

## Desarrollo y caracterización de mermeladas de frutas reducidas en calorías con el agregado de extracto de propóleos como conservante y fuente de polifenoles

Varela Florencia, Rivero Roy, Archaina Diego, Correa Silvana, Vallejos Omar A.

Contacto: Facultad de Bromatología. Universidad Nacional de Entre Ríos. Perón 1154. Gualeguaychú. Entre Ríos. Argentina.

Contactos: [vallejos.omar@uner.edu.ar](mailto:vallejos.omar@uner.edu.ar) y/o [roy.rivero@uner.edu.ar](mailto:roy.rivero@uner.edu.ar)

ARK: <http://id.caicyt.gov.ar/ark:/s22504559/a9x70inge>

### Resumen

Los alimentos emergentes con ingredientes bioactivos representan valiosas alternativas para promover el consumo de frutas y verduras, con un potencial significativo debido a sus propiedades funcionales en la lucha contra enfermedades crónicas. En este estudio, se desarrollaron confituras a base de frutas y hortalizas sin azúcares añadidos, en particular, variantes de zanahoria-durazno y zanahoria-ciruela amarilla enriquecidas con propóleos por su alta capacidad en antioxidantes. Los análisis demostraron que la variante zanahoria-ciruela amarilla fue la preferida debido a su equilibrio entre dulzura y acidez, junto con una destacada actividad antioxidante. Esto resalta el potencial de crear alimentos más saludables incorporando ingredientes bioactivos en la dieta. En cuanto al almacenamiento de mermeladas, se observa una relación compleja entre la liberación de compuestos funcionales y la variación del color. Las bajas temperaturas provocan una degradación del color debido a la liberación lenta de antioxidantes, mientras que las temperaturas elevadas aceleran la degradación, a pesar de una liberación rápida de estos compuestos. Sin embargo, a temperaturas intermedias, (entre 18 y 25°C), mantienen la estabilidad del color. Para asegurar la integridad, durabilidad, y acción del propóleos como conservante, se recomienda un envasado hermético, protección contra la luz y almacenamiento entre 18-25°C.

**Palabras clave:** Mermeladas, Propóleos, Capacidad antioxidante, Alimento funcional

## Objetivos propuestos y cumplidos

Objetivo general	Cumplidos	No cumplidos
Desarrollar un producto funcional y de bajas calorías, a partir de un alimento de consumo masivo como son las mermeladas de frutas, con la adición de extracto de propóleos como antimicrobiano natural, fuente adicional de polifenoles y la incorporación de endulzantes alternativos de bajo aporte calórico. Utilizando una metodología de superficie de respuesta (RSM) para obtener un producto con características fisicoquímica, texturales y sensoriales similares a las mermeladas tradicionales.	x	
<b>Objetivos Específicos</b>		
Conocer la composición de compuestos bioactivos con propiedades funcionales aportados por el propóleos.	x	
Realizar estudios microbiológicos para establecer el poder antimicrobiano del propóleos, para utilizarlo como conservante.	x	
Optimizar el proceso de elaboración de las mermeladas con sus nuevos componentes.	x	
Conocer las propiedades reológicas, funcionales y sensoriales del producto.	x	
Realizar un estudio de estabilidad de las propiedades fisicoquímicas, funcionales, microbiológicas y sensoriales durante el almacenamiento y estimar la vida útil del nuevo producto obtenido.	x	

## Marco Teórico y metodológico

A nivel global, la creciente demanda de alimentos que promuevan la salud del consumidor en respuesta a las nuevas demandas sociales y de salud ha llevado al surgimiento de alimentos funcionales que, además de cumplir con las necesidades nutricionales básicas, ofrecen propiedades que mantienen la salud sin requerir cambios significativos en la dieta (Martirosyan et al., 2020).

En 2016, las Enfermedades Crónicas No Transmisibles (ECNT) fueron responsables del 71% de las 57 millones de muertes en todo el mundo, destacando las enfermedades cardiovasculares, cánceres, enfermedades crónicas respiratorias y diabetes (OMS, 2018). Los alimentos funcionales, al proporcionar nutrientes que, en combinación con una dieta equilibrada y ejercicio regular, pueden contribuir a la salud, se han vuelto esenciales (Zapata, 2020). La mala alimentación, caracterizada por un consumo excesivo de azúcares, grasas y sodio, se relaciona con el aumento de las ECNT, lo que ha impulsado la necesidad de etiquetas de advertencia efectivas para orientar a los consumidores (OPS, 2023).

La creciente prevalencia de ECNT, incluyendo enfermedades cardiovasculares, obesidad y diabetes, ha llevado a una mayor demanda de productos bajos en azúcares refinados y ricos en ingredientes naturales con propiedades funcionales, como antioxidantes o fibra. La industria alimentaria se enfrenta al desafío de satisfacer las necesidades nutricionales y de salud de los consumidores y prevenir ECNT, que son la principal causa de mortalidad en el mundo. Los cambios en las preferencias de los consumidores, el acceso a información nutricional precisa y la demanda de dietas saludables están impulsando el crecimiento de alimentos funcionales (Maldonado, 2021).

Según las Estadísticas Sanitarias Mundiales 2019 de la OMS, las ECNT son las principales causas de muerte a nivel global, lo que subraya la necesidad de abordar enfermedades cardiovasculares, cáncer, diabetes y enfermedades respiratorias crónicas, además de reducir los traumatismos (OMS, 2020). Se pronostica que las muertes relacionadas con el tabaco aumentarán significativamente, y en América Latina, las ECNT representan una parte significativa de las muertes y la carga de enfermedad (OMS, 2008). Del total de muertes por ECNT en 2012, más del 40% fueron prematuras, lo que resalta la importancia de la prevención (OMS, 2014).

En el mercado, las mermeladas y jaleas comparten similitudes en cuanto a la percepción de los consumidores, el momento de compra y el consumo, y a menudo se exhiben juntas en tiendas. Estos productos se consumen comúnmente como untable y se utilizan en repostería. La oferta de sabores y precios varía, lo que influye en la elección de los consumidores. Las diferencias de calidad y presentación son notables entre las marcas líderes y las de segunda categoría, y las empresas líderes concentran su producción en regiones frutícolas como Mendoza (Franco, 2021).

En la Argentina desde el año 2021 rige la Ley 27642 Promoción de la Alimentación Saludable, a través del etiquetado frontal, aprobada por el Honorable Congreso de la Nación (Boletín Oficial de la República Argentina, 2021), en cuyo art. 1° se refiere a los objetivos de la presente ley y donde expresa:

a) Garantizar el derecho a la salud y a una alimentación adecuada a través de la promoción de una alimentación saludable, brindando información nutricional simple y comprensible de los alimentos envasados y bebidas analcohólicas, para promover la toma de decisiones asertivas y activas, y resguardar los derechos de las consumidoras y los consumidores;

b) Advertir a consumidoras y consumidores sobre los excesos de componentes como azúcares, sodio, grasas saturadas, grasas totales y calorías, a partir de información clara, oportuna y veraz en atención a los artículos 4° y 5° de la ley 24.240, de Defensa al Consumidor;

c) Promover la prevención de la malnutrición en la población y la reducción de enfermedades crónicas no transmisibles.

En el Código Alimentario Argentino (CAA), en el capítulo X, dentro del artículo 807 se especifica "Con la denominación genérica de Confituras, se entienden los productos obtenidos por cocción de frutas, hortalizas, o tubérculos (enteros o fraccionados), sus jugos y/o pulpas, con azúcares (Azúcar, dextrosa, Azúcar invertido, jarabe de glucosa o sus mezclas), los que podrán ser reemplazados parcial o totalmente por miel" (ANMAT, 2023).

### **Obtención de materias primas**

Las frutas y hortalizas utilizadas fueron adquiridas en locales de venta de frutas y verduras de la ciudad de Gualeguaychú, seleccionando las más adecuadas para el proceso de elaboración.

El propóleos fue aportado por la cooperativa apícola local y el mismo fue tratado para la obtención de un extracto etanólico para su aplicación como ingrediente.

Los endulzantes fueron adquiridos a través de la compra a proveedores de materias primas y aditivos alimentarios y también por muestras que los mismos aportaron.

### **Obtención del extracto de propóleos con diseño de superficie de respuesta**

Para obtener el extracto de propóleos, es imprescindible procesar el mismo, para extraer las resinas que contienen los polifenoles, los cuales son considerados importantes y necesarios a los fines del presente desarrollo y por lo cual fueron agregados al producto final.

Para dicha extracción, se utilizó una combinación de soluciones hidroalcohólicas, tiempos de maceración y temperaturas de tratamiento. El proceso de obtención del extracto de propóleos se realizó siguiendo lo establecido por Archaina y col (2015), publicación resultante del PID 9069. El proceso general de obtención fue el siguiente: las muestras de propóleo (congeladas) se molieron con el objetivo de disminuir su granulometría. Esto aumentó la superficie de contacto de la muestra para mejorar la eficiencia del proceso de extracción. Se tomaron 5 g de la muestra de propóleo molido y se colocaron en un recipiente cerrado con 50 ml de la solución de extracción en constante agitación, variando el contenido de etanol, tiempo y temperatura. Las suspensiones obtenidas se centrifugaron a 2500 rpm durante 5 minutos, separando la fracción líquida (sobrenadante) de la fracción sólida. El sobrenadante se recolectó en un frasco color caramelo, mientras que la porción sólida se colocó nuevamente en el recipiente de extracción repitiendo la operación tres veces más hasta obtener un volumen de 200 ml. Los sobrenadantes obtenidos se colocaron en frascos color caramelo y se refrigeraron a 4°C durante un periodo de 72 horas para permitir una correcta solidificación de las ceras que pudieron solubilizarse durante la extracción. Las ceras solidificadas se separaron por centrifugación a 2500 rpm y se descartaron. Los líquidos sobrenadantes constituyeron los correspondientes EEP. Los EEP obtenidos se colocaron en frascos color caramelo y se almacenaron en condiciones de refrigeración para su mejor conservación hasta su utilización.

Para conocer las condiciones óptimas de extracción, se realizó un modelo de optimización utilizando un diseño de superficie de respuesta Box-Behnken con 3 factores y 3 respuestas (Design Expert 11.0). Los factores elegidos fueron: tiempo (10 a 40 min), temperatura (30 a 70°C) y concentración de etanol (40 a 90%); y las respuestas: capacidad antioxidante (CA), compuestos polifenólicos totales (CPT) y extracto sólido (ES). Del diseño resultaron quince puntos experimentales que incluyeron tres réplicas de puntos centrales en dos bloques.

### **Análisis de las variables respuesta del diseño**

**Determinación del poder antioxidante:** Se evaluó el poder antioxidante por el método TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), según el método descrito por Archaina y col. (2015).

**Compuestos Polifenólicos totales (CPT):** La determinación se llevó a cabo según el método de Singleton y col. (1999), utilizando el reactivo Folin-Ciocalteu. Los resultados se expresarán en miligramos de ácido gálico por 100 gramos de extracto de propóleos (mg EAG/100 g EP).

**Extracto Seco (ES):** Se realizó tomando alícuotas de 10,0 ml de cada uno de los EEP y colocándolas en cristalizadores previamente tarados. Estas alícuotas se sometieron a un proceso de secado en una estufa a 100°C hasta alcanzar un peso constante. El contenido de ES presente en el EEP se calculó utilizando la siguiente fórmula: (Ecuación 1)

**Ecuación 1:** 
$$ES\% = \frac{(PCre - PCv)}{VEEP} \times 100$$

Donde:

PCre: Peso del cristalizador con residuo.

PCv: Peso del cristalizador vacío.

VEEP: Volumen de EEP utilizado.

### Retención de las resinas de propóleos en carbonato de calcio

Una vez que se ha obtenido el extracto que será incorporado a la formulación del producto, se procedió a retener los compuestos funcionales en una matriz sólida. Para este propósito, se utilizó carbonato de calcio como matriz de soporte, el cual se mezcló con el EEP. A continuación, se inició el proceso de eliminación del etanol remanente y el agua de la mezcla, aplicando calor a una temperatura constante de 45°C a presión reducida. Para lograr la evaporación, se empleó una estufa de vacío y se agitó la mezcla cada dos horas aproximadamente. Este proceso de evaporación se llevó a cabo durante un período de 12 horas y al término del cual se obtuvo un producto sólido. Posteriormente, este producto sólido se sometió a un proceso de molienda hasta alcanzar la granulometría deseada, dando lugar al polvo final (PP). Una vez obtenido el polvo, el siguiente paso fue el envasado, para lo cual, el producto en forma de polvo se colocó en bolsas de polipropileno con cierre fácil, similares a las bolsas tipo ziploc. Finalmente, las bolsas se almacenaron en un lugar fresco, seco y protegido de la luz, asegurando así la preservación de su calidad durante el período de almacenamiento.

### Características fisicoquímica, funcional e inhibitoria del PP

**Actividad de agua:** Para la medición de la actividad de agua se utilizó un higrómetro marca Rotronic modelo Hygrolab 3 (E.E.U.U.).

**Determinación de humedad:** La humedad total se cuantificó siguiendo el método gravimétrico indirecto (AOAC, 2000), en una estufa a 105°C hasta peso constante.

**Medición de los parámetros de color (L, a\* y b\*):** El color superficial se determinó mediante fotocolorimetría utilizando un colorímetro portátil HunterLab MiniScan EZ (Murnau, Alemania).

**Ángulo de reposo:** Para determinar el ángulo de reposo del material, se determinó según Farmacopea Estadounidense (USP 37), según la ecuación 2:

**Ecuación 2:** 
$$\tan \varphi_{rep} = \tan \alpha = \frac{H}{R}$$

Donde  $\theta$  representó el ángulo de reposo, H fue la altura del embudo y R fue el diámetro de la base de la pila. Según los ángulos de 25° a 40° indicaron una fluidez excelente a adecuada, de 41° a 55° una fluidez aceptable a pobre y de 56° a más de 66° una fluidez muy pobre a extremadamente pobre.

**Densidad aparente y compactada:** Fluidez (Índice de Carr - Ecuación 3) y cohesión (Relación de Hausner - Ecuación 4). Las densidades aparentes ( $\delta_B$  y  $\delta_T$ ) se determinaron siguiendo a Archaina, Vasile, Jiménez-Guzmán, Alamilla-Beltrán y Schebor (2019), según la ecuación 3 y 4.

$$C_I = \frac{(\delta_T - \delta_B) \times 100}{\delta_T}$$

**Ecuación 3:**

$$H_R = \frac{\delta_T}{\delta_B}$$

$$C_I = \frac{(\delta_T - \delta_B) \times 100}{\delta_T}$$

**Ecuación 4:**

$$H_R = \frac{\delta_T}{\delta_B}$$

Donde  $\delta_B$  y  $\delta_T$  son las densidades aparentes y compactadas,  $C_I$  se refiere al Índice de Carr y  $H_R$  es la Relación de Hausner.

