



25/09/2022

Asunto: Autorización de impresión

**Mtra. Ojuky del Rocío Islas Maldonado**  
**Directora de Administración Escolar**  
**Presente.**

El Comité Tutorial del nombre del producto que indique el documento curricular del programa educativo de posgrado titulado "Índice glucémico in vitro y actividad antioxidante de jarabe de agave obtenido por evaporación rotatoria al vacío", realizado por la sustentante Carolina Cerón Zamora con número de cuenta 230510 perteneciente al programa de Maestría en Ciencias Biomédicas y de la Salud, una vez que ha revisado, analizado y evaluado el documento recepcional de acuerdo a lo estipulado en el Artículo 110 del Reglamento de Estudios de Posgrado, tiene a bien extender la presente:

**AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN**

Por lo que el sustentante deberá cumplir los requisitos del Reglamento de Estudios de Posgrado y con lo establecido en el proceso de grado vigente.

Atentamente

"Amor, Orden y Progreso"

Pachuca, Hidalgo a 21 de septiembre de 2022

El Comité Tutorial

Dr. Ernesto Alanís García  
 Director

Dra. Nelly del Socorro  
 Cruz Cansino  
 Miembro del comité



ÁREA ACADÉMICA DE MEDICINA

Dr. José Alberto Ariza  
 Ortega  
 Miembro del comité

Dr. José Ramón  
 Montejano Rodríguez  
 Miembro del comité

Juan Ramírez Godínez

Dr. Juan Ramírez  
 Godínez  
 Miembro del comité

Comité de Planeación y Coordinación de Docentes  
 Pachuca, Hidalgo, San Agustín Tlaxiela, Hidalgo,  
 México, C.P. 40100  
 Teléfono: 02 (171) 71 730 00 Ext. 4308 2101, 4344, 4310  
 web@uaeh.edu.mx





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO  
INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD

---

---

**“Índice glucémico *in vitro* y actividad antioxidante de jarabe de agave obtenido por evaporación rotatoria al vacío”**

Tesis que para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS Y DE LA SALUD**

Presenta:

**Q.A. CAROLINA CERÓN ZAMORA**

Director(a) de Tesis

**Dr. Ernesto Alanís García**

Codirector(a) de Tesis

**Dr. José Alberto Ariza Ortega**

San Agustín Tlaxiaca Hgo. a 25 de septiembre de 2022



**Antonio José Fernández López**

**Presidente del Comité Científico del V Congreso en Ciencia Sanitaria**

## CERTIFICA

Que la comunicación científica **Póster virtual sin defensa** titulada:

**COMPOSICIÓN FÍSICOQUÍMICA Y ANTIOXIDANTE DEL JARABE DE AGAVE PULQUERO OBTENIDO POR ROTA-EVAPORACIÓN AL VACÍO UTILIZANDO UN DISEÑO DE SUPERFICIE DE RESPUESTA DE TIPO BOX-BEHNKEN**

Ha sido presentada por:

<b>Don / Doña</b>	<b>DNI/NIE/Pasaporte</b>
CAROLINA CERÓN ZAMORA	CAROLINACERONZAMORA
ERNESTO ALANÍS GARCÍA	19716184
JOSÉ ALBERTO ARIZA ORTEGA	G01401712
NELLY DEL SOCORRO CRUZ CANSINO	0880047283023
LUIS DELGADO OLIVARES	1015008924577

Esta comunicación ha sido revisada y aceptada por el Comité Científico del Congreso. Cuenta con valor intrínseco y original. Dicho Congreso, de índole internacional, y declarado de Interés Científico Sanitario en España, se ha celebrado desde el 6 hasta el 8 de julio de 2022. La Publicación Científica está publicada en el Libro de Actas del V Congreso Internacional en Ciencia Sanitaria. Volumen I con ISBN: 978-84-18707-67-4.

El congreso cuenta con el apoyo y colaboración de la Sociedad Científica Española de Formación Sanitaria (Inscrita en registro de Sociedades Científicas con Nº 611948. Identificador Estándar Internacional (ISNI): 0000 0004 9330 2066). Resolución Favorable de Reconocimiento de Interés Científico-Sanitario (Nº Expte: 7/2022). Este certificado está asociado a una clave de trazabilidad exclusiva que refleja su veracidad, podrá consultarlo a través del siguiente código QR. **Categoría Profesional: Química.**

Y para que así conste a efectos oportunos, allí donde proceda, se expone la presente certificación.

**En Murcia, a 6 de julio de 2022.**



**SOCIFOSA**  
Sociedad Científica Española de Formación Sanitaria



**Ciencia Sanitaria**  
CienciaSanitaria.es

**Antonio José Fernández López**



Durante el desarrollo de estos estudios, se contó con una beca de manutención otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), con número de CVU 1077251 y folio de beca 771926.

De igual forma le agradezco a la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, por prestar las instalaciones para la realización de este estudio realizado en el posgrado de la Maestría de Ciencias Biomédicas y de la Salud perteneciente al ICSa.

También agradezco a los responsables de los laboratorios donde se llevó a cabo este proyecto: Laboratorio de Alimentos Funcionales y Nutracéuticos, Laboratorio de Tecnofuncionalidad de Alimentos y al Laboratorio de Farmacia, ya que sin las áreas de trabajo, equipos, materiales y reactivos no se hubiera llevado a cabo.

Un agradecimiento muy especial al Dr. Juan Francisco Flores Aguilar, investigador del Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería (ICBI) perteneciente a esta casa Mater, quien nos apoyó y asesoró en parte del diseño este proyecto.

## **Agradecimientos personales**

*“Aprendí que lo difícil no es llegar a la cima, sino jamás dejar de subir”*

*-Walt Disney-*

Los sueños se idealizan, se crean y se logran, con trabajo, dedicación, empeño, esfuerzo y, sobre todo, con gente que te apoya para lograr tu sueño por ello agradezco a cada persona que estuvo involucrada en esta etapa de mi vida, agradezco a Dios por haberme dado la calma en las situaciones más complicadas. De igual forma agradezco a mi padre y madre (Eduardo y Angelica), por el apoyo, comprensión y el amor que me brindan en todo momento. También agradezco a mi hermano (Lalo) por siempre ser mi modelo para seguir, le agradezco que siempre estuvo ahí en esta etapa que ambos vivimos juntos aun en la situación mundial que se vivió y se sigue viviendo. Agradezco a toda mi familia por siempre darme una motivación y siempre estar ahí.

Mis mayores agradecimientos al Dr. Ernesto Alanís, ya que me brindó el apoyo, los insumos e inmobiliario para que este proyecto se realizara y culminara en tiempo y forma, de igual forma le agradezco cada enseñanza, asesoría, paciencia y tolerancia que siempre me mostró ante cada situación que vivimos juntos en este estudio.

Agradezco a la Dra. Nelly Cruz por su apoyo en todo momento de este proyecto, también agradezco enormemente al Dr José A. Ariza por las asesorías y apoyo en la escritura de este documento, y las asesorías que me dio durante mi estancia en dicha institución. Agradezco al Dr. Montejano y a su esposa Geo quien siempre me tendieron una mano cuando ocupe su laboratorio y siempre fueron muy pacientes y accesibles con el trabajo. También agradezco al Dr Juan quien me dio un consejo y asesorías durante esta etapa.

También agradezco a mis compañeros y ahora amigos de maestría Efrén, Jazmín, Francisco y Esmeralda, ya que sin sus palabras de apoyo no lo hubiéramos

logrado. Agradezco a mis compañeras de laboratorio Lety, Rebe, Mai y Xime quienes siempre me ofrecieron su apoyo y me ayudaron en mis determinaciones. Agradezco a la vida por permitirme conocer a estas personas tan maravillosas y en especial a Gloria por siempre apoyarme, enseñarme y brindarme una asesoría en mis momentos más difíciles.

De igual forma agradezco a los señores Narcizo y Modesto “Tlaxiqueros de la localidad de San Juan Solís” quienes siempre me brindaron el apoyo al darme el aguamiel a pesar de que era su sustento de su familia. Para finalizar agradezco a cada persona que indirectamente estuvo involucrado en este proyecto y que siempre me apoyaron

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	viii
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	ix
<b>ABREVIATURAS</b> .....	x
<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>ABSTACT</b> .....	2
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	4
<b>II. ANTECEDENTES</b> .....	6
2.1 <i>Generalidades</i> .....	6
2.1.1 <i>Agave</i> .....	6
2.1.1.2. <i>Agave pulquero</i> .....	6
2.1.2. <i>Aguamiel</i> .....	8
2.1.3 <i>Índice glucémico en alimentos</i> .....	12
2.1.4. <i>Compuestos bioactivos</i> .....	13
2.2 <i>Antecedentes del problema</i> .....	17
2.3 <i>Planteamiento del problema</i> .....	19
<b>III. JUSTIFICACIÓN</b> .....	21
<b>V. OBJETIVOS</b> .....	22
5.1 <i>Objetivo General</i> .....	22
5.2 <i>Objetivos Específicos</i> .....	22
<b>VI MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	23
6.1 <i>Tipo y diseño de estudio</i> .....	23
6.2 <i>Selección de la muestra, criterios de inclusión y exclusión</i> .....	23
6.3 <i>Tamaño de muestra y muestreo</i> .....	23
6.4 <i>Definición de variables (dependientes, independientes)</i> .....	23
6.5 <i>Diagrama de la metodología experimental</i> .....	27
6.6 <i>Instrumentos de recolección</i> .....	29
6.6.1 <i>Pretratamiento de materia prima (aguamiel)</i> .....	29
6.6.2 <i>Análisis de la materia prima</i> .....	29
6.6.2.1 <i>Análisis microbiológico</i> .....	29
6.6.2.2 <i>Sólidos solubles totales (SST)</i> .....	30
6.6.2.3 <i>pH</i> .....	30
6.6.2.4 <i>Acidez Titulable</i> .....	31
6.6.2.5 <i>Azúcares reductores (AR)</i> .....	31

6.6.2.6	Compuestos y actividad antioxidante .....	32
6.6.2.6.1	Contenido de fenoles totales .....	32
6.6.2.6.2	Contenido de ácido ascórbico .....	32
6.6.2.6.3	Contenido de betalaínas .....	33
6.6.2.6.4	Ensayo DPPH <sup>•+</sup> .....	34
6.6.2.6.5	Ensayo ABTS <sup>•+</sup> .....	35
6.6.2.6.6	Ensayo FRAP .....	35
6.6.3	Diseño experimental de superficie de respuesta .....	36
6.6.3.1	Sólidos solubles totales (°Bx).....	38
6.4.3.2	Compuestos y actividad antioxidante .....	38
6.6.4	Evaluación vida útil.....	38
6.6.4.1	Diseño experimental para vida útil .....	38
6.6.5	Análisis de jarabes o mieles de agave .....	39
6.6.5.1	Composición fisicoquímica .....	39
6.6.5.1.1	Determinación de humedad.....	39
6.6.5.1.2	Determinación de cenizas.....	40
6.6.5.1.3	Determinación de proteína .....	40
6.6.5.2	Contenido de azúcares y carbohidratos .....	41
6.6.5.2.1	Azúcares reductores .....	41
6.6.5.2.2	Azúcares totales y sacarosa.....	41
6.6.5.2.3	Carbohidratos totales .....	42
6.6.5.3	Indicadores de calidad .....	42
6.4.5.3.1	Determinación de hidroximetil furfural (HMF) .....	42
6.5.5.3.2	Determinación del índice de oscurecimiento .....	43
6.6.5.4	Color .....	44
6.6.5.5	Viscosidad .....	44
6.6.5.6	Compuestos y actividad antioxidante .....	44
6.6.6	Índice Glucémico in vitro .....	45
6.7	Análisis Estadístico .....	45
<b>VII</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>47</b>
7.1	Análisis de la materia prima .....	47
7.1.1	Análisis microbiológicos .....	47
7.1.2	Sólidos solubles totales, pH, acidez titulable y azúcares reductores .....	47
7.1.3	Compuestos y actividad antioxidante .....	48

7.2	Diseño de superficie de respuesta.....	49
7.2.1	<i>Sólidos solubles totales, compuestos y actividad antioxidante</i> .....	49
7.2.2	<i>Optimización en la obtención de jarabe de agave por evaporación al vacío</i> .....	58
7.2.3	<i>Reproducibilidad del estudio</i> .....	59
7.3	Evaluación vida útil.....	59
7.4	Análisis de jarabes o mieles de agave.....	65
7.4.1	<i>Composición fisicoquímica</i> .....	65
7.4.2	<i>Indicadores de calidad</i> .....	70
7.4.3	<i>Color</i> .....	71
7.4.4	<i>Compuestos y actividad antioxidante</i> .....	72
7.4.5	<i>Viscosidad</i> .....	74
7.5	<i>índice glucémico in vitro</i> .....	74
<b>VIII.</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	76
8.1	Optimización de jarabe de agave por evaporación al vacío .....	76
8.1.1	<i>Características fisicoquímicas del aguamiel</i> .....	76
8.1.2	<i>Efecto de la temperatura, vacío y tiempo sobre sólidos solubles totales, compuestos y actividad antioxidante</i> .....	79
8.1.3	<i>Reproducibilidad</i> .....	83
8.1.4	<i>Vida útil del jarabe de agave pulquero</i> .....	85
8.2	Características nutrimentales del jarabe de agave pulquero.....	90
<b>IX</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	100
<b>X.</b>	<b>RECOMENDACIONES</b> .....	101
<b>XI.</b>	<b>REFERENCIAS</b> .....	102
<b>XII.</b>	<b>ANEXOS</b> .....	117

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estados de la república mexicana donde se cultiva el Agave salmiana.....	7
<b>Figura 2.</b> Proceso de obtención de aguamiel.....	9
<b>Figura 3.</b> Metodología experimental .....	28
<b>Figura 4.</b> Gráficas de contorno para SST (°Bx) .....	51
<b>Figura 5.</b> Gráficas de contorno para contenido de fenoles totales (mg EAG/100 g).....	52
<b>Figura 6.</b> Gráficas de contorno para contenido de ácido ascórbico (mg EAA/100g).....	53
<b>Figura 7.</b> Gráficas de contorno para contenido betacianinas mg/100 g .....	55
<b>Figura 8.</b> Gráficas de contorno para el ensayo DPPH <sup>•+</sup> ( mg ET/100g).....	55
<b>Figura 9.</b> Gráficas de contorno para el ensayo ABTS <sup>•+</sup> ( mg ET/100g).....	56
<b>Figura 10.</b> Gráficas de contorno para el ensayo FRAP (mmol Fe (II)/100g).....	57
<b>Figura 11.</b> Resultado de la optimización del jarabe de agave pulquero con las variables respuesta con la condición optima y maximizando su concentración en el programa MiniTab .....	58
<b>Figura 12.</b> Gráficas del comportamiento de determinaciones fisicoquímicas del jarabe de agave obtenido por roto evaporación al vacío durante 90 días de almacenamiento a temperatura ambiente y en dos condiciones (luz y oscuridad). (A)SST (°Bx), (B) pH y (C) Acidez titulable.....	60
<b>Figura 13.</b> Gráficas del comportamiento de indicadores de calidad para el jarabe de agave obtenido por roto evaporación al vacío durante 90 días de almacenamiento a temperatura ambiente y en dos condiciones (luz y oscuridad). (A) Hidroximetilfurfural y (B) Índice de oscurecimiento.....	61
<b>Figura 14.</b> Gráficas del comportamiento en la coloración jarabe de agave obtenido por roto evaporación al vacío durante 90 días de almacenamiento a temperatura ambiente y en dos condiciones (luz y oscuridad). (A) Coordenada L, (B) Coordenada a*, (C) Coordenada b* y (D) deltas de diferencia de color.....	62
<b>Figura 15.</b> Gráficas del comportamiento en la concentración de compuestos antioxidantes del jarabe de agave obtenido por roto evaporación al vacío durante 90 días de	

almacenamiento a temperatura ambiente y en dos condiciones (luz y oscuridad). (A) Contenido de fenoles totales, (B) ácido ascórbico y (C) contenido de betalaínas.....	63
<b>Figura 16.</b> Gráficas del comportamiento en la actividad antioxidante del jarabe de agave obtenido por roto evaporación al vacío durante 90 días de almacenamiento a temperatura ambiente y en dos condiciones (luz y oscuridad). (A) ensayo DPPH <sup>•+</sup> , (B) ensayo ABTS <sup>•+</sup> y (C) ensayo FRAP.....	65
<b>Figura 17.</b> Muestras comerciales de jarabes o mieles de agave . De izquierda a derecha, los dos primeros son de agaves pulqueros y los dos últimos de agave tequilero .....	66

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Sinopsis de las prácticas agrícolas del maguey pulquero .....	7
<b>Tabla 2.</b> Parámetros experimentales de aguamiel en el estado de Hidalgo .....	10
<b>Tabla 3.</b> Parámetros experimentales de jarabe de agave del estado de Hidalgo.....	11
<b>Tabla 4.</b> Compuestos bioactivos importantes en la miel y el agave .....	14
<b>Tabla 5.</b> Índice glucémico (IG) de diferentes mieles y jarabe de agave .....	17
<b>Tabla 6.</b> Definición de variables independientes y dependientes .....	24
<b>Tabla 7</b> Factores y niveles aplicados en el diseño de experimentos para la obtención de jarabe de agave pulquero mediante ERV .....	37
<b>Tabla 8.</b> Condiciones para la obtención de jarabe de agave por ERV, corridas ordenadas de manera aleatoria por el programa .....	38
<b>Tabla 9.</b> Análisis microbiológico al aguamiel durante el pretratamiento .....	47
<b>Tabla 10.</b> Características fisicoquímicas del aguamiel.....	47
<b>Tabla 11.</b> Compuestos y actividades antioxidantes del aguamiel .....	48
<b>Tabla 12.</b> Resultados de las diferentes variables respuestas de acuerdo con cada corrida realizada para la obtención de jarabe de agave por ERV ordenadas de manera aleatorizadas por el programa.....	50
<b>Tabla 13.</b> Comparación de los valores predichos por la superficie de respuesta y los obtenidos experimentalmente .....	59
<b>Tabla 14.</b> Composición fisicoquímica de jarabes de agaves .....	67
<b>Tabla 15.</b> Indicadores de calidad en jarabes de agaves .....	70

<b>Tabla 16.</b> Determinación de color en jarabes de agaves.....	71
<b>Tabla 17.</b> Compuestos y actividad antioxidante de jarabes de agaves .....	72
<b>Tabla 18.</b> Viscosidad de jarabes y mieles de agaves .....	74
<b>Tabla 19.</b> Estimación del índice glucémico in vitro de jarabes y mieles de agaves .....	74

## **ABREVIATURAS**

**AG:** Ácido Gálico

**AOAC:** Association of Official Analytical Chemists

**AR:** Azúcares Reductores

**Eig:** Estimación de Índice Glucémico

**ERV:** Evaporación Rotatoria al Vacío

**ET:** Equivalentes de Trolox

**HMF:** Hidroximetilfurfural

**JAERV\*:** Jarabe de Agave pulquero obtenido por ERV muestra óptima\*

**IG:** Índice Glucémico

**SST:** Sólidos Solubles Totales

## RESUMEN

La miel o jarabe de agave es un subproducto de las plantas de agave que tienen propiedades nutricionales y funcionales debido a su contenido de minerales, fructooligosacáridos, aminoácidos o compuestos bioactivos, que han permitido ampliar la variedad de edulcorantes para la población debido a su bajo índice glucémico (IG), además de su actividad antioxidante dado por su contenido de compuestos bioactivos. El objetivo de este trabajo fue optimizar las condiciones de obtención de jarabe de agave por evaporación rotatoria al vacío (ERV), utilizando un diseño Box-Behnken para obtener un edulcorante natural. El proyecto se dividió en 4 etapas iniciando con la caracterización de la materia prima (aguamiel), posteriormente, la optimización del proceso de elaboración, también, se determinó la vida útil del producto durante 90 días a temperatura ambiente y en dos condiciones de almacenamiento (Luz y oscuridad). Asimismo, la muestra óptima y los jarabes comerciales fueron analizados, con el fin de determinar sus propiedades (fisicoquímicas y actividad antioxidante), y por último se estimó el IG *in vitro* (eIG) para conocer su contenido de glucosa. La superficie de respuesta para sólidos solubles totales indicó una  $R^2$  de 97.8 y una  $R^2$  de predicción de 70.2, con respecto a los compuestos y actividad antioxidante no se pudo obtener una  $R^2$  alta (<50%), pero si se preservaron los compuestos y propiedades. La mejor combinación para la optimización dando un valor fijo de SST y un máximo en las concentraciones de compuestos y actividad antioxidante, de acuerdo con el programa, fue de 68°C, 65 mbar y 25 min, la cual presentó actividad antioxidante similar a las mieles de agave comerciales de la especie pulquera (p.ej. DPPH<sup>+</sup> Maye @ 13.56 mg ET/ 100 g, ABTS<sup>+</sup> y FRAP Hacienda de Amoltepec= 21.97 mg ET/ 100 g y 8.20 mmol Fe<sup>2+</sup>/ 100 g respectivamente) y mayor que la especie tequilera (p.ej. Enature DPPH<sup>+</sup> = 2.60 mg ET/ 100 g, ABTS<sup>+</sup> = 1.31 mg ET/ 100 g y FRAP = 1.36 mmol Fe<sup>2+</sup>/ 100 g). La muestra óptima obtuvo 75.20 ± 0.9 °Brix, un porcentaje de cenizas y proteínas de 1.12 ± 0.20 y 2.31 ± 0.028 respectivamente, 51.55 ± 0.005 g/100g de azúcares reductores, el color de la muestra mostró coordenadas  $L^*$  = 51.90 ± 0.20,  $a^*$  = -3.41 ± 0.36 y  $b^*$  = 12.23 ± 0.08 y una viscosidad de 3226.66 ± 45.09 cP. La estimación de IG del jarabe fue de 36.65 durante un tiempo de 180 min. Se concluye que el uso del rotovapor reduce tiempos y temperaturas en la concentración del aguamiel preservando sus propiedades

nutricionales, compuestos y actividad antioxidante, generando un edulcorante natural benéfico para el consumidor.

**Palabras clave:** Jarabe de agave, *agave spp.*, índice glucémico, actividad antioxidante, evaporación rotatoria al vacío

## ABSTRACT

Honey or syrup agave is a by-product of agave plants that have nutritional and functional properties due to their content of minerals, fructooligosaccharides, amino acids or bioactive compounds, which have made it possible to expand the variety of sweeteners for the population due to their low index glycemic acid (GI), in addition to its antioxidant activity given by its content of bioactive compounds. The objective of this work was to optimize the conditions for obtaining agave syrup by vacuum rotary evaporation (VRE), using a Box-Behnken design to obtain a natural sweetener. The project was divided into 4 stages, beginning with the characterization of the raw material (aguamiel), later, the optimization of the elaboration process, also, the useful life of the product for 90 days at room temperature and in two storage conditions (Light and darkness). Likewise, the optimal sample and the commercial syrups were analyzed in order to determine their properties (physicochemical and antioxidant activity), and finally the in vitro GI (eGI) to determine their glucose content was estimated. The response surface for total soluble solids indicated a R<sup>2</sup> of 97.8 and a prediction R<sup>2</sup> of 70.2, with respect to the compounds and antioxidant activity, a high R<sup>2</sup> (<50%) could not be obtained, but the compounds and properties were preserved. The best combination, according to the program, for optimization was 68°C, 65 mbar and 25 min, which presented antioxidant activity similar (DPPH•+ Maye ® 13.56 mg TE/ 100 g, ABTS•+ and Hacienda de Amoltepec FRAP= 21.97 mg TE/ 100 g and 8.20 mmol Fe 2+/ 100 g respectively) to commercial agave syrups of the pulquera species and higher than tequila species (p.ex. Enature DPPH•+ = 2.60 mg ET/ 100 g, ABTS•+= 1.31 mg ET/ 100 g and FRAP= 1.36 mmol Fe 2+ / 100 g). The optimal sample obtained 75.20 ± 0.9 °Brix, a percentage of ash and protein of 1.12 ± 0.20 and 2.31 ± 0.028 respectively, 51.55 ± 0.005 g/100g of reducing sugars, the color of the sample showed coordinates L\* = 51.90 ± 0.20, a\* = -3.41 ± 0.36 and b\* = 12.23 ± 0.08 and a viscosity of 3226.66 ± 45.09 cP.

The GI estimation of the syrup was 36.65 during a time of 180 min. It is concluded that the use of rotovapor reduces times and temperatures in the concentration of mead, preserving its nutritional properties, compounds and antioxidant activity, generating a beneficial natural sweetener for the consumer.

**Key words:** agave syrup, *agave spp.*, glycemic index, antioxidant activity, vacuum rotary evaporation.

## I. INTRODUCCIÓN

México cuenta con aproximadamente 200 especies de agave los cuales se encuentran distribuidos en la mayor parte del territorio, generando productos alimenticios, bebidas alcohólicas o productos de uso textil, ornamental o con fines religiosos. El estado de Hidalgo es considerado uno de los estados con mayor producción de pulque, que es una bebida alcohólica con propiedades nutricionales benéficas para el consumidor, debido al proceso de elaboración y sobre todo a su materia prima. El aguamiel es la savia del agave pulquero que se recolecta después de realizar un raspado en el centro de la planta (también llamada maguey), esta actividad la realiza un “Tlachiquero” (persona encargada de cultivar el maguey, recolectar el aguamiel y elaborar el pulque). Para que este proceso se lleve a cabo debe esperar a que el maguey cumpla con una edad determinada que va de los 10 a 12 años.

Para la elaboración de este proyecto, la toma de muestra de la materia prima “Aguamiel” se realizó en diferentes días, considerando los SST ( $^{\circ}\text{Bx}$ ) de 11 como un parámetro de homogenización para la elaboración de la superficie de respuesta. Adicionalmente se analizaron parámetros como pH, acidez titulable, azúcares reductores compuestos y actividad antioxidante.

La superficie de respuesta se realizó con el fin de optimizar la elaboración de jarabe de agave mediante la combinación de tres factores que se pueden controlar en un equipo de rotovapor (temperatura, vacío y tiempo). La respuesta principal fue la concentración de sólidos solubles totales (SST), posteriormente el contenido de compuestos y la actividad antioxidante. Una vez obtenida la muestra óptima se comparó con muestras de mieles o jarabes comerciales de la especie pulquera y tequilera. También se evaluó la vida útil en dos condiciones (luz y oscuridad) durante 90 días. Por último, se realizó una eIG *in vitro* con el fin de conocer la liberación de glucosa durante un tiempo determinado.

En una tercera sección se describen los resultados y el análisis de la materia prima, la superficie de respuesta con sus respectivas variables respuestas ( $^{\circ}\text{Bx}$ , compuestos y actividad antioxidante), la comparación fisicoquímica, índices de calidad, color y la

viscosidad de la muestra óptima con respecto a muestras comerciales. La evaluación de la vida útil durante los 90 días y por último el resultado de la eIG. Los paquetes estadísticos utilizados fueron el software Minitab versión 18 (superficie de respuesta) y SPSS statistics versión 25 (análisis estadísticos). Finalmente, la última sección se encuentran conclusiones, recomendaciones, referencias y anexo.

## II. ANTECEDENTES

### 2.1 Generalidades

#### 2.1.1 Agave

El agave también llamado “maguey”, pertenece al género de *Asparagales* que proviene de la familia *Agavacea*, que contiene a más de 200 especies de las cuales el 75% se encuentran en México (1,2), con fines alimenticios, medicinales, textiles, religiosos e incluso ornamentales. En la industria alimentaria la producción de bebidas alcohólicas como lo son el tequila, mezcal, el bacanora, raicilla y pulque, el cual es un proceso que comienza cuando un agave ya se encuentra en un estado de madurez avanzada que va de los 7 a 10 años (2,3). Es utilizado con fines culinarios y medicinales debido a sus carbohidratos, y por el contenido de flavonoides, ácidos fenólicos y saponinas, entre otros compuestos respectivamente (4).

El agave no solo se utiliza como alimento, sino también para la construcción, cordelería, vestimentas, control de suelos y eventos ceremoniales (5). El agave florece y con ello se realiza una cosecha con fines comestibles (6), la inulina, una fibra dietética que puede ser del bagazo del maguey (7); así mismo y como ya se mencionó para la elaboración de bebidas alcohólicas (8), incluso en la generación de etanol como un biocombustible (9). En las familias campesinas el maguey tiene amplia variedad de usos, desde las pencas, cuales se utilizan como recipiente para servir alimentos, o beber pulque, como combustible (leña), en la elaboración de cepillos, estropajos y papel, incluso la elaboración de viviendas, la extracción de gusano rojo y blanco e incluso para la preparación de barbacoa (10). Se ha indicado que la base económica de estas plantas puede expandirse para aplicaciones en alimentos, forraje, ensilaje, agricultura, medicina, energía, textiles, cosméticos y estética en la medida en la que se le dé uso posterior a la biomasa de esta planta (2).

#### 2.1.1.2. Agave pulquero

El agave pulquero es aquella planta que produce aguamiel, el cual es recolectado para elaborar pulque. Las especies para la producción de aguamiel son: *Agave americana*, *A. atrovirens*, *A. ferox*, *A. mapisaga*, y *A. salmiana* (11), los cuales son especies importantes

en el ecosistema del Valle de México, pero algunas prácticas de manejo han propiciado la reducción de la densidad de siembra (12,13), entre los principales estados productores en México se encuentra Hidalgo, Edo. De México, Puebla y Tlaxcala y en menor proporción San Luis Potosí, Michoacán, Querétaro, Morelos, Guanajuato y Veracruz (12). En la Figura 1 se muestra la ubicación geográfica donde se encuentra presente el *Agave salmiana* en el territorio nacional indicando estados como Coahuila, Nuevo León, Durango, San Luis Potosí, Jalisco, Zacatecas, Aguascalientes, Guanajuato, Edo. De México, Querétaro, Hidalgo, Michoacán, Morelos, Tlaxcala CDMX, Guerrero, Puebla, Oaxaca, Veracruz y Chiapas.



**Figura 1.** Estados de la república mexicana donde se cultiva el *Agave salmiana*

Fuente: Instituto de biología de UNAM (14)

El cultivo del maguey implica ciertos cuidados durante 10 a 12 años para que esta planta este en producción de aguamiel de 4 a 6 meses (19), el proceso se observa en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Sinopsis de las prácticas agrícolas del maguey pulquero

Actividades realizadas en cada año		
0	1-2	3-10
<b>1.Preparación del terreno (arar y rastra)</b>	1. Selección del material vegetal (semilla, bulbilo o propágulos rizomatosos)	1. Cultivo intensivo
	2. Trasplante	2. Deshierbe y poda anual
	3. Plantación definitiva	3. Control de plagas y enfermedades
	4. Deshierbe y poda anual	4. Asociación con otros

	cultivos (maíz, frijol, etc.)
5. Control de plagas y enfermedades	5. Desahije (4 años de edad)
6. Fertilización	6. Fertilización

---

Fuente obtenida de: José y García (12)

Observando en la Tabla 1, el desarrollo del maguey pulquero implica ciertas actividades las cuales se desarrollan durante 10 años pero durante este periodo la planta sufre alteraciones en su composición química; se reporta que durante el periodo de crecimiento de la planta los fructanos se sintetizan y se acumulan en el tallo, y cuando el maguey está listo para su etapa reproductiva de (6 a 8 años) los fructanos comienzan un proceso de hidrólisis (generando fructosa y glucosa), dado el gasto energético que se lleva en esta etapa, es importante tener un contenido de carbohidratos adecuados debido a que este parámetro determina el rendimiento del producto final (17), es por eso que se debe mantener un buen cuidado de la planta y saber la edad de la misma para iniciar la etapa de recolección de la savia y que está sea de calidad.

### *2.1.2. Aguamiel*

La aguamiel es la savia (líquido compuesto de azúcares) del agave que se obtiene de diferentes géneros de agaves pulqueros que es transformada en bebida alcohólica llamada pulque (18,19). Cuando la planta tiene alrededor de 8 a 12 años, comienza el proceso para la obtención del pulque, iniciando con el careo, castración, picazón, sazonado, raspado, explotación, recolección de aguamiel, traspotación al tinacal, elaboración del pulque y por último la comercialización (12), este proceso se puede observar en la Figura 2 donde se observan los puntos más importantes del procedimiento de obtención de aguamiel



**Figura 2.** Proceso de obtención de aguamiel

Fuente: Huezcas-Garrido *et al* (20).

Este proceso comienza cuando el tallo de la planta alcanza su altura máxima (1.23 a 2.8 m) y se realiza un hueco en el centro del maguey; el cual será tallado, y la recolección de la savia se lleva a cabo cada 12 horas, pudiendo durar su producción entre los 4 a 6 meses, el volumen de aguamiel varía durante el tiempo de la cosecha (15,16), y se consiguen recolectar hasta 1000 litros de aguamiel, la cual, está compuesta de glucosa, fructosa, fructooligosacáridos, inclusive diversas especies de bacterias, que se puede consumir de manera fresca (inmediata) o fermentada (4,13). Algunas de las especies microbianas más importantes del aguamiel son: *Saccharomyces cerevisiae*, encargado de la fermentación alcohólica, las bacterias del género *Leuconostoc* encargadas de la síntesis de polisacáridos los cuales pueden tener actividad probiótica o prebiótica (11). En la Tabla 2 se observa la composición del aguamiel del estado de Hidalgo.

**Tabla 2.** Parámetros experimentales de aguamiel en el estado de Hidalgo

<b>pH</b>	6.40
<b>Acidez (%)</b>	0.08
<b>Sólidos solubles totales (°Bx)</b>	15.67
<b>Índice de Refracción</b>	1.3342
<b>Proteína (%)</b>	3.03
<b>Azúcares reductores totales (%)</b>	10.03
<b>Capacidad antioxidante ABTS (<math>\mu\text{mol ET/g}</math>)</b>	5.15
<b>Fenoles (mg AG/g)</b>	6.95
<b>Color <math>L^*</math></b>	43.32
<b>Color <math>a^*</math></b>	1.32
<b>Color <math>b^*</math></b>	8.74

Fuente modificada de: Espindola-Sotro *et al.*, (21)

La norma mexicana NMX-V-022-1972 “aguamiel” define a este producto como un líquido translúcido, de color ambarino, de olor y sabor característicos, el cual contiene compuestos bioactivos como los son las saponinas, vitaminas, aminoácidos, grasas, ácidos grasos, minerales y fructooligosacáridos (FOS), lo que la convierte en una bebida funcional (22,23). Otro estudio indicó que el aguamiel contenía 11,5% en peso de materia seca, la cual estaba compuesta principalmente de azúcares como glucosa, fructosa y sacarosa (75% en peso), el 10% en peso eran fructooligosacáridos (FOS) además se encontró que el 0,3% del peso eran aminoácidos libres, 3% en peso de proteínas y 3% en peso de cenizas (16). Uno de los usos que se le puede dar al aguamiel es en la producción de miel o jarabe, este último es un edulcorante natural que se realiza mediante deshidratación, la cual, tiene valor nutritivo debido a los componentes antes mencionados. Este producto se puede utilizar para preparar mermeladas, galletas, atole, agua de sabor y artículos para el cuidado de la piel (10).

El jarabe de agave es un néctar obtenido por la concentración del aguamiel o savia del maguey, que tiene un uso como endulzante 100% natural para el consumo alimenticio (24). Este producto también llamado néctar de agave, tiene un consumo mayor en la región

occidente de México, ya que se utiliza como alternativa a los edulcorantes tradicionales porque tiene un índice glucémico bajo (17-27) en comparación con la miel y la sacarosa (IG 55 y 68 respectivamente) lo cual le ha dado el status de ser un producto vegano (25). Por otra parte la norma oficial mexicana relativa a las características de sanidad, calidad agroalimentaria, autenticidad, etiquetado y evaluación de la conformidad del jarabe de agave (NOM-003-SAGARPA-2016), propone esta definición de jarabe de agave como una “sustancia dulce natural producida por hidrólisis de los frútanos provenientes de la planta del agave”, que tiene el doble de poder edulcorante que el azúcar común gracias a su composición, que es principalmente fructosa y dextrosa o glucosa (26).

El jarabe de agave también contiene otros compuestos los cuales se observan en la Tabla 3, se muestran los resultados de la composición fisicoquímica del jarabe de agave realizado en el estado de Hidalgo.

**Tabla 3.** Parámetros experimentales de jarabe de agave del estado de Hidalgo

<b>pH</b>	7.31
<b>Acidez (%)</b>	0.05
<b>Sólidos solubles totales °Bx</b>	63.33
<b>Índice de Refracción</b>	1.34
<b>Proteína (%)</b>	3.07
<b>A.R. totales (%)</b>	59.55
<b>Capacidad antioxidante ABTS</b>	21.36
<b>(<math>\mu</math>mol de equivalente de Trolox/g)</b>	
<b>Fenoles (mg AG/g)</b>	19.32
<b>Color <i>L</i>*</b>	13.03
<b>Color <i>a</i>*</b>	18.33
<b>Color <i>b</i>*</b>	7.80

Fuente modificada de: Espindola-Sotro et al. (21)

La composición fisicoquímica del jarabe de agave es: Humedad 24-26%, carbohidratos totales 99.9 g, proteína 0.50 mg/100g también se pueden encontrar minerales como el

potasio, calcio, y magnesio. Este producto tiene un pH que va de 4 a 4.5 y puede tener una densidad de 1.39g/mL (27).

La miel o jarabe de agave se elabora a partir de la obtención de la savia de agave (aguamiel) mediante hidrólisis enzimática, tratando de preservar la transferencia de nutrientes de la planta a la savia, principalmente los fructano (23), las sustancias dulces naturales que se producen cuando los pinos de agave son sometidos a un proceso hidrolítico de frútanos para desplegar polisacáridos llamados agavinas que son polímeros de fructosa que generan la dulzura (28). Algunos estudios han estandarizado la obtención de jarabe de agave realizando una hidrólisis térmica, donde se somete a la materia prima a diferentes temperaturas y tiempos que pueden ser a los 65°C a 60 minutos o 85°C a 120 minutos (29), otros han concentrado el aguamiel con estufa de vacío (24 atm y 60°C) o con parrilla en agitación a una temperatura de 70°C para alcanzar 60 °Bx (27). De manera industrial el jarabe de agave se obtiene cuando la planta tiene 6 años de vida como mínimo y es cosechada a mano, posteriormente se realizan diversos pasos pero en la hidrólisis térmica se trabaja con temperaturas de 80°C (25). Los jarabes de agave están ganando popularidad como nuevos edulcorantes naturales, este producto se utiliza como sustituto del azúcar ya que tiene un bajo índice glucémico, capacidad antioxidante (baja), incluso propiedades antibacterianas (30,31).

### *2.1.3 Índice glucémico en alimentos*

La composición de los jarabes de agave les confiere un IG bajo ya que sus principales compuestos son la fructosa, seguido de glucosa y con trazas de sacarosa (28). El “índice glucémico” es una propiedad de un alimento que se evalúa con el uso de sujetos humanos (32), este mide la velocidad con que un alimento que contiene carbohidratos eleva el nivel de glucosa en la sangre. También se puede utilizar como un sistema de clasificación de los alimentos que contienen carbohidratos, esta medida nos indicara la calidad de los carbohidratos basada en su efecto directo sobre los niveles de glucosa en sangre durante 2 horas después de la ingesta del producto. Se utiliza como punto de referencia la glucosa, con IG igual a 100 (33,34).

La determinación y clasificación del IG de un producto alimenticio ahora está estandarizada por la Organización Internacional de Normalización, también nos ayuda a comparar la naturaleza glucémica del carbohidrato en diferentes alimentos con uno de referencia (32).

Existen tablas confiables de IG que se realizan a partir de la literatura científica. Las tablas internacionales de IG enumeran la miel con un IG de 32 a 87 (referencia glucosa), dependiendo del origen botánico y contenido de fructosa (35).

