



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

ELABORACIÓN DE ENCAPSULADOS DE EXTRACTO DE FRUTA
MILAGROSA (*Synsepalum dulcificum*) COMO AGENTE MODIFICADOR
DEL SABOR.

AUTOR

Franklin Mauricio Garrido Gutiérrez

AÑO

2020



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

ELABORACIÓN DE ENCAPSULADOS DE EXTRACTO DE FRUTA
MILAGROSA (*Synsepalum dulcificum*) COMO AGENTE MODIFICADOR DEL
SABOR.

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos
establecidos para optar por el título de Ingeniero Agroindustrial y de alimentos

Profesor Guía

PhD. María Elizabeth Mosquera Quelal

Autor

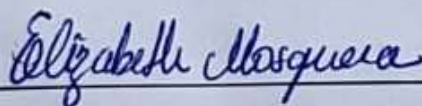
Franklin Mauricio Garrido Gutiérrez

Año

2020

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

"Declaro haber dirigido el trabajo, Elaboración de encapsulados de extracto de fruta milagrosa (*Synsepalum dulcificum*) como agente modificador del sabor, a través de reuniones periódicas con el estudiante Franklin Mauricio Garrido Gutiérrez, en el semestre 202010, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".



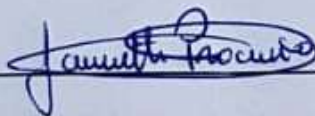
Maria Elizabeth Mosquera Quelal

Doctora en Ingeniería Industrial

C.I.: 1715044192

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

"Declaro haber revisado este trabajo, Elaboración de encapsulados de extracto de fruta milagrosa (*Synsepalum dulcificum*) como agente modificador del sabor, del estudiante Franklin Mauricio Garrido Gutiérrez, en el semestre 202010, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".



Janeth Fabiola Proaño Bastidas

Doctora en Ingeniería Industrial

C.I.: 1706515564

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

"Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes."



Franklin Mauricio Garrido Gutiérrez

C.I.: 1725988255

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por bendecirme con vida, salud y fortaleza para cumplir uno de mis sueños más anhelados.

A mis padres, hermano, abuelos y demás familia, que siempre brindaron su amor y paciencia, siendo la inspiración para salir adelante.

A mis amigos Camila, Katherine, Pablo y María que hicieron de mi vida universitaria, un recuerdo inolvidable de verdadera amistad.

Finalmente, a mis docentes, que más que sólo maestros, fueron amigos, especialmente a Elizabeth Mosquera, quien formó mis conocimientos en varios semestres y al final me brindó su ayuda incondicional en la presente investigación.

DEDICATORIA

En honor a Eduardo Aníbal
Gutiérrez Vaca y María Luisa
Santacruz Cruz, mis ángeles en
el cielo.

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo la elaboración de encapsulados de extracto de fruta milagrosa (*Synsepalum dulcificum*) como agente modificador del sabor. La elaboración de encapsulados se realizó mediante dos metodologías, esferificación directa, cuyos tratamientos variaron en la concentración de alginato de sodio (2 %, 3 % y 4 %) y en los tiempos de exposición a la solución de cloruro de calcio de 6 % (30 segundos, 1 minuto y 2 minutos) y, por esferificación inversa cuyos tratamientos variaron en la concentración de lactato de calcio (3 %, 4 % y 5 %) y en los tiempos de exposición a la solución de alginato de sodio al 0.75 % (30 segundos, 1 minuto y 2 minutos), adicionalmente, en esta segunda, se requirió 0.4 % de goma xantana para aumentar la viscosidad de la sustancia a esferificar. Realizados los tratamientos, por esferificación directa se obtuvo esferas completamente gelificadas siendo las esferas del tratamiento T5, las de mayor resistencia (alginato 3% y 1 minuto de exposición), mientras que, en la esferificación inversa, se obtuvo esferas que conservan el extracto de fruta milagrosa en estado líquido dentro de una matriz de gel; en esta metodología la mejor resistencia se presentó en el tratamiento T18 (lactato de calcio 5% y 2 minutos de exposición). Respecto a la exposición de las esferas a bebidas (infusión de frutas cítricas), las esferas elaboradas por ambas metodologías son resistentes, sin embargo, en bebidas extremadamente ácidas, con un pH de 3.11, las esferas elaboradas por esferificación directa tienen mayor resistencia. Se determinó que las esferas mantienen todas sus características por 60 días, posterior a este tiempo, sus características físicas y químicas se vieron afectadas, no obstante, microbiológicamente fueron estables hasta 180 días. En el estudio se definió, en las distintas metodologías, la cinética de formación de gel y la relación directa entre la concentración y el tiempo de exposición con la resistencia de los encapsulados, adicional, se concluyó que la interacción osmótica entre la esfera y el líquido de gobierno es causal de inestabilidad, sin embargo, los hallazgos del estudio de encapsulados de fruta milagrosa hacen que puedan ser aplicados como sustituto de azúcar y edulcorantes no calóricos en bebidas.

ABSTRACT

The present study aimed at the development of encapsulated miraculous fruit extract (*Synsepalum dulcificum*) as a flavor modifying agent. The encapsulation was prepared using two methodologies, direct spherification, whose treatments varied in the concentration of sodium alginate (2%, 3% and 4%) and in the exposure times to the calcium chloride solution of 6% (30 seconds, 1 minute and 2 minutes) and, by inverse spherification whose treatments varied in the concentration of calcium lactate (3%, 4% and 5%) and in the times of exposure to the 0.75% sodium alginate solution (30 seconds, 1 minute and 2 minutes), additionally, in this second, 0.4% xanthan gum was required to increase the viscosity of the substance to be spherified. After the treatments, by direct spherification, completely gelled spheres were obtained, the spheres of the T5 treatment being the ones with the highest resistance (3% alginate and 1 minute exposure), while, in reverse spherification, spheres were obtained that preserve the extract miraculous fruit in a liquid state within a gel matrix; In this methodology the best resistance was presented in the T18 treatment (5% calcium lactate and 2 minutes of exposure). Regarding the exposure of the spheres to beverages (infusion of citrus fruits), the spheres made by both methodologies are resistant, however, in extremely acidic beverages, with a pH of 3.11, the spheres made by direct spherification have greater resistance. It was determined that the spheres maintain all their characteristics for 60 days, after this time, their physical and chemical characteristics were affected, however, microbiologically they were stable for up to 180 days. In the study it was defined, in the different methodologies, the kinetics of gel formation and the direct relationship between the concentration and the exposure time with the resistance of the encapsulates, additionally, it was concluded that the osmotic interaction between the sphere and the liquid The government is a cause of instability, however, the findings of the study of encapsulated miraculous fruit mean that they can be applied as a substitute for sugar and non-caloric sweeteners in beverages.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS:	3
Objetivo general	3
Objetivos específicos	3
1. MARCO TEÓRICO.....	3
1.1. Fruta milagrosa (<i>Synsepalum dulcificum</i>).....	3
1.1.1. Origen y producción.....	4
1.1.2. Características fisicoquímicas	6
1.1.2.1. Propiedades físicas	6
1.1.2.2. Composición bioquímica	8
1.2. Encapsulados.....	9
1.2.1. Producción de encapsulados a nivel mundial	9
1.2.2. Producción de encapsulados en Ecuador	11
1.2.3. Técnicas de encapsulación	12
1.2.4. Gelación iónica	13
1.2.4.1. Esferificación directa	14
1.2.4.2. Esferificación inversa.....	15
1.2.5. Alginato de sodio	16
1.2.6. Citrato de sodio.....	17
1.2.7. Cloruro de calcio.....	17
1.2.8. Goma Xantana.....	18
1.2.9. Lactato de calcio.....	18
1.3. Modificación del sabor.....	18
1.3.1. Sabor	18
1.3.2. Acción de la miraculina sobre el sabor	19
2. METODOLOGÍA.....	21

2.1. Materiales y equipos	21
2.1.1. Materiales, insumos y equipos de laboratorio.....	21
2.1.1.1. Materiales de laboratorio	21
2.1.1.2. Insumos de laboratorio	22
2.1.1.3. Equipos de laboratorio.....	22
2.1.2. Materiales y equipos de oficina.....	23
2.2. Métodos	23
2.2.1. Ubicación del experimento	23
2.2.2. Condiciones ambientales.....	23
2.2.3. Estadística	24
2.2.3.1. Diseño experimental.....	24
2.2.3.2. Factores de estudio.....	24
2.2.3.3. Hipótesis.....	25
2.2.3.4. Tratamientos	26
2.2.3.5. Unidad experimental.....	28
2.2.3.6. Esquema ADEVA	28
2.2.3.7. Variables	29
2.2.3.8. Análisis funcional.....	30
2.2.4. Manejo del experimento	30
2.2.4.1. Obtención de extracto de fruta milagrosa.....	30
2.2.4.2. Regulación de pH.....	32
2.2.4.3. Esferificación directa	33
2.2.4.4. Esferificación inversa.....	37
2.2.4.5. Determinación de resistencia	40
2.2.4.6. Estabilidad.....	40
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
3.1. Obtención de extracto de fruta milagrosa	48
3.2. Regulación de pH.....	51
3.3. Esferificación directa	53
3.4. Esferificación inversa.....	56

3.5. Determinación de resistencia	59
3.5.1. Análisis de varianza.....	62
3.5.2. Resistencia de esferas a bebidas	68
3.6. Modificación del sabor.....	71
3.7. Estabilidad.....	72
4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	79
4.1. Conclusiones.....	79
4.2. Recomendaciones.....	81
REFERENCIAS.....	83
ANEXOS	88

INTRODUCCIÓN

El panel sobre Nutrición, Nuevos Alimentos y Alérgenos Alimentarios (NDA) de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), en estudios realizados en 2011 respecto de la sustitución de la sacarosa por diferentes agentes endulzantes concluye que, el uso de aditivos edulcorantes inciden de manera positiva en el metabolismo de los carbohidratos simples, pues, se comprobaron las funciones como sustitutos del azúcar común, pues disminuyen los niveles de azúcar en sangre, logrando frenar alteraciones como sobrepeso y obesidad; adicional a esto, evita la desmineralización de las piezas dentales (EFSA, 2013).

El consumo masivo de edulcorantes no calóricos se debe a la gran presencia de productos alimenticios procesados con azúcar, por lo cual se incrementa la búsqueda de productos con un menor aporte calórico. Según la Organización Panamericana de la Salud (OPS), en 12 países latinoamericanos, se observó una tendencia al consumo de alimentos procesados con altas concentraciones de azúcar aumentando el consumo en un tercio entre los años 1999 y 2013 (Almeida, 2013). Es por este motivo que, en el año 2014, se inició un plan regional para evitar la obesidad y la diabetes buscando reducir la mortalidad prematura a causa de estas enfermedades que alcanzará el 25 % para el 2025 (OPS, 2015).

El consumo de azúcar en los productos procesados ha disminuido por la utilización de edulcorantes no calóricos, sin embargo, se han reportado alteraciones causadas por el consumo de los mismos, como la muerte de la flora bacteriana de los consumidores (Hernández y Vázquez, 2019). Las diversas afecciones se deben a la presencia de edulcorantes en la mayoría de productos procesados, que por ser altamente consumidos, pueden llevar a consecuencias dañinas (OPS, 2014).

El conocido fruto milagroso (*Synsepalum dulcificum*), según investigaciones realizadas en los últimos años, posee un componente de interés respecto a la modificación del sabor. Esta baya, posee una sustancia denominada miraculina, de amplio interés en el campo de la industria alimentaria para la reducción del consumo de azúcar y edulcorantes. El citado componente constituye una glicoproteína capaz de otorgar una sensación de dulzor a alimentos, cuyos sabores característicos son el amargo y el ácido, en los receptores de la lengua; por tanto, se busca realizar una encapsulación de miraculina para la aplicación en bebidas no alcohólicas y, de esta manera, reducir el consumo de azúcar y edulcorantes (Hudson, Sims, y Odabasi, 2018).

La encapsulación es un proceso en el cual se busca formar esferas que contengan una sustancia de interés, esta operación se logra a través de varias metodologías. El proceso de gelificación es uno de los más eficientes para la fabricación de esferas que contengan compuestos cuyo efecto implique modificación del atributo del sabor. La gelificación puede realizarse bajo dos modalidades, directa o inversa; para esto, es necesario utilizar alginato de sodio, polisacárido extraído principalmente de algas pardas o marrones, estas son capaces de otorgar la capacidad de gelificación al tener contacto con una sal cálcica y, de esta manera, obtener la encapsulación (Pasin B. L., 2012).

Los datos citados previamente, apoyan la propuesta del planteamiento de una nueva alternativa que busca la utilización del fruto milagroso. La presencia de miraculina en un alimento procesado evitará el consumo de azúcar, por ende, las derivadas afectaciones a la salud.

En el capítulo 1, Marco teórico, se describe las bases teóricas que sustentan la presente investigación.

En el capítulo 2, Metodología, se detallan las técnicas aplicadas para cumplir los objetivos planteados.

En el capítulo 3, Resultados y discusión, se muestra el análisis de los resultados obtenidos a través de la experimentación.

En el capítulo 4, Conclusiones y recomendaciones, se describe de manera concreta los hallazgos de la investigación y se brinda aportaciones para próximas investigaciones afines.

OBJETIVOS:

Objetivo general

Elaborar encapsulados de extracto de la fruta milagrosa (*Synsepalum dulcificum*) como agente modificador del sabor.

Objetivos específicos

- Determinar la resistencia de encapsulados de extracto de fruta milagrosa elaborados mediante esferificación directa.
- Determinar la resistencia de encapsulados de extracto de fruta milagrosa elaborados mediante esferificación inversa.
- Identificar la metodología de encapsulado que permita la mayor resistencia de la esfera al tiempo de exposición a bebidas.

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Fruta milagrosa (*Synsepalum dulcificum*)

1.1.1. Origen y producción

La fruta milagrosa pertenece a la familia *Sapotaceae*, es nativa de África occidental tropical, de modo que se encuentra originariamente en países como Ghana y Benín (Hudson, 2018). En la Figura 1, se observa las zonas de producción de fruta milagrosa en distintos países de América como Ecuador, Costa Rica, Panamá, Honduras y Estados Unidos; en el continente asiático se concentra en Sri Lanka, China, Birmania, Filipinas y Singapur; sin embargo, la mayor concentración se da en la zona africana, donde su principal uso se da en el consumo de bebidas, mientras que las hojas, raíces y corteza de la planta, se utiliza de manera tradicional para tratamientos de diabetes, tos y afecciones estomacales (Tchokponhoué, 2017). La fruta milagrosa, a pesar de los años que lleva introducida en otros países, no ha tenido producción tecnificada a nivel industrial, por lo cual, no se tiene registros precisos de la producción a nivel mundial; adicional a esto, no se ha cultivado ampliamente, por su lenta tasa de crecimiento y su fase juvenil prolongada. La fruta milagrosa requiere entre 3 a 4 años para comenzar a fructificar, es por este motivo que se descuida el cultivo de esta planta, mientras que en su hábitat natural se ha visto que presenta una mala condición física por la incapacidad de competir contra malezas y perturbaciones causadas por el hombre (Tchokponhoué, 2017). Es por este motivo que se inician investigaciones para acelerar la transición a la madurez por medio de inducción ambiental, inducción autónoma o el uso de reguladores de crecimiento y así, lograr un incremento de la producción de fruta milagrosa de manera tecnificada y eficiente a nivel mundial.

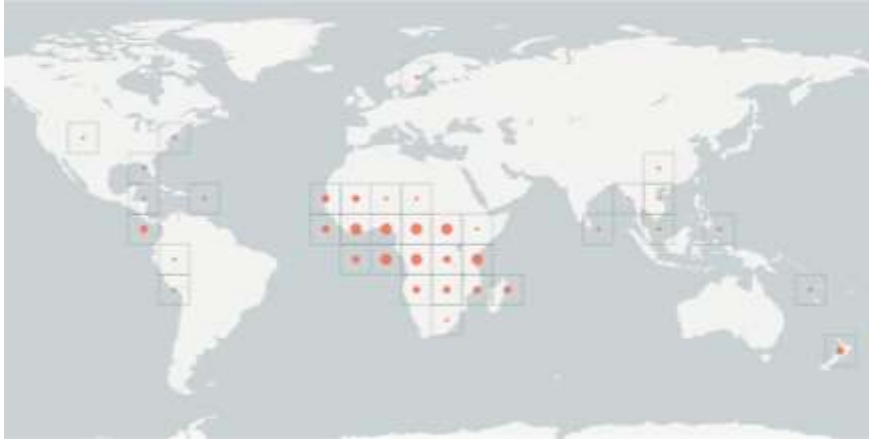


Figura 1. Mapa mundial de zonas de producción de fruta milagrosa.

Tomado de (GBIF, 2019).

En el continente Americano, la empresa llamada Miracle Fruit Farm posee la mayor producción de fruta milagrosa, ubicada al suroeste central de Miami en el distrito agrícola Redlands (Figura 2.), empresa certificada con buenas prácticas agrícolas (BPA), certificación libre de organismos genéticamente modificados (GMO FREE), entre otras certificaciones (Miracle Fruit Farm, 2019). La empresa posee más de 14000 plantas, las cuales se vende en fresco, en pastillas y en polvo liofilizado (Madan, 2017).



Figura 2. Ubicación de Miracle fruit farm.

Adaptado de (Miracle Fruit Farm, 2019).

En Ecuador, existe una empresa familiar “Ecuaforestar” dedicada a la producción de la fruta milagrosa. La empresa está ubicada en el recinto El Limón, Vía Santo Domingo – Quinindé (Figura 3.). Esta empresa tiene un cultivo tradicional de 6000 plantas distribuidas en 2 hectáreas y una producción de 440 frutos en promedio en cada una de la cosechas, anualmente se realizan 3 cosechas (Ecuaforestar, 2019). Es así que esta empresa tiene el mayor cultivo de fruta milagrosa del país. Se reportan otros viveros con pocas plantas, sin embargo, estas son para consumo propio o de colección.



Figura 3. Ubicación de Ecuaforestar.

Adaptado de (Ecuaforestar, 2019).

1.1.2. Características fisicoquímicas

1.1.2.1. Propiedades físicas

El arbusto perenne *Synsepalum dulcificum* produce como fruto, bayas pequeñas elipsoidales de 1.2 a 3 cm de largo por 0.6 a 1.2 cm de ancho de un peso promedio de 1 gramo (Figura 4.). La baya es de color rojo brillante en su pericarpio, al interior de la cáscara se encuentra la parte comestible constituida

por un mesocarpio carnoso, este es delgado y de color blanco; esta pulpa tiene un sabor agridulce y es el lugar donde se encuentra la miraculina, cuya función radica en la modificación del sabor. Finalmente, en el centro del fruto se encuentra el endocarpio o semilla de forma alargada, que al desprender el mesocarpio, se la visualiza de color negro (Figura 5.) (Tchokponhoué, 2017).



Figura 4. Fruto de Synsepalum dulcificum.

Tomado de (PicClick, 2019).



Figura 5. Estructura del fruto de Synsepalum dulcificum.

Adaptado de (Botanical Growers, 2019).