**Perfil de polifenoles por HPLC:** La caracterización del perfil de polifenoles del EEP seleccionado, se llevó a cabo siguiendo varios criterios detallados en la sección de resultados. Para ello, se aplicó la técnica de HPLC, conforme a la metodología informada por Spáčil y sus colaboradores (2008), con algunas adaptaciones.

Para identificar y cuantificar los diversos constituyentes presentes en el EEP, se emplearon los siguientes estándares de Sigma-Aldrich®: ácido caféico, ácido benzoico, ácido ferúlico, ácido cinámico, ácido cumárico, ácido vainillínico, ácido protocatéquico, ácido sinápico, crisina, ácido elágico, quercetina, pinocembrina, ácido gálico, ácido clorogénico, galangina, kaempferol y apigenina. Estos estándares, se prepararon en fase metanólica, a una concentración de 200 ppm y por último, se filtraron utilizando un filtro de jeringa de 0,45  $\mu\text{m}$  antes de la inyección en el sistema cromatográfico. La cuantificación de estos compuestos se llevó a cabo mediante la técnica de estándar externo. Para ello, se determinó el área bajo la curva de cada pico identificado en el cromatograma, se comparó con el área del estándar correspondiente y, teniendo en cuenta la dilución realizada en la muestra, se calculó la concentración de polifenoles en el carbonato con propóleos, expresada en miligramos por gramo de muestra, utilizando la Ecuación 5:

**Ecuación 5:**  $CPM = A_m / A_p \times CE \times fd / M$

Donde:

**CPM:** concentración de polifenoles en mg/g de muestra de carbonato con propóleos.

**CE:** concentración del estándar en mg/mL de solución.

**Am:** área del pico correspondiente a la muestra.

**Ap:** área del pico correspondiente al estándar.

**fd:** factor de dilución.

**M:** gramos de muestra de carbonato con propóleos

**Capacidad inhibitoria:** La evaluación antimicrobiana se llevó a cabo siguiendo a Rodríguez Pérez y col. (2020), utilizando los siguientes microorganismos: *Escherichia coli*, *Enterococcus faecium*, *Candida albicans* y *Aspergillus spp.* La preparación de la suspensión de microorganismos se realizó tomando con un ansa las colonias a evaluar y se sumergió en caldo Mueller-Hinton (MH) para las bacterias, y caldo Sabouraud para levaduras y mohos.

### Proceso de formulación y elaboración de mermeladas

La metodología empleada en la preparación de la mermelada se dividió en seis operaciones:

**Operación N°1,** se pesaron los ingredientes sólidos en polvo, que incluyeron malto-dextrina, isomalta, stevia, sucralosa, pectina, agar-agar y ácido cítrico, y se mezclaron adecuadamente.

**Operación N°2,** se procedió a la preparación de la fruta y la hortaliza (ciruela y zanahoria), lo cual implicó varias operaciones como: lavar, pelar y procesar cada una por separado. Posteriormente, se mezclaron en partes iguales en una olla de teflón para dar inicio a la cocción.

**Operación N°3,** la mezcla de los polvos, se añadió en forma constante y en pequeñas porciones a la mezcla de ciruela y zanahoria, con agitación constante para evitar la formación de grumos. Se continuó calentando la mezcla hasta alcanzar una temperatura de 80°C aproximadamente.

**Operación N°4,** la mezcla se mantuvo a 80°C durante 30 minutos para asegurar la cocción, el ablandamiento de las frutas y la eliminación de microorganismos patógenos y aquellos responsables del deterioro del producto.

**Operación N°5,** después de la cocción, se retiró la olla del fuego, se enfrió hasta una temperatura entre 50 - 55°C, y se añadió el extracto de propóleos en polvo agitando hasta lograr una completa homogeneización.

**Operación N°6,** se envasó el terminado caliente en frascos de vidrio previamente esterilizados por inmersión en agua hirviendo. Estos frascos se taparon y se almacenaron refrigerados para su óptima conservación hasta su utilización.

### Determinación de los límites de gelificantes utilizados

Para establecer en forma teórica los límites de gelificantes en el producto desarrollado, nos basamos en los porcentajes encontrados en antecedentes y bibliografías, en las sugerencias aportadas por los proveedores de estos insumos y en las experiencias de los productores locales, quienes normalmente utilizan estos tipos de gelificantes en la elaboración de estas confituras como las mermeladas y dulces.

En el desarrollo de la mermelada, se realizaron pruebas con diferentes proporciones de estos gelificantes hasta encontrar el punto óptimo para la formación del gel. En

el caso de la pectina y el agar-agar, los porcentajes se establecieron en 0,22% y 0,17% respectivamente.

### Diseño experimental de mezclas

El modelo de mezcla se aplicó utilizando un diseño experimental de mezcla D-óptima de cuatro factores y cuatro respuestas (Design Expert 11.0). Los cuatro factores seleccionados fueron los ingredientes que influyen en las características texturales del producto "Tipo mermelada": Pectina (0,13 - 0,37 %), Agar-agar (0,13 - 37 %), Isomalta (8,00 - 24,47 %) y Maltodextrina (8,00 - 24,47 %). Estos porcentajes representan la cantidad utilizada en la preparación de cada muestra. Las cuatro respuestas evaluadas fueron: Textura, Untuosidad, Dulzor y Aceptabilidad sensorial global. El diseño completo de la mezcla consistió en veintidós puntos experimentales, incluyendo tres réplicas del punto central.

Entre las múltiples respuestas posibles del modelo de acuerdo con los criterios (ver **Tabla 1**), se seleccionaron tres puntos para llevar a cabo una evaluación experimental, con el fin de confirmar las características óptimas de los polvos de acuerdo a la predicción del modelo.

**Tabla 1:** Criterios del diseño de experimentos para la obtención de las mermeladas de zanahoria y durazno (MZD), Mermelada de zanahoria y ciruela (MZC). Los signos (+) muestran cuánta consideración se asignó a los diferentes parámetros.

Formulaciones	MZD		MZC	
	Objetivo	Importancia	Objetivo	Importancia
<b>Pectina</b>	En el rango	-	En el rango	-
<b>Agar-agar</b>	En el rango	-	En el rango	-
<b>Isomalta</b>	En el rango	-	En el rango	-
<b>Maltodextrina</b>	En el rango	-	En el rango	-
<b>Textura</b>	En el rango	-	En el rango	-
<b>Untuosidad</b>	Minimizar	+++	Minimizar	+++
<b>Dulzor</b>	Maximizar	+++	Maximizar	+++
<b>Aceptabilidad global</b>	Maximizar	+++++	Maximizar	+++++

**Análisis sensorial de los atributos respuestas:** Para llevar a cabo la elección de la formulación final, se tuvo en cuenta las características sensoriales de las diferentes mermeladas. Los diferentes prototipos de "mermeladas" fueron evaluados por un panel sensorial interno compuesto por 16 evaluadores no entrenados, con el objetivo de encontrar formulaciones sensorialmente aceptadas (Watts y col., 1992). Para la valoración de las variables respuesta del diseño de las mermeladas por parte del panel interno, se utilizó una escala hedónica de 5 puntos: 1) Me disgustó; 2) Me disgustó un poco; 3) Ni me gustó ni me disgustó; 4) Me gustó ligeramente; 5) Me gustó. A cada punto de la escala se le asignó un "puntaje", los cuales fueron promediados en cada atributo. El valor resultante representó el puntaje de la mezcla y fue evaluado.

### Adición de la resina de propóleos

En esta etapa, se estableció la concentración de propóleos a adicionar en la mermelada reducida en calorías, a través de un análisis sensorial.



Se utilizaron dos concentraciones de resina de propóleos: 0,15% y 0,20%. La elección de no emplear cantidades inferiores al 0,15% se basó en la consulta de bibliografía y antecedentes que, en su mayoría, sugieren que cantidades inferiores no permiten que el propóleos ejerza sus propiedades antioxidantes y conservantes de manera efectiva.

A continuación, se describen los análisis sensoriales realizados:

**Intensidad de nivel de atributos característicos (JAR):** La prueba se realizó para conocer la intensidad y grado de gusto de los diferentes atributos estudiados (textura, untuosidad y dulzor). Para ello se utilizó la escala JAR, por sus siglas en inglés Just About Right, que evalúa intensidades sensoriales en una escala de 1 a 5, siendo 1 = Mucho menos de lo que me gusta, 2 = Menos de lo que me gusta, 3 = Justo como me gusta, 4 = Más de lo que me gusta, 5 = Mucho más de lo que me gusta. Posteriormente esta clasificación se reestructuró para agrupar las percepciones en tres grupos: Poco (puntos 1 y 2 de la 120 escala); Justo (punto 3 de la escala) y Mucho (puntos 4 y 5 de la escala).

**Aceptación global:** La prueba de satisfacción global consistió en solicitar a los consumidores que describan la sensación que les produce un atributo en particular o el producto globalmente. Se empleó una escala hedónica, que mide la respuesta de agrado o rechazo ante el producto, en una escala ordinal de 1 a 7, siendo 1= me disgusta mucho, 2= me disgusta, 3= me disgusta levemente, 4= no me gusta ni me disgusta, 5= me gusta levemente, 6= me gusta, 7= me gusta mucho.

**Análisis de penalidades:** El método, basado en comparaciones múltiples, tales como las que se usan en ANOVA, consiste en identificar, para cada una de las características utilizadas en la escala JAR, si las calificaciones están relacionadas con resultados significativamente diferentes en las puntuaciones de gusto o preferencia. Esto nos permite mejorar el producto, al conocer cuáles atributos impactan de manera negativa en la aceptación y a la vez contribuye a comprender los atributos más aceptados (Palazzo y Bolini, 2017).

## Caracterización fisicoquímica y estabilidad de la formulación final.

### Caracterización fisicoquímica y funcional

**Humedad:** El contenido de agua de la mermelada se determinó gravimétricamente mediante el método oficial 925.09 (AOAC, 2005). Las muestras se secaron en una estufa de vacío FI-J010045 (Fistreem International Ltd, Loughborough, Reino Unido) a una temperatura de 60°C hasta alcanzar peso constante. La pérdida de peso de las muestras se determinó por pesada en una balanza analítica AG245 (Mettler Toledo, Ohio, Estados Unidos) de precisión 0,01 mg. Antes de cada pesada las muestras se enfriaron en un desecador conteniendo sílica gel. La humedad se expresa como gramos de agua por cada 100 gramos de mermelada (g H<sub>2</sub>O/100 g M)

**pH:** El pH se determinó sobre una fracción de mermelada mediante el método oficial 945.27 (AOAC, 2005). Se utilizó un pHmetro HI 2223 (Hanna®, Buenos Aires, Argentina) calibrado con soluciones buffer de pH 4,0 y 7,0.

**Actividad de agua:** La actividad de agua (aw) se determinó mediante el método oficial 925.09 (AOAC, 2005). Las medidas se realizaron a 25°C ± 3° empleando un higrómetro de punto de rocío Aqualab 3TE (Decagon Devices, Washington, Estados Unidos) con sensibilidad de ± 0,003, el cual se calibró previamente con soluciones saturadas de sales.

**Color:** El color superficial se midió utilizando un fotocolorímetro portátil Hunter Lab Mini Scan EZ (E.E.U.U.) usando el iluminante D65 y 2° de ángulo de observador. Se registraron los parámetros  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  del espacio CIELab (Martínez-Girón y col., 2017). Los resultados se informaron como el promedio de 10 mediciones  $\pm$  la desviación estándar.

**Capacidad antioxidante:** Se evaluó el poder antioxidante por el método TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), según el método descrito por Archaina y col. (2015).

**Compuestos Polifenólicos totales (CPT):** La determinación se llevó a cabo según el método de Singleton y col. (1999), utilizando el reactivo Folin-Ciocalteu. Los resultados se expresarán en miligramos de ácido gálico por 100 gramos de extracto de propóleos (mg EAG/100 g EP).

Estabilidad de las mermeladas durante el almacenamiento

Con el fin de evaluar la estabilidad de las mermeladas durante el almacenamiento y comprender su respuesta a las fluctuaciones de temperatura, se sometieron las muestras a un período de almacenamiento de 6 meses a tres temperaturas distintas (4°C, 22°C y 34°C). Se llevaron a cabo muestreos mensuales para evaluar las variaciones a lo largo del tiempo, y se registraron las modificaciones en las siguientes características analizadas.

**color ( $L$ ,  $a^*$  y  $b^*$ ):** El color superficial se determinó mediante fotocolorimetría utilizando un colorímetro portátil HunterLab MiniScan EZ (Murnau, Alemania). Ecuaciones 6,7 y 8.

**Ecuación 6:**  $C = (a^{*2} + b^{*2})$

**Ecuación 7:**  $^{\circ}h = \arctan (b^*/a^*)$

Además se calculara la delta de color a lo largo del tiempo ( $\Delta E$ )

**Ecuación 8:**  $\Delta E = (\Delta L^2 + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2})$

**Cap. Antiox:** Según técnica descrita en la caracterización fisicoquímica y funcional

**CPT:** Según técnica descrita en la caracterización fisicoquímica y funcional

**Acidez:** Se tomó 3,0 g de muestra de mermelada y se disolvió en 100 ml de agua destilada en un erlenmeyer y se agregó tres gotas de fenolftaleína como indicador. Luego se tituló con una solución de hidróxido de sodio (NaOH) 0.5 N desde una bureta, hasta alcanzar el punto de neutralización, evidenciado por el cambio de color de incoloro a rosado. Se registró el volumen de NaOH gastado para cada repetición. Posteriormente, se calcularon los miligramos de ácido cítrico por cada 100 gramos de muestra y las determinaciones se realizaron por triplicado.

**Arrhenius:** La ecuación de Arrhenius se utiliza como una herramienta fundamental para comprender cómo las variaciones en la temperatura afectan a los procesos químicos y cinéticos durante el almacenamiento de productos.

Ecuación 9:  $k = A \exp\left(\frac{-E_a}{RT}\right)$

Donde:

- k: es la constante de velocidad.
- A: es el factor de pre-exponencial, que depende de la frecuencia de colisión de las moléculas.
- E<sub>a</sub>: es la energía de activación de la reacción.
- R: es la constante de los gases ideales (8,314 KJ/(mol·K)).
- T: es la temperatura absoluta en Kelvin.

Esta ecuación relaciona la tasa de reacción de un proceso con la temperatura en términos de una constante de velocidad y la energía de activación. Al someter una muestra a diferentes temperaturas y monitorear cómo cambian ciertas propiedades o características a lo largo del tiempo, como la degradación de un componente específico en un producto, es posible obtener datos experimentales que se ajusten a la ecuación de Arrhenius.

Al considerar las características estudiadas durante el almacenamiento, se logró identificar cuál de estas características se convierte en el factor limitante para el almacenamiento de los productos. Además, esto permitió determinar las condiciones de temperatura óptima en las que se maximiza la estabilidad.

