



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD ÁREA ACADÉMICA DE NUTRICIÓN

“Optimización del proceso de termoultrasonido en aguamiel de maguey manso (*Agave atrovirens Karw*) sobre sus propiedades microbiológicas, fisicoquímicas y antioxidantes”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN NUTRICIÓN
PRESENTA

L.N. Elizabeth López Martínez

Bajo la Dirección de:

Dra. Nelly Del Socorro Cruz Cansino

Codirector:

Dra. Esther Ramírez Moreno

Pachuca de Soto, Hgo. Noviembre 2018





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD
ÁREA ACADÉMICA DE NUTRICIÓN



De acuerdo con el artículo 134 del Reglamento de Control Escolar vigente, el jurado de examen recepcional designado, autoriza para su impresión la Tesis titulada

"Optimización del proceso de termoultrasonido en aguamiel de maguey manso (*Agave atrovirens* Karw) sobre sus propiedades microbiológicas, fisicoquímicas y antioxidantes"

Que para obtener el Título de Licenciada de Nutrición sustenta la Pasante

C. Elizabeth López Martínez

ATENTAMENTE
Pachuca, Hidalgo, 19 de octubre del 2018
"Amor, Orden y Progreso"

PRESIDENTE:	DRA. ESTHER RAMÍREZ MORENO
SECRETARIO:	DRA. DIANA PATRICIA OLIVO RAMÍREZ
PRIMER VOCAL:	DR. JOSÉ ALBERTO ARIZA ORTEGA
SEGUNDO VOCAL:	MTRA. ZULI GPE. CALDERÓN RAMOS
TERCER VOCAL:	DRA. NELLY DEL SOCORRO CRUZ CANSINO
PRIMER SUPLENTE:	MTRA. TRINIDAD LORENA FERNANDEZ CORTÉS
SEGUNDO SUPLENTE:	MTRO. TEODORO SUAREZ DIÉGUEZ

ÍNDICE GENERAL

I.- ÍNDICE DE TABLAS	V
II.- ÍNDICE DE FIGURAS	VI
III. ABREVIATURAS	VIII
1. RESUMEN.....	1
2. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1 Generalidades de la planta de maguey	3
2.2 Características botánicas del maguey	3
2.3 Reproducción del maguey	5
2.4 Maguey pulquero	5
2.4.1 Descripción del <i>Agave atrovirens</i> Karw.....	5
2.4.2 Cultivo de <i>Agave atrovirens</i> Karw.....	6
2.4.3 Capado o castrado del maguey	7
2.4.4 Aguamiel.....	7
2.4.5 Producción de aguamiel.....	9
2.4.6 Importancia del aguamiel en la alimentación	10
2.4.7 Efectos benéficos del consumo de aguamiel	10
2.5 Antioxidantes	11
2.6 Aguamiel como alimento probiótico	12
2.7 Métodos para la conservación de bebidas.....	13
2.8 Ultrasonido	14
2.8.1 Efecto del ultrasonido en el procesamiento de jugos de frutas y verduras	16
2.8.2 Termoultrasonido	17
2.8.3 Efecto del termoultrasonido en el procesamiento de jugos de frutas y verduras	17
3. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	19
4. JUSTIFICACIÓN.....	20

5. OBJETIVOS.....	21
5.1 Objetivo general.....	21
5.2 Objetivos específicos.....	21
6. DISEÑO METODOLÓGICO.....	22
6.1 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	24
6.2 Obtención de la muestra.....	26
6.3 Tratamientos de termoultrasonido.....	26
6.4 Tratamiento por pasteurización.....	27
6.5 Determinación de microorganismos.....	28
6.6 Determinación de propiedades fisicoquímicas.....	28
6.6.1 Determinación de pH.....	28
6.6.2 Sólidos solubles totales.....	29
6.6.3 Acidez titulable.....	29
6.6.4 Índice de oscurecimiento.....	30
6.6.5 Índice de turbidez.....	30
6.6.6 Estabilidad.....	30
6.7 Contenido de compuestos antioxidantes.....	31
6.7.1 Ácido ascórbico.....	31
6.7.2 Fenoles totales.....	31
6.8.1 Capacidad antioxidante por el método de FRAP.....	32
6.8.2 Capacidad antioxidante por el método de DPPH•.....	33
6.8.3 Capacidad antioxidante por el método de ABTS•+.....	34
6.9 Actividad quelante.....	34
6.10 Análisis estadístico.....	35
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	36
7.1 Contenido de microorganismos.....	36

7.2 Propiedades fisicoquímicas.....	38
7.3 Contenido de compuestos antioxidantes	42
7.3.1 Ácido ascórbico.....	42
7.3.2 Fenoles totales	44
7.4 Capacidad antioxidante	47
7.4.1 Capacidad antioxidante por el método de FRAP	47
7.4.2 Capacidad antioxidante por el método de DPPH•.....	48
7.4.3 Capacidad antioxidante por el método de ABTS•+	49
7.4.4 Actividad quelante	50
7.5 Optimización del aguamiel por termoultrasonido	53
7.6 Reproducibilidad del estudio	56
7.7 Comparación del aguamiel termoultrasonificado optimizado con pasteurizado y control.	57
7.7.1 Contenido de Microorganismos.....	57
7.7.2 Índice de turbidez	59
7.7.3 Estabilidad	61
7.7.4 Ácido ascórbico.....	62
7.7.5 Fenoles totales	63
7.7.6 Capacidad antioxidante.....	64
7.7.7 Actividad quelante	66
8. CONCLUSIONES	68
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

I.- ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales usos del <i>Agave</i>	4
Tabla 2. Composición fisicoquímica y minerales de aguamiel.	8
Tabla 3. Tratamientos obtenidos del diseño experimental compuesto central rotatorio para el método de termoultrasonido.	25
Tabla 4. Efecto de la temperatura y el tiempo sobre el contenido de microorganismos	37
Tabla 5. Efecto del tratamiento por termoultrasonido sobre pH, sólidos solubles, acidez titulable, índice de oscurecimiento, índice de turbidez y estabilidad	40
Tabla 6. Coeficiente de regresión y ANOVA de los parámetros del modelo cuadrático de predicción de superficie de respuesta.....	41
Tabla 7. Efecto de la temperatura y el tiempo sobre el contenido de antioxidantes ..	45
Tabla 8. Coeficiente de regresión y ANOVA de los parámetros del modelo cuadrático de predicción de superficie de respuesta.....	46
Tabla 9. Efecto de la temperatura y el tiempo sobre la capacidad antioxidante	51
Tabla 10. Coeficiente de regresión y ANOVA de los parámetros del modelo cuadrático de predicción de superficie de respuesta	51
Tabla 11. Reproducibilidad del modelo de superficie de respuesta	56

