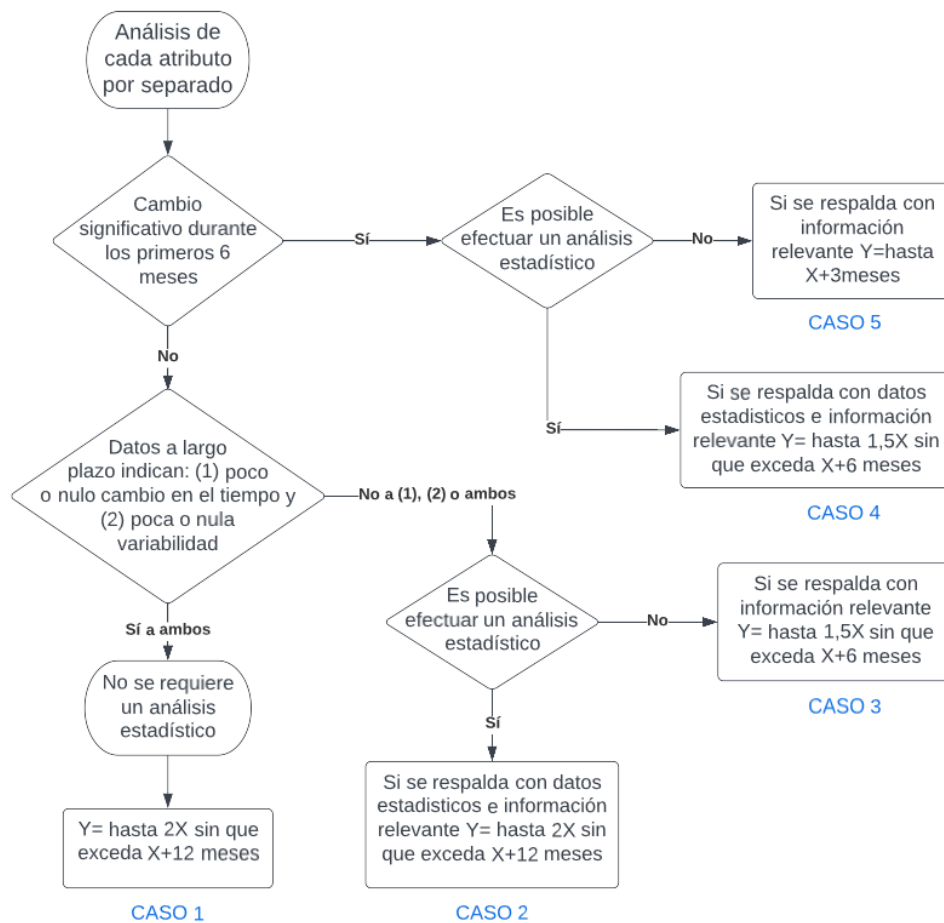


Figura 8. Árbol de decisiones para la determinación del tiempo de vida útil de cada parámetro.

Nota: Modificado de ACCSQ-PPWG (2005)

El tiempo de vida útil se determinará individualmente para cada parámetro analizado. Se toma en cuenta el protocolo propuesto por el Grupo de Trabajo de Productos Farmacéuticos del Comité Consultativo para Estándares y Calidad de la ASEAN (ACCSQ-PPWG, 2005), donde se establece un procedimiento para la determinación

del tiempo de vida útil para cada parámetro, en función del tiempo de vida útil propuesto (Y) y el periodo analizado en tiempo real (X), siguiendo las condiciones expuestas en el árbol de decisiones (Figura 8). Se establecen 5 posibles casos de análisis. El primer bloque de decisión discrimina los parámetros según la magnitud del cambio observado durante los primeros 6 meses. Se considera un cambio significativo la variación de un 5 %

El tiempo de vida útil general del producto será determinado a partir del parámetro cuyo tiempo de vida útil sea menor y represente un deterioro más temprano. Se considerarán también los tiempos de vida útil calculados mediante la extrapolación de los modelos de regresión. De este modo se asegura que los demás parámetros mantengan las condiciones de calidad e inocuidad alimentaria durante el tiempo de vida útil establecido (Subramaniam & Wareing, 2016).

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis y discusión de los resultados

3.1.1. Condiciones de almacenamiento

Las muestras analizadas se encontraban almacenadas en una habitación sin exposición directa del sol, a una temperatura de $20,2\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 4$ y una humedad relativa de $58\% \pm 5$. Estos valores de encuentran en línea con las condiciones de almacenamiento recomendadas.

3.1.2. Determinación de antocianinas

Para la determinación de antocianinas, en primera instancia se determinó la longitud de onda con la máxima absorbancia (λ_{max}) en el extracto de antocianinas a pH 1, siendo este valor 531,2 nm (Figura 9a). Este valor se encuentra dentro de los valores experimentales para glucósidos de cianidina y delphinidina, reportados por diferentes estudios, recopilados por Giusti & Wrolstad (2001), que abarcan el rango de 508,5-547 nm.

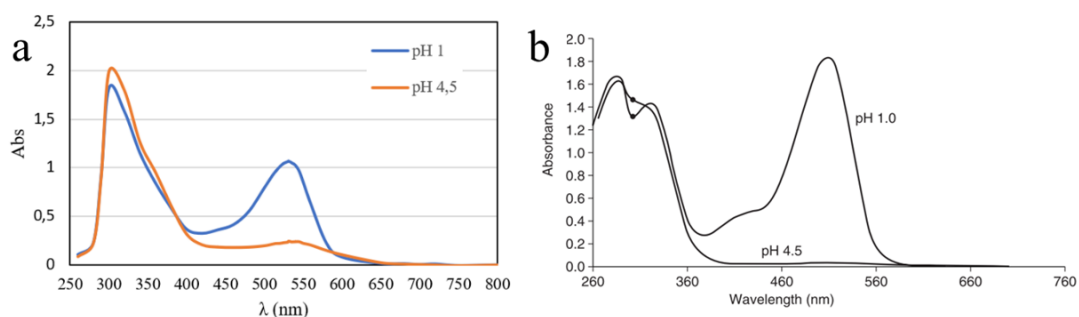


Figura 9. Espectro de la absorbancia de una muestra de extracto de antocianinas a pH y pH 4,5.

Nota: En la izquierda (a) se encuentra el gráfico construido con los valores experimentales obtenidos. En la derecha (b) se encuentra el gráfico elaborado por Giusti & Wrolstad (2001).

Se analizaron las muestras extraídas y equilibradas a pH 1 y pH 4,5, midiendo sus absorbancias a λ_{\max} (531 nm) y a 700 nm. Utilizando las ecuaciones 10 y 11, se obtuvo la CAT para cada muestra, según los dos métodos propuestos (Tabla 8).

Tabla 8. Cuantificación de antocianinas totales para lotes en diferentes tiempos.

LOTE	MESES	CAT (mg Cn3G/ 100g)	
		M. rápido	M. pH diferencial
L20718	33	45,791	30,009
	40	44,100	29,585
L28218	31	90,439	60,677
	38	91,917	59,763
L34718	29	61,335	35,820
	36	57,728	35,482
L00419	28	99,861	74,905
	35	93,314	70,619
L01119	28	113,557	81,718
	35	103,655	80,782
L02720	16	105,809	76,481
	22	103,904	76,906
L25320	8	56,920	38,457
	14	56,765	36,113
L04821	3	69,005	52,179
	9	69,538	47,146

En promedio el CAT en todas las muestras fue de 79,249 mg Cn3G/100 g según el método rápido y 55,415 mg Cn3G/100 g según el método del pH diferencial. Considerando la degradación, estos valores son comparables con el resultado obtenido por Ortiz (2018), quién usó el método rápido y obtuvo 122,95 mg Cn3G/100 g en un extracto de antocianinas microencapsulado.

Los resultados obtenidos mediante ambos métodos son visualmente diferentes entre sí (Figura 10). Realizada una prueba *t* para comparar las medias y con un 95 % de confianza se obtuvo un estadístico *t* de 3,0975 y un *P* de 0,0042, este último al ser menor de 0,05 indica que existe una diferencia significativa entre los resultados de ambos métodos. Los valores de CAT obtenidos mediante el método del pH diferencial son menores debido a la naturaleza del método que es más complejo al considerar la absorbancia a diferentes longitudes de onda y compararlas con las absorbancias obtenidas a pH 4,5. Como se muestra en la ecuación 11, el valor de absorbancia

utilizado para el cálculo toma en cuenta las absorbancias que corresponden a interferencias en la determinación. Por esto, se estima que los valores superiores obtenidos por el método rápido no discriminan las interferencias que se encuentran en la muestra y son identificables a λ_{\max} , además de la utilización de un valor diferente de ϵ . Como se observa en la Figura 9a, la muestra a pH 4,5 contiene trazas detectables a λ_{\max} , y ya que se conoce que a ese pH las antocianinas son incoloras y prácticamente indetectables por espectrofotometría se presume que esa porción corresponde a interferencias generadas por la maltodextrina. Compárese la Figura 9a con 9b.

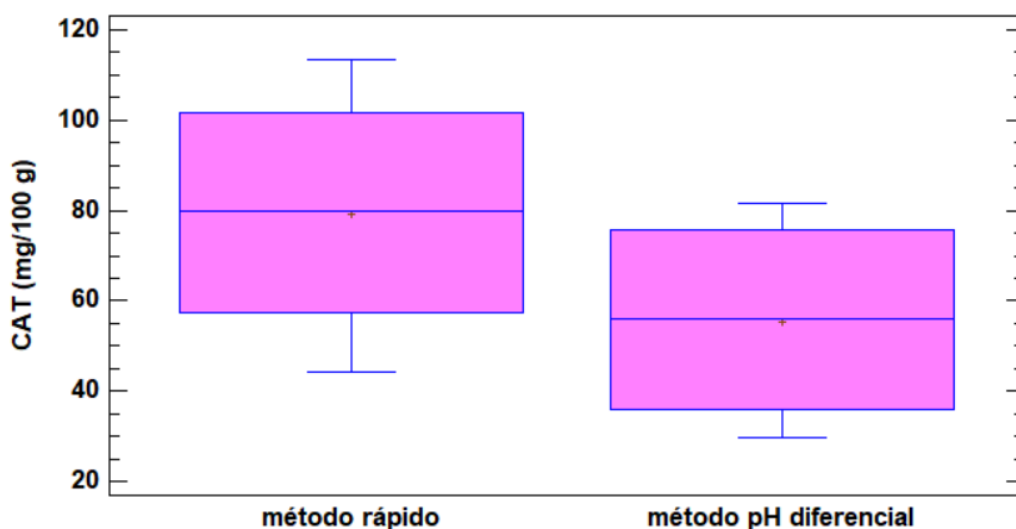


Figura 10. Diagrama de cajas y bigotes de los valores de CAT obtenidos por los métodos rápido y de pH diferencial.

En consecuencia, se determina que el método del pH diferencial es el método como adecuado y se tomarán en cuenta sus valores para los análisis posteriores.

Con los datos de CAT, obtenidos por el método de pH diferencial, se realizaron dos modelos de regresión: un modelo lineal para una cinética de orden 0 (Figura 11) y un modelo logarítmico para una cinética de orden 1 (Figura 12). El coeficiente de determinación R^2 y el error estándar estimado S se muestran en la Tabla 9. Ambos valores de R^2 muestran un buen ajuste de los datos experimentales a los modelos propuestos, sin embargo, el parámetro S, indica que el error estándar es significativamente menor en el modelo logarítmico de orden 1.

Tabla 9. Parámetros estadísticos de los modelos de regresión de antocianinas.

Parámetro	Orden	
	0	1
Ecuación	$80,793 - 0,254952 t$	$84,78 * e^{-0,00486678 t}$
R ²	99,752 %	99,762 %
S	1,42519	0,02678

De modo que se elige el modelo cinético de primer orden para representar la degradación de antocianinas en el producto. Nayak (2010) y Zapata (2016) coinciden en utilizar un modelo de primer orden para el mismo efecto en estudios de estabilidad de antocianinas.

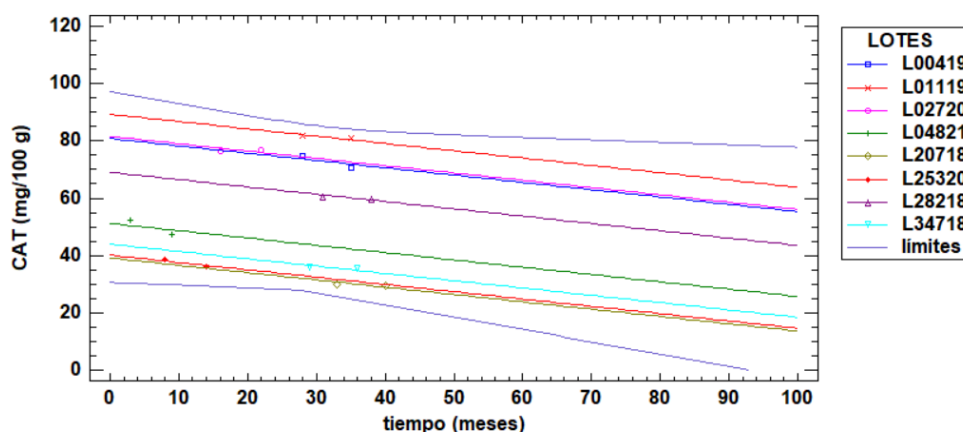


Figura 11. Modelo de regresión lineal para la evolución del CAT en el tiempo.