1.1.2.2. Composición bioquímica

El fruto posee en su composición un porcentaje de agua entre 60 % a 66 %, lo cual disminuye la vida útil de la baya por tener alta actividad de agua (Nkwocha, 2014). A pesar del tamaño y la pequeña cantidad comestible, el fruto tiene alto contenido de compuestos fenólicos, aproximadamente 625.6 mg por cada 100 g de pericarpio y pulpa. En el fruto, los compuestos fenólicos que se hallan principalmente son flavonoides y antocianos (Martínez, 2016), los mismos que tienen un gran poder antioxidante, además de ser los responsables del color rojo del fruto (Peñarrieta y Tejeda, 2014). La baya posee un contenido bajo en azúcares, alrededor de 22.5 %, del cual se estima un 5.6 % de monosacáridos como glucosa, ribosa, arabinosa, galactosa y ramnosa, contiene además 12.5 mg de fibra alimentaria por cada 100g de peso fresco.

Los aminoácidos que se encuentran en mayor cantidad son glicina, valina, lisina, ácido aspártico y ácido glutámico (Martínez, 2016). En total, el fruto posee alrededor de 7.75 % de proteína. En el caso de vitaminas y minerales posee aproximadamente 100 ppm de calcio, 24.20 ppm de hierro, 9.49 ppm de zinc, 6.22 ppm de cobre, 0.01 ppm de cromo y 0.01 ppm de cobalto y, es fuente de vitamina A, vitamina C, vitamina D y vitamina K (Nkwocha, 2014).

Adicional a los componentes anteriormente mencionados y que se observan en la Tabla 1., la fruta milagrosa posee un componente destacado y de mayor interés denominado miraculina, glucoproteína (proteínas que contienen oligosacáridos (glucanos) unidos covalentemente a la unidad proteica “aminoácidos”) (Rodwell, 2016), que está presente en la pulpa del fruto y es capaz de modificar la sensación de los sabores ácidos a dulces. La miraculina está constituida por 191 aminoácidos unidos por enlaces disulfuro intermoleculares, posee un punto isoeléctrico de 8.3 a 9 y un peso molecular de 44000 daltones (Martínez, 2016). Por su naturaleza proteica, la miraculina es termolábil y sensible a un pH sumamente ácido, es decir que, si se expone esta

proteína a altas temperaturas (por encima de 100 °C) o a un pH menor a 3, la glucoproteína se desnaturaliza y pierde las propiedades modificadoras de sabor (Socolovsky, 2014). Es por esto que, para la conservación de la baya y de sus características químicas, se recomienda los procesos de congelación o liofilización, de igual manera, para aplicaciones en alimentos, debe tomarse en cuenta que no se puede someter a la miraculina a procesos de cocción, escaldado o fritura (Martínez, 2016).

Tabla 1.

Composición nutricional del fruto de Synsepalum dulcificum

Componente	g/ 100g de peso fresco
Agua	65.33
Grasa	0
Carbohidratos	22.5
Monosacáridos	5.6
Fibra dietética	0.0125
Proteína	7.75
Vitamina A	0.0373
Vitamina C	0.0401
Cenizas	1
Compuestos fenólicos totales	0.6256

Adaptado de (Nkwocha, 2014) (Martínez, 2016).

1.2. Encapsulados

1.2.1. Producción de encapsulados a nivel mundial

Los encapsulados en el sector alimentario, se han utilizado como una opción para proteger sustancias de interés como probióticos, nutracéuticos, vitaminas, pigmentos, extractos y concentrados ante agentes ambientales que afectan la

viabilidad de los efectos buscados (Sneyder, 2016). Es así que, en los años 80 en Taiwán, se inicia con la tendencia del té de burbujas, generalmente conocido como bubble tea, que es un té de distintos sabores al cual se adiciona perlas (encapsulados) de sabores (Figura 6.) (Bubbletea, 2019).



Figura 6. Encapsulaciones de sabores para bubble tea.

Adaptado de (Embobate, 2019).

Una de las primeras empresas en fabricar este tipo de bebidas fue *Chen En Food Product Enterprise Co., Ltd*, fundada en el año de 1983 y desde entonces promueve el consumo de bubble tea (Ta chung ho, 2019). Este tipo de té se expandió rápidamente por el mundo, llegando a ser consumido en América, Europa, Asia y Oceanía. En la actualidad, una de las empresas más grandes dedicadas a la elaboración de encapsulados es *GONG CHA* (McGrath, 2018), una empresa taiwanesa, que cuenta con más de 1500 tiendas en el mundo, distribuidas en distintos países (Figura 7.) (Gong Cha, 2019).



Figura 7. Países en los que se encuentra GONG CHA.

Tomado de (Gong Cha, 2019).

1.2.2. Producción de encapsulados en Ecuador

En Ecuador, al igual que en el mundo, se investiga sobre encapsulados con sustancias funcionales. No obstante, la tendencia del té de burbujas también llegó al Ecuador, sin embargo son muy pocas las empresas conocidas y dedicadas a la elaboración de este tipo de producto. Una de las más importantes se fundó en Quito en el año 2017, en la actualidad cuenta con 6 establecimientos distribuidos en distintas ciudades, 4 locales se encuentran en Quito, uno en Santo Domingo y finalmente un establecimiento en Manta. La empresa ha tenido aceptación por tener bebidas calientes y frías, frutales y cremosas (con crema no láctea) de sabores como arándano, fresa, mango, chocolate, almendra, café, entre otros (Embobate, 2019).

Otra empresa ecuatoriana distinguida es Bubble Tea y Pearl Tea, sus actividades iniciaron a finales del año 2016 y se expandieron en el país; hoy cuentan con 6 establecimientos en total, uno en cada una de las siguientes ciudades: Quito, Ambato, Cuenca, Loja, Manta y Portoviejo (Bubbletea, 2019).

1.2.3. Técnicas de encapsulación

Existen diversas técnicas de encapsulación mecánica, físico-química y química; las mismas pueden ser utilizadas de distintas maneras en la industria alimentaria. La encapsulación es una forma de conservación o mejora de propiedades en el manejo y producción de ingredientes alimenticios tales como vitaminas, enzimas, sabores, aromas, microorganismos, acidulantes, entre otros (Sneyder, 2016).

Entre las técnicas más conocidas y utilizadas por el bajo costo, se encuentra el método de secado por atomización, frecuentemente se encapsula ingredientes alimenticios como vitaminas, probióticos, antioxidantes (Díaz y Torres, 2017). Se caracteriza por transformar un material líquido en sólido para atrapar sustancias sensibles dentro de una matriz, la misma que constituye una barrera que evita la pérdida de las sustancias, aumenta la estabilidad y la biodisponibilidad (Díaz y Torres, 2017).

El método se realiza en tres fases: la preparación de una emulsión del material de interés con una solución de agentes encapsulantes como almidones modificados, maltodextrina o gomas, el agente encapsulante debe ser inmisible, de baja viscosidad y alto peso molecular para evitar problemas de aglomeración, apelmazamiento y pegajosidad, igualmente permite disminuir el tiempo de secado y formar una capa con alto contenido de sólidos; posteriormente, se homogeneiza la emulsión y en último lugar se atomiza en la cámara de secado donde la emulsión se seca creando encapsulados de tamaño menor a 100 μm , el mismo que depende de la velocidad de alimentación, flujo de alimentación y de la viscosidad de la emulsión (Guevara, 2008).

Otro método muy conocido es la coacervación, técnica de encapsulación físico-química donde se da la separación de un coloide solvatado en dos fases líquidas. Una de estas fases tiene alta proporción de coloide y se denomina capa

coacervado, soluto polimérico separado en pequeñas gotas líquidas, esta es obtenida por variaciones de pH, temperatura o por adición de alguna sal iónica. La otra fase presenta una baja proporción (fase sin polímero denominada solución de equilibrio). La presencia de gotas insolubles forma capsulas que, por gelificación con gelatinas o gomas, crea una película fluida que envuelve al núcleo y posteriormente se endurece y solidifica. Este método puede ser simple o complejo, la diferencia radica en utilizar un solo polímero o más de un polímero respectivamente (Nava y Álvarez, 2015).

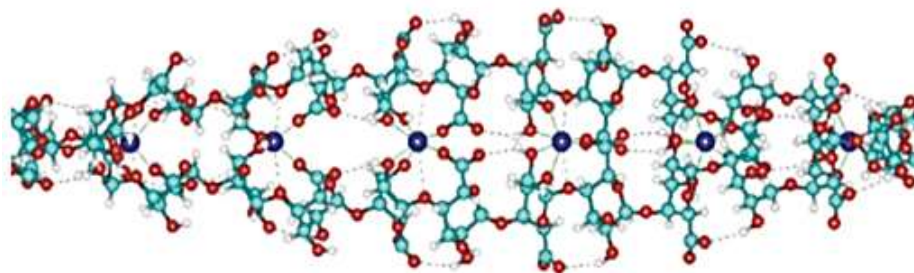
Es así que en la industria alimentaria se puede obtener distintos tipos y tamaños de encapsulados teniendo en cuenta lo que se busca encapsular, ya sean sabores, aromas o sustancias funcionales como probióticos. Conjuntamente a los métodos mencionados, existen otras técnicas como la extrusión, extrusión centrífuga, enfriamiento por atomización, o métodos químicos como la inclusión molecular y gelación iónica (Sneyder, 2016).

1.2.4. Gelación iónica

La gelación o gelificación iónica es un método químico muy utilizado en la industria alimentaria, puesto que, se puede encapsular cualquier sustancia deseada. El material generalmente utilizado como agente encapsulante es el alginato, un hidrocólide con gran capacidad gelificante al ser expuesto a iones divalentes de calcio. La gelificación es el resultado de la unión entre un G-bloque de una molécula de alginato con otro G-bloque de otra molécula de alginato por medio del ion calcio, dando un reordenamiento estructural del que resulta un material sólido con características de gel (Figura 8.) (Fernández y Castro, 2014).

La dureza de este gel aumenta al tener mayor tiempo de exposición a los iones de calcio, es decir, la dureza del gel es directamente proporcional al tiempo de exposición a los iones de calcio. Para este método, se debe tomar en cuenta

tanto la concentración de iones calcio como la concentración de alginato y el pH de la sustancia a esferificar, debido a, que el alginato pierde su propiedad gelificante cuando es expuesto a un pH extremo; por tal motivo, se debe tener un pH dentro del rango de 4 a 7 (Ortíz y Bravo, 2018). Al controlar los factores antes mencionados, se obtienen esferificaciones muy porosas, lo cual es causa de una rápida difusión de las sustancias dentro y fuera de la matriz de alginato (Guevara, 2008).



● Ca^{2+} ● ● Monómeros: ácidos β -D-manurónico y α -L-gulurónico

Figura 8. Reordenamiento estructural por unión de G-bloques de alginato por medio de iones calcio.

Tomado de (Pasin y González, 2012).

1.2.4.1. Esferificación directa

También conocida como esferificación externa, este proceso se caracteriza por la propagación del ion calcio a través de una solución que envuelve la sustancia a encapsular, misma que se encuentra combinada con el hidrocoloide “alginato”. Adicional, la generación del gel encapsulante, inicia desde la parte exterior y avanza progresivamente al interior de la esfera. Esto se debe a que los G-bloques del alginato están combinados con la sustancia, y por acción del calcio, comienzan a unirse los G-bloques resultando un gel de la sustancia de interés (Figura 9.). Frecuentemente, la sal de calcio utilizada es el cloruro de calcio por tener el mayor porcentaje de calcio disponible, siendo el resultado de la reacción $\text{Ca}(\text{Alginato})_2 + 2\text{NaCl}$; es así que se evidencia la formación de sal

común, la misma que, en este caso, no afecta el sabor de la sustancia de interés, porque el sabor salado se queda en la solución de calcio (Pasin B. L., 2012).

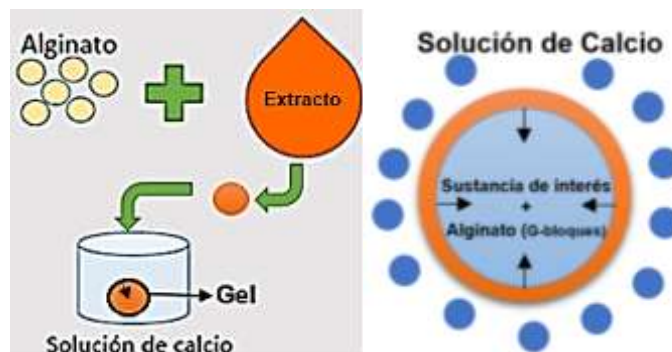


Figura 9. Esferificación directa.

Adaptado de (Camacho, 2017).

1.2.4.2. Esferificación inversa

Denominada también esferificación interna, se caracteriza por la propagación del ion calcio por medio de una mezcla compuesta por una sal cálcica y la sustancia de interés, sometida posteriormente a una solución de alginato de sodio que envuelve la sustancia a encapsular para formar un gel. Adicional, la formación del gel encapsulante es progresiva hacia el exterior creando una matriz protectora donde la sustancia de interés mantiene su estado líquido (Figura 10.). Este fenómeno se da porque la fuente de calcio está combinada con la sustancia de interés y al reaccionar con los G-bloques de la solución envolvente se inicia la restructuración de los G-bloques formando un gel de la solución envolvente (Mans y Castells, 2011).

La reacción química es idéntica a la de esferificación directa, por lo cual se obtiene como resultado $\text{Ca}(\text{Alginato})_2 + 2\text{NaCl}$; sin embargo, en este caso afecta el sabor de la esfera formada, porque el cloruro de calcio se encuentra en la

sustancia encapsulada y al reaccionar con el alginato, la sal común resultante es atrapada en el encapsulado manifestando un sabor salado en la sustancia de interés (Pasin y González, 2012).

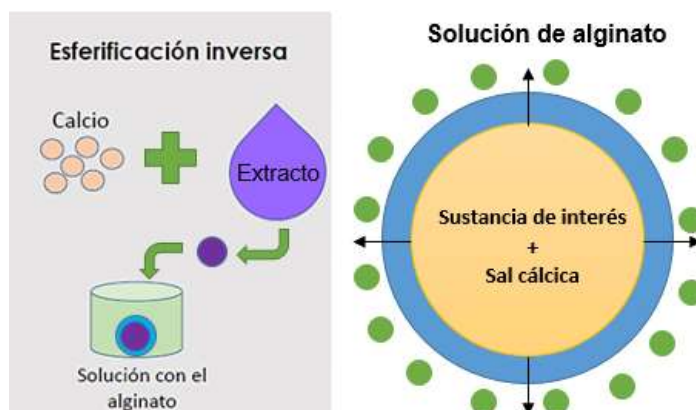
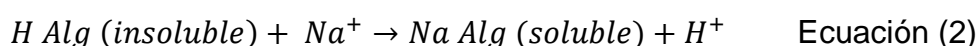
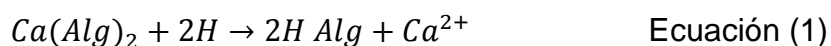


Figura 10. Esferificación inversa.

Adaptado de (Camacho, 2017).

1.2.5. Alginato de sodio

El alginato es un polímero obtenido especialmente de algas pardas alcanzando hasta el 40% de su peso seco, es extraído en dos etapas principales. Primero, un pre-tratamiento ácido para convertir las sales insolubles en ácido algínico (Ecuación 1) y segundo, la exposición del ácido a un tratamiento alcalino, donde se elimina el ácido e ingresa el sodio para obtener alginato de sodio soluble (Ecuación 2) que luego es separado, precipitado y secado (Méndez y Quintero, 2015).



Adaptado de (Mesa, 2003).

El aditivo alimentario (E-401) es un polisacárido lineal constituido por dos monómeros, el ácido β -D-manurónico (M) y el ácido α -L-gulurónico (G), los mismos que pueden constituir homopolímeros (G-bloques “guluronato” y M-bloques “manuronato” o heteropolímeros (G y M-bloques se alternan) (FAO, 2019). Esta composición del alginato es muy importante, de esto dependen las características del gel formado al contacto con iones de calcio; si existe mayor presencia de G-bloques, el gel es fuerte y frágil, mientras que cuando se tiene más M-bloques el gel es suave y elástico (Méndez y Quintero, 2015).

1.2.6. Citrato de sodio

El aditivo alimentario E-331(iii) es la sal sódica obtenida de ácido cítrico, el citrato trisódico ($C_6H_5Na_3O_7$) tiene funciones como regulador de acidez, secuestrante, estabilizador y sal emulsionante, su ingesta diaria admisible (IDA) está definida bajo buenas prácticas de fabricación (FAO, 2019). El citrato de sodio se encuentra en estado sólido en forma de cristales incoloros o polvo cristalino blanco soluble en agua, inodoro, sabor salado y presenta un pH promedio de 8 en una solución al 5% (GTM, 2014). Para la encapsulación por el método de gelificación iónica es necesario regular la acidez de sustancias muy ácidas, dado que, a un pH extremadamente bajo el alginato pierde su capacidad gelificante (Ortíz y Bravo, 2018).

1.2.7. Cloruro de calcio

El aditivo E-509 es un agente endurecedor, espesante y estabilizante, su dosis de ingesta está dado por buenas prácticas de fabricación. El cloruro de calcio ($CaCl_2$) es la sal cálcica con mayor porcentaje de calcio disponible, por esta razón contiene más iones calcio para unir los G-bloques del alginato, por este motivo es muy utilizado para realizar esferificación directa (Pasin y González, 2012). Se encuentra en estado sólido de cristales incoloros delicuescentes, es

decir, que los cristales tienen la capacidad de atrapar la humedad del ambiente y disolverse, por lo tanto es totalmente soluble en agua (FAO, 2019).

1.2.8. Goma Xantana

El aditivo E-415 se presenta en polvo de color crema, soluble en agua, sabor insípido. La goma xantana ($C_{35}H_{49}O_{29}$) es utilizado como emulsionante, espumante, estabilizante y espesante. No tiene dosis máxima, por lo que se limita a la cantidad mínima necesaria para conseguir el efecto buscado (FAO, 2018). Es un biopolímero producto de la fermentación realizada por bacterias del género *Xanthomonas*. El 60 % de la molécula es ácido pirúvico, responsable de brindar la resistencia a la hidrólisis y viscosidad a sustancias (Sobenes, 2015).

1.2.9. Lactato de calcio

El aditivo E-327 es un agente endurecedor, regulador de acidez, espesante y sal emulsionante. El di lactato de calcio ($C_6H_{10}CaO_6$) se presenta en polvo o gránulos de color blanco a crema (FAO, 2018). Es una sal cálcica obtenida a partir del ácido láctico, posee menor porcentaje de calcio disponible en comparación al cloruro de calcio, sin embargo, es una fuente de iones calcio que interactúan con los G- bloques del alginato en la gelificación iónica (Pasin y González, 2012).

1.3. Modificación del sabor

1.3.1. Sabor

Se debe entender que el gusto es uno de los cinco sentidos con el que se perciben sustancias disueltas de los alimentos, mientras que el sabor es la

sensación que se produce en este sentido (RAE, 2019). Es así que el gusto posee receptores de sabor con lo cual se conoce parcialmente las características del alimento, ya que para conocerlas completamente es necesario integrar el resto de los sentidos (Watson, 2010). La lengua posee grupos de 50 a 100 células neuroepiteliales especializadas conformando papilas gustativas que responden a estímulos de sabor dulce, amargo, umami, salado y ácido (Lee y Chung, 2019). Los receptores identificados para el sabor dulce y umami son de tipo 1, sin embargo, se diferencian por formar heterodímeros (molécula formada por dos componentes diferentes), donde el responsable de la percepción del sabor dulce es el heterodímero T1R2/T1R3 y para el sabor umami es T1R1/T1R3, estos receptores son responsables de la transducción sensorial a través de señales eléctricas por medio de fibras nerviosas hacia el cerebro (Fuentes y Javiera, 2010).