II.- ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Agave atrovirens</i> Karw a) Morfología y b) Floración	6
Figura 2. Cavidad del agave capado para almacenamiento de aguamiel.....	9
Figura 3. Cavitación ultrasónica.	15
Figura 4. Diagrama del diseño metodológico.	23
Figura 5. Procesador de ultrasonido VCX – 1500, Sonic & Materials, Inc. Newtown, CT, Estados Unidos.....	27
Figura 6. Efecto del termoultrasonido sobre el índice de turbidez del aguamiel.	41
Figura 7. Efecto del termoultrasonido sobre el porcentaje de estabilidad del aguamiel.	42
Figura 8. Efecto del termoultrasonido sobre el contenido de ácido ascórbico en el aguamiel.	46
Figura 9. Efecto del termoultrasonido sobre el contenido de fenoles totales.	47
Figura 10. Efecto del termoultrasonido sobre la capacidad antioxidante del aguamiel medida por el método de DPPH•.	52
Figura 11. Efecto del termoultrasonido sobre la capacidad antioxidante del aguamiel medida por el método de ABTS•+.	52
Figura 12. Efecto del termoultrasonido sobre el porcentaje de actividad quelante en aguamiel.	53
Figura 13. Condiciones óptimas de termoultrasonificación del aguamiel índice de turbidez, % estabilidad, ácido ascórbico, contenido de fenoles totales, capacidad antioxidante (DPPH• y ABTS•+) y actividad Quelante.	55
Figura 14. Recuento microbiológico: Mesófilos aerobios (MA), Enterobacterias (EB) y Bacterias ácido lácticas (BAL) de aguamiel tratado por termoultrasonido (T-U), pasteurizado y Control..	59
Figura 15. Índice de turbidez del aguamiel tratado por termoultrasonido (T-U), pasteurizado y Control..	61
Figura 16. Estabilidad del aguamiel tratado por termoultrasonido (T-U), pasteurizado y Control..	62
Figura 17. Contenido de ácido ascórbico en aguamiel tratado por termoultrasonido (T-U), pasteurizado y Control.....	63

Figura 18. Contenido de fenoles totales en aguamiel tratado por termoultrasonido (T-U), pasteurizado y Control.....	64
Figura 19. Capacidad antioxidante medida por los métodos de DPPH• (a) y ABTS•+ (b) en aguamiel tratado por termoultrasonido (T-U), y pasteurizado y Control	66
Figura 20. Actividad Quelante de aguamiel tratado por termoultrasonido (T-U), pasteurizado y Control	67

III. ABREVIATURAS

m: metro

cm: centímetro

g: gramo

%: porcentaje

mg: miligramo

mL: mililitros

L: litro

h: hora

min: minuto

µL: microlitro

nm: nanómetro

°C: grado centígrado

M: molar

ABTS: ácido 2,2-azino-bis-(3-etil-benzotiazolin-6-sulfónico)

BAL: bacterias ácido lácticas

DCPI: 2,6-diclorofenol-indofenol

DPPH: 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo

EB: enterobacterias

FDA: Administración de Alimentos y Fármacos de los Estados Unidos

FRAP: Poder antioxidante de reducción férrica

rpm: revolución por minuto

KHz: kilohercio

Log₁₀ UFC/mL: logaritmo 10 de unidades formadoras de colonias por mililitro

MA: mesófilos aerobios

mg EAA/L: miligramos equivalentes de ácido ascórbico por litro

mg EAG/L: miligramos equivalentes de ácido gálico por litro

ROS: especies de oxígeno reactivo

RSM: *Response Surface Methodology*

UBI: ultrasonido de baja intensidad

UAI: Ultrasonido de alta intensidad

µmol Fe (II)/L: micromoles de hierro (II) por litro

µmol ET/L: micromoles equivalentes de Trolox por litro

1. RESUMEN

El aguamiel es la savia que se obtiene durante la capación del maguey maduro, es rico en vitaminas, minerales, proteínas e hidratos de carbono, y se considera como alimento probiótico por su cantidad de bacterias ácido lácticas que contiene. En zonas rurales es comúnmente consumido en fresco, es altamente inestable y no existe un tratamiento que evite la fermentación y permita mantener sus características nutricionales y sensoriales. Actualmente se ha estudiado el efecto combinado del ultrasonido con tratamientos térmicos (termoultrasonificación o termoultrasonido) en los alimentos, como inactivación microbiana y enzimática, manteniendo las propiedades relacionadas con la calidad. El objetivo del presente estudio fue optimizar las condiciones de proceso de termoultrasonido en aguamiel sobre las propiedades microbiológicas, fisicoquímicas y antioxidantes. Se evaluó el contenido de mesófilos aerobios, enterobacterias y bacterias ácido lácticas, propiedades fisicoquímicas, contenido de ascórbico y fenoles totales, y la capacidad antioxidante por FRAP, DPPH•, ABTS•+ y actividad quelante, y el proceso óptimo de termoultrasonido se comparó con aguamiel pasteurizado (85 °C/ 25 s) y aguamiel fresco. La condición óptima de proceso de termoultrasonido fue de 51 ± 1 °C por 19 min obteniendo 0.014 de turbidez, 88.14% de estabilidad, 20.51 mg EAA/L de ascórbico, 194.04 mg EAG/L de fenoles, 111.41 y 72.29 $\mu\text{mol ET/L}$ en actividad antioxidante por DPPH• y ABTS•+, respectivamente y 75% de actividad quelante. El aguamiel termoultrasonificado optimizado presentó $4.19 \log^{10}$ UFC/mL de mesófilos aerobios y $4.64 \log^{10}$ UFC/mL de bacterias ácido lácticas en comparación con la muestra pasteurizada ($4.68 \log^{10}$ UFC/mL y $4.31 \log^{10}$ UFC/mL, respectivamente), así como también presentó mejores resultados para índice de turbidez (0.014), 89.60 % de estabilidad, de ácido ascórbico (20.37 mg EAA/L), de fenoles totales (195.74 mg EAG/L) y actividad antioxidante por ABTS•+ (56.32 $\mu\text{mol ET/L}$). Por lo anterior, el proceso óptimo de termoultrasonido en el aguamiel permite conservar sus propiedades fisicoquímicas, contenido de antioxidantes y bacterias ácido lácticas, facilitando un buen producto para el consumidor en general.

Palabras clave: Aguamiel, termoultrasonido, microbiología, ácido ascórbico, fenoles, actividad antioxidante.