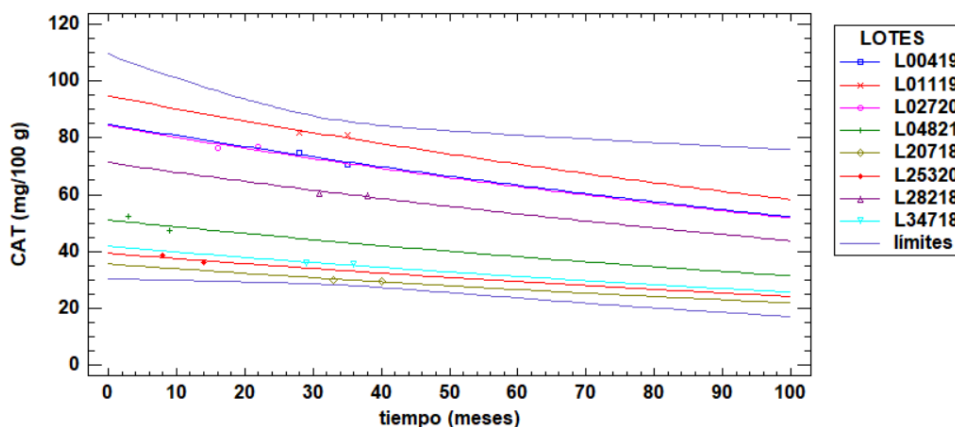


Figura 12. Modelo de regresión logarítmica para la evolución del CAT en el tiempo.

Utilizando el modelo de primer orden se obtuvo la tasa de degradación k y el tiempo de vida media (Tabla 10).

Tabla 10. Valores de k y $t_{1/2}$ para la degradación de antocianinas.

Parámetro	meses	días
k	0,004867 meses ⁻¹	1,5593 x10 ⁻⁴ días ⁻¹
$t_{1/2}$	148 meses	4445 días

Se realizó un análisis de varianza del CAT en el tiempo, encontrando un valor P de 0, que al ser menor a 0,05, significa que sí varía significativamente en el tiempo y en consecuencia la constante k obtenida posee un valor significativo. La tasa de degradación de antocianinas k (1,5593 x10⁻⁴ días⁻¹) es comparable con los valores obtenidos por Zapata (2016) que obtuvo valores de k entre 8,3 x10⁻³ y 2,3 x10⁻³ días⁻¹, Nayak y Rastogi (2010) reportaron valores de k entre 1,68 x10⁻³ y 0,62 x10⁻³ días⁻¹. En el primer caso se analizan las antocianinas de un jugo sin microencapsular, durante un periodo de 5 meses y en el segundo caso se analizan antocianinas microencapsuladas por un periodo de 3 meses, en comparación con el periodo de 40 meses de análisis en este proyecto.

Como se observa en la Figura 13a, los datos obtenida de Zapata (2016) muestran que la mayor parte de la degradación de antocianinas se da durante el primer mes, este efecto se ve disminuido por la microencapsulación según se muestran los datos de Nayak (2010) (Figura 13b). Se observa que la degradación de las antocianinas es mayor durante las primeras semanas y después se estabiliza, ralentizando su degradación. Este comportamiento se explica perfectamente por el modelo logarítmico de una cinética de primer orden. Para comparar de mejor manera los datos obtenidos se recomienda realizar un estudio más exhaustivo de la degradación en los primeros días del producto.

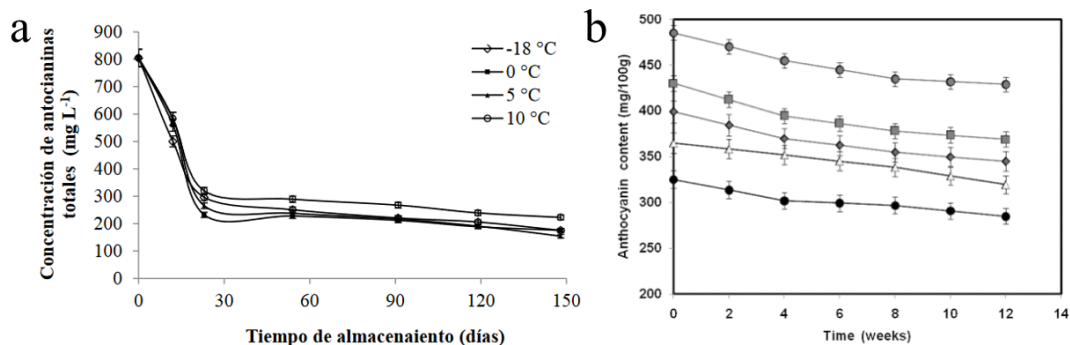


Figura 13. Cinética de degradación de antocianinas determinada por otros autores.

Nota: A la izquierda (a) gráfico de Zapata (2016) y a la derecha (b) gráfico de Nayak y Rastogi (2010).

3.1.3. Determinación de pH

Los valores de pH obtenidos se muestran en la Tabla 11. Todos los valores se encuentran dentro del límite de calidad especificado (2,8 – 3,8). Se realizó una regresión utilizando el modelo $y^{-1} x^2$ (Figura 14), que mostró una mejor correlación con los datos obtenidos respecto a otros modelos de regresión, considerando el coeficiente R^2 (Tabla 12).

Se realizó además un análisis de varianza de los valores de pH en el tiempo, considerando los efectos del lote como una variable fija. Como resultado el valor de P obtenido para el modelo fue 0,0247, al ser menor que 0,05 se considera que el pH cambia significativamente a través del tiempo, sin embargo, debido al bajo nivel de correlación de los datos (48,15 %) se considera que la pendiente del modelo de regresión no es suficientemente significativa para estimar un tiempo de vida útil con el 95 % de confianza.

La casi nula variabilidad que muestra este parámetro puede deberse a la baja actividad de agua, que en el rango de 0,3 – 0,4 apenas permite actividad enzimática que pueda degradar químicamente el producto.

Tabla 11. Determinación de pH para lotes en diferentes tiempos.

Lote	Meses	pH
L20718	0	3,20
	32	3,14
	33	3,24
	34	3,26
	40	3,25
L28218	0	3,30
	29	3,35
	31	3,37
	38	3,36
L34718	0	3,20
	27	3,38
	29	3,26
	36	3,40
L00419	0	3,30
	27	3,35
	28	3,36
	29	3,40
	35	3,40
L01119	0	3,20
	26	3,33
	28	3,36
	35	3,35
L02720	0	3,50
	14	3,33
	16	3,36
	22	3,29
L25320	0	3,60
	7	3,28
	8	3,31
	14	3,33
L04821	0	3,40
	3	3,39
	9	3,34

Tabla 12. Comparativa de modelos de regresión alternativos para el pH.

Modelo	R ²
$y^{-1} x^2$	48,15 %
$\log(y) x^2$	46,95 %
$\sqrt{y} x^2$	46,34 %
x^2	45,72 %
y^{-1}	44,19 %
exponencial	43,01 %
lineal	41,81 %
\sqrt{x}	38,99 %

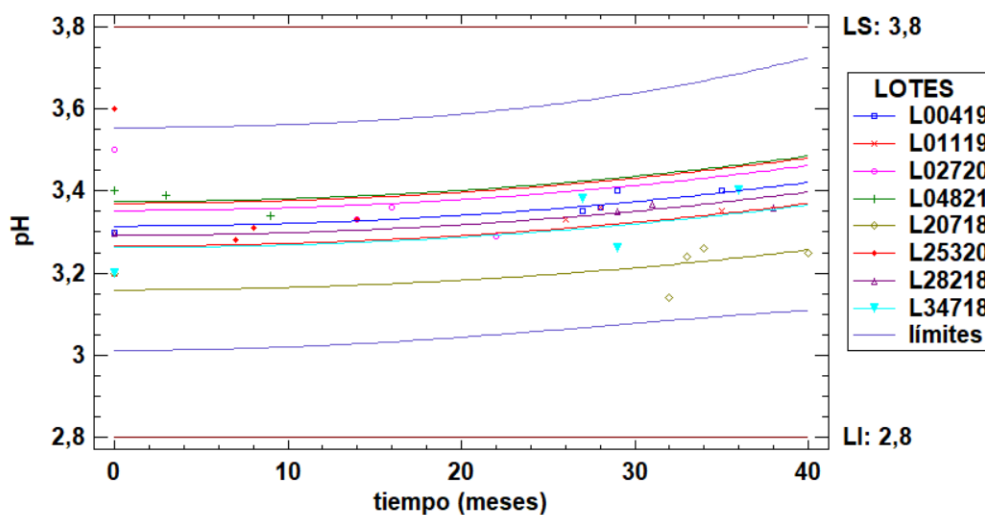


Figura 14. Modelo de regresión $y^{-1} x^2$ para la evolución de la pH en el tiempo y pronóstico de su vida útil.

3.1.4. Determinación de humedad

Los valores de humedad determinados se muestran en la Tabla 13, encontrando que todos los valores se encuentran por debajo del límite establecido (10 %). Se utilizó un modelo de regresión lineal (Figura 15) que demostró un coeficiente R^2 superior al de otros modelos alternativos (Tabla 14). Se realizó un análisis de varianza y se determinó que el estadístico P es de 0, por lo que se determina que la humedad varía significativamente a través del tiempo.

Como muestra la Figura 15, el producto muestra una clara tendencia de aumento de la humedad en el tiempo. Se calcula un tiempo de vida útil de 81,73 meses para este parámetro, valor muy por encima del tiempo de vida útil registrado para este producto (24 meses).

Además de la considerable vida útil en este parámetro, como se muestra más adelante en el análisis de actividad de agua, una humedad de 10 % corresponde a una actividad de agua de 0,436, muy por debajo del límite de crecimiento microbiano y con apenas actividad enzimática.

Tabla 13. Determinación de humedad para lotes en diferentes tiempos.

Lote	Meses	Humedad (%)
L20718	0	4,050
	32	6,416
	33	6,473
	34	6,065
	40	6,444
L28218	0	4,850
	29	5,213
	30	6,101
	31	5,787
	38	5,919
L34718	0	5,755
	27	6,345
	29	6,216
	36	6,286
L00419	0	5,540
	27	6,668
	27	6,695
	28	7,162
	29	6,723
	35	6,998
L01119	0	5,850
	26	6,868
	28	6,917
	35	6,864
L02720	0	5,200
	14	5,553
	16	5,407
	22	5,686
L25320	0	6,200
	7	6,492
	8	6,647
	14	6,761
	21	6,514
L04821	0	4,099
	3	4,102
	9	4,222
	16	4,233

Tabla 14. Comparativa de modelos de regresión alternativos para la humedad.

Modelo	R ²
lineal	91,62 %
y ²	91,60 %
Exponencial	91,22 %
√x	90,85 %
x ²	90,45 %
y ⁻¹	90,45 %

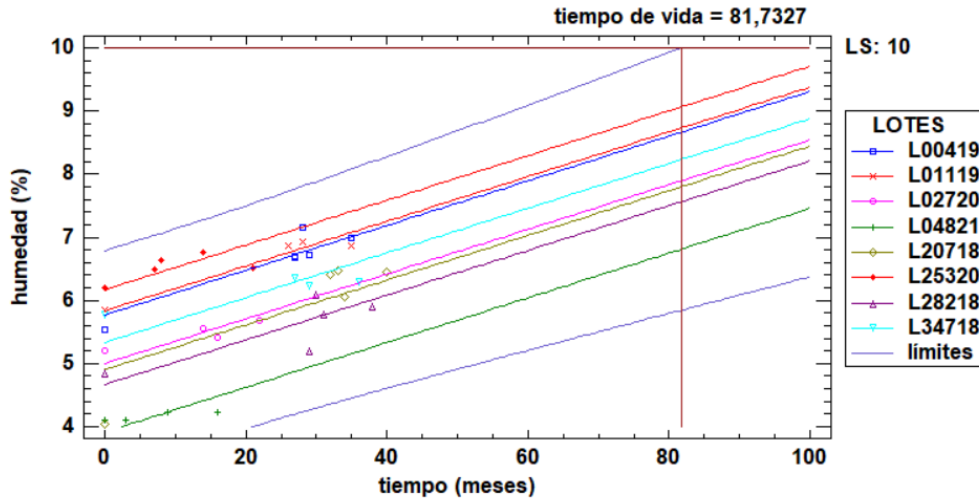


Figura 15. Modelo de regresión lineal para la evolución de la humedad en el tiempo y pronóstico de su vida útil.

3.1.5. Isoterma de sorción

Se separaron 9 alícuotas para el acondicionamiento de humedad según el método AWM y fueron tratadas como indica la Tabla 15.

Tabla 15. Tratamientos de acondicionamiento de humedad aplicados para la determinación de la isoterma de sorción.