1.3.2. Acción de la miraculina sobre el sabor

La acción de la miraculina es permitir la percepción del sabor dulce en presencia del sabor ácido, es decir, suprime la acidez de alimentos en cierto grado para brindar la sensación de dulzor sin necesidad de adición de azúcar o edulcorantes no calóricos. En estudios realizados sobre la acción de la miraculina sobre el aroma, sabor, dulzor y acidez del limón, se obtuvo resultados significativos con el aumento de la sensación del dulzor y la disminución de acidez, comprobando el efecto que tiene la miraculina de suprimir la sensación de acidez (Figura 11.) (Hudson, Sims, y Odabasi, 2018).

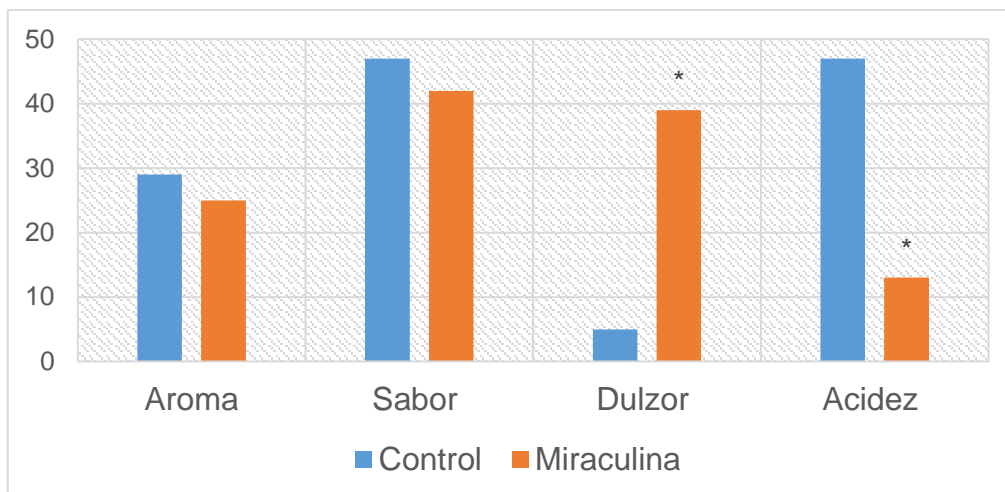


Figura 11. Acción de la miraculina sobre características del limón

Adaptado de (Hudson, Sims, y Odabasi, 2018).

De igual manera, se evalúa la acción de la miraculina sobre alimentos en los cuales predomina el dulzor, como es el caso del chocolate y jarabe de arce, donde no se obtiene efecto sobre las sensaciones del gusto (Figura 12.) (Hudson, Sims, y Odabasi, 2018).

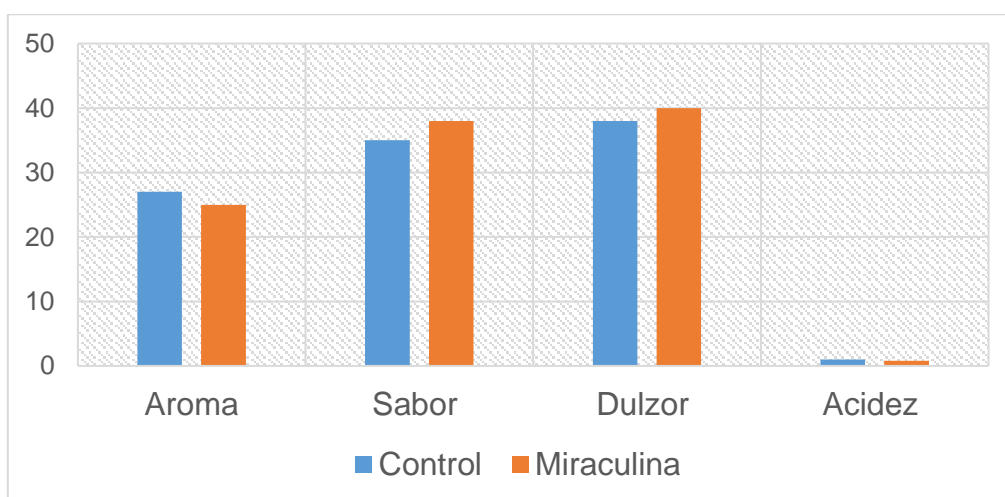


Figura 12. Acción de la miraculina sobre características del jarabe de arce.

Adaptado de (Hudson, Sims, y Odabasi, 2018).

La acción de la miraculina hipotéticamente se debe a la fuerte adherencia de la miraculina a los grupos de células neuroepiteliales que conforman las papilas gustativas que responden al sabor dulce, donde el heterodímero T1R2/T1R3 se activa cuando es expuesto a un medio ácido. Al activarse, transmite información al cerebro dando la misma respuesta cerebral cuando se consume azúcar que al consumir ácido cítrico con miraculina. Es así que, mientras más ácido sea el medio, mayor es el dulzor y el encubrimiento de acidez por parte de la miraculina, no obstante, hay un rango de pH de 6.5 a 7.4 donde se pierde el efecto o la respuesta es insignificante, mientras que a un pH de 4.8 a 6.5 existe el mayor efecto de la miraculina (Martínez, 2016).

2. METODOLOGÍA

2.1. Materiales y equipos

Para aplicar las diferentes técnicas y procedimientos se utilizó los materiales, insumos y equipos descritos a continuación.

2.1.1. Materiales, insumos y equipos de laboratorio

2.1.1.1. Materiales de laboratorio

- Extracto de fruta milagrosa
- Alginato de sodio
- Cloruro de calcio
- Lactato de calcio
- Citrato de sodio
- Goma Xantana
- Agua destilada
- Agua de peptona

- Agar PCA
- Agar Manitol sal (MS)
- Agar Salmonella- Shigella (SS)
- Alcohol al 70 %

2.1.1.2. Insumos de laboratorio

- Mortero
- Vasos de precipitado
- Varilla de agitación
- Cuchillo
- Balanza de precisión
- Cedazo pequeño
- Pipeta plástica
- Bandejas de pesaje plásticas
- Tubos de ensayo
- Micropipeta
- Puntas para micropipeta
- Asa de vidrio

2.1.1.3. Equipos de laboratorio

- Potenciómetro
- Licuadora o túrmix de mano
- Cámara de estabilidad acelerada
- Agitador vortex
- Incubadora a 25 °C
- Incubadora a 37 °C

2.1.2. Materiales y equipos de oficina

- Cámara de fotos
- Cuaderno de campo

2.2. Métodos

2.2.1. Ubicación del experimento

El estudio se llevó a cabo en los laboratorios bioquímicos y biológicos de la Universidad de las Américas (UDLA) en la ciudad de Quito, Ecuador. En la tabla 2 se describe las características geográficas del lugar.

Tabla 2.

Geo referencia de la ubicación del experimento.

Latitud	(S 0° 10' 10.642")
Longitud	(O 78° 28' 14.313")
Altitud (msnm)	2834

Adaptado de (mapcoordinates, 2019)

2.2.2. Condiciones ambientales

Las condiciones ambientales del laboratorio son importantes en caso de replicar la investigación para obtener resultados similares. Estas se encuentran descritos en la Tabla 3 a continuación:

Tabla 3.

Condiciones ambientales de la ubicación del experimento.

Temperatura máxima	9 °C
Temperatura mínima	21 °C
Temperatura promedio	19 °C
Humedad relativa máxima	33 %
Humedad relativa mínima	19 %
Humedad relativa promedio	22 %

Tomado de (AccuWeather, 2019).

2.2.3. Estadística

2.2.3.1. Diseño experimental

El estudio se realizó en base a un diseño completamente al azar (DCA) en arreglo factorial 3x3 con 3 repeticiones.

2.2.3.2. Factores de estudio

Los factores y niveles de cada metodología de gelificación iónica se describen a continuación.

2.2.3.2.1. Factores y niveles de esferificación directa.

- Factor 1: Concentración de alginato.
 - Niveles del factor 1:
 - 2 % p/p.
 - 3 % p/p.
 - 4 % p/p.

- Factor 2: Tiempo de exposición a solución al 6 % de cloruro de calcio.
 - Niveles del factor 2:
 - 30 segundos.
 - 1 minuto.
 - 2 minutos.

2.2.3.2.2. Factores y niveles de esferificación inversa.

- Factor 1: Concentración de lactato de calcio.
 - Niveles del factor 1:
 - 3 % p/p.
 - 4 % p/p.
 - 5 % p/p.

- Factor 2: Tiempo de exposición a solución al 0.75 % de alginato de sodio.
 - Niveles del factor 2:
 - 30 segundos.
 - 1 minuto.
 - 2 minutos.

2.2.3.3. Hipótesis

- Determinar la resistencia de encapsulados de extracto de fruta milagrosa elaborados mediante esferificación directa.

H1: La concentración de alginato y el tiempo de exposición a cloruro de calcio afectan la resistencia del encapsulado formado a través de esferificación directa.

H0: La concentración de alginato y el tiempo de exposición a cloruro de calcio no afectan la resistencia del encapsulado formado a través de esferificación directa.

- Determinar la resistencia de encapsulados de extracto de fruta milagrosa elaborados mediante esferificación inversa

H1: La concentración de lactato de calcio y el tiempo de exposición a alginato afectan la resistencia del encapsulado formado a través de esferificación inversa.

H0: La concentración de lactato de calcio y el tiempo de exposición a alginato no afectan la resistencia del encapsulado formado a través de esferificación inversa.

- Identificar la metodología de encapsulado que permita la mayor resistencia de la esfera al tiempo de exposición a bebidas.

H.1: El tiempo de exposición de los encapsulados a bebidas afecta la resistencia del encapsulado.

H.0: El tiempo de exposición de los encapsulados a bebidas no afecta la resistencia del encapsulado.

2.2.3.4. Tratamientos

La combinación de los diferentes factores dio como resultado un total de 9 tratamientos de la metodología de esferificación directa descritos a continuación en la tabla 4.

Tabla 4.

Tratamientos de esferificación directa.

Esferificación directa	
Tratamiento	Descripción
T1	Concentración de alginato 2 % p/p, tiempo de 30 segundos a solución de CaCl ₂ .
T2	Concentración de alginato 2 % p/p, tiempo de 1 minuto a solución de CaCl ₂ .
T3	Concentración de alginato 2 % p/p, tiempo de 2 minutos a solución de CaCl ₂ .
T4	Concentración de alginato 3 % p/p, tiempo de 30 segundos a solución de CaCl ₂ .
T5	Concentración de alginato 3 % p/p, tiempo de 1 minuto a solución de CaCl ₂ .
T6	Concentración de alginato 3 % p/p, tiempo de 2 minutos a solución de CaCl ₂ .
T7	Concentración de alginato 4 % p/p, tiempo de 30 segundos a solución de CaCl ₂ .
T8	Concentración de alginato 4 % p/p, tiempo de 1 minuto a solución de CaCl ₂ .
T9	Concentración de alginato 4 % p/p, tiempo de 2 minutos a solución de CaCl ₂ .

La combinación de los diferentes factores dio como resultado un total de 9 tratamientos de la metodología de esferificación inversa descritos en la tabla 5.

Tabla 5.

Tratamientos de esferificación inversa

Esferificación inversa	
Tratamiento	Descripción

T10	Concentración de $C_6H_{10}CaO_6$ 3 % p/p, tiempo de 30 segundos a solución de alginato.
T11	Concentración de $C_6H_{10}CaO_6$ 3 % p/p, tiempo de 1 minuto a solución de alginato.
T12	Concentración de $C_6H_{10}CaO_6$ 3 % p/p, tiempo de 2 minutos a solución de alginato.
T13	Concentración de $C_6H_{10}CaO_6$ 4 % p/p, tiempo de 30 segundos a solución de alginato.
T14	Concentración de $C_6H_{10}CaO_6$ 4 % p/p, tiempo de 1 minuto a solución de alginato.
T15	Concentración de $C_6H_{10}CaO_6$ 4 % p/p, tiempo de 2 minutos a solución de alginato.
T16	Concentración de $C_6H_{10}CaO_6$ 5 % p/p, tiempo de 30 segundos a solución de alginato.
T17	Concentración de $C_6H_{10}CaO_6$ 5 % p/p, tiempo de 1 minuto a solución de alginato.
T18	Concentración de $C_6H_{10}CaO_6$ 5 % p/p, tiempo de 2 minutos a solución de alginato.

2.2.3.5. Unidad experimental

Tubo de ensayo con infusión de frutas cítricas.

2.2.3.6. Esquema ADEVA

2.2.3.6.1. ADEVA esferificación directa

Aplicado el análisis de varianza se obtuvo la Tabla 9, con la cual se buscó obtener diferencias significativas en los tratamientos.

Tabla 6.

ADEVA de esferificación directa.

Fuente de variación	Grados de libertad
Total	26
Concentración de alginato (F1)	2
Tiempo de exposición (F2)	2
F1 X F2	4
Error experimental	18
C.V %	

2.2.3.6.2. ADEVA esferificación inversa

Aplicado el análisis de varianza se obtuvo la Tabla 9, con la cual se buscó obtener diferencias significativas en los tratamientos.

Tabla 7.

ADEVA esferificación inversa.

Fuente de variación	Grados de libertad
Total	26
Concentración de alginato (F1)	2
Tiempo de exposición (F2)	2
F1 X F2	4
Error experimental	18
C.V %	

2.2.3.7. Variables

La variable enfocada en el estudio obedece a la resistencia de las esferas determinada en gramos fuerza (gF).

2.2.3.8. Análisis funcional

Si se llegase a encontrar diferencias significativas, se empleará la prueba de Tukey, con la cual se busca determinar el mejor tratamiento con respecto a la resistencia del encapsulado.

2.2.4. Manejo del experimento

2.2.4.1. Obtención de extracto de fruta milagrosa

Para obtener el extracto de la fruta, se inicia con la recepción de la fruta congelada, la misma que es sometida a un proceso de lavado para limpiar y contrarrestar posibles contaminantes físicos, químicos y biológicos. Al estar las bayas congeladas se facilita la actividad posterior, que es el cortado y remoción de la semilla, realizado con un cuchillo en un mortero, en esta actividad se realiza un corte longitudinal en el pericarpio y mesocarpio de la baya, se retira el mesocarpio carnoso junto a la cáscara hasta dejar la semilla lo más limpia posible. Este proceso se puede realizar sin que las bayas estén congeladas, sin embargo, se dificulta y requiere mayor tiempo por el tamaño y textura resbaladiza de la pulpa.

Una vez separado de la semilla el mesocarpio carnoso y el pericarpio, se da paso a la trituración o molienda con la ayuda del pilón del mortero de las estructuras previamente separadas hasta obtener un aglomerado de sólidos y líquidos, de esta manera se consigue liberar los líquidos que se encuentran aprisionados en el mesocarpio y cáscara. Finalmente, el aglomerado se traslada a un cedazo pequeño para ser despulpado, se presiona repetidamente con la ayuda del pilón para obtener el extracto y recogerlo en un vaso de precipitado pequeño (Figura 13.).

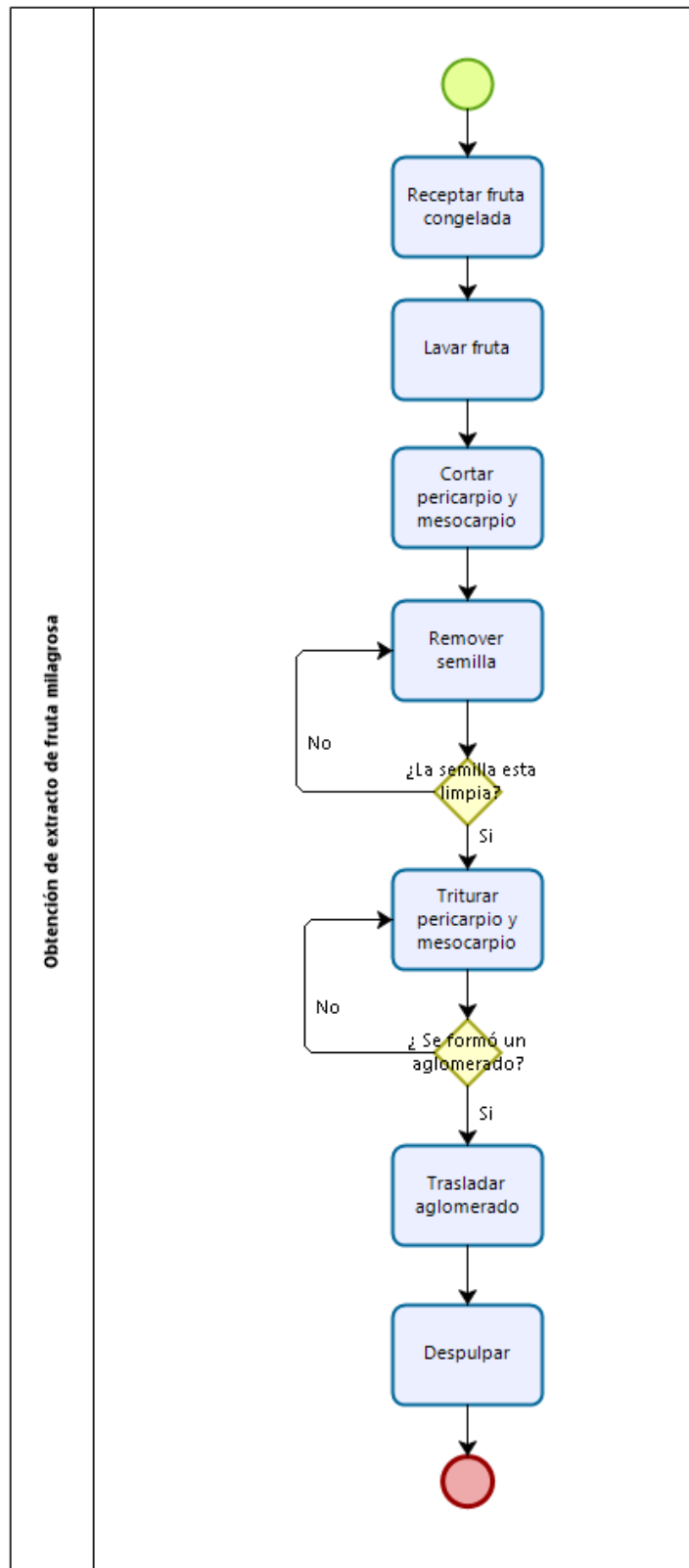


Figura 13. Proceso de obtención de extracto de fruta milagrosa

2.2.4.2. Regulación de pH

Este proceso es fundamental para lograr la formación de esferas, debido a que el alginato, al estar expuesto a un pH extremadamente ácido, pierde la propiedad gelificante. Para este proceso, inicialmente se realiza una medición de pH del extracto de la fruta milagrosa sumergiendo el potenciómetro en la solución hasta visualizar un valor estable, generalmente el pH promedio del extracto es de 3.61. Este pH no es el ideal para el alginato en la gelificación iónica, por lo cual, se procede a colocar y homogeneizar el citrato de sodio en el extracto para regular la acidez y llegar a un pH de 5 a 5.5 en el cual el alginato puede cumplir su función tanto en la esferificación directa como inversa. Una vez que se logra un pH dentro del rango óptimo, se almacena para ser utilizado posteriormente (Figura 14.).