### **Análisis estadístico**

Los resultados se expresaron como el promedio ± desviación estándar de 3 repeticiones. Se aplicó el análisis de varianza (ANOVA) para determinar diferencias significativas, utilizando la prueba de LSD Fisher con un nivel de significancia de 5% ( $p < 0,05$ ). Todos los resultados fueron analizados utilizando el software Infostat (Di Rienzo y col., 2020). Además, para establecer la relación entre los factores y las respuestas se realizó un análisis de componentes principales (ACP), mediante el programa InfoStat-Statistical versión 2018e.

### **Resultados**

#### **Resultados de la optimización del proceso de obtención de los extractos de propóleos**

En la Tabla 2, se muestra el diseño experimental completo realizado para optimizar las condiciones de extracción de compuestos funcionales del propóleos e investigar el efecto de las tres variables independientes sobre los valores de las respuestas estudiadas.

**Tabla 2:** Diseño de obtención de los diferentes EEP y respuestas obtenidas

Bloque-Ex-tracto	Temp, (°C)	Etanol (%)	Tiempo (min)	CA (mmol/100 ml)	CPT (mg EAG /100 ml)	ES (%)
B1-1	50	40	10	4,80±0,10 <sup>b</sup>	530,15±6,29 <sup>b</sup>	0,51±0,02 <sup>n</sup>
B1-2	70	90	25	1,24±0,03 <sup>l</sup>	70,76±1,73 <sup>o</sup>	3,53±0,03 <sup>d</sup>
B1-3	30	90	25	5,22±0,18 <sup>a</sup>	560,55±2,15 <sup>a</sup>	3,55±0,03 <sup>d</sup>
B1-4	70	40	25	1,06±0,03 <sup>m</sup>	92,65±2,72 <sup>m</sup>	0,58±0,01 <sup>e</sup>
B1-5	70	65	10	4,06±0,07 <sup>e</sup>	379,93±9,25 <sup>hi</sup>	2,18±0,03 <sup>e</sup>
B1-6	50	90	10	4,93±0,07 <sup>b</sup>	428,93±16,70 <sup>e</sup>	3,81±0,01 <sup>a</sup>
B1-7	30	40	25	0,50±0,01 <sup>o</sup>	46,37±1,67 <sup>p</sup>	0,21±0,01 <sup>q</sup>
B1-8	30	65	40	3,47±0,03 <sup>i</sup>	334,87±8,74 <sup>k</sup>	1,69±0,01 <sup>j</sup>
B1-9	30	65	10	3,63±0,11 <sup>hi</sup>	281,58±4,92 <sup>l</sup>	1,53±0,01 <sup>l</sup>
B1-10	50	40	40	1,03±0,05 <sup>m</sup>	82,71±1,21 <sup>mno</sup>	0,38±0,01 <sup>p</sup>
B1-11	50	90	40	4,55±0,03 <sup>c</sup>	520,85±18,21 <sup>b</sup>	3,81±0,07 <sup>a</sup>
B1-12	70	65	40	2,61±0,05 <sup>k</sup>	480,07±22,76 <sup>d</sup>	2,11±0,01 <sup>f</sup>
B1-13	50	65	25	3,87±0,27 <sup>fg</sup>	370,63±6,07 <sup>ij</sup>	1,84±0,02 <sup>hi</sup>
B1-14	50	65	25	3,83±0,06 <sup>g</sup>	385,12±3,79 <sup>ghi</sup>	1,52±0,01 <sup>l</sup>
B1-15	50	65	25	2,72±0,10 <sup>k</sup>	391,02±7,74 <sup>gh</sup>	1,90±0,04 <sup>g</sup>
B2-1	50	40	10	5,25±0,05 <sup>a</sup>	499,39±33,52 <sup>c</sup>	0,43±0,01 <sup>o</sup>
B2-2	70	90	25	1,25±0,03 <sup>l</sup>	85,82±0,46 <sup>mno</sup>	3,52±0,01 <sup>d</sup>
B2-3	30	90	25	5,22±0,06 <sup>a</sup>	400,67±5,97 <sup>fg</sup>	3,62±0,02 <sup>c</sup>
B2-4	70	40	25	1,03±0,02 <sup>m</sup>	88,07±0,94 <sup>mn</sup>	0,44±0,01 <sup>o</sup>
B2-5	70	65	10	4,61±0,06 <sup>c</sup>	374,57±0,62 <sup>hij</sup>	2,22±0,01 <sup>e</sup>
B2-6	50	90	10	5,25±0,09 <sup>a</sup>	412,48±3,22 <sup>ef</sup>	3,75±0,01 <sup>b</sup>
B2-7	30	40	25	0,48±0,01 <sup>o</sup>	33,85±0,66 <sup>p</sup>	0,16±0,01 <sup>r</sup>
B2-8	30	65	40	3,91±0,15 <sup>efg</sup>	327,36±4,34 <sup>k</sup>	1,68±0,02 <sup>j</sup>
B2-9	30	65	10	2,89±0,20 <sup>j</sup>	329,50±0,62 <sup>k</sup>	1,61±0,01 <sup>k</sup>
B2-10	50	40	40	0,83±0,02 <sup>n</sup>	74,56±0,86 <sup>no</sup>	0,45±0,01 <sup>o</sup>
B2-11	50	90	40	4,23±0,17 <sup>d</sup>	461,83±9,10 <sup>d</sup>	3,83±0,07 <sup>a</sup>
B2-12	70	65	40	4,30±0,07 <sup>d</sup>	384,04±3,79 <sup>ghi</sup>	1,87±0,01 <sup>gh</sup>
B2-13	50	65	25	4,05±0,18 <sup>e</sup>	475,42±5,91 <sup>d</sup>	1,82±0,08 <sup>i</sup>
B2-14	50	65	25	3,74±0,10 <sup>gh</sup>	357,76±15,17 <sup>j</sup>	1,56±0,03 <sup>kl</sup>
B2-15	50	65	25	4,02±0,07 <sup>ef</sup>	384,58±17,57 <sup>ghi</sup>	2,08±0,01 <sup>f</sup>

\*Letras diferentes dentro de una misma columna, representan diferencias significativas entre las muestras ( $p < 0,05$ ).

En la Tabla 3, se presenta el análisis de varianza (ANOVA) del diseño de superficie de respuesta Box-Behnken de tres factores para el DOE, donde se entrega el valor P para cada factor. En ella se observa la significancia del modelo, la no significancia de la carencia de ajuste que indica un buen manejo, independencia y homogeneidad de las variables. También se aprecia que los R<sup>2</sup> presentan valores altos (R<sup>2</sup>>0,962), por lo que los puntos se ajustan a las curvas modeladas.

**Tabla 3:** ANOVA de tres factores del modelo cuadrático

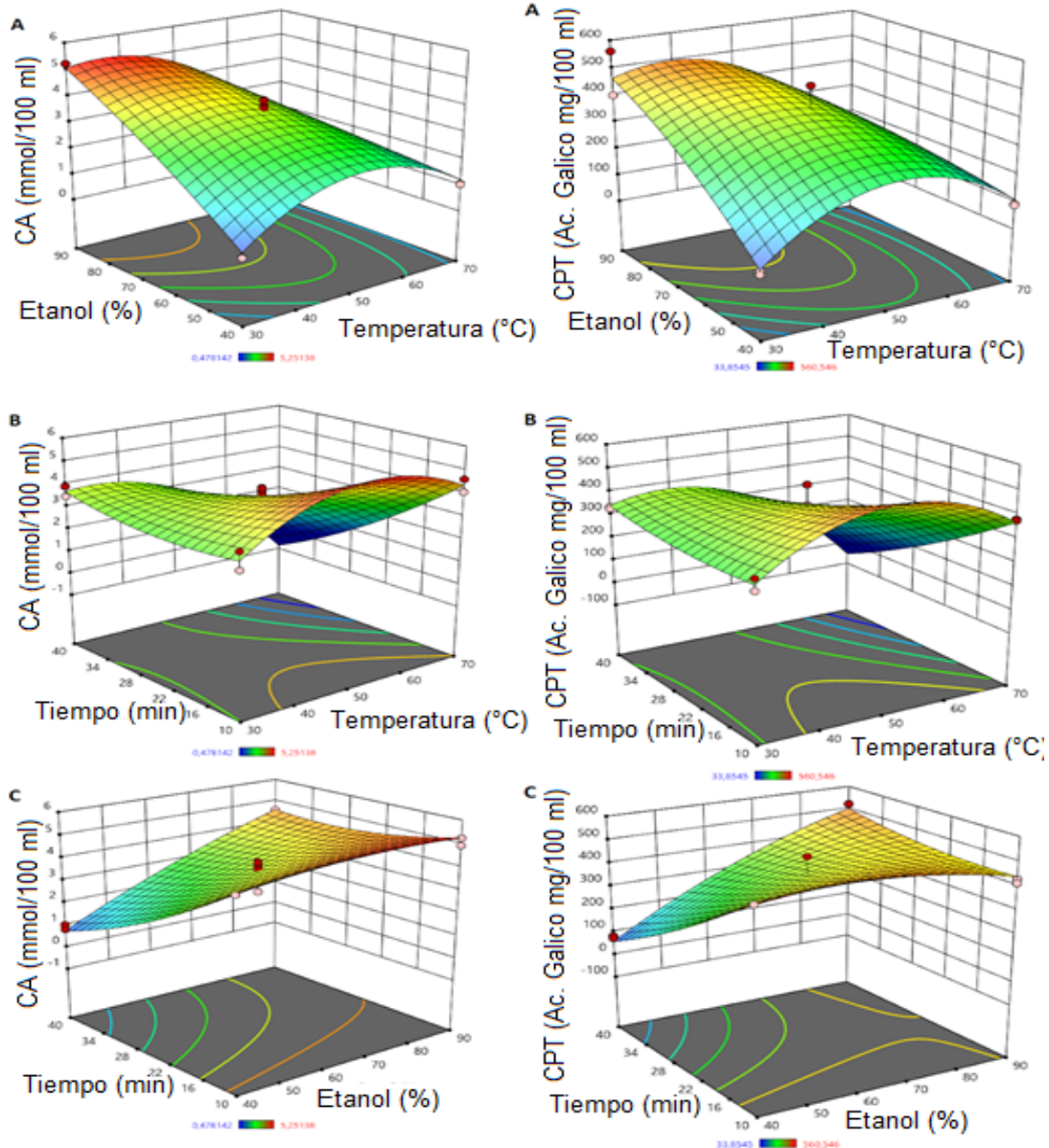
Modelo Cuadrático	Valores de p		
	CA	CPT	ES
<b>Modelo</b>	<0,001	<0,001	<0,001
<b>A-Temp.</b>	<0,001	<0,001	0,016
<b>B-Etanol</b>	<0,001	<0,001	<0,001
<b>C-Tiempo</b>	<0,001	<0,001	0,255*
<b>AB</b>	<0,001	<0,001	0,063*
<b>AC</b>	<0,001	<0,001	0,036
<b>BC</b>	<0,001	<0,001	0,620*
<b>A<sup>2</sup></b>	<0,001	<0,001	0,153*
<b>B<sup>2</sup></b>	0,151*	0,018	<0,001
<b>C<sup>2</sup></b>	0,021	0,144*	0,156*
<b>Falta de ajuste</b>	0,164*	0,326*	0,080*
<b>R<sup>2</sup></b>	0,9664	0,9621	0,9922
<b>R<sup>2</sup> ajustado</b>	0,9496	0,9432	0,9884

\*Valores de p mayores a 0.05 no son significativos.

Se observa que los tres factores influyen en las características funcionales, en su forma lineal y en sus combinaciones, y solo la temperatura resulta significativa en su forma cuadrática. En cambio, para ES el tiempo no es significativo en su forma lineal, pero sí lo es, cuando se combina con la temperatura.

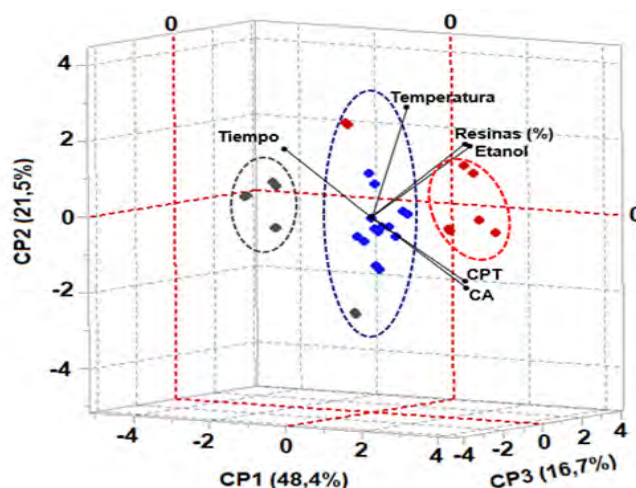
El aumento de la concentración de etanol es el factor predominante en la extracción de los CPT y CA, sin embargo, se encuentra afectado por la temperatura. Las figuras 1A y 2A, muestran que el aumento de temperatura favorece la extracción de los compuestos funcionales, sin embargo, se observa que a partir de una “temperatura límite”, se produce una disminución en los valores de CPT y CA. Esto probablemente debido al deterioro de los compuestos funcionales a elevadas temperaturas. Al analizar la relación entre el tiempo y la temperatura (Figuras 1B y 2B), se aprecia que extracciones prolongadas favorecen levemente la extracción a bajas temperaturas, pero cuando aumenta influye de manera inversa, posiblemente al provocar el deterioro de los compuestos polifenólicos. En cuanto a la relación del tiempo y el contenido de etanol, mostrada en las Figuras 1C y 2C, se aprecia que a elevadas concentraciones de etanol el tiempo no parece tener mucha influencia, sin embargo, a bajas concentraciones los tiempos prolongados de tratamientos disminuyen los valores de CPT y la CA de los extractos.

A partir de las distintas relaciones observadas en el diseño, se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP), entre los factores y respuestas (Figura 2). Los primeros dos componentes principales (CP) no alcanzaron a explicar más del 80% de la variación total, por este motivo fue necesario tomar un tercer componente. Contemplando los tres CP se logró explicar el 86,6% de la variación total entre las muestras. En función de estos tres componentes, los extractos se pudieron diferenciar en tres grupos según su CPT y CA: Bajo - óvalo gris; Medio - óvalo azul y Alto - óvalo rojo. A su vez cada uno estaba conformado mayoritariamente por los extractos obtenidos con 40% 65% y 90% de etanol respectivamente.