#### *2.1.4. Compuestos bioactivos*

Los compuestos bioactivos de origen vegetal se han definido como compuestos químicos naturales presentes en pequeñas cantidades en las plantas con beneficios para la salud humana (36), estos compuestos también conocidos como fitoquímicos o fitonutrientes se pueden clasificar en 4 grupos de compuestos bioactivos (sustancias nitrogenadas, azufradas, terpénicas y fenólicas), estos compuestos participan en procesos biológicos de las plantas incluidos la formación de color y olor de plantas comestibles (37,38). En el agave se encuentran compuestos bioactivos como las saponinas, compuestos fenólicos y terpenos, con efectos biológicos como los antimicrobianos, antifúngicos, antioxidantes, actividad antiinflamatoria, inflamatoria, antihipertensiva, inmunomoduladora, antiparasitaria y anticancerosa (3). Algunos compuestos bioactivos que se encuentran en la miel de abeja y en el agave en sus diferentes partes de la planta se presentan en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Compuestos bioactivos importantes en la miel y el agave

*Antecedentes*

Miel de abeja			Agave ssp		
Compuesto	Nombre	Actividad biológica	Compuesto	Nombre	Actividad biológica
Flavonoide	Apigenina	Antibacteriano, antiinflamatorio	Compuestos fenólicos	Glucosidos flavonoides, proantocianinas	Estimulación de expresión de enzimas
	Acacetina	Antialérgico, contra el cáncer		Flavonoides diméricos, quercetina kaempferol	Anticancerígeno
	Quercetina	Anticancerígeno, antialérgico, antibacteriano, antiinflamatorio		Isorhamnetina Hexóxido de ácido elágico	Insecticida
	Galangina	Anticancerígeno, antioxidante		24,6-trinitrofenol Flavonoides Ácidoscarboxílicos 2-aminometil-propanol	Insecticida
	Pinocebrina	Antimicrobiano, anticáncer		Homoisoflavonoides	Antiinflamatorio
	Crisina	Antibacteriano, antiinflamatorio, anticancerígeno		Apigenina	Antifúngico
	Fisetina	Antibacteriano, antialérgico, anticancerígeno		Ácido p-cumárico	Antidiabético
	Éster Fenetílico	Antitumoral, anticáncer		Saponinas	Kammogenina

Del Ácido  
Cafeico

Luteolina	Antioxidante Antiinflamatorio antitumoral
Pinobanksina	Antioxidante
Hesperetina	Antioxidante antiinflamatorio
Naringenina	Neuroprotector antioxidante
Genisteína	Anticáncer

<b>Ácido fenólico</b>	Ácido p-Cumárico	Antigenotóxico neuroprotector
	Ácido Gálico	Antianxiolítico
	Ácido Elágico	Antioxidante Quimiopreventivo antiproliferativo
	Ácido Ferúlico	Antioxidante Antiinflamatorio

pentaglucósido,  
tetraglucósido,  
gentrogenina

Cantala-saponin-1	Antineuroinflamatorio
Glicosidos-kammogenin	Anticancerígena
Smilagenina-diglucósido	Inmunomodulador Antiinflamatoria
Saponinas esteroideas glicosiladas	Citotóxico
Saponinas esteroidea- hexaglicosilada	Antiulcerogénico
B-sitosterol-hglucósido	Inmunomodulador
Cicloartenol	antiinflamatorio

	neuroprotector
Ácido Siríngico	Antioxidante
	anticancerígeno

---

Fuente modificada de: Pasupuleti *et.al*; (39) y Bermúdez-Bazán *et. al*;(40)

## 2.2 Antecedentes del problema

El interés de la elaboración del jarabe de agave se ha dado en los últimos años debido a su reporte de bajo IG, siendo una alternativa más de edulcorante natural con beneficios antioxidantes para el consumidor.

Existen tablas confiables de IG que se realizan a partir de la literatura científica, en ellas se mencionan el IG de edulcorantes naturales en especial de la miel de abeja y en menor o incluso nulo reporte de otros edulcorantes naturales. Está reportado el IG de la miel con un IG de 32 a 87 (referencia glucosa), dependiendo del origen botánico y contenido de fructosa (35). En la Tabla 5 se puede observar el IG de mieles de abeja y el de jarabe de agave, el cual puede variar dependiendo del origen botánico.

**Tabla 5.** Índice glucémico (IG) de diferentes mieles y jarabe de agave

Tipos de mieles	Evaluación de IG
Miel de cítricos	44.9
Miel de leche de algarroba	69.1
Miel de castaña	55.5
Miel de tomillo	52.6
Miel de lima	55.3
Miel de pino	58.8
Jarabe agave	17-27

Fuente: Atayoğlu *et.al* (41); Willems y Low (25)

Otro estudio similar fue realizado en Estados Unidos donde se evaluó el IG de diferentes mieles. Las muestras fueron miel de trébol (IG=69.2), tupelo (IG=74.1), algodón (IG=73.6) y trigo sarraceno (IG=73.4) (42). También se han evaluado mieles silvestres de los países de Malasia y Australia dando IG de 65 y 59 respectivamente(43). Como ya se mencionó, la composición de los jarabes de agave les confiere un IG bajo ya que sus principales compuestos son la fructosa, seguido de glucosa y con trazas de sacarosa (28), un estudio determinó el IG del jarabe de agave *salmiana* indicando un IG bajo (47.6)(44). La miel, por otro lado, al ser también un producto dulce natural, tiene una composición compleja, pero

en comparación con el azúcar (IG de 60), tiene un IG aproximado de 58 y un valor energético más bajo (45).

Los estudios revelan que la miel contiene aproximadamente 200 sustancias, en las que se encuentran compuestos que actúan como antioxidantes (vitamina C, la vitamina E, los compuestos fenólicos y las enzimas, como la catalasa y la peroxidasa) (46), mientras que en el jarabe de agave; se han reportado compuestos fitoquímicos mediante ensayos cualitativos, la presencia de saponinas, flavonoides, quinonas, glucósidos, glucósidos cardiacos, terpenoides, cumarinas y compuestos fenólicos pero aún se desconoce la concentración de cada uno de estos compuestos, estos compuestos se reportan en su totalidad en el jarabe de agave de la especie *salmiana* y en menor proporción e incluso ausentes en el jarabe de agave *tequilena* (28).

Estudios previos han medido la actividad antioxidante de mieles determinando su poder antirradical evaluado por el ensayo de eliminación de radicales DPPH<sup>+</sup> y su poder antioxidante, evaluado mediante el ensayo FRAP (47). El DPPH<sup>+</sup> es un radical libre centrado en nitrógeno inquebrantable que se ha empleado ampliamente para probar la capacidad de eliminación de radicales libres. Al evaluar el potencial de eliminación de radicales de las mieles, la actividad de eliminación de DPPH<sup>+</sup> indica una actividad antioxidante. FRAP es una prueba simple y directa que se usa ampliamente para evaluar la capacidad antioxidante; esta prueba calcula la cantidad de antioxidantes o reductores presentes en una muestra en función de su capacidad para reducir compuestos férricos (Fe<sup>3+</sup>) a ferrosos (Fe<sup>2+</sup>) (46). Un estudio caracterizó y evaluó el compuestos con capacidad antioxidante de mieles italianas mediante HPLC-UV y ensayos como DPPH y FRAP, estos autores indicaron que las mieles contienen fenoles y flavonoides como ácido gálico, ácido clorogénico, p-ácidocumárico, ácido cafeico, miricetina, quercetina, genisteína, kaempferon, apigenina, crisina y galangin, los autores mencionan que los componentes caracterizados son los responsables de la actividad antioxidante de las mieles y que aún falta por caracterizar compuestos acuosos y lipofílicos como ascorbato, alfa-tocoferol y carotenoides que se han reportado en las mieles y que también ejercen una actividad antioxidante (48).

Se ha reportado que un alimento con altas concentraciones de azúcares y compuestos fitoquímicos, como es la miel de abeja o la savia concentrada del agave (jarabe de agave), muestran capacidad antioxidante y ésta va aumentando durante su almacenamiento debido a la liberación de diversos compuestos (19,49). La evaluación de la capacidad antioxidante en mieles se ha reportado, mostrando que en la miel de acacia tiene un porcentaje de 62.17% en DPPH<sup>+</sup> y un rango de 193.31 a 379.53  $\mu\text{M Fe (II)}/100\text{ g}$  (46), en otro estudio donde se evaluaron diferentes mieles de Malasia encontraron que la miel de Tualang presentó un porcentaje de 59.89% en DPPH<sup>+</sup> y 576.91  $\mu\text{M Fe (II)}/100\text{ g}$  (50). También en Turquía se evaluaron diferentes tipos de mieles mostrando un rango entre 0.64 a 4.30  $\mu\text{M Fe (II)}/100$  con una actividad de DPPH<sup>+</sup> de 12.56 a 152.40 mg/mL(51). A pesar de la forma de elaboración del jarabe de agave, el cual implica altas temperaturas y tiempos prolongados, se han reportado una actividad antioxidante, un estudio indicó que la mayor capacidad antioxidante de edulcorantes naturales fue del jarabe de agave de la especie *salmiana* con un promedio de inhibición de radical libre del 28.33%, en jarabe de agave *tequilana* del 23.56%, para miel de abeja del 24.16% y jarabe de maíz del 8.6% (28). Otro estudio evaluó la capacidad antioxidante de 3 concentrados de savia de agave *salmiana* (jarabe de agave) realizados de manera artesanal obtenidos en tiendas de Monterrey, México, teniendo concentraciones de 12.7 a 18.9 ET  $\mu\text{mol/g}$  (peso seco) (19). Un estudio evaluó la capacidad antioxidante de extractos de hojas de agave *atrovirens*, el cual fue concentrado con un rotovapor a 65°C y una presión de 0.6 a 0.7 Bar, hasta llegar a una concentración de sólidos solubles totales de 20°Bx, este estudio demostró que compuestos fenólicos o saponinas e incluso la actividad antioxidante sufrían un cambio mínimo por el proceso al que fue sometido el extracto de hojas del agave, concluyendo que las hojas del agave para la elaboración de jarabes mediante evaporación rotatoria al vacío podría ser una alternativa más de edulcorante natural (52).

### 2.3 Planteamiento del problema

Los carbohidratos han tenido principal atención en el sector salud, debido a su asociación con ciertas enfermedades (53), sin embargo, diferentes tipos de carbohidratos producen respuestas glucémicas e insulínicas variables, un ejemplo son los carbohidratos de absorción lenta (disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos), los cuales producen efectos

benéficos sobre el control de glucosa, la hiperinsulinemia, la resistencia a la insulina, los lípidos en sangre y la saciedad (54,55).

México se ha convertido en uno de los principales países consumidores de edulcorantes ocupado el 6° lugar a escala mundial en consumo de azúcar (56,57), debido a esto hoy en día se buscan alternativas de endulzantes naturales para la sustitución de azúcar, un ejemplo claro es la miel, un alimento nutricional que tiene un IG bajo (50-60) (debido a sus composición principal de fructosa y glucosa (58–60). Otro ejemplo es el jarabe de arce también es considerado un endulzante natural con un IG menor a la sacarosa (54) (61,62).

En la actualidad existen otras opciones de edulcorante como el néctar, jarabe o miel de agave, el cual es un edulcorante rico en fructosa que es extraído de una planta llamada maguey y contiene un IG bajo comparándolo con el azúcar refinado (63,64). La elaboración de estos productos se realiza de manera artesanal o industria con tiempos prolongados y altas temperaturas (80-90°C) para la concentración de la savia, lo cual afecta la composición de la materia prima y sus compuestos bioactivos como saponinas, terpenoides, flavonoides y taninos, los cuales se han reportado en el agave (19,25,28), sin embargo, existen estudios donde observan beneficios de estos jarabes. Hooshmand *et. al*, realizaron un estudio donde comparan el efecto del néctar de agave y la sacarosa en ratones, observando una mejora en el incremento del peso, el peso de la almohadilla grasa, la glucosa plasmática e insulina (63). Otras de las aplicaciones de este producto es como sustituto de sacarosa en productos de panificación como pasteles sin gluten o barras de cereal (65,66). El jarabe de agave no solo proporciona dulzor, sino que también, compuestos bioactivos que son benéficos para el consumidor (19,44). Estudios indican que los alimentos con IG bajo tienden a ser más saludables, permitiendo al consumidor disfrutar del sabor dulces de productos alimenticios, debido a su lenta liberación de glucosa manteniendo niveles séricos bajos (67). Por ello, se propuso obtener un edulcorante o jarabe natural a partir de aguamiel, mediante evaporación rotatoria al vacío, con un IG bajo y con un aporte de antioxidantes.

### III. JUSTIFICACIÓN

Hidalgo cuenta con la mayor producción nacional de pulque (78.14 %), extraído del agave pulquero o también llamado maguey, (68), esto indica que el aguamiel; la materia prima para la elaboración de esta bebida, se encuentra disponible para ser utilizada en la elaboración de mieles o jarabes de agave, debido a que es un líquido compuesto principalmente por azúcares (69), no obstante también del maguey se pueden obtener otros productos como el gusano de maguey (blanco y rojo), ixtle, pulque y curados (70).

Hoy en día, en México, existen una gran variedad de jarabes de agave en el mercado, pero estos son elaborados a partir del *Agave tequilana* y en menor proporción de agaves pulqueros mediante métodos artesanales (calentamiento directo de la savia), semiindustriales o industriales (hidrólisis enzimática o térmica, seguido de una evaporación) (25,71), estos procesos utilizan una alta temperatura y un tiempo prolongado a la explosión calórica, alterando las características de la savia como lo son sus compuestos bioactivos (4,72). Por otro lado, es de conocimiento que, en la miel o jarabes de agave (endulzantes naturales) no solo existen mono y oligosacáridos, sino también otros compuestos bioactivos, como fenólicos, flavonoides, ácidos orgánicos, derivados de carotenoides, metabolitos de óxido nítrico (NO), ácido ascórbico, productos de la reacción de Maillard, compuestos aromáticos, oligoelementos, vitaminas, aminoácidos y proteínas, y existe evidencia sobre los beneficios en la salud al consumirla aumentando los antioxidantes plasmáticos y mejorado el estrés oxidativo en los tejidos (28,73).

Por lo anterior, se propone obtener un jarabe, que es un subproducto a partir de aguamiel de agave pulquero, mediante evaporación rotatoria al vacío (método no convencional) que preserva y evita las pérdidas de compuestos bioactivos, debido al uso de bajas temperaturas y tiempos cortos de concentración de la savia del agave. Esta endulzante natural coadyuva a disminuir el consumo de edulcorantes calóricos y no calóricos con alto contenido de glucosa, siendo una alternativa de endulzante natural con un IG bajo y beneficios adicionales como vitaminas, minerales e incluso antioxidantes.

## IV. HIPÓTESIS

La concentración de aguamiel, para la producción de jarabe de agave, a través de evaporación rotatoria al vacío, mejorará las propiedades fisicoquímicas y comportamiento reológico, conservando la calidad nutrimental y funcional de sus componentes bioactivos, obteniendo un edulcorante natural con un IG bajo.

## V. OBJETIVOS

### 5.1 *Objetivo General*

Optimizar las condiciones de obtención de jarabe de agave por evaporación rotatoria al vacío utilizando un diseño de superficie de respuesta (Box-Behnken) para la obtención de un endulzante natural con un bajo IG.

### 5.2 *Objetivos Específicos*

1. Optimizar el proceso de obtención de jarabe de agave por evaporación rotatoria al vacío aplicando un diseño de experimentos de tipo Box-Behnken.
2. Evaluar la vida útil del producto mediante parámetros fisicoquímicos que permitan determinar su estabilidad durante un tiempo determinado
3. Evaluar parámetros fisicoquímicos, reológicos y actividad antioxidante del producto que permitan definir su calidad, así como su comparación con productos comerciales similares.
4. Estimar el índice glucémico del jarabe agave mediante un ensayo *in vitro* para clasificar al producto en base al IG.

## VI MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Tipo y diseño de estudio

El estudio realizado fue del tipo experimental, cuantitativo y longitudinal.

### 6.2 Selección de la muestra, criterios de inclusión y exclusión

Criterios de inclusión:

1. Aguamiel de agave pulquero de la especie *salmiana ssp. Xamini*
2. Contenido de SST de 11°Bx
3. Edad mínima de la planta de 8 a 10 años

Criterios de exclusión:

1. Aguamiel en proceso de fermentación
2. Aguamiel con un contenido menor a 11°Bx
3. Adulteración con agua o azúcar añadida
4. Savia de agaves de otras especies

### 6.3 Tamaño de muestra y muestreo

Las muestras de aguamiel se obtuvieron de agaves pulqueros (*Agave salmiana ssp. Xamini*) de San Agustín Tlaxiaca, Hidalgo, a primeras horas del día con el fin de preservar la muestra. El aguamiel se recolectó con ayuda de un cultivador (Tlachiquero) en frascos de vidrio estériles (1 L). Las recolectas de materia prima, la cual solo se realizó, para la elaboración de la superficie de respuesta, se tomó a partir de diferentes platas seleccionadas al azar por el mismo cultivador de agave en el mes de septiembre del 2021 debido a que estas plantas se encontraban bajo explotación comercial.

Las muestras de jarabe comerciales se adquirieron en centros comerciales o tiendas locales de los estados de Hidalgo y Puebla.

### 6.4 Definición de variables (dependientes, independientes)

Las definiciones de las variables se presentan en la Tabla 6

**Tabla 6.** Definición de variables independientes y dependientes

Variable	Definición	Dimensiones	Indicadores	Escala e instrumento
<b>Independientes</b>				
<b>Aguamiel</b>	Savia que contiene el cogollo de las plantas conocidas como maguey; pertenecientes a la familia de los agaves, especialmente de los magueyes pulqueros	Recolección	Litros y calidad	Escala valorativa (%) Probeta
<b>Jarabe de agave</b>	Es el Jarabe producido por hidrólisis a partir de los frútanos provenientes del agave.	Elaboración	Litros y calidad	Escala valorativa (%)
<b>Dependientes</b>				
<b>Viscosidad</b>	Medida de su resistencia a las deformaciones graduales producidas por tensiones cortantes o tensiones de tracción	Medición	Tipo de jarabe según su alto, medio o baja viscosidad	mPas o cP Viscosímetro
<b>Humedad</b>	pérdida de peso que sufre la muestra por calentamiento hasta obtener peso constante	Medición	Nos indica la cantidad de agua que tienen el jarabe	% Estufa
<b>pH</b>	Concentración de hidrogeniones en un alimento	Medición Escala	pH de la miel que oscila entre 4 a 6	Escala de 0-14 Potenciómetro
<b>Acidez</b>	Representa a los ácidos orgánicos libres y se mide con su neutralización a partir de una solución base	Medición Escala	Medición de acidez que presenta el jarabe de agave	Gramos de NaOH/g de muestra Titulación
<b>SST (°Bx)</b>	Unidad que sirve para determinar el cociente total de materia seca disuelta en un líquido	Medición Escala	Solutos totales del jarabe entre 60 a 90°Brix	°Bx Refractómetro
<b>Color</b>	modelo cromático usado normalmente para describir todos los colores que puede percibir el ojo humano	Medición	Qué tipo de color tienen la miel (desde oscura hasta clara)	L* a* b* Colorímetro
<b>Azúcares reductores</b>	son aquellos azúcares que poseen su grupo carbonilo intacto, y que a través del mismo pueden reaccionar como reductores con otras moléculas que actuarán como oxidantes.	Medición	Conocer la cantidad de azúcares reductores que pueda contener el jarabe	g/100 g Espectrofotómetro
<b>Azúcares totales</b>	Los azúcares son la forma más simple de	Medición		g/100 g

	carbohidratos. Están compuestos por átomos de oxígeno (O), carbono (C) e hidrógeno (H)			Espectrofotómetro
<b>Sacarosa*</b>	Azúcar que se encuentra en el jugo de muchas plantas y se extrae especialmente de la caña dulce y de la remolacha; se emplea en alimentación como edulcorante nutritivo y sus ésteres como aditivos.	Medición	Conocer las muestras son adulteradas	* Espectrofotómetro
<b>Hidroximetil furfural</b>	Es un aldehído y un furano formado durante la descomposición térmica de los glúcidos	Medición	Verificación de la temperatura de elaboración	Cromatógrafo
<b>Cenizas</b>	incineración de la muestra a 600 °C para quemar todo el material orgánico, al material inorgánico no destruido se le llama ceniza	Medición	Determinar la cantidad de minerales que contiene el jarabe	% Mufla
<b>Proteínas</b>	Micro-Kjeldahl Método basado en la oxidación	Medición	Determinación de proteína bruta	% Kjeldahl (Digestión, destilación y titulación)
<b>Carbohidratos</b>	son biomoléculas compuestas principalmente de carbono, hidrógeno y oxígeno, aunque algunos de ellos también contienen otros bioelementos tales como nitrógeno, azufre y fósforo.	Medición	Conocer la cantidad de carbohidratos presentes en el jarabe	Por diferencia*
<b>Actividad antioxidante</b>	Es la capacidad de una sustancia para inhibir la degradación oxidativa	Medición	Conocer la cantidad de antioxidantes que contiene el jarabe	Fenoles, flavonoides, FRAP, DPPH ABTS
<b>Contenido de fenoles totales</b>	Son compuestos orgánicos en cuyas estructuras moleculares contienen al menos un grupo fenol, un anillo aromático unido a un grupo hidroxilo	medición	Conocer si la muestra de jarabe contiene fenoles	Mg EAG/mL
<b>FRAP</b>	Radical libre que mide la habilidad de reducir el ion férrico a complejo ferroso	Medición	Conocer la actividad antioxidante del jarabe	mmol Fe (II) /100 g
<b>DPPH</b>	Radical libre que reacciona con compuestos lipófilos.	Medición	Conocer la actividad antioxidante del jarabe	mg ET/100 g
<b>ABTS</b>	Radical libre que reacciona con compuestos	Medición	Conocer la actividad	mg EAA/100 g

	hidrófilos y lipófilos.		antioxidante del jarabe	
<b>Vida útil</b>	Período de uso en servicio. Se ha definido como "la vida útil total de un producto en uso desde el punto de venta hasta el punto de descarte" y se distingue de la vida de reemplazo"	Determinación	Conocer cuál es la viabilidad del producto	
<b>Índice Glucémico</b>	Sistema para cuantificar la respuesta glucémica de un alimento que contiene la misma cantidad de carbohidratos que un alimento de referencia	Determinación	Verificar si el índice glucémico del jarabe es medio a bajo	Tiempo

### 6.5 Diagrama de la metodología experimental

La metodología general empleada para el desarrollo de este proyecto se muestra en la Figura 3. Comenzando con una recolección de la materia prima (aguamiel) a primeras horas del día y trasportándola en hielera con el fin de evitar su fermentación, posteriormente se realizó un pretratamiento (centrifugación y pasteurización) del aguamiel para poder ser utilizada en la elaboración de los diferentes jarabes por rotavapor de acuerdo con las diferentes combinaciones de temperatura y vacío que indicó el diseño experimental Box-Behnken. Una vez analizado las diferentes superficies de respuesta se determinó la condición óptima para la obtención de un jarabe de agave la cual se analizó y comparo con otros productos comerciales similares a la muestra. El jarabe de agave obtenido se monitoreo para conocer su vida útil y finalmente se le determino el índice glucémico *in vitro*.

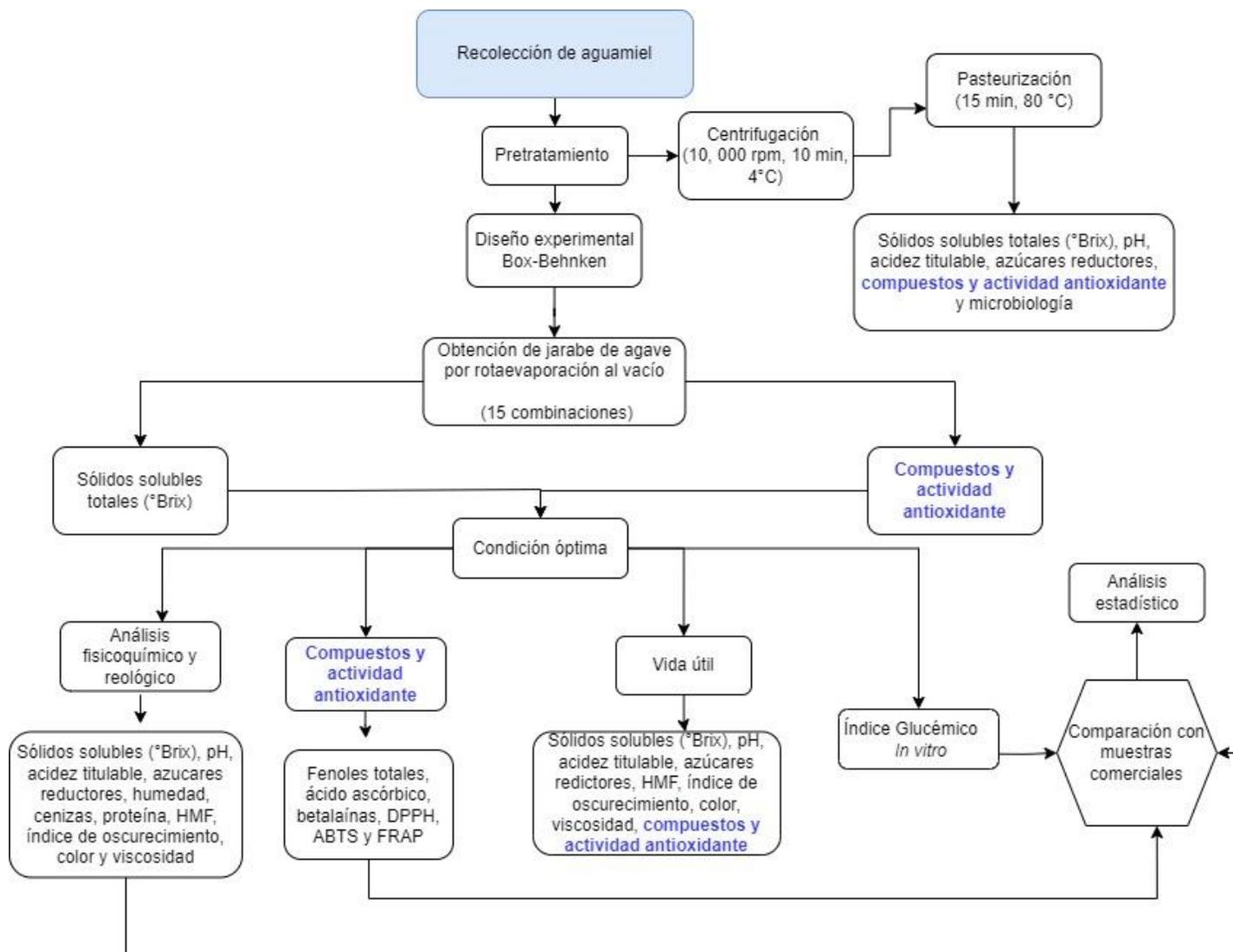


Figura 3. Metodología experimental

## 6.6 Instrumentos de recolección

### 6.6.1 Pretratamiento de materia prima (aguamiel)

Una vez recolectada el aguamiel se sometió a centrifugación a 7000 rpm por 10 minutos a 4 °C en una centrifuga refrigerada (Beckman Culter ® modelo Allegra 25R) con el fin de eliminar partículas contaminantes del aguamiel, seguido de un tratamiento térmico (pasteurización) a 80 °C por 15 minutos para eliminar la carga microbiana evitando la fermentación.

### 6.6.2 Análisis de la materia prima

En primer paso se analizó la materia prima para poder indicar su calidad e inocuidad para la elaboración de una superficie de respuesta que ayudó a optimizar el proceso de elaboración de jarabe de agave pulquero.

#### 6.6.2.1 Análisis microbiológico

##### **Fundamento**

Existen diferentes tipos de deterioro en los alimentos uno de ellos es a partir de los microorganismo presentes en los alimentos, pero el crecimiento o propagación se pueden parar con un proceso de esterilización parcial, que se conoce como “pasteurización” y es aplicable al vino, la cerveza, la sidra, el vinagre, la leche y un sinnúmero de otras bebidas percederas, y alimentos orgánicos (74). Debido a las propiedades en la composición de la miel, es considerada como un alimento seguro, sin embargo, puede contener una gran variedad de bacterias y en especial hongos, los cuales pueden generar infecciones en el ser humano (75).

##### **Procedimiento**

La determinación microbiológica solo se analizó a la materia prima (aguamiel) antes y durante las diferentes etapas previas a la concentración por rotavapor tomado una alícuota de 10 mL las cuales fueron colocadas en frascos previamente esterilizados, las muestras se colocaron inmediatamente en frio para evitar cualquier proceso de fermentación. Posteriormente el análisis microbiológico se realizó con la técnica de microgota (76).

Previamente se prepararon cajas de siembra con agar Recuento Total en condiciones de esterilidad. Se preparó una solución de agua peptonada de acuerdo con las indicaciones del fabricante y se colocaron 900 µL en tubos eppendorf para realizar las diluciones (-1 a -10)

de las diferentes muestras de aguamiel (sin ningún tratamiento, centrifugación y pasteurización). La caja de siembra se dividió en 4 y en cada cuadrante se inoculó 20  $\mu\text{L}$  de la muestra y se procedió a realizar la siembra con ayuda de un asa bacteriológica. Las cajas fueron incubadas (LSI-3016<sup>a</sup>, Labtech, Korea) durante 48 hr a 30°C. Transcurrido el tiempo se realizó un conteo en placa de las colonias observadas, las cuales se multiplicaron por el inverso de la dilución correspondiente, los resultados fueron calculados obteniendo el logaritmo base 10 de unidades formadoras de colonias por mililitro (log UFC/mL)

#### 6.6.2.2 Sólidos solubles totales (SST)

##### **Fundamento**

Los sólidos solubles se miden con ayuda de un refractómetro, este equipo se basa en el cambio de dirección que sufren los rayos luminosos en el límite de separación de dos medios en los cuales es distinta la velocidad de propagación y se utiliza para conocer la cantidad de azúcares de un líquido dando unidades de grados Bx (77,78)

##### **Procedimiento**

La metodología realizada fue de acuerdo con la norma NMX-F-103-1982 alimentos. Frutas y derivados. Determinación de grados brix. El refractómetro (FG-113 y ATC Portable Refractometer, Chincan) antes de ser utilizado para la lectura de las muestras se calibró con agua, posteriormente se colocaron unas gotas de aguamiel antes y después del tratamiento térmico en el refractómetro con una escala de 0 a 30 la medición se realizó por triplicado expresando los resultados como °Bx (77).

#### 6.6.2.3 pH

##### **Fundamento**

El pH es el inverso del logaritmo de la concentración de iones de Hidrógeno presentes en solución acuosa o semisólidos, el método establece el grado de acidez, neutralidad o alcalinidad de un alimento, se utiliza un electrodo de vidrio y uno de referencia a través de un aparato de pH (potenciómetro)(79).

##### **Procedimiento**

La determinación del pH se hizo utilizando un potenciómetro (Hanna Instruments, 210 ®, Rumania), después de haber sido calibrado con soluciones amortiguadoras de pH 4 y 7 a temperatura ambiente. Se colocaron 10 mL de aguamiel en vaso de precipitados y posteriormente se introdujo el electrodo para realizar la lectura por triplicado; de acuerdo con la NMX-F-317-NORMEX-2013 (79).

#### 6.6.2.4 Acidez Titulable

##### **Fundamento**

La acidez titulable es representada por los ácidos orgánicos libres y se mide con su neutralización a partir de una solución base. A partir de una solución indicadora (fenolftaleína), la cual se adiciona a la muestra, y mediante titulación con una solución base (NaOH) usada para neutralizar la sustancia, donde el punto final de la reacción lo indica la aparición de un color rosa pálido (80).

##### **Procedimiento**

Se colocó 10 mL aguamiel en un matraz Erlenmeyer con 5 gotas de solución indicadora (fenolftaleína al 1% disuelta en una solución etanoica), la neutralización se realizó con NaOH 0.1 N hasta la aparición de un color rosa. La acidez titulable se determinó por triplicado mediante el método 939.05 de la AOAC (81), expresando los resultados como mg/L.

$$Acidez\ mg/l = \frac{V \times N \times Eq}{Vm}$$

Donde:

V= volumen gastado de NaOH (mL); N= Normalidad de NaOH (0.1); Eq= Equivalentes de ácido láctico (90); Vm=Volumen de muestra (mL)

#### 6.6.2.5 Azúcares reductores (AR)

##### **Fundamento**

El método de DNS (ácido 3,5 dinitrosalicílico). Se utiliza para calcular la concentración de azúcares reductores (AR) en distintos materiales. El procedimiento se basa en una reacción redox que ocurre entre el DNS y los azúcares reductores presentes en la muestra. Cambia su coloración de amarillo-naranja a rojo. La principal ventaja es su alta sensibilidad y productividad debido a que es un método espectrofotométrico (82).

### **Procedimiento**

Se tomó 30  $\mu\text{L}$  de la muestra previamente diluida (hasta que entrara en la curva de calibración), se agregó 180  $\mu\text{L}$  del reactivo DNS, se homogenizaron con ayuda de un Vortex®, posteriormente se incubaron por 15 min  $100^{\circ}\text{C}$ , pasado el tiempo de incubación se adicionó 1230  $\mu\text{L}$  de agua, la lectura fue en un espectrofotómetro (Power WaveXs UV-Biotek, software KC Junior, USA, acoplado a PC con software Gen 0.5) a 540 nm.

La curva de calibración se realizó con glucosa a concentraciones de 0 a 1000 mg/L; siguiendo el mismo procedimiento para las muestras, la cual se muestra en el anexo A-1.

#### *6.6.2.6 Compuestos y actividad antioxidante*

La determinación de compuestos y actividad antioxidante se llevó a cabo con el fin de conocer y corroborar si ciertos compuestos de interés si se encontraban presente en la materia prima.

##### *6.6.2.6.1 Contenido de fenoles totales*

### **Fundamento**

El método de Folin-Ciocalteu se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. El reactivo de Folin-Ciocalteu contiene molibdato y tungstato sódico, que reaccionan con cualquier tipo de fenol, formando complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico (83,84).

### **Procedimiento**

Se tomó una alícuota de 100  $\mu\text{L}$  de la muestra (previamente diluida) más 500  $\mu\text{L}$  de la solución Folin-Ciocalteu (1:10), posteriormente se agregó 400  $\mu\text{L}$  de carbonato de sodio (7.5%). La muestra se incubó durante 30 min a temperatura ambiente y las muestras se leyeron en un espectrofotómetro (Power WaveXs UV-Biotek, software KC Junior, USA, acoplado a PC con software Gen 0.5) a 765 nm. los resultados se expresaron como mg EAG/100 g. Previamente se realizó una curva de calibración con ácido gálico de 0 a 300 mg/L la cual se muestra en el anexo A-2.

##### *6.6.2.6.2 Contenido de ácido ascórbico*

### **Fundamento**

La determinación espectrofotométrica se basa en la reducción por del 2,6 dicloroindofenol (DCPI), el cual va de una coloración transparente a rosado, es el método más sencillo y fiable para determinar el contenido de ácido ascórbico en alimentos (85).

### **Procedimiento**

Se preparó una solución de 2,6-Diclorofenolindofenol (DCPI) (3 mg diluido en 250 mL de agua desionizada), una solución de ácido oxálico (1g diluido en 250 mL de agua desionizada), solución de ácido ascórbico con 100 mL de la solución de ácido oxálico previamente preparada, y por último una solución amortiguadora (3 g de acetato de sodio aforada con 10 mL de ácido acético glacial y 7 mL de agua desionizada). Se tomaron 100  $\mu$ L de la muestra previamente diluida en ácido oxálico, se adición 100  $\mu$ L de la solución amortiguadora y 800  $\mu$ L de la solución CDPI. Las muestras fueron leídas en un espectrofotómetro (Power WaveXs UV-Biotek, software KC Junior, USA, acoplado a PC con software Gen 0.5) a 520 nm.

La curva estándar de ácido ascórbico fue con concentraciones de 0 a 50 mg/L (ácido ascórbico/ácido oxálico) siguiendo el mismo procedimiento que las muestras La curva de calibración se muestra en el anexo A-3.

#### *6.6.2.6.3 Contenido de betalaínas*

### **Fundamento**

Las betalaínas son pigmentos abundantes en la naturaleza, los cuales se dividen en dos grupos: betacianinas (tonalidades rojizas) y betaxantinas (tonos amarillos). Este grupo de pigmentos se encuentran involucrados para la protección contra la oxidación celular debido a su actividad antioxidante (83).

### **Procedimiento**

La cuantificación de betaxantinas y betacianinas se determinó de acuerdo con la metodología de Stintzing *et al.* (86). se tomó 1 mL de la muestra previamente diluida (1:10) y se colocó en tubos eppendorf los cuales fueron centrifugados (Grant-bio, pvc-2400L, EU) durante 10 min, se leyeron las muestras a 535 y 480 nm en un espectrómetro (Power WaveXs con un software Gen 0.5. La absorbancia obtenida se utilizó para conocer el contenido de betalaínas (CB) con la siguiente fórmula:

$$CB \left( \frac{mg}{L} \right) = \left[ \frac{A \times FD \times MW \times 1000}{e \times I} \right]$$

Donde: A= Absorbancia; FD= Factor de dilución; I= Volumen de la celda (0.316 cm<sup>3</sup>)

Para cuantificación de betacianinas y betaxantinas, se aplicaron los pesos moleculares (PM) y los coeficientes de excitación molar (e) que se muestran a continuación:

MW= 550 g/mol y e= 60,000 L/mol cm en H<sub>2</sub>O para betaninas

MW= 308 g/mol y e= 48,000 L/mol cm en H<sub>2</sub>O para betaxantinas

La determinación se realizó por triplicado indicando el contenido de betaninas y betaxantinas (mg Equivalentes/100 mL)

#### 6.6.2.6.4 Ensayo DPPH<sup>•+</sup>

##### **Fundamento**

El fundamento del método descrito por Brand Williams et al, consiste en que el radical libre estable 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH<sup>•+</sup>) tiene un electrón desapareado y la solución es de color azul-violeta, virando hacia amarillo pálido por reacción con una sustancia capturadora de radicales libres; la absorbancia es medida espectrofotométricamente. La diferencia de absorbancias, permite obtener el porcentaje de captación de radicales libres (87,88).

##### **Procedimiento**

El análisis de este ensayo fue de acuerdo a la metodología propuesta por Brand-Williams *et al.* con algunas modificaciones (89). Se pesaron 7.4 mg de DPPH<sup>•+</sup> que posteriormente se aforaron a 100 ml con etanol, se realizó una curva estándar de Trolox de 0 a 300 μmol ET/L (Anexo A-4), la finalidad de la curva fue para interpolar la absorbancia de las muestras analizadas y conocer la concentración mediante una molécula de referencia (Trolox) en el rango establecido por la metodología. Se tomó 100 μL de muestra y 500 μL de la solución de DPPH<sup>•+</sup>, las cuales se mezclaron y posteriormente se dejaron en reposo durante una hora, transcurrido el tiempo se colocaron en microplacas y se leyeron en un espectrofotómetro (Power WaveXs UV-Biotek, software KC Junior, USA, acoplado a PC con software Gen 0.5) a 515 nm. La determinación fue con las muestras previamente diluidas y expresando los resultados en mg ET/100 g.

#### 6.6.2.6.5 Ensayo ABTS<sup>•+</sup>

##### **Fundamento**

Se fundamenta en la cuantificación de la decoloración del radical ABTS<sup>•+</sup>, debido a la interacción con especies donantes de hidrógeno o de electrones, el radical catiónico ABTS<sup>•+</sup> es un cromóforo que absorbe a una longitud de onda de 734 nm y se genera por una reacción de oxidación del ABTS (2,2-azino-bis-(3-etil benzotiazolin-6-sulfonato de amonio) con persulfato de potasio) (89).

##### **Procedimiento**

Este método se llevó a cabo de acuerdo con Thaipong *et al* (88). Se realizó una solución de ABTS<sup>•+</sup> 7 mM (76.8 mg de ABTS<sup>•+</sup> diluido en 20 mL de agua desionizada), a la cual se le adicionó persulfato de potasio al 2.45 mM, (6.6 mg en 10 mL de agua) para generar una solución total 2:1; la cual se dejó en reposo y oscuridad durante 16 horas. Para la lectura de las muestras la solución se diluyó con agua hasta obtener una lectura de absorbancia  $0.7 \pm 0.1$  a 754nm. Así mismo, se elaboró una curva estándar de Trolox de 0 a 300  $\mu\text{mol ET/L}$  (anexo A-5) para interpolar la absorbancia de las muestras analizadas y conocer la concentración mediante una molécula de referencia (Trolox) en el rango establecido por la metodología.

Se tomó 60  $\mu\text{L}$  de muestra y 980  $\mu\text{L}$  de la dilución de ABTS<sup>•+</sup>, con un tiempo de reposo de 7 min, se prosiguió a la medición espectrofotométrica a 754 nm en un lector de microplacas (Power WaveXs UV-Biotek, software KC Junior, USA, acoplado a PC con software Gen 0.5) Se ejecutó la misma metodología para las muestras previamente diluidas y se expresaron los resultados en mg ET/100 g.

#### 6.6.2.6.6 Ensayo FRAP

##### **Fundamento**

Este método evalúa la capacidad antioxidante de una muestra de acuerdo a su capacidad para reducir el hierro férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) presente en un complejo con la 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) hasta la forma ferrosa ( $\text{Fe}^{2+}$ ), que presenta un máximo de absorbancia a una longitud de onda entre 590-595 nm (88).