Alícuota	Tratamiento
H1	Secado a 45 °C por 30 min
H2	-
H3	Humidificación por 6 horas
H4	Humidificación por 12 horas
H5	Humidificación por 24 horas
H6	Humidificación por 3 días
H7	Humidificación por 5 días
H8	Humidificación por 8 días
H9	Humidificación por 12 días

Se determinó la humedad y la actividad de agua de cada alícuota y se consideró además el valor teórico del agua destilada. Los valores se muestran en la Tabla 16.

Tabla 16. Valores de humedad y actividad de agua para las alícuotas acondicionadas.

Alícuota	M_w	a_w
H1	3,400	0,3275
H2	5,417	0,3511
H3	6,172	0,3521
H4	8,156	0,3747
H5	10,136	0,4247
H6	22,760	0,5465
H7	27,283	0,5602
H8	50,396	0,6100
H9	59,734	0,6341
A	100	1

La representación gráfica de los valores obtenidos se muestra en la Figura 16. Se identifica que el comportamiento de la curva coincide con una curva del tipo V según la clasificación de Brunauer. Se observa que la pendiente crece a la mitad de la escala de a_w , a diferencia de los otros tipos de curva, como la de tipo I con la pendiente observable a valores de a_w bajos, los tipos II y III con un incremento uniforme a lo largo del dominio de a_w o de tipo IV con una pendiente observable a valores altos de a_w (Blahovec & Yanniotis, 2010).

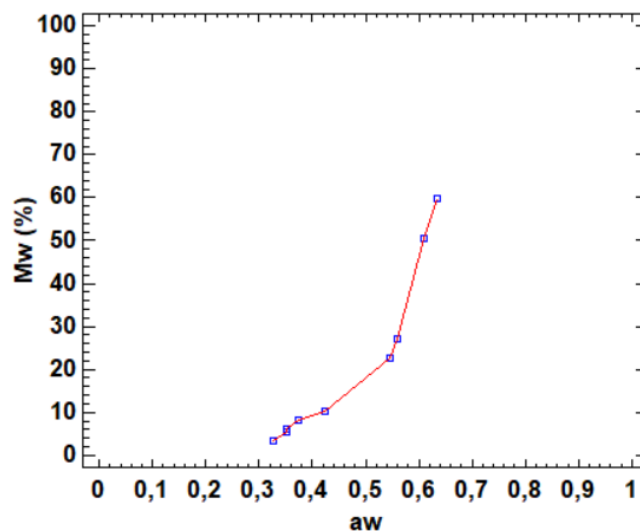


Figura 16. Representación de los valores experimentales para la isoterma de sorción.

Los valores obtenidos fueron analizados según el modelo BET y el modelo GAB, para este efecto se realizó una regresión cuadrática de $\frac{a_w}{M_w}(a_w)$ (Figura 17), que obtuvo un R^2 de 88,642 %. Al ser una curva de tipo V, se aplicó también el modelo BET generalizado de tercer orden, por lo que se realizó una regresión cúbica de $\frac{a_w}{M_w}(a_w)$ (Figura 17) con un R^2 de 94,99 %. A partir de los coeficientes de cada regresión (Tabla 17) se determinaron las constantes M_0 , C y K (Tabla 18). De este modo se obtienen las ecuaciones de la isoterma de sorción (Tabla 19).

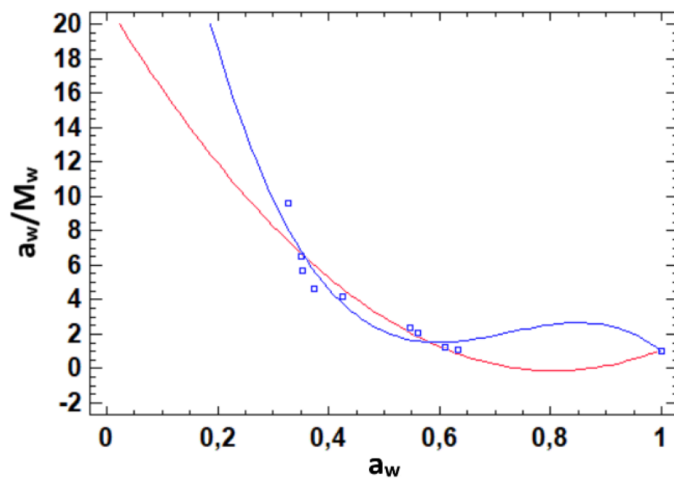


Figura 17. Modelos de regresión cuadrática y cúbica de $\frac{a_w}{M_w}(a_w)$.

Tabla 17. Coeficientes de las ecuaciones de regresión cuadrática y cúbica.

Coeficiente	R. cuadrática	R. cúbica
α	32,7547	-140,306
β	-52,8334	304,27
γ	21,1761	-213,178
δ	-	50,1871

Tabla 18. Constantes para la determinación de la curva isoterma de sorción según los diferentes modelos.

Constante	BET	GAB	GAB III
K	-	1,1504	0,968104
C	-0,520868	-0,168776	$\frac{-0,232518}{a_w - 0,335243}$
M_0	-0,090662	-0,243217	0,029675

Tabla 19. Ecuaciones de la isoterma de sorción según los diferentes modelos.

Modelo	Ecuación $M_w(a_w)$	S
BET	$M_w = \frac{0,03105 a_w}{(a_w - 1)(a_w - 0,657519)}$	0,5953
GAB	$M_w = \frac{0,030545 a_w}{(a_w - 0,868948)(a_w - 0,744161)}$	0,0589
GAB III	$M_w = \frac{-0,007127 a_w}{(a_w - 1,03295)(a_w^2 - 1,13567 a_w + 0,346288)}$	0,0819

En la Figura 18 se encuentran representadas las curvas de la isoterma de sorción según cada modelo. El modelo BET representó adecuadamente la parte correspondiente a una baja actividad de agua y tal como menciona Andrade (2011), este modelo no es el más adecuado para representar valores de actividad de agua superiores a 0,45. El modelo GAB hizo un mejor trabajo obteniendo el menor error estándar de los 3, sin embargo, al igual que el modelo BET no fue capaz de representar la totalidad del dominio de actividad de agua. Para suplir esta limitación se realizó el análisis con el modelo GAB generalizado de tercer orden que, aunque sí logra representar la totalidad del dominio de actividad de agua, se aleja significativamente de los valores experimentales.

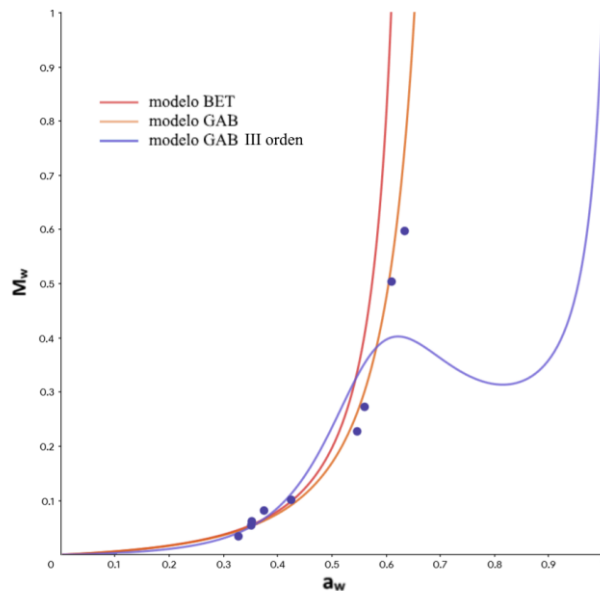


Figura 18. Curvas de la isoterma de sorción de Fakuti Uro Health® según los diferentes modelos a 25 °C y 60 % HR

De todos modos, los 3 modelos son capaces de representar satisfactoriamente la región de interés, de entre el 3 y el 10 % de humedad, en donde se encuentran los valores habituales de humedad en condiciones reales de almacenamiento (Tabla 13).

En comparación, Nayak (2010) obtuvo una mejor correlación de la isoterma de sorción de antocianinas microencapsuladas con maltodextrina con el modelo BET, sin embargo, el comportamiento de la curva, según la clasificación de Brunauer, fue de tipo III. Esta diferencia puede deberse a los métodos de acondicionamiento de las muestras, mientras que Nayak (2010) utilizó el método tradicional con diferentes sales saturadas, en este proyecto se utilizó el método alternativo AWM de (Zhang et al., 2016) que si bien diversos estudios demuestran una correlación de este método con otros tradicionales (Chen, 2000; de Souza et al., 2013; Demarchi et al., 2013), existen estudios como el de Yu (2007) quien registra una gran diferencia del método AWM respecto a métodos tradicionales. Shands y Labuza, (2009) reportaron valores inferiores de humedad con el método AWM en comparación con el método de sales saturadas, atribuyen esta diferencia a la heterogeneidad de la humedad en las muestras. Por eso la importancia del periodo de homogenización después del acondicionamiento de humedad. Otra posible causa, aunque menos probable, sea la diferencia en las características de la microencapsulación, dado que el comportamiento de una curva del tipo V se da por las características porosas del material (Blahovec & Yanniotis, 2007), puede ser que la microencapsulación de Fakultí Uro Health[®] resulte en microesferas más porosas. Se recomienda un estudio donde se aplique el algún método convencional para la determinación de la curva isoterma de sorción y se comparen los resultados aquí presentados.

Considerando los valores de error estándar de estimación S (Tabla 19), se elige el modelo GAB convencional que representa los valores experimentales más adecuadamente que el modelo BET y GAB de tercer orden (Figura 18).

Para la determinación de la actividad de agua a partir de los valores de humedad ya obtenidos, se dispone la ecuación del modelo GAB (Tabla 19) en términos de $a_w(M_w)$ y se obtiene como resultado la siguiente ecuación:

$$a_w = \frac{-0,062394 \left(\sqrt{M_w^2 + 6,32842 M_w + 0,0599158} - 12,9268994 (M_w + 0,0189355) \right)}{M_w} \quad (17)$$

3.1.6. Análisis de actividad de agua

Utilizando la ecuación 17, se toman los valores de humedad recogidos en la Tabla 13 y se interpolan para obtener los valores de actividad de agua correspondientes como se muestra en la Tabla 20. Todos los valores se encuentran muy por debajo del límite establecido de 0,6. Como indica la Figura 5, estos valores de actividad de agua aseguran una limitada actividad enzimática y un nulo crecimiento microbiano.

Se realizó una regresión siguiendo el modelo y^2 (Figura 19) que demostró un coeficiente R^2 superior al de otros modelos alternativos (Tabla 21). Se realizó un análisis de varianza y se determinó que el estadístico P es de 0, por lo que se determina que la actividad de agua varía significativamente a través del tiempo.

El modelo de regresión demostró una clara tendencia de aumento de actividad de agua y estimó un tiempo de vida útil de 290,048 meses. Este valor es ampliamente superior al tiempo de vida registrado del producto (24 meses).

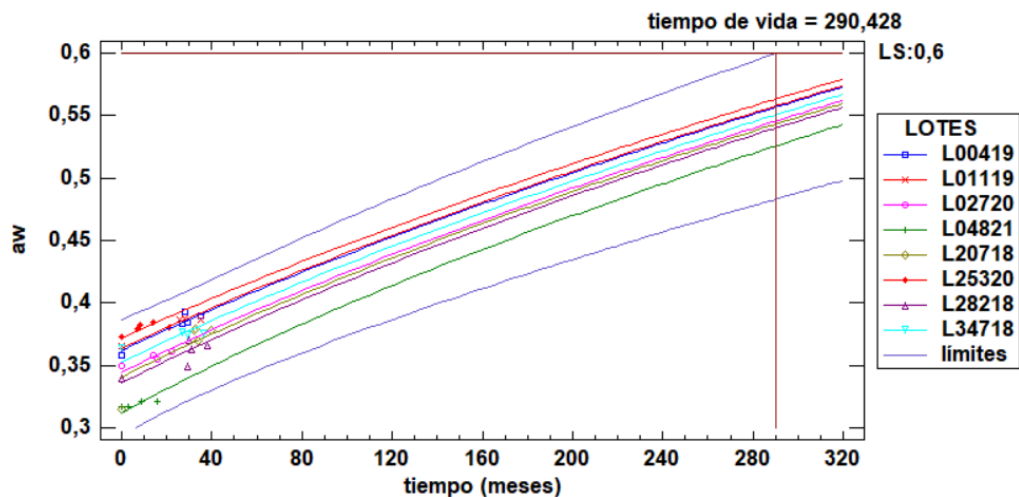


Figura 19. Modelo de regresión y^2 para la evolución de actividad de agua en el tiempo y pronóstico de su vida útil.

Tabla 20. Actividad de agua para lotes en diferentes tiempos.