**Figura 1 (A, B y C):** Superficie de respuesta para los factores temperatura, etanol y tiempo, en relación a la CA.

**Figura 2 (A, B y C):** Superficie de respuesta para los factores temperatura, etanol y tiempo, en relación a la CPT.



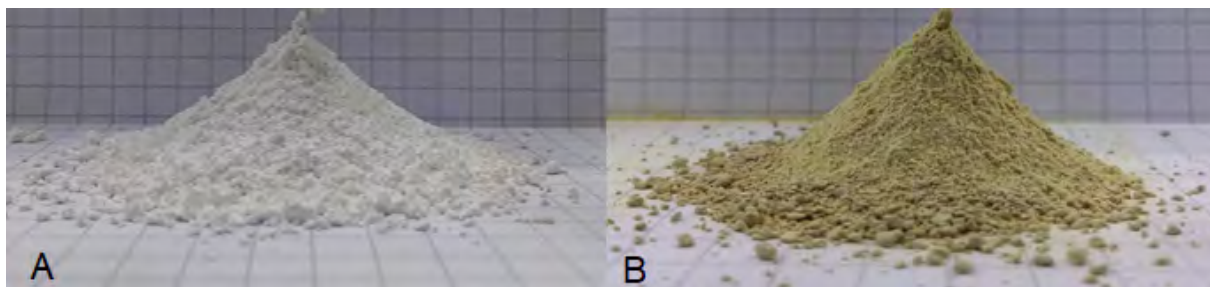
**Figura 2:** Variación de los factores y respuestas estudiadas mediante Análisis de Componentes Principales (ACP). EEP extraídos con 40% (•), 65% (◐) y 90% (◑) de etanol

No obstante, se aprecian dos pares de muestras que no cumplen con esta tendencia, alojándose en la zona media, a pesar de corresponder a otra según su contenido de etanol. Esto se podría explicar al tener en cuenta la influencia de la CP3, puesto que los EEP 11 extraídos con 90% de etanol que se encuentran alojados en la zona media, presentaron tratamientos prolongados y a mayor temperatura, provocando posiblemente un deterioro en los compuestos funcionales. En cambio, en los extractos obtenidos con un 40% de etanol y alojados en esta zona, tuvieron tratamientos a bajas temperaturas y mayor tiempo.

Los modelos de factores y respuestas se sometieron a un proceso de optimización para predecir los valores de los factores que maximizan la CA y los CPT, manteniendo los valores estables del ES y de esta manera se obtuvieron las condiciones óptimas que fueron: Solución de extracción de etanol 87%, temperatura de 31°C, para evitar la degradación de los polifenoles y un tiempo de 39 minutos para asegurar una saturación de la solución de extracción.

### Caracterización fisicoquímica, funcional e inhibitoria del propóleos encapsulado

Una vez definido el carbonato de calcio como soporte adecuado de la resina de propóleos, para utilizarlo como ingrediente, (Figuras 3A y 3B), se procedió a efectuar la caracterización fisicoquímica y funcional del mismo. En la Tabla 3, se muestran las diferencias en las características fisicoquímicas y funcionales entre el carbonato de calcio y la mezcla de Carbonato de calcio y resina de propól



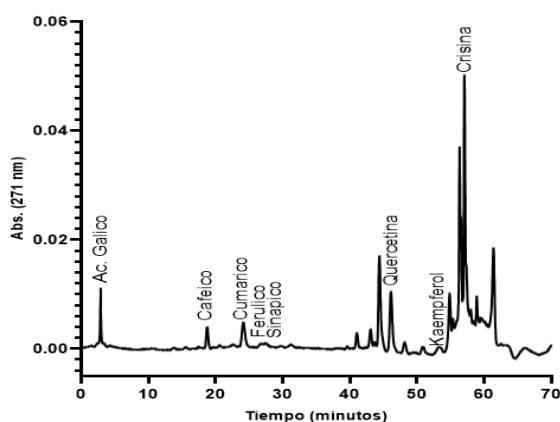
**Figura 3:** Carbonato de calcio utilizado como matriz soporte (A) y resina retenida en carbonato de calcio (B)

**Tabla 4:** Diferencias en las características fisicoquímicas y funcionales entre el carbonato de calcio y mezcla de carbonato de Ca + resina de propóleos.

Características		CaCO <sub>3</sub>	CaCO <sub>3</sub> +Resina
Actividad de agua		0,433±0,015 <sup>a</sup>	0,491±0,002 <sup>b</sup>
Húmedad		0,58±0,02 <sup>a</sup>	0,81±0,03 <sup>b</sup>
Color	L	83,50 ± 0,41 <sup>a</sup>	61.92±0,23 <sup>b</sup>
	a*	-0.68±0,04 <sup>a</sup>	-1.21±0,05 <sup>b</sup>
	b*	4.64±0,41 <sup>a</sup>	28.46±0,34 <sup>b</sup>
Ángulo de reposo		35,6±0,77 <sup>a</sup>	32,2±0,36 <sup>b</sup>
Fluidez		5,84±0,07 <sup>a</sup>	4,31±0,05 <sup>b</sup>
Cohesividad		1,06<0,01 <sup>a</sup>	1,05<0,01 <sup>a</sup>
Capacidad antioxidante		***	16,03±0,31 mmol eq de trolox/100g

La inclusión de resina provocó cambios significativos en las propiedades fisicoquímicas del carbonato de calcio en polvo. Los parámetros de color reflejan una variación en el tono de blanco-grisáceo a tonos más amarillo-verdoso, con una disminución de la luminosidad. La humedad y la actividad de agua aumentaron con la adición de la resina, lo que puede ser atribuido a las dificultades en la eliminación del agua durante el proceso de secado, debido a la presencia de la resina. Sin embargo, estas variaciones no parecen influir en las características físicas del polvo. La fluidez, el ángulo de reposo y la cohesividad, aunque mostraron algunas diferencias, mantuvieron las características esperadas para la estructura de un polvo, según lo establecido en la farmacopea USP 37, con una fluidez excelente y una cohesividad adecuada. Además, la inclusión de resina contribuyó a mejorar la capacidad antioxidante, ya que el carbonato de calcio por sí solo, no posee dicha capacidad.

Como complemento a esta caracterización, se realizó un análisis de perfil de compuestos polifenólicos presentes en el polvo obtenido. En la Figura 4, se muestra un cromatograma del perfil de polifenoles presentes en la muestra de polvo, donde se puede observar la identificación de 8 polifenoles.

**Figura 4:** Cromatograma de perfil de polifenoles por HPLC



Estos compuestos son ácido gálico, cafeico, cumárico, ferúlico y sinápico, pertenecientes a la subclase de los ácidos hidroxibenzoicos y los ácidos hidroxicinámicos. Además, se encontraron dos flavonoides, quercetina y kaempferol, pertenecientes a la subclase de las flavonas, y crisina, un flavonoide que pertenece a la subclase de los flavonoides flavononas.

De los compuestos identificados, se determinó la presencia de tres en mayor concentración, quercetina, crisina y kaempferol, las cuales poseen comprobadas características funcionales y beneficios para la salud. En particular, se ha demostrado que estos flavonoides tienen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y cardiovasculares, además de propiedades neuroprotectoras y anticancerígenas.

La quercetina, puede actuar en la reducción de los niveles de colesterol LDL, mejorar la salud cardiovascular, reducir la presión arterial y mejorar la función endotelial, además de tener propiedades antiinflamatorias y antioxidantes. (Urbina Herrera, 2021).

Urbina Herrera, F. N. (2021). Efecto protector de principios bioactivos presentes en legumbres sobre la disfunción endotelial (Doctoral dissertation, Universidad de Talca (Chile). Escuela de Tecnología Médica.).

La crisina, por otro lado, puede ayudar a reducir la inflamación y el dolor en el cuerpo, mejorar la salud cardiovascular, tener propiedades anticancerígenas y mejorar la salud del cerebro. Por último, el kaempferol también tiene propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, mejora la salud cardiovascular y tiene propiedades anticancerígenas y neuroprotectoras.

Respecto a la capacidad inhibitoria, se observó que la muestra de extracto de propóleos presentó actividad antimicrobiana bactericida frente a *Enterococcus faecium*, *Candida albicans* y *Aspergillus spp.*; en las concentraciones evaluadas (0,25% al 10% de extracto de propóleos); no así frente a *Escherichia coli*, en cuyas diluciones de extracto se observó desarrollo en tubos y posterior confirmación en placa (Figuras 5a y 5b).

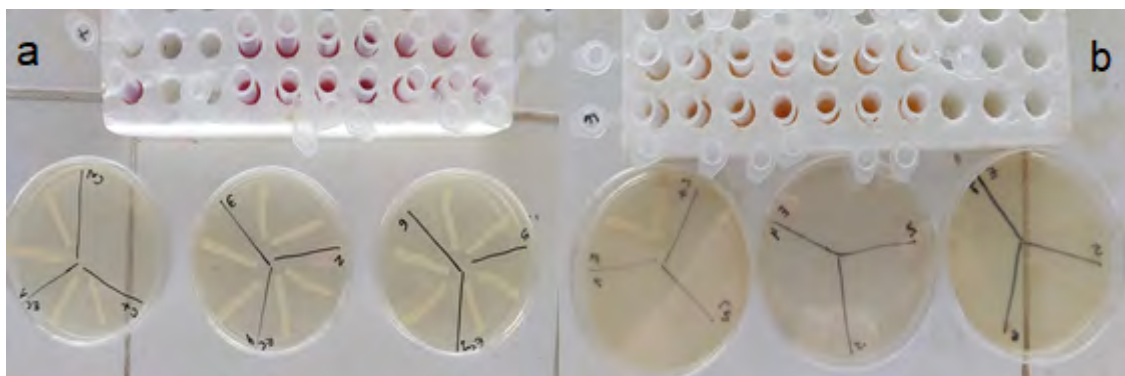


Figura 5: E coli en placas (a) y enterococcus en placas (b)

## Diseño y análisis sensorial de las mermeladas reducida en calorías

### Determinación de las concentraciones extremas de los “gelificantes”

Para la determinación de los límites de gelificantes utilizados en este desarrollo, nos basamos en los porcentajes teóricos encontrados en fuentes bibliográficas, en fichas técnicas aportadas por los proveedores de insumos y en las experiencias de los productores locales, quienes utilizan estos ingredientes en sus productos.

Para ello, se han realizado pruebas con diferentes concentraciones de estos gelificantes hasta encontrar el punto óptimo de formación del gel en el producto terminado.

Cabe destacar que, en las mermeladas tradicionales, el porcentaje de pectinas agregadas es hasta un 2,0% aproximadamente, según el contenido de pectinas de las frutas u hortalizas utilizadas, y en el caso del agar, el porcentaje puede variar entre el 0,1 y el 0,5%. Esto determinó que los rangos de concentraciones para ambos gelificantes, se establecieran entre el 0,13 a 0,37%.

### Obtención de las formulaciones mediante diseño experimental

El modelo de mezcla se realizó aplicando un diseño experimental de mezcla D-óptima de cuatro factores y cuatro respuestas (Design Expert 11.0). Los cuatro factores elegidos fueron los ingredientes responsables de las características texturales del producto "Mermelada": Pectina (0,13 – 0,37 %), Agar-agar (0,13 – 37 %), Isomalta (8,00 - 24,47 %) y Maltodextrina (8,00 – 24,47 %), el porcentaje representa la cantidad que se debe usar en la preparación de cada muestra; y los cuatro parámetros de respuesta fueron: Textura, Untuosidad, Dulzor y aceptabilidad sensorial global.

El diseño de la mezcla completa consta de veintidós (22) puntos experimentales que incluían tres réplicas del punto central, cada uno de estos con sus respectivas respuestas. En la Tabla 5, se observan las formulaciones elaboradas de mermeladas con zanahoria y durazno (MZD) y mermeladas con zanahoria y ciruela (MZC) respectivamente. Los valores de respuestas fueron determinados con un panel interno.

**Tabla 5:** Contenido de los ingredientes elegidos para el diseño de las mezclas; y datos de los parámetros sensoriales tomados como respuesta para MZD (valores en color verde) y MZC (valores en color azul).

M	Pectina	Agar-agar	Isomalta	Maltodextrina	Textura	Untuosidad	Dulzor	Satisfacción global				
1	0,25	0,37	18,89	13,45	3,71	3,44	3,57	3,56	3,71	3,67	3,86	3,67
2	0,22	0,18	8,39	24,17	4,13	3,60	4,00	4,50	4,19	4,10	4,19	4,10
3	0,13	0,13	20,97	11,74	3,06	3,11	3,69	3,11	3,00	3,33	3,31	3,44
4	0,37	0,37	8,05	24,17	3,44	2,90	3,44	3,60	2,56	2,70	2,56	3,10
5	0,13	0,26	24,40	8,18	3,38	3,80	3,75	4,50	3,75	3,70	3,75	3,90
6	0,24	0,37	10,85	21,50	2,14	4,33	2,29	4,56	2,64	3,89	2,14	4,11
7	0,37	0,37	24,05	8,18	3,64	3,30	3,57	3,60	3,64	3,80	3,62	3,20
8	0,13	0,37	8,63	23,84	2,13	3,00	2,81	3,90	2,06	2,90	2,13	3,80
9	0,25	0,25	16,30	16,17	3,88	4,11	3,63	4,44	4,31	4,44	3,81	4,33
10	0,13	0,13	22,65	10,07	3,64	2,40	3,71	2,70	3,50	3,60	3,46	2,50
11	0,31	0,13	24,36	8,18	3,21	3,40	3,07	4,40	3,36	3,30	3,43	3,40
12	0,37	0,22	18,14	14,23	3,50	3,10	3,69	3,90	4,25	3,20	3,94	3,30
13	0,13	0,13	12,67	20,05	3,50	4,50	4,29	4,90	3,14	4,30	3,08	4,20
14	0,31	0,13	24,36	8,18	3,57	3,72	3,57	3,83	3,36	3,74	3,43	3,85

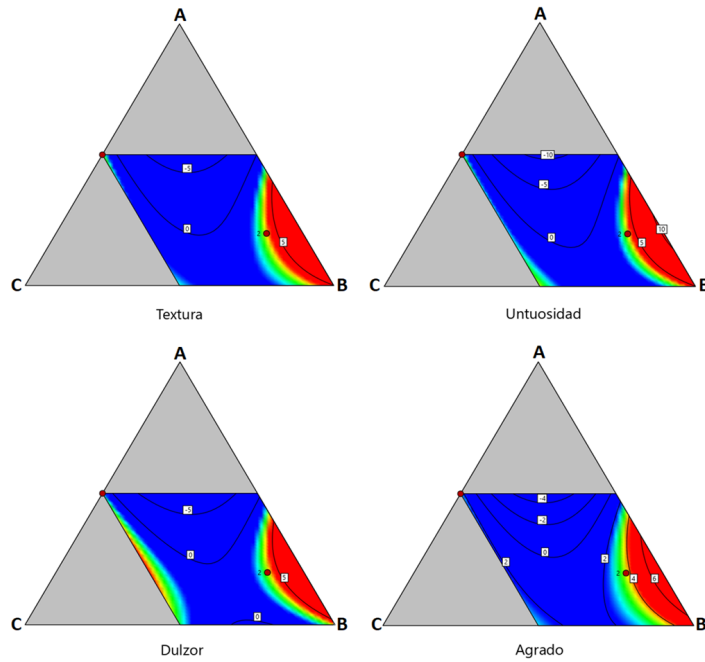
15	0,25	0,25	16,30	16,17	2,86	3,70	2,93	3,90	2,71	3,60	2,64	3,90
16	0,25	0,25	16,30	16,17	2,69	4,20	3,38	4,70	2,81	4,20	2,50	4,30
17	0,25	0,37	18,89	13,45	3,21	3,50	3,64	3,60	3,93	4,40	3,38	3,80
18	0,13	0,26	24,40	8,18	3,38	2,78	3,75	2,67	4,06	3,33	3,69	3,11
19	0,13	0,13	15,91	16,81	3,53	4,20	3,53	3,50	3,20	3,00	3,60	4,20
20	0,22	0,18	8,39	24,17	3,31	4,20	3,44	4,70	2,94	4,20	3,31	4,30
21	0,37	0,29	14,08	18,22	3,86	3,90	3,43	3,80	2,93	3,80	3,93	3,90
22	0,37	0,13	9,29	23,18	3,29	3,05	4,07	4,10	3,36	3,10	3,31	3,20

El mejor modelo se ajustó según una desviación estándar baja y un  $r^2$  alto (0,84-0,66). Siguiendo estas pautas, el modelo Cúbico fue el que mejor se adaptó a la MZD, en cambio las MZC presentaron un comportamiento diferente, donde la textura se ajustó a un modelo cúbico, la untuosidad a uno lineal y el dulzor y Agrado a un modelo cuadrático. De los resultados del ANOVA, para el caso de las MZD, se priorizó la textura, especialmente la untuosidad. En contraste, en las MZC, además de las propiedades texturales, se destacó la percepción del dulzor, lo que podría relacionarse con la influencia de la acidez en la aceptación del producto. Es relevante destacar que esta es una hipótesis, ya que no se recopiló información sobre la percepción de la acidez en las mermeladas, pero es sabido que la relación entre el dulzor y la acidez es esencial para la calidad y el sabor de los productos a base de frutas y las preferencias individuales. En la industria alimentaria, esta relación es esencial para que los productos sean atractivos y cumplan con las expectativas de los consumidores, lo que podría explicar el mayor nivel de agrado percibido en las mermeladas de zanahoria y ciruela (MZC).