##### **Procedimiento**

Para este ensayo, se hizo la metodología (con algunas modificaciones) de la técnica descrita por Benzie y Strain (89). Se preparó el reactivo de FRAP en una proporción 10:1:1 con 100 mL de un amortiguador de acetato 0.3 M a pH 3.6, 10 mL de TPTZ (2,4,6-tripiridil-1,3,5-triazina) a 10 mM (31.33 mg disuelto en 10 mL de HCl al 0.04 M) y 10 mL de  $\text{FeCl}_3$  a 20 mM. Para la determinación se tomaron 30  $\mu\text{L}$  de la muestra (previamente diluida), 90  $\mu\text{L}$  de agua y 900  $\mu\text{L}$  de FRAP, la mezcla resultante se homogenizó en un vórtex y posteriormente se colocaron en baño de agua a  $37^\circ\text{C}$  durante 10 minutos, transcurriendo ese tiempo las muestras se leyeron en un espectrofotómetro (Power WaveXs UV-Biotek, software KC Junior, USA, acoplado a PC con software Gen 0.5) a 593 nm, la determinación se realizó por triplicado. Se elaboró una curva estándar de sulfato ferroso en concentraciones de 0 a 50 mmol Fe (II)/L la cual se presenta en el anexo A-6, ésta curva se realizó con el fin de interpolar la absorbancia de las muestras analizadas para conocer la concentración en el rango establecido por la metodología en unidades de mmol  $\text{Fe}^{2+}$ /L.

### 6.6.3. Diseño experimental de superficie de respuesta

#### **Fundamento**

Los diseños Box-Behnken son modelos de superficie de respuestas de segundo orden que ayudan a economizar y realizar una predicción de un experimentos completamente aleatorizado (90).

#### **Procedimiento**

La elaboración de un diseño experimental de tipo Box-Behnken, fue hecho para observar el efecto sobre los compuestos antioxidantes, actividad antioxidante y la concentración de SST ( $^\circ\text{Bx}$ ) del jarabe de agave al concentrar el aguamiel mediante roto evaporación. Se consideraron 3 factores (temperatura, vacío y tiempo), con 3 valores en cada factor (bajo, central y superior) Tabla 7.

**Tabla 7** Factores y niveles aplicados en el diseño de experimentos para la obtención de jarabe de agave pulquero mediante ERV

Factores de control	Niveles seleccionados		
	-1	0	1
A Temperatura (°C)	60	65	70
B Vacío (mbar)	60	75	90
C Tiempo (min)	20	25	30

Una vez establecido los parámetros como factores y niveles de trabajo, se sometieron a análisis de regresión lineal múltiple utilizando el software estadístico Minitab 18® y se ajustaron a un modelo polinomial de segundo orden, dado en la siguiente ecuación

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2$$

Donde  $Y_i$  es la respuesta prevista,  $\beta_0$  es el coeficiente constante,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\beta_3$  son los coeficientes de regresión en sus términos lineales (temperatura, vacío y tiempo) respectivamente),  $\beta_{12}$ ,  $\beta_{13}$  y  $\beta_{23}$  es el coeficiente de interacción y  $\beta_{11}$ ,  $\beta_{22}$  y  $\beta_{33}$  son coeficientes de regresión cuadráticos, cada una de las ecuaciones de las diferentes variables respuestas se encuentran en el Anexo A-8.

Las variables de respuesta que se ajustaron al modelo matemático de superficie de respuesta (RSM, por sus siglas en inglés: Response Surface Methodology) fue la variable SST (°Bx), alcanzando  $R^2 \geq 90$  y una  $R^2_p > 70$ , de igual forma se interpretaron tras la elaboración de figuras tridimensionales y las figuras de Pareto las diferentes variables respuestas

En la Tabla 8 se muestran las 15 combinaciones que calculó el programa Minitab® para realizar la superficie de respuesta.

**Tabla 8.** Condiciones para la obtención de jarabe de agave por ERV, corridas ordenadas de manera aleatoria por el programa

<b>Orden aleatorio</b>	<b>Corrida</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Vacío (mbar)</b>	<b>Tiempo (min)</b>
14	1	65	75	27.5
4	2	70	90	27.5
3	3	60	90	27.5
13	4	65	75	27.5
9	5	65	60	25
11	6	65	60	30
15	7	65	75	27.5
5	8	60	75	25
12	9	65	90	30
2	10	70	60	27.5
7	11	60	75	30
6	12	70	75	25
8	13	70	75	30
1	14	60	60	27.5
10	15	65	90	25

#### 6.6.3.1 Sólidos solubles totales (°Bx)

De acuerdo con la metodología descrita en el apartado 6.6.2.1 utilizando un refractómetro de 30 a 80 °Bx.

#### 6.6.3.2 Compuestos y actividad antioxidante

Se realizaron las determinaciones de acuerdo con el apartado 6.6.2.5

#### 6.6.4 Evaluación vida útil

##### **Fundamento**

La vida útil de un producto es un término que tiene importancia para el consumidor y un vendedor debido a que este indica la cantidad de tiempo que un alimento puede ser guardado. Es importante mencionar que un producto alimenticio tiene una vida útil microbiológica, química, funcional y organoléptica, pues el deterioro de un alimento puede ser de diferentes maneras y ritmos (91).

##### 6.6.4.1. Diseño experimental para vida útil

Para conocer la estabilidad del producto a lo largo del tiempo se realizó una estimación de vida útil donde las muestras fueron colocadas en 2 condiciones de almacenamiento (luz y oscuridad) a temperatura ambiente durante un periodo de 90 días.

## Procedimiento

La toma de muestra del jarabe de agave obtenido por evaporación rotatoria al vacío se realizó desde el día 0 y posteriormente cada 30 días (hasta cumplir los 90 días de almacenamiento) a temperatura ambiente, con el fin de analizar su comportamiento durante su almacenamiento en los parámetros de SST (°Bx), pH, acidez titulable, indicadores de calidad, color, viscosidad, compuestos y actividad antioxidantes.

### 6.6.5 Análisis de jarabes o mieles de agave

#### 6.6.5.1 Composición fisicoquímica

La muestra óptima obtenida mediante evaporación rotatoria al vacío y las muestras de jarabes o mieles se analizaron la determinación de SST (apartado 6.6.2.1), pH (apartado 6.6.2.2) y acidez titulable (apartado 6.6.2.3). De igual forma se realizaron otras determinaciones que a continuación se presentan.

##### 6.6.5.1.1 Determinación de humedad

#### Fundamento

Todos los alimentos, cualquiera que sea el método de industrialización a que hayan sido sometidos, contienen agua en mayor o menor proporción. Las cifras de contenido en agua varían entre un 60 y un 95% en los alimentos naturales (92).

#### Procedimiento

La determinación fue con el método 925.10 de la AOAC (81). En charolas de aluminio (previamente a peso constante) se colocaron de 2 a 3 g de miel o jarabe de agave, las cuales se colocaron en un horno (Scopion Scientific, Horno Oven) a 105°C durante 4 a 6 horas. Transcurrido el tiempo se colocaron en un desecador (Bel-Artproducts, desecador TM, USA) durante 15 minutos para dejar enfriar y proseguir a su pesaje.

El porcentaje de humedad se determinará de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{Po - Pf}{m} \times 100$$

Donde:

Po= Peso de la charola con muestra antes del secado (g); Pf= Peso de la charola con muestra después del secado (g); m= peso de la muestra fresca.

#### 6.6.5.1.2 Determinación de cenizas

##### **Fundamento**

Las cenizas de un alimento son un término analítico equivalente al residuo inorgánico que queda después de calcinar la materia orgánica. Las cenizas normalmente, no son las mismas sustancias inorgánicas presentes en el alimento original, debido a las pérdidas por volatilización o a las interacciones químicas entre los constituyentes (92).

##### **Procedimiento**

La determinación aplicada fue por el método 923.03 de la AOAC (81). En crisoles de porcelana a peso constante, se colocaron de 2 a 3 g de jarabe o miel de agave, con ayuda de un mechero, dentro de una campana de extracción de humos, se realizó la calcinación de las muestras, este proceso concluyó hasta que las muestras dejaran de desprender humo. Posteriormente se incineraron colocando los crisoles en una mufla a 550°C hasta obtener un color homogéneo de las cenizas. Por último, los crisoles con la muestra calcinada fueron colocados en un desecador con el fin de bajar la temperatura y posteriormente ser pesado. El porcentaje de cenizas se determinará con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{Pf - Po}{m} \times 100$$

Donde:

Pf= Peso del crisol con la muestra después de incineración (g); Po= Peso del crisol a peso constante (g); m= peso de la muestra fresca.

#### 6.6.5.1.3 Determinación de proteína

##### **Fundamento**

El procedimiento de referencia Kjeldahl determina la materia nitrogenada total, que incluye tanto las no proteínas como las proteínas verdaderas. El método se basa en la determinación de la cantidad de Nitrógeno orgánico contenido en productos alimentarios, compromete dos pasos consecutivos: a) La descomposición de la materia orgánica bajo calentamiento en presencia de ácido sulfúrico concentrado y b) El registro de la cantidad de amoníaco obtenida de la muestra (92).

## Procedimiento

La determinación de proteína se aplicó de acuerdo al método de Kjeldahl, (método oficial de la AOAC 920.152) (81)., la cual se divide en dos etapas. En un primer paso se realizó una digestión Kjeldahl colocando 1 g de muestra, 1 tableta catalizadora (5 g  $K_2SO_4 + 0.5g CuSO_4 \times 5 H_2O$ ) y 15 mL de ácido sulfúrico concentrado en un tubo digestor los cuales se colocaron en un digestor (Gerhardt, Kjeldatherm, KB8 ) con las diferentes condiciones de tiempos y temperaturas de acuerdo con la rampa de calentamiento establecida en el equipo. Una vez concluido la digestión se colocaron los tubos en un destilador (Gerhardt, vapodest, 50 ) el cual adicionó hidróxido de sodio al 32% liberando amoníaco, el cual es disuelto en ácido bórico al 3% formando borato de amonio, el cual es valorado con ácido clorhídrico 0.098 N. El contenido de nitrógeno presente en las muestras se multiplicó por el factor de conversión (F) de 6.25 para obtener el porcentaje de proteína.

$$\% \text{ Proteína} = \% \text{ Nitrógeno} \times F$$

### 6.6.5.2 Contenido de azúcares y carbohidratos

#### 6.6.5.2.1 Azúcares reductores

La metodología se realizó de acuerdo con el apartado 6.4.2.4

#### 6.6.5.2.2 Azúcares totales y sacarosa

## Procedimiento

Se pesó 5 g de muestra y se diluyó en 50 mL de agua (1:10), posteriormente se colocó 10 mL de ácido clorhídrico (1:1), la mezcla se dejó reposar durante 18 horas a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo se añadió 5 mL NaOH 10 N y se ajustó el pH de la muestra entre 5 y 7 con una solución de NaOH 1 N, el contenido se transfirió a un matraz volumétrico de 100 mL y se aforó con agua desionizada. Se tomó una alícuota de 1 mL y se transfirió a un matraz volumétrico de 100 mL y se volvió a aforar con agua desionizada. Posteriormente se siguió el mismo procedimiento para azúcares reductores descrito en el 6.6.2.4

Para conocer la cantidad de azúcares totales y la sacarosa presentes en la muestra se realizaron los siguientes cálculos con las fórmulas:

$$\text{Sacarosa (mg/mL)} = (AR_f - AR_i) \times 0.95$$

$$\text{Azúcares Totales (mg/mL)} = \text{Sacarosa (mg/ml)} + \text{AR (mg/ml)}$$

Donde:

$\text{AR}_f$  = Azúcares reductores totales después de la inversión;  $\text{AR}_i$  = Azúcares reductores antes de la inversión

#### 6.6.5.2.3 Carbohidratos totales

##### **Fundamento**

El método de Orcinol o Bial se realiza en condiciones de temperatura y tiempo establecidos, utilizando una mezcla de ácido clorhídrico o sulfúrico, orcinol y  $\text{FeCl}_3$ . La reacción de color para medir la concentración de carbohidratos solubles por lector de placas se basa en la utilización del método colorimétrico de fenol-sulfúrico. El ácido rompe los enlaces glicosídicos y deshidrata los monosacáridos derivados de hidrolizados a furfural para la condensación con el orcinol, así como para la oxidación de los grupos carbonilos libres. Se utiliza para identificar pentosas gracias a la coloración que genera (93)

##### **Procedimiento**

Se preparó la solución de orcinol al 0.1% con ácido sulfúrico al 70% en una cama de hielo con agitación constante hasta su total solubilización del orcinol. Se tomó una alícuota de 250  $\mu\text{L}$  de la muestra previamente diluida (1:300 o 1:400) colocados en una cama de hielo para poder adicionar 1 mL de la solución de orcinol al 0.1%, posteriormente se colocaron en baño maría a 100°C durante 5 min. Las muestras se leyeron en un espectrofotómetro (Power WaveXs UV-Biotek, software KC Junior, USA, acoplado a PC con software Gen 0.5) a 420 nm.

Para la curva de calibración se realizará con glucosa a concentraciones de 0 a 120 ppm siguiendo el mismo procedimiento para las muestras la cual se muestra en el anexo A-7.

#### 6.6.5.3 Indicadores de calidad

##### 6.4.5.3.1 Determinación de hidroximetil furfural (HMF)

##### **Fundamento**

Es uno de los compuestos de importancia en mieles, formado por la degradación de los productos azucarados, en particular por deshidratación de la fructosa. Su formación, está directamente relacionada con alteraciones de color y el desarrollo de sabores y olores

extraños (94). El método espectrofotométrico utiliza dos alícuotas clarificadas de una muestra, a la cual a una de ellas se le adiciona agua y a otra bisulfito de sodio (blanco), el cual neutraliza el HMF (95).

### Procedimiento

Se prepararon las soluciones Carrez I (1.5 g ferrocianuro de potasio aforado a 10 mL con agua desionizada), Carrez II (3 g acetato de zinc aforado a 10 mL con agua desionizada) y la solución de sulfito ácido de sodio a 2%. Se tomaron 5 g de muestra y se adicionaron 25 mL de agua desionizada más 0.5 mL de la solución de carrez I (reactivos) y 0.5 mL de carrez II, se mezclaron con ayuda de un vortex, posteriormente se aforaron a 50 mL. Después las muestras fueron filtradas (despreciando los primeros 10 mL), tomando dos alícuotas de 10 mL en diferentes tubos. Al primer tubo se le adicionó 10 mL de agua y al segundo tubo 10 mL de la solución de sulfito ácido de sodio. Las muestras fueron medidas a 284 nm y 336 nm a través de un lector de microplacas (Power WaveXs UV-Biotek, software KC Junior, USA, acoplado a PC con software Gen 0.5)

La cantidad de HMF se determinó con la siguiente fórmula

$$HMF (mg/100 g) = \frac{(A1 - A2) \times F \times 5}{p}$$

Donde:

A1= Absorbancia de la muestra a 284 nm; A2= Absorbancia de la muestra a 336 nm; F= Factor de 14.97; P= Peso de la muestra g

#### 6.5.5.3.2 Determinación del índice de oscurecimiento

### Fundamento

Una de las características más importante de un producto alimenticio es el color, el cual sufre cambios por su proceso de fabricación o deterioro propio del alimento. El pardeamiento de un producto puede deberse a la parte enzimática o no enzimática (96).

### Procedimiento

La determinación se realizó mediante la metodología propuesta por Meydanv *et al.* (97) con algunas modificaciones, se realizó una dilución 1:10 de las muestras las cuales fueron centrifugadas durante 10 min a 3400 rpm en una centrifuga (Halmiton Bell ® v6500, USA) posteriormente se tomó una alícuota de 5 mL y se mezclaron con 5 mL de etanol y se

volvió a centrifugar en las mismas condiciones. Se tomó muestras del sobrenadante y se midió la absorbancia a 420 nm en un lector de microplacas (Power WaveXs UV-Biotek, software KC Junior, USA, acoplado a PC con software Gen 0.5)

#### 6.6.5.4 Color

##### **Fundamento**

En los productos alimenticios la apariencia es uno de los puntos más importantes para el consumidor, destacando el color como el atributo de mayor relevancia en la apariencia final (98).

##### **Procedimiento**

La determinación de color se realizó utilizando un colorímetro portátil (Kimble Chase, Japón) el cual se calibró de acuerdo con las indicaciones del fabricante, posteriormente se colocó aproximadamente 3 a 5 g de muestra en contenedores circulares de color blanco, la muestra fue aislada con papel film con el fin de tener una superficie más homogénea y no contaminar el lente del colorímetro. Los resultados que se obtuvieron del equipo fueron las coordenadas  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  así como C y h.

#### 6.6.5.5 Viscosidad

##### **Fundamento**

Es la propiedad de los fluidos que se caracteriza por su resistencia a flujo, debida al rozamiento entre sus moléculas. En el Sistema Internacional se mide en Pascales por segundo, pero la unidad más utilizada es el centipoise (Cps) (99,100).

##### **Procedimiento**

Se colocaron 30 mL de jarabe de agave en tubos de ensayo, la muestra se atempero a 20°C, las mediciones se realizaron con un viscosímetro (Brookfiel ® DV3T, USA) a 60 RPM con aguja LV-64 (mayor viscosidad). Los valores se expresaron en centipoises (Cps)

#### 6.6.5.6 Compuestos y actividad antioxidante

De acuerdo con lo descrito en el apartado 6.6.2.6

### 6.6.6 Índice Glucémico *in vitro*

#### Fundamento

El índice glucémico (IG) fue originalmente concebido para clasificar los alimentos ricos en carbohidratos según su impacto fisiológico sobre la glucemia postprandial. El IG se define como el efecto que tiene un CHO glucémico, en una comida determinada, sobre la glucosa sanguínea, expresado como un porcentaje del efecto provocado por una cantidad igual de glucosa u otro CHO patrón (101,102).

#### Procedimiento

El procedimiento se realizó de acuerdo a las metodologías descritas por Goñi *et al.*, Díaz-Osorio *et al.* y Aleixandre *et al.* (103–105), con algunas modificaciones. Se colocaron 500 mg de la muestra más 30 mL de la solución buffer Tris 0.1 M a un pH de 6.9, posteriormente las muestras fueron colocadas en un baño maría a 37°C y se les agregó 52 µL de  $\alpha$ -amilasa 50 U/mL. Se tomaron alícuotas de 1 mL al minuto 0, 15, 30, 60, 90, 120, 150 y 180 las cuales se colocaron en un baño maría a 100°C durante 5 min para inactivar la enzima. Las alícuotas se almacenaron en hielo hasta obtener la última muestra. A todas las alícuotas se les añadió 3 mL del buffer acetato de sodio 0.4 M pH 4.75 y 200 50 µL de amilogucosidasa 330 U/mL y se llevaron a incubar a 60 °C durante 5 min. Posteriormente se tomaron muestras y se procedió a realizar la metodología GOP-POD que indica el Fabricante. Para esta metodología se utilizó como muestra de referencia jarabe de glucosa. Los cálculos para la determinación se realizaron mediante las metodologías propuestas por Ferrer-Mairal *et al.* (106) y las anteriormente mencionadas; donde en primera instancia se calculó el porcentaje de hidrólisis (HI) y el área bajo la curva con el programa magicplot 2.5.1 (AUC) tanto de la muestra de referencia y la muestra de jarabe de agave, por último, se estimó el índice glucémico de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$eIG = 8.198 + 0.862HI$$

### 6.7 Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó un nivel de significancia de  $p < 0.05$ , con ayuda del software SPSS Statics versión 25, en él se realizaron pruebas como T-student (para comparar el valor predicho por el programa y el valor experimental) y ANOVA con prueba

post-hoc de Tukey para el análisis de los lotes de aguamiel utilizados, el análisis de la vida útil y la comparación de las propiedades fisicoquímicas con otros jarabes comerciales. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Para la realización de superficie de respuesta se utilizó el software Minitab versión 18, el cual nos indicó las diferentes combinaciones de temperatura, vacío y tiempo, al igual que las gráficas de contorno, superficie de respuesta diagramas de Pareto y ANOVA de cada variable respuesta.

## VII RESULTADOS

### 7.1 Análisis de la materia prima

#### 7.1.1 Análisis microbiológicos

La determinación del análisis microbiológico se realizó para evaluar la eficacia del pretratamiento del aguamiel en disminuir la carga microbiana, evitando el proceso de fermentación de la materia prima, esta determinación se realizó solo en un lote de aguamiel previo a la utilización del aguamiel para la elaboración de la superficie de respuesta, como se observa en la Tabla 9, la centrifugación disminuyó el contenido inicial de microorganismos de 4.91 a 3.32 log UFC/mL. Por otro lado, el tratamiento térmico eliminó el total de los microorganismos presentes en el aguamiel.

**Tabla 9.** Análisis microbiológico al aguamiel durante el pretratamiento

Tratamiento	Mesófilos aerobios (log UFC/ mL)
Aguamiel fresca (sin tratamiento)	4.91 ± 43.11
Aguamiel centrifugado	3.32 ± 14.47
Aguamiel pasteurizado	0

Resultados promedio del triplicado y desviación estándar.

#### 7.1.2 Sólidos solubles totales, pH, acidez titulable y azúcares reductores

Los resultados de SST, pH, acidez titulable y azúcares reductores de 4 lotes de aguamiel recolectada en el estado de Hidalgo se encuentran plasmados en la Tabla 10 que se muestra a continuación.

**Tabla 10.** Características fisicoquímicas del aguamiel

Determinación	Lote			
	1	2	3	4
SST (°Bx)	11.00 ± 0.10 <sup>a</sup>	11.00 ± 0.50 <sup>a</sup>	10.6 ± 0.20 <sup>a</sup>	10.20 ± 0.30 <sup>a</sup>
pH	5.05 ± 0.05 <sup>a</sup>	4.79 ± 0.01 <sup>a</sup>	4.45 ± 0.05 <sup>a</sup>	5.6 ± 0.62 <sup>a</sup>
Acidez titulable (g/L)	1.80 ± 0.05 <sup>a</sup>	1.86 ± 0.17 <sup>a</sup>	2.67 ± 0.11 <sup>c</sup>	2.36 ± 0.11 <sup>b</sup>
AR (g/100 mL)	11.04 ± 0.01 <sup>c</sup>	11.13 ± 0.03 <sup>d</sup>	10.25 ± 0.04 <sup>b</sup>	9.48 ± 0.00 <sup>a</sup>

Resultados promedio del triplicado y desviación estándar. <sup>a-d</sup> Letras superíndices diferentes en fila indican diferencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0.05$ ). SST= Sólidos solubles total, AR= Azúcares reductores.

Valores similares se observan en los resultados para SST y pH, indicando la ausencia de diferencia estadística a entre las muestras de aguamiel de los 4 lotes, obteniendo un valor de

10.2 a 11 °Bx para SST y para pH de 4.45 a 5.6. Con respecto a la acidez titulable se observó diferencia significativa, teniendo mayor acidez el aguamiel del lote 3 con un valor de  $2.67 \pm 0.11$  g/L y de menor acidez la del lote 1 con un valor de  $1.80 \pm 0.05$  g/L, esto indica que el lote 4 es 74 % más ácida el lote 1 y 2. También, en AR, indicando el aguamiel del lote 4 fue la que tuvo menor cantidad ( $p < 0.05$ ) con un valor de  $9.48 \pm 0.00$  y el lote 2 la de mayor concentración ( $11.13 \pm 0.03$ ) dando una diferencia del 14.82%.

En general, se obtuvo una relación inversa entre la acidez titulable con respecto a la concentración de AR, observando que a mayor concentración de AR menor acidez y a menor concentración mayor acidez.

### 7.1.3 Compuestos y actividad antioxidante

Los compuestos antioxidantes (fenoles totales, ácido ascórbico y betataínas) y la capacidad antioxidante realizada con los ensayos DPPH<sup>•+</sup>, ABTS<sup>•+</sup> y FRAP en los 4 lotes de aguamiel recolectada para la elaboración de la superficie de respuesta se presentan en la Tabla 11.

**Tabla 11.** Compuestos y actividades antioxidantes del aguamiel

Determinación	Lote			
	1	2	3	4
<b>Contenido de fenoles totales (mg EAG/100mL)</b>	$22.28 \pm 0.02^d$	$18.59 \pm 0.00^b$	$19.30 \pm 0.00^c$	$9.38 \pm 0.00^a$
<b>Ácido ascórbico (mg EAA/100 mL)</b>	$24.73 \pm 1.15^c$	$23.72 \pm 0.01^c$	$12.92 \pm 0.00^b$	$7.92 \pm 0.00^a$
<b>Betacianinas (mg/100mL)</b>	$0.10 \pm 0.01^a$	$0.32 \pm 0.00^a$	$0.11 \pm 0.08^a$	$0.32 \pm 0.03^a$
<b>Betaxantinas (mg/100 mL)</b>	$0.098 \pm 0.00^a$	$0.29 \pm 0.00^a$	$0.098 \pm 0.06^a$	$0.29 \pm 0.02^a$
<b>DPPH<sup>•+</sup> (mg ET/100 mL)</b>	$4.11 \pm 0.03^b$	$4.36 \pm 0.03^c$	$4.40 \pm 0.04^c$	$2.40 \pm 0.02^a$
<b>ABTS<sup>•+</sup> (mg ET/100 mL)</b>	$10.17 \pm 0.04^d$	$7.32 \pm 0.01^c$	$7.14 \pm 0.02^b$	$6.67 \pm 0.01^a$
<b>FRAP (mmol Fe<sup>2+</sup>/100 mL)</b>	$0.82 \pm 0.01^b$	$0.81 \pm 0.00^{ab}$	$0.82 \pm 0.01^{ab}$	$0.79 \pm 0.00^a$

Resultados promedio del triplicado y desviación estándar <sup>a-d</sup> Letras superíndices diferentes en fila indican diferencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0.05$ )

El lote 4 de aguamiel mostró un contenido de fenoles totales, ácido ascórbico y la actividad antioxidante menor a los demás lotes. Con respecto al contenido de fenoles totales el aguamiel que más contenía fue el lote 1 con una diferencia del 57.9% más que la del lote 4, para ácido ascórbico no se encontraron diferencia significativa en las muestras del lote 1 y 2 ( $24.07 \pm 0.00$  y  $23.71 \pm 0.02$  mg EEA/100 mL respectivamente) siendo aproximadamente

67.1% más que la del lote 4. El contenido de betalainas no mostró diferencia significativa entre los diferentes lotes de aguamiel analizados.

Con respecto a la actividad antioxidante en el ensayo DPPH<sup>•+</sup>, el lote de aguamiel que mayor actividad antioxidante mostraron fueron el 2 y 3 con una cantidad de  $4.36 \pm 0.03$  y  $4.40 \pm 0.04$  mg ET/100 mL respectivamente, se observa una diferencia del 45.45% más que el lote 4. Para el ensayo ABTS<sup>•+</sup>, el lote 1 mostró la mayor cantidad de actividad antioxidante ( $10.17 \pm 0.04$  mg ET/100 mL), por último, para el ensayo FRAP, los lotes 1, 2 y 3 de aguamiel analizada indicaron similitud en la actividad antioxidante ( $0.82 \pm 0.01$ ,  $0.81 \pm 0.0$  y  $0.82 \pm 0.01$  mmol Fe<sup>2+</sup> /100 mL respectivamente)

## 7.2 Diseño de superficie de respuesta

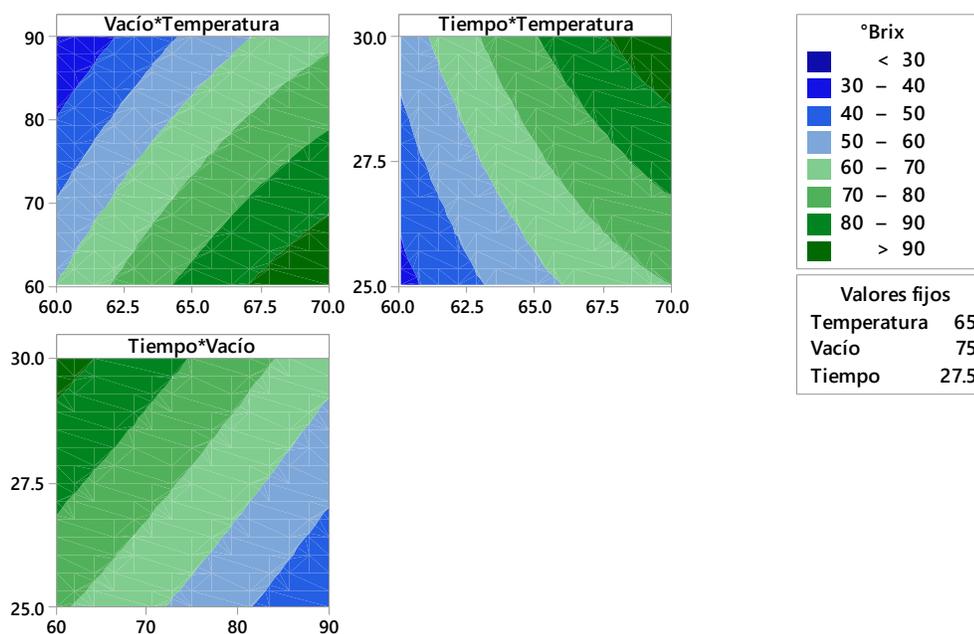
### 7.2.1 Sólidos solubles totales, compuestos y actividad antioxidante

En primera instancia, se realizó una superficie de respuesta con los 4 lotes de aguamiel descritos anteriormente, en cada lote existía diferencia estadística tanto en SST como en las diferentes determinaciones, la R<sup>2</sup> de predicción de la superficie de respuesta, de los 4 lotes de aguamiel, para SST fue de 28.88%, lo cual no fue deseable, lo que no permitió la optimización de obtención del jarabe con el valor mínimo de SST que indica la norma mexicana (74°Bx). También se observó que el valor inicial de SST del aguamiel afecta a la optimización del proceso. Por esta razón se realizó una segunda superficie de respuesta iniciando con un contenido de SST de 11 °Bx para todas las muestras de aguamiel recolectadas. Los resultados se muestran en la Tabla 12 para cada corrida realizada, al igual que sus diferentes R<sup>2</sup>.

**Tabla 12.** Resultados de las diferentes variables respuestas de acuerdo con cada corrida realizada para la obtención de jarabe de agave por ERV ordenadas de manera aleatorizadas por el programa

Orden aleatorio	Corrida	Temperatura (°C)	Vacío (mbar)	Tiempo (min)	SST (°Brix)	Fenoles (mg ET/100g)	Ácido ascorbico (mg EAA/100g)	Betacianinas mg/100 g	Betaxantinas mg/100 g	DPPH (mg ETrolox/100 g)	ABTS (mg ETrolox/100 g)	FRAP (mmol Fe (II)/100 g)
14	1	65	75	27.5	65.0	18.03	22.63	0.11	0.10	14.74	66.47	8.15
4	2	70	90	27.5	69.0	19.46	30.18	0.12	0.11	12.19	67.97	8.38
3	3	60	90	27.5	34.0	7.48	23.23	0.12	0.09	5.64	6.96	2.11
13	4	65	75	27.5	68.0	14.62	45.88	0.12	0.11	13.17	31.06	7.65
9	5	65	60	25	74.0	14.23	29.02	0.13	0.12	11.91	69.07	10.00
11	6	65	60	30	97.5	28.18	38.16	1.36	1.24	14.95	110.99	19.42
15	7	65	75	27.5	72.0	14.08	55.83	0.19	0.17	12.17	68.34	7.94
5	8	60	75	25	35.0	6.60	23.83	0.37	0.33	5.11	50.79	2.66
12	9	65	90	30	61.0	12.13	23.83	0.33	0.29	14.61	40.85	7.41
2	10	70	60	27.5	93.0	14.52	39.61	1.17	1.04	19.08	110.22	17.34
7	11	60	75	30	51.5	10.57	23.58	0.23	0.20	7.18	44.17	4.71
6	12	70	75	25	72.5	16.33	64.81	0.31	0.28	9.40	56.56	8.64
8	13	70	75	30	99.0	16.52	28.76	0.19	0.18	21.34	60.94	16.48
1	14	60	60	27.5	59.0	14.67	42.45	0.10	0.10	13.70	91.03	9.08
10	15	65	90	25	37.0	7.80	25.85	0.08	0.07	7.20	17.91	4.90
R <sup>2</sup> (%)					97.79	78.70	55.71	74.12	74.91	92.62	85.06	99.42
R <sup>2</sup> ajustado (%)					93.81	40.36	0.00	27.55	29.75	79.33	58.17	98.38
R <sup>2</sup> predicción (%)					70.24	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	91.21

Para la segunda superficie de respuesta la  $R^2$  de predicción en SST dio como resultado un 70.24% (Tabla de análisis de varianza, Diagrama de Pareto y las Gráficas de superficie de respuesta, Anexo B-1). Al analizar los resultados del análisis de varianza para la variable respuesta SST, se observa que los factores de control temperatura y vacío tienen un valor de significancia (en términos lineales) menor a  $p < 0.001$  mientras que la variable control tiempo dio una  $p < 0.05$ , estos datos nos indican que el tiempo no es un factor que dependa de las variables temperatura y vacío expresando que no existe una interacción significativa entre las 3 variables. En la Figura 4 se muestra el comportamiento de SST en las diferentes combinaciones de temperatura, vacío y tiempo.



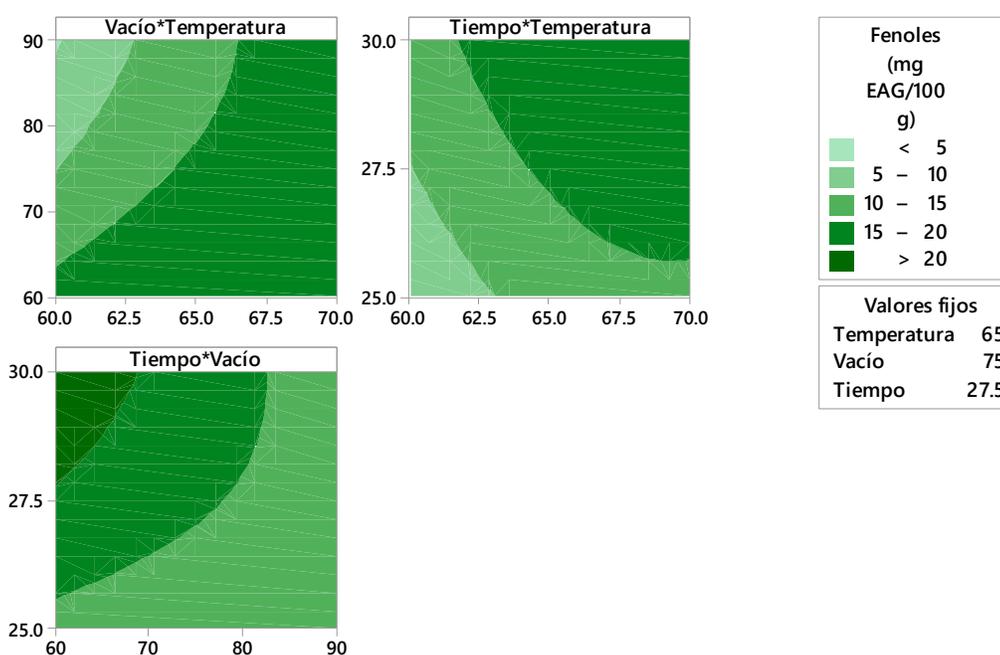
**Figura 4.** Gráficas de contorno para SST (°Bx)

El diagrama de Pareto mostró que la concentración de SST se ve afectada por los 3 factores control (Temperatura vacío y tiempo). De igual forma se observa en la Figura 4, que la mayor concentración de SST se encuentra los extremos de cada gráfico, mostrando que mayor temperatura, menor vacío y tiempos prolongados incrementan la concentración de SST.

## COMPUESTOS ANTIOXIDANTES

### A. Contenido de fenoles totales

Los compuestos fenólicos del aguamiel al ser concentrada mediante ERV con las diferentes combinaciones de temperatura vacío y tiempo, mostraron un comportamiento estable cuando se trabajaban con la temperatura máxima (70°C), una presión de vacío bajo (60 mbar) y tiempos largos de concentración (30 min), este comportamiento se puede apreciar en los extremos de las gráficas de contorno (Figura 5).



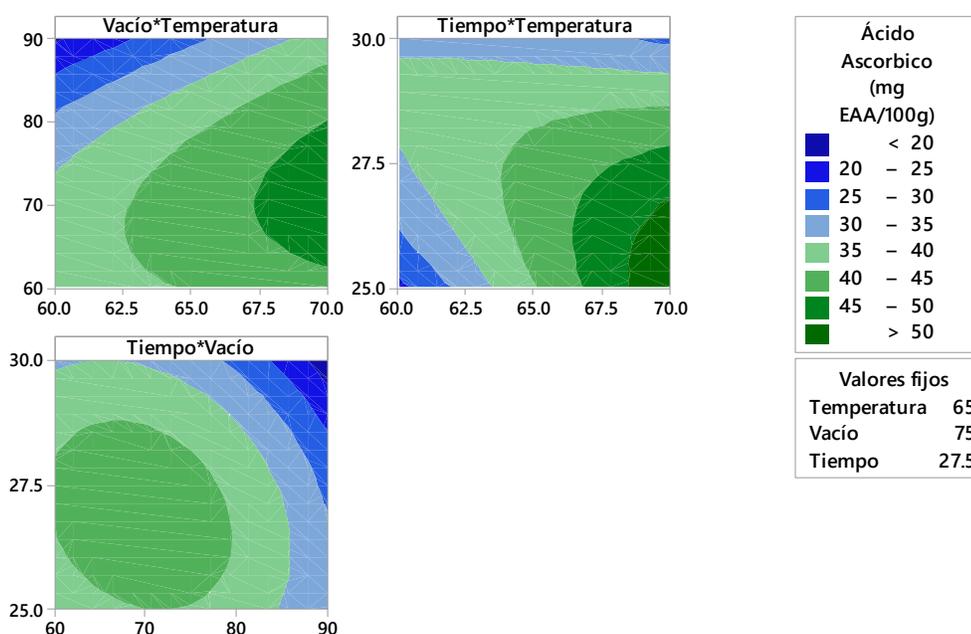
**Figura 5.** Gráficas de contorno para contenido de fenoles totales (mg EAG/100 g)

El diagrama de Pareto (Anexo B-2) revela que los factores control (temperatura, vacío y tiempo) no afectan estadísticamente esta respuesta, también se analizó en el análisis de varianza, los valores lineales, cuadrados y de interacción de los factores control, mostraron un valor de  $p > 0.05$ . Por otro lado, en la Figura 5, se expresa que la mayor concentración de estos compuestos se observa en los extremos en las combinaciones vacío-temperatura y tiempo-temperatura, este comportamiento demuestra que al trabajar presiones de vacío mayores no importa la temperatura se mantendrá una alta concentración de compuestos fenólicos, esto aunado con el tiempo, se confirma que mientras más pasa el tiempo y aumenta la temperatura, la concentración de compuestos fenólicos incrementa. Esto indica

que, a mayor temperatura, presión de vacío bajo y un tiempo prolongado incrementa la concentración de fenoles en la elaboración de jarabe pulquero.

### B. Contenido de ácido ascórbico

El comportamiento del ácido ascórbico; presente en el aguamiel, al ser concentrada mediante ERV mostró comportamientos distintos con las diferentes combinaciones de temperatura vacío y tiempo, como se observa en la Figura 6 la mayor concentración de este compuesto no se aprecia en los extremos de las gráficas.