Lote	Meses	Humedad (%)
L20718	0	0,3151
	32	0,3778
	33	0,3791
	34	0,3702
	40	0,3784
L28218	0	0,3398
	29	0,3496
	30	0,3710
	31	0,3639
	38	0,3669
L34718	0	0,3631
	27	0,3764
	29	0,3736
	36	0,3751
L00419	0	0,3579
	27	0,3830
	27	0,3836
	28	0,3926
	29	0,3842
	35	0,3895
L01119	0	0,3654
	26	0,3870
	28	0,3880
	35	0,3869
L02720	0	0,3493
	14	0,3583
	16	0,3546
	22	0,3615
L25320	0	0,3732
	7	0,3795
	8	0,3826
	14	0,3849
	21	0,3799
L04821	0	0,3167
	3	0,3168
	9	0,3208
	16	0,3212

Tabla 21. Comparativa de modelos de regresión para el parámetro actividad de agua.

Modelo	R ²
y ²	91,41 %
Lineal	91,20 %
Logístico	91,08 %
Exponencial	90,93 %
√x	90,37 %
x ²	90,26 %

3.1.7. Análisis microbiológico

Se realizó la cuantificación microbiológica de mesófilos aerobios (AC), *E. coli* (EC), coliformes (CO), mohos y levaduras (ML) y *S. aureus* (ST). Los resultados se encuentran expuestos en la Tabla 22. Todos los ensayos indicaron la ausencia total de los microorganismos evaluados, indicando una excelente viabilidad microbiológica del producto Fakulti Uro Health®.

Tabla 22. Análisis microbiológico para lotes en diferentes tiempos.

LOTE	MESES	AC	EC	CO	ML	ST
L04821	0	0	0	0	0	0
L25320	7	0	0	0	0	0
L02720	14	0	0	0	0	0
L00419	27	0	0	0	0	0
L20718	32	0	0	0	0	0

Se representó gráficamente la cuantificación de cada cultivo microbiológico a través del tiempo: AC (Figura 20), EC (Figura 21), CO (Figura 22), ML (Figura 23) y ST (Figura 24). En todos los casos el conteo de colonias fue de 0 UFC/g para todas las pruebas hasta el mes 32, valores muy por debajo o en línea de los límites permitidos (Tabla 5).

Al ser todos los valores iguales, la varianza es 0 por lo que no es posible realizar una regresión lineal y se considera simplemente como una tendencia constante, en este caso de 0, por lo que es imposible estimar un tiempo de vida útil considerando los parámetros de calidad microbiológicos.

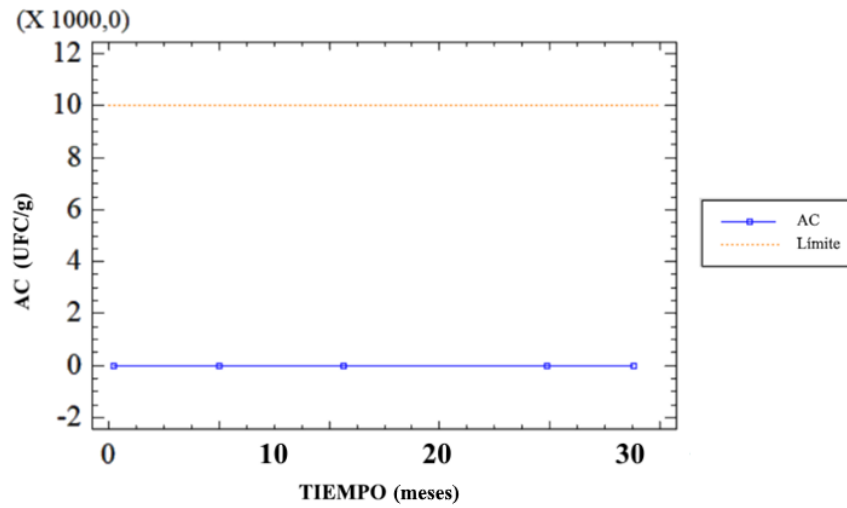


Figura 20. Evolución de la cuantificación de mesófilos aerobios a través del tiempo.

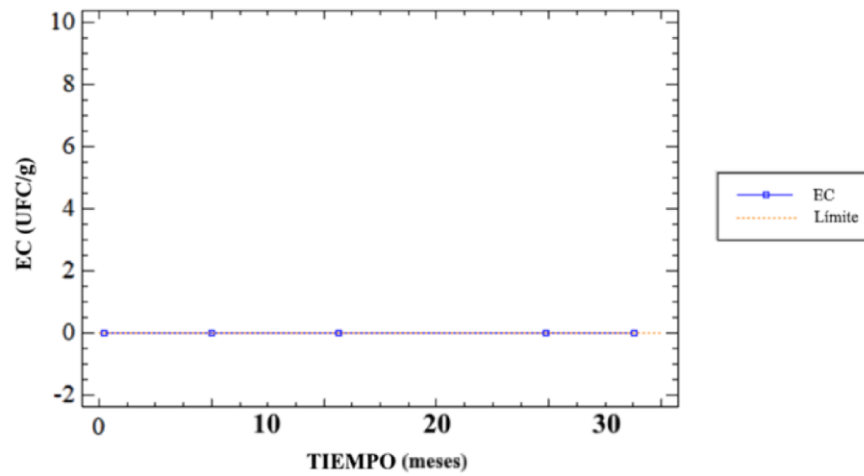


Figura 21. Evolución de la cuantificación de *E. coli* a través del tiempo.

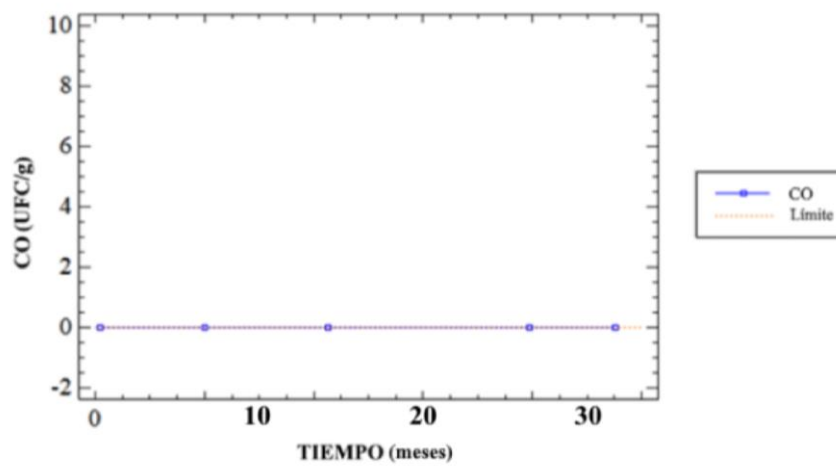


Figura 22. Evolución de la cuantificación de coliformes a través del tiempo.

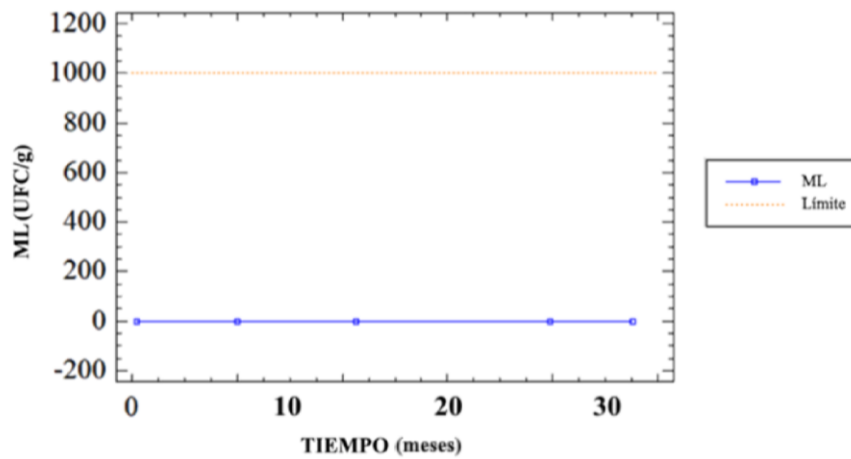


Figura 23. Evolución de la cuantificación de mohos y levaduras a través del tiempo.

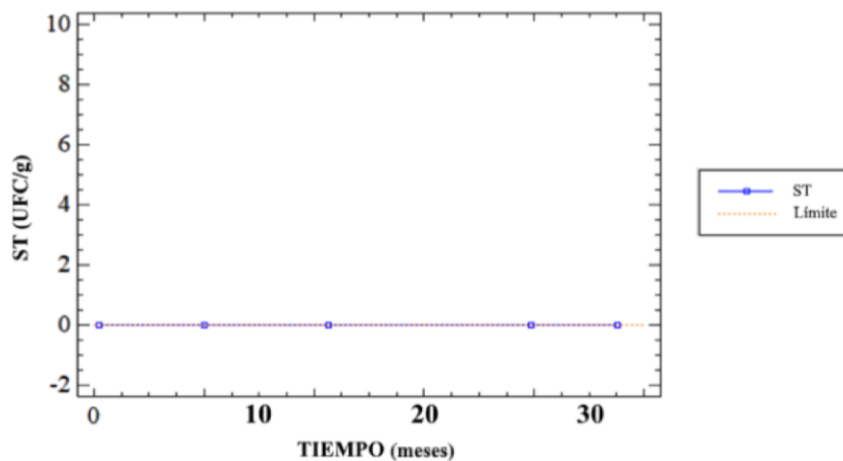


Figura 24. Evolución de la cuantificación de *Staphylococcus aureus* a través del tiempo.

Debido a la naturaleza del crecimiento microbiano, su proliferación requiere de al menos una célula o UFC para que se desarrolle contaminación microbiana. Al no existir microorganismos presentes en el producto, la proliferación microbiológica es físicamente imposible y se asegura una mayor estabilidad del producto.

La nula actividad microbiana se explica por factores como el bajo nivel de actividad de agua (menor a 0,6) y los bajos niveles de pH. Además, el alto contenido de antocianinas en el producto significa que este posee capacidad antimicrobiana, inhibiendo la actividad enzimática de diferentes bacterias grampositivas y gramnegativas. (Llvisaca et al., 2018).

La ausencia de actividad microbiológica es un indicador de procesos adecuados de procesamiento y empaque del producto, así como de un eficiente control de calidad en todos los aspectos de la producción.

3.1.8. Análisis sensorial

Se evaluaron los parámetros organolépticos del producto en forma de polvo y reconstituido en agua, según los parámetros de calidad establecidos en la Tabla 6. asignando valores cualitativos según la escala de Likert mostrada en la Tabla 7. Los resultados se muestran en la Tabla 23.

Tabla 23. Evaluación organoléptica para lotes en diferentes tiempos.

Lote	Meses	Polvo			Líquido Reconstituido		
		Color	Apariencia	Solubilidad	Color	Olor	Sabor
L20718	33	7	5	7	7	7	6
L28218	31	6	5	7	6	7	6
L01119	28	6	5	7	6	7	7
L02720	15	6	6	7	6	7	7
L25320	8	7	7	7	6	7	7
L04821	2	7	7	7	7	7	7

La valoración cualitativa demuestra que las propiedades de calidad organolépticas se mantienen a través del tiempo, al menos durante un plazo de 33 meses, que es superior al tiempo de vida útil legalmente establecido (2 años). Los cambios en el color del polvo y del líquido reconstituido se deben a la variación de la materia prima utilizada para la elaboración del producto, de manera que no significan un impacto en la calidad. La apariencia del polvo se ve comprometida con el paso del tiempo. Se evidencia la aglomeración del polvo, generando pequeños grumos, que sin embargo se encuentran dentro de los parámetros aceptables y no interfieren con el desempeño del producto. El comportamiento de solubilidad del producto se mantiene inalterado durante el tiempo, indicando que la eficiencia de la granulación no se ve alterada. Las características de sabor y olor se mantienen óptimas en todas las muestras, indicando que no existe oxidación, contaminación o degradación enzimática/microbiológica de las muestras, no se aprecian signos de ranciedad o humedad.

De este modo se puede asegurar que las propiedades organolépticas y la calidad percibida del producto se mantienen estables durante el tiempo por al menos 33 meses. Este comportamiento puede explicarse por la baja actividad de agua que limita la actividad enzimática y el adecuado almacenamiento del producto.

3.1.9. Determinación de tiempo de vida útil

A partir de los periodos de análisis en tiempo real (X) para cada parámetro, se analizan los datos experimentales en función del árbol de decisiones (Figura 8) y se determina un caso para cada parámetro y determinar así el tiempo de vida útil propuesto (Y).

Analizando las antocianinas se encuentra que presentan una degradación del 2,77 % en los 6 primeros meses, exhibe una variación significativa a largo plazo, existe variabilidad entre sus lotes y se ha realizado un análisis estadístico, en consecuencia se le asigna el caso 2. El pH presenta un cambio del 0,07 % en los 6 primeros meses, aunque no exhibe una variación significativa a largo plazo, existe variabilidad entre sus lotes y se ha realizado un análisis estadístico, por lo que se le asigna el caso 2. La humedad registra un cambio del 3,55 % en los 6 primeros meses, exhibe una variación significativa a largo plazo, existe variabilidad entre sus lotes y se ha realizado un análisis estadístico, así que se le asigna el caso 2. De igual manera la actividad de agua registra un cambio del 1,38 % en los 6 primeros meses, exhibe una variación significativa a largo plazo, existe variabilidad entre sus lotes y se ha realizado un análisis estadístico, en consecuencia, se le asigna el caso 1.