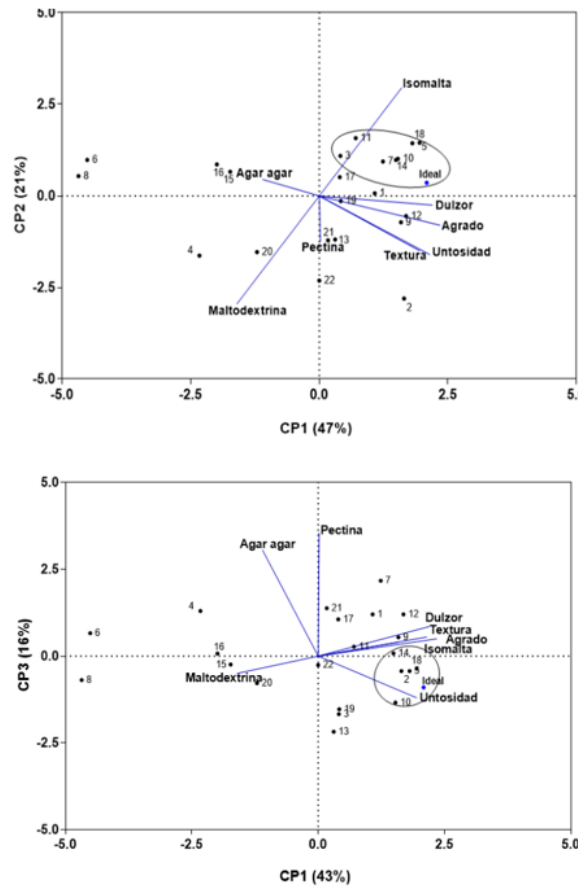
Los resultados obtenidos se representan a través de gráficas que ilustran cómo cambia la aceptación del producto a medida que se modifican las proporciones de las variables de estudio.

### Mermelada de durazno y zanahoria

En la Figura 6, se puede observar que todas las variables de las mezclas influyeron de manera similar en las cuatro respuestas estudiadas. Se observa también que la aceptabilidad de cada uno de los parámetros sensoriales aumenta (representados por tonos rojos) a medida que se incrementa el contenido de isomalta y se disminuye el de agar-agar, para un valor constante de maltodextrina (0,37).



**Figura 6:** Variables de respuesta del diseño de la mezcla MZD. Pectina (A); Isomalta (B), Agar-agar (C) y para una concentración de maltodextrina fija de 0,37



**Figura 7:** Atributos sensoriales y variables de mezcla estudiadas a través del análisis de componentes principales en MZD. Las muestras arrojadas por el diseño de mezclas (●).

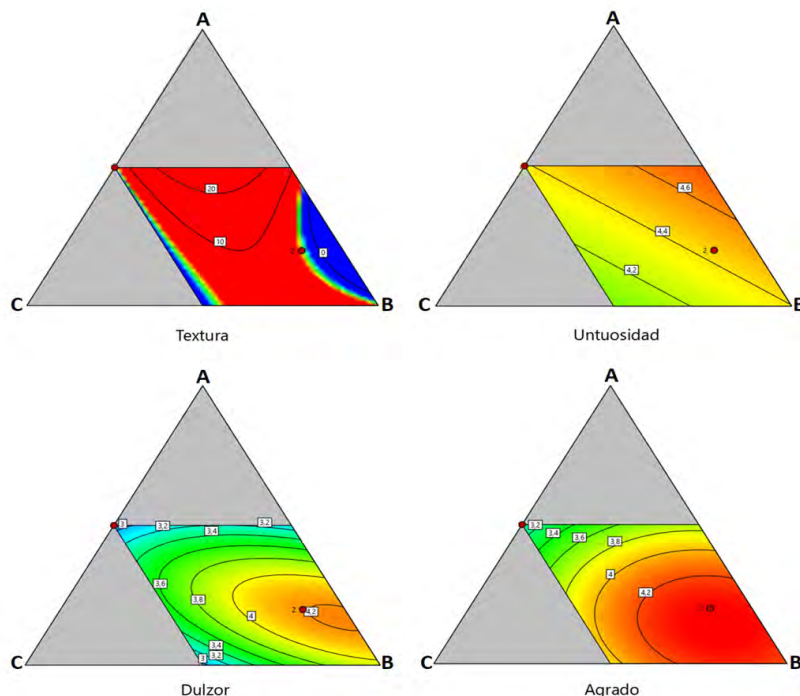
La Figura 7, presenta el análisis de componentes principales obtenido a partir de las variables que tuvieron un efecto relevante de las formulaciones en cuanto al agrado, estos fueron, el contenido de isomalta y maltodextrina. Las tres primeras componentes explican el 80% de la variación total entre las muestras, siendo la componente principal 1 (CP1) explicada por la isomalta y maltodextrina. En el caso de la primera, se relaciona directamente con las variables respuesta (dulzor, untuosidad, textura y agrado) e inversamente con la segunda.

Se puede observar que la aceptación de las formulaciones se relaciona con el aumento del contenido de isomalta y, según la CP2, con la disminución del contenido de agar-agar. Además, se puede notar que el agrado está más vinculado con la percepción del gusto dulce, ya que ambas características se encuentran agrupadas en un mismo cuadrante en ambos gráficos.

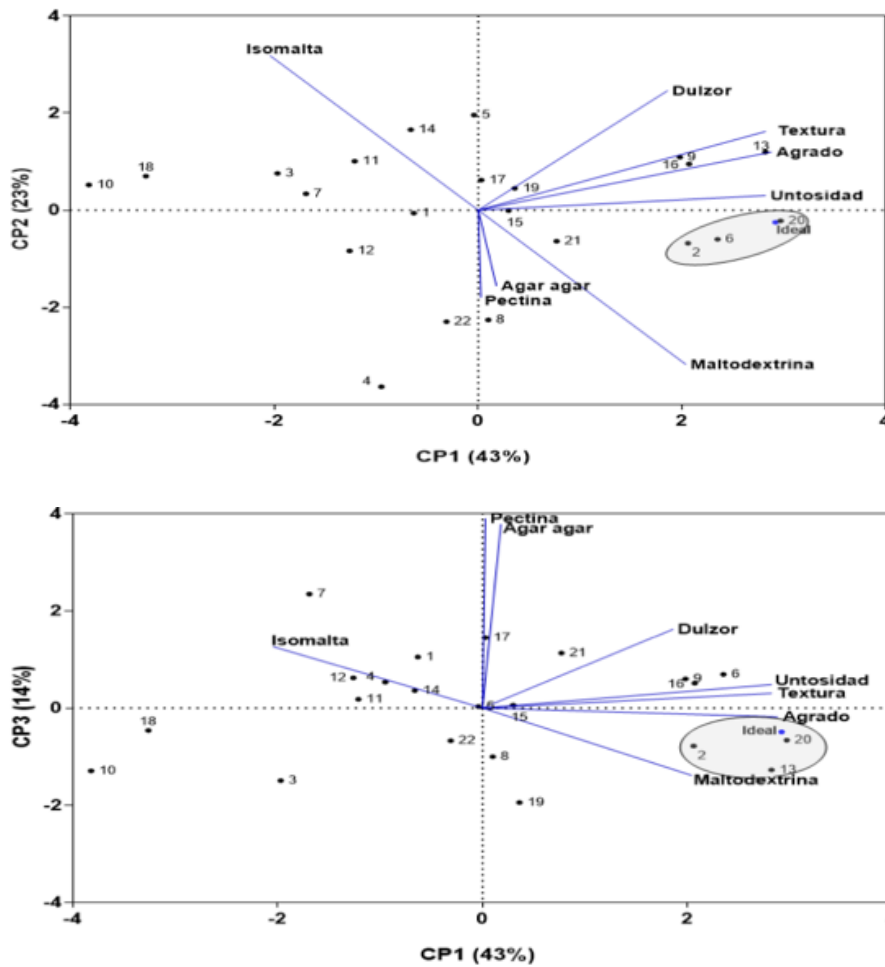
### Mermelada de ciruela y zanahoria

En la Figura 8, se puede observar que las características sensoriales evaluadas son influenciadas por cada variable de las mezclas, de diferente manera. En relación a la textura, se puede apreciar que al aumentar los valores de maltodextrina (valor fijo en el gráfico), se permite un amplio rango de variación de los componentes para lograr una buena aceptación en la textura. Además, se puede observar que el contenido de isomalta no afecta la untuosidad, mientras que la pectina y el agar agar se comportan en forma inversa.

En cuanto al dulzor y agrado, se comportan de manera similar, a medida que se aumenta la cantidad de isomalta hasta cierto punto, el dulzor y agrado aumentan y luego disminuyen, lo que indica una saturación del aspecto y una disminución del agrado del producto.



**Figura 8:** Variables de respuesta del diseño de la mezcla MZC. Pectina (A); Isomalta (B), Agar-agar (C) y para una concentración de maltodextrina fija de 0,37.



**Figura 9:** Atributos sensoriales y variables de mezcla estudiadas a través del análisis de componentes principales en MZC. Las muestras arrojadas por el diseño de mezclas (●).

La Figura 9, presenta el análisis de componentes principales obtenido a partir de las variables que tuvieron un efecto relevante en el agrado de las formulaciones, que fueron el contenido de isomalta y maltodextrina. Las tres primeras componentes explican el 80% de la variación total entre las muestras, siendo la componente principal 1 (CP1) explicada por la isomalta y maltodextrina. En el caso de la primera, se relaciona inversamente con las variables respuesta (dulzor, untuosidad, textura y agrado) e directamente con la segunda.

Se puede observar que la aceptación de las formulaciones se relaciona con el aumento del contenido de maltodextrina y, según la CP2, con la disminución del contenido de ambos gelificantes. Además, se puede notar que el agrado está más vinculado con la percepción de las características texturales y de untuosidad.

La diferencia en la aceptación de las dos formulaciones, determinadas como ideales, podría estar relacionada con la fruta utilizada en la elaboración, ya que ambas usan los mismos gelificantes y azúcares alternativos en su diseño de mezcla. Puede observarse también que, en las formulaciones con durazno, favoreció el agrado debido al aumento de la percepción del dulzor, mientras que, en las formulaciones con ciruela, se priorizaron los aspectos texturales. Esto podría deberse a que el sabor dulce quedó en segundo plano en las formulaciones más ácidas y, a su vez, este aspecto podría mejorar las propiedades gelificantes de los ingredientes agregados.

A continuación, en la Tabla 6, se presenta la composición de los ingredientes porcentuales empleados para la preparación de las “mermeladas ideales” para cada formulación.

**Tabla 6:** Ingredientes porcentuales empleados para la preparación de las “mermeladas ideales” para cada formulación.

Ingredientes	Composición (% p/p)	
	F <sub>1</sub> MZD	F <sub>2</sub> MZC
Zanahoria	31,67	31,67
Durazno	31,67	-----
Ciruela	----	31,67
Ac. Cítrico	0,2	0,2
Stevia	0,2	0,2
Sucralosa	0,2	0,2
Pec	0,16	0,22
Agar	0,16	0,17
Iso	24,34	8,40
Malto	8,14	24,17

También se tuvo en consideración el sabor amargo que podría aportar el propóleos a la formulación, ya que es muy intenso y podría generar un rechazo en la percepción sensorial de los consumidores.

Teniendo en cuenta todo mencionado anteriormente, y considerando que en promedio las formulaciones elaboradas con ciruela obtuvieron una mayor aceptación por parte del panel sensorial interno, se decidió utilizar esta fruta como ingrediente definitivo en la formulación, para posteriormente establecer la concentración adecuada de propóleos a añadir.

### **Análisis de intensidad de atributos característicos y satisfacción global**

**Resultado sensorial de la mermelada:** El análisis sensorial final, se realizó con la mermelada de zanahoria y ciruela amarilla, en el cual se buscó la concentración de propóleos más aceptable. Los valores están expresados de manera porcentual y el número de consumidores fueron en total 94.

En la Figura 10, se presentan las imágenes del momento de la prueba, donde los evaluadores no entrenados recibieron las muestras codificadas a evaluar, un formulario con las escalas de intensidad de los atributos particulares y satisfacción global. Además, de todos los elementos necesarios (vasos, agua, servilletas de papel, cucharitas de plástico, etc.).