ABSTRACT

Aguamiel is the sap which is obtained during the preparation of ripe maguey, it is rich in vitamins, minerals, proteins and carbohydrates, and is considered as a probiotic food due to the amount of lactic acid bacteria it contains. In rural areas is commonly consumed in fresh, is highly unstable and there is no treatment to prevent fermentation and can maintain its nutritional and sensory characteristics. Currently has been studied the combined effect of ultrasound with thermal treatments (thermoultrasonication or thermoultrasound) in foods, such as microbial and enzymatic inactivation maintaining the properties related to quality. The objective of the present study was to optimize the processing conditions of the thermoultrasound in aguamiel on microbiological, physicochemical and antioxidant properties. The content of aerobic mesophiles, enterobacteria and lactic acid bacteria, physicochemical properties, ascorbic content and total phenols, and the antioxidant capacity by FRAP, DPPH•, ABTS•+ and chelating activity were evaluated, and the optimal thermoultrasound process was compared with pasteurized aguamiel (85 °C/25 s) and fresh aguamiel. The optimal process condition of the thermoultrasound was at 51 ± 1 °C for 19 min, obtaining 0.014 of turbidity, 88.14% of stability, 20.51 mg AAE/L of ascorbic acid, 194.04 mg AGE/L of phenols, 111.41 and 72.29 $\mu\text{mol TE/L}$ in antioxidant activity by DPPH• and ABTS•+, respectively and 75% of chelating activity. Optimized thermoultrasonicated aguamiel presented $4.19 \log^{10}$ CFU/mL of aerobic mesophiles and $4.64 \log^{10}$ CFU/mL of lactic acid bacteria compared with pasteurized sample ($4.68 \log^{10}$ CFU/mL and $4.31 \log^{10}$ CFU/mL, respectively), as well as, presented better results for turbidity index (0.014), 89.60% of stability, of ascorbic acid (20.37 mg EAA/L), of total phenols (195.74 mg EAG/L) and antioxidant activity by ABTS•+ ($56.32 \mu\text{mol ET/L}$). For the above, the optimal thermoultrasound process in aguamiel allows to preserve its physicochemical properties, antioxidant content and lactic acid bacteria, facilitating a good product for the consumer in general.

Key words: Aguamiel, thermoultrasound, microbiology, ascorbic acid, phenols, antioxidant activity.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Generalidades de la planta de maguey

La familia agavácea es nativa de América, en la actualidad ocho géneros son reconocidos, todos los miembros de esta familia presentan una estructura básica en cuanto a sus rosetas, flores e inflorescencia (Flores-Maya, Vargas-Jurado, Suárez-Mota y Barrera-Escorcía, 2015). Desde hace unos 10 000 años, los magueyes del género *Agave* han sido de gran importancia para los habitantes de Mesoamérica (Gentry, 1982). El género *Agave* es sumamente diverso, constituido por más de 280 especies, siendo México el centro de origen (Trejo-Salazar, Scheinvar y Eguiarte, 2015). Junto con el maíz y el frijol, los agaves o “magueyes” fueron quizás de las primeras plantas cultivadas en Mesoamérica y por la gran cantidad de formas de uso se ganaron el apelativo de “árbol de la vida” (Gschaedler, Rodríguez, Prado y Flores, 2015). Las especies de *Agave* se han utilizado para satisfacer y complementar una serie de necesidades básicas como alimento humano y del ganado, fibras, medicamento, material para construcción (Mora-López, Reyes-Agüero, Flores-Flores, Peña-Valdivia y Aguirre, 2011); también se usan como cercos vivos y como cobertura para la retención del suelo, para producción de aguamiel y bebidas fermentadas, como el pulque, y destiladas como el tequila y el mezcal, entre otros usos (Tabla 1) (García-Herrera, Méndez-Gallegos y Talavera-Magaña, 2010).

2.2 Características botánicas del maguey

Los magueyes son plantas xerófitas (adaptadas a vivir en condiciones climáticas desfavorables), con largos periodos de sequía y altas temperaturas, de amplia distribución en hábitats áridos o semiáridos, aunque pueden encontrarse también en los bosques templados o tropicales (Alfaro-Rojas, Legaria-Solano y Rodríguez-Pérez, 2007). Los magueyes presentan ciertas estrategias para sobrevivir en ambientes secos o periódicamente secos, especialmente en el suelo, debido a que se enfrentan con grandes fluctuaciones de temperatura entre el día y la noche, las cuales tienden a limitar la pérdida de agua por transpiración y acumularla en tejidos especializados

(García-Mendoza, 2007). Por su sistema de raíces tienen la capacidad de absorber en forma muy efectiva e intensa el agua de lluvia generalmente escasa, la cual es almacenada en su tallo subterráneo o en las grandes hojas, que no la pierden fácilmente debido a que se encuentran cubiertas por una gruesa cutícula en la epidermis de la hoja evitando así, la evaporación (Alanís-Flores y González-Álvarez, 2011).

Tabla 1. Principales usos del *Agave*.

Usos	Producto	Parte de la planta
	Azúcar	Tallo (piña)
	Guisos	Flores y frutos (cápsulas frescas)
	Envoltura para barbacoa y mixiotes	Hojas/pencas y escapo floral (quiote)
Alimentos	Gusanos blancos	Hojas/pencas
	Escamoles	Cutícula del cogollo
	Gusanos rojos (Chinicuiles)	Raíz del maguey
	Pan de pulque	Tallo (piña)
	Tortillas	Perianto de flores + nixtamal
Bebidas	Aguamiel, miel, atole de aguamiel, pulque, mezcal, tequila, sotol, bacanora, vinagre, jarabe.	Tallo (piña)
	Cerca viva	Planta completa
Agrícola	Evitar erosión como formadora de suelo	Planta completa
	Abono orgánico (fertilizante)	Composta de hojas
	Alimentación (Bovinos, caprinos y porcinos)	Hojas/pencas, escapo floral, flores y parte de la inflorescencia, bagazo.

Fuente: García-Herrera et al., 2010

2.3 Reproducción del maguey

La forma natural más común y exitosa para multiplicación de plantas silvestres de maguey, es mediante la propagación asexual por hijuelos jóvenes derivados de rizoma, así como también por plantaciones comerciales (Trejo-Salazar et al., 2015). El ciclo vital de los magueyes es aproximadamente de 15 a 20 años, el cual comienza con la germinación de la semilla y el establecimiento de una plántula que va desarrollando hojas laterales hasta llegar a floración, fructificación, y la planta morirá luego de formar las semillas (semelparidad) (Alfaro-Rojas et al., 2007).