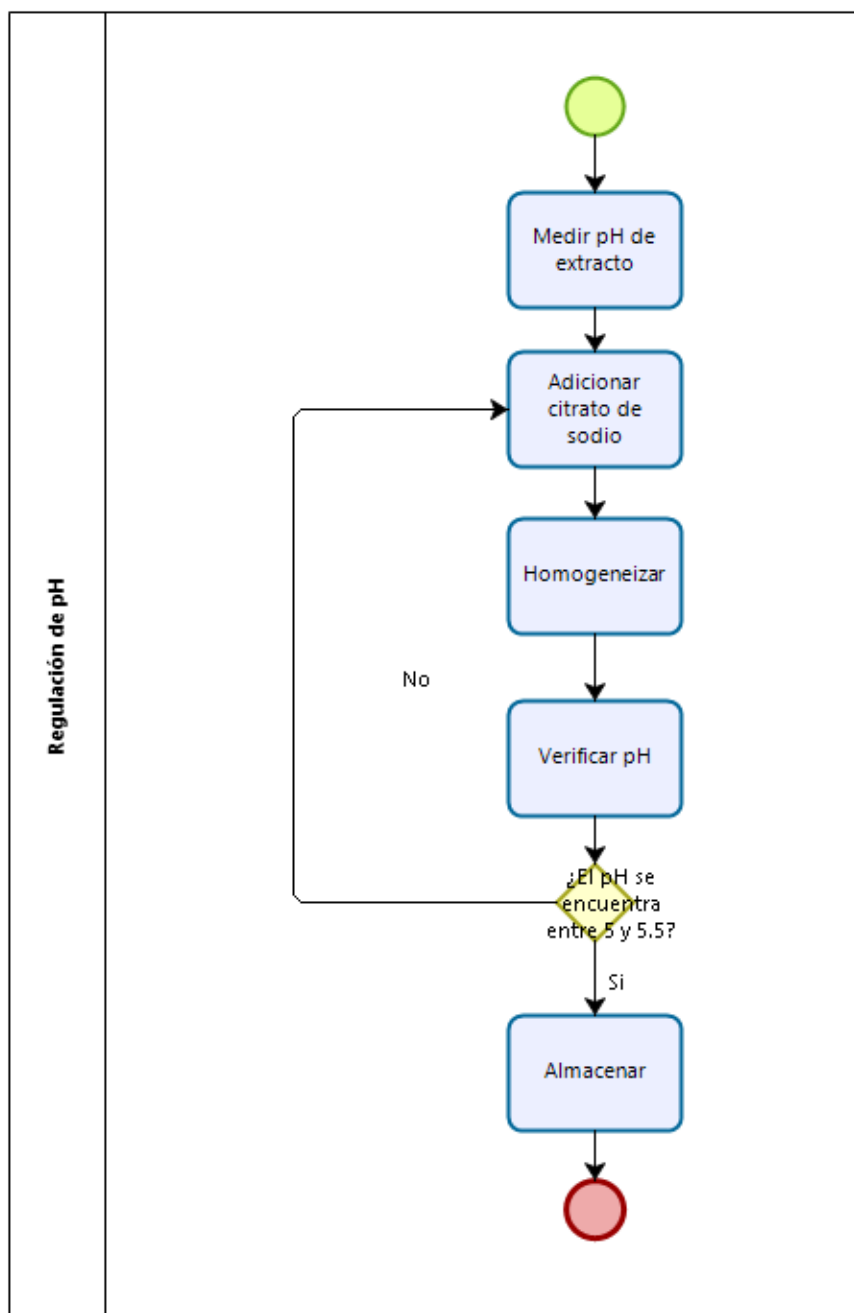


Figura 14. Proceso de regulación de pH del extracto de fruta milagrosa.

2.2.4.3. Esferificación directa

En este proceso primero se debe calcular la cantidad de cada sustancia que se requiere en cada uno de los tratamientos, dependiendo del tratamiento, varía el

porcentaje de alginato entre 2 %, 3 % y 4 % con respecto al peso de extracto de fruta milagrosa a esferificar. De igual manera, se determina la cantidad de cloruro de calcio que se mantiene constante con una concentración del 6 % con respecto a la cantidad de agua destilada que se va a utilizar para elaborar la solución envolvente, la misma que también debe ser determinada.

Una vez establecidas las cantidades a utilizar se procede a realizar el pesaje en una balanza de precisión para evitar desviaciones en las cantidades a adicionar. Se debe tomar en cuenta las unidades (gramos o miligramos) en las que se realiza el cálculo de sustancias y las unidades de la balanza de precisión para evitar posibles errores.

La solución envolvente está constituida por agua destilada y cloruro de calcio (por 100 g de agua destilada, se colocan 6 g de cloruro de calcio), por lo cual se toma en un vaso de precipitado la cantidad de agua destilada a utilizar y se adiciona poco a poco el 6 % de cloruro de calcio para facilitar la dilución, con el uso de una varilla de agitación, se procede a remover la solución hasta que el cloruro de calcio se diluya totalmente. Esta actividad se realiza posterior al pesaje de las sustancias, porque los cristales de cloruro de calcio son deliquescentes y si se someten mucho tiempo al ambiente absorberán la humedad y se disolverán en las bandejas de pesaje. Una vez lista la solución de cloruro de calcio, se deja en reposo para ser utilizada posteriormente en la esferificación.

Concluida la preparación de la solución envolvente, se inicia con la preparación de la sustancia a esferificar (extracto de fruta milagrosa) en el mismo vaso de precipitado en la que fue recogida. Para ello, se adiciona el alginato pesado al extracto de fruta milagrosa con el pH regulado y con la ayuda de una varilla de agitación limpia, se revuelve hasta eliminar totalmente grumos y obtener una mezcla homogénea, en caso de que el producto no sea de consumo inmediato, se coloca algún conservante para aumentar su vida útil. Esta preparación,

después de reposar por 5 minutos para ligar los ingredientes, es recogida con una pipeta plástica de 5 ml con una apertura de 0.5 cm, una vez ahí, se presiona ligeramente la pipeta plástica para que se evacue gota a gota la sustancia a esferificar sobre la solución de cloruro de calcio, una vez que la gota ingrese a la solución se toma el tiempo de exposición, dependiendo del tratamiento, se expone 30 segundos, 1 minuto y 2 minutos. Una vez terminado el tiempo de exposición se retira cuidadosamente las esferas con la ayuda de una espumadera o una cuchara y son trasladadas a un vaso de precipitado con agua destilada para retirar el exceso de la solución de calcio, finalmente, se almacenan para su posterior uso (Figura 15.). Cabe aclarar que en la esferificación directa no afecta que se coloquen varias gotas a la vez, estas no se adhieren una a otra como es el caso de la esferificación inversa.

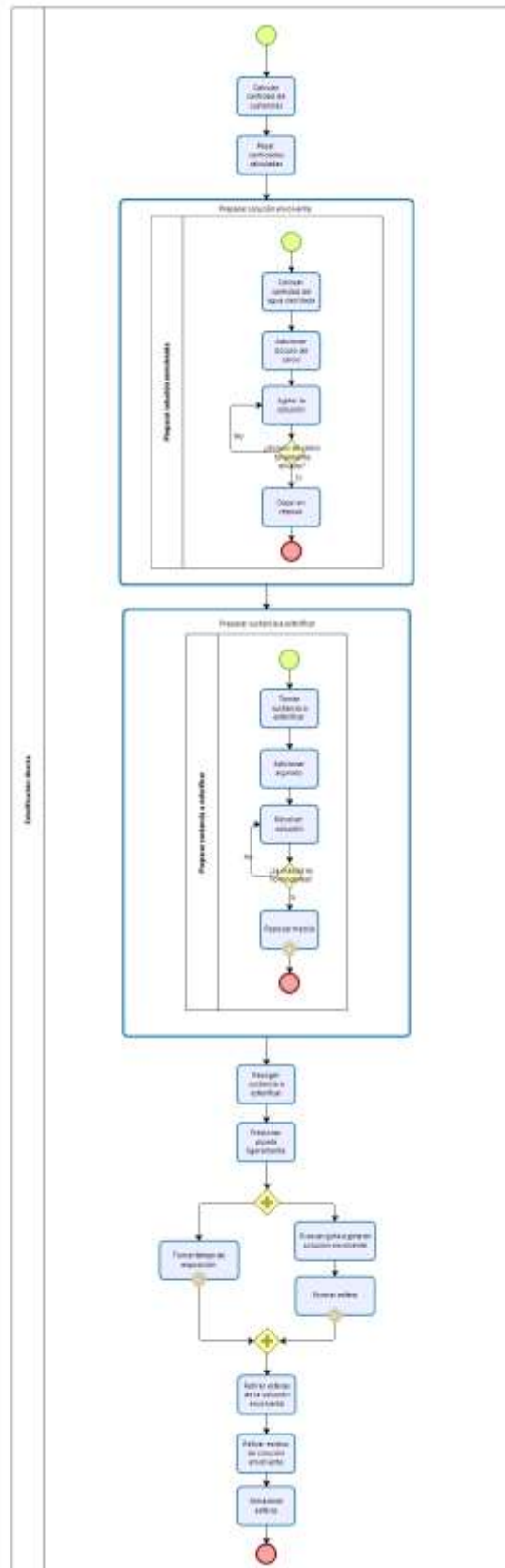


Figura 15. Proceso de esferificación directa.

2.2.4.4. Esferificación inversa

La elaboración de esferas de extracto de fruta milagrosa por esferificación inversa inicia con el cálculo de la cantidad requerida de cada uno de los ingredientes a utilizar según el tratamiento, en esta metodología se sustituye la fuente de iones calcio (cloruro de calcio) por lactato de calcio, mismo que varía en concentraciones de 3 %, 4 % y 5 % con respecto al peso del extracto de fruta milagrosa a esferificar. Adicional, en esta técnica se utiliza 0.4 % de goma xantana con relación al peso del extracto, con el objetivo de proporcionar mayor viscosidad al extracto consiguiendo que, al momento de evacuar las gotas de la sustancia a esferificar, estas no se disgreguen en la solución envolvente, constituida de una concentración constante de alginato al 0.75 % (por 100 g agua destilada se coloca 0.75 g de alginato) con respecto al de agua destilada a utilizar.

Posterior a la determinación de las cantidades se procede a realizar en una balanza de precisión el pesaje de lactato de calcio, goma xantana, agua destilada, alginato de sodio y en el caso de aumentar la vida útil, algún conservante. La actividad consecuente es preparar la solución envolvente, la misma que está compuesta por alginato y agua destilada, esta preparación se debe realizar en una licuadora o con un túrmix de mano para evitar la formación de grumos. Para esto, inicialmente se coloca en la licuadora agua destilada e inmediatamente el alginato de sodio, se licua a velocidad baja hasta obtener una mezcla homogénea, la misma que es trasvasada a un vaso de precipitado para mantener en reposo por 5 minutos con el objetivo de crear una capa de sedimentos en el vaso de precipitado, la misma que debe ser excluida trasvasando nuevamente a un vaso de precipitado limpio y finalmente almacenado para su uso subsecuente. En caso de no retirar los sedimentos, la capa se adhiere a la matriz de gel de las esferas provocando manchas blancas, que al consumir con las esferas, se crean grumos solidos insolubles en la cavidad bucal.

Se procede a la preparación de la solución a esferificar, la misma que está constituida por el extracto de fruta milagrosa, lactato de calcio, goma xantana y un conservante si se desea aumentar la vida útil. En el mismo vaso de precipitado, en el que se encuentra el extracto con pH regulado, se adiciona el lactato de calcio, donde, con la ayuda de una varilla de agitación, se procede a remover hasta lograr la dilución completa del aditivo; a esta mezcla se adiciona goma xantana y se agita con la misma varilla hasta obtener una mezcla totalmente homogénea. Esta sustancia resultante pasa a un reposo de 5 minutos para ligar ingredientes y su posterior uso.

Una vez obtenidas ambas soluciones, se procede a tomar la solución a esferificar con una pipeta plástica de 5 ml con una apertura de 0.5 cm. Se ubica la pipeta sobre el vaso de precipitado que contiene la solución envolvente y se procede a presionar ligeramente la pipeta para evacuar gota tras gota la solución a esferificar en la solución de alginato. Una vez que la gota ingresa, se toma el tiempo de exposición, mismo que fue determinado en 30 segundos, 1 minuto y 2 minutos dependiendo del tratamiento. Para formar la esfera se debe realizar movimientos leves y constantes mientras transcurre el tiempo de exposición para evitar la deformación (formas planas y elipsoidales) de las esferas al mantenerse asentadas en el fondo del vaso de precipitado.

Cuando finaliza el tiempo de exposición se procede a retirar las esferas formadas con la ayuda de una cuchara o espumadera para ser trasladadas a un vaso de precipitado con agua destilada para retirar el exceso de la solución de alginato (Figura 16.). Conjuntamente se debe tomar en cuenta que, en la técnica de esferificación inversa no se puede colocar varias gotas al mismo tiempo porque las esferas se adhieren entre sí.

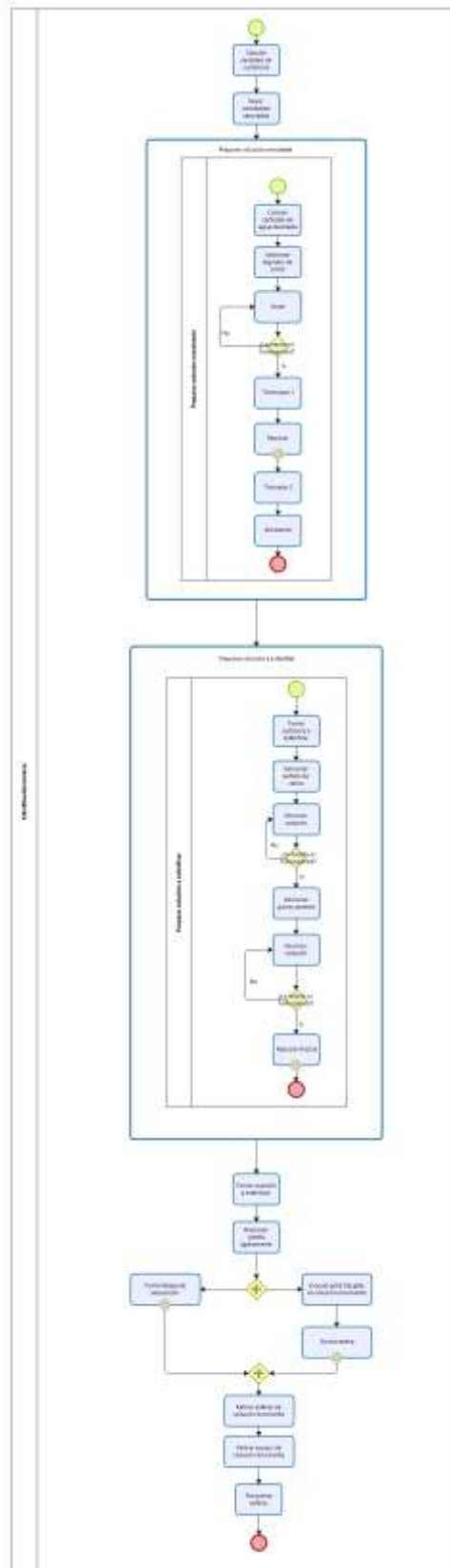


Figura 16. Proceso de esferificación inversa

2.2.4.5. Determinación de resistencia

Las esferas obtenidas tanto por método inverso como directo se sometieron a un análisis de fuerza en un texturometro con una sonda *cylinder probes* P/0.5 por el método “*gel capsule*”, el cual consiste en colocar la muestra en el centro de la placa del texturometro y presionar la capsula hasta su ruptura (Figura 17.). El texturometro establece un valor de la fuerza necesaria de ruptura (gF). Una vez obtenidos los resultados de cada tratamiento, se registran los datos de las mediciones para realizar el ADEVA.



Figura 17. Medición de resistencia por el método “*gel capsule*”.

2.2.4.6. Estabilidad

Con la finalidad de determinar la capacidad que tienen las esferas para conservar sus propiedades físicas, químicas y microbiológicas se realiza pruebas aceleradas de estabilidad del mejor tratamiento. Para ello, primero se coloca determinado líquido de gobierno (infusión de frutas cítricas) en un tubo de ensayo previamente abierto, seguidamente se colocan muestras de esferas en el mismo tubo, que a continuación es cerrado con su respectiva tapa y llevado a la cámara de estabilidad acelerada, donde se exponen las esferas a determinados factores

como luz, temperatura (40 grados centígrados) y humedad (75 %) para determinar su vida útil de manera más rápida. Las respectivas pruebas físicas, químicas y microbiológicas para conocer el estado de las esferas expuestas a la cámara de estabilidad se las realizó cada 10 días, es decir el día 0, 10, 20 y 30 (Figura 18.).

Se realizó el proceso de estabilidad durante 30 días, ya que el producto es destinado para bebidas, las mismas que pueden tener vida útil de hasta 9 meses, al permanecer en la cámara de estabilidad 1 mes, se estima un tiempo transcurrido de 6 meses conociendo de esta manera las características que tendrá el producto en largos periodos de tiempo.

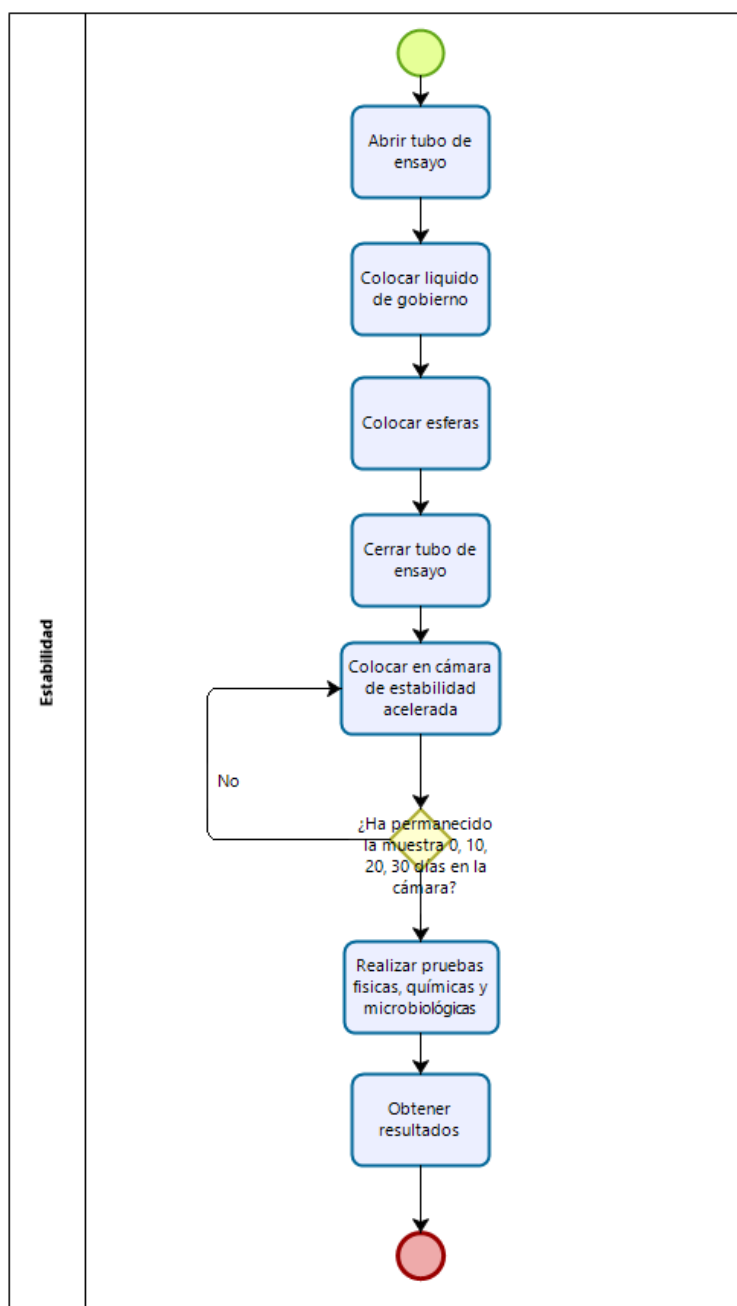


Figura 18. Proceso de estabilidad.