**Figura 10:** Planillas utilizadas en los sensoriales y grupo de estudiantes de la facultad de bromatología realizando el sensorial

### Intensidad y satisfacción por atributos característicos

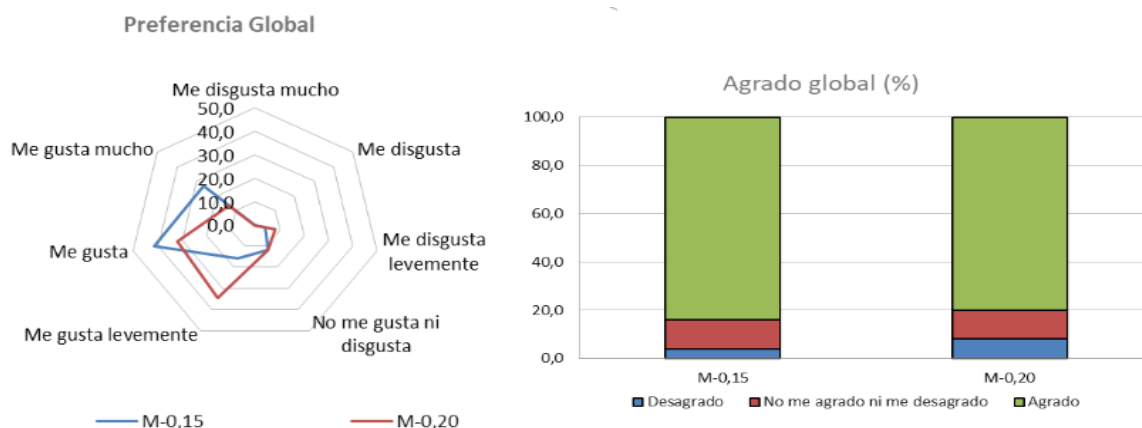
El estudio sensorial por atributos reveló varias tendencias significativas. En términos de color, la formulación con un 0.15% de resina mostró una leve preferencia sobre la de 0.20%, aunque la diferencia fue mínima, posiblemente influida por el carbonato en la acidez de la mermelada. Respecto a la textura, nuevamente, la formulación con 0.15% de resina obtuvo una ligera ventaja en la aceptación global en comparación con la de 0.20%, indicando que la percepción de la textura podría depender en gran medida de los parámetros de mezcla utilizados. Para el atributo del dulzor, la formulación con 0.15% de resina fue significativamente más preferida, alineándose con las preferencias de los consumidores en términos de intensidad del dulzor. En cuanto al amargor, la formulación con un 0.15% de resina fue la más aceptada, posiblemente debido a la sensibilidad de las personas a los sabores amargos. Esto sugiere que las formulaciones con menos resina podrían ser preferidas, especialmente por aquellos sensibles al sabor amargo. En lo que respecta a la acidez, nuevamente, la formulación con un 0.15% de resina fue la preferida, relacionándose con un menor contenido de carbonato y, por ende, una menor acidez, lo cual es relevante, dada la presencia de ciruela en el producto. Por último, en el atributo de sabor afrutado, la formulación con un 0.15% de resina fue más apreciada, y se observó que la intensidad del sabor afrutado disminuyó con un mayor contenido de resina.

En resumen, la formulación con 0.15% de resina recibió una mayor aceptación en los atributos estudiados, lo que sugiere su preferencia entre los consumidores y brinda valiosa información para mejorar la calidad y las preferencias en el desarrollo de las mermeladas.

### Satisfacción global

En cuanto a la percepción del agrado global (Figura 11), se pudo observar que ambas formulaciones recibieron valoraciones de agrado superiores al 80%. Sin embargo, la formulación con un 0.15% de resina tuvo un puntaje ligeramente superior en comparación con la fórmula que contenía un 0.20%. También se notó que la distribución de las valoraciones de agrado presentó categorías más altas en la primera formulación, alcanzando su máxima valoración en la categoría "me gusta".





**Figura 11:** Preferencia global de las formulaciones preparadas con dos concentraciones de propóleos.

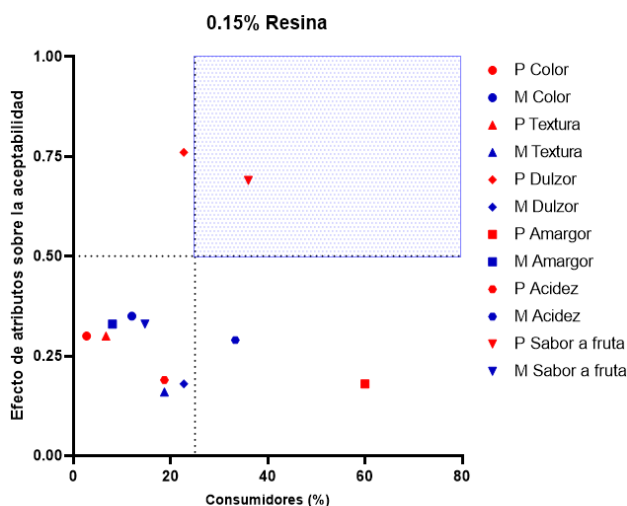
### Análisis de penalidades de las mermeladas

El análisis sensorial de penalidades utilizado en este estudio se enfocó en la evaluación de la intensidad por atributo y la satisfacción global de los consumidores. El objetivo de este análisis fue determinar los atributos sensoriales que influyen de manera negativa sobre la aceptación global del producto (variación mayor al 0,5), y que son observados por más del 25% de los consumidores. Los resultados de este análisis se utilizaron para seleccionar cual es la concentración que mejor se adapta a los gustos del consumidor, y a la vez, para conocer cuáles son los atributos que deben ser mejorados para aumentar su aceptación entre los consumidores.

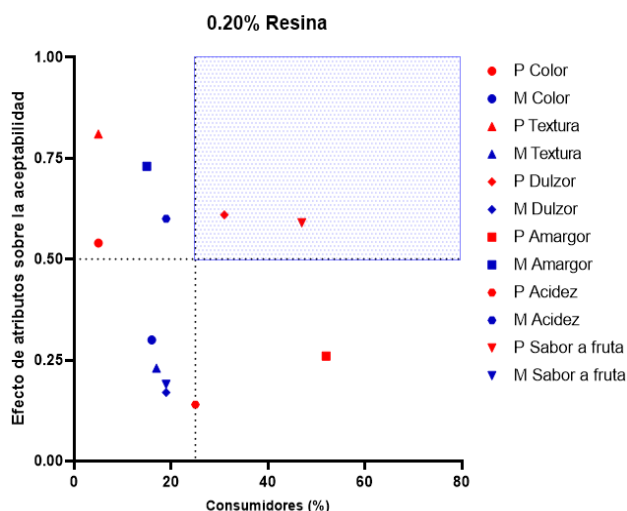
Las Figuras 12 y 13, ilustran las penalizaciones en función del porcentaje de consumidores que detectaron desviaciones del punto ideal en diferentes atributos de las mermeladas. La formulación con 0,15% de resina, mostró un atributo penalizado (poco sabor a fruta), posiblemente debido a la expectativa de sabor de una “mermelada” de ciruela, que se vio opacada por los sabores de la zanahoria y el propóleos.

El bajo nivel de dulzor también tuvo un impacto en la aceptación global, aunque no llegó a alcanzar la zona de penalización, lo que significa que solo afectó a un pequeño porcentaje de consumidores.

Por otro lado, la formulación con 0,20% de resina, mostró penalizaciones en dos atributos: poco sabor a fruta y poco dulzor. En comparación con la formulación anterior, la mayor concentración de propóleos, contribuyó con el sabor amargo fuerte que posiblemente disminuyó la percepción del dulzor, lo que llevó a la penalización de este atributo. Esto se vio reflejado en el aumento de la influencia del “mucho sabor amargo” en el gráfico, aunque fue apreciado por un pequeño número de consumidores.



**Figura 12:** Análisis de penalidades en la evaluación de la intensidad por atributos y la satisfacción global de los consumidores en mermeladas con 15% de resina.



**Figura 13:** Análisis de penalidades en la evaluación de la intensidad por atributos y la satisfacción global de los consumidores en mermeladas con 20% de resina.



### Elección de la concentración final

Para mejorar la aceptabilidad, fue necesario enmascarar el sabor amargo que proviene principalmente de la resina de propóleos, esto se logró aumentando los sabores dulces y ácidos, sin disminuir el contenido de resina, ya que una reducción de esta podría afectar la concentración de las sustancias bioactivas y la capacidad inhibitoria, y por consiguiente, la estabilidad del producto final. Por este motivo, se recomendó utilizar la formulación con 0,15% de resina, que fue la más aceptada y cumplió con la función del propóleos en la formulación.

### Características fisicoquímicas y funcionales de la mermelada

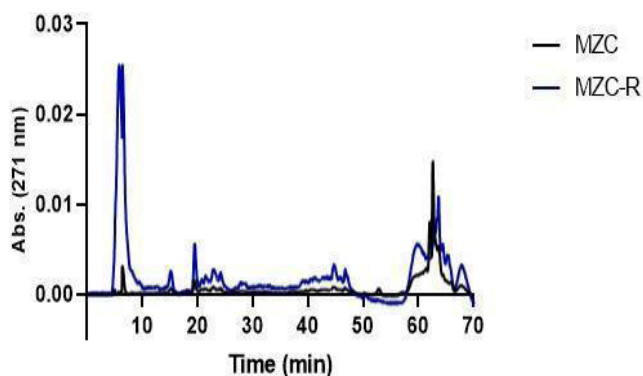
En la Tabla 7, se presenta la caracterización fisicoquímica de la mermelada de zana-horia y ciruela con y sin propóleos, en la misma se observa claramente la diferencia en las características que conllevan el agregado de la resina en la mermelada.

**Tabla 7:** Caracterización fisicoquímica de la mermelada de zanahoria y ciruela con y sin propóleo.

Determinaciones		Formulación sin propóleo	Formulación con propóleo
Humedad (%)		36,5±0,5a	40,7±0,5b
pH		6,0± 0,2a	3,3±0,2b
Aw		0,89± 0,1a	0,91±0,1a
Brix°		56±0,5a	55,5±0,5a
Color	L*	45,3±0,8a	37,6±0,2b
	a*	16,7±0,6a	14,2±0,2b
	b*	16,1±0,5a	19,4±0,5b
	Croma	48,1±0,9a	42,3±0,1b
	H°	46,0±0,1a	36,2±0,3b
Color s/ cielab			
Capacidad Antioxidante		19,71±01a	27,21±01b
CPT		252,4±01a	288,9±01b

\*Valores con diferente letra minúsculas representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las formulaciones

Como complemento de esta caracterización funcional, se realizó un análisis de perfil de compuestos polifenólicos presentes en el producto final. En la Figura 14, se muestra un cromatograma del perfil de polifenoles presentes en la muestra de mermelada.



**Figura 14:** Cromatogramas del perfil de polifenoles de la mermelada base (línea negra) y mermelada con resina de propóleos (línea azul)

En el cromatograma se puede observar que la mermelada con agregado de resina de propóleos evidencia picos de mayor altura y área respecto a la mermelada sin el agregado de la misma. Estos son coincidentes con los cromatogramas del perfil de polifenoles que contiene la resina de propóleos en forma de polvo con carbonato de calcio, utilizada para enriquecer la mermelada (Figura 5).

## Estabilidad

Las muestras de mermelada fueron sometidas a un período de almacenamiento de 6 meses a tres temperaturas distintas (4°C, 22°C y 34°C). A lo largo de este período de almacenamiento, se realizaron muestreos mensuales para evaluar las variaciones en las características de las mermeladas y se fueron registrando las modificaciones.

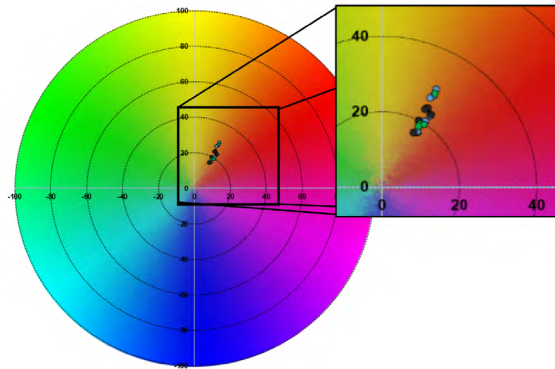
## Variación de color

Se realizó una evaluación de la variación en el color superficial por fotocolorimetría, utilizando un colorímetro. Esto nos permitió cuantificar la variación del color mediante sus valores de L, a\* y b\*. Estos valores, a su vez, se utilizaron para calcular el valor de croma y el ángulo de Hue (Tabla 8), lo que proporcionó información sobre la saturación cromática y la nitidez del color de las muestras (Figura 15). Además, se determinó la variación global en el color de las muestras (Figura 16) y se procedió a clasificarlas en categorías específicas de variación (Tabla 8) en función de los resultados obtenidos.

**Tabla 8:** Variación de las características de color durante el almacenamiento de seis meses de las mermeladas a diferentes temperaturas.