2.4 Maguey pulquero

El pulque ha sido uno de los principales productos derivados de los llamados magueyes pulqueros. Las evidencias encontradas en Teotihuacán, Estado de México, Tula y Tulancingo Hidalgo, muestran que los magueyes se aprovechan para la obtención de pulque desde hace más de 3 mil 500 años (Álvarez-Duarte, García-Moya, Suárez-Espinosa, Luna-Cavazos y Rodríguez-Acosta, 2018). Se sabe que los agaves se han cultivado desde tiempos prehispánicos para la obtención del aguamiel. Existe una gran diversidad de magueyes que producen aguamiel y pulque de calidad diferente, el aguamiel es una fuente natural de azúcar, y la principal materia prima para la producción de pulque (Aguilar-Juárez, Enríquez, Rodríguez-Ortiz, Granados-Sánchez y Cerero, 2014). Las principales especies pulqueras de las cuales se extrae el aguamiel son *Agave salmiana*, *Agave americana L.*, *Agave mapisaga*, *Agave marmorata Roez.*, *Agave applanata* y *Agave atrovirens Karw.* que se distribuyen en el Valle de México (Ramírez-Tobías, Peña-Valdivia, Aguirre, Reyes-Agüero, Sánchez-Urdaneta y Valle, 2012).

2.4.1 Descripción del *Agave atrovirens Karw*

Las plantas de maguey se caracterizan por ser suculentas y monocotiledóneas, algunas tales como *Agave atrovirens Karw* o maguey manso, cuentan con hojas gruesas y carnosas, cuyo número varía de 30 a 50, se distribuyen muy juntas en torno al tallo formando una roseta (forma característica del maguey), almacenando gran

cantidad de reservas, como jugos nutritivos; miden aproximadamente de 2-2.5 m de largo por 30-40 cm de ancho; son de color grisáceo o verde amarillento, en ocasiones suelen tener bordes provistos de gruesas espinas triangulares terminadas en un mucrón o espina fuerte oscura (Figura 1a) (Ortiz, Williams, Belleville y Doco, 2009). Por otra parte, tiene flores en forma de racimo que son de color verde amarillento cuando están en su etapa de madurez, encontrándose en un tallo denominado escapo central o qurote, que se desarrolla en poco tiempo midiendo aproximadamente de 2 a 5 metros de altura (Figura 1b) (Muñiz-Márquez, Rodríguez-Jasso, Rodríguez-Herrera, Contreras-Esquivel y Aguilar-González, 2013). La presencia del qurote y su floración son indicativas de que la planta morirá, ya que esta floración se da sólo una vez durante el período de vida del maguey y la edad en la que se inicia la floración depende de la especie o variedad, condiciones del terreno, clima y cuidados agrícolas proporcionados (Sánchez, 1998).

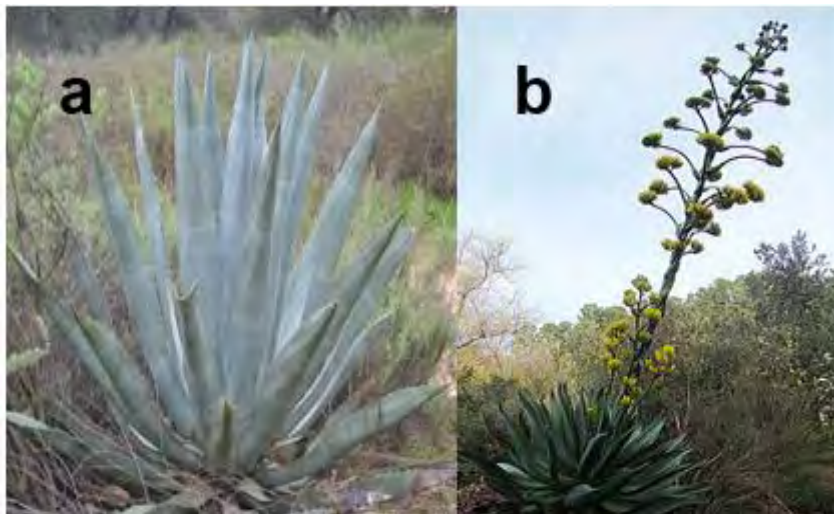


Figura 1. *Agave atrovirens* Karw a) Morfología y b) Floración

2.4.2 Cultivo de *Agave atrovirens* Karw

Una gran parte de la República Mexicana, debido a sus condiciones geográficas y agrícolas, es apropiada para el desarrollo del maguey en general y las regiones poco lluviosas con temperaturas templadas y frías con suelos resacos y duros, resultan ser

el lugar ideal para su crecimiento. En el estado de Hidalgo, Tlaxcala, México y parte de los estados de Puebla, Querétaro y Michoacán, se encuentra la zona en donde el cultivo del maguey y la elaboración del pulque tienen importancia económica (Sánchez-Marroquín y Hope, 1953). Los suelos de la zona magueyera son por lo general pobres, su capa arable es muy delgada (30 a 40 cm), la composición es arcillosa y arcillo-arenosa. La pobreza de los suelos y los fenómenos atmosféricos, como la rápida evaporación, los cambios bruscos en la temperatura, entre otros factores, determinan que los cultivos de cereales como el maíz, cebada y los cultivos de leguminosas sean aleatorios, por tal motivo, el cultivo del maguey es el que mejor se adapta a estas condiciones descritas y por ello ofrece un rendimiento seguro (Vázquez-Díaz, García-Nava, Peña-Valdivia, Tobías, Hugo y Morales-Ramos, 2011).

2.4.3 Capado o castrado del maguey

Se dice que la etapa productiva de un maguey pulquero comienza cuando es “capado”, es decir, desde el momento en que se corta el conjunto de hojas más tiernas del centro de la planta (García-Soto, Jiménez-Islas, Navarrete-Bolaños, Rico-Martínez, Miranda-López y Botello-Álvarez, 2011). La fase siguiente consiste en “picar” aproximadamente tres meses antes de comenzar el raspado y extracción del aguamiel, que consiste en raspar el centro del tronco o piña con la finalidad de formar una cavidad en la cual será almacenada la savia de las pencas. Esta práctica es crucial en cuanto a la cantidad y calidad del aguamiel. Transcurridos tres o cuatro meses se iniciará la raspa y recolección del aguamiel, teniendo en cuenta que la cavidad formada está lista desde el momento en que presenta un color entre rojo y amarillo oscuro (Flores, Mora y Romero, 2008).

2.4.4 Aguamiel

El aguamiel o jugo de agave es la savia de color amarillento, olor herbáceo y sabor característico (NMX-V-022, 1972), que se obtiene al realizar la capación del maguey maduro (de 8-10 años de edad), además, es rico por sí mismo en vitaminas, minerales, proteínas y carbohidratos tales como glucosa, fructosa y sacarosa (Yáñez, Ramírez y

Pérez, 2012; Escalante, Rodríguez, Martínez, López-Munguía, Bolívar y Gosset, 2004). En la Tabla 2 se reporta la composición fisicoquímica y los minerales presentes en el aguamiel.