2.2.4.6.1. Estabilidad física

La evaluación de estabilidad física se realiza los días establecidos (0, 10, 20 y 30). Se extrae de la cámara de estabilidad el tubo de ensayo que contiene las

esferas, primeramente se visualiza si mantiene el color y la forma inicial. Se extrae una esfera y se corta con ayuda de un cuchillo para verificar si la textura cambia de frágil (la esfera libera el líquido encapsulado con facilidad) a gomosa (densidad que persiste a lo largo de la masticación, inexistencia de fase líquida en el interior de la esfera) (Figura 19.).

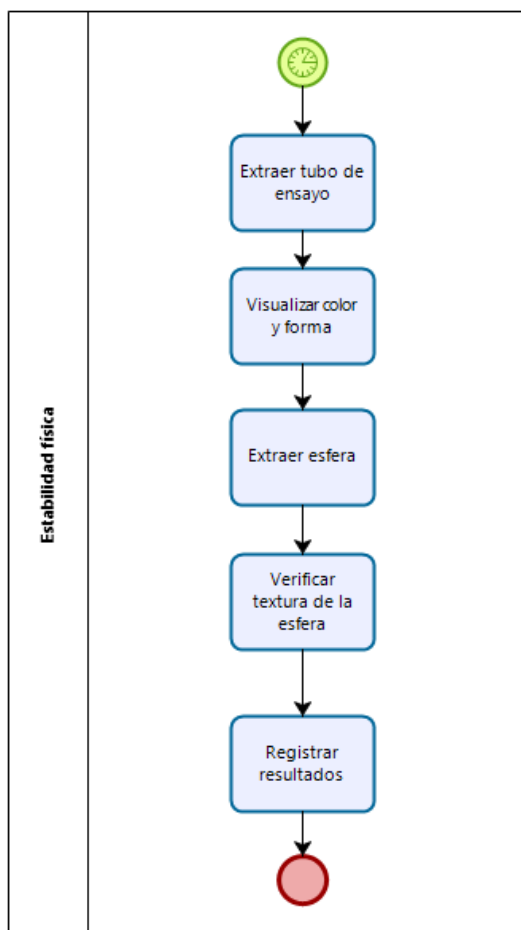


Figura 19. Proceso de estabilidad física.

2.2.4.6.2. Estabilidad química

La evaluación de la estabilidad química se realiza los días establecidos (0, 10, 20 y 30). Se extrae de la cámara de estabilidad el tubo de ensayo que contiene las esferas, se abre el tubo de ensayo, a continuación se toma una esfera para

consumirla. Se espera 1 minuto para que funcione la miraculina y se toma una muestra de limón para evaluar si existe o no el efecto de modificación del sabor en la boca (Figura 20.).

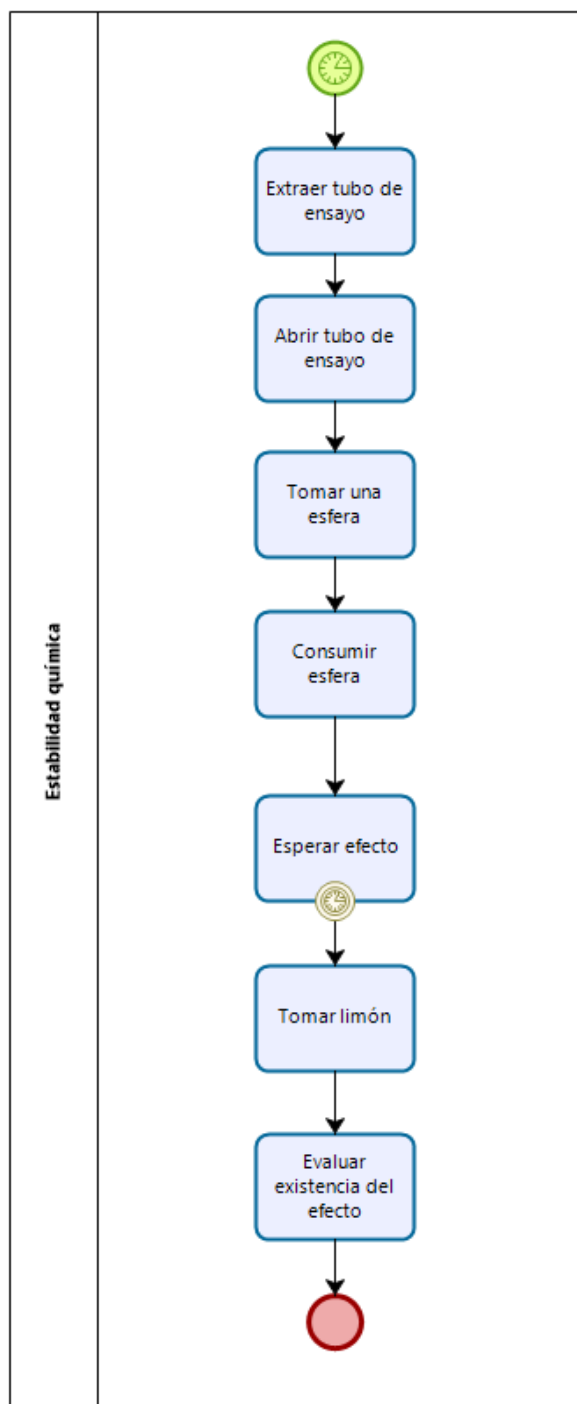


Figura 20. Proceso de estabilidad química.

2.2.4.6.3. Estabilidad microbiológica

Para realizar los respectivos análisis microbiológicos se toma como referencia los requisitos microbiológicos establecidos en la norma INEN 1961 "Gelatina comestible. Requisitos". Inicialmente se extrae el tubo de ensayo de la cámara de estabilidad y se toma una esfera, la misma es colocada en un tubo de ensayo con 9 mililitros de agua de peptona (AP). Una vez cerrado el tubo de ensayo se coloca en el agitador vortex por un periodo de 10 a 15 minutos para homogeneizar la solución a sembrar en cada agar.

Mientras transcurre el tiempo de homogeneización se coloca el agar PCA, agar SS, agar MS, micropipeta con sus respectivas puntas y el aza de vidrio en la cámara de siembra, la cual fue limpiada con alcohol al 70 %. Cuando todo el material anteriormente mencionado es colocado dentro de la cámara, se cierra la protección de vidrio y se prende la luz ultravioleta (UV) por 15 minutos para desinfectar totalmente los materiales a utilizar.

Una vez culminado el tiempo de desinfección de la cámara con UV, se levanta el vidrio protector y se activa la cámara de siembra, inmediatamente es necesario colocar cerca de la cámara un mechero encendido de alcohol junto a un vaso de precipitado de 150 ml con alcohol al 70 % (complementos). Una vez cumplidos los requisitos, se destapa parcialmente cada caja petri de los distintos agares. Realizada esta actividad, se introduce la muestra ya homogeneizada dentro de la cámara de siembra y se abre. Se toma la micropipeta y con una ligera presión se coloca la punta pertinente. Se sustrae 100 microlitros de la muestra y se coloca en cada agar la misma cantidad, es decir se toma y se coloca 100 microlitros de la muestra en cada caja petri. Inmediatamente se sumerge el asa de vidrio en el vaso de precipitado con alcohol al 70 % por un tiempo mínimo de 5 segundos, se retira el asa y se expone al fuego del mechero para flamearla (prenderle fuego) con el objetivo de volatilizar el alcohol y esterilizar el aza completamente. Una vez extinguido el fuego se introduce el asa a la cámara para

evitar posibles contaminaciones y se enfría por un mínimo de 15 segundos. Terminado este tiempo se destapa totalmente uno de los agares y utilizando el aza de vidrio, se expande por todo el agar la muestra previamente colocada. Cuando termina la difusión de la muestra en un agar, se vuelve a introducir el aza en el vaso de precipitado de alcohol y nuevamente se flamea para realizar el mismo procedimiento con los agares restantes.

Finalmente, se cierran todas las cajas petri y se retiran cuidadosamente de la cámara de siembra, se rotula con la respectiva información codificada y se coloca cada agar en su respectiva incubadora por 24 horas, el agar PCA en incubadora de 25 °C, los agares MS y SS en la incubadora de 37 °C. Trascurrido el tiempo de incubación, se procede a retirar cada agar para contar las colonias y comparar con los requisitos microbiológicos de la norma INEN 1961, una vez obtenidos los resultados, los agares se desechan (Figura 21.).

3. Resultados y discusión

3.1. Obtención de extracto de fruta milagrosa

Cuando se realizó por primera vez la obtención del extracto de fruta milagrosa se efectuó el proceso de trituración de la pulpa junto a la semilla, con el fin de evitar las actividades de cortar y retirar semilla, pues la fruta, al poseer alta concentración de agua junto con el mucilago se vuelve resbaladiza dificultando la extracción de la semilla, lo cual aumenta el tiempo del proceso (Nkwocha, 2014). Además, se consideró que no existían variaciones con respecto a la modificación del sabor, sin embargo, al triturar la semilla junto al mesocarpio y pericarpio se evidenció la primera variación, el cambio de coloración tanto en el aglomerado (Figura 22.) como en el extracto (Figura 23.) mismos que son obtenidos en el recipiente del mortero y en el vaso de precipitado, respectivamente.

A continuación se consumió el extracto de fruta milagrosa que fue triturada con la semilla evidenciando la segunda variación, la inhibición del efecto modificador del sabor de la miraculina, la cual, del mismo modo, fue reportada en un estudio de la fruta milagrosa como posible edulcorante natural en limonada, donde se estimó que la inhibición de la miraculina se debe al amargor que resulta al triturar la semilla (Cevallos, Andrade, y Arce, 2007), no obstante, en el presente estudio, se estima que la acción de la miraculina se inhabilita con sustancias ligadas a la semilla, sin embargo, se requieren datos adicionales que confirmen esta premisa. Cabe recalcar que, es de mucha utilidad conocer el compuesto responsable de la inhibición del efecto, considerando que en caso de tomar una bebida con miraculina e inmediatamente consumir un alimento salado que contenga limón o alguna sustancia ácida (vinagre) es necesario inhabilitar el efecto de la miraculina a conveniencia para evitar la modificación del sabor en alimentos como los mencionados previamente.



Figura 22. Diferencia en la coloración de aglomerado.



Figura 23. Diferencia en la coloración de extracto de fruta milagrosa.

Para la obtención de la sustancia de interés se congeló la fruta, lo cual facilitó la extracción de la semilla y optimizó el tiempo del proceso; al no estar resbaladiza la semilla, se separó el pericarpio y el mesocarpio efectivamente para triturar dichas estructuras. Se evidenció que la cantidad de extracto disponible en las bayas tiene relación directa con su tamaño (1.2 a 3 cm de largo por 0.6 a 1.2 cm de ancho) (Tchokponhoué, 2017) y se determinó que la semilla en promedio representa el 32 % de la fruta. Por lo cual, para definir las cantidades que se

pueden obtener del proceso “obtención de extracto de fruta milagrosa” se tomaron los datos del número de bayas utilizadas y los gramos obtenidos de extracto de fruta milagrosa (Tabla 8.).

Se obtuvo como resultado que a pesar de las pérdidas en el mortero y demás utensilios utilizados para la extracción, de una baya se obtiene en promedio 0.29 gramos de extracto, lo cual fue menos de lo estimado teóricamente, pues en promedio 0.68 gramos del fruto es pulpa y cascará, de ahí, el 60 % de la pulpa es agua resultando teóricamente 0.41 gramos de extracto por baya, sin embargo se consideró que la diferencia con el valor teórico se debió a que, no se pudo extraer totalmente el agua de la fruta, además, en el valor teórico se toma en cuenta el peso de los sólidos insolubles y cáscara (Martínez, 2016). En un estudio realizado, se buscó utilizar la fruta milagrosa como posible edulcorante natural, se licó 250 gramos de fruta milagrosa (sin semilla) con 250 mililitros de agua resultando que el rendimiento fue del 64 %, es decir 310 mililitros de extracto, a lo cual eliminando los 250 mililitros de agua queda 60 mililitros de extracto puro lo cual representa el 24 % (Cevallos, Andrade, y Arce, 2007), que es un valor cercano al encontrado en el presente estudio cuyo rendimiento fue del 29 %.

Tabla 8.

Cantidades obtenidas de extracto de fruta milagrosa por número de bayas utilizadas.

Cantidad de bayas utilizadas	Total extracto de fruta milagrosa (g)	Extracto disponible por fruta (g)
15	3.14	0.21
10	1.16	0.12
8	2.66	0.33
7	2.30	0.33
7	2.08	0.30

7	2.11	0.30
7	1.77	0.25
5	1.34	0.27
8	2.92	0.37
10	4.03	0.40

3.2. Regulación de pH

La regulación del pH es fundamental para lograr procesos de gelificación iónica, si se expone el alginato a una solución extremadamente ácida, este pierde su capacidad gelificante, pues el alginato no esferifica sustancias a un pH fuera del rango de 4 a 7 (Ortíz y Bravo, 2018). Es así que se midió el pH de cada extracto de fruta milagrosa (Tabla 9.) proporcionando como resultado un pH promedio de 3.61, valor similar al reportado por Cevallos, Andrade, y Arce (2007), equivalente a un pH de 3.81, mismo que se encuentra fuera del rango en el que el alginato gelifica. El inconveniente mencionado se evidenció al realizar la esferificación directa, donde se inició con un porcentaje de alginato al 1 % con respecto al peso del extracto (pH de 3.69), se homogeneizaron ambas sustancias y se evacuó gota a gota en la solución de cloruro de calcio al 6 %, como resultado, la sustancia a esferificar se disgregó en la solución envolvente.

Tras este resultado negativo se aumentó el porcentaje de alginato al 2 %, se realizó el mismo procedimiento de esferificación directa, sin embargo, no se obtuvo resultados positivos, puesto que no se formaron las esferas. Por tanto se colocó citrato de sodio en la sustancia a esferificar que contiene 2 % de alginato para regular el pH a 4.32 (dentro del rango establecido (Ortíz y Bravo, 2018)) sin embargo, el resultado es negativo. Se colocó nuevamente citrato de sodio aumentando el pH a 5.13, pues a este pH, se consiguió formar las esferas. Posteriormente, se volvieron a realizar pruebas con un pH menos ácido; para lo cual se añadió citrato de sodio hasta llegar a un pH de 6.78, donde no se

formaron las esferificaciones, nuevamente se difiere con el rango de 4 a 7 que también fue establecido por González, Pérez, y Lena (2015), donde se obtuvo esferificaciones a un pH de 4.2. Esta diferencia podría deberse a que, en el presente estudio, se utilizó el mínimo % de alginato para formar esferas (2 %) (Hernández, Hinojosa, y Salazar, 2018); adicional a esto, la sustancia a esferificar estuvo cerca del límite del pH al que el alginato deja de gelificar.

Adquiridos estos resultados, se estableció el rango ideal de pH para realizar esferificaciones por gelificación iónica, la sustancia a esferificar necesariamente se debe encontrar dentro del rango de 5 a 5.5 para evitar posibles desviaciones en la resistencia de las esferas, dado que se demostró que el pH influye directamente sobre la función del alginato (Lee y Rogers, 2012).

Tabla 9.

Mediciones de pH del extracto de fruta milagrosa.

Numero de extracto	pH
1	3,69
2	3,82
3	3,5
4	3,65
5	3,81
6	3,64
7	3,89
8	3,99
9	3,11
10	3,02

3.3. Esferificación directa

La esferificación directa se realizó a partir del extracto de fruta milagrosa previamente regulado el pH (dentro del rango 5 a 5.5). Inicialmente, se probaron concentraciones de 0.5 % y 1 % de alginato con respecto al peso de la sustancia a esferificar. Pese a realizar debidamente el método de esferificación, con estas concentraciones, no se obtuvo resultados óptimos (la solución a esferificar se disgregó al ingresar a la solución envolvente) al igual que en resultados obtenidos en un estudio de microencapsulación de bacterias por el mismo método, donde sólo al 2 % de alginato en solución, se formaron esferificaciones (Hernández, Hinojosa, y Salazar, 2018). Tras estas pruebas, se aumentó la concentración de alginato al 2 %, la misma que se estableció como concentración mínima para la esferificación directa. Se conoce que la fuerza del gel depende de la concentración de iones calcio y de alginato (Ortiz y Bravo, 2018), por lo cual se decidió aumentar la concentración a 3 % y 4 % obteniendo resultados positivos, evidenciando que, aumentó la dureza del gel.

Según investigaciones, el tiempo mínimo de exposición a la solución de cloruro de calcio es 30 segundos, tiempo suficiente para reordenar estructuralmente los G-bloques y crear una matriz de gel (Duarte y Marell, 2018). Sin embargo, se evidenció que al realizar el primer tratamiento (T1), de menor concentración de alginato (2 %) y menor tiempo de exposición (30 segundos), se formó la esfera de extracto de fruta milagrosa, no obstante, su resistencia fue excesivamente débil para ser trasvasada y sometida al texturometro. Esta misma concentración de alginato con mayor tiempo de exposición (1 minuto y 2 minutos), demostró que el tiempo influye directamente con la dureza del gel, pues, las esferas creadas resistieron el trasvasado y pudieron ser analizadas con el texturometro, corroborando que la dureza del gel tiene relación directa con el tiempo de exposición a los iones de calcio, al igual que en el estudio de Lee y Rogers (2012) en el cual se realizaron pruebas de esferificación de 1 % de alginato con 1 % de diferentes fuentes de calcio a distintos tiempo de exposición; se concluyó que el

tiempo para que el cloruro de calcio alcance su mayor dureza fue superados los 100 segundos y, a tiempos menores, la resistencia disminuyó.

Al aplicar cada tratamiento, se obtuvo esferas resistentes de extracto de fruta milagrosa a partir del tratamiento 2, porque como se mencionó previamente, el tratamiento 1 no presentó resistencia al trasvasado (Figura 24.). En todos los casos, las esferas resultantes tuvieron un tamaño promedio de 0.5 miligramos, lo cual es resultado del tamaño de apertura de la pipeta plástica utilizada para evacuar gota a gota la solución a esferificar, por lo cual, se establece una relación directa entre el tamaño de la esfera y el diámetro de la apertura de la pipeta.



Figura 24. Esferificaciones realizadas por T1, T2 y T3.