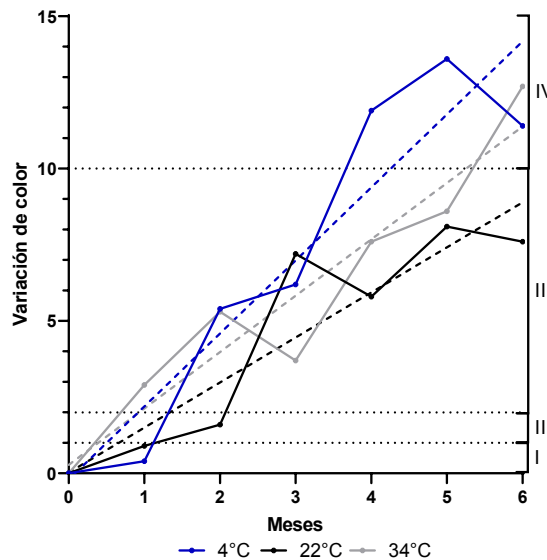
Temperatura de almacenamiento	Muestra	L	a*	b*	Croma	°h
4°C	T0	45,4±0,6 <sup>a</sup>	9,2±0,3 <sup>a</sup>	14,5±0,4 <sup>a</sup>	17,1±0,5 <sup>a</sup>	32,4±0,2 <sup>a</sup>
	T1	45,6±0,9 <sup>aA</sup>	9,1±0,5 <sup>aA</sup>	14,7±0,7 <sup>aA</sup>	17,3±0,8 <sup>aA</sup>	31,8±0,2 <sup>abA</sup>
	T2	41,3±0,1 <sup>cA</sup>	11,3±0,2 <sup>bA</sup>	17,4±0,9 <sup>bA</sup>	20,7±0,9 <sup>bA</sup>	33,0±1,2 <sup>acA</sup>
	T3	42,4±0,3 <sup>bA</sup>	12,5±0,4 <sup>cA</sup>	18,8±0,5 <sup>cA</sup>	22,5±0,6 <sup>cA</sup>	33,7±0,6 <sup>cA</sup>
	T4	40,1±0,5 <sup>dA</sup>	13,3±0,3 <sup>dA</sup>	24,3±0,9 <sup>dA</sup>	27,7±0,9 <sup>eA</sup>	28,7±0,3 <sup>dB</sup>
	T5	40,4±0,2 <sup>dA</sup>	14,1±0,1 <sup>eA</sup>	26,1±0,4 <sup>eA</sup>	29,7±0,4 <sup>fA</sup>	28,4±0,2 <sup>deB</sup>
	T6	39,3±0,2 <sup>eA</sup>	12,4±0,1 <sup>cB</sup>	23,6±0,5 <sup>dB</sup>	26,7±0,4 <sup>dB</sup>	27,7±0,3 <sup>eB</sup>
22°C	T1	45,4±0,7 <sup>aA</sup>	8,3±0,6 <sup>bC</sup>	14,4±0,9 <sup>aA</sup>	16,6±1,1 <sup>aA</sup>	29,8±0,3 <sup>bC</sup>
	T2	43,8±0,3 <sup>bbB</sup>	9,2±0,1 <sup>abB</sup>	14,6±0,1 <sup>acB</sup>	17,3±0,2 <sup>acB</sup>	32,3±0,1 <sup>aA</sup>
	T3	41,4±0,3 <sup>cbB</sup>	12,7±0,2 <sup>A</sup>	19,3±0,4 <sup>bA</sup>	23,1±0,5 <sup>bA</sup>	33,3±0,1 <sup>cAB</sup>
	T4	40,5±0,5 <sup>dbB</sup>	9,5±0,3 <sup>acB</sup>	17,6±0,5 <sup>ccB</sup>	20,0±0,5 <sup>ccB</sup>	28,3±0,1 <sup>dcB</sup>
	T5	40,8±0,3 <sup>dcaA</sup>	11,5±0,4 <sup>dbB</sup>	20,8±0,7 <sup>dbB</sup>	23,7±0,8 <sup>bbB</sup>	29,0±0,1 <sup>eA</sup>
	T6	41,2±0,1 <sup>cbB</sup>	11,2±0,1 <sup>dcB</sup>	20,5±0,2 <sup>dcB</sup>	23,4±0,2 <sup>bcB</sup>	28,8±0,2 <sup>eA</sup>
34°C	T1	44,0±0,6 <sup>bbB</sup>	10,0±0,3 <sup>bbB</sup>	16,9±0,6 <sup>bbB</sup>	19,7±0,6 <sup>bbB</sup>	30,6±0,2 <sup>bbB</sup>
	T2	40,4±0,8 <sup>dcB</sup>	9,6±0,4 <sup>abbB</sup>	16,1±0,7 <sup>bbB</sup>	18,8±0,8 <sup>bbB</sup>	30,8±0,3 <sup>bbB</sup>
	T3	42,8±0,6 <sup>caA</sup>	10,8±0,4 <sup>cbB</sup>	16,6±0,6 <sup>bbB</sup>	19,8±0,7 <sup>bbB</sup>	33,0±0,2 <sup>cbB</sup>
	T4	42,2±1,1 <sup>caA</sup>	11,8±0,8 <sup>dbB</sup>	20,9±1,7 <sup>cbB</sup>	24,0±1,9 <sup>cbB</sup>	29,4±0,3 <sup>daA</sup>
	T5	40,3±0,5 <sup>daA</sup>	11,6±0,2 <sup>dbB</sup>	21,0±0,7 <sup>cbB</sup>	24,0±0,7 <sup>cbB</sup>	29,0±0,4 <sup>daA</sup>
	T6	39,4±0,4 <sup>daA</sup>	13,7±0,5 <sup>eaA</sup>	24,8±0,8 <sup>daA</sup>	28,3±0,9 <sup>daA</sup>	29,0±0,3 <sup>daA</sup>

\*Valores con diferente letra minúsculas representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los tiempos de almacenamiento para una misma temperatura. Letras mayúsculas diferentes representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las temperaturas de almacenamiento para un mismo tiempo.



**Figura 15:** El espacio de color L\*a\*b\*. Muestras almacenadas a 4°C (puntos celestes), 22°C (puntos grises) y 34°C (puntos verdes).

Durante el período de almacenamiento los cambios en el color de las mermeladas se caracterizaron por una marcada disminución en la luminosidad (L) y en los valores de matiz (ángulo de tono o hue), acompañados por un aumento en la saturación cromática (Croma, Cr). Inicialmente, la mermelada tenía un color naranja vibrante, pero con el transcurso del tiempo, experimentó una transición hacia tonos más oscuros y tonalidades pardas. Estos cambios en todos los casos fueron significativos y es importante que se manifestaron de manera consistente en tres temperatura distintas, aunque con magnitudes variables. En términos generales, la reducción en la luminosidad indicó una pérdida en el brillo de la superficie de la mermelada. El ángulo de tono (°h) también disminuyó, lo que refleja un cambio desde un naranja claro hacia un matiz más pardo. Además, se observó un incremento en la intensidad o saturación del color, manifestado por el aumento del croma. Estos cambios en el color pueden atribuirse a diversos factores, como la posible oxidación de los ingredientes de la mermelada. Es importante tener en cuenta que estos cambios pueden influir en la percepción visual del producto y, potencialmente, en la calidad de la mermelada como producto final.



**Figura 16:** Gráfico del incremento del ΔE a lo largo del almacenamiento para las muestras expuestas a las tres temperaturas de estudio.

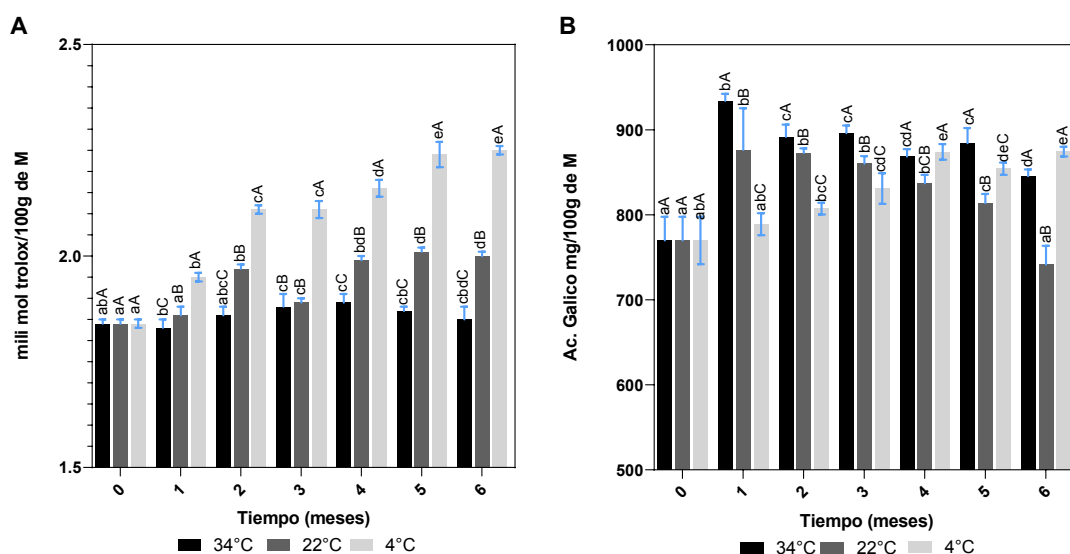
De acuerdo con el estudio de Keraité y col (2017) y otros investigadores, los valores de  $\Delta E_{00}$  se clasifican en diferentes categorías de percepción por el ojo humano. Los valores en la categoría I no son detectados por el ojo humano, los de la categoría II son perceptibles mediante una observación cercana, los de la categoría III son visibles a simple vista, los de la categoría IV son notoriamente diferentes, pero aún mantienen algunas similitudes, y los de la categoría V representan colores opuestos, (Tabla 9). Al analizar los resultados, se puede observar que las mermeladas almacenadas a temperaturas de 4°C y 34°C experimentaron variaciones en su color de mayor magnitud, ubicándose en la categoría IV. Por otro lado, las mermeladas almacenadas a 22°C se ubicaron en la categoría III, lo que indica que las variaciones en su color son visibles a simple vista, pero no tan notables como las de la categoría IV. Además, al examinar el gráfico, se puede apreciar que las mermeladas almacenadas a 4°C mostraron una “velocidad” de variación de color más rápida en comparación con las almacenadas a 34°C, seguidas de cerca por las de 22°C. Esto se evidencia por la pendiente más pronunciada de la línea de tendencia (representada por líneas segmentadas) en el gráfico. En resumen, según los resultados, las mermeladas almacenadas a temperaturas más bajas y más altas experimentaron cambios de color más notorios, ubicándose en la categoría IV de percepción, mientras que las almacenadas a temperatura intermedia se clasificaron en la categoría III. La velocidad de cambio de color fue más rápida a 4°C, seguida por 34°C y luego 22°C, como se muestra en el gráfico.

**Tabla 9:** categorías de variación de color en función de la manera en que se perciben.

Delta E	Percepción
I (0-1)	No perceptible por los ojos humanos.
II (1-2)	Perceptible mediante una observación minuciosa
III (2-10)	Perceptible a simple vista
IV (10-49)	Los colores son más similares que opuestos.
V (>49)	Los colores son exactamente opuestos.

### Estabilidad TEAC y CPT

Este análisis se llevó a cabo para determinar la CA (Figura 17A) y el CPT (Figura 17B) en las muestras de mermelada almacenadas a tres temperaturas distintas. Se observó que las variaciones en estas características funcionales se comportaron de manera similar, lo que sugiere una relación entre ambos aspectos.



**Figuras 17 A y B:** Variaciones de las características funcionales estudiadas durante el almacenamiento de las mermeladas.

\*Valores con diferente letra minúsculas representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los tiempos de almacenamiento para una misma temperatura. Letras mayúsculas diferentes representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las temperaturas de almacenamiento para un mismo tiempo.

En particular, a la temperatura de 4°C, se observó un aumento progresivo en la capacidad antioxidante (CA), la cual se correlacionó con el incremento en los niveles de polifenoles totales (CPT). Este incremento resultó llamativo, dado que normalmente se esperaría una disminución en la concentración de estos compuestos con el paso del tiempo. No obstante, se presume que este aumento en los CPT, se debe a la liberación gradual de estos compuestos al medio, que estaban encapsulados, (resina del propóleos retenida en carbonato de calcio) y agregada como fuente de polifenoles a la mermelada.

En las otras dos temperaturas (22 y 34°C), se observó un comportamiento similar en cuanto a la capacidad antioxidante (CA); ambas mostraron aumentos en las etapas iniciales del almacenamiento, aunque las muestras a 34°C experimentaron un aumento menor en comparación con la almacenada a 22°C. Sin embargo, después de transcurrir 4 meses, se produjeron diferencias en sus comportamientos. A 22°C, los valores de CA se mantuvieron relativamente estables, mientras que, a 34°C, se registró un ligero declive que, aunque estaba presente, no llegó a ser estadísticamente significativo. En lo que respecta al CPT, se observó un aumento inmediato en la concentración de estos compuestos, siendo mayor que los observados a 4°C, con una mayor disminución en las muestras almacenadas a 34°C.

Por otro lado, en las muestras almacenadas a 22°C, los niveles de CPT se mantuvieron sin diferencias significativas durante los primeros 4 meses, pero posteriormente comenzaron a disminuir. En cuanto a las muestras almacenadas a 34°C, estas experimentaron una caída más pronunciada y sostenida en sus valores de CPT, pero al final del período de almacenamiento, los niveles de CPT seguían siendo más altos en comparación con las muestras almacenadas a 22°C.

Estos resultados sugieren que las temperaturas más elevadas favorecen una liberación rápida de los polifenoles, lo cual, paradójicamente, puede ser desfavorable para su estabilidad y capacidad antioxidante. Esto se ve reflejado en las muestras almacenadas a temperaturas más altas, que muestran una disminución más marcada en la capacidad antioxidante a pesar de tener inicialmente niveles de CPT más elevados.

De acuerdo a todo lo observado, se puede inferir que las temperaturas más bajas tienen el potencial de mantener de manera más estable las propiedades funcionales a lo largo del tiempo. No obstante, también pueden dificultar la liberación de los polifenoles del propóleos en la mermelada. Esta liberación más lenta podría obstaculizar la función protectora de estos compuestos en las etapas iniciales del almacenamiento de la mermelada.

### Acidez

A diferencia de las otras características que se analizaron, la acidez se comportó de manera uniforme en las tres temperaturas de almacenamiento (Tabla 10).

**Tabla 10:** Variación de la acidez durante el almacenamiento.

Meses	Temperatura 4°C	Temperatura 22°C	Temperatura 34°C
0	78,7±1,5 <sup>aA</sup>	78,7±1,5 <sup>aA</sup>	78,7±1,5 <sup>aA</sup>
1	77,8±0,7 <sup>aA</sup>	77,5±5,1 <sup>aA</sup>	80,2±7,3 <sup>abA</sup>
2	75,4±3,2 <sup>aA</sup>	79,2±5,6 <sup>aA</sup>	81,4±5,5 <sup>bcA</sup>
3	74,3±2,8 <sup>abA</sup>	73,0±5,1 <sup>abA</sup>	87,7±3,2 <sup>CB</sup>
4	67,8±5,3 <sup>cA</sup>	72,2±5,9 <sup>abA</sup>	84,4±1,9 <sup>cbB</sup>
5	69,2±5,9 <sup>bcA</sup>	66,4±5,7 <sup>baA</sup>	72,3±5,4 <sup>dA</sup>
6	68,0±5,4 <sup>cA</sup>	68,7±6,2 <sup>baA</sup>	70,4±5,9 <sup>dA</sup>

\*Valores con diferente letra minúsculas representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los tiempos de almacenamiento para una misma temperatura. Letras mayúsculas diferentes representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las temperaturas de almacenamiento para un mismo tiempo.

En dichos análisis se observó una disminución notoria y significativa en los valores de acidez de las mermeladas con el tiempo, pero no se encontraron diferencias estadísticas entre las distintas temperaturas. La reducción de la acidez a 4°C (- 14%); 22°C (- 13%); y 34°C (- 11%), mostró una relación inversa con el aumento de la temperatura.

### Discusión y estimación de las condiciones de almacenamiento

De los resultados obtenidos, se observa que las variaciones de color no se comportan de la manera esperada en función de la temperatura, lo que sugiere una relación compleja entre la liberación de compuestos bioactivos y el cambio de color del producto en el tiempo.

A temperaturas bajas, se pudo observar una mayor variación de color, debido a la lenta liberación de compuestos antioxidantes. Esto pudo conducir a la degradación de los colorantes presentes en la mermelada, que provienen de ingredientes como la zanahoria y la ciruela amarilla. La liberación lenta de compuestos antioxidantes podría permitir que estos colorantes se degraden rápidamente y aparezcan pardeamientos propios de las frutas como la ciruela amarilla, generando productos de color marrón



rojizo, que modifican rápidamente el aspecto visual de la mermelada. Esto explicaría por qué las mermeladas almacenadas a temperaturas más bajas muestran una variación de color más evidente.