Tabla 2. Composición fisicoquímica y minerales de aguamiel.

Composición química del aguamiel de <i>Agave atrovirens</i> Karw	En 100g de base seca
Humedad	89.61 (%)
pH	6.29-7.72
Sólidos solubles (°Brix)	11.10-12.67
Acidez titulable	0.06 (%)
Proteínas totales	3.50 (%)
Fructosa total	32.63 (%)
Glucosa total	28.68 (%)
Fructooligosacáridos totales	15.51 (%)
Sacarosa total	12.90 (%)
Minerales	
Potasio	120.44 (mg)
Calcio	11.70 (mg)
Plomo	0.015 (mg)
Zinc	0.18 (mg)
Hierro	0.81 (mg)
Sodio	0.83 (mg)
Cobre	0.07 (mg)
Magnesio	0.55 (mg)
Selenio	0.047 (mg)

Fuente: Flores et al., 2008; Bautista y Arias, 2008.

2.4.5 Producción de aguamiel

Una vez formada la cavidad (20-30 cm), se comienza a almacenar la savia de agave llamada aguamiel (Figura 2) (García, Juárez, Aguirre, Pinos, Martínez y Santoyo, 2009).



Figura 2. Cavidad del agave capado para almacenamiento de aguamiel

La recolección de aguamiel por raspado de la piña se realiza cada 12 horas, misma que se extrae por succión oral con ayuda de un acocote (calabaza grande con orificios en los extremos), el tlachiquero (persona que realiza la extracción) raspa el maguey con una herramienta afilada para eliminar el espesor de las paredes y estimular la secreción del néctar; la vida productiva del maguey tiene una duración de 4 a 6 meses (Flores et al., 2008), durante este período se recoge el aguamiel y cada planta proporciona aproximadamente 1,500 L (Romero-López, Osorio-Díaz, Flores-Morales, Robledo y Mora-Escobedo, 2015). El volumen de producción es constante, al comienzo del raspado de cada planta se obtienen cerca de 0.4 litros por día, durante los primeros dos meses se recolecta aproximadamente de 4 a 6 litros por día, al término de la producción la cantidad de aguamiel nuevamente disminuye 0.4 litros al día (Ortiz, Pourcelly, Doco, Williams, Dornier y Belleville, 2008).

2.4.6 Importancia del aguamiel en la alimentación

El principal aprovechamiento del *Agave atrovirens Karw*, es para la extracción del aguamiel. En México, el aguamiel es empleado tradicionalmente para la obtención de una bebida alcohólica ancestral conocida como pulque. Aunque en algunas ocasiones también es útil en la fabricación de miel, jarabes fructosados y azúcares que sirven como edulcorantes naturales para pacientes con diabetes mellitus (Muñiz-Márquez et al., 2013). El contenido de sacarosa es apreciable en el jugo de maguey y, por lo tanto, se trata de un substrato que puede ser empleado como materia prima en la industria de la fermentación, para obtención de proteína de levadura; obtención de dextrinas para uso alimenticio o clínico y producción de vitaminas y ácidos orgánicos mediante microorganismos (Flores et al., 2008).

2.4.7 Efectos benéficos del consumo de aguamiel

Como se mencionó anteriormente, el aguamiel es una bebida que podría ejercer beneficios sobre la salud. Sin embargo, los estudios científicos sobre su efecto en la salud humana no han sido bien documentados. (Carrillo-López, Silos-Espino, Flores-Benítez, Espinoza-Sánchez, Ornelas-Tavares y Flores-Chávez, 2016), reportaron que el consumo de aguamiel en individuos con hipercolesterolemia presentó un efecto funcional específico, ya que disminuyó las concentraciones de colesterol en sangre sin ocasionar hiperglucemia.

Se ha demostrado que el aguamiel de *Agave salmiana* posee una gran capacidad antioxidante y se identificó que aumenta las concentraciones de hemoglobina, hematocrito y hemoglobina corpuscular media en conejos (Tovar-Robles, Perales-Segovia, Cedillo, Valera-Montero, Gómez-Leyva, Guevara-Lara y Silos-Espino, 2011). Cabe mencionar que ambos estudios son los primeros informes sobre el efecto del aguamiel en seres humanos y en el sistema animal sin reportar efectos adversos.

También se ha realizado un estudio sobre la capacidad antioxidante *in vitro* en aguamiel de *Agave atrovirens Karw*, donde se reportó el contenido de compuestos fenólicos, los cuales exhibieron capacidad antioxidante contra DPPH• (2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo) y ABTS•+ (ácido 2,2-azino-bis-(3-etil-benzotiazolin-6-sulfónico)), por lo

cual se sugiere que gracias a su consumo se obtiene una fuente importante de compuestos con posibles beneficios para la salud (Romero-López et al., 2015).

2.5 Antioxidantes

Los radicales libres son átomos, moléculas o iones con uno o más electrones desapareados en sus órbitas exteriores, son altamente inestables y activos para reacciones químicas con otras moléculas. Se derivan de tres elementos: oxígeno, nitrógeno y azufre, creando así especies de oxígeno reactivo (ROS), especies de nitrógeno reactivo (RNS) y especies de azufre reactivo (RSS) (Carocho y Ferreira, 2013). Además, por la vida media que es de microsegundos, ocurre una rápida propagación con moléculas aledañas y mayor daño potencial. De hecho, un radical libre puede afectar un millón de moléculas durante la reacción en cadena (Zamora, 2007).

Internamente, los radicales libres se producen como una parte normal del metabolismo humano. Los factores externos que ayudan a promover la producción de radicales libres son el tabaquismo, alcohol, los contaminantes ambientales, la radiación, las drogas, los pesticidas, los solventes industriales, el ozono y una alimentación inadecuada (Lobo, Patil, Phatak y Chandra, 2010).

En determinadas circunstancias, la producción de radicales libres puede aumentar en forma descontrolada, situación conocida con el nombre de estrés oxidativo (Coronado, Vega-León, Gutiérrez, Vázquez y Radilla, 2015). El concepto expresa la existencia de un desequilibrio entre las velocidades de producción y de destrucción de las moléculas tóxicas, que da lugar a un aumento en la concentración celular de los radicales libres (Zamora, 2007).