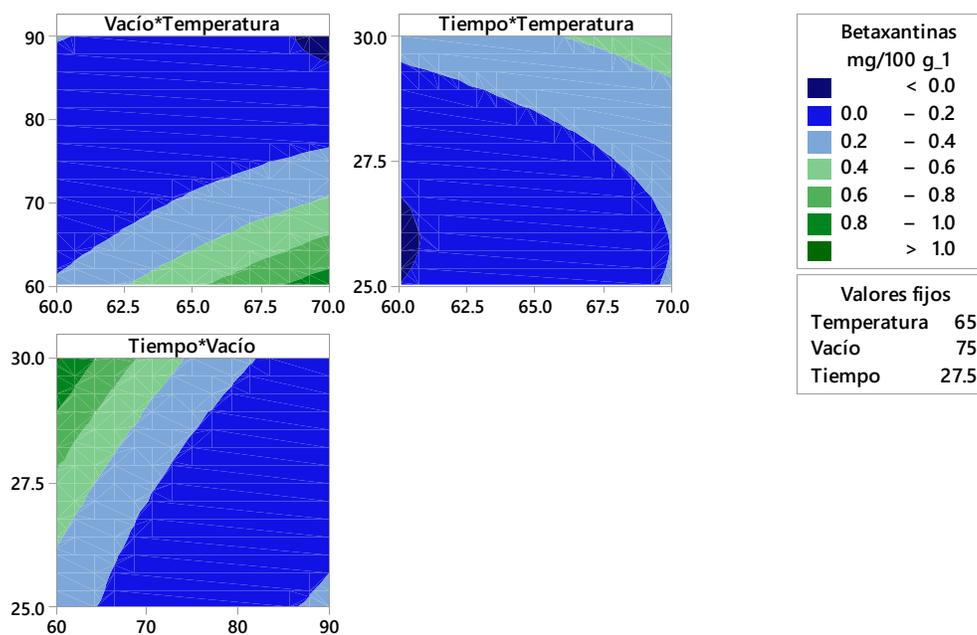
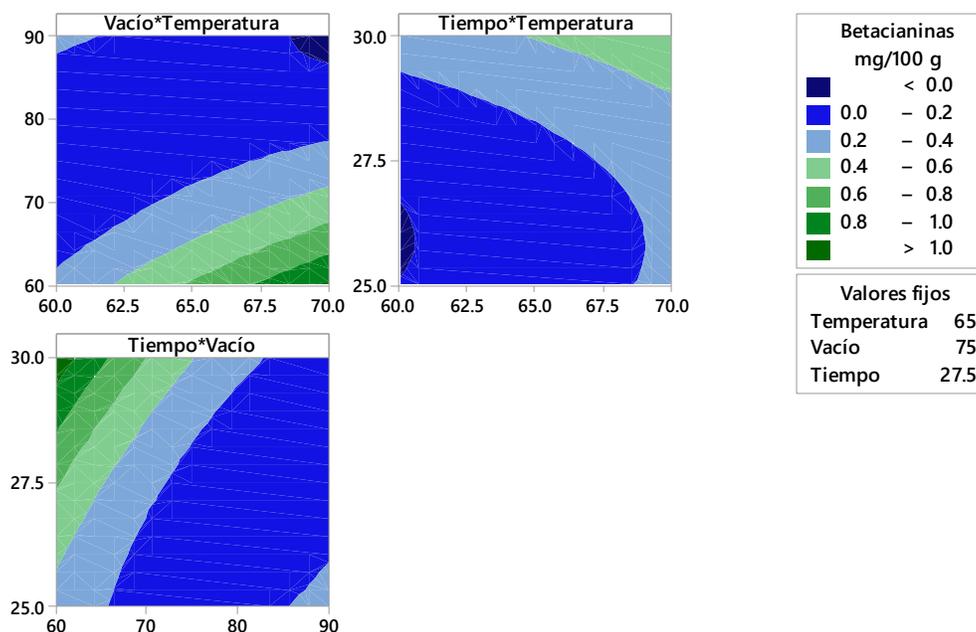
**Figura 6.** Gráficas de contorno para contenido de ácido ascórbico (mg EAA/100g)

El diagrama de Pareto (Anexo B-3) expresa que los factores control (temperatura, vacío y tiempo) no afectan estadísticamente esta respuesta, esto se puede confirmar con el análisis de varianza debido a que arrojó valores de  $p > 0.05$  en todos los factores control (manera lineal, cuadrática y en sus diferentes combinaciones). Además, se muestra en la Figura 6 que la combinación vacío-temperatura incrementa la concentración de ácido ascórbico en un rango de vacío de 60 a 80 mbar y temperaturas de 67.5 a 70°C. La combinación tiempo-temperatura indica que la mayor concentración se da cuando los tiempos son cortos (25 min) y las temperaturas altas (70°C). Con respecto a la combinación tiempo-vacío se puede observar una zona óptima con valores aproximadas 70 mbar y 26 min (circulo verde)

indicando que en esta zona se obtienen la mayor concentración de ácido ascórbico al momento de elaborar el jarabe de agave mediante ERV.

*C. Contenido de betalainas (betacianinas y betaxantinas)*

Las betacianinas y betaxantinas son compuestos que no se encuentran reportados en el aguamiel debido a esto se analizó previamente y se corroboró su presencia los diferentes jarabes obtenidos para la elaboración de la superficie de respuesta, en la Figura 7 se puede notar el comportamiento de la concentración del aguamiel mediante ERV generara jarabe de agave.



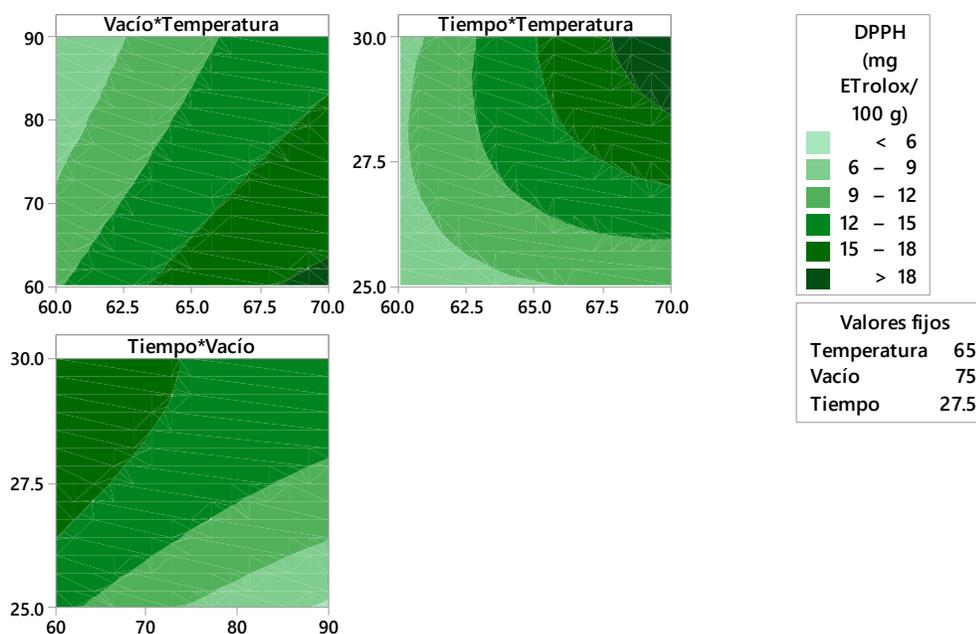
**Figura 7.** Gráficas de contorno para contenido betacianinas mg/100 g (A-Betacianinas, B-Betaxantinas)

Los diagramas de Pareto para estas dos respuestas se observan en el Anexo B-4 y B-5 enseñan que la temperatura, vacío y tiempo no afectan estadísticamente estas respuestas, y muestran un comportamiento similar al momento de la concentración del aguamiel por ERV para elaborar un jarabe. Semuestra en la Figura 7 que el contenido de estos compuestos aumenta cuando la temperatura es alta, presión de vacío baja y el tiempo es prolongando.

### ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

#### A. Ensayo DPPH

El comportamiento de la actividad antioxidantes, mediante el ensayo DPPH<sup>+</sup>, del aguamiel concentrada para obtener un jarabe mediante ERV se muestra en la Figura 8 de acuerdo con las diferentes combinaciones de temperatura, vacío y tiempo.



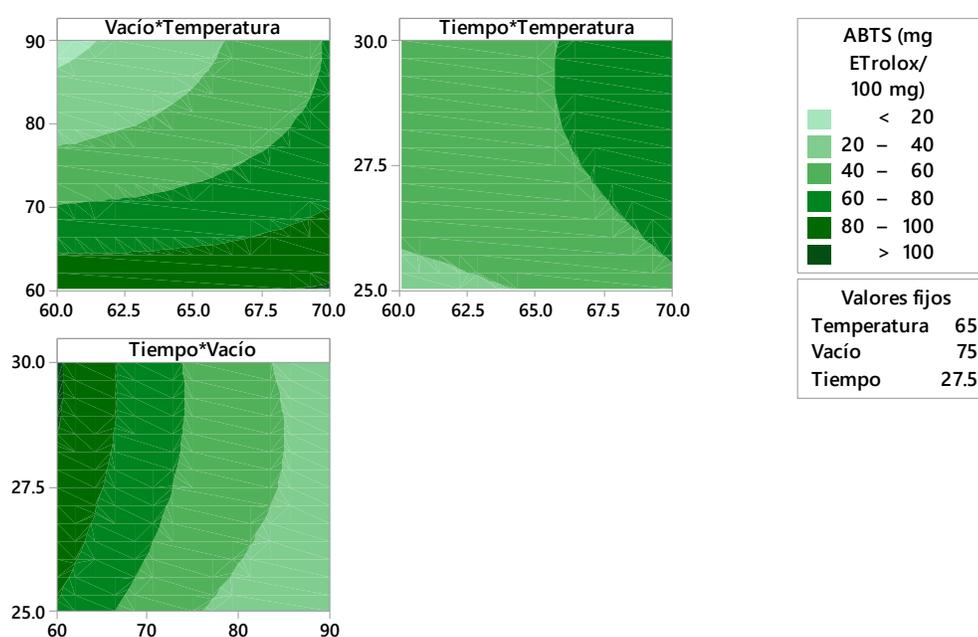
**Figura 8.** Gráficas de contorno para el ensayo DPPH<sup>+</sup>( mg ET/100g)

El diagrama de Pareto (Anexo B-6) muestra que la temperatura fue el factor con mayor relevancia para esta respuesta indicando que afecta estadísticamente, seguido del tiempo y en menor proporción el vacío, esto se corrobora con el valor de p en el análisis de varianza

(temperatura  $p < 0.005$ , tiempo  $p < 0.01$  y vacío  $p < 0.05$  esto en términos lineales). En la Figura 8, se observa que la concentración de la actividad antioxidante DPPH<sup>+</sup> aumenta cuando la temperatura es mayor, la presión de vacío es baja y el tiempo es prolongado.

### B. Ensayo ABTS<sup>+</sup>

Por otro lado, actividad antioxidante mediante el ensayo ABTS<sup>+</sup> del aguamiel concentrada para obtener un jarabe mediante ERV mostró diferentes comportamientos en las diferentes combinaciones de temperatura, vacío y tiempo, esto se observa en la Figura 9.



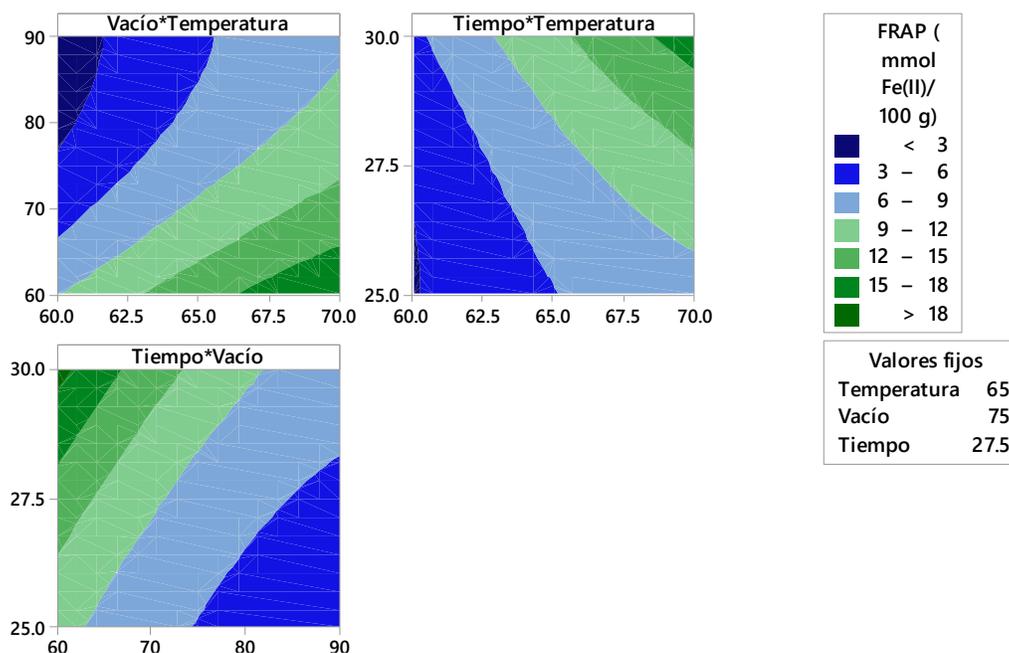
**Figura 9.** Gráficas de contorno para el ensayo ABTS<sup>+</sup> (mg ET/100g)

El diagrama de Pareto y en el análisis de varianza (Anexo B-7) para esta variable respuesta, mostró que el único factor control que afectó estadísticamente fue el vacío, con un valor de  $p < 0.01$  mientras que la temperatura y tiempo dieron valores de  $p < 0.5$ . En la Figura 9 se observa que en la combinación vacío-temperatura, la mayor concentración de actividad antioxidante está presente cuando la presión de vacío es menor a 70 mbar no importando la temperatura. Con respecto a la combinación tiempo-temperatura, se muestra que temperaturas superiores a 65°C y tiempos mayores a 27.5 min existe una mayor concentración de esta actividad antioxidante. Por último, en la combinación tiempo-vacío

indicó que a mayor tiempo (30 min) y una presión de vacío menor (60 mbar) existió una mayor concentración de esta actividad antioxidante.

### C. Ensayo FRAP

El comportamiento de la actividad antioxidantes mediante el ensayo FRAP, en la concentración de del aguamiel para obtener un jarabe mediante evaporación al vacío, se observa en la Figura 10 con las diferentes combinaciones de temperatura, vacío y tiempo.

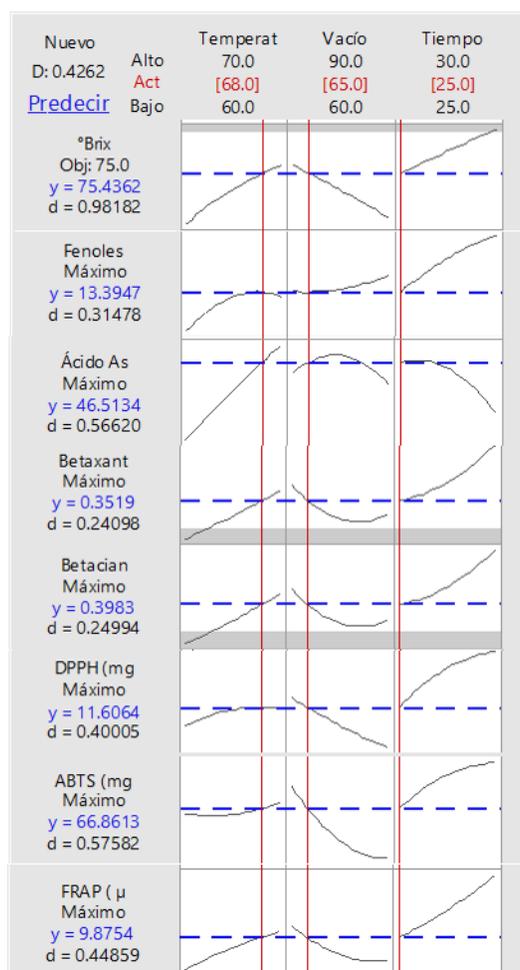


**Figura 10.** Gráficas de contorno para el ensayo FRAP (mmol Fe (II)/100 g)

Para esta variable respuesta el diagrama de Pareto muestra que los factores control y sus combinaciones afectan significativamente este resultado, esto se confirma con el valor de  $p$  de cada factor control que arroja el análisis de varianza indicando que temperatura, vacío y tiempo muestran un valor de  $p < 0.0001$  (Anexo B-8), mostrando en primer lugar al vacío, seguido de la temperatura y por último el tiempo, en cuanto a las combinaciones de estos factores afectaron significativamente vacío-vacío, vacío-tiempo y temperatura-tiempo ( $p < 0.01$ ). En la Figura 10, se muestra que, a una temperatura alta, presión de vacío bajo y tiempo prolongado incrementa la concentración de esta actividad antioxidante en la elaboración de jarabe de agave pulquero mediante ERV.

### 7.2.2 Optimización en la obtención de jarabe de agave por evaporación al vacío

La variable respuesta de mayor interés para el estudio fue la concentración de SST, con ayuda del programa Minitab se fijó a un valor a 75°Bx y maximizando las concentraciones en las demás variables respuesta (valores de y en la figura 11). El programa indicó una serie de combinaciones entre temperatura, vacío y tiempo, eligiendo la mejor combinación en el que se obtuvo los valores predichos máximos en las variables respuestas de compuestos y actividad antioxidante, siendo este de: Temperatura 68°C, Vacío 65 mbar y Tiempo 25 min (Figura 11).



**Figura 11.** Resultado de la optimización del jarabe de agave pulquero con las variables respuesta con la condición óptima y maximizando su concentración en el programa MiniTab

### 7.2.3 Reproducibilidad del estudio

Esta combinación de temperatura, vacío y tiempo se ejecutó con el fin de mantener y preservar la mayor cantidad de compuestos y actividad antioxidante, el cual se realizó por triplicado, de igual forma se determinaron las variables respuesta y se compararon con los valores predichos. En la Tabla 13 se reportan los valores predichos por el modelo de superficie de respuesta, así como los resultados obtenidos experimentalmente con la condición óptima.

**Tabla 13.** Comparación de los valores predichos por la superficie de respuesta y los obtenidos experimentalmente

Determinación	Valor predicho	Valor Experimental
Sólidos solubles totales (°Bx)	75	75.2 ± 0.90
Fenoles totales mg EAG/ 100g	13.39	14.77 ± 0.10*
Ácido ascórbico mg/100g	46.51	30.93 ± 0.004*
Betacianinas mg/100 g	0.35	0.10 ± 0.002*
Betaxantinas mg/100 g	0.39	0.10 ± 0.003*
DPPH <sup>+</sup> mg ET/100g	11.60	13.34 ± 0.05*
ABTS <sup>+</sup> mg ET/100g	66.86	28.54 ± 0.03*
FRAP mmol Fe (II)/100 g	9.87	6.16 ± 0.017*

Resultados promedio del triplicado y desviación estándar. (\*) indica diferencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0.05$ )

Se observa en la Tabla 13 que el único valor que es estadísticamente igual, y el cual se puede repetir experimentalmente, es el contenido de SST. Para la variable respuesta de Fenoles totales y actividad antioxidante DPPH<sup>+</sup> los datos obtenidos de la muestra experimental fueron mayor, mientras que para el resto de las variables respuesta los valores experimentales disminuyeron.

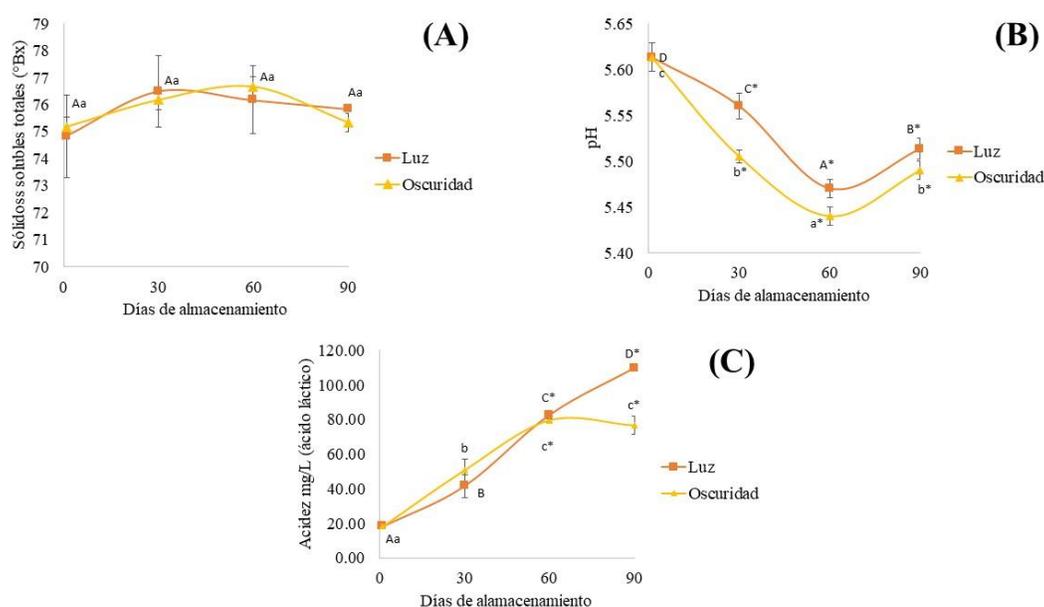
### 7.3 Evaluación vida útil

Al observar cambios fisicoquímicos en el jarabe de agave obtenido por ERV, se decidió analizar su comportamiento durante 90 días, en dos condiciones de almacenamiento (luz y oscuridad a temperatura ambiente).

#### A. Cambios fisicoquímicos

En la Figura 12 se nota el comportamiento de las determinaciones fisicoquímicas (SST, pH y acidez titulable). Para SST el comportamiento fue lineal, con un valor mínimo de 73.5 y un máximo de 77.5 teniendo una media 76 °Bx. En el parámetro pH se presentó una disminución en los primeros 60 días, teniendo el comportamiento más rápido el jarabe almacenado en oscuridad, por otro lado, a los 90 días, en ambas condiciones de almacenamiento hubo un incremento de pH.

Para el caso de acidez titulable hubo un incremento en ambas condiciones siendo más lineal la muestra almacenada en luz, en el caso de la muestra almacenada en oscuridad este incremento de acidez se detuvo a los 60 días, ya que al día 90 se mantuvo constante este valor.

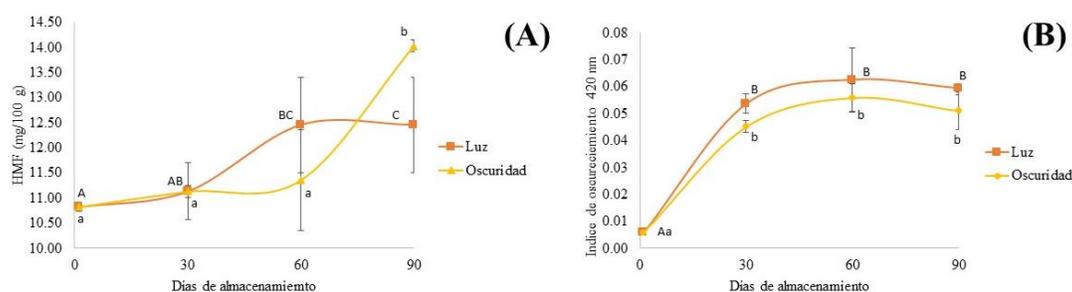


**Figura 12.** Gráficas del comportamiento de determinaciones fisicoquímicas del jarabe de agave obtenido por ERV durante 90 días de almacenamiento a temperatura ambiente y en dos condiciones (luz y oscuridad). (A) SST (°Bx), (B) pH y (C) Acidez titulable. <sup>A-D</sup> Letras diferentes indican diferencia estadística entre días de almacenamiento en luz. <sup>a-d</sup> Letras diferentes indican diferencia estadística entre días de almacenamiento en oscuridad. \* indica diferencia estadística entre grupo (luz u oscuridad)

## B. Indicadores de calidad

Se utilizaron 2 indicadores de calidad uno fue la concentración de Hidroximetilfurfural (HMF) y el otro el índice de oscurecimiento (Figura 13). Para el contenido de HMF, existió un aumento a partir del día 30 en la condición almacenada a la luz y su concentración fue igual en los días 60 y 90, mientras que la muestra almacenada en oscuridad mostró un comportamiento constante en la concentración durante los primeros 60 días y posteriormente hubo un aumento al día 90 de almacenamiento.

Con respecto al parámetro de índice de oscurecimiento, incremento exponencial en ambas condiciones de almacenamiento durante los primeros 30 días teniendo un oscurecimiento mayor la muestra almacenada en luz, pero no teniendo diferencia estadística con la muestra almacenada en oscuridad.



**Figura 13.** Gráficas del comportamiento de indicadores de calidad para el jarabe de agave obtenido por roto evaporación al vacío durante 90 días de almacenamiento a temperatura ambiente y en dos condiciones (luz y oscuridad). (A) Hidroximetilfurfural y (B) Índice de oscurecimiento. <sup>A-D</sup> Letras diferentes indican diferencia estadística entre días de almacenamiento en luz. <sup>a-d</sup> Letras diferentes indican diferencia estadística entre días de almacenamiento en oscuridad. \* indica diferencia estadística entre grupo (luz u oscuridad).

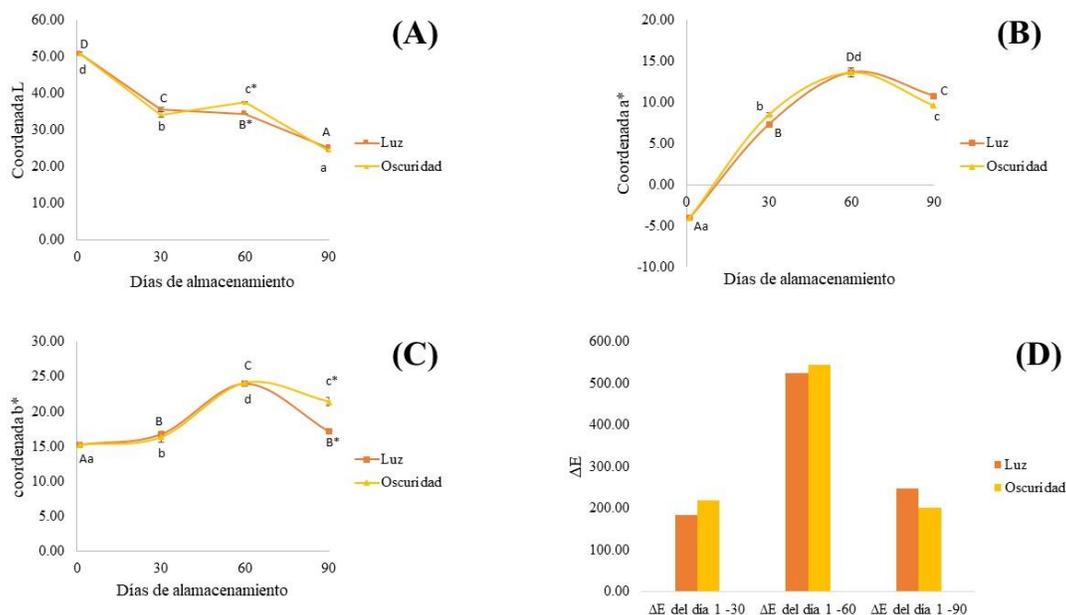
### C. Color

En la determinación de color se analizaron los valores de  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  (Figura 14). El valor de  $L^*$  está relacionado con el índice de oscurecimiento (que se mencionó anteriormente). Hubo una disminución en los valores de este parámetro para ambas muestras de jarabe de

agave almacenadas en diferentes condiciones, con un comportamiento similar en el jarabe almacenado en luz.

Para la coordenada  $b^*$ , incremento su valor a partir del día 30 y una disminución en el día 90, siendo más bajo el valor en el jarabe almacenado en luz. Para el caso de la coordenada  $a^*$  se notó un aumento constante hasta el día 60, ya que al día 90 hubo una disminución en ambas condiciones de almacenamiento.

La diferencia de color durante el almacenamiento revela que durante los diferentes días existe un cambio mayor al día 60, estos cambios se observan más en el jarabe almacenado en oscuridad, mientras que el almacenada en luz su mayor cambio fue al día 90. Las diferencias de color ( $\Delta E$ ) muestran valores altos indicando que estos cambios son perceptibles al ojo humano.

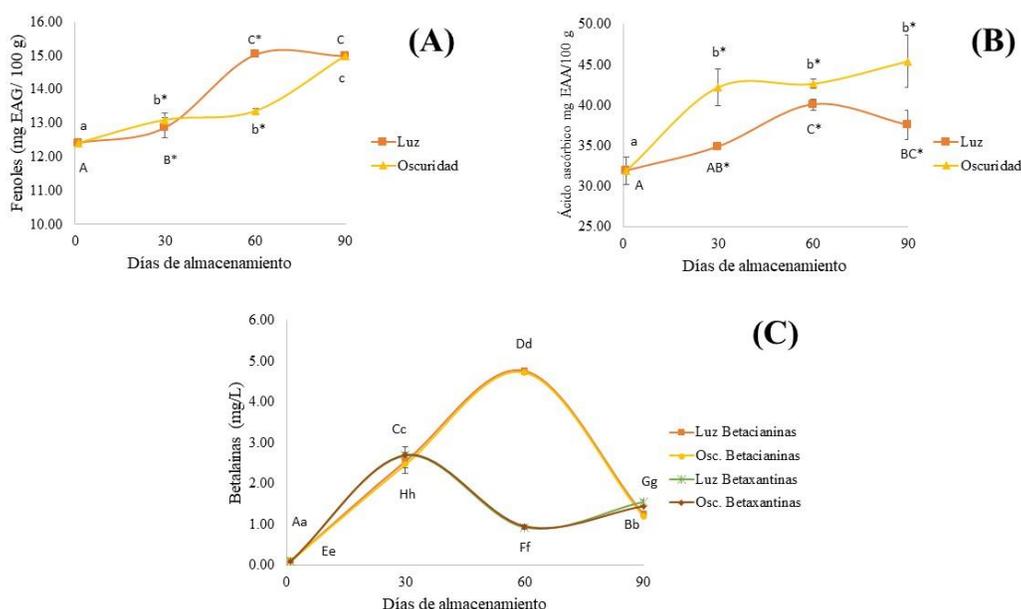


**Figura 14.** Gráficas del comportamiento en la coloración jarabe de agave obtenido por roto evaporación al vacío durante 90 días de almacenamiento a temperatura ambiente y en dos condiciones (luz y oscuridad). (A) Coordenada L, (B) Coordenada  $a^*$ , (C) Coordenada  $b^*$  y (D) deltas de diferencia de color. <sup>A-D</sup> Letras diferentes indican diferencia estadística entre días de almacenamiento en luz. <sup>a-d</sup> Letras diferentes indican diferencia estadística entre días de almacenamiento en oscuridad. \* indica diferencia estadística entre grupo (luz u oscuridad).

### D. Compuestos antioxidantes

Los compuestos antioxidantes analizados fueron el contenido de fenoles totales, el ácido ascórbico y las betalaínas (Figura 15), en el caso del contenido de fenoles totales incrementó en ambas muestras de jarabes almacenados (luz y oscuridad), pero con un comportamiento diferente para cada condición de almacenamiento. Para el ácido ascórbico hubo un aumento, siendo mayor la concentración en el jarabe de agave almacenado en oscuridad que la de luz, pero el jarabe almacenado en luz comienza un decrecimiento al día 90.

Para el contenido de betacianinas ambas condiciones tuvieron el mismo comportamiento durante los 90 días de almacenamiento teniendo un incremento al día 60 y posteriormente reduciendo su concentración al día 90. En el caso de la betaxantina de igual forma no hubo diferencia en ambas condiciones de almacenamiento, pero si en el tiempo, ya que después del día 30 se notó una disminución de su concentración.



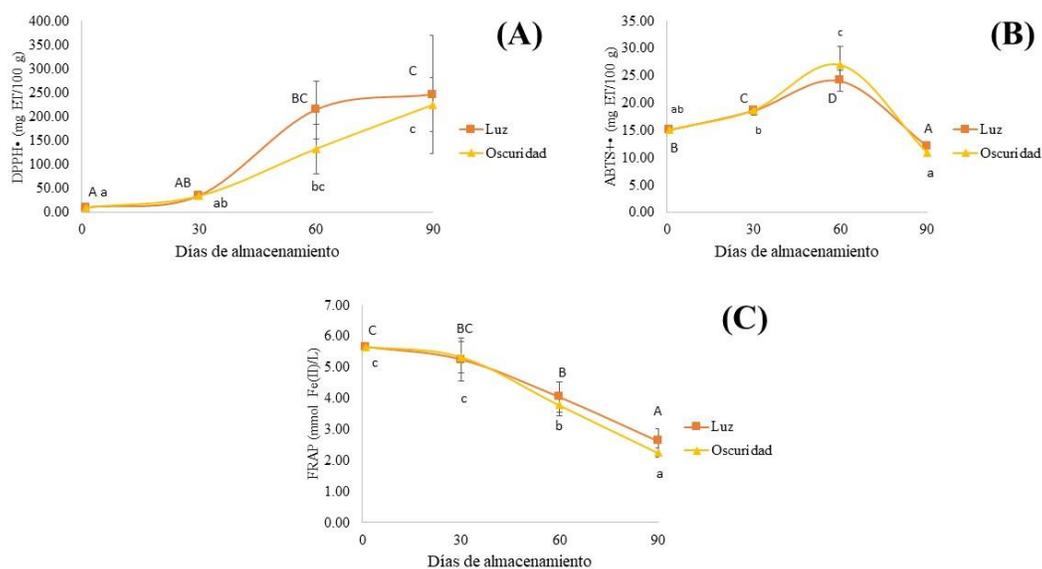
**Figura 15.** Gráficas del comportamiento en la concentración de compuestos antioxidantes del jarabe de agave obtenido por roto evaporación al vacío durante 90 días de almacenamiento a temperatura ambiente y en dos condiciones (luz y oscuridad). (A) Contenido de fenoles totales, (B) ácido ascórbico y (C) contenido de betalaínas. Letras diferentes mayúsculas <sup>A-D</sup> indican diferencia

estadística entre días de almacenamiento en luz, <sup>a-d</sup> Letras diferentes indican diferencia estadística entre días de almacenamiento en oscuridad. Nota para betalaínas: <sup>A-D</sup> letras diferentes indican diferencia estadística entre contenido de betacianinas almacenado en luz, letras diferentes minúsculas <sup>a-d</sup> indican diferencia estadística entre contenido de betacianinas almacenado en oscuridad; <sup>E-H</sup> letras diferentes indican diferencia estadística entre contenido de betaxantinas almacenado en luz; <sup>e-h</sup> letras diferentes indican diferencia estadística entre contenido de betaxantinas almacenado en oscuridad \* indica diferencia estadística entre grupo (luz u oscuridad).

### *E. Actividad antioxidante*

En el caso de la actividad antioxidante se evaluaron los ensayos DPPH<sup>+</sup>, ABTS<sup>•+</sup> y FRAP revelando los diferentes comportamientos en la Figura 16. El ensayo DPPH<sup>+</sup> mostró un incremento en la actividad antioxidante a partir del día 30 en ambas condiciones de almacenamiento (luz y oscuridad), posteriormente el jarabe almacenado en luz se mantuvo constante en los días 60 y 90, caso contrario en la muestra almacenada en oscuridad donde siempre reveló un incremento gradual.

En el ensayo ABTS<sup>•+</sup> los jarabes de agave indicaron un comportamiento similar en ambas condiciones con un incremento en los primeros 60 días y posteriormente un deceso en la concentración al día 90, en el ensayo FRAP después del día 0, las muestras mostraron un deceso exponencial en sus concentraciones en ambas condiciones de almacenamiento.



**Figura 16.** Gráficas del comportamiento en la actividad antioxidante del jarabe de agave obtenido por roto evaporación al vacío durante 90 días de almacenamiento a temperatura ambiente y en dos condiciones (luz y oscuridad). (A) ensayo DPPH<sup>+</sup>, (B) ensayo ABTS<sup>+</sup> y (C) ensayo FRAP. <sup>A-D</sup> Letras diferentes indican diferencia estadística entre días de almacenamiento en luz, <sup>a-d</sup> Letras diferentes indican diferencia estadística entre días de almacenamiento en oscuridad. \* indica diferencia estadística entre grupo (luz u oscuridad).

## 7.4 Análisis de jarabes o mieles de agave

### 7.4.1 Composición fisicoquímica

Una vez obtenida la muestra óptima del jarabe de agave por ERVal vacío, se realizó una comparación en cuanto a su composición fisicoquímica con jarabes de agave comerciales, los resultados de las diferentes determinaciones se reportan en la Figura 17. Los resultados de las diferentes determinaciones se observan la Tabla 14.



**Figura 17.** Muestras comerciales de jarabes o mieles de agave. De izquierda a derecha, los dos primeros son de agaves pulqueros y los dos últimos de agave tequilero

**Tabla 14.** Composición fisicoquímica de jarabes de agaves

Determinación	Agave pulquero			Agave Tequilero Azul	
	JAERv*	Maye®	Hacienda Amoltepec	Abeja Reyna®	Enature®
<b>Sólidos solubles totales (°Bx)</b>	75.20 ± 0.90 <sup>b</sup>	72.16 ± 0.28 <sup>a</sup>	73.20 ± 0.26 <sup>a</sup>	75.25 ± 0.25 <sup>b</sup>	76.41 ± 0.14 <sup>b</sup>
<b>Acidez mg AL/L</b>	88.31 ± 4.02 <sup>d</sup>	159.16 ± 5.90 <sup>e</sup>	56.13 ± 4.84 <sup>c</sup>	25.89 ± 0.50 <sup>b</sup>	15.41 ± 0.29 <sup>a</sup>
<b>pH</b>	4.57 ± 0.02 <sup>b</sup>	4.66 ± 0.00 <sup>b</sup>	5.15 ± 0.02 <sup>c</sup>	3.93 ± 0.00 <sup>a</sup>	4.59 ± 0.29 <sup>b</sup>
<b>Humedad (%)</b>	25.50 ± 0.93 <sup>c</sup>	28.20 ± 0.28 <sup>d</sup>	26.02 ± 0.51 <sup>c</sup>	19.94 ± 0.02 <sup>a</sup>	22.00 ± 0.10 <sup>b</sup>
<b>Cenizas (%)</b>	1.12 ± 0.20 <sup>b</sup>	2.01 ± 0.50 <sup>c</sup>	0.16 ± 0.62 <sup>a</sup>	ND	ND
<b>Proteína (%)</b>	2.31 ± 0.028 <sup>b</sup>	2.55 ± 0.03 <sup>c</sup>	1.21 ± 0.04 <sup>a</sup>	ND	ND
<b>Carbohidratos totales g/100g</b>	74.57 ± 2.82 <sup>a</sup>	75.91 ± 2.76 <sup>a</sup>	88.22 ± 6.01 <sup>b</sup>	82.61 ± 2.70 <sup>ab</sup>	91.66 ± 3.36 <sup>b</sup>
<b>Azúcares Reductores g/100g</b>	51.55 ± 0.005 <sup>a</sup>	81.10 ± 0.005 <sup>b</sup>	92.91 ± 0.10 <sup>d</sup>	93.03 ± 0.02 <sup>e</sup>	92.48 ± 0.34 <sup>c</sup>
<b>Sacarosa g/100g</b>	49.52 ± 0.01 <sup>e</sup>	30.13 ± 0.02 <sup>d</sup>	22.61 ± 0.01 <sup>c</sup>	4.32 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.69 ± 0.01 <sup>a</sup>
<b>Azúcares Totales g/100g</b>	62.67 ± 0.01 <sup>C</sup>	44.91 ± 0.02 <sup>a</sup>	58.11 ± 0.02 <sup>b</sup>	68.96 ± 0.03 <sup>d</sup>	69.31 ± 0.01 <sup>e</sup>

Resultados promedio del triplicado y desviación estándar. <sup>a-d</sup> Letras superíndices diferentes en fila indican diferencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0.05$ ). JAERv \*=Jarabe de Agave pulquero obtenido por ERV muestra óptima\*. ND = No Detectable

Para SST las muestras de jarabes o mieles de agave que presentaron menor cantidad fueron de las marcas Maye y Hacienda de Amoltepec (72.16 y 73.20, respectivamente) mientras que el JAERv\* mostró similitud ( $p < 0.05$ ) con los jarabes de agave azul con un tenido de 75.20 a 76.41 °Bx.

En la determinación de acidez titulable las concentraciones más altas correspondieron a las muestras elaboradas a partir de agave pulquero (JAERv\* Maye y Hacienda de Amoltepec) comparadas con las de agave azul. Un comportamiento similar reveló las muestras con respecto a la determinación de pH se demostró que el jarabe con un pH más bajo lo presentó el jarabe de agave azul y el más alto la muestra de Hacienda de Amoltepec (3.93 y 5.15 respectivamente).

La determinación de humedad expresada en porcentaje indicó que los jarabes de agave elaborados a partir de agave azul contienen un porcentaje menor de humedad, en cambio los de agave pulquero exhibieron un porcentaje mayor destacando la marca Maye con un 28.20 %.

El contenido de cenizas y proteínas no se encontraron presentes en las mieles o jarabes obtenidos a partir del agave azul pero sí en el agave pulquero. La miel de la marca Maye fue la que mayor porcentaje en cenizas y proteína contenía con un 2.01% y 2.55% respectivamente.

Observando los resultados de la Tabla 14 con respecto a la determinación de carbohidratos totales, existió una diferencia estadística ( $p < 0.05$ ) entre los jarabes de agave pulquero y los jarabes de agave tequilero especie azul, ya que los jarabes JAERv\* y Maye obtuvieron menor concentración al resto.

Los resultados obtenidos para los AR de los diferentes agaves de agave analizados revelaron que los jarabes de agave elaborados a partir de agave azul son las que mayor concentración presentan, al igual que, la muestra de la Hacienda de Amoltepec. Por otro lado, se observa que la muestra obtenida experimentalmente (JAERv\* ) es la que menor cantidad presentó (51.55 g/100g).

Caso contrario para el resultado en sacarosa, ya que el JAERv\*es la que mayor cantidad de este compuesto presenta (49.52 g/100g) comparándolo con las de miel o jarabe de agave azul (4.32 – 0.69 g/100 g). Las muestras de jarabe que mayor cantidad de azúcares totales contenían, fueron de la especie de agave azul, con 68.96 g/100g para la marca jarabe de agave azul y 69.31 g/100g para el jarabe de agave orgánico.

#### 7.4.2 Indicadores de calidad

Los parámetros que se eligieron indicadores de calidad fueron la concentración de HMF y el índice de oscurecimiento, mostrando los resultados de los diferentes jarabes analizados en la Tabla 15.