En la esferificación directa, el gel se forma desde la parte exterior y avanza progresivamente al interior (Pasin B. L., 2012). Se demostró que esta dinámica es correcta, porque los G-bloques del alginato que se encuentran diluidos en el extracto de fruta milagrosa reaccionaron con los iones de calcio y gelificaron toda la sustancia de interés, por lo tanto las esferas obtenidas fueron totalmente de gel al igual que los encapsulados experimentados por Duarte y Marell (2018) también conocidos como caviar.

En la metodología de la presente investigación, se utilizó cloruro de calcio porque no aportó sabor salado a las esferas, considerando que la sal común formada de la reacción permaneció en la solución envolvente. La disponibilidad de un mayor porcentaje de calcio y por ende mayor rapidez al reaccionar con el alginato de sodio, dio resultados similares a los reportados por Lee y Rogers (2012), donde se concluye que el uso del cloruro de calcio disminuye el tiempo de esferificación por gelificación mas rápida que con otras sales (lactato de calcio y gluconato de calcio).

Una vez realizados todos los tratamientos se eligió como mejor al tratamiento T6, que consistió en una concentración de alginato del 3 % y un tiempo de exposición a la solución de cloruro de calcio al 6 % de 2 minutos (Figura 25.). Se eligió este tratamiento porque, fue similar al tratamiento 7 (4% alginato y 30 segundos de exposición), especialmente, porque en el tratamiento elegido se optimizó el uso del alginato; adicionalmente con este tratamiento, se logró el objetivo de elaborar encapsulados de extracto de fruta milagrosa obteniendo esferas resistentes que pudieron ser sometidas al texturometro para determinar su resistencia en gF.

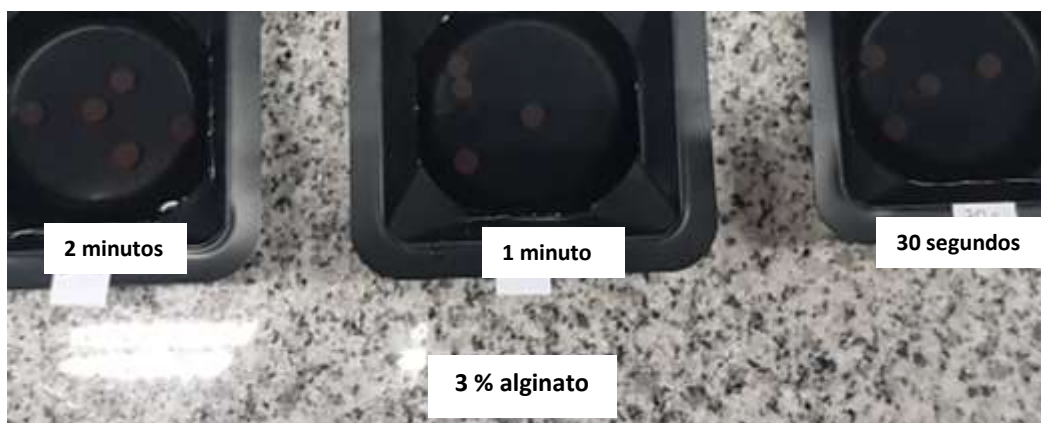


Figura 25. Esferificaciones de extracto de fruta milagrosa con 3 % de alginato y distintos tiempos de exposición a solución de cloruro de calcio.

3.4. Esferificación inversa

Inicialmente, se elaboró la solución envolvente, que en esta metodología estuvo constituida por agua destilada y alginato de sodio, sin embargo, se inició con una concentración del 1 % como se lo realizó en el estudio de Duarte y Marell (2018) donde se obtuvo resultados positivos con esta concentración, sin embargo en la presente investigación se creó excesivamente la capa de sedimentos al final del vaso de precipitado, se disminuyó y definió como constante la concentración de alginato al 0.75 %, para evitar el desperdicio del aditivo en los sedimentos. Se estimó que esta diferencia podría deberse a la solubilidad del alginato o la velocidad en la que se licuó, de igual manera, en estudios realizados por Ortíz y Bravo (2018) donde se buscó encapsular una bebida boliviana tradicional, se utilizó una concentración de 0.5 % de alginato, obteniendo resultados positivos, por lo cual el valor establecido en el presente estudio fue coherente con otras investigaciones.

En la solución a esferificar se utilizaron tres ingredientes, primero el extracto de fruta milagrosa (pH entre 5-5.5), segundo, lactato de calcio y tercero, goma xantana. Sin embargo, antes de utilizar lactato de calcio, se utilizaba el mismo cloruro de calcio de la esferificación directa, no obstante, al consumir las esferas resultantes, se percibió un sabor excesivamente salado, tal cual se mencionó en el estudio de Duarte y Marell (2018) en el que se estableció como sustituto el lactato de calcio para eliminar el sabor desagradable, el mismo que podría ser resultado de la formación de sal común dentro de la esfera; al reaccionar el cloruro de calcio diluido en el extracto de fruta milagrosa con el alginato de sodio de la solución envolvente, se forma cloruro de sodio, el cual es atrapado dentro de la matriz de gel promoviendo el sabor salado en las esferas.

A partir de ahí, se reemplazó la sal de calcio de la esferificación directa por lactato de calcio, cabe recalcar que, el lactato de calcio tiene menos calcio disponible (18%) que el cloruro de calcio (36 %). En el estudio realizado por Lee y Rogers

(2012) en el que se buscó el efecto que tiene la fuente de calcio y el tiempo de exposición sobre la esferificación, se realizaron pruebas de esferificación de 1 % de alginato con 1 % de diferentes fuentes de calcio a distintos tiempo de exposición, se concluyó que, la velocidad de gelificación disminuyó con el lactato de calcio (requiere de 500 segundos para alcanzar su máxima dureza), pero no la resistencia final del gel. Estos datos se ratifican en el presente estudio, debido a que el uso de lactato de calcio no tuvo resultados positivos en los tiempos establecidos (30 segundos, 1 minuto y 2 minutos) con concentraciones de 1 % y 2 %, esto podría deberse a que estas concentraciones requieren de mayor tiempo de exposición, por lo cual se aumentó el % de sal cálcica para tener mayor reactividad y disminuir el tiempo en la solución envolvente para tener esferas resistentes, puesto que la velocidad de gelificación tiene relación directa con la concentración de calcio (Lee y Rogers, 2012). Por tanto, se definieron concentraciones de 3 %, 4 % y 5 % de lactato de calcio.

El uso de la goma xantana fue necesario en esta metodología, ya que al no aumentar la viscosidad de la sustancia a esferificar, las esferas se deformaron (forma plana) (Figura 26.), esto se podría deber a la diferencia de viscosidades de los líquidos, pues, la solución envolvente al estar con alginato es más viscosa, lo cual, no permite el paso de la esfera, provocando la deformación de la misma. Esta posibilidad se considera también en el estudio de técnicas de encapsulación realizado por Muñoz (2017), donde se estimó que, en algunos casos, la deformación de las esferas se debe a la diferencia de viscosidad de la solución a esferificar y de la solución envolvente. Para corregir el problema se adicionó goma xantana, lo mismo se realizó en el presente estudio, colocando 0.4 % de goma xantana, misma que produjo un incremento de la viscosidad y las esferas de 0.5 cm de diámetro pudieron llegar al fondo del vaso de precipitado sin ningún perder su forma esférica perfecta.



Figura 26. Deformación de esferas por falta de viscosidad.

Una vez realizados todos los tratamientos de esferificación inversa, las esferas resistieron al trasvasado y aumentaban su resistencia según el tratamiento, sin embargo T10 (3 % lactato de calcio y 30 segundos de exposición) no fue sometida al texturometro (se rompió inmediatamente cuando se colocó en la placa del texturometro). Todas las esferas obtenidas por este método se diferenciaron principalmente, por mantener el extracto de fruta milagrosa en estado líquido, con lo cual se demuestra la dinámica de la esferificación inversa, la cual consiste en crear una matriz de gel hacia el exterior manteniendo la sustancia a esferificar en su estado líquido, debido a que los G-bloques de la solución envolvente se reestructuran al reaccionar con el calcio de la sustancia a esferificar, formando un gel de la solución envolvente, esto se menciona en los estudios de la nueva cocina científica de Mans y Castells (2011), donde se obtuvo resultados idénticos y se las denominó esferas líquidas.

Por características se eligió como mejor tratamiento el número 18, que consistió en una concentración del 5 % lactato de calcio y 2 minutos de exposición a la solución de alginato de sodio (Figura 27.). Se eligió este tratamiento porque presentó la mayor resistencia al momento de trasvasar no se produjeron alteraciones, adicionalmente, al momento de consumir la esfera tenía una matriz protectora resistente, es decir, no se rompía con facilidad en la cavidad bucal. Se podría aumentar el tiempo de exposición a 500 segundos, tal como se menciona en el estudio de Lee y Rogers (2012) donde se evaluó la influencia de diferentes fuentes de calcio y el tiempo de exposición sobre la esferificación, para observar si la diferencia es significativa al alcanzar la máxima dureza en la

esfera. Adicional se ratifica que el lactato de calcio requiere de mayor tiempo de exposición a la solución envolvente de alginato, ya que, al consumir las esferas de los tratamientos de menor tiempo (30 segundos), estas eran suaves y se disgregaban rápidamente en la boca.



Figura 27. Esferas de extracto de fruta milagrosa del T18.

3.5. Determinación de resistencia

Las esferas elaboradas en cada tratamiento fueron sometidas 3 veces (3 repeticiones) al texturometro, para determinar la resistencia (gF) por el método “*gel capsule*”, el cual consiste en presionar la esfera de extracto de fruta milagrosa hasta su ruptura. Inicialmente, con los valores obtenidos, se determinó la resistencia promedio de las capsulas elaboradas bajo la metodología de esferificación directa (Tabla 10.).

Tabla 10.

Resistencia promedio de esferificaciones por esferificación directa.

Tratamiento	Resistencia promedio (gF)
T1	0,00
T2	12,40
T3	17,30

T4	16,97
T5	19,02
T6	19,85
T7	18,42
T8	20,07
T9	22,53

De igual manera, se determinó la resistencia promedio de las capsulas elaboradas bajo la metodología de esferificación inversa (Tabla 11.).

Tabla 11.

Resistencia promedio de esferificaciones por esferificación inversa.

Tratamiento	Resistencia promedio (gF)
T10	0.00
T11	6.77
T12	14.37
T13	9.10
T14	10.67
T15	12.12
T16	11.87
T17	14.40
T18	18.13

Con las resistencias promedio obtenidas, se pudo verificar que los resultados de esferificación del presente estudio son consecuentes con los estudios realizados por Lee y Rogers (2012), debido a que, las esferas creadas con cloruro de calcio tienen mayor resistencia a las que fueron creadas con lactato de calcio. Esto estaría explicado porque el lactato de calcio requiere mayor tiempo que el cloruro de calcio para llegar a su máxima dureza, pues, a una concentración de 1 % el cloruro de calcio llegó a su máxima dureza a los 100 segundos, mientras que el

lactato de calcio a la misma concentración llegó a su máxima dureza en 500 segundos (Lee y Rogers, 2012).

Otro posible motivo es la diferencia de la cinética con la que se formó el gel en las metodologías, dado que en la esferificación directa la formación progresiva del gel hacia el interior, provocó que las capsulas sean completamente de gel, lo que hace que las esferas sean más fuertes, al ser un solo cuerpo gelificado, mientras que las capsulas de esferificación inversa formó el gel hacia el exterior y creó una matriz que conservó en estado líquido el extracto de fruta milagrosa en su interior; es decir, en este caso, resultó un saco de gel que protege al líquido interior, por lo cual tuvo menos resistencia (Pasin y González, 2012).

El tiempo de exposición a la solución envolvente es directamente proporcional a la resistencia (Lee y Rogers, 2012), pues, como se observó en las resistencias promedio, los tratamientos, tanto de esferificación directa como inversa, expuestos por 30 segundos a la solución envolvente tienen la menor resistencia con respecto a los demás tratamientos de su misma concentración, por ejemplo, las esferas del tratamiento T4 (3 % alginato y 30 segundos de exposición) presentaron la menor resistencia promedio en comparación al resto de tratamientos que tenían la misma concentración de alginato (3 %). Lo mismo sucedió en la esferificación inversa, donde el tratamiento T13 (4 % lactato de calcio y 30 segundos de exposición) tuvo la menor resistencia promedio de los tratamientos con su misma concentración (4 %); de esta manera, se evidenció claramente la influencia que tiene el tiempo de exposición a la solución envolvente con la resistencia del gel (Duarte y Marell, 2018).

En el estudio de Pasin y Gonzáles donde se evaluó técnicas de microencapsulación para aplicación en alimentos (2012), se concluyó que la concentración de alginato de sodio en esferificación directa como de lactato de calcio en esferificación inversa tuvo influencia directa sobre la resistencia de las

esferas. Estos datos son semejantes a los encontrados en el presente estudio, ya que, en los resultados de resistencia promedio, se identificó que, a un mismo tiempo de exposición, con aumento de la concentración de las sustancias antes mencionadas en su respectiva metodología, la resistencia aumentó, posiblemente se debió a que hay mayor concentración de G-bloques y de iones calcio respectivamente con la metodología (Pasin y González, 2012). Por ejemplo, los tratamientos T2, T5 y T8 fueron expuestos a la solución envolvente (solución de cloruro de calcio) por 1 minuto, cada tratamiento tuvo distinta concentración de alginato (2 %, 3 % y 4 %), lo cual influyó directamente con la resistencia, es decir que, cuando se aumentó la concentración de alginato, aumentó la resistencia de las esferas a un mismo tiempo de exposición. Lo mismo ocurrió con la esferificación inversa, se observaron las resistencias promedio de los tratamientos T11, T14 y T17 en la tabla 11, con lo cual también se evidenció que, la resistencia aumentó proporcionalmente a la concentración de lactato de calcio (3 %, 4 % y 5 %) en el extracto de fruta milagrosa; al igual que el estudio de Pasin y González (2012), la influencia de la concentración y los tiempos de exposición afectan la dureza del gel que se forma en la gelificación iónica.

3.5.1. Análisis de varianza

En la tabla 12 se desarrolló el análisis de varianza de la resistencia de las esferas de los tratamientos realizados por esferificación directa, mientras que en la tabla 16 se realizó el análisis de varianza de la resistencia de las esferas elaboradas por esferificación inversa. Al encontrar diferencia significativa se procedió al análisis funcional (Tukey) determinando el mejor tiempo de exposición a la solución envolvente, la mejor concentración de alginato y lactato de calcio, dependiendo de la metodología, y el mejor tratamiento con respecto a la resistencia.

Tabla 12.

ADEVA esferificación directa.

Fuente de variación	Grados de libertad	S.C	C.M	F	p-valor
Total	26	1296.26			
Concentración de alginato (F1)	2	563.52	281.76	23.40	<0.0001
Tiempo de exposición (F2)	2	305.65	152.82	12.69	0.0004
F1 X F2	4	210.38	52.59	4.37	0.0121
Error experimental	18	216.72	12.04		
C.V %	21.31				

Nota: S.C= suma de cuadrados, C.M= cuadrados medios, F= valor, p-valor= valor de $p > 0.05$.

Con los resultados del análisis de varianza que se observaron en la tabla 12, se estableció que estadísticamente existen diferencias significativas, debido a que los valores de “p-valor” fueron menores al 5% (0.05), por tal motivo se realizó el análisis funcional (Tukey al 5%) para determinar el mejor tiempo de exposición a la solución de cloruro de calcio, la mejor concentración de alginato y el mejor tratamiento para obtener esferas resistentes.

Cuando se realizó el análisis funcional de la esferificación directa por la prueba de Tukey al 5 %, se concluyó que, con respecto al tiempo de exposición a la solución de cloruro de calcio, 30 segundos es el tiempo menos indicado, porque las esferas presentaron la menor resistencia al ser expuestas por este periodo de tiempo. Sin embargo, al observar la tabla 13, se evidenció que no hay diferencia significativa entre 1 minuto y 2 minutos, por lo cual se establece que el mejor tiempo de exposición para esferificación directa es de 1 minutos, de esta manera, se puede optimizar el tiempo del proceso y obtener mayor número de esferas resistentes en un menor tiempo.

Tabla 13.

Análisis funcional (Tukey) del tiempo de exposición a la solución envolvente de cloruro de calcio.

Tiempo de exposición	Medias	n	E.E.	
30 segundos	11.79	9	1.16	A
1 minuto	17.16	9	1.16	B
2 minutos	19.89	9	1.16	B

Nota= Medias con igual letra, no presentaron diferencia significativa.

Con respecto a la concentración de alginato diluido en el extracto de fruta milagrosa, las concentraciones con mejor resistencia fueron 3 % y 4 %, sin embargo, entre ambas concentraciones se determinó que no existe diferencia significativa (Tabla 14.), por ello se establece el 3 % de alginato de sodio como la mejor concentración porque de esta manera se optimiza el uso del aditivo y se obtienen resultados similares en la resistencia de las esferas.

Tabla 14.

Análisis funcional (Tukey) de la concentración de alginato de sodio en el extracto de fruta milagrosa.

Concentración de alginato	Medias	n	E.E.	
2 % de alginato	9.90	9	1.16	A
3 % de alginato	18.61	9	1.16	B
4 % de alginato	20.34	9	1.16	B

Nota= Medias con igual letra, no presentaron diferencia significativa.

Una vez determinado el mejor tiempo de exposición y la mejor concentración de alginato, se define como el mejor tratamiento al tratamiento T5 (3 % alginato y 1 minuto de exposición) puesto que cumple con el objetivo de crear esferificaciones resistentes por el método directo; adicional a esto, se optimiza

tiempos y materiales que pueden ser utilizados para elaborar mayor número de esferas. Cabe recalcar que, anteriormente, se estableció como el mejor tratamiento al tratamiento T6 (3 % alginato y 2 minuto de exposición) pues, cumplía con la resistencia y el objetivo de esferificar el extracto de fruta milagrosa, sin embargo, con el tratamiento T5 se optimizó el tiempo y se consigue el mismo resultado, al ver que no existió diferencia significativa entre ambos tratamientos (Tabla 15.)

Tabla 15.

Análisis funcional (Tukey) de la interacción entre concentración de alginato de sodio y tiempo de exposición a solución de cloruro de calcio.

Concentración de alginato	Tiempo de exposición	Medias	n	E.E.	
2 % de alginato	30 segundos	0	3	2.0	A
2 % de alginato	1 minuto	12.40	3	2.0	B
3 % de alginato	30 segundos	16.97	3	2.0	B C
2 % de alginato	2 minutos	17.30	3	2.0	B C
4 % de alginato	30 segundos	18.42	3	2.0	B C
3 % de alginato	1 minuto	19.02	3	2.0	B C
3 % de alginato	2 minutos	19.85	3	2.0	B C
4 % de alginato	1 minuto	20.07	3	2.0	B C
4 % de alginato	2 minutos	22.53	3	2.0	C

Nota= Medias con igual letra, no presentaron diferencia significativa.

Con estos datos estadísticos se acepta la hipótesis alternativa de la esferificación directa, se demostró que la concentración de alginato de sodio y tiempo de exposición a cloruro de calcio afectó la resistencia del encapsulado, obteniendo resultados congruentes a los encontrados por Pasin y Gonzáles (2012).