Un antioxidante, es una molécula lo suficientemente estable como para donar un electrón a un radical libre agresivo y neutralizarlo, reduciendo así, su capacidad de daño (Patthamakanokporn, Puwastien, Nitithamyong y Sirichakwal, 2008). Su función primordial es evitar la oxidación de sustancias que puedan provocar alteraciones fisiológicas (Coronado et al., 2015), facilitando el uso fisiológico del oxígeno por parte

de las mitocondrias ayudando así, a reducir los efectos del estrés oxidativo y la falta de oxígeno y por consiguiente desempeñando una función fundamental en la prevención de las enfermedades derivadas del estrés oxidativo, como el cáncer, diabetes, hipertensión arterial, cirrosis, insuficiencia hepática, entre otras (Lobo et al., 2010).

Los principales antioxidantes son la vitamina E (α -tocoferol), la vitamina C (ácido ascórbico) y el β -caroteno, el cuerpo humano no puede producir estos micronutrientes, por lo que se deben suministrar en la dieta (Levine, Rumsey, Daruwala, Park y Wang, 1999). Entre otros antioxidantes, están los compuestos fenólicos naturales que también actúan como agentes reductores, terminan la reacción en cadena de radicales libres y quelan metales de transición (Sindhi, Gupta, Sharma, Bhatnagar, Kumari y Dhaka, 2013).

2.6 Aguamiel como alimento probiótico

El aguamiel es un estimulante de la flora intestinal por lo cual se considera como alimento probiótico, debido a la cantidad de bacterias ácido lácticas (BAL) que se encuentran de manera natural en esta bebida y a la composición nutricional como proteínas y aminoácidos (Yáñez et al., 2012). Las BAL son un grupo de bacterias Gram-positivas agrupadas por una gran cantidad de características morfológicas, metabólicas y fisiológicas. La descripción general de este grupo de bacterias se incluye en el grupo de Gram-positivos, no esporulados, cocos o bacilos que producen ácido láctico como producto de la fermentación de carbohidratos (Cueto y Aragón, 2012). El término probiótico hace referencia a un preparado o a un producto que contiene cepas de microorganismos viables en cantidad suficiente como para modificar la microflora en algún compartimento del huésped (por implantación o colonización), ejerciendo así, un efecto beneficioso sobre la salud del mismo (Olveria y González-Molero, 2007), dado que la microflora del intestino es un componente constitutivo de las mucosas intestinales, los probióticos dan una oportunidad para reforzar las defensas contra infecciones del tracto gastrointestinal, por lo que actualmente son empleados en la industria de alimentos (Wilches, 2005), además por su habilidad para acidificar y

preservar alimentos; así como también su implicación en la textura, sabor, olor y desarrollo de aroma de alimentos fermentados (Parra, 2010).

En las zonas rurales el aguamiel comúnmente es consumido en fresco después de su extracción. En la actualidad su consumo ha decaído considerablemente debido a la poca higiene y a que es altamente inestable, a causa de la gran cantidad de microorganismos nativos como levaduras y hongos, pH neutro y, por ende, el proceso de fermentación acelera (3 a 12 horas después de su extracción) (Flores et al., 2008), de manera que su comercialización es difícil. Por consiguiente, es necesario utilizar tecnologías adecuadas para ayudar a mejorar su conservación u obtención de productos derivados con mayor tiempo de vida útil, para así permitir su comercialización con un valor agrado; además se fomenta la introducción al mercado de productos alimenticios naturales.

2.7 Métodos para la conservación de bebidas

La pasteurización es comúnmente el tratamiento térmico aplicado para la conservación de alimentos. Asegura una buena vida útil y estabilidad de los jugos de frutas y vegetales; sin embargo, este proceso puede afectar la calidad del zumo en términos de parámetros nutricionales y fisicoquímicos, tales como: vitaminas (C y E), carotenoides, polifenoles, ácidos orgánicos, pH y color (Dubrovic, Herceg, Jambrak, Badanjak y Dragovic-Uzelac, 2011).

Con el fin de superar los efectos nocivos del calor en el deterioro de la calidad y la propiedad estética de los alimentos, las tecnologías no térmicas para el procesamiento de alimentos están ganando popularidad (Jovanovic-Malinovska, Kuzmanova y Winkelhausen, 2015). Las nuevas tecnologías de alimentos se describen como alternativas completas o parciales al procesamiento térmico, entre las que se destacan las aplicaciones de ultrasonido, que tienen un potencial comprobado para su uso en la industria alimentaria, especialmente en la industria de bebidas (Knorr, Froehling, Jaeger, Reineke, Schlueter y Schoessler, 2011).

2.8 Ultrasonido

El ultrasonido es un método no térmico de conservación de alimentos que tiene la ventaja de inactivar microorganismos en los alimentos sin causar los efectos secundarios comunes asociados con los tratamientos térmicos convencionales (Dubrovic et al, 2011). Se define como la energía generada por ondas sónicas de 20 kHz o más vibraciones por segundo (Robles-Ozuna y Ochoa-Martínez, 2012), y se refiere al sonido con frecuencia más allá de lo que el oído humano puede percibir (aproximadamente 20kHz) (Tiwari, O'Donnell y Cullen, 2009; Gómez-Díaz y López-Malo, 2009). Desde el punto de vista industrial y dependiendo de los rangos de frecuencia utilizados, el ultrasonido se puede dividir en dos grandes grupos: ultrasonido de baja intensidad (UBI) y el ultrasonido de alta intensidad (UAI) (Parra, 2010). El UBI, se utiliza normalmente para aplicaciones analíticas, como determinación de la composición, estructura y estado físico de alimentos sólidos, conocido como ultrasonido de diagnóstico (Hoover, 2000). El UAI, se encuentra en el rango de 16 a 100 kHz, es utilizado en la industria alimentaria para la conservación de alimentos, ya que puede alterar las propiedades fisicoquímicas o la estructura de un material, produciendo reacciones químicas (Mason, Rivera, Vercet y López-Buesa, 2005). Los efectos del ultrasonido, en sistemas líquidos están relacionados principalmente con el fenómeno de la cavitación. El ultrasonido se propaga a través de una serie de ondas de compresión y rarefacción (Figura 3) inducidas en las moléculas del medio tratado. A una potencia suficientemente alta, donde el ciclo de rarefacción puede exceder las fuerzas atractivas de las moléculas líquidas y se forman burbujas de cavitación a partir de los núcleos de gas existentes dentro del fluido (Hoover, 2000). Estas burbujas, distribuidas por todo el líquido, cambian de tamaño, creciendo con el transcurso de unos pocos ciclos hasta alcanzar un tamaño crítico, volviéndose inestables y colapsando violentamente. El ultrasonido puede ser utilizado en la industria de alimentos, para limpieza y desinfección ya que provoca la destrucción microbiana, inactivación enzimática, favorece reacciones químicas y la extracción de ciertos compuestos (Chemat, Zill-e-Huma y Kamran, 2011). El ultrasonido representa una tecnología novedosa, la cual ha creado bastante interés debido a sus efectos en las áreas del procesamiento y conservación de alimentos; actualmente es considerada

como una tecnología emergente (Robles-Ozuna y Ochoa-Martínez, 2012), que resulta económica, sencilla, respetuosa con el medio ambiente y eficaz para lograr una disminución de la carga microbiana, sin tener efectos nocivos sobre la nutrición, la calidad, los atributos sensoriales y estéticos de los alimentos (Tiwari et al., 2009). Adicionalmente, el ultrasonido por su capacidad para destruir paredes y membranas biológicas, se considera una tecnología promisoría tanto para la destrucción de microorganismos a temperaturas de procesamiento inferiores a las utilizadas durante la esterilización, como para acompañar otras tecnologías de proceso como lo son la extracción, las altas presiones, la pasteurización, entre otras (Khandpur y Gogate, 2016).