**Tabla 15.** Indicadores de calidad en jarabes de agaves

Determinación	Agave pulquero			Agave Tequilero Azul	
	JAERv *	Maye®	Hacienda Amoltepec	Abeja Reyna®	Enature®
<b>HMF (mg/100 g)</b>	10.82 ± 0.07 <sup>b</sup>	17.44 ± 0.20 <sup>d</sup>	13.05 ± 0.13 <sup>c</sup>	33.54 ± 0.11 <sup>e</sup>	2.38 ± 0.12 <sup>a</sup>
<b>Índice de oscurecimiento (420 nm)</b>	0.008 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.95 ± 0.06 <sup>d</sup>	0.44 ± 0.05 <sup>c</sup>	0.42 ± 0.01 <sup>c</sup>	0.23 ± 0.02 <sup>b</sup>

Resultados promedio del triplicado y desviación estándar. <sup>a-d</sup> Letras superíndices diferentes en fila indican diferencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0.05$ ). JAERv \*=Jarabe de Agave pulquero obtenido por ERV al vacío muestra óptima\*

De acuerdo al análisis el jarabe de agave azul de la marca Abeja Reyna, obtuvo más concentración de HMF (33.53mg/100g) y el de menor concentración fue la de la marca Enature, con un contenido de 2.38 mg/100 g.

Con respecto al índice de oscurecimiento los jarabes de las marcas Maye, Hacienda de Amoltepec y Abeja Reyna mostraron los valores más altos (0.95, 0.44 y 0.42 respectivamente), el JAERv\* alcanzó el valor más bajo (0.008).

## 7.4.3 Color

La determinación de color se realizó a los diferentes jarabes de agave, las coordenadas y los valores de  $C^*$  y  $h^\circ$  se observan en la Tabla 16.

**Tabla 16.** Determinación de color en jarabes de agaves

Coordenadas	Agave pulquero			Agave Tequilero Azul	
	JAERV*	Maye®	Hacienda Amoltepec	Abeja Reyna®	Enature®
$L^*$	51.90 ± 0.20 <sup>a</sup>	39.88 ± 0.36 <sup>a</sup>	41.94 ± 0.91 <sup>a</sup>	42.86 ± 0.10 <sup>a</sup>	41.31 ± 2.49 <sup>a</sup>
$a^*$	-3.41 ± 0.36 <sup>a</sup>	-3.91 ± 1.25 <sup>a</sup>	-3.61 ± 2.76 <sup>a</sup>	-0.46 ± 0.13 <sup>a</sup>	-1.52 ± 0.63 <sup>a</sup>
$b^*$	12.23 ± 0.08 <sup>b</sup>	5.99 ± 5.87 <sup>ab</sup>	2.98 ± 0.57 <sup>a</sup>	3.63 ± 0.21 <sup>a</sup>	3.41 ± 0.24 <sup>a</sup>
$C^*$	12.77 ± 0.32 <sup>c</sup>	5.41 ± 0.90 <sup>b</sup>	3.66 ± 0.18 <sup>a</sup>	3.78 ± 0.35 <sup>a</sup>	17.70 ± 6.63 <sup>d</sup>
$h^\circ$	104.9 ± 0.89 <sup>ab</sup>	149.77 ± 7.95 <sup>c</sup>	97.18 ± 1.42 <sup>a</sup>	111.36 ± 9.92 <sup>b</sup>	94.14 ± 1.46 <sup>a</sup>
$\Delta E$	-	144.28	81.24	108.45	16.18

Resultados promedio del triplicado y desviación estándar. <sup>a-d</sup> Letras superíndices diferentes en fila indican diferencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0.05$ ). JAERV\*=Jarabe de Agave pulquero obtenido por ERV muestra óptima\*

La coordenada  $L^*$  indica la luminosidad, se observa que el JAERV \* fue el que obtuvo el valor más alto (51.90), y el jarabe con el valor más bajo fue de la marca Maye (39.88), pero estadísticamente no se observó diferencia entre cada muestra de los diferentes jarabes. la coordenada  $a^*$  presentó un comportamiento similar

Para la coordenada  $b^*$  el JAERV\* fue el único con diferencia estadísticamente ( $p < 0.05$ ) comparado con los jarabes de Hacienda de Amoltepec, Abeja Reyna y Enature, pero si reveló similitud con el jarabe de la marca Maye. Los valores de  $C^*$  de los diferentes jarabes analizados, mostraron diferencia estadísticamente significativa, indicando que el jarabe con el valor más alto es de la marca Enature y los valores más bajos fueron para los jarabes de las marcas Hacienda de Amoltepec y Abeja Reyna.

Los valores que arrojaron las diferentes muestras de los jarabes para h°, indicaron que el JAERv\* tiene similitud con el jarabe de Hacienda de Amoltepec, Abeja Reyna y Enature. De igual forma se observó en la Tabla 16, que el jarabe de agave que mostró menos diferencia de color ( $\Delta E$ ) con la muestra JAERv\* fue de la marca Enature® con una diferencia de 16.18

#### 7.4.4 Compuestos y actividad antioxidante

La determinación de algunos compuestos antioxidante, al igual que, su capacidad de las diferentes muestras de jarabes de agave se puede observar en la Tabla 17.

**Tabla 17.** Compuestos y actividad antioxidante de jarabes de agaves

Determinación	Agave pulquero			Agave Tequilero Azul	
	JAERv *	Maye®	Hacienda Amoltepec	Abeja Reyna®	Enature®
<b>Fenoles totales (mg EAG/ 100g)</b>	14.78 ± 0.10 <sup>d</sup>	25.31 ± 0.07 <sup>e</sup>	12.82 ± 0.02 <sup>c</sup>	6.67 ± 0.02 <sup>b</sup>	1.87 ± 0.01 <sup>a</sup>
<b>Ácido ascórbico (mg/100 g)</b>	30.89 ± 0.001 <sup>d</sup>	27.86 ± 0.01 <sup>c</sup>	59.70 ± 0.00 <sup>e</sup>	16.65 ± 0.00 <sup>b</sup>	7.39 ± 0.01 <sup>a</sup>
<b>Betacianinas (mg/100 g)</b>	0.10 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.82 ± 0.01 <sup>e</sup>	0.26 ± 0.00 <sup>d</sup>	0.18 ± 0.00 <sup>c</sup>	0.03 ± 0.00 <sup>a</sup>
<b>Betaxantinas (mg/100 g)</b>	0.10 ± 0.00 <sup>b</sup>	1.28 ± 0.02 <sup>e</sup>	0.39 ± 0.00 <sup>d</sup>	0.22 ± 0.00 <sup>c</sup>	0.03 ± 0.00 <sup>a</sup>
<b>DPPH<sup>+</sup> (mg ET/100 g)</b>	13.34 ± 0.06 <sup>d</sup>	13.56 ± 0.04 <sup>e</sup>	10.56 ± 0.03 <sup>c</sup>	6.66 ± 0.07 <sup>b</sup>	2.60 ± 0.06 <sup>a</sup>
<b>ABTS<sup>+</sup> (mg ET/100 g)</b>	28.54 ± 0.04 <sup>e</sup>	14.66 ± 0.01 <sup>c</sup>	21.97 ± 0.06 <sup>d</sup>	7.60 ± 0.001 <sup>b</sup>	1.35 ± 0.01 <sup>a</sup>
<b>FRAP (mmol Fe (II)/100 g)</b>	6.17 ± 0.02 <sup>c</sup>	14.20 ± 0.02 <sup>e</sup>	8.20 ± 0.02 <sup>d</sup>	4.44 ± 0.02 <sup>b</sup>	1.36 ± 0.01 <sup>a</sup>

Resultados promedio del triplicado y desviación estándar. <sup>a-e</sup> Letras superíndices diferentes en fila indican diferencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0.05$ ). JAERv\*=Jarabe de Agave pulquero obtenido por ERV muestra óptima\*

Para el contenido de fenoles totales existió diferencia significativa entre los diferentes jarabes de agave, observando que las muestras de jarabe con menor cantidad son las de agave tequilero azul (Enature= 1.87 y Abeja Reyna =6.67 mg EAG/100g) y la que presentó mayor concentración de fenoles totales fue el jarabe de agave de la marca Maye (25.31mg EAG/100g).

En la determinación de ácido ascórbico se presentó una diferencia estadística, debido a que los jarabes de agave con mayores concentraciones fueron los pertenecientes al agave pulquero (Hacienda de Amoltepec=59.70, JAERv\*=30.89 y Maye=27.86 mg/100g) y los

de agave tequilero azul tenían una menor concentración (Enature=7.39 y Abeja Reyna=16.65 mg/100g).

El contenido de betacianinas los jarabes de agave con una concentración menor fueron de la marca Enature ( $0.03 \pm 0.00$  mg/100g) y la obtenida experimentalmente (0.10 mg/100g), por otro lado, las muestras de jarabes con mayor concentración fueron de la marca Maye (0.82 mg/100g) y Hacienda de Amoltepec (0.26 mg/100g).

De igual forma para el contenido de betaxantinas, los jarabes de agave de la marca Enature (0.03 mg/100g) y la obtenida experimentalmente (0.10 mg/100g) mostraron menor concentración, mientras que el jarabe que mayor concentración tuvo fue de la marca Maye (1.28 mg/100g).

En la determinación de la actividad antioxidante por el ensayo DPPH<sup>+</sup> los diferentes jarabes de agave mostraron diferencia estadística, siendo el jarabe obtenido experimentalmente (JAERv\*) y el de la marca Maye los que mayor concentración (13.34 y 13.56 mg ET/ 100g respectivamente).

En el ensayo ABTS<sup>+</sup> los jarabes con mayor concentración en esta actividad antioxidante fue la obtenida experimentalmente (JAERv\*) con un valor de 28.54 mg/100 g. Por otro lado, en el ensayo FRAP indicó que la muestra con mayor concentración fue de la marca Maye con un valor de 14.20 mmol Fe (II)/100g. Un aspecto importante a resaltar en la Tabla 17, fue que los jarabes que proceden de agave tequilero azul, presentaron menor concentración en los diferentes ensayos, tanto compuestos como actividad antioxidante.

#### 7.4.5 Viscosidad

La viscosidad se determinó en las diferentes muestras de jarabe de agave, los resultados se muestran en la Tabla 18.

**Tabla 18.** Viscosidad de jarabes y mieles de agaves

Determinación	Agave pulquero			Agave Tequilero Azul	
	JAER*	Maye®	Hacienda Amoltepec	Abeja Reyna®	Enature®
Viscosidad (cP)	3226.6 6 ± 45.09 <sup>e</sup>	1866.66 ± 20.81 <sup>c</sup>	1180.00 ± 30 <sup>b</sup>	2026.66 ± 5.77 <sup>d</sup>	1073.33 ± 5.77 <sup>a</sup>

Resultados promedio del triplicado y desviación estándar. <sup>a-e</sup> Letras superíndices diferentes en fila indican diferencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0.05$ ). JAERv\*=Jarabe de Agave pulquero obtenido por ERV muestra óptima\*

Se observa que la muestra con mayor viscosidad significativamente fue la obtenida experimentalmente (JAERv\*) con un valor de 3226.66 cP, por otro lado, el jarabe que presentó menor viscosidad fue el jarabe orgánico de la marca Enature con un valor de 1073.33 cP.

#### 7.5 índice glucémico *in vitro*

La determinación de la estimación del IG (eIG) se realizó en la muestra obtenido experimentalmente y los jarabes de agave comerciales (Tabla 19).

**Tabla 19.** Estimación del índice glucémico *in vitro* de jarabes y mieles de agaves

Determinación	Agave pulquero			Agave Tequilero Azul	
	JAERv*	Maye®	Hacienda Amoltepec	Abeja Reyna®	Enature®
ABC	39217.39	37744.35	60637.71	54279.66	42155.27
IH	33.01	31.77	51.04	45.69	35.48
eIG	36.65	35.58	52.19	47.58	38.78

ABC= Área Bajo la curva de hidrólisis después de 180 min; IH= índice de hidrólisis; eIG= Estimación de índice glucémico; ABC muestra de referencia Jarabe de glucosa: 118793.30; eIG fue calculado con forme la metodología de Grandfeldt *et al.*(107). JAERv\*=Jarabe de Agave pulquero obtenido por ERV muestra óptima\*

Observando los resultados de la eIG, todas las muestras analizadas se pueden catalogar como producto con un IG bajo, lo cual se debe a su composición y a la materia prima de la cual están elaborados.

## VIII. DISCUSIÓN

### 8.1 Optimización de jarabe de agave por evaporación al vacío

Para la optimización del proceso de obtención del jarabe de agave pulquero mediante la evaporación rotario al vacío se utilizó un diseño de superficie de respuesta de tipo Box-Beachken, el cual; permite estimar el comportamiento de variables respuesta en procesos experimentales y así poder optimizar el proceso; esto se realizó con el fin de preservar los compuestos bioactivos del aguamiel, y generar una alternativa en la elaboración de jarabe de agave pulquero y ofreciendo una opción más como edulcorante natural.

#### 8.1.1 Características fisicoquímicas del aguamiel

En una primera etapa de este estudio se caracterizó la materia prima con el fin de determinar su calidad. El aguamiel es la savia extraída del agave pulquero, la norma mexicana NMX-V-022-1972 “aguamiel” lo clasifica como Tipo I y II (22). Los resultados de las determinaciones en los diferentes lotes de aguamiel, que se ocuparon en la elaboración de la primer superficie de respuesta (la cual no fue reproducible), mostraron valores en SST de 11 - 10.2 °Bx, pH de 4.45 - 5.6 y acidez titulable de 1.80 - 2.67 g/100 mL (Tabla 8), clasificando la muestra de aguamiel para este estudio como del tipo II debido a que la norma (dicha anteriormente ) establece que las características del aguamiel debe cumplir con un valor no menor a 7 para SST (g/100 mL), pH no menor a 4.5 y el contenido de acidez no mayor de 4 g/100 mL.

El pH del aguamiel tiende a ser de baja acidez (de acuerdo a la norma antes mencionada) (22), lo cual se ve demostrado en el pH de los diferentes lotes de aguamiel analizado, siendo similar con los valores del aguamiel del *A. americana* con valores de 4.85 a 5.75 (108) y con lo reportado por Rodríguez *et al* (109). quienes analizaron el bagazo del agave tequilero indicando un pH de 4.8. Considerando que el pH está relacionado con la acidez del aguamiel, esta no puede ser tan alta, por que indicaría el inicio de un proceso de fermentación, el cual genera diversos ácidos orgánico, principalmente láctico, convirtiendo el aguamiel en pulque, que no era deseado para esta investigación (8).

En el aguamiel del *Agave salmiana* existe la presencia de carbohidratos, destacando la fructosa, seguido de glucosa y en pequeñas cantidades sacarosa (110). En este estudio el aguamiel analizado para la realización de la superficie de respuesta número 1, indicó un

contenido en AR de 9 a 11 g/100 mL sugiriendo que la mayor concentración de sólidos solubles totales son AR, destacando la fructosa. Con respecto al contenido permitido de AR, la NMX-V-022-1972 “aguamiel” (22), indica que debe ser mayor a 6 g/100 mL, corroborado que el aguamiel utilizado en este trabajo se encuentra en la clasificación de tipo II.

Tanto la cantidad de SST así como AR, se pueden ver afectados por las condiciones climáticas donde se encuentra la planta, generando una fluctuación en su concentración (13,111), como se observó en la Tabla 10. Enríquez-Salazar *et al*, reportaron que la composición de SST aumenta en invierno y primavera, de igual forma que la glucosa, mientras que la fructosa es constante en todas las épocas del año, pero la sacarosa aumenta en primavera y verano, debido al metabolismo del ácido crasuláceo de los agaves (13). Esto confirma que los AR presentes en el aguamiel contiene en su mayoría fructosa, y en menor proporción glucosa, porque la recolecta del aguamiel se llevó a cabo en otoño.

El aguamiel no solo contiene azúcares simples, también se ha reportado la presencia de fructanos o fructooligosacáridos (FOS), los cuales presentan capacidad antioxidante (112). Picazo *et al*, evaluaron el efecto de hidrólisis de fructanos para incrementar los FOS y la actividad antioxidante en el aguamiel, mediante un complejo enzimático producido a partir de *Aspergillus oryzae*, posterior al tratamiento enzimático, observaron un alto incremento en los ensayos de DPPH<sup>+</sup> (de 34.81 a 116.46 mg/ET) y FRAP (42.65 a 298.86 mg/ ET), ellos mencionan que el incremento de la actividad antioxidante se debe a la relación de la degradación enzimática parcial para la producción de FOS u otros compuestos de fructosa que inducen la formación de compuestos heterocíclicos (113), también se observa que los valores de actividad antioxidante en estas dos determinaciones para el aguamiel, son superiores a los obtenidos en este estudio (Tabla 9).

Además, la actividad antioxidante también se ve acrecentado por compuestos bioactivos que la favorecen. Como bien se sabe, los compuestos fenólicos tienen un papel importante en la mantención de la salud humana, debido a que ejercen efectos favorables sobre los radicales libres, la inflamación, la microbiota intestinal, incluso la carcinogénesis, estos compuestos son considerados metabolitos secundarios de las plantas, los cuales desempeñan papeles fisiológicos cruciales en ellas, por ejemplo en el proceso de desarrollo

con la división celular, la regulación hormonal, la actividad fotosintética, mineralización de nutrientes y reproducción (114,115). El aguamiel utilizada para la elaboración de la superficie de respuesta, mostró una concentración de 9.38–22.28 mg EAG/ 100 mL para fenoles totales, estos resultados son similares con lo reportado por Ramírez-Cuellar donde analizaron el contenido de fenoles totales de aguamiel, recolectada en diferentes semanas en el estado de Zacatecas y observaron valores estadísticamente diferentes (14.59 – 20.52 mg/100 g) en cada semana (116). Otro estudio muestra la presencia de compuestos fenólicos en aguamiel liofilizada extraída de *Agave atrovirens* con una concentración de 3.02 mg EAG/g de aguamiel (117). Estos resultados indican que la concentración de los compuestos fenólicos varía de acuerdo con la región geográfica, el día de recolección y el tipo de especie botánica de la cual es extraída el aguamiel.

Con respecto al ácido ascórbico (vitamina C), es un compuesto soluble en agua, con capacidad antioxidante capaz de interactuar con radicales libres para formar moléculas estables (ascorbilo y ácido dehidroascórbico), formas oxidadas del ácido ascórbico (118). Debido a su característica hidrofílica, se ha reportado como un metabolito endógeno del agave con un rango de concentración de 2.01 a 24.07 mg/ 100 mL (8,119) o de 35.1 mg/250 mL (110). Sin embargo, su contenido depende del origen botánico y lugar geográfico, datos similares a los obtenidos en este trabajo, observando una concentración en un rango de 7.92-24.07 mg EAA/100g.

Las betalaínas son pigmentos nitrogenados con actividad antioxidantes que se dividen en dos grupos: las betacianinas (rojo-violeta) y betaxantinas (amarillo-naranja) (120), el aguamiel al ser un líquido extraído de una planta y con tonalidad amarilla, se cuantificó el contenido de betalaínas encontrando concentraciones que van de 0.1 a 0.32 mg/ 100 mL en betacianinas y de 0.098 a 0.29 mg/ 100 mL para betaxantinas, lo que se sugiere que esta coloración se debe a la presencia de estos compuestos, debido a que no se ha encontrado evidencia científica que indique que se encuentran presentes en el aguamiel.

Debido a que ya se comprobó la presencia de ciertos compuestos que contribuyen a la actividad antioxidante, este parámetro se evaluó mediante diferentes ensayos, obteniendo valores máximos de 4.40 mg ET/100 mL para DPPH<sup>+</sup>, 10.17 mg ET/100 mL en ABTS<sup>+</sup> y 0.82 mmol Fe<sup>2+</sup>/100 mL en FRAP, estos resultados son similares a los reportados por

Tovar-Robles *et al.*(110), donde observaron que el aguamiel tiene una mayor capacidad antioxidante comparado con el pulque y que el jugo de naranja mezclado con extracto de nopal, mostrando un comportamiento similar en el contenido de compuestos fenólicos.

Estos resultados confirman que los compuestos que contiene el aguamiel tienen efectos benéficos para la salud, desde los FOS que sirven como sustratos para la microbiota, siendo un prebiótico para microorganismos como *Lactobacillus* o *Bifidobacterium*,(113) y su variedad de compuestos bioactivos con capacidad antioxidante (compuestos antioxidantes), indicando que el aguamiel es una buena fuente para generar jarabe de agave pulquero.

Otro aspecto importante y que afectó a los resultados de este estudio, es la composición química del aguamiel, que se ve afectada por la zona geográfica, clima o estación del año, incluso la hora de recolección de la savia (111), por lo que, para la elaboración de la superficie de respuesta, se optó por realizarla con aguamiel que tuvieran características del lote 1 y 2 debido a que presentó mayor cantidad de SST (11°Bx) y mayor concentración de compuestos y actividad antioxidante.

Previo a su concentración mediante la evaporación rotatoria al vacío, se realizó un tratamiento térmico de esterilización a baja temperatura en donde se verificó la ausencia de microorganismos. Este fue un punto importante para poder garantizar la inocuidad del producto final (jarabe), debido a que en el aguamiel se puede encontrar microorganismos nativos como *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Saccharomyce cerevisea* que son los encargados de la acidificación y fermentación alcohólica del aguamiel (11,13,18,23).

#### *8.1.2 Efecto de la temperatura, vacío y tiempo sobre sólidos solubles totales, compuestos y actividad antioxidante*

La evaporación es una operación unitaria que logra separar líquidos y sólidos por la suministración de calor al líquido con el fin de recuperar el soluto, por otro lado, la tecnología de vacío se está utilizando ampliamente en muchas aplicaciones químicas, el principal fin de esta tecnología es realizar operaciones térmicas y mecánicas básicas para procesar productos y poder preservar el producto (121,122).

La técnica de evaporación rotaria se está utilizando para aplicaciones industriales a gran escala con una amplia gama de usos como pueden ser la concentración, el secado, la recristalización, la purificación de solventes y destilación, esta técnica es rápida y con bajas temperaturas de evaporación que disminuyen la degradación térmica (123). Debido a estas últimas ventajas se optó por realizar la concentración del aguamiel con un rango de temperatura de 60 a 70°C, una presión de vacío de 60 a 90 mbar con un rango de tiempo de 20 a 30 min.

El comportamiento de la variable respuesta de SST se ve afectado por la temperatura, vacío y tiempo, lo cual se corrobora en los extremos de los cuadrantes de los diagramas de contorno (Figura 4), estos fenómenos de evaporación al vacío se han utilizado en la concentración de jugo de naranja (124), con el fin de reducir espacio de almacenamiento, desactivación de algunas enzimas y la disminución de la carga microbiana, en un segundo estudio evaluaron el efecto de la evaporación al vacío acoplado a un sistema de calentamiento óhmico en un jugo de frutas, indicando que el valor de la conductividad eléctrica aumentada con la evaporación al vacío, y fue similar en productos como agua de mar, pasta de tomate, jugo de granada y cereza, a consecuencia del aumento de la concentración de SST (125).

En las superficies de respuesta se observa un comportamiento similar, cuando la temperatura y la presión de vacío van en incremento y el tiempo es prolongado incrementa la concentración de SST, debido a que la alta presión de vacío (70 a 60 mbar) desciende el punto de evaporación del agua concentrando más rápido la cantidad de solutos de la materia prima y a baja temperatura. Esto se debe a las propiedades coligativas de la materia prima, debido a que la presión de vapor de un disolvente desciende cuando este contenga un soluto no volátil, en este caso los carbohidratos, debido a la disminución del número de moléculas del disolvente (agua) en la superficie libre y al incremento de fuerzas de atracción entre las moléculas del soluto (carbohidratos), lo que dificulta el paso del vapor (126), este comportamiento se observó durante la cinética de concentración, ya que cuando se alcanzaba una concentración mayor del 80% las muestras se concentraban rápidamente con variaciones de minutos e incluso segundos.

De igual forma, la composición de la materia prima afecta este proceso de evaporación al vacío, evidencia científica reporta que la dextrosa y sacarosa pueden aumentar o disminuir la tensión superficial dependiendo su concentración (127), debido a la poca concentración de sacarosa en el aguamiel la tensión superficial fue baja, facilitando la evaporación del agua, caso similar ocurrió en la elaboración de jarabe de coco con roto evaporación a 60°C a una presión de 250 mbar en un tiempo aproximado de 12 minutos (123).

Como se mencionó anteriormente, los fenoles no se ven afectados por los rangos de temperatura, vacío y tiempo utilizados para la elaboración de la superficie de respuesta, ya que, cuando existía un incremento en la temperatura, tiempo y la presión de vacío la concentración aumentaba, comportamiento similar en un estudio donde incrementó el contenido total de fenoles en miel, cuando está se calentaba a 65°C (128), esto se debe a que las estructuras químicas de los fenoles pueden mostrar resistencia al calor (129) y a temperaturas mayores de 70°C es cuando inicia la degradación (130), por lo que en esta variable respuesta se puede observar la tendencia a una concentración de estos compuestos, debido a que la temperatura más alta fue 70°C y un tiempo máximo de 30 min.

Con respecto a la variable respuesta de ácido ascórbico, el diagrama de Pareto y el ANOVA, indica que este analito no se afectó por los 3 factores control (anexo B-2), lo que nos muestra que los rangos de temperatura, vacío y tiempo no son perjudiciales. De igual forma, se observa que la combinación de temperatura y tiempo son factores que influyen en la concentración, lo cual se corrobora con la literatura, debido a que en un estudio determinaron la degradación de ácido ascórbico durante un proceso de deshidratación en el procesamiento de tomate fresco (131), indicando que la degradación disminuye cuando se trabaja a temperaturas estables durante un tiempo prolongado. Otro estudio determinó la mejor condición de temperatura y tiempo para el escaldado de pulpa de mango sin afectar la concentración de ácido ascórbico, obteniendo como mejor condición a 85°C durante 15 minutos (132), esto muestra que el ácido ascórbico puede soportar altas temperaturas sin tener una degradación como se observa en este trabajo. De la misma manera, un estudio comparó 3 métodos diferentes de obtención de jarabe de coco (sistema abierto, roto evaporación y microondas) concluyendo que el método que preservaba este compuesto fue por roto evaporación a 60 °C (133).

Otros compuestos poco estudiado en el aguamiel son betalaínas, las cuales presentan propiedades antioxidantes y fungen como agentes quelantes que pueden actuar como estabilizadores (134), su degradación se puede llevar a cabo por diferentes mecanismo ya sea intrínsecos o extrínsecos, como puede ser la temperatura, el oxígeno y la luz. Bajo el conocimiento de que la temperatura y el oxígeno promueven su degradación, observando en las superficies de respuesta (anexo B-3) que la evaporación al vacío ayuda a su preservación, debido a la eliminación de oxígeno por la condición de vacío utilizado y las bajas temperaturas, reportando que su degradación aumenta entre 80 a 90°C a un pH de 7 (135), lo que explica el por qué los valores de las condiciones utilizados en la superficie de respuesta no afectan esta degradación, observando un incremento en su concentración cuando la temperatura fue cercana a 70°C. Otro componente de la materia prima (aguamiel) que ayuda a la estabilidad de estos compuestos es el ácido ascórbico, debido a que se ha reportado que mejora la estabilidad de las betalaínas (136).

Por otro lado, se ha reportado que las betacianinas son compuestos estables en ciertos minerales, como pueden ser  $K^+$  y  $Fe^{2+}$ , pero poco estables con azúcares como glucosa y fructosa (137), lo cual son compuestos que se encuentran presentes en el aguamiel (117,138). Con respecto a la temperatura se ha reportado que en un rango de 70 a 80°C, durante un tiempo de 5 horas, la degradación de estos compuestos es más rápida (137), de acuerdo a estos reportes, los minerales ayudan a su estabilidad, al igual que la temperatura y tiempo máximo utilizado para la elaboración de la superficie de respuesta, ya que no sobrepasan los 70°C y el tiempo máximo fue de 30 min. Por lo tanto, los factores control utilizados no afectan a este compuesto, con lo que concuerda con los datos observados en el diagrama de Pareto para esta variable respuesta.

Comportamiento similar se observó para betaxantinas. Estos compuestos son los responsables de dar un color amarillo al aguamiel y al jarabe después de su concentración (24,116). Se ha reportado que su degradación se puede dar por calor, pH, luz, oxígeno, iones metálicos e incluso la actividad de agua (139). Como ya se mencionó, la ausencia de oxígeno por el uso del vacío, la presencia de minerales en el aguamiel y las bajas temperaturas son condiciones y factores que no afectaron a esta variable, lo cual concuerda con el diagrama de Pareto.

Dada la presencia de compuestos antioxidantes en el jarabe de agave por evaporación al vacío se determinó su capacidad antioxidante, para el ensayo DPPH<sup>•+</sup> se observó que los factores temperatura, vacío y tiempo, afectaron estadísticamente incrementado su actividad antioxidante, y esto se debe a que a mayor concentración de compuestos propios del alimento (en este caso sacarosa o ácido cítrico) aumentan la capacidad antioxidante (140).

El ensayo ABTS<sup>•+</sup> se utiliza para determinar la capacidad antioxidante de alimentos con nutrientes hidrofílico, lipofílicos, de alta humedad o pigmentados (141), el aguamiel al tener una característica más hidrófila (mayor cantidad de agua), se observó que el vacío si afecta significativamente y de manera positiva la capacidad antioxidante para el ensayo ABTS<sup>•+</sup>, ya que se puede observar en un aumento en su capacidad cuando las presiones de vacío están en 60 mbar.

El ensayo FRAP se ve afectado de manera positiva por todos los factores control al igual que algunas de estas combinaciones de factores, también este ensayo indica la presencia de compuestos antioxidantes como pueden ser ácido ascórbico (vitamina C),  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), ácido úrico, bilirrubina y compuestos polifenólicos como catequinas y otros flavonoides (142), lo cual concuerda con los resultados anteriores, debido a que los compuestos como ácido ascórbico o compuestos fenólicos no se vieron afectados por las condiciones de temperatura, vacío y tiempo incrementando su actividad antioxidante observado en este ensayo.

### *8.1.3 Reproducibilidad*

La reproducibilidad de estudio solo se logró para SST ( $R^2= 97.8$  y una  $R^2$  de predicción = 70.2), el cual fue un parámetro que se pudo controlar desde la materia prima, por ser una determinación rápida, de igual manera este valor era el de mayor interés ya que la NMX-FF-110-SCFI, menciona que para ser considerado un jarabe de agave debe tener al menos un contenido en sólidos solubles de 74°Bx (143), lo cual sí se pudo reproducir con la condición óptima establecida (Temperatura 68°C, Vacío 65 mbar y Tiempo 25 min).

Para las variables de respuesta como los compuestos (ácido ascórbico, fenoles y betacianinas) y actividad antioxidante (ABTS<sup>•+</sup>, FRAP y DPPH<sup>•+</sup>), son factores que se ven afectados por la madurez de la planta (144), hora de recolección del aguamiel e incluso el

clima, por lo que se catalogaron como factores externos, los cuales no se pudieron controlar afectando la reproducibilidad del estudio para estas variables respuesta ( $R^2$  predicción  $<0$ )

Por otro lado, este diseño de superficie de respuesta ayuda a reducir tiempos en la elaboración de jarabe de agave, ya que se ha reportado que se requieren temperaturas altas (mayores a  $90^{\circ}\text{C}$ ) y tiempos prolongados para su elaboración (6 a 8 horas). Un estudio elaboró jarabe de agave a partir de aguamiel de manera artesanal, se comparó dos métodos de evaporación, donde el primero consistía en un calentamiento previo de 60 min a  $65^{\circ}\text{C}$  seguido de una evaporación de 125 min a  $75^{\circ}\text{C}$ , y el segundo método, solo realizaban una evaporación a  $85^{\circ}\text{C}$  durante 120 min, el cual si logró una concentración de  $74^{\circ}\text{Bx}$  (145). En otro estudio elaboraron jarabes de agave pulquero de la especie *salmiana* mediante una evaporación en sistema abierto (sartén y estufa de gas), utilizando diferentes temperaturas ( $50, 60, 70, 90$  y  $95^{\circ}\text{C}$ ), y el tiempo de calentamiento se detenía cuando la muestra alcanzaba los  $65^{\circ}\text{Bx}$ , ellos mencionan que las temperaturas de  $50$  y  $60^{\circ}\text{C}$  la descartaron por el tiempo tan prolongado, mientras que las temperaturas de  $70$  y  $80^{\circ}\text{C}$  detuvieron el tiempo a las 14 y 10 hrs respectivamente, mientras que a  $90$  y  $95^{\circ}\text{C}$  el tiempo de evaporación fue de 4 y 3 hrs respectivamente (4). Un estudio reportó que en la elaboración del jarabe de agave tequilana, de manera industrial, utilizan una temperatura de hidrólisis de  $80^{\circ}\text{C}$  seguido de una evaporación a  $95^{\circ}\text{C}$  (25), estos estudios reportan que la elaboración de jarabes de agave ocupan temperaturas altas afectando la estabilidad o los compuestos bioactivos de la savia del agave.

También se ha comprado diferentes métodos de concentración para la elaboración de jarabe de coco, los métodos utilizados fueron: sistema abierto, microondas y EVR al vacío, dando el mejor resultado la concentración por ERV ya que no afectaba las propiedades (color, índice de oscurecimiento, concentración de azúcares y perfil, cenizas y sólidos solubles totales)(123). En el estudio también compararon el tiempo de concentración, indicando que con evaporación al vacío a  $60^{\circ}\text{C}$  y 250 mbar fue la más rápida (12.2 min), llegando a una concentración de SST de  $65^{\circ}\text{Bx}$  la cual era su objetivo. Comparando estos datos con lo realizado en este proyecto, se indica, que al trabajar con altas presiones de vacío (60 mbar), se logró reducir tiempos ( $< 30$  min) y temperaturas ( $< 70^{\circ}\text{C}$ ) de

evaporación, lo que indica que la evaporación por este método genera un edulcorante que preserva y concentra los compuestos bioactivos de la materia prima (aguamiel).

#### 8.1.4 Vida útil del jarabe de agave pulquero

La vida útil, un término reconocido en la legislación alimentaria de la Unión Europea y el Reino Unido, el cual define como el período durante el cual un producto alimenticio permanecerá seguro y apto para su uso (91), por lo que se evaluó el jarabe de agave ,obtenido por rotaevaporación al vacío, durante 90 días en condiciones de luz y oscuridad permitiendo evaluar los cambios fisicoquímicos de compuestos y su actividad antioxidante.

Como primer parámetro, por su importancia, se evaluó la cantidad de SST, debido a que es uno de los factores que ayudan a la preservación del jarabe por su alta concentración (75°Bx aproximadamente), esta concentración aumenta la presión osmótica del sistema, inmovilizando el agua libre y evitando el crecimiento bacteriano, de la misma forma como ocurre en el jarabe con alto contenido de azúcar (146). Durante el almacenamiento no se observó un cambio en esta concentración, indicando que durante los 90 días no hubo pérdida de agua, también la conservación de SST ayudó a que no hubiera crecimiento bacteriano.

Un alimento con un pH por debajo de 4.6 se considera un alimento inocuo donde el deterioro por microorganismo patógenos no es posible (146), este dato es importante debido a que el jarabe con el pH más bajo, durante el almacenamiento, fue al día 60 con un valor de 5.45, esta disminución no es el factor principal para detener la proliferación de microorganismo como lo es la alta concentración de SST.

La acidez del jarabe de agave fue un parámetro que desde el día 0 tuvo un incremento en ambas condiciones de almacenamiento hasta el día 60, dato similar fueron reportados por Cavia *et al* (147), donde evaluaron la acidez en mieles de abeja durante 20 meses, ellos mencionan que este comportamiento fue lineal asociándolo al tiempo de almacenamiento y el proceso de fermentación que se puede generar, debido a que los azúcares y alcoholes de la miel se transforman en ácidos por la acción de las levaduras, estos microorganismos osmófilos son capaces de sobrevivir en medios con una alta cantidad de azúcares en el medio (148).

Como se observa en la Figura 13-A, el comportamiento del 5-hidroximetil-2-furfural (5-HMF) tiene un aumento significativo en ambas condiciones de almacenamiento, pero con menor velocidad en la muestra almacenada en oscuridad. El 5-HMF es un producto de descomposición térmica de los sacáridos, su formación puede ser por dos vías; la primera, durante la reacción de Maillard y la segunda por deshidratación térmica de sacáridos en condiciones ácidas (149), debido a estas condiciones y características, el jarabe de agave es un producto que cuenta con tales compuestos químicos, los cuales se han reportado con potencial genotóxico, mutagénico y cancerígeno(149). Pero existen otros parámetros que afectan la formación de 5-HMF como son la temperatura, el tiempo, el pH, la actividad del agua, el tipo de sacárido y los aminoácidos y esto se observó y confirmó en este proyecto, debido a una relación entre pH (antes mencionado) y el tiempo de almacenamiento. Un estudio analizó la concentración de HMF, indicando que su aumento tenía relación con el contenido de agua libre, la presencia de iones Ca y Mg y pH bajo ( $< 6$ ) (150), mismo comportamiento se observa en la Figura 12-B y Figura 13-A, donde la muestra almacenada a la luz directa, reporta la mayor concentración de HMF al día 60, al igual que la mayor disminución de pH en ese mismo día, mientras que en el día 90, esta concentración se mantuvo constante lo que se puede asociar al incremento del pH del jarabe de agave pulquero. Con respecto a la concentración de HMF en el jarabe de agave pulquero almacenada en oscuridad, hubo un incremento exponencial después del día 60 pero su pH y acidez siempre estaban por debajo que la muestra almacenada en Luz directa. Después del día 60, se observa un aumento en el pH y una disminución en la acidez. La acidez y el HMF tiene relación, debido a la presencia de los ácidos levulínico y fórmico, ya que son derivados de dicho compuesto, en una reacción sucesiva cuando existen moléculas de agua en el medio, las cuales se unen con dos moléculas de agua, aumentando la concentración de acidez libre (147).

Otro parámetro de calidad que se analizó fue el índice de oscurecimiento (Figura 13-B), la reacción de oscurecimiento se realizó en ambas condiciones (luz y oscuridad) teniendo una diferencia mínima entre ellas, esto indica que la luz no afecta la coloración del jarabe de agave pulquero, sino la secuencia de las reacciones no enzimáticas del mismo producto. De igual forma, en la Figura 13, el incremento del oscurecimiento se da en los primeros 60 días de almacenamiento, es importante mencionar que el oscurecimiento de un alimento

puede ser mediante reacciones enzimáticas o no enzimáticas. Dentro de las reacciones no enzimáticas se encuentra a la caramelización y la reacción de Maillard, estas reacciones se producen por tratamiento térmico. La caramelización se da por una deshidratación y una reacción de pirólisis generando azúcares oxidados y compuestos como enodioses y dicarbonilos. Por otro lado, la reacción de Maillard es una reacción de polimerización entre azúcar, agua y aminoácidos (los cuales son parte de la materia prima) generando melanoidinas o compuestos precursores tóxicos y/o mutagénicos (146) estos reportes indican que ambas reacciones se llevan a cabo en la obtención del jarabe y estas se van modificando con el paso del tiempo.

La estabilidad de los colorantes naturales puede ser fundamental para mantener la aceptación de un producto por parte del consumidor, y se ven afectados por factores como la disponibilidad de oxígeno, la temperatura, exposición a la luz y el pH, así como muchos procesos naturales como el enzimático o crecimiento microbiano (146). Un estudio evaluó los cambios en los azúcares y su comportamiento de mieles de abeja en diferentes condiciones de almacenamiento durante 24 semanas, reportando cambios en su coloración volviéndose más oscura (151), ocurriendo un comportamiento similar en el jarabe de agave pulquero.

Debido a esto se evaluó las coordenadas  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  en el jarabe donde el almacenamiento en ambas condiciones (luz y oscuridad) no mostraron diferencia, ya que se observa un mismo comportamiento durante el periodo de evaluación (Figura 14). Esto indica que la luz no es un factor que afecte la estabilidad de los pigmentos naturales del alimento, pero el pH si, por otra parte, cuando el pH disminuye del día 0 al 60 existe un cambio drástico en las coordenadas  $L$ ,  $a^*$  y  $b^*$ ; y cuando el pH aumenta (día 90) hay un comportamiento diferente. Estos datos concuerdan con lo reportado en mieles de abeja, donde mencionan que la degradación de azúcares en medio ácido generan compuestos como 2-acetilfurano, isomaltol, 3,5-dihidroxi-2-metil-5,6-diidropirano-4-ona y maltol, compuestos que se forman por el calentamiento y la presencia de aminoácidos y que contribuyen al cambio de coloración de la miel de abeja (152). Un estudio donde evaluaron el cambio de coloración de la miel de abeja con diferentes grados de humedad (153), reportó que en la coordenada  $L^*$  (luminosidad), la miel con 18% en humedad, presentó el valor más bajo (28

aproximadamente), datos similares se obtuvieron en el almacenamiento del jarabe de agave pulquero (Figura 14-A). Con respecto a los parámetros oxígeno, temperatura, presencia de enzimas o microorganismo no se puede generar una correlación debido a que no se controlaron o midieron estos parámetros, esto indica que el almacenamiento del jarabe de agave pulquero no se ve afectada por la luz, pero sí por su composición.