En el caso de los parámetros microbiológicos, todos muestran una nula variación por lo que se les asigna el caso 1.

Analizando los parámetros organolépticos, todos excepto la apariencia del polvo muestra una variación nula o casi nula, por lo que se les asigna el caso 1. En el caso de la apariencia del polvo no se aprecian cambios considerables sino hasta el mes 28 y al ser un parámetro cualitativo no puede ser analizado estadísticamente por lo que se le asigna el caso 3.

Con los casos ya asignados se procede a calcular el tiempo de vida propuesto como indica el árbol de decisiones (Figura 8), que junto con los valores de vida útil que fueron calculados mediante los modelos de regresión, se muestran en la Tabla 24.

El tiempo de vida útil más bajo (39 meses) corresponde al parámetro organoléptico de apariencia del polvo. De modo que se considera este valor como el tiempo de vida estimado para el producto Fakulti Uro Health®. Este valor supera considerablemente los 24 meses, que es el tiempo de vida útil que registra actualmente el producto. Se demuestra así la gran estabilidad que posee el producto debido a los numerosos factores ya discutidos: su bajo nivel de humedad, actividad de agua, su bajo pH y las características antioxidantes y antibacterianas de las antocianinas que limitan la actividad enzimática y microbiana; además de la microencapsulación y los métodos adecuados de producción, empaque y almacenamiento.

Tabla 24. Evaluación de los tiempos de vida útil estimados para cada parámetro.

Parámetro	Caso	Periodo analizado (X) (meses)	Tiempo de vida propuesto (Y) (meses)	Tiempo de vida regresión (meses)	
Antocianinas	2	40	52	-	
pH	2	40	52	-	
Humedad	2	40	52	81,7	
a_w	2	40	52	290,4	
MB	AC	1	32	44	-
	EC	1	32	44	-
	CO	1	32	44	-
	ML	1	32	44	-
	ST	1	32	44	-
Sensorial	Color (P)	1	33	45	-
	Apariencia (P)	3	33	39	-
	Solubilidad (P)	1	33	45	-
	Color (LR)	1	33	45	-
	Olor (LR)	1	33	45	-
	Sabor (LR)	1	33	45	-

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

- Se evaluó la estabilidad en tiempo real de los parámetros fisicoquímicos, microbiológicos y organolépticos de 8 lotes del suplemento alimenticio Fakulti Uro Health[®], analizando muestras con tiempos de almacenamiento de hasta 40 meses desde su fecha de elaboración.
- Se evaluó la estabilidad del contenido de antocianinas totales considerando una cinética de degradación de primer orden. Se determinó la constante de degradación k , obteniendo un valor de $1,5593 \times 10^{-4}$ días⁻¹, a partir del cual se calculó un tiempo de vida media $t_{1/2}$ de 148 meses.
- Se determinó la isoterma de sorción para el suplemento alimenticio Fakulti Uro Health[®] a 25 °C y 60 % HR, estableciendo una relación entre el contenido de humedad y la actividad de agua en el mismo. Se utilizó el modelo GAB convencional, que presentó una mayor correlación con los datos experimentales.
- Se analizó el comportamiento en el tiempo del pH utilizando un modelo de regresión $y^{-1} x^2$ se determinó que su variación en el tiempo no es suficientemente significativa para estimar un tiempo de vida útil. Analizando la humedad con un modelo de regresión lineal se evidenció que este parámetro incrementa en el tiempo y se estimó un tiempo de vida útil de 82 meses hasta que sobrepase el límite establecido de 10 % de humedad. La actividad de agua demostró un incremento significativo a través del tiempo mediante un modelo de regresión y^2 estimando un tiempo de vida útil de 290 meses hasta alcanzar un valor de 0,6.
- El análisis microbiológico demostró una nula actividad microbiana en todas las muestras analizadas de hasta 32 meses, se considera inviable la proliferación bacteriana, imposibilitando la determinación de un tiempo de vida útil estimado para este parámetro.

- Se evaluaron cualitativamente las características organolépticas del producto, encontrando que todas las muestras analizadas de hasta 33 meses cumplen con los parámetros establecidos de calidad. Se notó que la apariencia del polvo se ve afectada en el tiempo, mostrando signos de aglutinamiento, sin embargo, los cambios no se consideran significativos al no afectar al desempeño del producto.
- Todos los parámetros analizados demostraron una excelente estabilidad, manteniéndose dentro de los parámetros de calidad establecidos aún después de superar el tiempo de vida útil registrado para este producto, 24 meses. Se atribuye este comportamiento al bajo nivel de humedad y actividad de agua que limitan la capacidad de reacción química, enzimática y microbiana en el medio; la capacidad antioxidante y antimicrobiana de las antocianinas; el pH ácido que favorece la estabilidad de las antocianinas y una baja actividad microbiana; la microencapsulación que limita la exposición con los factores ambientales además de la aplicación adecuada de los métodos de producción, empaque y almacenamiento.
- Se propone un tiempo de vida útil de 39 meses para el suplemento alimenticio Fakulti Uro Health[®] tomando en cuenta los criterios establecidos por el Grupo de Trabajo de Productos Farmacéuticos del Comité Consultativo para Estándares y Calidad de la ASEAN (ACCSQ-PPWG).

4.2. Recomendaciones

- Continuar con el estudio por más tiempo para enriquecer los datos obtenidos y comprobar la correlación de los modelos de regresión propuestos.
- Realizar un análisis de la estabilidad de las antocianinas durante los primeros días del producto para comparar si su degradación se ajusta con la degradación a largo plazo del modelo propuesto.
- Analizar la actividad antioxidante de Fakultí Uro Health y su variación a través del tiempo.
- Realizar un estudio de sorción empleando métodos convencionales como el de las sales saturadas para compararlo con los modelos propuestos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Aal, E.-S. M., & Hucl, P. (1999). A Rapid Method for Quantifying Total Anthocyanins in Blue Aleurone and Purple Pericarp Wheats. *Cereal Chemistry Journal*, 76(3), 350–354. <https://doi.org/10.1094/CCHEM.1999.76.3.350>
- ACCSQ-PPWG. (2005). ASEAN guideline on stability study of drug product. *9th ACCSQ-PPWG Meeting, 21-24 February 2005*.
- Aizpurua-Olaizola, O., Navarro, P., Vallejo, A., Olivares, M., Etxebarria, N., & Usobiaga, A. (2016). Microencapsulation and storage stability of polyphenols from *Vitis vinifera* grape wastes. *Food Chemistry*, 190, 614–621. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.117>
- Akhavan Mahdavi, S., Jafari, S. M., Assadpour, E., & Ghorbani, M. (2016). Storage stability of encapsulated barberry's anthocyanin and its application in jelly formulation. *Journal of Food Engineering*, 181, 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.03.003>
- Alafnan, S., Awotunde, A., Glatz, G., Adjei, S., Alrumaih, I., & Gowida, A. (2021). Langmuir adsorption isotherm in unconventional resources: Applicability and limitations. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, 207, 109172.
- Andrade, R. D., Lemus, R., & Pérez, C. E. (2011). Models of sorption isotherms for food: Uses and limitations. *Vitae*, 18(3), 325–334.
- Aranda Núñez, C. I. (2018). *Extracción y microencapsulación de antocianinas a partir de papas nativas (Solanum. spp) variedades Puca-shungo y Yana-shungo*. Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos
- Normativa Sanitaria Para Control De Suplementos Alimenticios*, 1 (2016) (ARCSA). https://www.controlsanitario.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2017/02/Resolución_ARCSA-DE-028-2016-YMIH_NTS_SUPLEMENTOS_ALIMENTICIOS.pdf
- Bajaj, S., Sakhuja, N., & Singla, D. (2012). Stability Testing of Pharmaceutical Products. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 02(03), 129–138.

- Blahovec, J., & Yanniotis, S. (2007). GAB generalized equation for sorption phenomena. *Food and Bioprocess Technology*, 1(1), 82–90.
- Blahovec, J., & Yanniotis, S. (2010). 'GAB' generalised equation as a basis for sorption spectral analysis. *Czech Journal of Food Sciences*, 28(5), 345–354.
- Cajiao Orellana, L. E., & Luna Guillén, M. J. (2019). *Microencapsulación de Antocianinas de Mortiño (Vaccinium floribundum) utilizando una combinación de Alginato y Pectina* [Universidad San Francisco de Quito]. <http://repositorio.usfq.edu.ec/handle/23000/8088>
- Cardona, F. (2019). Actividad del agua en alimentos: concepto, medida y aplicaciones. *Departamento de Tecnología de Alimentos. Universitat Politècnica de València. Artículo. España.*
- Castelló Gómez, M. L., Pérez Esteve, E., Barrera Puigdollers, M. C., Betoret Valls, N., & Andrés Grau, A. M. (2021). *Centrifugación industrial.*
- Castro Callejas, S. P., Chávez Monterroza, K. R., & Serrano Peña, J. F. (2018). *Diseño y desarrollo de un suplemento alimenticio basado en el aprovechamiento de las hojas de terebinto (Moringa oleífera)*. Universidad de El Salvador.
- Chen, C. (2000). A rapid method to determine the sorption isotherms of peanuts. *Journal of Agricultural Engineering Research*, 75(4), 401–408.
- Chirife, J., & Fontana, A. J. (2020). Introduction: Historical Highlights of Water Activity Research. In *Water Activity in Foods* (2nd ed., pp. 1–11). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781118765982.CHI>
- Coba, P., Coronel, D., Verdugo, K., Paredes, M. F., Yugsi, E., & Huachi, L. (2012). Estudio etnobotánico del mortiño (*Vaccinium floribundum*) como alimento ancestral y potencial alimento funcional. *LA GRANJA. Revista de Ciencias de La Vida*, 16(2), 5–13.
- Dadkhah, N., Shirani, M., Etemadifar, Sh., & Mirtalebi, M. (2016). The effect of *Cornus mas* in preventing recurrent urinary tract infections in women: A randomized controlled trial. *Advanced Herbal Medicine*, 2(3), 39–46. http://herbmed.skums.ac.ir/article_22520.html
- de Souza, T. C. L., de Souza, H. A. L., & Pena, R. da S. (2013). A rapid method to obtaining moisture sorption isotherms of a starchy product. *Starch-Stärke*, 65(5-6), 433–436.

- Demarchi, S. M., Ruiz, N. A. Q., de Michelis, A., & Giner, S. A. (2013). Sorption characteristics of rosehip, apple and tomato pulp formulations as determined by gravimetric and hygrometric methods. *LWT-Food Science and Technology*, 52(1), 21–26.
- Directiva 2002/46/CE. (2002). *del Parlamento Europeo y del Consejo de 10 de junio de 2002 relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros en materia de complementos alimenticios.*
- Ergun, R., Lietha, R., & Hartel, R. W. (2010). Moisture and shelf life in sugar confections. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50(2), 162–192.
- Code of Federal Regulations Title 21 Foods and Drugs, 175.300 (2022). <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/cfrsearch.cfm?fr=175.300>
- FDA. (2022). *Questions and Answers on Dietary Supplements.* Information for Consumers on Using Dietary Supplements. <https://www.fda.gov/food/information-consumers-using-dietary-supplements/questions-and-answers-dietary-supplements>
- Fontana, A. J. (2008). Appendix D: Minimum Water Activity Limits for Growth of Microorganisms. *Water Activity in Foods*, 405–405. <https://doi.org/10.1002/9780470376454.APP4>
- Garcia-Vaquero, M., & Rajauria, G. (2018). *Chapter 33 - Analytical Techniques for Phytochemical Estimation in Fruit Juices* (G. Rajauria & B. K. B. T.-F. J. Tiwari, Eds.; pp. 669–692). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802230-6.00033-3>
- Giusti, M. M., & Wrolstad, R. E. (2001). Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 00(1), F1.2.1-F1.2.13. <https://doi.org/10.1002/0471142913.faf0102s00>
- Jaakola, L., Määttä-Riihinen, K., Kärenlampi, S., & Hohtola, A. (2004). Activation of flavonoid biosynthesis by solar radiation in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) leaves. *Planta*, 218(5), 721–728.
- Jing, P., Bomser, J. A., Schwartz, S. J., He, J., Magnuson, B. A., & Giusti, M. M. (2008). Structure-function relationships of anthocyanins from various

- anthocyanin-rich extracts on the inhibition of colon cancer cell growth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(20), 9391–9398. <https://doi.org/10.1021/jf8005917>
- Lakshmanakumar, M., Sriram, S., & Balamurugan, D. (2018). Performance analysis of TiO₂-flavylium compound-based dye-sensitized solar cell (DSSC): a DFT–TDDFT approach. *Journal of Computational Electronics*, 17(3), 1143–1152. <https://doi.org/10.1007/s10825-018-1189-6>
- Lätti, A. K., Riihinen, K. R., & Kainulainen, P. S. (2008). Analysis of anthocyanin variation in wild populations of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) in Finland. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(1), 190–196.
- Llavisaca, S., Manzano, P., Ruales, J., Flores, J., Mendoza, J., Peralta, E., & Cevallos-Cevallos, J. M. (2018). Chemical, antimicrobial, and molecular characterization of mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) fruits and leaves. *Food Science & Nutrition*, 6(4), 934–942. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/fsn3.638>
- López Hernández, O. D. (2010). Microencapsulación de sustancias oleosas mediante secado por aspersión. *Revista Cubana de Farmacia*, 44(3), 381–389. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152010000300013&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Määttä-Riihinen, K. R., Kamal-Eldin, A., Mattila, P. H., González-Paramás, A. M., & Törrönen, A. R. (2004). Distribution and contents of phenolic compounds in eighteen Scandinavian berry species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(14), 4477–4486.
- Madene, A., Jacquot, M., Scher, J., & Desobry, S. (2006). Flavour encapsulation and controlled release—a review. *International Journal of Food Science & Technology*, 41(1), 1–21.
- Magari, R. (2003). Assessing Shelf Life Using Real-Time and Accelerated Stability Tests. *BioPharm International*, 16, 36–48.
- Montoya, C. G., Arredondo, J. D. H., Arias, M. L., Cano, C. I. M., & Rojano, B. A. (2012). Cambios en la actividad antioxidante en frutos de mortiño (*Vaccinium meridionale* Sw.) durante su desarrollo y maduración. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 65(1), 6487–6495.