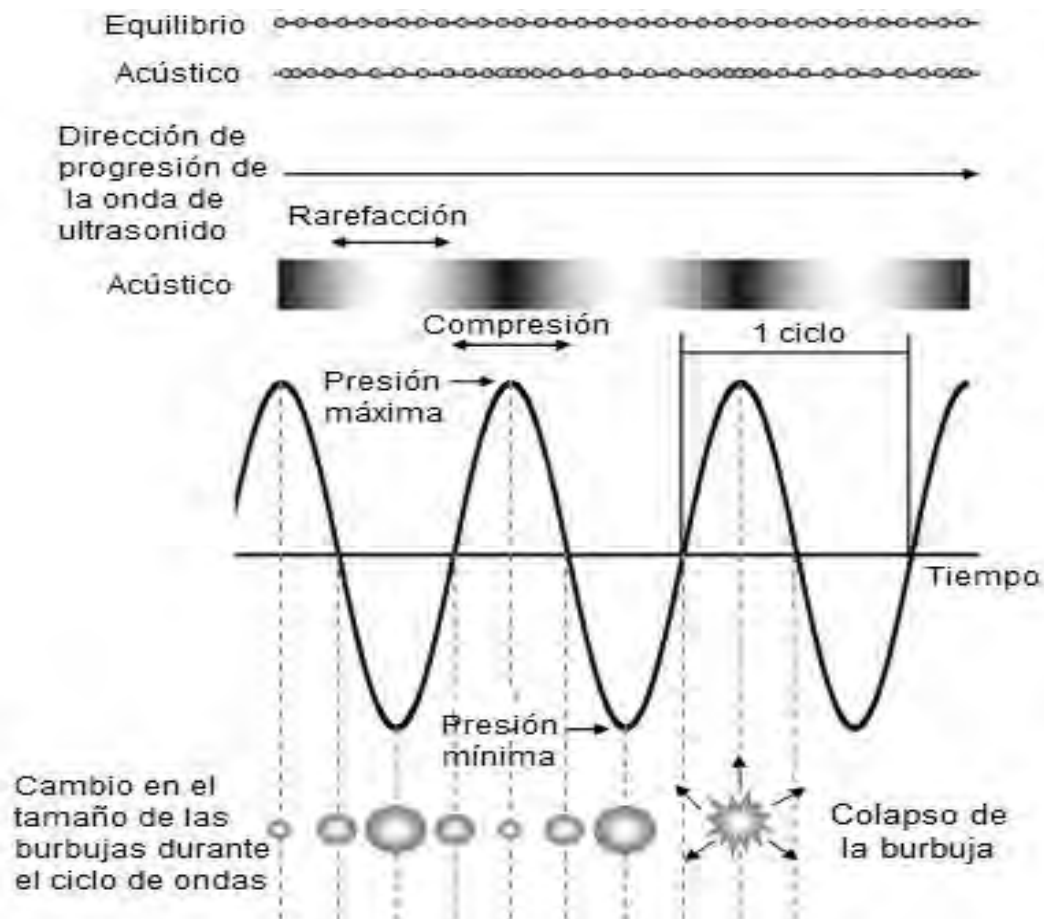


Figura 3. Cavitación ultrasónica (Soria y Villamiel, 2010).

2.8.1 Efecto del ultrasonido en el procesamiento de jugos de frutas y verduras

Se han realizado estudios acerca del efecto del ultrasonido sobre las características fisicoquímicas de jugos de frutas, demostrando que dicho tratamiento no induce cambios significativos en el pH ni en el contenido de sólidos solubles totales, mientras que las propiedades como turbidez y capacidad antioxidante se ven favorecidas después del tratamiento (Tiwari, Patras, Brunton, Cullen y O'Donnell, 2010; Cordeiro, Pimenta, Oliveira, Araújo, Barbosa y Moreira, 2015).

En un estudio realizado en jugo de maracuyá, se reportó que el ultrasonido no afectó la calidad sensorial del jugo y que se puede prolongar la estabilidad microbiológica en este producto (Gómez-López, Buitrago y Martínez-Yépez, 2018). Mientras que en jugo de zarzamora el tratamiento disminuyó la carga microbiológica a mayor amplitud y tiempo, el contenido de fenoles totales aumentó al igual que su capacidad antioxidante por DPPH• (Ramírez-Moreno, Zafra-Rojas, Arias-Rico, Ariza-Ortega, Alanís-García y Cruz-Cansino, 2018). Y en jugo de pera, se logró una inactivación microbiana y mayor retención de compuestos bioactivos, obteniendo mejores resultados en comparación con el tratamiento por pasteurización (Saeeduddin, Abid, Jabbar, Wu, Hashim, Awad y Zeng, 2015). Por otro lado, Khandpur y Gogate (2015), realizaron un estudio en diferentes jugos de frutas y vegetales, en donde se reportó que es posible producir jugos con excelentes propiedades nutricionales usando el tratamiento de ultrasonido en comparación con el método de esterilización térmica, ya que el análisis de los nutrientes del jugo tratado exhibió que las muestras estaban a la par con el jugo fresco.

Sin embargo, el ultrasonido no es eficaz por sí solo, ya que se genera un incremento de la temperatura por lo que actualmente se ha estudiado su efecto combinado con otras técnicas entre ellas el calor el cual se le denominado termosonicación (Herceg, Lelas, Jambrak, Vukusic y Levaj, 2013).