Teniendo en cuenta que el color tiene gran relación en la actividad antioxidante, también se monitoreo la concentración de compuestos y su actividad. Con respecto a compuestos fenólicos, se observa un aumento en su concentración durante el periodo de almacenamiento, siendo mayor en el jarabe de agave pulquero almacenado bajo luz, reportado que los compuestos fenólicos son responsables de la coloración en mieles de abeja (color más oscuro) durante su almacenamiento debido a su degradación (154), caso contrario con el JAERV\*, ya que durante el almacenamiento hubo un aumentó en su concentración, lo cual, indica que el método de elaboración (ERV) no afectan a estos compuestos ni a su degradación.

Con respecto al ácido ascórbico, se sabe que es un compuesto inestable debido a la oxidación química y enzimática, también estos cambios se deben a factores como luz, oxígeno y el calor (155), como se puede observar en la Figura 15-B, la concentración de ácido ascórbico aumenta con respecto al paso del tiempo y es mayor la concentración cuando el jarabe es alanceado en oscuridad, por otro lado, cuando el jarabe es almacenado a la luz, si afecta a este compuesto Este aumento se puede deber, a la presencia de oxígeno, ya que el ácido ascórbico se degrada a ácido deshidroascórbico, y este compuestos posee actividad completa de vitamina C (85). La presencia de enzimas, como la oxidasa y peroxidasa, son otro factor que afecta negativamente la concentración de ácido ascórbico, estas enzimas se pueden inactivar por tratamientos térmicos, existiendo la evidencia en un estudio con un concentrado de fresa, ya que hubo una inactivación cuando alcanzó una temperatura de 80°C manteniéndose el ácido ascórbico (156), estos resultados indican que el pretratamiento térmico que se le aplicó al aguamiel, ayudo a la inactivación de estás enzimas, manteniendo el ácido ascórbico durante el tiempo de almacenamiento.

En el caso del contenido de betalainas, (Figura 15-C), hubo una mayor degradación de las betaxantinas después del día 30, siendo mayor que la de betacianinas, las cuales se

degradan a partir del día 60, esto se ha sido reportado por Sapers y Hornstein quienes describieron este comportamiento a temperatura ambiente (157), esta estabilidad se debe a que las betacianinas realizan un proceso de esterificación con ácidos alifáticos y ácidos aromáticos (158), los cuales pueden estar presentes en el jarabe de agave pulquero aumentando su estabilidad durante el periodo de almacenamiento.

La actividad antioxidante en un alimento, que contiene tiene azúcares está asociada a los compuestos que se generan a partir de la reacción de Maillard, la caramelización, compuestos de Amadori, reductoras reactivas, premelanoidinas y melanoidinas (159). Los cambios de la actividad antioxidante durante el almacenamiento fueron evaluados mediante los ensayos DPPH<sup>•+</sup>, ABTS<sup>•+</sup> y FRAP. Con respecto al ensayo DPPH<sup>•+</sup>, se observó un aumento en la actividad después del día 30 (Figura 16-A), mismo día donde ocurre los cambios más relevantes en el color (Figura 13-B). Este comportamiento en el ensayo DPPH<sup>•+</sup> se puede deber a los compuestos propios de la materia prima (aguamiel), ya que se ha reportado que moléculas que tienen relación con proteínas, inhiben una alta concentración del radical DPPH<sup>•+</sup>, debido a una capa hidrofóbica que se generan por el calentamiento de proteínas, haciendo que las moléculas interactúen más con compuestos hidrófobos como el DPPH<sup>•+</sup>, también las melanoidinas son compuestos que interactúan en dicho ensayo (159). Con respecto al ensayo de ABTS<sup>•+</sup>, se observa una disminución de la actividad después del día 60, no importando la condición de almacenamiento (luz y oscuridad), y esto se debe a que los primeros productos o compuestos de la reacción de Maillard interactúan eficientemente con radicales hidrofílicos como ABTS<sup>•+</sup> en solución acuosa, mientras que los últimos productos de la reacción tendrán mayor actividad con el ensayo DPPH<sup>•+</sup>, los cuales son los pigmentos de color marrón que se producen posteriormente (160), este comportamiento se observa en la Figura 16-A y B. Por otro lado el ensayo FRAP permite conocer el poder reductor/antioxidante mediante la reducción del cloruro férrico-ferricianuro a ferroso (Fe<sup>2+</sup>), los compuestos de la reacción de Maillard que interactúan con este ensayo son los grupos hidroxilo, pirrol, melanoidinas de alto peso molecular, compuestos heterocíclicos y los de Amadori (159), pero estos compuestos se pueden degradar al paso del tiempo, comportamiento similar se aprecia en la Figura 16-C, con una disminución de la concentración del ion Fe<sup>2+</sup> durante el almacenamiento.

## 8.2 Características nutrimentales del jarabe de agave pulquero

En este apartado del estudio se analizó con mayor detalle la composición fisicoquímica del jarabe de agave pulquero, también la actividad antioxidante, al igual que la estimación del índice glucémico (eIG), todo esto con el fin de conocer su calidad nutricional y poder compararlos con otros productos comerciales.

La norma oficial mexicana NOM-003-SAGARPA-2016, define al jarabe como una “*solución acuosa, de consistencia viscosa, con alta concentración de carbohidratos con un sabor dulce característico*” (26), de acuerdo a esta definición, se indica que el producto que se obtuvo, después de realizar la superficie de respuesta, concuerda con lo establecido con la norma ya que la materia prima es procedente de un agave, su mayor contenido son carbohidratos y presenta una consistencia viscosa. Por otro lado, la Norma Mexicana NMX-FF-110-SCFI- 2008 (143), define al jarabe de agave como “*una sustancia dulce natural producida por hidrólisis a partir de oligosacáridos del agave*”, de igual forma esta norma indica, que un jarabe de agave debe contener un mínimo de 74°Bx, lo cual fue un criterio en el diseño de la superficie de respuesta, ya que el jarabe de agave óptimo, con fines prácticos de manipulación, se fijó en 75°Bx. Como se observa en la Tabla 12, los jarabes de agave que cumplen con este parámetro son: el obtenido experimentalmente (JAERv\*) y los dos jarabes comerciales de agave azul (Abeja Reyna y Enature). Un estudio comparó características de edulcorantes naturales entre ellos el jarabe de agave azul, jarabe de maíz, caña y también la miel, reportaron que los jarabes de agave azul en promedio tenían una concentración de SST de 76°Brix, los jarabes de maíz de 75° Brix, los de caña 79 °Bx y la miel mostró la mayor concentración con un promedio de 82°Bx (64), este estudio indica que los jarabes no sobrepasan los 80°Brix, como en el caso de la miel mostrando una mejor manipulación del producto. De igual forma este estudio indica que un jarabe con un bajo contenido en SST y un alto contenido de humedad hace susceptible al producto al desarrollo de patógenos.

La NOM-003-SAGARPA-2016 (26) indica que un jarabe de agave debe tener una cantidad de humedad entre 20 a 28 g/100 g, comparando la norma con las muestras analizadas, el JAERv\* cumple con este parámetro, al igual que los jarabes comerciales a excepción del

jarabe de la marca Abeja Reyna ®. Otros autores indicaron un contenido promedio de humedad del 22% para el jarabe de agave azul (64). La humedad o el agua es un factor importante en la miel, debido a la relación con su calidad, porque afecta propiedades como el color, cristalización, peso específico, viscosidad, estabilidad y características sensoriales, indicando que una miel con baja humedad son muy difíciles de manejar y procesar, mientras que las mieles con una alta humedad tienden a sufrir procesos de fermentación (161).

Con respecto al pH, la NOM-003-SAGARPA-2016 (26) indica un rango de 4 como mínimo y un máximo de 6, con respecto a los resultados obtenidos en la Tabla 12, se observa que la muestra JAERv\* cumple con los parámetros de la norma (pH= 4.57) al igual que las marcas comerciales, y únicamente el jarabe de agave de la marca Abeja Reyna ®, mostró el valor más alto no cumpliendo con los parámetros de esta norma.

En la determinación de acidez, el jarabe obtenido experimentalmente JAERv\* tenía una cantidad de 88.31 mg/L, mientras que el jarabe que mostró una concentración menor fue de la marca Enature ® y la mayor concentración fue el jarabe de la marca Maye (Tabla12), esta concentración de acidez se debe a los diferentes ácidos orgánicos que tiene la planta como consecuencia de la fotosíntesis, debido a que los agaves son plantas con un metabolismo del ácido crasuláceo (proceso de transpiración nocturna, en la cual abren sus estomas en la noche y fijan el carbono en ácidos orgánicos (162)). Observando los resultados de la Tabla 12, la mayor concentración de acidez titulable se encuentra presente en las muestras de jarabes de agave de la especie pulquera, indicando que aun en la etapa de rapado el agave produce estos ácidos orgánicos aumentando y preservando su concentración en el aguamiel.

Con respecto al contenido de cenizas la NOM-003-SAGARPA-2016 menciona un valor máximo de 0.60 g/100g (26), observando los resultados de la Tabla 12 las muestras que cumplen con este requisito son las procedentes de agave tequilero (Abeja Reyna y Enature) y del jarabe de agave pulquero de la marca Hacienda de Amoltepec,. Este resultado se debe a que los jarabes de agave pulquero están elaborados a partir de aguamiel, la cual reporta un porcentaje de cenizas en base seca de 3.10%, teniendo como minerales al potasio, calcio, sodio y en menor proporción hierro, cobre, magnesio, selenio y zinc (117), esto indica que

en el jarabe pulquero preserva estos minerales no importando su método de elaboración (rotavapor o sistema abierto).

Con respecto al contenido de proteína la NOM-003-SAGARPA-2016 y la NMX-FF-110-SCFI- 2008 no mencionan un rango de valor o si debe estar ausente del producto, al ser el aguamiel la materia prima de los jarabes de agave pulquero, estos mostraron la presencia de proteína con un porcentaje de 2.31%, 2.55% y 1.21% en las muestra de jarabes JAERV\*, Maye y Hacienda de Amoltepec respectivamente, este porcentaje se puede deber a la presencia de aminoácidos en el aguamiel como ácido aspártico y glutámico, serina, glicina, histidina, arginina, treonina, alanina, prolina, tirosina, valina, metionina, cisteína, isoleucina, leucina, fenilalanina y lisina (117), en un estudio reportaron que el contenido de proteína en jarabes de agave oscilaba entre 3.4 y 4.2 (% peso seco) y que la mayoría era aminoácidos libre y en especial prolina (19). Por otro lado, un estudio evaluó el contenido de proteína en el jarabe de agave pulquero, indicando un mayor concentración la especie *salmiana* (5.64%), cuando el aguamiel era concentrada a una temperatura de 80°C, pero esta disminuía cuando la temperatura era 95°C o el tiempo era más prolongado (tiempos de 14 horas), mismo comportamiento se observó con el jarabe de agave pulquero de la especie *atrovirens* donde la muestra presento valores más altos en proteína, y con un mismo comportamiento con los factores temperatura y tiempo (antes mencionados)(4), podríamos indicar que al ser 80°C una temperatura que no ocupó tantas horas de exposición al calor la reacción de Maillard no se lleva a cabo por completo, preservando proteína libre. Estos estudios resaltan que la presencia de los aminoácidos se encuentra presentes después de la elaboración de jarabe no importando el método de concentración, pero es importante controlar temperaturas y tiempos de concentración.

En la parte de evaluación microbiológica (la cual, no se realizó en el jarabe obtenido), la norma tiene límites permisibles para el jarabe de agave de un máximo de 100 UFC/g, es por eso que a la materia prima se realizó un pretratamiento, observando que la carga bacteriana disminuía considerablemente en la centrifugación y la eliminación de cualquier microorganismo al término de la pasteurización (Tabla 10). Esto indica que, si se mantiene las condiciones óptimas de higiene y esterilidad de la materia prima, el crecimiento bacteriano no se llevará a cabo, cumpliendo con los parámetros establecidos en la norma.

Otra característica que favorece la no proliferación de microorganismos en el jarabe de agave es la reducción de la actividad de agua, ya que al ser un alimento con un porcentaje de humedad no mayor a 25% (Tabla 12) se puede deducir una reducción de la actividad de agua, lo cual previene el crecimiento de células microbianas vegetativas, la germinación de esporas y la producción de toxinas por mohos y bacterias (163). También esta disminución de la actividad de agua, por la concentración de sólidos, genera en los microorganismos una condición de estrés (estrés hiperosmótico), debido a que las bacterias liberan el agua que contienen en su interior a través de la membrana plasmática, dejando a la bacteria seca y finalmente llevándola a la muerte (164).

Dos criterios importantes de calidad de la miel son la concentración de 5-hidroximetil-2-furfural (HMF) y el color (153), estos criterios se analizaron en los jarabes de agave, tanto de la especie pulquera y tequilera. La NOM-003-SAGARPA-2016 establece que el valor máximo permitido es de 0.7 g/100g. esto indica que tanto el JAERv\* (10.82 mg/100g) como los jarabes comerciales (2.38 a 33.53 mg/100g) cumplen con este parámetro. Como ya se mencionó, este parámetro indica frescura o un calentamiento excesivo de las mieles, debido a que las pentosas y hexosas se descomponen en una enolización lenta y una rápida eliminación de agua, formando estos compuestos indeseables (furanos principalmente 5-HMF), derivado de hexosas como la glucosa y la fructosa)(165),

Comparando el jarabe obtenido experimentalmente (JAERv\*) con las comerciales, el JAERv\* presentó un índice de oscurecimiento menor al resto, tanto de origen de agave pulquero como agave tequilero, se ha reportado que el color ámbar de la miel de abeja lo proporcionan principalmente los compuestos fenólicos y los productos de la reacción de Maillard, y este color se va oscureciendo durante el almacenamiento debido a la degradación de los compuestos fenólicos y la reacción de Maillard, pero otros factores como la composición propia del alimento, la actividad del agua, el pH, el tratamiento térmico aplicado durante el procesamiento, la temperatura y la duración del almacenamiento afectan el pardeamiento (153) como se observó anteriormente en la sección “vida útil”.

De igual forma los índices de oscurecimiento que muestra los otros jarabes, se deben a la reacción de Maillard producida por el tipo de elaboración del producto (Temperatura y

tiempo de calentamiento), un estudio donde elaboraron jarabe de agave pulquero en sistema abierto, indicó que las muestras que tenían mayor coloración oscura fueron las muestras de 70°C y 80°C con un tiempo de evaporación de 14 horas aproximadamente (4). También, el oscurecimiento se observó más en el jarabe que contenían una concentración mayor en compuestos fenólicos (Tabla 15), como fue el caso de la muestra de jarabe de agave de la marca Maye, este resultado concuerda con un estudio donde evaluaron la coloración de jarabes de arce indicando que los jarabes más oscuros mostraron mayor contenido de fenoles totales (166).

A las diferentes muestras de jarabe de agave también se les determinó el color con ayuda de un colorímetro, iniciando con la coordenada L, se observa en la Tabla 14, que la muestra que tuvo el valor más bajo fue de la marca Maye® ( $L^* = 39.88$ ), esto concuerda con el valor más alto en índice de oscurecimiento. Por otro lado, la muestra que presentó mayor luminosidad (más clara), fue la muestra JAERv\* con un valor de 51.90.

Un estudio evaluó el color con las coordenada CieLab en jarabes de agave de diferentes estados de la república: Estado de México, Hidalgo y Tlaxcala (21), los autores mencionan que en coordenada  $L^*$  los jarabes de agave tuvieron valores de 21.11, 19.14 y 21.02, respectivamente, estos valores indicaron que los jarabes tenían una coloración más oscura al JAERv\* y los jarabes comerciales analizadas en este estudio (Tabla 14). Para la coordenada  $a^*$  los valores que reportaron los autores fueron de: 12.82, 18.33 y 12.29 (respectivamente) y en coordenada  $b^*$  de 4.66, 7.80 y 3.44 (respectivamente), estas coordenadas indican que los jarabes analizados en el estudio tienden a un color rojizo (21), mientras que el jarabe JAERv\* ( $a = -3.41$  y  $b = 12.23$ ) tiende a un color amarillento, y los otros jarabes tienden a estar más cerca del centro indicando una coloración más oscura. Con respecto a los parámetros  $C^*$  y  $h^*$  la muestra obtenida mostró valores de 12.77 y 104.9 respectivamente, con en  $C^*$ , el jarabe que se asemeja al JAERv\* fue de la marca Enature®, para  $h^*$ , los jarabes que tiene un comportamiento similar fueron de las marcas Abeja Reyna® y Enature® (Tabla 14). Un estudio donde evaluaron la coloración en la elaboración del jarabe de agave pulquero (*salmiana* y *atrovirens*) indican que el valor de  $C^*$  aumento con el incremento de la temperatura dando valores de 4.36 a 6.61 pero en  $h^*$

no se observó este comportamiento, ya que las temperaturas de 90°C mostraron un menor valor, indicando que el tiempo de calentamiento y la temperatura afecta a estos valores (4).

Brudzgnskin y Miotto (167) y Singh *et al.* (166), mencionan que la coloración más oscura en edulcorantes naturales (miel o jarabe de arce), tiene relación con una mayor capacidad antioxidante, por lo que se decidió evaluar de igual forma sus compuestos y actividad antioxidante de las mieles o jarabes de agave comerciales. En los compuestos fenólicos, en el JAERv\* contiene 14.78 mg EAG/100 g, estos compuesto son metabolitos aromáticos secundarios de las plantas ampliamente distribuidos en todo el reino vegetal y asociados con el color, las cualidades sensoriales y las propiedades nutricionales y antioxidantes de los alimentos (168), López-Romero (169) reportó la presencia de compuestos fenólicos en un extracto de *Agave agustifolia*, con una concentración de 21.7 mg EAG/g, este reporte indica que la concentración de aguamiel para elaborar jarabe mediante evaporación al vacío, ayuda a la concentración de estos compuestos (Tabla 9 y 15), pero la especie de agave influye significativamente, debido a que los jarabes de agave pulquero mostraron mayor cantidad que las de agave tequilero, lo cual concuerda con los resultados de Ahumada-Santos (170), reportando la presencia de flavonoides en *A. ornithobroma* y cantidades trazas en agave tequilero Tabla 16. López-Romero *et al* indicaron la presencia de compuestos fenólicos como kaempferol, kaemperol-3-glucoside, miricentin-3-O-rhamnoside y quercetin-3-O-arabinoside\_(171).

El ácido ascórbico es un compuesto antioxidante presente en aguamiel, y que se ve afectado por tratamientos térmicos de pasteurización (105°C por 15 minutos), ya que hubo una disminución de 13.50 mg/100 g a 11.98 mg/100g después de someterla a este proceso (108), caso contrario en la concentración del aguamiel para la obtención del jarabe (muestra JAERv\*), en las Tablas 9 y 15 se muestra, que existe un aumento en su concentración después de ser sometida a evaporación al vacío, esto demuestra que la temperatura y la ausencia de oxígeno, a lo que fue sometida el aguamiel, no afecta a este compuesto. De igual forma se observa que la concentración de ácido ascórbico depende del origen botánico, reportándose cantidades que van desde 2.01 hasta 9 mg/100 mL en el aguamiel

(8,172) y esto concuerda con los datos presentes en la Tabla 16, donde los jarabes de agave pulquero mostraron mayor cantidad que los de agave tequilero.

Las betalainas son compuestos que dan coloraciones amarillas y rojas, el JAERv\* tenía una tonalidad amarilla clara, suponiendo la presencia de estos compuestos en una concentración de 0.10 mg/100 g para betacianinas y betaxantinas, este resultado es similar a lo reportado por Skalicky *et al* (173), donde compararon la coloración de extractos de hipocótilos de *Beta vulgaris*, donde uno de los extractos muestra se asemejaba al color del jarabe obtenido experimentalmente, el extracto tenía un contenido de 0.16 mg/100 mL para betacianinas y 0.35 mg/100 mL betaxantinas. En el caso de los jarabes de agave tequilero, mostraron una menor concentración que las de agave pulquero, y cabe resaltar que la presencia de compuestos propios del alimento influyen en su concentración, debido a que estas estructuras parten de una misma base (ácido betalámico), pero cuando existe la presencia de compuestos como con un grupo amino la concentración de betaxantinas aumenta (137) y esto se corrobora con el jarabe de agave de la marca Maye®, ya que fue la que mayor cantidad de proteína presentó al igual que betaxantinas.

Acerca de la capacidad antioxidante de algunos edulcorantes naturales se ha reportado que el jarabe de agave de la especie *salmiana*, tiene una mayor capacidad antioxidante con respecto al jarabe de agave tequilero, la miel, la caña de azúcar y el jarabe de maíz (28), esto se muestra en la Tabla 16, corroborando que los jarabes con mayor actividad antioxidante en los ensayos son de la especie pulquera y el JAERv\*(DPPH<sup>•+</sup>: 13.33 mg ET/100g, ABTS<sup>•+</sup>: 28.54 mg ET/100g y FRAP: 6.17 mmol Fe (II)/ 100 g respectivamente). De igual forma, se demuestra que la concentración del aguamiel con ERV, incrementa la actividad antioxidante en el jarabe, ya que es un estudio de extracto de *A. angustifolia* reportó una actividad de captación de radicales libres de 2.43 mg ET/g en DPPH, 6.16 mg ET/100g en ABTS y 0.14 mmo ET/g en FRAP (169).

Por otro lado, se analizó la viscosidad de los jarabes o mieles de agave, indicando una gran diferencia en ellas, siendo el JAERv\* la que obtuvo mayor viscosidad (3224.66 cP), (Tabla 16), aun cuando presentaron valores de SST similares a los jarabes de jarabe de agave de

las marcas Abeja Reyna ® y Enature ® (Tabla 12). Estos resultados indican que el JAERV\* contiene moléculas diferentes a los jarabes comerciales. En el aguamiel se ha reportado compuestos como fructooligosacáridos, los cuales tienen un grado de polimerización de 3 a 10 unidades con enlaces de tipo  $\beta$ -2,1 y  $\beta$ -2,6, estos fructooligosacáridos pueden ser inulinas, levanas o agavinas al igual que compuestos como 1-ketosa, 1-nistosa y 1-F- $\beta$ -fructofuranosilnistosa (13,113), estos productos al ser de un grado mayor de polimerización comparado con mono o disacáridos afectan la viscosidad. Un estudio analizó la influencia de los tratamientos térmicos en la composición del aguamiel y el jarabe de agave de la especie *salmiana*, los autores reportaron que al realizar procesos como pasteurización a 121°C durante 15 minutos, disminuye la concentración de 1-ketosa y la eliminación de 1-nistosa y 1-F- $\beta$ -Fructofuranosilnistosa (72), por lo que, al realizar un pretratamiento, de la materia prima, con una temperatura no mayor a 80°C y una concentración a una temperatura no mayor de 70°C del aguamiel, es posible que la alta viscosidad de la muestra se debe a la presencia de estos compuestos, suponiendo que aún se preservan con la concentración por ERV.

De igual forma se puede observar en la Tabla 12, que el jarabe que presentó mayor contenido en azúcares reductores fue de la marca Abeja Reyna ®, lo cual indica que es una posible fuente alta en fructosa, mientras que el jarabe obtenido experimentalmente JAERV\* mostró la menor concentración de estos azúcares, esta diferencia se puede deber al proceso de hidrólisis en la elaboración, ya que en el jarabe de agave por ERV, no se realiza una hidrólisis total, como en el caso de los jarabes pulqueros (marca Maye ® y Hacienda de Amoltepec) y el jarabe de agave tequilero Enature ®. Con respecto al contenido de sacarosa, se observa que los jarabes de agave pulquero fueron los que obtuvieron los valores más altos, siendo el jarabe JAERV\* el que tenía mayor contenido (49.52 g/100g), y en segundo lugar el jarabe de la marca Maye® (30.13g/100g y Hacienda de Amoltepec (22.61 g/100g) y en los jarabes o miles de agave tequilero azul se observan cantidades trazas. El resultado obtenido de los diferentes jarabes analizados coincide con lo reportado por Leal-Díaz *et al.*, debido a que ellos reportan que la concentración de aguamiel de *Agave salmiana* contiene un mayor contenido de sacarosa, seguido de glucosa y menor concentración de fructosa (44). Muñiz-Marquez *et al.* (72), también contribuyen a esta

información, ya que reportaron que el jarabe de agave contiene fructosa, glucosa y un mayor contenido de sacarosa, al igual que se observa una disminución de ketosa y compuestos oligoméricos. Este cambio en la composición de azúcares propios del aguamiel, se debe a que los tratamientos térmicos favorecen la hidrólisis de carbohidratos complejos a azúcares libres de tipo mono y disacáridos (174,175). Es importante mencionar, que la alta concentración de azúcares totales se obtuvo en el jarabe de la marca Enature ® (69.31 g/100g) y también, fue quien presentó mayor contenido de azúcares reductores, indicando que en composición existe una mayor concentración de fructosa y glucosa, con respecto al jarabe obtenido experimentalmente (JAERV\*), se observa una alta concentración de azucares totales (62.67 g/100g), pero esto se debe por su alta concentración de sacarosa y no de azúcares reductores (Tabla 12.)

Para la determinación del índice glucémico se realizó una estimación *In vitro* Tabla 17, un valor de eIG de 36.65 para JAERV\*, siendo similar al valor del jarabe de jarabe de agave tequilero de la marca Enature ® la cual tenía un valor de 38.78, estos valores indican que los jarabes analizados contienen un bajo índice glucémico, ya que sus valores no sobrepasan el valor de 55 establecido por la Asociación Americana de Diabetes (33). Leal-Diaz también analizaron el IG del concentrado de aguamiel obtenido por ebullición en sistema abierto del *Agave salmiana*, obteniendo un IG de 47.6, catalogándolo aún como un alimento con un bajo IG a pesar de las altas concentraciones de sacarosa y glucosa, ellos plantean la hipótesis de que “compuestos distintos de los azúcares son los responsables del bajo IG” (44). Realizando esta comparación, se indica que la concentración de aguamiel por ERV, preserva estos compuestos que ayudan a que se mantenga su IG bajo en el jarabe. Al observar los cambios de concentración de glucosa en la cinética *in vitro* (Anexo C-1), en la determinación del IG, los cambios en la concentración, el JAERV\* mostró un aumento en el contenido de glucosa a los 120 min, mientras que los jarabes de la marca Abeja Reyna® y Hacienda de Amoltepec presentaron los picos más altos a los 90 min. Espino *et al.* (176), mencionan que un pico máximo de glucosa en la evaluación de IG *in vivo* al minuto 30 indica la presencia de carbohidratos de rápida digestión, mientras que los alimentos que tiene un incremento después del minuto 120 indican la presencia de carbohidratos de lenta

digestión. Al comparar los resultados de la viscosidad y la cinética del IG *in vitro* se puede afirmar la posible presencia de carbohidratos complejos en el JAERv\*.

## IX CONCLUSIONES

- La composición inicial de la materia prima, influyo estadísticamente el desarrollo de la superficie de respuesta y la reproducibilidad debido a que se ve afectada por condiciones climáticas y de estación del año.
- El uso de un diseño de tipo Box-Behnken permitió optimizar los procesos de obtención del jarabe de agave pulquero con una buena reproducibilidad para SST, además de permitir evaluar los cambios en los compuestos bioactivo de estudio.
- La obtención del jarabe de agave por evaporación rotatoria al vacío es un proceso rápido y que afecta en menor medida las características fisicoquímicas del aguamiel, preservando sus compuestos bioactivos.
- La vida útil del jarabe de agave pulquero almacenado a temperatura ambiente evidencio estabilidad en los primeros 60 días.
- El jarabe de agave pulquero presentó un bajo índice glucémico (36.65) y una capacidad antioxidante mayor que los jarabes tequileros comerciales.

## **X. RECOMENDACIONES**

Para futuras investigación se recomienda probar el jarabe de agave pulquero en experimentos *in vivo* para la determinación del IG real y evaluar su efecto, benéfico en pacientes con diabetes y obesidad.

Para incrementar el porcentaje de reproducción de la predicción, partir de un lote de aguamiel homogenizado y de mayor volumen.

Realizar una determinación para conocer el perfil y la concentración de carbohidratos (monosacáridos, disacáridos y fructooligosacáridos) presentes en el jarabe de agave pulquero y evaluar la cristalización de la muestra debido a que influye con el tipo y concentración de carbohidratos presentes

Evaluar atributos como color, olor y sabor mediante pruebas sensoriales de tipo afectiva para conocer el nivel de agrado por parte de consumidores potenciales.

**XI. REFERENCIAS**

1. Narvaez-Zapata A, Sanchez-Teyer F. Agaves as a Raw Material: Recent Technologies and Applications. *Recent Patents on Biotechnology*. 2009;3(3):185–91.
2. Pérez-Zavala M de L, Hernández-Arzaba JC, Bideshi DK, Barboza-Corona JE. Agave: a natural renewable resource with multiple applications. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2020;100(15):5324–33.
3. López-Romero JC, Ayala-Zavala JF, González-Aguilar GA, Peña-Ramos EA, González-Ríos H. Biological activities of Agave by-products and their possible applications in food and pharmaceuticals. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2018;(7):2461–74.
4. González-Montemayor ÁM, Flores-Gallegos AC, Serrato-Villegas LE, Ruelas-Chacón X, López MG, Rodríguez-Herrera R. Processing temperature effect on the chemical content of concentrated aguamiel syrups obtained from two different Agave species. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 2020;14(3):1733–43.
5. Torres-García I, Rendón-Sandoval F, Blancas J, Casas A, Moreno-Calles A. The genus Agave in agroforestry systems of Mexico. *Botanical Sciences*. 2019;97(3):263–90.
6. Pinedo-Espinoza J, Gutiérrez-Tlahque J, Santiago-Saenz Y, Aguirre-Mancilla C, Reyes-Fuentes M, López-Palestina C. Nutritional Composition, Bioactive Compounds and Antioxidant Activity of Wild Edible Flowers Consumed in Semiarid Regions of Mexico. *Plant Foods for Human Nutrition*. 2020;75(3):413–9.
7. Márquez-Aguirre AL, Camacho-Ruiz RM, Gutiérrez-Mercado YK, Padilla-Camberos E, González-Ávila M, Gálvez-Gastélum FJ, et al. Fructans from Agave tequilana with a Lower Degree of Polymerization Prevent Weight Gain, Hyperglycemia and Liver Steatosis in High-Fat Diet-Induced Obese Mice. *Plant Foods for Human Nutrition*. 2016;71(4):416–21.
8. Tovar L, Olivos M, Gutiérrez M. Pulque, an alcoholic drink from rural Mexico, contains phytase. Its in vitro effects on corn tortilla. *Plant Foods for Human Nutrition*. 2008;63(4):189–94.
9. Mabroum S, Aboulayt A, Taha Y, Benzaazoua M, Semlal N, Hakkou R. Elaboration of geopolymers based on clays by-products from phosphate mines for construction applications. *Journal of Cleaner Production*. 2020;261:121317.
10. Narváez AU, Martínez T, Jiménez MA. El cultivo de maguey pulquero: opción para el desarrollo de comunidades rurales del altiplano mexicano. *Revista de Geografía*

- Agrícola. 2016;56:33–44.
11. Escalante A, López DR, Velázquez JE, Giles-Gómez M, Bolívar F, López-Munguía A. Pulque, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage: Historical, microbiological, and technical aspects. *Frontiers in Microbiology*. 2016;7:1026.
  12. José R, García E. Remoción Cuticular (“Mixiote”) y Desarrollo Foliar en los Agaves pulqueros (*Agave Salmiana* y *A. Mapisaga*). *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 2000;66.
  13. Isabel Enríquez-Salazar M, Veana F, Aguilar CN, De la Garza-Rodríguez IM, López MG, Rutiaga-Quiñones OM, et al. Microbial diversity and biochemical profile of aguamiel collected from *Agave salmiana* and *A. atrovirens* during different seasons of year. *Food Science and Biotechnology*. 2017;26(4):1003–11.
  14. Hernández C. Maguey pulquero. UNAM, Instituto de Biología (IBUNAM).
  15. García RM, Galán M, Cuevas J, Álvarez R. Identificación y caracterización morfológica de agaves en sistemas agroforestales con metepantle en tierras campesinas. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 2020;11(4):917–29.
  16. Ortiz-Basurto RI, Pourcelly G, Doco T, Williams P, Dormer M, Belleville MP. Analysis of the main components of the aguamiel produced by the maguey-pulquero (*Agave mapisaga*) throughout the harvest period. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008;56(10):3682–7.
  17. Michel-Cuello C, Juárez-Flores BI, Aguirre-Rivera JR, Pinos-Rodríguez JM. Quantitative characterization of nonstructural carbohydrates of mezcal agave (*Agave salmiana* Otto ex Salm-Dick). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008;56(14):5753–7.
  18. Castro-Rodríguez D, Sánchez-Hernández H, Yáñez J. Probiotic Properties of *Leuconostoc mesenteroides* Isolated from Aguamiel of *Agave salmiana*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 2015;7(2):107–17.
  19. Santos-Zea L, Leal-Díaz AM, Jacobo-Velázquez DA, Rodríguez-Rodríguez J, García-Lara S, Gutiérrez-Urbe JA. Characterization of concentrated agave saps and storage effects on browning, antioxidant capacity and amino acid content. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2016;45:113–20.
  20. Huezcas-Garrido L, Alanís-García E, Ariza-Ortega JA, Zafra-Rojas QY. Subproductos de interés nutricional y funcional de *Agave salmiana*. *Revista chilena de nutrición*. 2022;49(2):250–62.
  21. Espíndola-Sotro V, Trejo-Márquez MA, Lira-Vargas AA, Pascual-Bustamante S. Caracterización de aguamiel y jarabe de agave originario del Estado de México, Hidalgo y Tlaxcala. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 2018;3:522–8.

22. NORMEX. NMX-V-022-1972 "Aguamiel". DOF (Diario Oficial de la federación) México; 1972.
23. Vicente-Magueyal FJ, Bautista-Méndez A, Villanueva-Tierrablanca HD, García-Ruíz JL, Jiménez-Islas H, Navarrete-Bolaños JL. Novel process to obtain agave sap (aguamiel) by directed enzymatic hydrolysis of agave juice fructans. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*. 2020;127:109387.
24. Sánchez V, Concha V, Prieto L, Carranza J. Encapsulación del jarabe de agave. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 2016;1(1):600–5.
25. Willems JL, Low NH. Major carbohydrate, polyol, and oligosaccharide profiles of agave syrup. Application of this data to authenticity analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2012;60(35):8745–54.
26. DOF. Norma Oficial Mexicana NOM-003-SAGARPA-2016, Relativa a las características de sanidad, calidad agroalimentaria, autenticidad, etiquetado y evaluación de la conformidad del jarabe de agave - 18 de Noviembre de 2016 - DOF. *Diario Oficial de la Federación* -. 2016.
27. Torres A. Evaluación de dos procesos para la obtención de miel del Agave atrovirens karw. Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro" División de Ciencia Animal Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos; 2014.
28. Velázquez I, González-García G, Mellado-Mojica E, Veloz R., Dzul J, López M, et al. Phytochemical profiles and classification of Agave syrups using 1H-NMR and chemometrics. *Food Science and Nutrition*. 2019;7(1):3–13.
29. Espíndola-Sotres V, Trejo-Márquez M, Lira-Vargas A, Ramírez-Ortíz M. Estandarización del proceso de elaboración de jarabe a partir de aguamiel. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 2018;3:515–21.
30. Mellado-Mojica E, López MG. Identification, classification, and discrimination of agave syrups from natural sweeteners by infrared spectroscopy and HPAEC-PAD. *Food Chemistry*. 2015;167:349–57.
31. Phillips KM, Carlsen MH, Blomhoff R. Total Antioxidant Content of Alternatives to Refined Sugar. *Journal of the American Dietetic Association*. 2009;109(1):64–71.
32. Wolever T, Augustin L, Brand-Miller J, Delport E, Livesey G, Ludwig D, et al. Glycemic index is as reliable as macronutrients on food labels. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2017;105(3):768–9.
33. Association AD. ¿Qué puedo comer? La Guía de la Diabetes sobre opciones de alimentos saludables. *Portufamilia.org*. 2010;8–9.
34. Venn BJ, Green TJ. Glycemic index and glycemic load: Measurement issues and their effect on diet–disease relationships. *European Journal of Clinical Nutrition*.

- 2007;61:S122–31.
35. Foster-Powell K, Holt SHA, Brand-Miller JC. International table of glycaemic index and glycaemic load values: 2002. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2002;76(1):5–56.
  36. Uwineza PA, Waśkiewicz A. Recent Advances in Supercritical Fluid Extraction of Natural Bioactive Compounds from Natural Plant Materials. *Molecules*. 2020;25(17):3847.
  37. Martínez-Navarrete N, Canacho M, Martínez J. Los compuestos bioactivos de las frutas y sus efectos en la salud. *Revista Española de Nutrición Humana y Dietética*. 2008;12(2):64–8.
  38. Elhadi Y. *Fruit and Vegetable Phytochemicals*. Autonomous. Queretaro, México: John Wiley & Sons Ltd; 2018.
  39. Pasupuleti VR, Sammugam L, Ramesh N, Gan SH. Honey, Propolis, and Royal Jelly: A Comprehensive Review of Their Biological Actions and Health Benefits. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2017;2017.
  40. Bermúdez-Bazán M, Castillo-Herrera GA, Urias-Silvas JE, Escobedo-Reyes A, Estarrón-Espinosa M. Hunting Bioactive Molecules from the Agave Genus: An Update on Extraction and Biological Potential. *Molecules*. 2021;26(22):6789.
  41. Atayoğlu AT, Soylu M, Silici S, İnanç N. Glycaemic index values of monofloral turkish honeys and the effect of their consumption on glucose metabolism. *Turkish Journal of Medical Sciences*. 2016;46(2):483–8.
  42. Ischayek JI, Kern M. US Honeys Varying in Glucose and Fructose Content Elicit Similar Glycaemic Indexes. *Journal of the American Dietetic Association*. 2006;106(8):1260–2.
  43. Robert S, Ismail A. Two varieties of honey that are available in malaysia gave intermediate glycaemic index values when tested among healthy individuals. *Biomedical Papers*. 2009;153(2):145–8.
  44. Leal-Díaz AM, Noriega LG, Torre-Villalvazo I, Torres N, Alemán-Escondrillas G, López-Romero P, et al. Aguamiel concentrate from Agave salmiana and its extracted saponins attenuated obesity and hepatic steatosis and increased Akkermansia muciniphila in C57BL6 mice. *Scientific Reports*. 2016;6(1):1–15.
  45. Bobiş O, Dezmirean DS, Moise AR. Honey and Diabetes: The Importance of Natural Simple Sugars in Diet for Preventing and Treating Different Type of Diabetes. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2018;2018.
  46. Moniruzzaman M, Sulaiman SA, Azlan SAM, Gan SH. Two-year variations of phenolics, flavonoids and antioxidant contents in acacia honey. *Molecules*.