- Morales Ramírez, M. E. (2017). *Optimización del proceso de recuperación de aceites centrifugados de limón, en la etapa de centrifugación*. Instituto Tecnológico de Colima.
- Nayak, C. A., & Rastogi, N. K. (2010). Effect of selected additives on microencapsulation of anthocyanin by spray drying. *Drying Technology*, 28(12), 1396–1404. <https://doi.org/10.1080/07373937.2010.482705>
- Ochoa, L., Igartua, M., HERNÁNDEZ, R. M., R GASCÓN, A., & PEDRAZ, J. L. (2006). Granulación por fusión en mezcladores granuladores de alta velocidad. *Vitae*, 13(1), 40–47.
- Ortiz, J. (2018). *Obtención de un extracto rico en polifenoles a partir del residuo de la pulpa de mortiño (Vaccinium meridionale)* [Universidad Técnica de Ambato]. <https://repositorio.uta.edu.ec/handle/123456789/27310>
- Ortiz, J., Marín-Arroyo, M.-R., Noriega-Domínguez, M.-J., Navarro, M., & Arozarena, I. (2013). Color, Phenolics, and Antioxidant Activity of Blackberry (*Rubus glaucus* Benth.), Blueberry (*Vaccinium floribundum* Kunth.), and Apple Wines from Ecuador. *Journal of Food Science*, 78(7), C985–C993. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1750-3841.12148>
- Parra Huertas, R. A. (2010). Revisión: microencapsulación de alimentos. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 63(2), 5669–5684.
- Patiño, C., Muñoz, C., Patiño, M., Ocampo, J., & Muñoz, E. (2021). Carrot milling: a strategy for value-added food production. *Perfiles*, 1(25 SE-), 63–70. <https://doi.org/10.47187/perf.v1i25.117>
- Patrignani, F., & Lanciotti, R. (2016). Applications of high and ultra high pressure homogenization for food safety. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1132.
- Riaz, M., Zia-Ul-Haq, M., & Saad, B. (2016). Anthocyanins effects on carcinogenesis, immune system and the central nervous system. In *Anthocyanins and Human Health: Biomolecular and therapeutic aspects* (pp. 125–138). Springer.
- Saéñz, 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.
- Sanzini, E., Badea, M., dos Santos, A., Restani, P., & Sievers, H. (2011). Quality control of plant food supplements. *Food & Function*, 2(12), 740–746.

- Schmidt, S. J., & Lee, J. W. (2012). Comparison between water vapor sorption isotherms obtained using the new dynamic dewpoint isotherm method and those obtained using the standard saturated salt slurry method. *International Journal of Food Properties*, *15*(2), 236–248.
- Scott, W. J. (1953). Water relations of *Staphylococcus aureus* at 30 C. *Australian Journal of Biological Sciences*, *6*(4), 549–564.
- Serris, G. S., & Biliaderis, C. G. (2001). Degradation kinetics of beetroot pigment encapsulated in polymeric matrices. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *81*(8), 691–700. <https://doi.org/10.1002/jsfa.864>
- Shands, J., & Labuza, T. (2009). Comparison of the dynamic dew point isotherm method to the static and dynamic gravimetric methods for the generation of moisture sorption isotherms. *IFT Annual Meeting Poster. Anaheim, CA*.
- Smeriglio, A., Barreca, D., Bellocco, E., & Trombetta, D. (2016). Chemistry, Pharmacology and Health Benefits of Anthocyanins. *Phytotherapy Research*, *30*(8), 1265–1286. <https://doi.org/10.1002/ptr.5642>
- Subramaniam, P., & Wareing, P. (2016). *The Stability and Shelf Life of Food* (P. Subramaniam, Ed.; 2nd ed.). Woodhead Publishing.
- Summers, M., & Aulton, M. (2004). Granulación. La ciencia del diseño de las formas farmacéuticas. *Capítulo*, *25*, 368–378.
- Tsuda, T. (2012). Dietary anthocyanin-rich plants: Biochemical basis and recent progress in health benefits studies. *Molecular Nutrition & Food Research*, *56*(1), 159–170. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201100526>
- Vasco, C., Riihinen, K., Ruales, J., & Kamal-Eldin, A. (2009a). Phenolic compounds in Rosaceae fruits from Ecuador. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(4), 1204–1212.
- Vasco, C., Riihinen, K., Ruales, J., & Kamal-Eldin, A. (2009b). Chemical composition and phenolic compound profile of mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(18), 8274–8281. <https://doi.org/10.1021/JF9013586>
- Vera Zambrano, M., Dutta, B., Mercer, D. G., MacLean, H. L., & Touchie, M. F. (2019). Assessment of moisture content measurement methods of dried food products in small-scale operations in developing countries: A review. In

Trends in Food Science and Technology (Vol. 88, pp. 484–496). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.04.006>

- Wahyuningsih, S., Wulandari, L., Wartono, M. W., Munawaroh, H., & Ramelan, A. H. (2017). The Effect of pH and Color Stability of Anthocyanin on Food Colorant. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 193(1), 012047.
- Yu, X. (2007). *Investigation of moisture sorption properties of food materials using saturated salt solution and humidity generating techniques*. University of Illinois at Urbana-Champaign.
- Zapata, L. M., Castagnini, J. M., Quinteros, C. F., Carlier, E., Jimenez-Veuthey, M., & Cabrera, C. (2016). Estabilidad de antocianinas durante el almacenamiento de jugos de arándanos. *Vitae*, 23(3), 173–183.
- Zhang, L., Sun, D. W., & Zhang, Z. (2016). Methods for measuring water activity (aw) of foods and its applications to moisture sorption isotherm studies. *https://Doi.Org/10.1080/10408398.2015.1108282*, 57(5), 1052–1058. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1108282>
- Zokti, J., Sham Baharin, B., Mohammed, A., & Abas, F. (2016). Green Tea Leaves Extract: Microencapsulation, Physicochemical and Storage Stability Study. *Molecules*, 21(8), 940. <https://doi.org/10.3390/molecules21080940>

ANEXOS

Anexo 1. Espectro de absorbancia UV-vis de los extractos de antocianinas a pH 1 y pH 4,5.

λ (nm)	pH 1	ph 4,5
260	0,104	0,083
280	0,227	0,223
290	0,924	0,904
300	1,821	1,991
320	1,576	1,793
340	1,148	1,260
360	0,840	0,951
380	0,583	0,609
400	0,365	0,315
420	0,323	0,205
440	0,359	0,182
460	0,411	0,178
480	0,548	0,181
500	0,791	0,195
510	0,913	0,211
515	0,965	0,219
520	1,010	0,220
525	1,044	0,227
530	1,061	0,232
531	1,065	0,237
531,1	1,066	0,239
531,2	1,067	0,240
531,5	1,065	0,242
534	1,056	0,237
535	1,050	0,235
540	1,024	0,237
545	0,961	0,237
550	0,852	0,221
560	0,622	0,202
580	0,221	0,147
600	0,078	0,103
650	0,013	0,021
680	0,011	0,007
700	0,002	0,002
720	0,008	-0,002
750	-0,009	-0,010
800	-0,001	-0,003

Anexo 2. Datos experimentales de absorbancia para la determinación de CAT.

Muestra	Rep	λ	pH	A			promedio	A _{pHd}	F. análisis
L20718	1	531	1	0,589	0,599	0,612	0,6000	0,4030	22/04/21
		700	1	0,013			0,0130		
		531	4,5	0,201	0,199	0,215	0,2050		
		700	4,5	0,021			0,0210		
	2	531	1	0,604	0,626	0,63	0,6200	0,4253	22/04/21
		700	1	0,016			0,0160		
		531	4,5	0,181	0,187	0,18	0,1827		
		700	4,5	0,004			0,0040		
L00419	1	531	1	1,324	1,338	1,34	1,3340	1,0387	22/04/21
		700	1	0,01			0,0100		
		531	4,5	0,306	0,317	0,302	0,3083		
		700	4,5	0,023			0,0230		
	2	531	1	1,295	1,309	1,317	1,3070	1,0137	22/04/21
		700	1	0,023			0,0230		
		531	4,5	0,29	0,294	0,299	0,2943		
		700	4,5	0,024			0,0240		
L34718	1	531	1	0,88	0,895	0,89	0,8883	0,5333	29/04/21
		700	1	0,031			0,0310		
		531	4,5	0,466			0,4660		
		700	4,5	0,142			0,1420		
	2	531	1	0,894	0,905	0,899	0,8993	0,5483	29/04/21
		700	1	0,036			0,0360		
		531	4,5	0,451			0,4510		
		700	4,5	0,136			0,1360		
L28218	1	531	1	1,33	1,342	1,35	1,3407	0,9513	07/05/21
		700	1	0,037			0,0370		
		531	4,5	0,44	0,441	0,446	0,4423		
		700	4,5	0,09			0,0900		
	2	531	1	1,312	1,312	1,323	1,3157	0,8950	07/05/21
		700	1	0,039			0,0390		
		531	4,5	0,539	0,535	0,53	0,5347		
		700	4,5	0,153			0,1530		
L01119	1	531	1	1,614	1,635	1,637	1,6287	1,2127	07/05/21
		700	1	0,039			0,0390		
		531	4,5	0,405	0,425	0,427	0,4190		
		700	4,5	0,042			0,0420		
	2	531	1	1,661	1,669	1,703	1,6777	1,2523	07/05/21
		700	1	0,027			0,0270		
		531	4,5	0,457	0,468	0,471	0,4653		
		700	4,5	0,067			0,0670		

L04821	1	531	1	1,067	1,069	1,075	1,0703	0,8343	12/05/21
		700	1	0,011			0,0110		
		531	4,5	0,238	0,23	0,234	0,2340		
		700	4,5	0,009			0,0090		
	2	531	1	1,029	1,054	1,04	1,0410	0,8197	12/05/21
		700	1	0,004			0,0040		
		531	4,5	0,213	0,23	0,215	0,2193		
		700	4,5	0,002			0,0020		
L02720	1	531	1	1,585	1,591	1,59	1,5887	1,2017	13/05/21
		700	1	0,015			0,0150		
		531	4,5	0,42	0,417	0,42	0,4190		
		700	4,5	0,047			0,0470		
	2	531	1	1,595	1,608	1,611	1,6047	1,1897	13/05/21
		700	1	0,014			0,0140		
		531	4,5	0,449	0,457	0,456	0,4540		
		700	4,5	0,053			0,0530		
L25320	1	531	1	0,837	0,846	0,846	0,8430	0,5683	13/05/21
		700	1	0,02			0,0200		
		531	4,5	0,447	0,44	0,447	0,4447		
		700	4,5	0,19			0,1900		
	2	531	1	0,845	0,854	0,858	0,8523	0,6183	13/05/21
		700	1	0,012			0,0120		
		531	4,5	0,351	0,356	0,352	0,3530		
		700	4,5	0,131			0,1310		
L20718	1	531	1	0,628	0,634	0,629	0,6303	0,4437	15/11/21
		700	1	0,043			0,0430		
		531	4,5	0,209	0,21	0,213	0,2107		
		700	4,5	0,067			0,0670		
	2	531	1	0,622	0,621	0,627	0,6233	0,4277	15/11/21
		700	1	0,035			0,0350		
		531	4,5	0,198	0,203	0,201	0,2007		
		700	4,5	0,04			0,0400		
L28218	1	531	1	1,317	1,318	1,324	1,3197	0,8933	15/11/21
		700	1	0,012			0,0120		
		531	4,5	0,45	0,447	0,445	0,4473		
		700	4,5	0,033			0,0330		
	2	531	1	1,308	1,307	1,309	1,3080	0,8767	15/11/21
		700	1	0,035			0,0350		
		531	4,5	0,48	0,478	0,477	0,4783		
		700	4,5	0,082			0,0820		
L34718	1	531	1	0,843	0,837	0,835	0,8383	0,5487	16/11/21
		700	1	0,051			0,0510		
		531	4,5	0,384	0,386	0,387	0,3857		
		700	4,5	0,147			0,1470		