Por otro lado, a temperaturas más altas, donde los compuestos funcionales se liberan rápidamente, se pudo evidenciar que estos compuestos también se degradaron debido al efecto de la temperatura. Esto significa que, a pesar de que existe una liberación rápida, los antioxidantes no pueden actuar eficazmente como protectores de los compuestos coloreados en la mermelada. Como resultado de esto último, también se produjo una degradación rápida del color, en aquellas muestras almacenadas a mayor temperatura.

Por el contrario, a temperaturas intermedias, la liberación de los compuestos funcionales es lo suficientemente rápida como para evitar una degradación rápida del color, y la temperatura no es lo suficientemente alta como para acelerar significativamente la degradación de los compuestos funcionales. Esto proporcionaría una mayor estabilidad del color a estas temperaturas, ya que los compuestos funcionales liberados pueden actuar como protectores efectivos de los compuestos coloreados en la mermelada.

Considerando todo lo dicho anteriormente, se podría decir que, para asegurar la calidad y la estabilidad de las mermeladas en un tiempo máximo de 6 meses (considerando la variación de color), es necesario seguir las siguientes condiciones de almacenamiento:

En primer lugar, se recomienda envasar las mermeladas en recipientes herméticos para prevenir la entrada de aire y humedad, lo que podría acelerar la degradación del producto y afectar su sabor y textura. Además, es esencial proteger las mermeladas de la luz directa, ya que la exposición a la luz puede provocar cambios en el color del producto. Para mantener la estabilidad del color y los compuestos funcionales presentes en la mermelada, la temperatura de almacenamiento óptima se encuentra en el rango de 18-25°C. Este intervalo de temperatura evita tanto la liberación rápida de compuestos funcionales, como su degradación por efecto de las temperaturas más altas.

El propóleo utilizado como conservante natural, actúa como inhibidor del crecimiento de microorganismos, sin eliminarlos por completo, manteniendo la estabilidad microbiológica en el tiempo sugerido. Por esto, resultaría fundamental mantener un control adecuado de la temperatura de almacenamiento y asegurarse de que los envases estén bien cerrados para evitar la contaminación y garantizar la vida útil del producto.

## Conclusiones

### En cuanto a las condiciones óptimas de obtención del EEP:

El extracto de propóleos eficaz para maximizar las características funcionales, se obtiene mediante una solución de etanol al 87%, a una temperatura de 31°C, para evitar la degradación de los polifenoles, y un tiempo de extracción de 39 minutos, para asegurar la saturación de la solución. El aumento de la temperatura favoreció la extracción de los compuestos funcionales, pero a partir de una "temperatura límite" de 35°C, se detectó una disminución en los valores de contenido de polifenoles totales (CPT) y capacidad antioxidante (CA). Además, se estableció que, tiempos prolongados

a temperaturas más bajas, no tienen un impacto significativo en la extracción, y en cuanto al contenido de etanol, a concentraciones elevadas, el tiempo de tratamiento parece no influir significativamente. Sin embargo, a bajas concentraciones de etanol y tiempos prolongados de tratamiento, se observó una disminución en los valores de CPT y CA en los extractos obtenidos.

#### **Respecto al soporte de la resina (carbonato de calcio):**

El carbonato de calcio mostró ser el soporte ideal para encapsular la resina de propóleos, ya que permitió una retención adecuada de los compuestos y mantuvo las características esperadas para un ingrediente en forma de polvo, con excelente fluidez y cohesividad. El perfil de compuestos polifenólicos obtenido de los polvos con carbonato de calcio, incluye ácidos gálico, caféico, cumárico, ferúlico y sinápico, pertenecientes a las subclases de ácidos hidroxibenzoicos y ácidos hidroxicinámicos. Además, se identificaron dos flavonoides, quercetina y kaempferol, de la subclase de flavonas, así como crisina, un flavonoide de la subclase de flavononas. Entre estos compuestos, se destacó la presencia de quercetina, crisina y kaempferol en concentraciones significativas, los cuales poseen propiedades funcionales beneficiosas para la salud, incluyendo efectos antioxidantes, antiinflamatorios, cardiovasculares, así como propiedades neuroprotectoras y potencialmente anticancerígenas. Estos resultados resaltan la utilidad del carbonato de calcio como vehículo para compuestos bioactivos como el propóleos y la riqueza en compuestos funcionales de los polvos obtenidos.

#### **A cerca de la obtención de mermeladas de frutas y hortalizas reducidas en calorías:**

En el diseño de mezcla realizado, se observó que todas las variables tuvieron un impacto similar en las cuatro respuestas evaluadas, y se encontró que la aceptación de las mermeladas aumentaba a medida que se incrementaba el contenido de isomalta y se reducía el de agar-agar, manteniendo constante el valor de maltodextrina. Los resultados del análisis sensorial revelaron que la aceptabilidad de las mermeladas estaba relacionada con el aumento del contenido de isomalta y el agrado se asociaba con la percepción del dulzor, las características de textura y untuosidad. Además, se observó que la elección de la fruta tenía un impacto en la preferencia, ya que la mermelada de durazno era apreciada por su dulzura, mientras que la de ciruela destacaba por su sabor ácido, lo que a su vez mejoraba las propiedades texturales del producto.

#### **En relación a la adición de propóleos en la mermelada reducida en calorías, a través de un análisis sensorial, funcional y fisicoquímico:**

La concentración de propóleos aceptable para la mermelada de zanahoria y ciruela amarilla fue del 0,15%, sin que esto afectará negativamente la percepción de la textura ni del color. Sin embargo, esta formulación presentó un atributo penalizado debido a la poca percepción del sabor frutal, posiblemente influenciado por la presencia de zanahoria y propóleos. Aunque el nivel de dulzor también fue bajo y afectó ligeramente la aceptación global, no alcanzó la zona de penalización, lo que indica que solo un pequeño porcentaje de consumidores se vio afectado.

Para mejorar la aceptabilidad, se propone enmascarar el sabor amargo del propóleos mediante un aumento en los sabores dulces y ácidos, sin reducir la concentración de resina, ya que esto podría comprometer las propiedades bioactivas y la capacidad inhibidora, así como la estabilidad del producto final. En consecuencia, se recomienda

la elaboración de la mermelada con un 0,15% de resina, ya que esta fórmula obtuvo la mayor aceptación y cumplió con la función del propóleos en la formulación. Además, se observó que el análisis de inhibición de crecimiento microbiano, indicaba un efecto bacteriostático y fungistático en el ensayo microbiológico en placa, mientras que la ausencia de crecimiento correspondía a un efecto bactericida o fungicida.

Esto nos permita decir, que se logró desarrollar una mermelada de zanahoria y ciruela amarilla reducida en calorías con compuestos polifenólicos provenientes del propóleos, que le confieran capacidad antioxidante, buena aceptación sensorial y propiedades antimicrobianas naturales al producto final.

### **En relación al almacenamiento a diferentes temperaturas:**

Durante el almacenamiento se manifiesta una relación compleja entre la liberación de compuestos funcionales y la variación de color en las mermeladas. A temperaturas más bajas, la lenta liberación de compuestos antioxidantes puede conducir a una degradación rápida de los colorantes presentes en el producto, lo que explica la variación de color más pronunciada. Por otro lado, a temperaturas más altas, a pesar de una liberación rápida de compuestos funcionales, la degradación del color es rápida debido al efecto de la temperatura. En contraste, a temperaturas intermedias, se logra un equilibrio que proporciona mayor estabilidad al color, ya que la liberación de compuestos funcionales es lo suficientemente rápida como para evitar una degradación significativa. Por lo tanto, para asegurar la calidad y estabilidad de las mermeladas en góndolas, es crucial el envasado en recipientes herméticos, protegidos de la luz directa y almacenados a temperaturas entre 18-25°C. Además, el propóleos como conservante natural, requiere un control adecuado de la temperatura y almacenamiento una vez abierto el envase, para prolongar la vida útil y mantener la calidad del producto. Estas prácticas garantizan una experiencia satisfactoria para los consumidores y la durabilidad del producto en el tiempo de vida útil sugerido.

### **Bibliografía**

- Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT). (2023). Código Alimentario Argentino. Ministerio de Salud – ANMAT. Disponible en: <https://www.argentina.gob.ar/anmat/codigoalimentario>
- Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT). (2014). Fibra Alimentaria. Nutrición y Educación Alimentaria Ficha N° 33. Disponible en: [https://alimentosargentinos.magyp.gob.ar/HomeAlimentos/Nutricion/fichaspdf/Ficha\\_33\\_fibraAlimentaria.pdf](https://alimentosargentinos.magyp.gob.ar/HomeAlimentos/Nutricion/fichaspdf/Ficha_33_fibraAlimentaria.pdf)
- AOAC (2000) Official Methods of Analysis. 17th Edition, The Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD, U.S.A.
- AOAC Official Method (2005) Official Methods of Analysis, 18th ed. AOAC International, Gaithersburg, MD, U.S.A.
- Archaina, D., Leiva, G., Salvatori, D. y Schebor, C. (2018). Physical and functional properties of spray-dried powders from blackcurrant juice and extracts obtained 220 from the waste of juice processing. *Food Science and Technology International*, 24(1), 78–86
- Archaina, D., Rivero, R., Sosa, N., & Baldi Coronel, B. (2015). Influence of the harvesting procedure and extracting process on the antioxidant capacity of ethanolic propolis extracts. *Journal of Apicultural Research*, 54(5), 474-481.

- Archaina, D., Vasile, F., Jiménez-Guzmán, J., Alamilla-Beltrán, L., & Schebor, C. (2019). Physical and functional properties of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract spray dried with maltodextrin-gum arabic mixtures. *Journal of Food Processing and Preservation*, 43(9), e14065.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2020. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Franco D. (2021). Jaleas y mermeladas. Cadenas alimentarias. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca. Ministerio de Economía. Alimentos Argentinos, 53, 37-41. Disponible en: [http://www.alimentosargentinos.gov.ar/contenido/revista/revista\\_53.php](http://www.alimentosargentinos.gov.ar/contenido/revista/revista_53.php)
- Keraité G, Sivakova B and Kiuberis J, Investigation of the impact of organic and inorganic halides on the ageing stability of paper with iron gall ink. *Chemija* 28: 137-147 (2017).
- Maldonado, M. (2021). Nuevos desafíos para la industria alimentaria y los nuevos conocimientos acerca del tercer cerebro. *Revista de Nutrición Clínica y Metabolismo*; 4(4): 92-97.
- Martinez-Giron, J., figueroa-molano, A. M. y Ordóñez-santos, L. E. (2017). Effect of the addition of peach palm (*Bactris gasipaes*) peel flour on the color and sensory properties of cakes. *Food Science and Technology*, 37(3), 418-424.
- Martirosyan D. (2021). *The emerging potential of functional foods in viral disease prevention. Bioactive Compounds in Health and Disease* 3(6): 95- 99.
- OMS (Organización Mundial de la Salud). (2008). The global burden of disease: 2004 update. Disponible en: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/43942/9789241563710\\_eng.pdf](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/43942/9789241563710_eng.pdf)
- OMS (Organización Mundial de la Salud). (2014). Informe sobre la situación mundial de las enfermedades no transmisibles 2014. Disponible en: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/149296/WHO\\_NMH\\_NVI\\_15.1\\_spa.pdf?sequence=](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/149296/WHO_NMH_NVI_15.1_spa.pdf?sequence=)
- OMS (Organización Mundial de la Salud). (2015). Nota informativa sobre la ingesta de azúcares recomendada en la directriz de la OMS para adultos y niños. Disponible en: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/154587/WHO\\_NMH\\_NHD\\_15.2\\_spa.pdf](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/154587/WHO_NMH_NHD_15.2_spa.pdf)
- OMS (Organización Mundial de la Salud). (2018). Alimentación sana. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/healthy-diet>
- OMS (Organización Mundial de la Salud). (2019). Aumentar el consumo de frutas y verduras para reducir el riesgo de enfermedades no transmisibles. Disponible en línea en Biblioteca electrónica de documentación científica sobre medidas nutricionales.
- OMS (Organización Mundial de la Salud). (2020). La OMS revela las principales causas de muerte y discapacidad en el mundo: 2000-2019. Disponible en: <https://www.who.int/es/news/item/09-12-2020-who-reveals-leading-causes-of-death-and-disability-worldwide-2000-|2019>
- OPS (Organización Panamericana de la Salud) (2023). Etiquetado frontal. Disponible en: <https://www.paho.org/es/temas/etiquetado-frontal>
- Palazzo, A. B. y Bolini, H. M. A. (2017). Sweeteners in diet chocolate ice cream: Penalty analysis and acceptance evaluation. *Journal of Food Studies*, 6(1), 1-13.
- Rodríguez Pérez, B., Canales Martínez, M. M., Penieres Carrillo, J. G., & Cruz Sánchez, T. A. (2020). Chemical composition, antioxidant properties and antimicrobial activity of Mexican propolis. *Acta universitaria*, 30.

- Singleton, V. L. y Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolyb-  
dic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*,  
16(3), 144-158.
- Spáčil, Z., Nováková, L. y Solich, P. (2008). Análisis de compuestos fenólicos por cromatografía líquida de alto rendimiento y cromatografía líquida de ultra rendimiento. *Talanta*, 76 (1), 189-199.
- United States Pharmacopeia. (2014). USP 37-NF 32. United States Pharmacopeial Convention.
- Urbina Herrera, F. N. (2021). *Efecto protector de principios bioactivos presentes en legumbres sobre la disfunción endotelial* (Doctoral dissertation, Universidad de Talca (Chile). Escuela de Tecnología Médica.).
- Watts, B. M., Ylimaki, G. L., Jeffery, L. E., & Elías, L. G. (1992). Pruebas orientadas al consumidor. *Métodos sensoriales básicos para la evaluación de alimentos*. CIID, Ottawa, ON, CA.

**PID 9108 Denominación del Proyecto**

Desarrollo y caracterización de mermeladas de frutas reducidas en calorías con el agregado de extracto de propóleos como conservante y fuente de polifenoles

**Director**

Omar A. Vallejos

**Codirector**

Roy C. Rivero

**Unidad de Ejecución**

Universidad Nacional de Entre Ríos

**Dependencia**

Facultad de Bromatología

**Contacto**

[vallejos.omar@uner.edu.ar](mailto:vallejos.omar@uner.edu.ar) y/o [roy.rivero@uner.edu.ar](mailto:roy.rivero@uner.edu.ar)

**Cátedra/s, área o disciplina científica**

Departamento de Bromatología y Materias Aplicadas. Cátedra de Bromatología III y Cátedra de Conservación de Alimentos. Laboratorio de Investigaciones y Servicios de Productos Apícolas.

**Instituciones intervinientes**

Convenio marco de colaboración con la Cooperativa Apícola Gualaguaychú Limitada.

**Integrantes del proyecto**

Dr. Archaina, Diego A. Lic. Correa, Silvana A. Lic. Roche, Marcela F.  
Becarios de investigación: Varela, Florencia C.

**Fechas de iniciación y de finalización efectivas**

15/08/2019 y 30/10/2023

Aprobación del Informe Final por Resolución C.S. N° 510/23 (21-12-2023)