- 2013;18(12):14694–710.
47. Aljadi AM, Kamaruddin MY. Evaluation of the phenolic contents and antioxidant capacities of two Malaysian floral honeys. *Food Chemistry*. 2004;85(4):513–8.
  48. Pichichero E, Canuti L, Canini A. Characterisation of the phenolic and flavonoid fractions and antioxidant power of Italian honeys of different botanical origin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2009;89(4):609–16.
  49. Brudzynski K, Miotto D. Honey melanoidins: Analysis of the compositions of the high molecular weight melanoidins exhibiting radical-scavenging activity. *Food Chemistry*. 2011;127(3):1023–30.
  50. Moniruzzaman M, Khalil MI, Sulaiman SA, Gan SH. Physicochemical and antioxidant properties of Malaysian honeys produced by *Apis cerana*, *Apis dorsata* and *Apis mellifera*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2013;13.
  51. Can Z, Yildiz O, Sahin H, Akyuz Turumtay E, Silici S, Kolayli S. An investigation of Turkish honeys: Their physico-chemical properties, antioxidant capacities and phenolic profiles. *Food Chemistry*. 2015;180:133–41.
  52. Olvera-Garcia V, Cardador-Martinez A, Martin del Campo ST. Effect of thermal process and filtration on the antioxidant activity and physicochemical parameters of *Agave atrovirens* extracts. *Journal of Food Research*. 2014;4(1):155.
  53. Rippe J, Angelopoulos T. Sugars, obesity, and cardiovascular disease: results from recent randomized control trials. *European journal of nutrition*. 2016;55(2):45–53.
  54. Agustin LS, Franceschi S, Jenkins JDA, Kendall CWC, La Vecchia C. Glycemic index in chronic disease: A review. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2002;56(11):1049–71.
  55. Qi X, Tester RF. Fructose, galactose and glucose – In health and disease. *Clinical Nutrition ESPEN*. 2019;33:18–28.
  56. Vázquez Hernández M, Guevara R, Aguirre H, Alvarado A, Romro H. Current consumption of natural sweeteners (benefits and problems): Stevia. *Revista Médica Electrónica*. 2017;168–75.
  57. Briones-Avila L, Moranchel-Hernández M, Moreno-Riolobos D, Silva T, Ortega A, Villaseñor K, et al. Analysis of caloric and noncaloric sweeteners present in dairy products aimed at the school market and their possible effects on health. *Nutrients*. 2021;13(9).
  58. Hills S, Mitchell P, Wells C, Russell M. Honey supplementation and exercise: a systematic review. *Nutrients*. 2019;11(7).
  59. Ramli N, Chin K, Zarkasi K, Ahmad F. A review on the protective effects of honey

- against metabolic syndrome. *Nutrients*. 2018;10(8).
60. Atkinson F, Brand-Miller J, Foster-Powell K, Buyken A, Goletzke J. International tables of glycemic index and glycemic load values 2021: a systematic review. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2021;
  61. Nagai N, Ito Y, Taga A. Comparison of the enhancement of plasma glucose levels in type 2 diabetes Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats by oral administration of sucrose or maple syrup. *Journal of Oleo Science*. 2013;62(9):737–43.
  62. Redmer J, Minichiello V. Undertandings sweeteners. *Pacific Institute for Research and Evaluation*. 2014;1–4.
  63. Hooshmand S, Holloway B, Nemoseck T, Cole S, Petrisko Y, Young H, et al. Effects of Agave Nectar Versus Sucrose on Weight Gain, Adiposity, Blood Glucose, Insulin, and Lipid Responses in Mice. 2014;17(9):1017–21.
  64. Mellado-Mojica E, López-Pérez M. Análisis comparativo entre jarabe de agave azul (Agave tequilana weber Var. Azul) y otros jarabes naturales. *Agrociencia*. 2013;47:233–44.
  65. Rothschild J, Rosentrater K, Onwulata C, Singh M, Menutti L, Jambazian P, et al. Influence of quinoa roasting on sensory and physicochemical properties of allergen-free, gluten-free cakes. *International Journal of Food Science & Technology*. 2015;50(8):1873–81.
  66. Zamora-Gasga V, Bello-Pérez L, Ortíz-Basurto R, Tovar J, Sáyago-Ayerdi S. Granola bars prepared with Agave tequilana ingredients: Chemical composition and in vitro starch hydrolysis. *LWT - Food Science and Technology*. 2014;56(2):309–14.
  67. Ng A, Loh KK, Gupta N, Narayanan K. A polyol-stevia blended sugar replacer exhibits low glycemic response among human subjects. *Clinical nutrition Espen*. 2019;33:39–41.
  68. Navarrete-Torres M, Muñoz-Aparicio C. The “pulque” the drink of the gods with milenary value and tradition. *Journal of Tourism and Heritage Research*. 2021;4(1):20–36.
  69. Narváez-Suárez AU, Jiménez-Velázquez MA, Martínez-Saldaña T, Cruz-Galindo B. Pulque maguey (Agave salmiana Otto ex Salm-Dyck): An option for rural develoment. *Agroproductividad*. 2016;9(10):56–62.
  70. Flores R, Flores I, Rodriguez R, Vázquez MA. Derived products from alternative maguey growth in Atotonilco de Tula and Tetepango Hidalgo. *Boletín científico de la escuela superior Tepeji del Rio (UAEH)*. 2017;4(8).
  71. Ozuna C, Franco-Robles E. Agave syrup: An alternative to conventional sweeteners? A review of its current technological applications and health effects. *LWT*.

- 2022;162:113434.
72. Muñiz-Márquez DB, Contreras JC, Rodríguez R, Mussatto SI, Wong-Paz JE, Teixeira JA, et al. Influence of thermal effect on sugars composition of Mexican Agave syrup. *CYTA - Journal of Food*. 2015;13(4):607–12.
  73. Erejuwa OO, Sulaiman SA, Ab Wahab MS. Honey - A novel antidiabetic agent. *International Journal of Biological Sciences*. 2012;8(6):913–34.
  74. Dubos R, Brock TD. Pasteurization. *Pasteur and Modern Science*. 2014;52–66.
  75. Grabowski NT, Klein G. Microbiology and foodborne pathogens in honey. *Critical reviews in food science and nutrition*. 2017;57(9):1852–62.
  76. Strahsburger E, Retamales P, Estrada J, Seeger M. Microdot method: used with chromogenic agar is a useful procedure for sanitary monitoring in aquaculture. *Latin american journal of aquatic research*. 2016;44(4):742–9.
  77. NORMEX. NMX-F-103-1982. Alimentos. Frutas y derivados. Determinación de grados Brix. DOF (Diario oficial de la federación) México; 1982.
  78. Kawahigashi H, Kasuga S, Okuizumi H, Hiradate S, Yonemaru J. Evaluation of Brix and sugar content in stem juice from sorghum varieties. *Grassland Science*. 2013;59(1):11–9.
  79. NORMEX. NMX-F-317-2013. Alimentos determinación de pH en alimentos y bebidas no alcohólicas. Método potenciométrico-Método de prueba. DOF (Diario oficial de la federación) México; 2013.
  80. NMX-F-102-S-1978 Determinación de la acidez titulable en productos elaborados a partir de frutas y hortalizas. DOF (Diario oficial de la federación) México; 1978.
  81. AOAC. Association of Official Analytical Chemists. 16 td. Gatherstoung. E.U.U.; 1999.
  82. Chalplin MF. Monosaccharides. *Carbohydrate Analysis: A Practical Approach*. Chalplin MF, Kennedy JF, editors. Oxford, England; 1986. 1–36 p.
  83. Stintzing FC, Herbach KM, Mosshammer MR, Carle R, Yi W, Sellappan S, et al. Color, betalain pattern, and antioxidant properties of cactus pear (*Opuntia* spp.) clones. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005;53(2):442–51.
  84. Vega A, De León JA, Reyes SM. Determination of the Content of Total Polyphenols, Flavonoids and Antioxidant Activity in 34 Commercial Coffee Brands of Panama. *Información Tecnológica*. 2017;28(4):29–38.
  85. Zago K, Garcia F, Bernando M, Vit P, Luna JR, Gualtierri M. Determinación del contenido de vitamina C en miel de abejas venezolanas por volumetría de óxido-

- reducción. *Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel*. 2010;41:25–30.
86. Stintzing FC, Schieber A, Carle R. Evaluation of colour properties and chemical quality parameters of cactus juices. *European Food Research and Technology* . 2003;2016:303–11.
  87. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset CL. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *LWT-Food Science and Technology*., 1995;28:559–62.
  88. Mesa-Vanegas A, Zapata-Uribe S, Arana LM, Zapata I, Monsalve Z, Rojano B. Actividad antioxidante de extractos de diferente polaridad de *Ageratum conyzoides* L. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 2015;14(1):1–10.
  89. Thaipong K, Boonprakob U, Crosby K, Cisneros-Zevallos L, Hawkins Byrne D. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2006;19(6–7):669–75.
  90. Robinson TJ. Box-Behnken Designs. *Encyclopedia of statistics in quality and reliability*. John Wiley & Sons, Ltd; 2014.
  91. Man D. Shelf Life. Vol. 2. UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2015.
  92. UNAM. Fundamentos y técnicas de análisis de alimentos. México: Departamento de alimentos y biotecnología; 2007.
  93. Cardoso F, Pedroso F, Martínez M, Chang J, Fernández V, Verez V. Validación del método del bial para su utilización en el control de calidad. *Revista Cubana de Química*. 2005;16(1):28.
  94. Subovsky MJ, Sosa López Á, Castillo A, Cano N. Evaluación del contenido de Hidroximetilfurfural en mieles del Nordeste Argentino. *Agrotecnia*. 2004;12(12):32–3.
  95. Villar M, Villar P, Cobo S, Rodríguez MD, Serrano M. Determinación de hidroximetilfurfural en mieles como parámetro indicador de la calidad de las mismas. *Revista de Ciencia de la Universidad Pablo de Olavide*. 2015;18:3.
  96. Manayay D, Ibarz A. Modeling the kinetics nonenzymatic browning reactions and rheological behavior in the thermal process of fruit juices and pulps. *Scientia Agropecuaria*. 2010;1(2):155–68.
  97. Meydavi S, Saguy I, Kopelman IJ. Browning determination in citrus products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1977;25:602–4.
  98. Bordim J, Lise CC, Marques C, Oldoni TC, Varela-Tomasco P, Mitterer-Daltoé M.

- Potential use of naturally colored antioxidants in the food industry-A study of consumers' perception and acceptance. *Journal of Sensory Studies*. 2021;36(4):15.
99. Mardones L, Juanto S. Laboratorio: Medida de viscosidad. In: *Química Aplicada*. Buenos Aires: Universidad Tecnológica Nacional;
  100. Brookfield. Medición de la viscosidad por el método de Brookfield | *QuimiNet.com* [Internet]. *QuimiNet.com*. 2008.
  101. Marcelo Fernández J, López Miranda Pérez Jiménez JF. Glycemic index and physical exercise Índice glucémico y ejercicio físico. *Revista Andaluza de Medicina del Deporte*. 2008;1(3):116–40.
  102. Guerrero JCM, Romero RR, Zepeda RAG, Hernández RO, Jiménez SR, Ríos Chávez AN, et al. Determinación del índice glucémico y la carga glucémica de productos lácteos fermentados en sujetos adultos sanos, sedentarios y deportistas. *Nutricion Hospitalaria*. 2016;33(5):1095–101.
  103. Goñi I, Garcia-Alonso A, Saura-Calixto F. A starch hydrolysis procedure to estimate glycemic index. *Nutrition Research*. 1997;17(3):427–37.
  104. Díaz-Osorio A, Martínez-Castaño M, Contreras-Calderon J, Gallardo-Cabrera C. Glycemic index in vitro, phenolic content and antioxidant activity of snacks made with unripe banana (*Musa paradisiaca*) and Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) flours. *Información Tecnológica*. 2019;30(5).
  105. Aleixandre A, Benavent-Gil Y, Rosell C. Effect of Bread Structure and In Vitro Oral Processing Methods in Bolus Disintegration and Glycemic Index. *Nutrients*. 2019;11(9).
  106. Ferrer-Mairal A, Peñalva-Lapuente C, Iglesia I, Urtasun L, De Miguel-Etayo P, Remón S, et al. In vitro and in vivo assessment of the glycemic index of bakery products: Influence of the reformulation of ingredients. *European Journal of Nutrition*. 2012;51:947–54.
  107. Granfeldt Y, Björck I, Drews A, Tovar J. An in vitro procedure based on chewing to predict metabolic response to starch in cereal and legume products. *European Journal of Clinical Nutrition*. 1992;46(9):649–60.
  108. Chagua P, Malpartida R, Ruíz A. Pasteurization time and its response in the chemical characteristics and antioxidant capacity of aguamiel from *Agave americana* L. *Revista de Investigaciones Altoandinas*. 2020;22:45–57.
  109. Rodríguez R, Jiménez JF, Real JJ, del Salcedo E, Zamora, J. F., & Covarrubias GÍ. Utilización de subproductos de la industria tequilera. Parte 11. Compostaje de bagazo de agave crudo y biosólidos provenientes de una planta de tratamiento de vinazas tequileras. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 2013;29(4):303–3013.

110. Tovar-Robles CL, Perales-Segovia C, Cedillo A, Valera-Montero LL, Gómez-Leyva JF, Guevara-Lara F, et al. Effect of aguamiel (agave sap) on hematic biometry in rabbits and its antioxidant activity determination. *Italian Journal of Animal Science*. 2011;10(2):e21.
111. Peralta-García I, González-Muñoz F, Elena RAM, Sánchez-Flores A, López-Munguía A. Evolution of Fructans in Aguamiel (Agave Sap) During the Plant Production Lifetime. *Frontiers in Nutrition*. 2020;0:175.
112. Manosroi A, Sainakham M, Chankhampan C, Manosroi W, Manosroi J. In vitro anti-cancer activities of Job's tears (*Coix lachryma-jobi* Linn.) extracts on human colon adenocarcinoma. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2016;23(2):248–56.
113. Picazo B, Flores-Gallegos AC, Iliina A, Rodríguez-Jasso RM, Aguilar CN. Production of an enzymatic extract from *Aspergillus oryzae* dia-mf to improve the fructooligosaccharides profile of aguamiel. *Frontiers in Nutrition*. 2019;6:15.
114. Borzì AM, Biondi A, Basile F, Luca S, Vicari ESD, Vacante M. Olive Oil Effects on Colorectal Cancer. *Nutrients* . 2018;11(1):32.
115. Sharma A, Shahzad B, Rehman A, Bhardwaj R, Landi M, Zheng B. Response of Phenylpropanoid Pathway and the Role of Polyphenols in Plants under Abiotic Stress. *Molecules* . 2019;24(13):2452.
116. Ramírez-Cuellar LI, Alfaro-Rodríguez C, Ramos-Muñoz LG, Hernández -Castañeda VN, Carranza-Concha J. Capacidad antioxidante, fenoles totales y análisis microbiológico del Aguamiel. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 2018;3:495–500.
117. Romero-López M., Osorio-Díaz P, Flores-Morales A, Robledo N, Mora-Escobedo R. Chemical composition, antioxidant capacity and prebiotic effect of aguamiel (*Agave atrovirens*) during in vitro fermentation. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 2015;14(2):281–92.
118. Knight J, Madduma-Liyanage K, Mobley JA, Assimios DG, Holmes RP. Ascorbic acid intake and oxalate synthesis. *Urolithiasis*. 2016;44(4):289–97.
119. Andrade V V. Caracterización nutricional y desarrollo de productos alimenticios a partir de ecotipos locales de *Agave americana* L. (Tesis de pregrado). Facultad de Ciencia y Tecnología, Universidad del Azuay, Cuenca, Ecuador. 2014;
120. Flores-Mancha MA, Ruíz-Gutiérrez MG, Sánchez-Vega R, Santellano-Estrada E, Chávez-Martínez A. Characterization of Beet Root Extract ( *Beta vulgaris*) Encapsulated with Maltodextrin and Inulin. *Molecules* (Basel, Switzerland). 2020;25(23).
121. Considine GD. Evaporation. In: Van Nostrand's Scientific Encyclopedia. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Ltd; 2005.

122. Jorisch W. Fundamentals of Vacuum Technology. Vacuum Technology in the Chemical Industry. 2014;1–14.
123. Asghar MT, Yusof YA, Mokhtar MN, Yaacob ME, Ghazali HM, Varith J, et al. Processing of coconut sap into sugar syrup using rotary evaporation, microwave, and open-heat evaporation techniques. Journal of the Science of Food and Agriculture. 2020;100(10):4012–9.
124. Avalo B, Pérez S, Tovar M. Caracterización preliminar del proceso de concentración del jugo natural de naranja en un evaporador de tres efectos. Interciencia. 2009;34(11):784–90.
125. Sabanci S, Icier F. Evaluation of an ohmic assisted vacuum evaporation process for orange juice pulp. Food and Bioproducts Processing. 2022;131:156–63.
126. Rodríguez R. Fundamento de química general: Disoluciones, propiedades coligativas y gases ideales. 1st ed. UPSE, editor. Santa Elena; 2017. 38–45 p.
127. Hoorfar M, Kurz MA, Policova Z, Hair ML, Neumann AW. Do polysaccharides such as dextran and their monomers really increase the surface tension of water? Langmuir. 2006;22(1):52–6.
128. Molaveisi M, Beigbabaei A, Akbari E, Noghabi MS, Mohamadi M. Kinetics of temperature effect on antioxidant activity, phenolic compounds and color of Iranian jujube honey. Heliyon. 2019;5(1):1129.
129. Ghafoor K, Mohamed IA, Doğu S, Uslu N, Gbemisola Jamiu F, Al Juhaimi F, et al. The Effect of Heating Temperature on Total Phenolic Content, Antioxidant Activity, and Phenolic Compounds of Plum and Mahaleb Fruits. International Journal of Food Engineering. 2019;15(11–12).
130. Sepúlveda C, Zapata J. Effect of Temperature, pH and Solids Content on Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Bixa orellana L. Extract. Información tecnológica. 2019;30(5):57–66.
131. Ghasemi A, Chayjan R. Numerical simulation of vitamin C degradation during dehydration process of fresh tomatoes. Journal of Food Process Engineering. 2019;42(6):e13189.
132. Huampa E. Efecto de la temperatura y tiempo de escaldado sobre el contenido de vitamina c, carotenoides y capacidad antioxidante en la pulpa de mango (mangifera indica l.) variedad haden. Universidad Nacional Amazónica de Madre de Dios; 2018.
133. Asghar M, Yusof Y, Noriznan M, Yaacob M, Ghazali H, Chang L, et al. Effect of processing method on vitamin profile, antioxidant properties and total phenolic content of coconut (Cocos nucifera L.) sugar syrup. International Journal of Food Science & Technology. 2020;55(7):2762–70.

134. Herbach KM, Stintzing FC, Carle R. Betalain stability and degradation - Structural and chromatic aspects. *Journal of Food Science*. 2006;71(4):R41–50.
135. Havlíková L, Miková K, Kyzlink V. Heat stability of betacyanins. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung* 1983 177:4. 1983;177(4):247–50.
136. Attoe E, Von Elbe J. Oxygen involvement in Betanine degradation: effect of antioxidants. *Journal of Food Science*. 2006;50(1):106–10.
137. Liu B, Ye C, Geng L, Zhou W. Betacyanins in dragon fruit peels: the kinetic models of their degradation under different treatment conditions. *International Journal of Food Science & Technology*. 2019;54(10):2949–62.
138. Silos-Espino G, González-Cortés N, Carrillo-López A, Guevara-Lara F, Valverde-González ME, Paredes-López O. Chemical composition and in vitro propagation of *Agave salmiana* ‘Gentry.’ *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. 2015;82(3):355–9.
139. Pátkai G, Barta J. Decomposition of betacyanins and betaxanthins by heat and pH changes. *Food / Nahrung*. 1996;40(5):267–70.
140. Kranz S, Bolling B. Sugars and Citric Acid Differently Modulate DPPH Antioxidant Activity in Polyphenol-rich Fruit Juices. *The FASEB Journal*. 2015;29(S1):922.14.
141. Floegel A, Kim DO, Chung SJ, Chun O. Comparison of ABTS/DPPH assays for the detection of antioxidant capacity in foods. *The FASEB Journal*. 2010;24:535.9-535.9.
142. Benzie IFF, Devaki M. The ferric reducing/antioxidant power (FRAP) assay for non-enzymatic antioxidant capacity: concepts, procedures, limitations and applications. In: Apak R, Capanoglu E, Shahidi F, editors. *Measurement of Antioxidant Activity and Capacity: Recent Trends and Applications*. John Wiley & Sons, Ltd; 2017. p. 77–106.
143. NORMEX. NMX-FF-110-SCFI- 2008 (2008) Productos alimenticios – Jarabe de agave - Especificaciones y Métodos de prueba. *Diario de la federación*. 2008;
144. Leal-Díaz A, Santos-Zea L, Martínez-Escobedo H, Guajardo-Flores D, Gutiérrez-Urbe J, Serna-Saldivar S. Effect of *Agave americana* and *Agave salmiana* Ripeness on Saponin Content from Aguamiel (Agave Sap). *Journal of agricultural and food chemistry*. 2015;63(15):3924–30.
145. Espíndola-Sotres V, Trejo-Márquez MA, Lira-Vargas AA, Ramírez-Ortiz ME. Estandarización del proceso de elaboración de jarabe a partir de aguamiel. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 2018;3:515–21.
146. Morris SA. Food Preservation and Shelf Life. *Food and Package Engineering*. 2011;253–97.

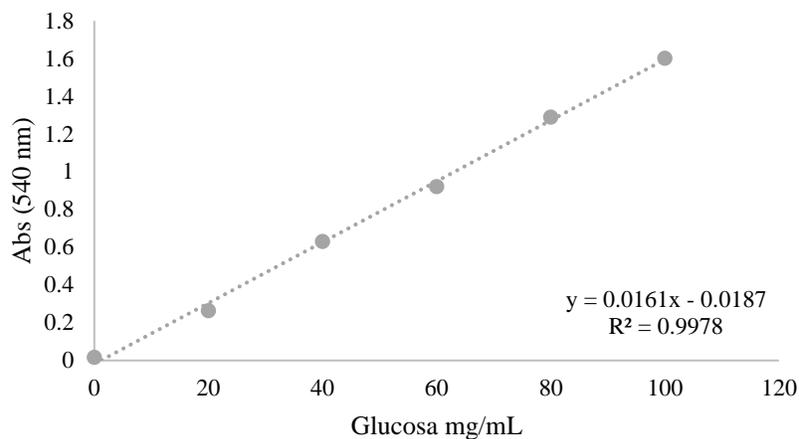
147. Cavia MM, Fernández-Muiño MA, Alonso-Torre SR, Huidobro JF, Sancho MT. Evolution of acidity of honeys from continental climates: Influence of induced granulation. *Food Chemistry*. 2007;4(100):1728–33.
148. Snowdon JA, Cliver DO. Microorganisms in honey. *International Journal of Food Microbiology*. 1996;31(1–3):1–26.
149. Švecová B, Mach M. Content of 5-hydroxymethyl-2-furfural in biscuits for kids. *Interdisciplinary toxicology*. 2017;10(2):66–9.
150. Yang W, Zhang C, Li C, Huang ZY, Miao X. Pathway of 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde formation in honey. *Journal of food science and technology*. 2019;56(5):2417–25.
151. Rybak-Chmielewska H. Changes in the carbohydrate composition of honey undergoing during storage. *Journal of Apicultural Science*. 2007;51(1):39–48.
152. Da Silva PM, Gauche C, Gonzaga LV, Costa ACO, Fett R. Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food chemistry*. 2016;196:309–23.
153. Bulut L, Kilic M. Kinetics of hydroxymethylfurfural accumulation and color change in honey during storage in relation to moisture content. *Journal of Food Processing and Preservation*. 2009;33(1):22–32.
154. Gonzales A, Burin L, Buera M del P. Color changes during storage of honeys in relation to their composition and initial color. *Food Research International*. 1999;32:185–91.
155. León-Ruiz V, Vera S, González-Porto A V., San Andrés MP. Analysis of Water-Soluble Vitamins in Honey by Isocratic RP-HPLC. *Food Analytical Methods*. 2013;6(2):488–96.
156. Garzón GA, Wrolstad RE. Comparison of the Stability of Pelargonidin-based Anthocyanins in Strawberry Juice and Concentrate. *Journal of Food Science*. 2002;67(4):1288–99.
157. Sapers GM, Hornstein JS. Varietal differences in colorant properties and stability of red beet pigments . *Journal of Food Science*. 1979;44(4):1245–8.
158. Azeredo HMC. Betalains: properties, sources, applications, and stability – a review. *International Journal of Food Science & Technology*. 2009;44(12):2365–76.
159. Nooshkam M, Varidi M, Bashash M. The Maillard reaction products as food-born antioxidant and antibrowning agents in model and real food systems. *Food chemistry*. 2019;275:644–60.
160. Liu Q, Li J, Kong B, Jia N, Li P. Antioxidant capacity of maillard reaction products formed by a porcine plasma protein hydrolysate-sugar model system as related to

- chemical characteristics. *Food Science and Biotechnolo.* 2013;23(1):33–41.
161. Ortega IL, Montes MC. Apicultura en el Territorio Patagonia Verde, Región de Los Lagos. INIA, editor. Vol. 442. 2021. 107–123 p.
  162. Zúñiga L. Nutrición de Agave tequilana y manejo de los fertilizantes en un sistema de producción intensiva (riego por goteo). Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. 2013;(978-607-37-0066–5).
  163. Erkmén O, Bozoglu TF. Food Preservation by Reducing Water Activity. *Food Microbiology: Principles into Practice.* 2016;44–58.
  164. Stewart CM, Buckle KA, Cole MB. The Future of Water Activity in Food Processing and Preservation. *Water Activity in Foods.* 2020;535–51.
  165. Chernetsova ES, Morlock GE. Assessing the capabilities of direct analysis in real time mass spectrometry for 5-hydroxymethylfurfural quantitation in honey. *International Journal of Mass Spectrometry.* 2012;Complete(314):22–32.
  166. Singh AS, Jones AMP, Saxena PK. Variation and correlation of properties in different grades of maple syrup. *Plant foods for human nutrition (Dordrecht, Netherlands).* 2014;69(1):50–6.
  167. Brudzynski K, Miotto D. The relationship between the content of Maillard reaction-like products and bioactivity of Canadian honeys. *Food Chemistry.* 2011;124(3):869–74.
  168. Gupta S, Prakash J. Studies on Indian green leafy vegetables for their antioxidant activity. *Plant Foods for Human Nutrition.* 2009;64(1):39–45.
  169. López-Romero J, Ayala-Zavala J, Peña-Ramos E, Hernández J, González-Ríos H. Antioxidant and antimicrobial activity of Agave angustifolia extract on overall quality and shelf life of pork patties stored under refrigeration. *Journal of Food Science and Technology.* 2018;55(11):4413.
  170. Ahumada-Santos Y, Montes-Avila J, Uribe-Beltrán M, Díaz-Camacho S, López-Angulo G, Vega-Aviña R, et al. Chemical characterization, antioxidant and antibacterial activities of six Agave species from Sinaloa, Mexico. *Industrial Crops and Products.* 2013;49:143–9.
  171. López-Romero J, Ayala-Zavala J, González-Aguilar G, Peña-Ramos E, González-Ríos H. Biological activities of Agave by-products and their possible applications in food and pharmaceuticals. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 2018;(7):2461–74.
  172. Lappe-Oliveras P, Moreno-Terrazas R, Arrizón-Gaviño J, Herrera-Suárez T, García-Mendoza A, Gschaedler-Mathis A. Yeasts associated with the production of Mexican alcoholic nondistilled and distilled Agave beverages. *FEMS Yeast*

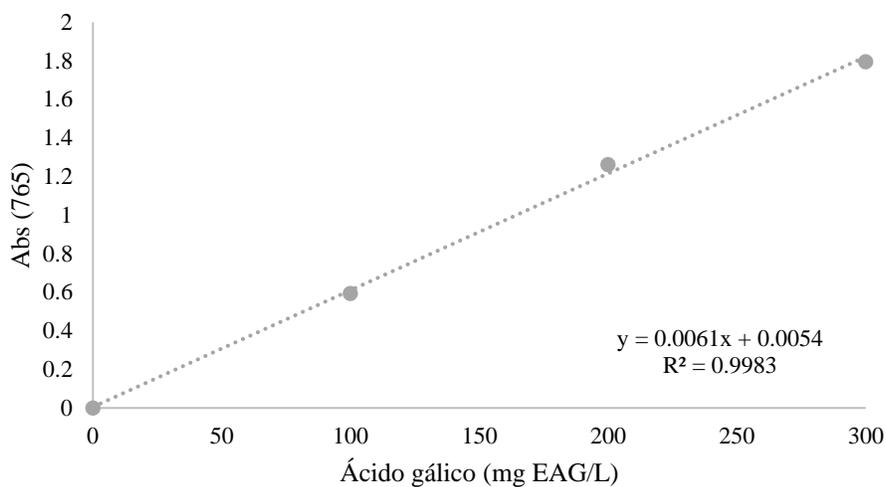
- Research. 2008;8(7):1037–52.
173. Skalicky M, Kubes J, Shokoofeh H, Tahjib-Ul-Arif M, Vachova P, Hejnak V. Betacyanins and Betaxanthins in Cultivated Varieties of *Beta vulgaris* L. Compared to Weed Beets. *Molecules* . 2020;25(22).
  174. Apolinário AC, De Lima Damasceno BPG, De Macêdo Beltrão NE, Pessoa A, Converti A, Da Silva JA. Inulin-type fructans: a review on different aspects of biochemical and pharmaceutical technology. *Carbohydrate polymers*. 2014;101(1):368–78.
  175. Rascón L, Cruz M, Rodríguez-Jasso RM, Neira-Vielma AA, Ramírez-Barrón SN, Belmares R. Effect of Ohmic Heating on Sensory, Physicochemical, and Microbiological Properties of “Aguamiel” of *Agave salmiana*. *Foods* (Basel, Switzerland). 2020;9(12).
  176. Espino S, Güemes N, Castañeda A, Alanis E, Piloni J. Uso de harina de papa roja (*Oxalis tuberosa*) en la elaboración de pan tipo danés (Croissant), con actividad funcional, reducido en grasa saturada libre de gluten. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo; 2019.

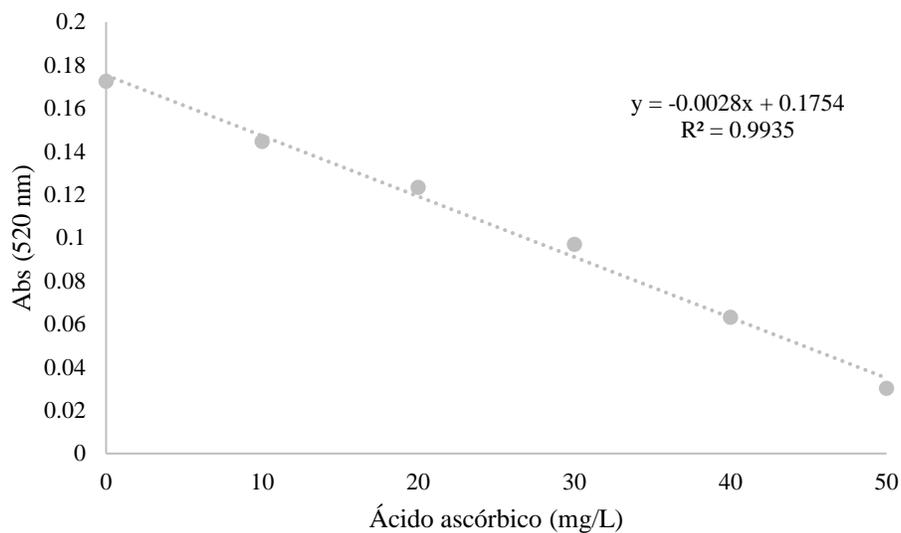
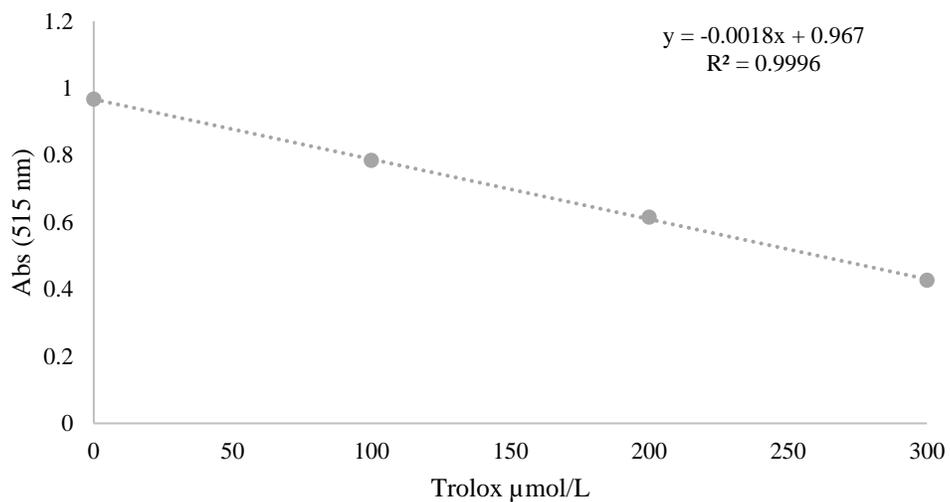
## XII. ANEXOS

### Anexo A-1. Curva de calibración de glucosa (concentraciones de 0 a 1000 mg/mL) para la determinación de azúcares reductores método DNS

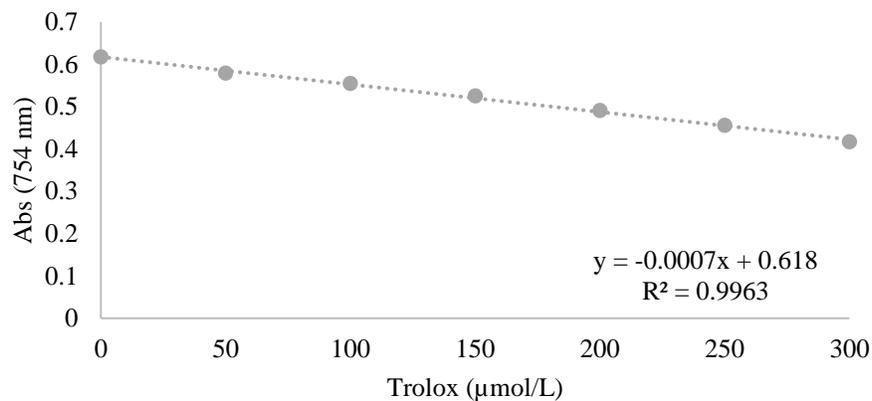


### Anexo A-2. Curva de calibración con ácido gálico (0 a 300 mg EAG/100g) para contenido de fenoles totales por el método Folin-Ciocalteu

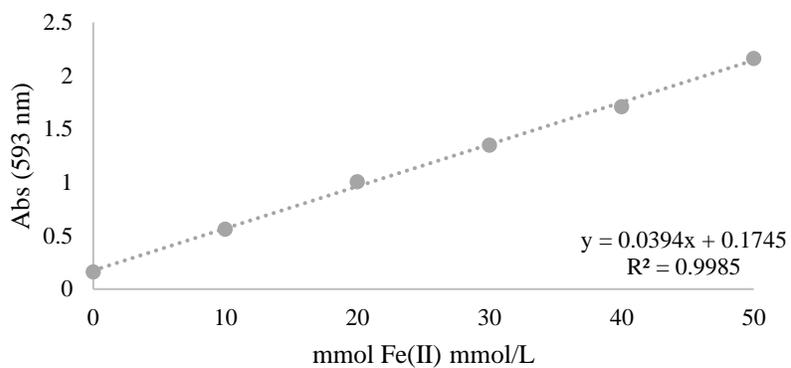


**Anexo. A-3. Curva estándar de ácido ascórbico (0 a 50 mg/L) para la determinación de ácido ascórbico****Anexo A-4. Curva estándar de Trolox (0 a 300  $\mu\text{mol ET/L}$ ) para la determinación del ensayo DPPH**

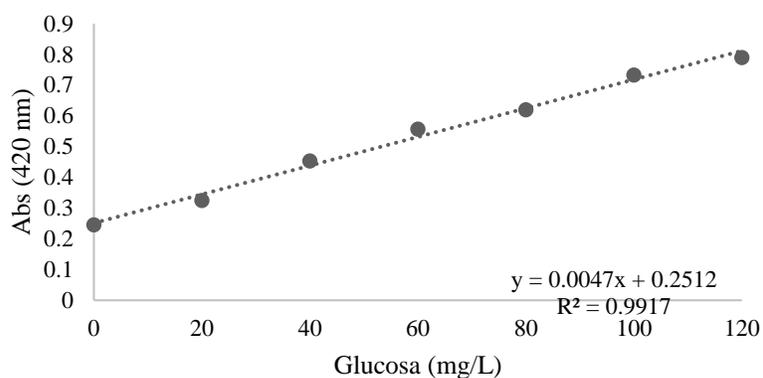
**Anexo A-5. Curva estándar de Trolox (0 a 300  $\mu\text{mol ET/L}$ ) para la determinación del ensayo ABTS**



**Anexo A-6. Curva estándar de sulfato ferroso (0 a 50 mmol Fe (II)/L) para la determinación en el ensayo FRAP**



**Anexo A-7. Curva de calibración de glucosa (0 a 120 mg/L) para la determinación de carbohidratos por el método Orcinol**



### Anexo A-8. Ecuaciones de regresión en unidades no codificadas de las diferentes variables respuesta

$$\begin{aligned} \text{°Brix} = & -513 + 17.5 \text{ Temperatura} - 0.76 \text{ Vacío} - 7.8 \text{ Tiempo} - 0.149 \text{ Temperatura*Temperatura} \\ & - 0.0038 \text{ Vacío*Vacío} - 0.017 \text{ Tiempo*Tiempo} + 0.0033 \text{ Temperatura*Vacío} \\ & + 0.200 \text{ Temperatura*Tiempo} + 0.0033 \text{ Vacío*Tiempo} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Fenoles (mg EAG/100 g)} = & -577 + 11.7 \text{ Temperatura} - 1.58 \text{ Vacío} + 17.5 \text{ Tiempo} \\ & - 0.0924 \text{ Temperatura*Temperatura} + 0.00341 \text{ Vacío*Vacío} \\ & - 0.121 \text{ Tiempo*Tiempo} + 0.0404 \text{ Temperatura*Vacío} \\ & - 0.075 \text{ Temperatura*Tiempo} - 0.0641 \text{ Vacío*Tiempo} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Ácido Ascórbico (mg EAA/100g)} = & -2204 + 22.5 \text{ Temperatura} + 4.08 \text{ Vacío} + 98.4 \text{ Tiempo} \\ & - 0.031 \text{ Temperatura*Temperatura} - 0.0302 \text{ Vacío*Vacío} \\ & - 0.87 \text{ Tiempo*Tiempo} + 0.0327 \text{ Temperatura*Vacío} \\ & - 0.716 \text{ Temperatura*Tiempo} - 0.074 \text{ Vacío*Tiempo} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Betacianinas mg/100 g} = & -9.5 + 0.191 \text{ Temperatura} + 0.246 \text{ Vacío} - 0.49 \text{ Tiempo} \\ & + 0.00068 \text{ Temperatura*Temperatura} + 0.000969 \text{ Vacío*Vacío} \\ & + 0.0185 \text{ Tiempo*Tiempo} - 0.00353 \text{ Temperatura*Vacío} \\ & + 0.0004 \text{ Temperatura*Tiempo} - 0.00651 \text{ Vacío*Tiempo} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Betaxantinas mg/100 g}_1 = & -8.2 + 0.172 \text{ Temperatura} + 0.219 \text{ Vacío} - 0.46 \text{ Tiempo} \\ & + 0.00050 \text{ Temperatura*Temperatura} + 0.000869 \text{ Vacío*Vacío} \\ & + 0.0169 \text{ Tiempo*Tiempo} - 0.00309 \text{ Temperatura*Vacío} \\ & + 0.0006 \text{ Temperatura*Tiempo} - 0.00599 \text{ Vacío*Tiempo} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{DPPH (mg ETrolox/ 100 g)} = & 19 + 0.53 \text{ Temperatura} - 1.45 \text{ Vacío} - 0.2 \text{ Tiempo} \\ & - 0.0423 \text{ Temperatura*Temperatura} + 0.00157 \text{ Vacío*Vacío} \\ & - 0.247 \text{ Tiempo*Tiempo} + 0.0039 \text{ Temperatura*Vacío} \\ & + 0.1976 \text{ Temperatura*Tiempo} + 0.0291 \text{ Vacío*Tiempo} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{ABTS (mg ETrolox/ 100 g)} = & 932 - 32.6 \text{ Temperatura} - 14.4 \text{ Vacío} + 49 \text{ Tiempo} \\ & + 0.143 \text{ Temperatura*Temperatura} + 0.0452 \text{ Vacío*Vacío} \\ & - 0.92 \text{ Tiempo*Tiempo} + 0.139 \text{ Temperatura*Vacío} \\ & + 0.220 \text{ Temperatura*Tiempo} - 0.126 \text{ Vacío*Tiempo} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{FRAP ( } \mu\text{mol Fe(II)/ 100 g)} = & 73.1 + 0.70 \text{ Temperatura} + 0.217 \text{ Vacío} - 9.23 \text{ Tiempo} \\ & - 0.0198 \text{ Temperatura*Temperatura} + 0.00805 \text{ Vacío*Vacío} \\ & + 0.1136 \text{ Tiempo*Tiempo} - 0.00666 \text{ Temperatura*Vacío} \\ & + 0.1158 \text{ Temperatura*Tiempo} - 0.04608 \text{ Vacío*Tiempo} \end{aligned}$$

## Anexo B-1. Resultados estadísticos indicados por el programa Minitab para la variable respuesta SST (°Brix) vs. Temperatura, vacío y tiempo