Con los resultados del análisis de varianza de esferificación inversa observados en la tabla 16, se estableció que, estadísticamente existió diferencias

significativas, ya que los valores de “p-valor” fueron menores al 5% (0.05), por esta razón se realizó el análisis funcional (Tukey al 5%) para determinar el mejor tiempo de exposición a la solución de alginato de sodio, la mejor concentración de lactato de calcio y el mejor tratamiento para obtener esferas resistentes.

Tabla 16.

ADEVA esferificación inversa.

Fuente de variación	Grados de libertad	S.C	C.M	F	p-valor
Total	26	683.35			
Concentración lactato de calcio (F1)	2	271.19	135.59	84.38	<0.0001
Tiempo de exposición (F2)	2	280.27	140.14	87.21	<0.0001
F1 X F2	4	102.96	25.74	16.02	<0.0001
Error experimental	18	28.92	1.61		
C.V %	11.71				

Nota: S.C= suma de cuadrados, C.M= cuadrados medios, F= valor, p-valor= valor de $p > 0.05$.

Una vez realizados los análisis funcionales por la prueba de Tukey al 5 %, se concluyó que en los tiempos de exposición a la solución envolvente de alginato de sodio al 0.75 % hubo diferencias significativas entre los tres tiempos (30 segundos, 1 minuto y 2 minutos) (Tabla 17.), siendo el mejor tiempo 2 minutos, lo cual es razonable, dado que el lactato de calcio, al tener solo 18 % de calcio disponible, requiere de mayor tiempo de exposición para alcanzar su máxima dureza (Lee y Rogers, 2012).

Tabla 17.

Análisis funcional (Tukey) del tiempo de exposición a la solución envolvente de alginato de sodio.

Tiempo de exposición	Medias	n	E.E.	
30 segundos	6.99	9	0.42	A
1 minuto	10.61	9	0.42	B
2 minutos	14.87	9	0.42	C

Nota= Medias con igual letra, no presentaron diferencia significativa.

Además, con la tabla 18, se determinó que la mejor concentración de lactato de calcio en el extracto de fruta milagrosa fue del 5 %, presenta la mejor resistencia y diferencias significativas con las concentraciones de 3 % y 4 %.

Tabla 18.

Análisis funcional (Tukey) de la concentración de lactato de calcio en el extracto de fruta milagrosa.

Concentración de lactato de calcio	Medias	n	E.E.	
3 % de lactato de calcio	7.04	9	0.42	A
4 % de lactato de calcio	10.63	9	0.42	B
5 % de lactato de calcio	14.80	9	0.42	C

Nota= Medias con igual letra, no presentaron diferencia significativa.

Es así que se estableció a T18 (5% lactato de calcio y 2 minutos de exposición) como el mejor tratamiento de esferificación inversa (Tabla 19.), estadísticamente se obtuvo en este tratamiento la mejor resistencia, además, anteriormente también se eligió este tratamiento por las características de resistencia que presentaba, pues al momento de consumir la esfera tuvo una matriz protectora resistente y mantuvo el extracto de la fruta milagrosa en estado líquido, corroborando que por, esferificación inversa este es el mejor tratamiento, sin

embargo, se podrían realizar estudios de esferificación inversa con menor concentración y mayor tiempo de exposición para optimizar materiales.

Tabla 19.

Análisis funcional (Tukey) de la interacción entre concentración de lactato de calcio y tiempo de exposición a solución de alginato de sodio.

Concentración de lactato de calcio	Tiempo de exposición	Medias	n	E.E.	
3 % lactato de calcio	30 segundos	0	3	0.73	A
3 % lactato de calcio	1 minuto	6.77	3	0.73	B
4 % lactato de calcio	30 segundos	9.10	3	0.73	B C
4 % lactato de calcio	2 minutos	10.67	3	0.73	C
5 % lactato de calcio	30 segundos	11.87	3	0.73	C D
4 % lactato de calcio	1 minuto	12.12	3	0.73	C D
3 % lactato de calcio	2 minutos	14.37	3	0.73	D
5 % lactato de calcio	1 minuto	14.40	3	0.73	D
5 % lactato de calcio	2 minutos	18.13	3	0.73	E

Nota= Medias con igual letra, no presentaron diferencia significativa.

Con los resultados obtenidos en el presente estudio, se evidenció que, la concentración de lactato de calcio y el tiempo de exposición a la solución envolvente de alginato de sodio afectan la resistencia de los encapsulados, por tanto, se acepta la hipótesis alternativa de la esferificación inversa.

3.5.2. Resistencia de esferas a bebidas

Previamente se escogió el mejor tratamiento de cada metodología (T5 de esferificación directa y T18 de esferificación inversa), sin embargo, se buscaba que las esferas fueran parecidas a las utilizadas en los distintos té de burbujas, es decir que las esferas exploten en la cavidad bucal y liberen la sustancia encapsulada (extracto de fruta milagrosa), la misma que debe encontrarse en

estado líquido; para conseguir este efecto, se eligió al tratamiento T18 para observar la resistencia en una infusión de futas cítricas, ya que este tratamiento al ser realizado por esferificación inversa cumplió el requerimiento de ser una capsula explosiva.

Las esferas elaboradas fueron colocadas en dos infusiones de frutas cítricas para determinar la supuesta resistencia que pueden tener en la bebida, para lo cual, en una de ellas se colocó limón para bajar el pH y observar la influencia del pH en la esferificación, en la otra infusión no se adicionó ninguna sustancia y se la mantuvo en su pH normal (Tabla 20.).

Tabla 20.

Muestras de té con su respectivo pH.

Muestra de té	pH
Té sin limón	6.76
Té con limón	3.11

Ambas infusiones iniciaron con una temperatura de 38.2 °C y permanecieron por una hora a temperatura ambiente, cuando se concluyó el tiempo, se visualizaron las esferas colocadas en las infusiones. En ambos tratamientos no existió ningún tipo de ruptura en las esferas colocadas en la infusión con limón (Figura 28.) y colocadas en la infusión sin limón (Figura 29.), sin embargo, al consumir las esferas se percibió un ligero cambio en la resistencia de las esferas que permanecieron en la infusión con limón. Por lo cual se estima que el pH de la bebida influye negativamente en la resistencia de las esferas, al igual que en el estudio realizado por Ortíz y Bravo (2018) donde se concluyó que al exponer las esferas elaboradas por gelificación ionica por largos lapsos de tiempo a un pH extremo se degradó la matriz de gel.

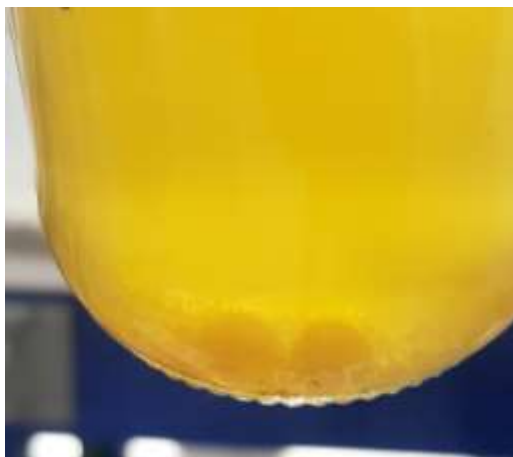


Figura 28. Infusión de frutas cítricas con limón.

Con estos datos se pudo concluir que el tiempo de exposición a bebidas con pH extremadamente ácido afecta la resistencia de los encapsulados, sin embargo, se requieren de más datos para definir el nivel de degradación de la matriz de gel, por ello, se pudo aceptar la hipótesis alternativa, porque, la exposición por largos periodos de tiempo de los encapsulados a bebidas, afecto la resistencia del encapsulado.



Figura 29. Infusión de frutas cítricas sin limón.

3.6. Modificación del sabor

El efecto modificador del sabor de la fruta milagrosa no se vio afectado en ninguna de las dos técnicas de esferificación con lo cual se evidenció que la gelificación iónica es un método adecuado para conservar ingredientes alimenticios y conservar las características de los mismos (Sneyder, 2016). Según estudios realizados sobre la dosis de extracto de fruta milagrosa necesaria para ocultar el sabor ácido y percibir el sabor dulce, se definió por Cevallos, Andrade, y Arce (2007) que la dosis promedio en la que se dio el efecto modificador del sabor fue de 0.6 ml de extracto compuesto por 250 ml agua y 250 g de fruta, mientras que en estudios de Hudson, Sims, y Odabasi (2018), se estableció una baya completa (0.29 g de extracto) para su efecto.

En el presente estudio, se estableció que para obtener claramente el efecto modificador se debe consumir un mínimo de 3 esferas, puesto que cada esfera contienen en promedio de 0.065 ml de extracto de fruta milagrosa, es decir que, al consumir 3 esferas se consume en total 0.19 ml de extracto de fruta milagrosa (aproximadamente el 65 % del extracto obtenido por baya), la diferencia al comparar este valor con el establecido por Cevallos, Andrade, y Arce (2007) se puede deber a que en sus estudios la extracción se realizó con agua en relación 1:1 con la fruta (250 ml de agua con 250 g de fruta), mientras que en el presente estudio no se adicionó agua, es decir se utilizó extracto sin diluciones, por lo cual, se requiere de menor cantidad para obtener el efecto, al igual que en los estudios de Hudson, Sims, y Odabasi (2018), donde la dosis utilizada para su estudio fue una baya completa, sin embargo, no se estableció una dosis mínima para el efecto; se concluyó que una baya es suficiente para que modifique el sabor ácido a dulce y el efecto persista hasta que la amilasa salival desnaturalice la glucoproteína (30 minutos hasta 1 hora) (Martínez, 2016), esto corrobora lo encontrado en el presente estudio, donde por 3 esferas se consume más de la mitad del extracto obtenido de una baya, suficiente para obtener el efecto.

3.7. Estabilidad

Se realizaron pruebas de estabilidad en un tubo de ensayo con infusión de frutas cítricas como líquido de gobierno. El proceso se realizó en la cámara acelerada de estabilidad (40 °C, 75 % de humedad y luz) (Figura 30.), donde se comprobó la capacidad que tienen las esferas para conservar sus propiedades por aproximadamente 6 meses, ya que, 10 días en la cámara de estabilidad representó 60 días fuera de ella; de esta manera, se pudo observar los cambios físicos, químicos y microbiológicos en los diferentes tiempos.



Figura 30. Tubo de ensayo con esferas y líquido de gobierno en la cámara de estabilidad.

3.7.1. Estabilidad física

La evaluación de la estabilidad física se determinó cada 10 días para observar los cambios progresivos generados en las esferas (Tabla 21.).

Tabla 21.

Características físicas de las esferas en la cámara de estabilidad.

Días dentro de C.E.	Días fuera de C.E.	Color	Forma	Textura
0	0	Rosado	Esférica	Frágil
10	60	Anaranjado	Esférica	Frágil
20	120	Blanquecino	Esférica	Gomosa
30	180	Blanquecino	Esférica	Gomosa

Nota: C.E.= Cámara de estabilidad acelerada.

En las pruebas de estabilidad física (Tabla 21.), inicialmente se establecieron los factores de comparación, a partir de las propiedades físicas de las esferas del día 0 que presentaron color rosado y textura frágil (Figura 31.).



Figura 31. Esferas día 0 en la cámara de estabilidad acelerada.

Al cabo de 10 días en la cámara de estabilidad, se trasvasó la muestra a agua destilada para observar fácilmente la degradación del color, que fue el principal cambio, considerando que la esfera mantuvo su forma y textura inicial, únicamente la coloración se tornó anaranjada pálida (Figura 32.), este cambio pudo deberse a que las esferas obtenidas por gelificación iónica son muy porosas, resultando que, por osmosis con la infusión de frutas cítricas, las esferas propaguen el extracto de fruta milagrosa diluyendo el extracto lo cual provocó la modificación del color (Guevara, 2008).



Figura 32. Esferas día 10 en la cámara de estabilidad acelerada.

El comportamiento del color previamente mencionado se mantiene constante por el resto de días en los que la muestra permaneció en la cámara de estabilidad, pues en el día 20 las esferas perdieron su color, transformándose totalmente a color blanco (Figura 33.).



Figura 33. Esferas día 20 en la cámara de estabilidad acelerada.

En el día 30 (Figura 34.) las esferas blancas presentaron manchas color rosa; estas manchas posiblemente se dieron porque los sólidos de la infusión (polvo) se adhirieron a las esferas, lo cual hace que visualmente, fueran de color rosado nuevamente.



Figura 34. Esferas día 30 en la cámara de estabilidad acelerada.

La textura fue el último cambio que se visualizó en las esferas, ya que al pasar el tiempo, la forma esférica se mantuvo constante, no obstante, la textura cambió en el día 20, la esfera presentó textura gomosa (la densidad persistió a lo largo de la masticación) y en el interior presentó una sola masa, en la cual el líquido encapsulado no se diferenció, esta característica se puede deber a que el agua utilizada para hacer la infusión contenía minerales que reaccionaron con el alginato y construyeron un gel, sin embargo, se requiere de datos adicionales para corroborar la posible causa del efecto citado.

3.7.2. Estabilidad química

En la estabilidad química, se evaluó la existencia del efecto modificador del sabor de las esferas al transcurrir el tiempo en la cámara de estabilidad, para ello, se consumió una esfera transcurrido un minuto, se determinó la existencia del efecto con una muestra de limón (Tabla 22).

Tabla 22.

Evaluación de modificación del sabor en días establecidos.

Días dentro de la cámara	Existencia de efecto
Día 0	Si existió efecto
Día 10	Si existió efecto

Día 20	No existió efecto
Día 30	No existió efecto

La existencia del efecto se mantuvo en los primeros días, es decir en el día 0 y en el día 10. En los siguientes días, la desaparición del efecto posiblemente se debió a la interacción osmótica con el líquido de gobierno, considerando que al igual que el cambio físico del color, la glucoproteína pudo salir de la matriz de gel y diluirse en el líquido de gobierno, lo cual disminuye o elimina totalmente el efecto modificador del sabor (Guevara, 2008).

3.7.3. Estabilidad microbiológica

Para determinar la estabilidad microbiológica, se tomó como referencia los requisitos microbiológicos establecidos en la norma INEN 1961 “Gelatina comestible. Requisitos” (Tabla 23.); sin embargo, se omitió el requisito de *Clostridium perfringens* porque en el presente estudio no se utilizaron materias primas de origen animal, las mismas que pueden ser causantes de contaminación con el microorganismo previamente mencionado (FAO, 2002).

Tabla 23.

Requisitos microbiológicos de la norma INEN 1961.

Requisitos	Unidad	n	c	M	M
<i>Staphylococcus aureus</i>	UFC/g	5	1	1.0×10^2	1.0×10^4
Mohos	UFC/g	5	1	1.0×10^1	1.0×10^2
<i>Salmonella SPP</i>	UFC/g	10	0	Ausencia	

Nota: UFC= unidades formadoras de colonias, n= número de muestras a analizar, c=número de muestras admisibles con resultados entre m y M, m= límite de aceptación, M= límite superado el cual se rechaza.

Los análisis microbiológicos se realizaron en los días establecidos (0, 10, 20 y 30 días), y posterior a la incubación, se obtuvo los resultados descritos en la tabla 24.

Tabla 24.

Recuento de UFC/g de cada microorganismo en su respectivo día.

Día	<i>Staphylococcus aureus</i>	Mohos	<i>Salmonella SPP</i>
0	0 UFC/g	0 UFC/g	0 UFC/g
10	0 UFC/g	0 UFC/g	0 UFC/g
20	0 UFC/g	0 UFC/g	0 UFC/g
30	0 UFC/g	0 UFC/g	0 UFC/g

Gracias a los resultados, se determinó que las esferas conservaron sus características microbiológicas por aproximadamente 6 meses, posiblemente por la inocuidad del proceso no existieron unidades formadores de colonias (UFC) de *Staphylococcus aureus* (Figura 35.)

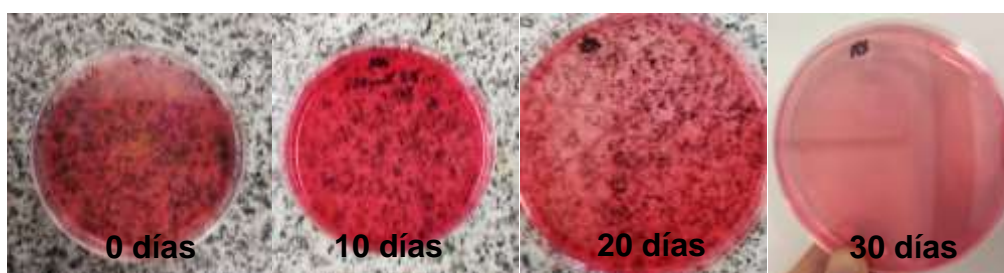


Figura 35. Agar manitol sal (MS) posterior al tiempo de incubación.

Respecto al conteo de *Salmonella SPP* se tuvo un desarrollo nulo, ya que no existió crecimiento en ninguno de los días que se conservó el producto en la cámara de estabilidad acelerada (Figura 36.).

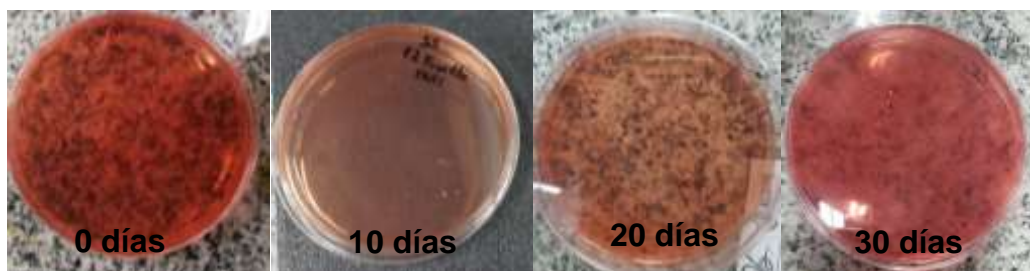


Figura 36. Agar salmonella-shigella (SS) posterior al tiempo de incubación.

La adición de sorbato de potasio en 800 mg por kilo de extracto de fruta milagrosa, evitó el crecimiento de mohos y levaduras (Figura 37.). Cabe recalcar que la cantidad utilizada de sorbato de potasio no excede la cantidad máxima establecida de 1000 mg por kilo de producto (FAO, 2018). Con estos resultados; se estableció que las esferas tuvieron principalmente la capacidad de conservar las propiedades microbiológicas; en los demás resultados de estabilidad, existieron diversas variaciones tanto en características físicas como químicas.

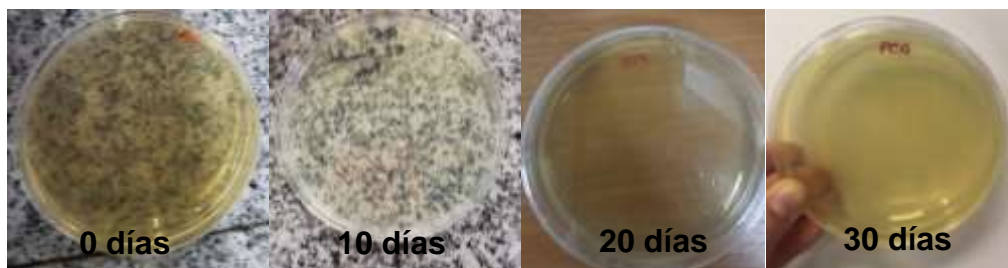


Figura 37. Agar PCA posterior al tiempo de incubación.