	2	531	1	0,864	0,872	0,867	0,8677	0,5377	16/11/21
		700	1	0,048			0,0480		
		531	4,5	0,392	0,397	0,396	0,3950		
		700	4,5	0,113			0,1130		
L00419	1	531	1	1,381	1,386	1,389	1,3853	1,0913	16/11/21
		700	1	0,021			0,0210		
		531	4,5	0,315	0,307	0,308	0,3100		
		700	4,5	0,037			0,0370		
	2	531	1	1,354	1,353	1,347	1,3513	1,0543	16/11/21
		700	1	0,018			0,0180		
		531	4,5	0,429	0,425	0,43	0,4280		
		700	4,5	0,149			0,1490		
L01119	1	531	1	1,532	1,529	1,531	1,5307	1,2473	16/11/21
		700	1	0,03			0,0300		
		531	4,5	0,409	0,409	0,41	0,4093		
		700	4,5	0,156			0,1560		
	2	531	1	1,516	1,512	1,513	1,5137	1,2107	16/11/21
		700	1	0,01			0,0100		
		531	4,5	0,42	0,421	0,422	0,4210		
		700	4,5	0,128			0,1280		
L02720	1	531	1	1,486	1,489	1,486	1,4870	1,1513	17/11/21
		700	1	0,019			0,0190		
		531	4,5	0,496	0,502	0,501	0,4997		
		700	4,5	0,183			0,1830		
	2	531	1	1,523	1,516	1,519	1,5193	1,1540	17/11/21
		700	1	0,015			0,0150		
		531	4,5	0,503	0,501	0,503	0,5023		
		700	4,5	0,152			0,1520		
L25320	1	531	1	0,819	0,825	0,825	0,8230	0,5427	17/11/21
		700	1	0,023			0,0230		
		531	4,5	0,417	0,415	0,42	0,4173		
		700	4,5	0,16			0,1600		
	2	531	1	0,802	0,807	0,806	0,8050	0,5303	17/11/21
		700	1	0,012			0,0120		
		531	4,5	0,365	0,371	0,373	0,3697		
		700	4,5	0,107			0,1070		
L04821	1	531	1	1,012	1,013	1,019	1,0147	0,7157	17/11/21
		700	1	0,018			0,0180		
		531	4,5	0,329	0,334	0,336	0,3330		
		700	4,5	0,052			0,0520		
	2	531	1	1,026	1,032	1,027	1,0283	0,7193	17/11/21
		700	1	0,025			0,0250		
		531	4,5	0,377	0,384	0,382	0,3810		
		700	4,5	0,097			0,0970		

Anexo 3. Valores de determinación de CAT con el método pH diferencial.

LOTE	F ELAB	FECHA	DÍAS	MESES	MEDIDAS		CAT
L20718	26/07/18	22/04/21	1001	33	29,2004	30,8186	30,009
L20718	26/07/18	15/11/21	1208	40	30,1284	29,0419	29,585
L28218	09/10/18	07/05/21	941	31	62,5279	58,8253	60,677
L28218	09/10/18	15/11/21	1133	38	60,3258	59,2003	59,763
L34718	13/12/18	29/04/21	868	29	35,5560	36,0843	35,820
L34718	13/12/18	16/11/21	1069	36	35,8415	35,1229	35,482
L00419	04/01/19	22/04/21	839	28	75,8177	73,9928	74,905
L00419	04/01/19	16/11/21	1047	35	71,8368	69,4012	70,619
L01119	11/01/19	07/05/21	847	28	80,4032	83,0332	81,718
L01119	11/01/19	16/11/21	1040	35	81,9873	79,5772	80,782
L02720	27/01/20	13/05/21	472	16	76,8647	76,0971	76,481
L02720	27/01/20	17/11/21	660	22	76,8175	76,9954	76,906
L25320	09/09/20	13/05/21	246	8	36,8364	40,0771	38,457
L25320	09/09/20	17/11/21	434	14	36,5277	35,6975	36,113
L04821	17/02/21	12/05/21	84	3	52,6420	51,7166	52,179
L04821	17/02/21	17/11/21	273	9	47,0252	47,2661	47,266

Anexo 4. Valores de determinación de CAT con el método rápido.

LOTE	F ELAB	FECHA	DÍAS	MESES	MEDIDAS		CAT
L20718	26/07/18	22/04/21	1001	33	45,0400	46,5413	45,791
L20718	26/07/18	15/11/21	1208	40	44,3459	43,8535	44,100
L28218	09/10/18	07/05/21	941	31	91,2906	89,5883	90,439
L28218	09/10/18	15/11/21	1133	38	92,3246	91,5084	91,917
L34718	13/12/18	29/04/21	868	29	61,3555	61,3138	61,335
L34718	13/12/18	16/11/21	1069	36	56,7359	58,7211	57,728
L00419	04/01/19	22/04/21	839	28	100,8821	98,8403	99,861
L00419	04/01/19	16/11/21	1047	35	94,4730	92,1543	93,316
L01119	11/01/19	07/05/21	847	28	111,8737	115,2395	113,557
L01119	11/01/19	16/11/21	1040	35	104,2338	103,0762	103,655
L02720	27/01/20	13/05/21	472	16	105,2785	106,3388	105,809
L02720	27/01/20	17/11/21	660	22	102,7860	105,0210	103,904
L25320	09/09/20	13/05/21	246	8	56,6064	57,2331	56,920
L25320	09/09/20	17/11/21	434	14	57,3922	56,1369	56,765
L04821	17/02/21	12/05/21	84	3	69,9641	68,0467	69,005
L04821	17/02/21	17/11/21	273	9	69,0728	70,0031	59,538

Anexo 5. Valores de determinación de humedad.

LOTE	F ELAB	FECH A	DÍA S	MESE S	MEDIDAS			HUMEDAD (%)
L2071 8	26/07/1 8	26/07/1 8	0	0	4,00 0	4,10 0		4,050
L2071 8	26/07/1 8	01/03/2 1	952	32	6,24 8	6,55 6	6,44 3	6,416
L2071 8	26/07/1 8	22/04/2 1	1001	33	6,45 3	6,48 0	6,48 7	6,473
L2071 8	26/07/1 8	09/05/2 1	1018	34	6,07 2	6,19 2	5,93 8	6,065
L2071 8	26/07/1 8	15/11/2 1	1208	40	6,38 9	6,54 4	6,39 9	6,444
L2821 8	09/10/1 8	09/10/1 8	0	0	4,80 0	4,90 0		4,850
L2821 8	09/10/1 8	09/03/2 1	882	29	5,49 8	5,20 3	4,93 7	5,213
L2821 8	09/10/1 8	15/03/2 1	888	30	6,06 3	6,13 4	6,10 5	6,101
L2821 8	09/10/1 8	09/05/2 1	943	31	5,72 0	5,79 1	5,84 9	5,787
L2821 8	09/10/1 8	15/11/2 1	1133	38	6,02 1	5,83 2	5,90 4	5,919
L3471 8	13/12/1 8	13/12/1 8	0	0	5,74 0	5,77 0		5,755
L3471 8	13/12/1 8	09/03/2 1	817	27	6,34 5	6,35 4	6,33 6	6,345
L3471 8	13/12/1 8	09/05/2 1	878	29	5,94 1	6,49 7	6,21 1	6,216
L3471 8	13/12/1 8	16/11/2 1	1069	36	6,12 2	6,32 8	6,40 9	6,286
L0041 9	04/01/1 9	04/01/1 9	0	0	5,55 0	5,53 0		5,540
L0041 9	04/01/1 9	09/03/2 1	795	27	6,46 8	6,86 9	6,66 7	6,668
L0041 9	04/01/1 9	23/03/2 1	809	27	6,70 3	6,43 6	6,94 5	6,695
L0041 9	04/01/1 9	23/04/2 1	840	28	7,20 6	7,17 2	7,10 9	7,162
L0041 9	04/01/1 9	09/05/2 1	856	29	6,53 6	6,82 4	6,81 0	6,723
L0041 9	04/01/1 9	16/11/2 1	1047	35	6,95 4	7,02 3	7,01 8	6,998
L0111 9	11/01/1 9	11/01/1 9	0	0	5,84 0	5,86 0		5,850
L0111 9	11/01/1 9	09/03/2 1	788	26	7,03 3	6,86 5	6,70 6	6,868

L0111 9	11/01/1 9	09/05/2 1	849	28	6,79 0	6,94 5	7,01 7	6,917
L0111 9	11/01/1 9	16/11/2 1	1040	35	6,88 7	6,98 2	6,72 4	6,864
L0272 0	27/01/2 0	27/01/2 0	0	0	5,10 0	5,30 0		5,200
L0272 0	27/01/2 0	29/03/2 1	427	14	5,51 0	5,60 4	5,54 4	5,553
L0272 0	27/01/2 0	13/05/2 1	472	16	5,41 1	5,41 9	5,39 2	5,407
L0272 0	27/01/2 0	17/11/2 1	660	22	5,73 1	5,59 7	5,72 9	5,686
L2532 0	09/09/2 0	09/09/2 0	0	0	6,14 0	6,26 0		6,200
L2532 0	09/09/2 0	29/03/2 1	201	7	6,45 3	6,49 3	6,53 1	6,492
L2532 0	09/09/2 0	13/05/2 1	246	8	6,65 3	6,69 8	6,59 0	6,647
L2532 0	09/09/2 0	17/11/2 1	434	14	6,81 9	6,75 2	6,71 1	6,761
L2532 0	09/09/2 0	08/06/2 2	637	21	6,60 7	6,40 9	6,52 7	6,514
L0482 1	17/02/2 1	19/02/2 1	2	0	4,08 8	4,09 2	4,11 7	4,099
L0482 1	17/02/2 1	12/05/2 1	84	3	3,97 0	4,18 9	4,14 7	4,102
L0482 2	17/02/2 1	17/11/2 1	273	9	4,00 8	4,38 7	4,27 2	4,222
L0482 2	17/02/2 1	08/06/2 2	476	16	4,47 5	4,02 5	4,20 0	4,233

Anexo 6. Valores de determinación de pH.

LOTE	F ELAB	FECHA	DÍAS	MESES	MEDIDAS			pH
L20718	26/07/18	26/07/18	0	0	3,2			3,20
L20718	26/07/18	01/03/21	952	32	3,13	3,17	3,11	3,14
L20718	26/07/18	22/04/21	1001	33	3,25	3,25	3,22	3,24
L20718	26/07/18	09/05/21	1018	34	3,26	3,24	3,27	3,26
L20718	26/07/18	15/11/21	1208	40	3,24	3,25	3,25	3,25
L28218	09/10/18	09/10/18	0	0	3,3			3,30
L28218	09/10/18	09/03/21	882	29	3,36	3,33	3,35	3,35
L28218	09/10/18	09/05/21	943	31	3,38	3,35	3,38	3,37
L28218	09/10/18	15/11/21	1133	38	3,35	3,37	3,37	3,36

L34718	13/12/18	13/12/18	0	0	3,2			3,20
L34718	13/12/18	09/03/21	817	27	3,38	3,39	3,36	3,38
L34718	13/12/18	09/05/21	878	29	3,27	3,26	3,26	3,26
L34718	13/12/18	16/11/21	1069	36	3,4	3,41	3,38	3,40
L00419	04/01/19	04/01/19	0	0	3,3			3,30
L00419	04/01/19	09/03/21	795	27	3,36	3,35	3,34	3,35
L00419	04/01/19	22/04/21	839	28	3,36	3,38	3,35	3,36
L00419	04/01/19	09/05/21	856	29	3,4	3,41	3,4	3,40
L00419	04/01/19	16/11/21	1047	35	3,4	3,4	3,39	3,40
L01119	11/01/19	11/01/19	0	0	3,2			3,20
L01119	11/01/19	09/03/21	788	26	3,33	3,32	3,35	3,33
L01119	11/01/19	09/05/21	849	28	3,36	3,35	3,36	3,36
L01119	11/01/19	16/11/21	1040	35	3,34	3,37	3,34	3,35
L02720	27/01/20	27/01/20	0	0	3,5			3,50
L02720	27/01/20	29/03/21	427	14	3,34	3,33	3,33	3,33
L02720	27/01/20	13/05/21	472	16	3,35	3,37	3,36	3,36
L02720	27/01/20	17/11/21	660	22	3,27	3,3	3,29	3,29
L25320	09/09/20	09/09/20	0	0	3,6			3,60
L25320	09/09/20	29/03/21	201	7	3,28	3,28	3,28	3,28
L25320	09/09/20	13/05/21	246	8	3,31	3,3	3,31	3,31
L25320	09/09/20	17/11/21	434	14	3,32	3,34	3,34	3,33
L04821	17/02/21	18/02/21	1	0	3,4			3,40
L04821	17/02/21	12/05/21	84	3	3,39	3,38	3,4	3,39
L04821	17/02/21	17/11/21	273	9	3,33	3,34	3,35	3,34

Anexo 7. Prueba t de comparación de medias de los resultados obtenidos de los diferentes métodos de determinación de CAT.