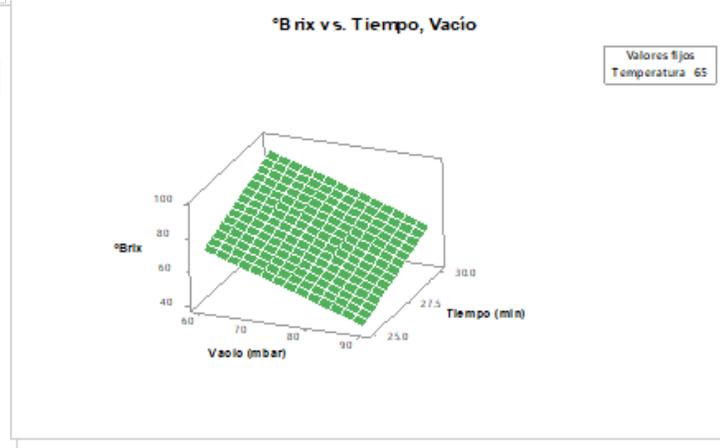
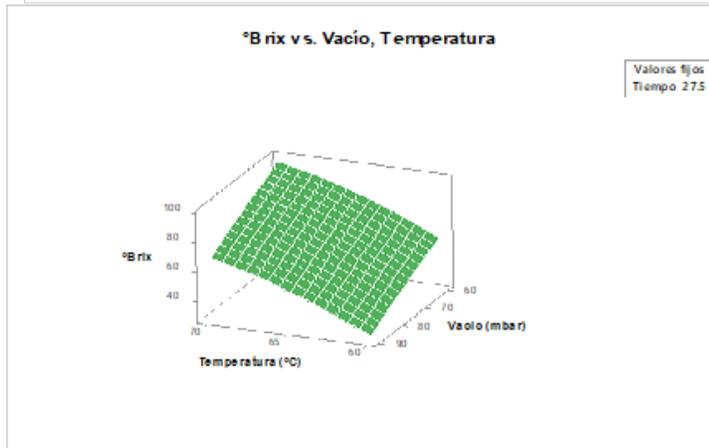
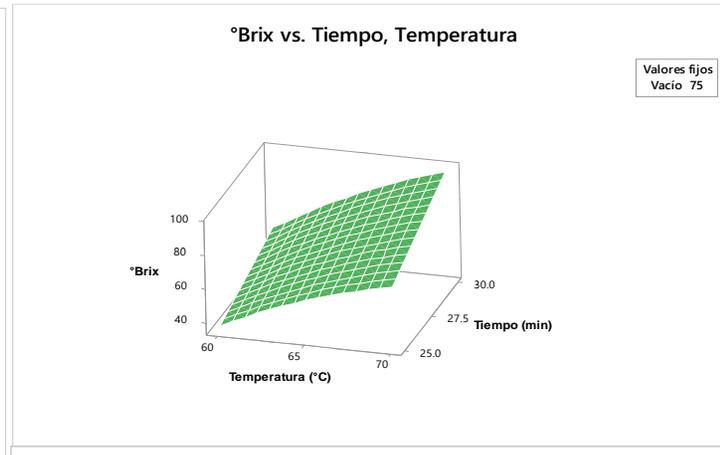
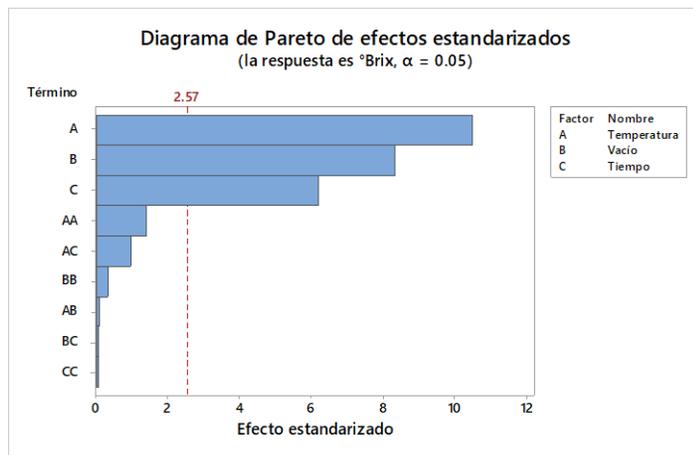
### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	9	5942.10	660.23	24.59	0.001
Lineal	3	5864.06	1954.69	72.81	0.000
Temperatura	1	2964.50	2964.50	110.43	0.000
Vacío	1	1875.78	1875.78	69.87	0.000
Tiempo	1	1023.78	1023.78	38.14	0.002
Cuadrado	3	52.73	17.58	0.65	0.614
Temperatura*Temperatura	1	51.35	51.35	1.91	0.225
Vacío*Vacío	1	2.69	2.69	0.10	0.764
Tiempo*Tiempo	1	0.04	0.04	0.00	0.971
Interacción de 2 factores	3	25.31	8.44	0.31	0.815
Temperatura*Vacío	1	0.25	0.25	0.01	0.927
Temperatura*Tiempo	1	25.00	25.00	0.93	0.379
Vacío*Tiempo	1	0.06	0.06	0.00	0.963
Error	5	134.23	26.85		
Falta de ajuste	3	109.56	36.52	2.96	0.263
Error puro	2	24.67	12.33		
Total	14	6076.33			

### Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
5.18130	97.79%	93.81%	70.24%

Diagrama de Pareto y superficies de respuesta para la variable SST (°Brix)



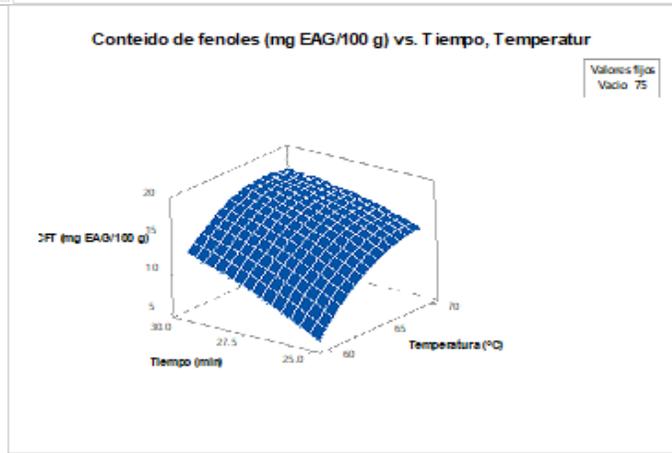
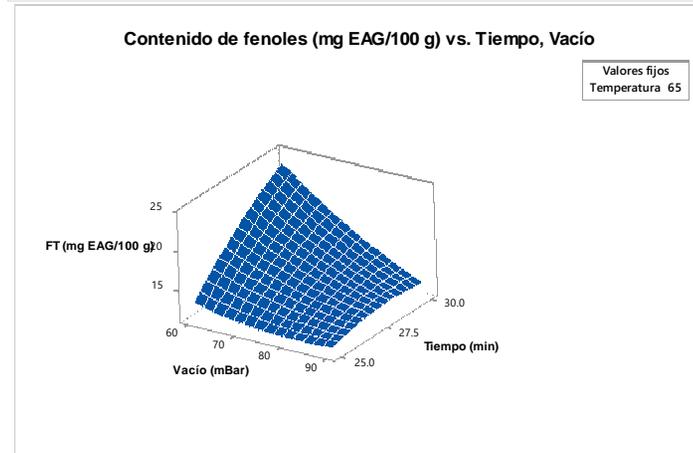
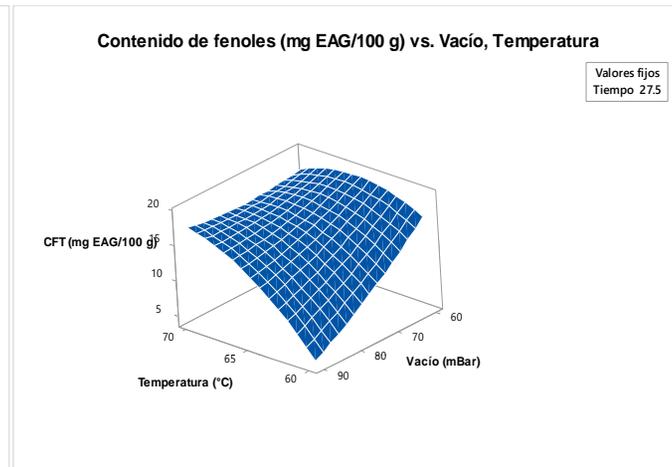
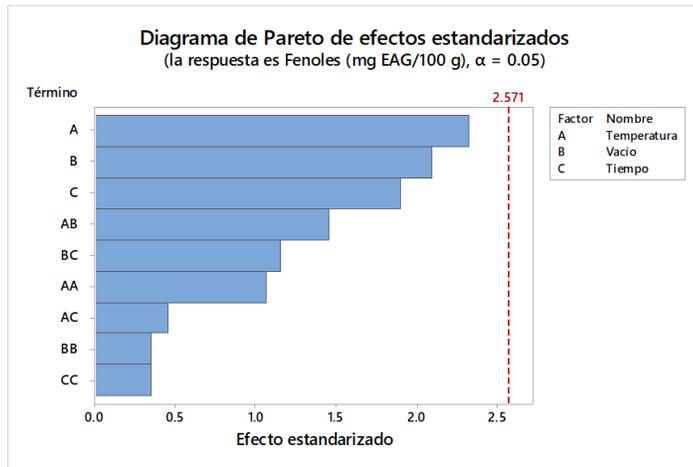
**Anexo B-2. Resultados estadísticos indicados por el programa Minitab para la variable respuesta para contenido de fenoles vs. Temperatura, vacío y tiempo**  
**Análisis de Varianza**

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	9	321.868	35.763	2.05	0.222
Lineal	3	233.798	77.933	4.47	0.070
Temperatura	1	94.561	94.561	5.43	0.067
Vacío	1	76.316	76.316	4.38	0.091
Tiempo	1	62.922	62.922	3.61	0.116
Cuadrado	3	24.591	8.197	0.47	0.716
Temperatura*Temperatura	1	19.711	19.711	1.13	0.336
Vacío*Vacío	1	2.174	2.174	0.12	0.738
Tiempo*Tiempo	1	2.117	2.117	0.12	0.742
Interacción de 2 factores	3	63.478	21.159	1.21	0.395
Temperatura*Vacío	1	36.792	36.792	2.11	0.206
Temperatura*Tiempo	1	3.559	3.559	0.20	0.670
Vacío*Tiempo	1	23.127	23.127	1.33	0.301
Error	5	87.112	17.422		
Falta de ajuste	3	77.935	25.978	5.66	0.154
Error puro	2	9.177	4.589		
Total	14	408.980			

**Resumen del modelo**

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
4.17401	78.70%	40.36%	0.00%

Diagrama de Pareto y superficies de respuesta para la variable respuesta fenoles totales



### Anexo B-3. Resultados estadísticos indicados por el programa Minitab para la variable respuesta para ácido ascórbico vs. Temperatura, vacío y tiempo

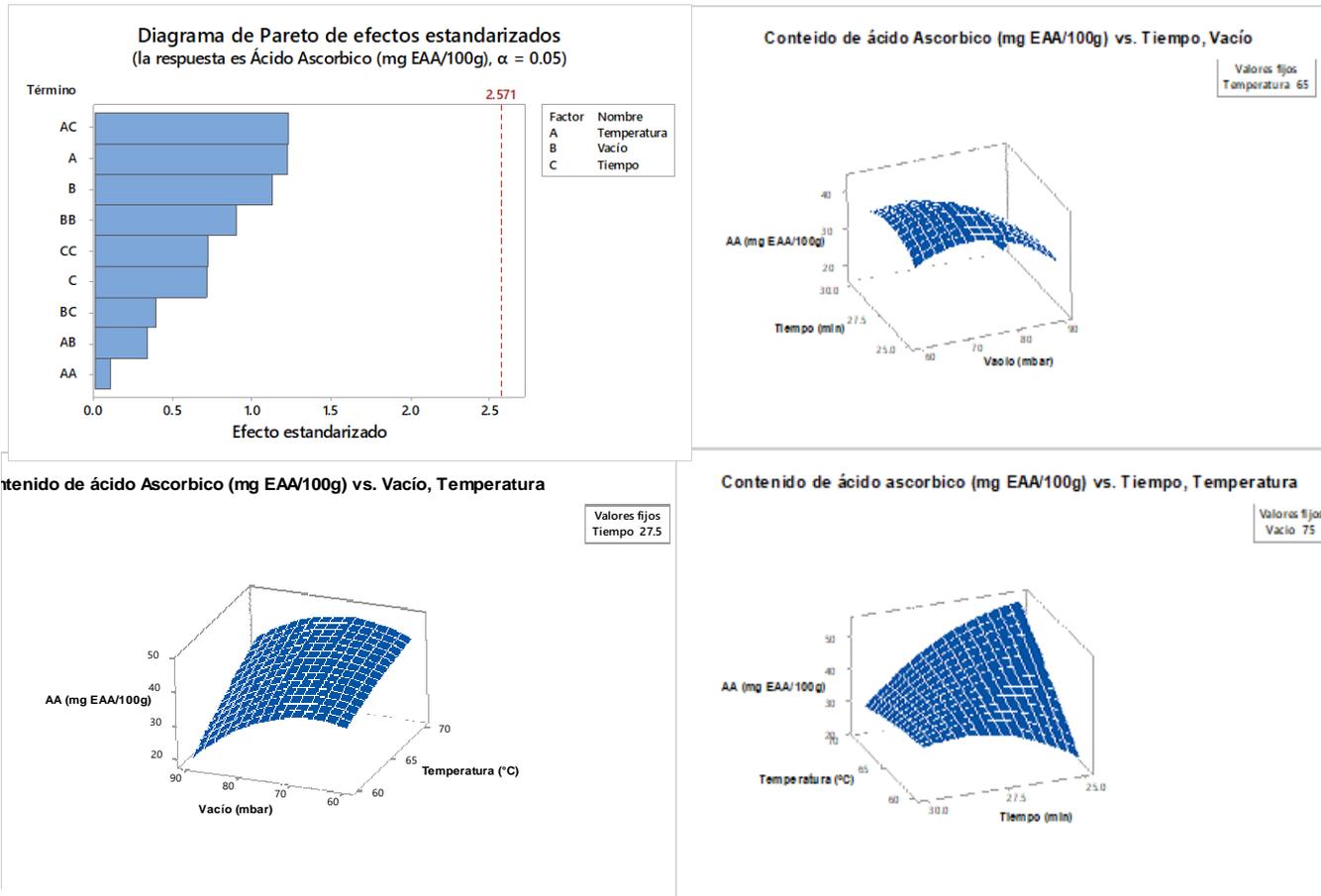
#### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	9	607922	67547	1.50	0.340
Lineal	3	420769	140256	3.12	0.126
Temperatura	1	142718	142718	3.18	0.135
Vacío	1	269902	269902	6.01	0.058
Tiempo	1	8150	8150	0.18	0.688
Cuadrado	3	24165	8055	0.18	0.906
Temperatura*Temperatura	1	10313	10313	0.23	0.652
Vacío*Vacío	1	11984	11984	0.27	0.627
Tiempo*Tiempo	1	10	10	0.00	0.988
Interacción de 2 factores	3	162987	54329	1.21	0.396
Temperatura*Vacío	1	43124	43124	0.96	0.372
Temperatura*Tiempo	1	27987	27987	0.62	0.466
Vacío*Tiempo	1	91876	91876	2.05	0.212
Error	5	224501	44900		
Falta de ajuste	3	98283	32761	0.52	0.710
Error puro	2	126218	63109		
Total	14	832423			

#### Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
211.897	73.03%	24.49%	0.00%

Diagrama de Pareto para la variable respuesta ácido ascórbico



## Anexo B-4. Resultados estadísticos indicados por el programa Minitab para la variable respuesta para betacianinas vs. Temperatura, vacío y tiempo

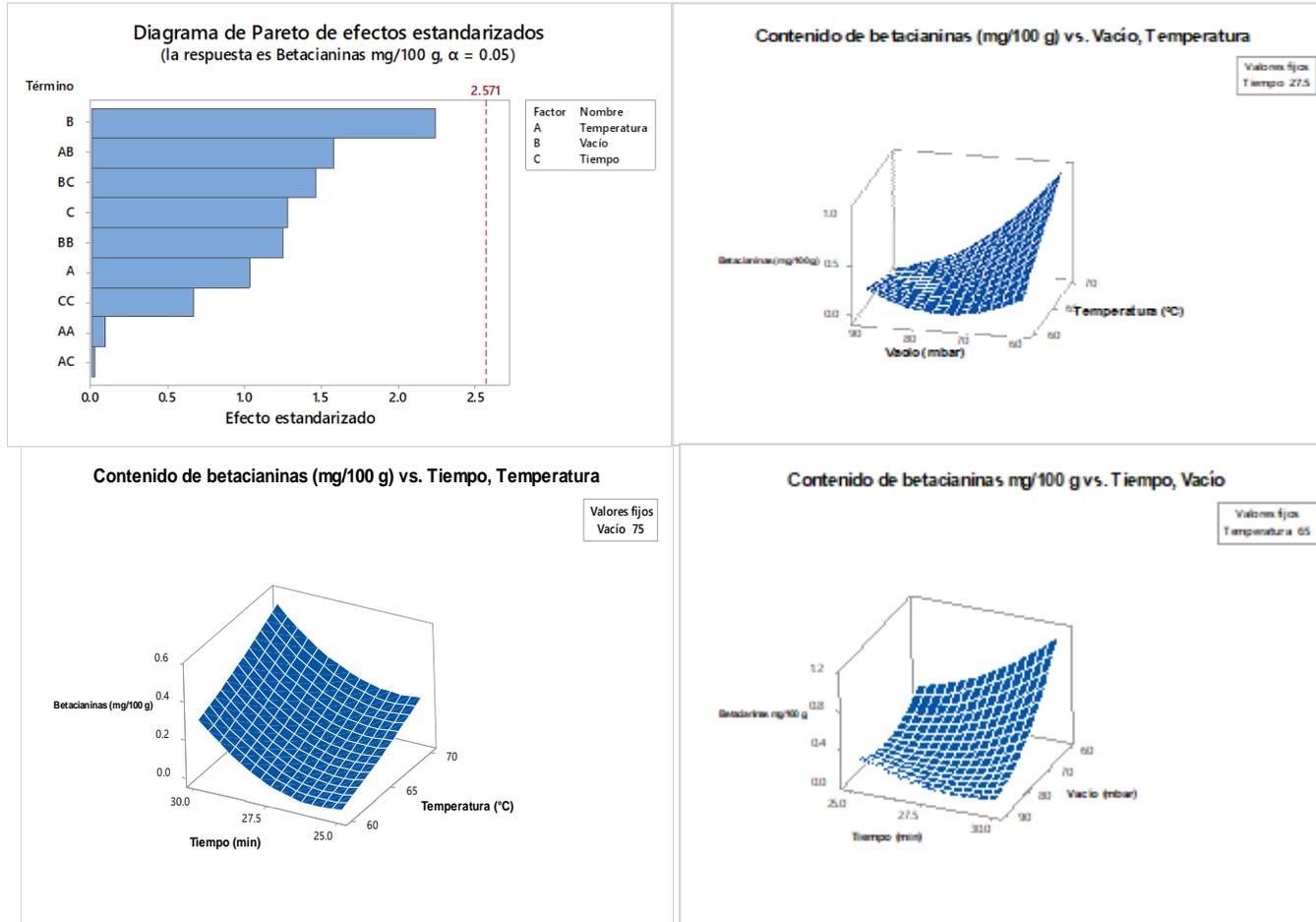
### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	9	1.59354	0.177060	1.59	0.317
Lineal	3	0.86243	0.287476	2.58	0.166
Temperatura	1	0.11884	0.118836	1.07	0.349
Vacío	1	0.55981	0.559811	5.03	0.075
Tiempo	1	0.18378	0.183782	1.65	0.255
Cuadrado	3	0.21195	0.070649	0.64	0.624
Temperatura*Temperatura	1	0.00106	0.001058	0.01	0.926
Vacío*Vacío	1	0.17545	0.175448	1.58	0.265
Tiempo*Tiempo	1	0.04939	0.049388	0.44	0.535
Interacción de 2 factores	3	0.51917	0.173056	1.56	0.310
Temperatura*Vacío	1	0.28036	0.280362	2.52	0.173
Temperatura*Tiempo	1	0.00008	0.000080	0.00	0.980
Vacío*Tiempo	1	0.23873	0.238726	2.15	0.203
Error	5	0.55626	0.111253		
Falta de ajuste	3	0.55237	0.184123	94.56	0.010
Error puro	2	0.00389	0.001947		
Total	14	2.14981			

### Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.333546	74.12%	27.55%	0.00%

Diagrama de Pareto para la variable respuesta betacianinas



## Anexo B-5. Resultados estadísticos indicados por el programa Minitab para la variable respuesta para betaxantinas vs. Temperatura, vacío y tiempo

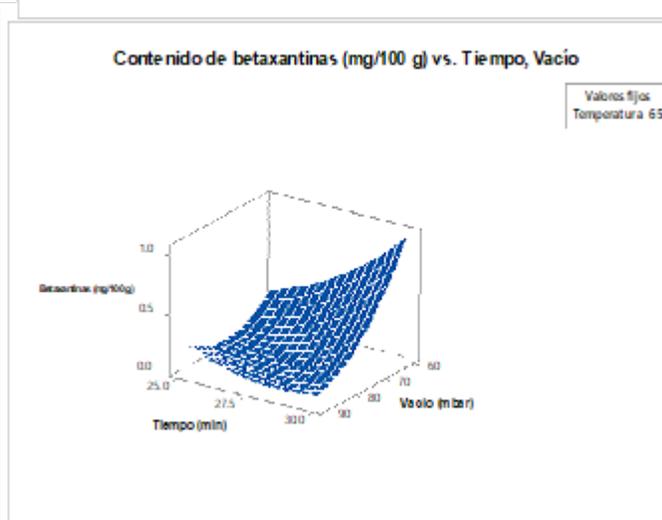
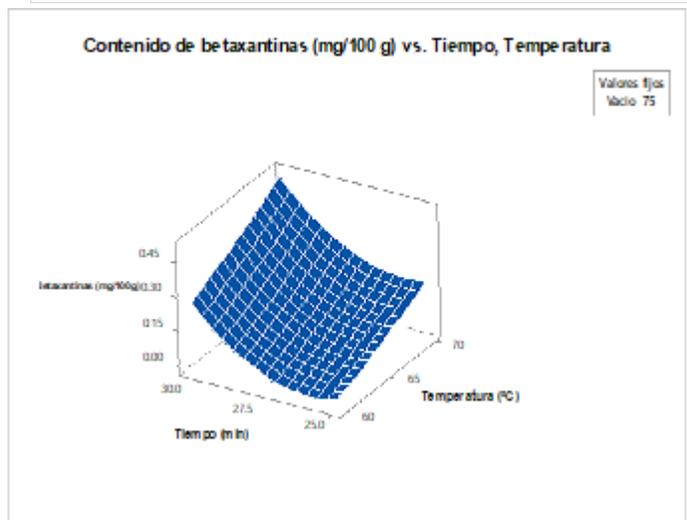
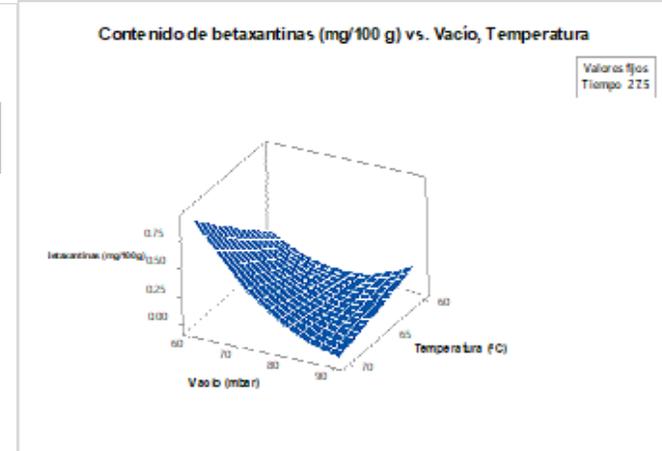
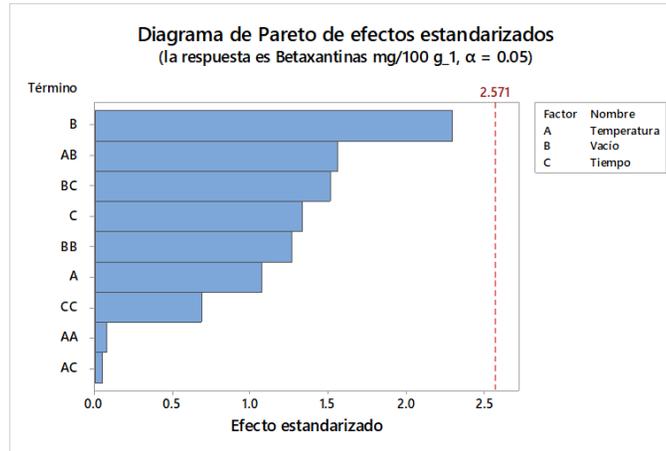
### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	9	1.31001	0.145557	1.66	0.300
Lineal	3	0.72127	0.240422	2.74	0.153
Temperatura	1	0.10066	0.100655	1.15	0.333
Vacío	1	0.46429	0.464291	5.29	0.070
Tiempo	1	0.15632	0.156321	1.78	0.240
Cuadrado	3	0.17213	0.057377	0.65	0.614
Temperatura*Temperatura	1	0.00058	0.000581	0.01	0.938
Vacío*Vacío	1	0.14131	0.141310	1.61	0.260
Tiempo*Tiempo	1	0.04125	0.041247	0.47	0.523
Interacción de 2 factores	3	0.41662	0.138872	1.58	0.305
Temperatura*Vacío	1	0.21461	0.214614	2.45	0.179
Temperatura*Tiempo	1	0.00023	0.000233	0.00	0.961
Vacío*Tiempo	1	0.20177	0.201770	2.30	0.190
Error	5	0.43878	0.087756		
Falta de ajuste	3	0.43583	0.145277	98.49	0.010
Error puro	2	0.00295	0.001475		
Total	14	1.74880			

### Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.296237	74.91%	29.75%	0.00%

Diagrama de Pareto para la variable respuesta betaxantinas



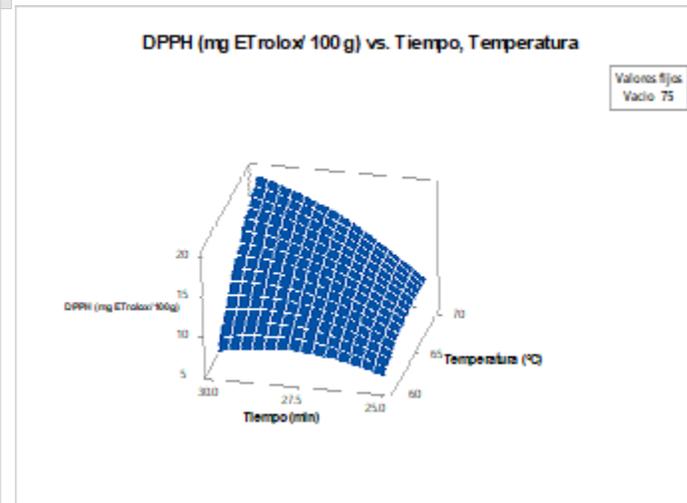
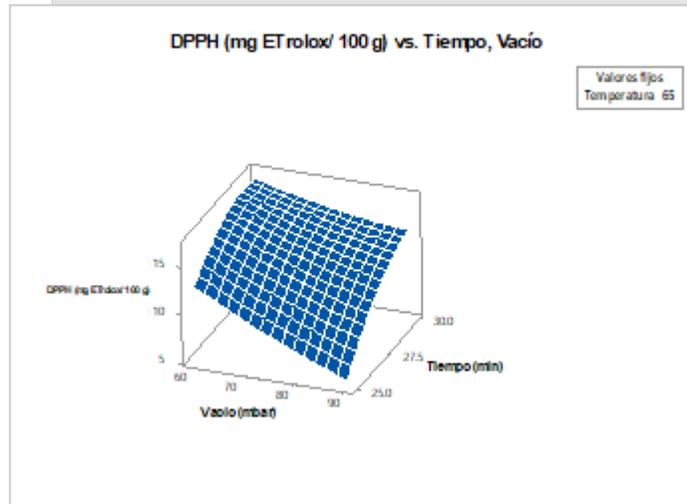
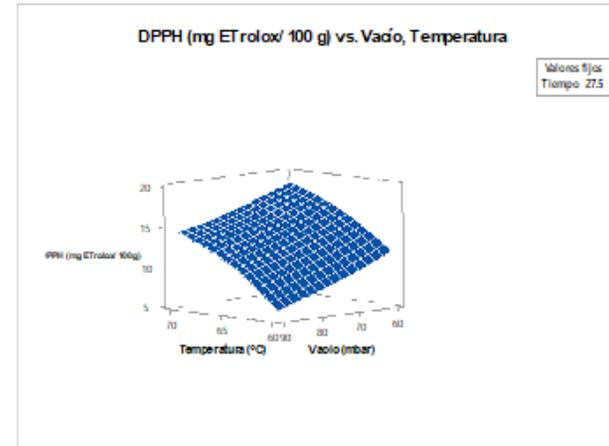
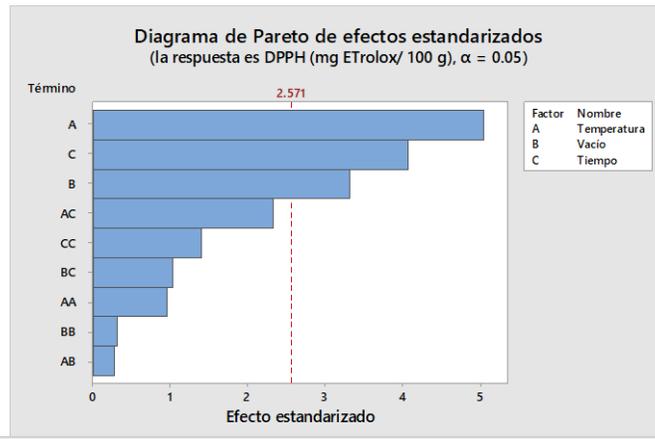
**Anexo B-6. Resultados estadísticos indicados por el programa Minitab para la variable respuesta en el ensayo DPPH<sup>+</sup> vs. Temperatura, vacío y tiempo**  
**Análisis de Varianza**

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	9	282.661	31.407	6.97	0.023
Lineal	3	240.017	80.006	17.76	0.004
Temperatura	1	115.255	115.255	25.58	0.004
Vacío	1	49.972	49.972	11.09	0.021
Tiempo	1	74.790	74.790	16.60	0.010
Cuadrado	3	13.140	4.380	0.97	0.475
Temperatura*Temperatura	1	4.131	4.131	0.92	0.382
Vacío*Vacío	1	0.458	0.458	0.10	0.763
Tiempo*Tiempo	1	8.784	8.784	1.95	0.221
Interacción de 2 factores	3	29.504	9.835	2.18	0.208
Temperatura*Vacío	1	0.342	0.342	0.08	0.794
Temperatura*Tiempo	1	24.403	24.403	5.42	0.067
Vacío*Tiempo	1	4.760	4.760	1.06	0.351
Error	5	22.524	4.505		
Falta de ajuste	3	19.156	6.385	3.79	0.216
Error puro	2	3.367	1.684		
Total	14	305.185			

**Resumen del modelo**

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
2.12245	92.62%	79.33%	0.00%

Diagrama de Pareto para la variable respuesta en el ensayo DPPH<sup>+</sup>



## Anexo B-7. Resultados estadísticos indicados por el programa Minitab para la variable respuesta en el ensayo ABTS<sup>++</sup> vs. Temperatura, vacío y tiempo

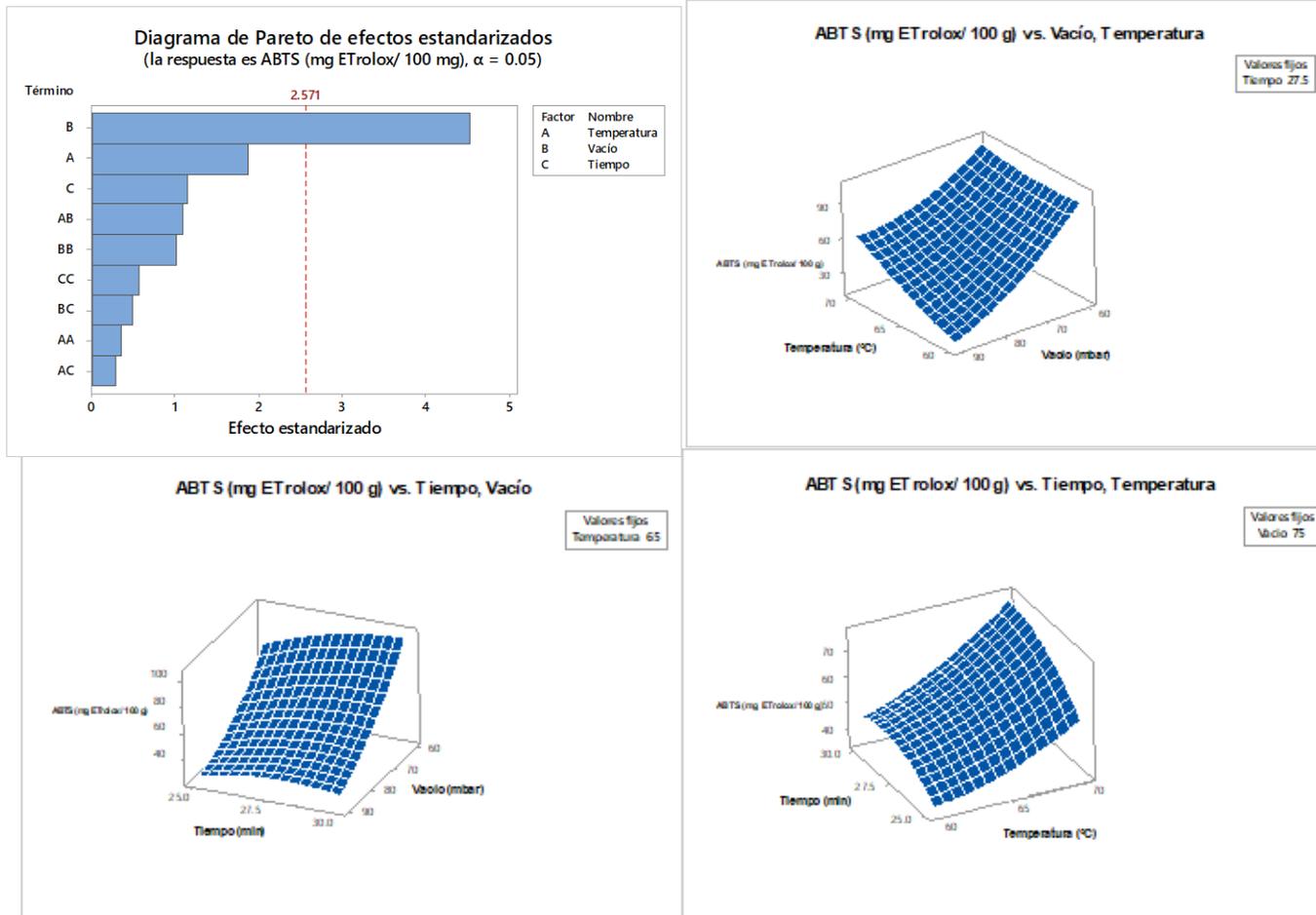
### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	9	10611.8	1179.08	3.16	0.109
Lineal	3	9473.4	3157.79	8.47	0.021
Temperatura	1	1319.2	1319.20	3.54	0.119
Vacío	1	7664.1	7664.13	20.56	0.006
Tiempo	1	490.0	490.03	1.31	0.303
Cuadrado	3	580.9	193.64	0.52	0.687
Temperatura*Temperatura	1	47.4	47.37	0.13	0.736
Vacío*Vacío	1	382.2	382.22	1.03	0.358
Tiempo*Tiempo	1	122.4	122.38	0.33	0.591
Interacción de 2 factores	3	557.5	185.83	0.50	0.699
Temperatura*Vacío	1	437.2	437.21	1.17	0.328
Temperatura*Tiempo	1	30.3	30.28	0.08	0.787
Vacío*Tiempo	1	90.0	89.99	0.24	0.644
Error	5	1863.8	372.75		
Falta de ajuste	3	981.5	327.17	0.74	0.618
Error puro	2	882.3	441.13		
Total	14	12475.5			

### Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
19.3068	85.06%	58.17%	0.00%

Diagrama de Pareto para la variable respuesta en el ensayo ABTS<sup>+</sup>



## Anexo B-8. Resultados estadísticos indicados por el programa Minitab para la variable respuesta en el ensayo FRAP vs. Temperatura, vacío y tiempo

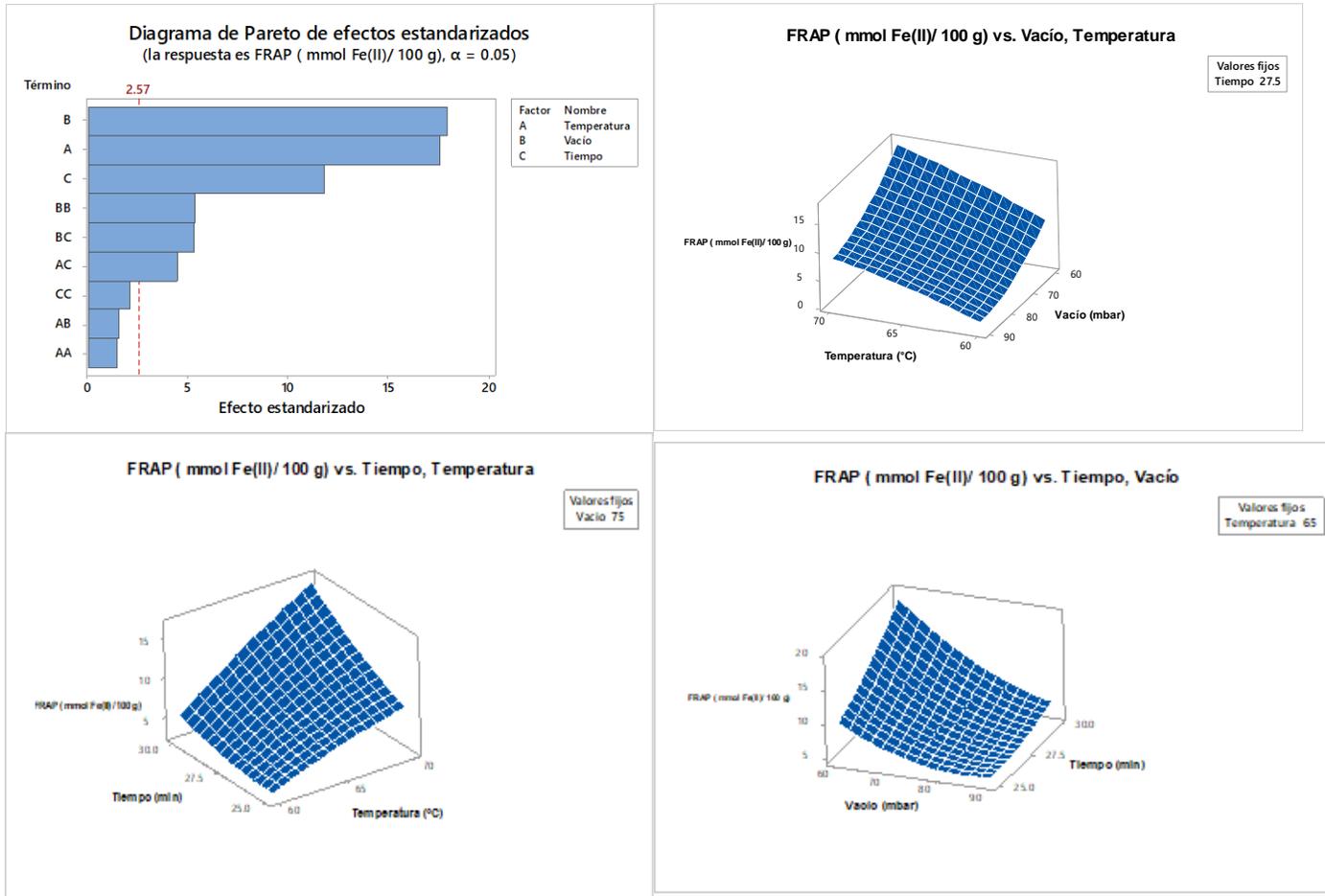
### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	9	362.687	40.299	95.36	0.000
Lineal	3	326.337	108.779	257.40	0.000
Temperatura	1	130.279	130.279	308.28	0.000
Vacío	1	136.557	136.557	323.13	0.000
Tiempo	1	59.501	59.501	140.80	0.000
Cuadrado	3	15.027	5.009	11.85	0.010
Temperatura*Temperatura	1	0.905	0.905	2.14	0.203
Vacío*Vacío	1	12.115	12.115	28.67	0.003
Tiempo*Tiempo	1	1.863	1.863	4.41	0.090
Interacción de 2 factores	3	21.323	7.108	16.82	0.005
Temperatura*Vacío	1	0.999	0.999	2.36	0.185
Temperatura*Tiempo	1	8.379	8.379	19.83	0.007
Vacío*Tiempo	1	11.946	11.946	28.27	0.003
Error	5	2.113	0.423		
Falta de ajuste	3	1.986	0.662	10.40	0.089
Error puro	2	0.127	0.064		
Total	14	364.800			

### Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.650080	99.42%	98.38%	91.21%

Diagrama de Pareto para la variable respuesta en el ensayo FRAP



**Anexo C-1. Estimación del IG *in vitro* de jarabes o mieles de agave**