4. Conclusiones y recomendaciones

4.1. Conclusiones

Con respecto a la resistencia de los encapsulados elaborados mediante esferificación directa, se concluyó que tanto el tiempo de exposición a la solución envolvente de cloruro de calcio (6 %) como la concentración de alginato de sodio disuelto en el extracto de fruta milagrosa influyen directamente con la resistencia de las esferas, por consiguiente, se definió que el mejor tiempo de exposición fue de 1 minuto y la mejor concentración de alginato del 3 % (tratamiento 5), dado que, con estas características se obtienen esferas resistentes y, se optimiza materiales y tiempo de proceso.

Los encapsulados elaborados mediante esferificación directa demostraron que la cinética de formación de gel inicia en el exterior y avanza progresivamente hasta el centro de la esfera resultando esferas donde el extracto de fruta milagrosa está totalmente gelificado, esto se debe a que los G-bloques estuvieron diluidos en el extracto, por lo cual, al reaccionar con los iones calcio se reestructuran y gelifican la sustancia de interés. Por tal motivo, presentaron mayor resistencia que los encapsulados elaborados mediante esferificación inversa, pues las esferas poseen un cuerpo totalmente gelificado y no es solo una matriz de gel protectora como es el caso de las esferas resultantes de la esferificación inversa.

En el estudio se demostró la cinética de formación de gel en la esferificación inversa, ya que, en esta metodología, la formación de gel es progresiva hacia el exterior creando una matriz o vesícula de gel que mantiene en estado líquido el extracto de fruta milagrosa, de esta manera se obtuvieron esferas explosivas que al ingresar a la cavidad bucal y aplicar ligera presión, explotan y liberan el extracto líquido. Pues al solo ser una matriz de gel, presentaron menor

resistencia que las esferas totalmente gelificadas, elaboradas mediante esferificación directa.

Por la reacción de gelificación iónica directa con cloruro de calcio se obtiene cloruro de sodio, porque el sodio del alginato se une fuertemente al cloro del cloruro de calcio de la solución envolvente, sin embargo, en esta metodología no afectó el sabor de los encapsulados, porque la sal formada se queda en la solución envolvente, es así que en esta metodología es óptimo utilizar cloruro de calcio por su alto porcentaje de calcio disponible y por no tener efecto sobre el sabor de las esferas.

La esferificación inversa requiere sustituir la fuente de calcio utilizada en la esferificación directa (cloruro de calcio) por lactato de calcio, el cual al reaccionar con el alginato de sodio no presentó ningún sabor desagradable, no obstante el lactato de calcio tiene menor porcentaje de calcio disponible (18 %) por lo cual, al utilizar este aditivo se requiere de mayor tiempo de exposición a la solución envolvente para aumentar la resistencia.

La exposición de las esferas a bebidas con temperatura inicial de 38.2 °C, por 1 hora, no afectó la resistencia hasta el punto de romper las esferas, sin embargo se estima que el pH ácido de la bebida afecta la resistencia del encapsulado. Por tal, se concluyó que las esferas elaboradas por esferificación directa presentaron mayor resistencia a la exposición a bebidas, ya que, en caso de degradarse el gel, se requiere de a mayor tiempo para degradar totalmente la esfera, mientras que en las esferas elaboradas por esferificación inversa la degradación de la matriz de gel toma menor tiempo y puede generar una ruptura de la esfera en la bebida.

Para ambas metodologías de esferificación se determinó que el pH de la sustancia a esferificar se debe ajustar dentro del rango de 5 - 5.5; para evitar variaciones entre los tratamientos y para brindar condiciones óptimas para el funcionamiento adecuado del alginato de sodio.

Respecto del efecto modificador del sabor, se concluyó que ninguna de las dos metodologías afecta la función de la miraculina, por lo cual es posible realizar esferificaciones resistentes de extracto de fruta milagrosa para evitar el consumo de azúcares y edulcorantes en bebidas.

Se determinó que las esferas cuentan con una vida útil aproximadamente de 60 días, al superar este de tiempo se perdieron característica de color, textura y efecto modificador del sabor, sin embargo microbiológicamente las esferas fueron estables hasta aproximadamente 180 días. Se estima que la interacción osmótica con el líquido de gobierno provocó inestabilidad física y química de las esferas, pues, al tener un líquido de gobierno con similares características se logra mínima interacción osmótica en las esferas.

4.2. Recomendaciones

Se recomienda evaluar la estabilidad física, química y microbiológica de la esferificación directa, pues, al presentar la mayor resistencia y no afectar el efecto modificador del sabor de la miraculina, puede ser una alternativa para usar este tipo de encapsulados en postres.

Respecto a la resistencia de las esferas en la exposición a bebidas, se recomienda hacer pruebas con mayores tiempos de exposición y determinar el cambio exacto de la resistencia en bebidas ácidas, ya que de esta manera se

puede establecer un rango de tiempo y de pH en el cual las esferas de alginato sean estables y no sufran ruptura en largos tiempos de exposición a bebidas.

En ambas metodologías, se recomienda realizar diluciones del extracto de fruta milagrosa (con la misma bebida en la que se va a utilizar) para lograr mayor rendimiento y a partir de esta dilución, elaborar un líquido de gobierno con características similares a la sustancia encapsulada evitando la excesiva interacción osmótica, misma que, afectó la capacidad de las esferas de conservar sus propiedades físicas y químicas.

Se recomienda realizar estudios de interacción osmótica de las esferas con el líquido de gobierno, para poder determinar el comportamiento de las esferas una vez colocadas en la bebida.

Referencias

- AccuWeather. (2019). AccuWeather Quito. Recuperado el 16 de Noviembre de 2019, de <https://www.accuweather.com/es/ec/quito/129846/december-weather/129846>
- Almeida, J. G. (4 de Julio de 2013). Una visión global y actual de los edulcorantes. Aspectos de regulación. Recuperado el 5 de Noviembre de 2019, de Scielo: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112013001000003
- Botanical Growers. (2019). Miracle Fruit Tree (synsepalum dulcificum). Recuperado el 2 de Octubre de 2019, de Urban Perennials: <https://urbanperennials.com/product/miracle-fruit-tree-synsepalum-dulcificum/>
- Bubbletea. (2019). bubble tea Ecuador. Recuperado el 16 de Noviembre de 2019, de <http://www.bubbletea.com.ec>
- Camacho, A. (2017). Esferificación, una técnica de la gastronomía molecular. Recuperado el 10 de Noviembre de 2019, de <https://steemit.com/stem-espanol/@andreinac/3w19wy-esferificacion-una-tecnica-de-la-gastronomia-molecular>
- Cevallos, L., Andrade, S., & Arce, J. (2007). ESTUDIO DE LA FRUTA MILAGROSA (Synsepalum dulcificum Daniell) COMO POSIBLE EDULCORANTE NATURAL. Recuperado el 13 de Noviembre de 2019, de <https://www.doc-developpement-durable.org/file/Culture-plantes-a-petits-fuits-sucres/Synsepalum%20dulcificum/Estudio%20del%20a%20fruta%20milagrosa.pdf>
- Díaz, Y., & Torres, L. (2017). Efecto de la Encapsulación en Secado por Atomización de Biocomponentes de Pitahaya Amarilla con Interés Funcional. Recuperado el 6 de Noviembre de 2019, de Scielo: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-07642017000600004
- Duarte, R., & Marell, R. (2018). Esferificación. Recuperado el 18 de Noviembre de 2019, de <https://www.le-fort.org/wp-content/uploads/2018/02/esf-180220.pdf>
- Ecuaforestar. (Octubre de 2019). Ecuaforestar. Recuperado el 20 de Enero de 2019, de <https://ecuaforestar.com/fruto-milagroso/>
- EFSA. (31 de Julio de 2013). Edulcorantes. Recuperado el 12 de Diciembre de 2019, de <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/sweeteners>
- Embobate. (2019). Embobate Ecuador. Recuperado el 12 de Diciembre de 2019, de <https://www.embobatec.com/encuentranos>
- FAO. (2002). Mejoramiento de la calidad y seguridad de los alimentos. Recuperado el 12 de Enero de 2020, de <http://www.fao.org/3/w0073s/w0073s12.htm>
- FAO. (2018). Codex Alimentarius. Recuperado el 20 de Enero de 2020, de http://www.fao.org/gsfaonline/docs/CXS_192s.pdf

- FAO. (2019). Calcium Chloride. Recuperado el 2020 de Enero de 15, de http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/jecfa_additives/docs/Monograph1/Additive-076.pdf
- FAO. (2019). INFORMACIÓN SOBRE EL ADITIVO ALIMENTARIO Sodium alginate (401). Recuperado el 19 de Octubre de 2019, de <http://www.fao.org/gsfaonline/additives/details.html?id=52>
- FAO. (2019). Trisodium citrate. Recuperado el 5 de Noviembre de 2019, de <http://www.fao.org/gsfaonline/additives/details.html?id=4>
- Fernández, B., & Castro, C. (2014). ALGINATE FIBERS OBTAINED BY COAGULATION SPINNING WITH MULTIVALENT METAL SULPHATES. Recuperado el 7 de Noviembre de 2019, de <http://ve.scielo.org/pdf/rlmm/v35n2/art05.pdf>
- Fuentes, A., & Javiera, M. (2010). Sensopercepción Gustativa: una Revisión. Recuperado el 12 de Noviembre de 2019, de https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-381X2010000200010
- Fuentes, A., & María, F. (2010). Sensopercepción Gustativa. Recuperado el 7 de Noviembre de 2019, de https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-381X2010000200010
- GBIF. (2019). Global Biodiversity Information Facility. Recuperado el 5 de Octubre de 2019, de <https://www.gbif.org/es/occurrence/map?q=synsepalum%20dulcificum>
- Gong Cha. (2019). GONG CHA. Recuperado el 5 de Octubre de 2019, de <https://www.gongcha.mx/inicio>
- Gong Cha. (2019). Gong Cha Canada. Recuperado el 22 de Octubre de 2019, de <https://www.gongchacanada.ca/about-us>
- González, R., Pérez, J., & Lena, M. (2015). Efecto de la Microencapsulación sobre la Viabilidad de *Lactobacillus delbrueckii* sometido a Jugos Gástricos Simulados. Recuperado el 19 de Noviembre de 2019, de https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-07642015000500003
- GTM. (Agosto de 2014). Hoja de datos de seguridad citrato de sodio. Recuperado el 4 de Enero de 2020, de <http://www.gtm.net/images/industrial/c/CITRATO%20DE%20SODIO.pdf>
- Guevara, B. (2008). Encapsulacion: Tecnicas y aplicaciones en la industria alimentaria. Puebla. Recuperado el 29 de Diciembre de 2019
- Hernández, B. N., & Vázquez, R. (2019). Revisión de la evidencia científica y opinión técnica sobre el consumo de edulcorantes no calóricos en enfermedades gastrointestinales. Recuperado el 29 de Diciembre de 2019, de Revista de Gastroenterología de México: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S2255534X19301008?token=FEAC279246D749155D001E42EDA990D1CA8A704AB65CCCC7386349A8CB05FEFE6CFA29B7BA91A1A1405BD0FC10AB70668>

- Hernández, J., Hinojosa, P., & Salazar, Á. (2018). The conservation of the agricultural use bacteria *Azospirillum Brasilense* by microencapsulation. Recuperado el 29 de Diciembre de 2019, de http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0250-54602018000400002&lng=en&nrm=iso
- Hudson, S. D., Sims, C., & Odabasi, A. (14 de Junio de 2018). Flavor Alterations Associated with Miracle Fruit and *Gymnema sylvestre*. Recuperado el 12 de Diciembre de 2019, de NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6108391/>
- Irache, J. (2010). Micro- y nanoencapsulación de aditivos y otros compuestos de interés alimentario. Recuperado el 29 de Diciembre de 2019, de https://www.coiaanpv.org/recursos/files/web/congresos_y_jornadas/historico_de_congresos/congreso_agroalimentacion/ponencias/por_la_tarde/por_la_manyana/np-food-irache-2011.pdf
- Lee, A., & Chung, O. (2019). Sugars, sweet taste receptors, and brain responses. Recuperado el 20 de Diciembre de 2019, de Molecular Nutrition: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128498866000203>
- Lee, P., & Rogers, M. (2012). Effect of calcium source and exposure-time on basic caviar spherification using sodium alginate. Recuperado el 20 de Diciembre de 2019, de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878450X13000073>
- Madan, M. (02 de Enero de 2017). Fruta milagrosa al rescate de pacientes de cáncer. Recuperado el 25 de Octubre de 2019, de <https://www.elnuevoherald.com/noticias/sur-de-la-florida/article124178879.html>
- Mans, C., & Castells, P. (Octubre de 2011). La nueva cocina científica. Recuperado el 20 de Diciembre de 2019, de <https://www.investigacionyciencia.es/files/7505.pdf>
- mapcoordinates. (2019). mapcoordinates. Recuperado el 22 de Septiembre de 2019, de <https://www.mapcoordinates.net/es>
- Martínez, C. (22 de Abril de 2016). Revelando el secreto de la fruta milagrosa. Recuperado el 22 de Octubre de 2019, de http://www.renc.es/imagenes/auxiliar/files/RENC_2016_4_04.pdf
- McGrath, M. (12 de Noviembre de 2018). 30 Under 30 2019: Introducing Food And Drink's Rising Stars. Recuperado el 29 de Diciembre de 2019, de Forbes: <https://www.forbes.com/sites/maggiemcgrath/2018/11/13/30-under-30-2019-introducing-food-and-drinks-rising-stars/#4b86db897c53>
- Méndez, D., & Quintero, J. (2015). Alginato de sodio en el desarrollo de películas comestibles. Recuperado el 29 de Diciembre de 2019, de https://www.researchgate.net/publication/294892030_Alginato_de_sodio_en_el_desarrollo_de_pelculas_comestibles
- Mesa, J. (2003). Utilización de algas pardas (*Sargazos*) para la obtención de Alginatos de Sodio de diferentes calidades. Recuperado el 12 de Octubre de 2019, de

- http://www.proceedings.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=MSC000000002200000100006&lng=en&nrm=iso
- Miracle Fruit Farm. (Octubre de 2019). Miracle Fruit Farm. Recuperado el 22 de Octubre de 2019, de <https://www.miraclefruitfarm.com/our-farm>
- Muñoz, V. (2017). Técnica de esferificación. Recuperado el 10 de Noviembre de 2019, de <https://cookstorming.com/2017/tecnica-de-esferificacion>
- Nava, E., & Álvarez, G. (2015). Microencapsulación de componentes bioactivos. Recuperado el 29 de Diciembre de 2019, de <https://www.redalyc.org/pdf/674/67446014009.pdf>
- Nkwocha, C. (2014). PROXIMATE AND MICRONUTRIENT ANALYSES OF SYNSEPALUM DULCIFICUM PULP. Recuperado el 26 de Octubre de 2019, de SCIRJ: https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/34394514/PROXIMATE_AND_MICRONUTRIENT_ANALYSES_OF_SYNSEPALUM_DULCIFICUM_PULP.pdf?response-content-disposition=inline%3B%20filename%3DPROXIMATE_AND_MICRONUTRIENT_ANALYSES_OF_S_OF.pdf&X-Amz-Algorithm=AWS4-HMAC-SHA25
- OPS. (2014). Edulcorantes. Recuperado el 12 de Diciembre de 2019, de https://www.paho.org/ecu/index.php?option=com_content&view=article&id=1242:junio-17-2014&Itemid=972
- OPS. (2015). La OPS y la OMS instan a reducir el consumo de azúcares en adultos y niños. Recuperado el 4 de Octubre de 2019, de https://www.paho.org/ecu/index.php?option=com_content&view=article&id=1523:la-ops-y-oms-istan-a-reducir-consumo-azucars-en-adultos-y-ninos&Itemid=360
- Ortíz, J., & Bravo, J. (2018). Molecular kitchen Chemistry; Bolivian traditional Gastronomy; Molecular chufly. Recuperado el 20 de Octubre de 2019, de http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0250-54602018000100001&lng=es&nrm=iso
- Parra, R. (2011). Microencapsulación de Alimentos. Recuperado el 12 de Diciembre de 2019, de <http://www.scielo.org.co/pdf/rfnam/v63n2/a20v63n01.pdf>
- Pasin, B. L. (2012). Microencapsulación con alginato en alimentos. Técnicas y aplicaciones. Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos, 130-151. Recuperado el 10 de Octubre de 2019
- Pasin, B., & González, A. (2012). Microencapsulation in alginate for food. Technologies and applications. Recuperado el 29 de Diciembre de 2019, de <http://oaji.net/articles/2017/4924-1495374245.pdf>
- Peñarrieta, M., & Tejeda, L. M. (31 de Diciembre de 2014). PHENOLIC COMPOUNDS IN FOOD. Recuperado el 28 de Noviembre de 2019, de <https://www.redalyc.org/pdf/4263/426339682006.pdf>

- PicClick. (22 de Octubre de 2019). Graines Miracle Fruit. Recuperado el 10 de Enero de 2020, de <https://picclick.fr/10pcs-Graines-Miracle-Fruit-100-Frais-Semence-synsepalum-Dulcificum-362179800675.html#&gid=1&pid=1>
- RAE. (2019). Gusto. Recuperado el 29 de Diciembre de 2019, de <https://dle.rae.es/?w=gusto#otras>
- Rodwell, V. (2016). Harper: bioquímica ilustrada. Mexico: McGraw-Hill. Recuperado el 15 de Diciembre de 2019
- Sneyder, R. (2016). Encapsulación de Alimentos Probióticos mediante Liofilización en Presencia de Prebióticos. Recuperado el 19 de Noviembre de 2019, de Scielo: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-07642016000600014
- Sobenes, J. (2015). Produção de goma xantana por *X. Campestris* ATCC 13951 utilizando soro de queijo desproteinado. Recuperado el 22 de Diciembre de 2019, de <http://www.scielo.org.co/pdf/rion/v28n2/v28n2a07.pdf>
- Socolovsky, S. (Octubre de 2014). Innovación en reducción de azúcares. Recuperado el 26 de Octubre de 2019, de ASSAI: <https://www.assal.gov.ar/congreso/2014/disertaciones/Socolovsky-Innovacion-en-reduccion-de-azucars.pdf>
- Ta chung ho. (2019). Chen En Food Product Enterprise Co., Ltd. Recuperado el 16 de Noviembre de 2019, de <http://www.tachungho.com.tw/en/about.php>
- Tchokponhoué, D. A. (30 de Marzo de 2017). Early fruiting in *Synsepalum dulcificum* (Schumach. & Thonn.) Daniell juveniles induced by water and inorganic nutrient management. Recuperado el 28 de Septiembre de 2019, de <https://f1000research.com/articles/6-399/v1>
- Watson, C. (2010). Recopilación de información: los sistemas sensoriales. Recuperado el 22 de Septiembre de 2019, de <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/taste-receptor>
- Yoshida, y., & Zhonghou, W. (Abril de 2019). Bitter taste receptor T2R7 and umami taste receptor subunit T1R1 are expressed highly in Vimentin-negative taste bud cells in chickens. Recuperado el 22 de Septiembre de 2019, de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X19302025>

ANEXOS

Anexo 1. Medición de resistencia (gF) de T5 en el textuómetro.



Anexo 2. Medición de resistencia (gF) de T18 en el textuómetro.