Hipótesis nula: $media1 = media2$

Hipótesis alternativa: $media1 \neq media2$

asumiendo varianzas iguales: $t = -3,09749$ $P = 0,00421128$

Rechazar la hipótesis nula para $\alpha = 0,05$.

Anexo 8. Análisis de varianza y parámetros de la regresión de CAT en el tiempo.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	F	P
Modelo	2,10428	8	0,263035	366,78	0,0000
Residuos	0,00502	7	0,000717143		
Total (Corr.)	2,1093	15			

R-cuadrado = 99,762 por ciento

R-cuadrado (ajustado por GL) = 99,49 por ciento

R-cuadrado (predicho) = 98,794 por ciento

Error estándar de Est. = 0,0267795

Error absoluto medio = 0,0157109

Estadístico de Durbin-Watson = 2,89129 ($P=0,6749$)

$CAT = \exp(4,44006 - 0,00486678 * t(\text{meses}))$

Anexo 9. Análisis de varianza y parámetros de la regresión de humedad en el tiempo.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>GL</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Modelo	26,7763	8	3,34704	38,27	0,0000
Residuos	2,44879	28	0,0874568		
Total (Corr.)	29,2251	36			

R-cuadrado = 91,6209 por ciento
R-cuadrado (ajustado por GL) = 89,2269 por ciento
R-cuadrado (predicho) = 83,4954 por ciento
Error estándar de Est. = 0,295731
Error absoluto medio = 0,187902
Estadístico de Durbin-Watson = 2,04883 (P=0,1381)

$$H = 5,76917 + 0,0354178 * t(\text{meses})$$

Anexo 10. Análisis de varianza y parámetros de la regresión de actividad de agua en el tiempo.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>GL</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Modelo	0,00838824	8	0,00104853	37,25	0,0000
Residuos	0,000788091	28	0,0000281461		
Total (Corr.)	0,00917633	36			

R-cuadrado = 91,4117 por ciento
R-cuadrado (ajustado por GL) = 88,9579 por ciento
R-cuadrado (predicho) = 82,6916 por ciento
Error estándar de Est. = 0,00530529
Error absoluto medio = 0,00326156
Estadístico de Durbin-Watson = 1,98329 (P=0,0967)

$$aw = \text{sqrt}(0,130886 + 0,000616901 * t(\text{meses}))$$

Anexo 11. Análisis de varianza y parámetros de la regresión de pH en el tiempo.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>GL</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Modelo	0,000966875	8	0,000120859	2,79	0,0247
Residuos	0,00104111	24	0,0000433797		
Total (Corr.)	0,00200799	32			

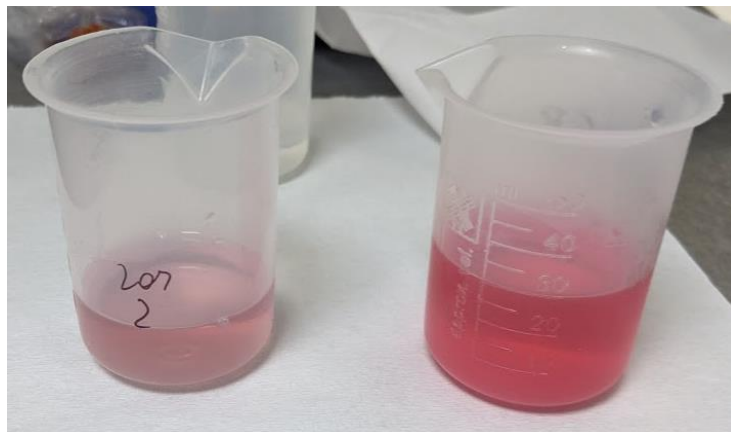
R-cuadrado = 48,1514 por ciento
R-cuadrado (ajustado por GL) = 30,8686 por ciento
R-cuadrado (predicho) = 4,04891 por ciento
Error estándar de Est. = 0,00658633
Error absoluto medio = 0,00402323
Estadístico de Durbin-Watson = 2,77457 (P=0,8742)

$$pH = 1 / (0,3017 - 0,00000589793 * (t(\text{meses}))^2)$$

Anexo 12. Proceso de filtración del extracto de antocianinas para la determinación de CAT.



Anexo 13. Comparación del extracto de antocianinas equilibrado a pH 4,5 y pH 1.

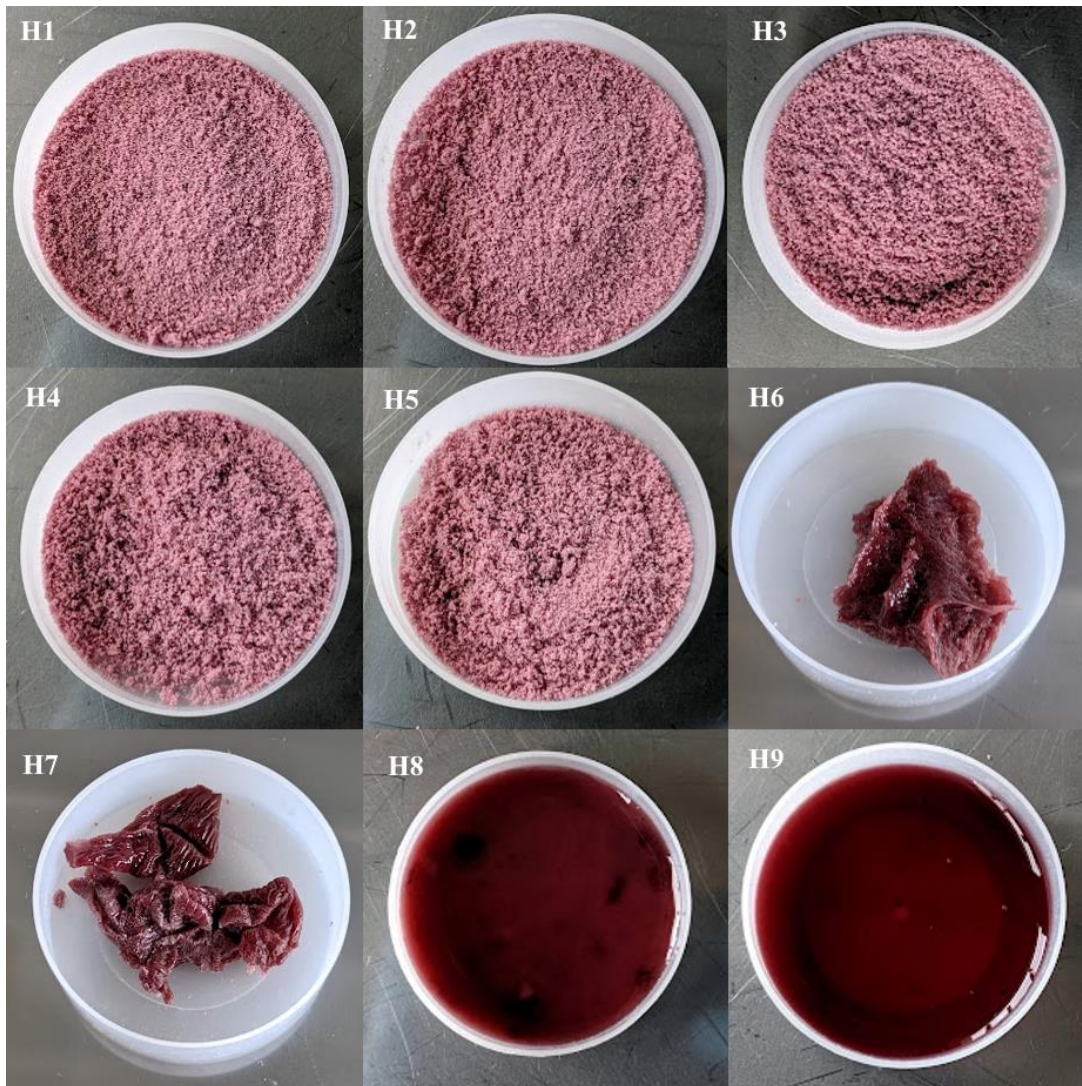


Nota: A la izquierda el extracto equilibrado a pH 4,5 y a la derecha a pH 1.

Anexo 14. Medición de la absorbancia de los extractos de antocianinas para la determinación de CAT.



Anexo 15. Alícuotas acondicionadas para la determinación de la isoterma de sorción.



Anexo 16. Determinación de la actividad de agua de las alícuotas acondicionadas.



Anexo 17. Análisis visual para la evaluación de las propiedades organolépticas del líquido reconstituido.



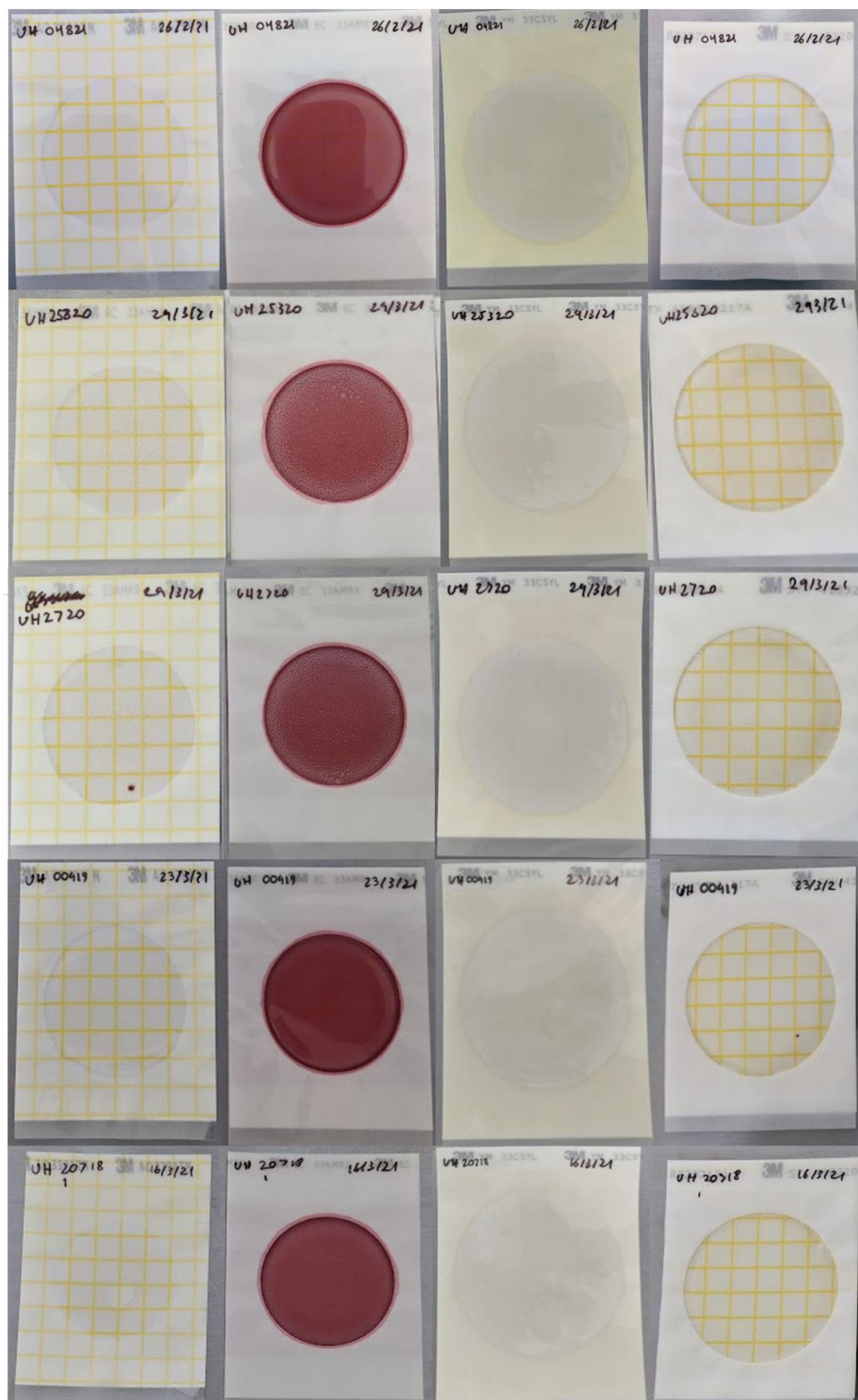
Nota: De izquierda a derecha: L04821, L25320, L02720, L01119, L28218 y L20718.

Anexo 18. Análisis visual para la evaluación de las propiedades organolépticas del producto en forma de polvo.



Nota: De izquierda a derecha, arriba: L20718, L28218 y L01119; y abajo: L02720, L25320 y L04821.

Anexo 19. Placas Petrifilm para el análisis microbiológico.



Nota: De izquierda a derecha: AC, EC/CO, ML y ST. De arriba hacia abajo: L04821, L25320, L02720, L00419 y L20718.

* Las manchas que se encuentran en las placas AC L02720 y ST 00419 no corresponden a colonias ya que no poseen la coloración ni las características correspondientes.