2.8.2 Termoultrasonido

El uso simultáneo de ultrasonido y temperaturas suaves (<100 °C, generalmente entre 50 y 60 °C), es un proceso llamado termoultrasonido, que reduce la temperatura y/o el tiempo del proceso de esterilización y por ende previene el daño del producto (Demirdöven y Baysal, 2008); esta tecnología emergente ha demostrado ser una muy buena opción como alternativa a los tratamientos térmicos convencionales, ya que se han obtenido resultados favorables en el procesamiento de alimentos, tales como la inactivación microbiana y enzimática mediante el calor combinado y la cavitación; produciendo un efecto sobre la membrana bacteriana y la despolimerización de las macromoléculas (Herceg et al., 2013), así como también ayuda a la liberación y retención de compuestos de capacidad antioxidante y el mantenimiento de sus propiedades relacionadas con la calidad como el color, acidez, titulable, entre otros parámetros, sin afectar la calidad de los alimentos (Tiwari, O'Donnell, Patras y Cullen, 2008; López-Malo, Palou, Jiménez, Alzamora y Guerrero, 2005).

2.8.3 Efecto del termoultrasonido en el procesamiento de jugos de frutas y verduras

En la actualidad se han realizado estudios del tratamiento de termoultrasonido sobre los alimentos, el cual ha demostrado ser más efectivo, con respecto al ultrasonido por sí solo. Este tratamiento logró una inactivación total de microorganismos nativos del jugo de manzana (Abid, Jabbar, Hu, Hashim, Wu, Lei, Khan y Zeng, 2014); por otro lado, en jugo de zarzamora no se detectó crecimiento microbiano en ninguna de las muestras termoultrasonificadas con respecto al jugo fresco (Cervantes-Elizarrarás, Piloni-Martini, Ramírez-Moreno, Alanís-García, Güemes-Vera, Gómez-Aldapa, Zafra-Rojas y Cruz-Cansino, 2017). Mientras que en otro estudio realizado en zumo de manzana se inactivó *Escherichia Coli* y se cumplió con los requisitos de la Administración de Alimentos y Fármacos de los Estados Unidos (FDA) para el procesamiento de jugos de frutas (reducción mínima de 5 log de microorganismos) (Muñoz, Caminiti, Palgan, Pataro, Noci, Morgan y Lyng, 2012). En un zumo de zanahoria el proceso de termoultrasonido mejoró el contenido fenólico y la actividad

antiradical en comparación con la muestra de jugo control (Adiamo, Ghafoor, Al-Juhaimi, Babiker y Ahmed, 2018). Aguilar, Garvín, Ibarz y Augusto, 2017), evaluaron el efecto del procesamiento de termoultrasonido sobre el contenido de ácido ascórbico de los jugos, un factor que se utiliza como indicador de calidad nutricional de los productos de fruta y encontraron que la sonicación no afectaba el contenido de ácido ascórbico cuando las muestras era desgasificadas previamente. También se analizó el efecto del termoultrasonido en la mejora de la calidad del jugo de tomate, obtuvieron efectos beneficiosos a los 70° C ya que se presentó una inactivación enzimática, hecho que se atribuye al mecanismo de cavitación (Wu, Gamage, Vilku, Simons y Mawson, 2008), entre otros. Por este motivo, surge la necesidad de optimizar los procesos del termoultrasonido, para lograr una mayor retención de compuestos bioactivos y que a su vez permita obtener un producto libre de microorganismos que puedan afectar la calidad e inocuidad en los alimentos.

3. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

El aguamiel en México, es obtenido del maguey y utilizado principalmente para la manufactura del pulque. Es una bebida nutritiva, actualmente considerada como “bebida probiótica”, ya que contiene una amplia variedad de fitoquímicos con capacidad antioxidante y bacterias ácido lácticas. En la actualidad, la producción de esta bebida no es rentable para los agricultores, debido a diferentes factores entre los que destacan la erosión de los cultivos de maguey, que han sido utilizados para otros fines, como el uso de la penca para envolver barbacoa, alimentación de ganado, producción de chinicuiles para uso gastronómico, entre otros. De igual manera el consumo de aguamiel ha disminuido por la poca higiene con la que se produce (formas de obtención, manipulación y uso de utensilios y materiales que entran en contacto con el producto), incrementando así entre otros microorganismos contaminantes, la microflora natural y ocasionando la rápida fermentación. Motivo por el cual no se puede transportar desde los lugares de producción a lugares distantes a más de tres horas para su comercialización. Otro factor, puede ser la disminución en la demanda del pulque y por ende el aguamiel, debido a la destitución por otras bebidas más comercializadas: tequila, cerveza, u combinación con bebidas edulcorantes.

Pregunta de investigación

¿Qué condición óptima es la mejor para propiciar aguamiel de buena calidad?

4. JUSTIFICACIÓN

El aguamiel se puede consumir como una bebida refrescante, sin embargo, es altamente inestable debido a la gran cantidad de flora nativa. El procesamiento de este producto incluye solamente la obtención del producto fresco sin ningún tratamiento que preserve la cantidad de microorganismos y que permita mantener sus características sensoriales y nutricionales. La pasteurización pudiera ser una opción viable para retardar la fermentación y disminuir la contaminación por microorganismos, sin embargo, ocasionaría la disminución de la flora nativa del producto, además de que podría afectar características sensoriales como el sabor y color, y algunas propiedades nutricionales como la pérdida de vitaminas termosensibles. El termoultrasonido es una tecnología que utiliza bajas temperaturas y el uso de generación de ondas de cavitación podría obtener un producto con mejor calidad microbiológica y nutritiva. La generación de información del aguamiel y alternativas de procesamiento, permitirá a los productores tener una mayor comercialización de un producto inocuo, incluso en áreas urbanas y suburbanas donde no se produce.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Determinar la condición óptima del efecto del termoultrasonido en aguamiel de maguey manso (*Agave atrovirens Karw*) sobre sus propiedades microbiológicas, fisicoquímicas y antioxidantes.

5.2 Objetivos específicos

- Realizar trece tratamientos de proceso (combinación de temperatura y tiempo) de termoultrasonificación en el aguamiel utilizando la metodología de superficie de respuesta (RSM), considerando las siguientes variables de respuesta:
 - Calidad microbiológica (recuento de mesófilos aerobios, enterobacterias) y bacterias ácido lácticas.
 - Características fisicoquímicas (pH, sólidos solubles totales, acidez titulable, índice de oscurecimiento, índice de turbidez, porcentaje de estabilidad)
 - Contenido de ácido ascórbico y fenoles totales.
 - Capacidad antioxidante por el método de FRAP, DPPH• y ABTS•+, y actividad quelante.
- Determinar la condición óptima de termoultrasonido a través de la superposición de las figuras de contorno.
- Validar el modelo matemático mediante la reproducibilidad de los valores predichos.
- Comparar la condición óptima de termoultrasonido, con aguamiel pasteurizado y aguamiel fresco considerando la calidad microbiológica, propiedades fisicoquímicas, contenido y capacidad antioxidante.

6. DISEÑO METODOLÓGICO

El proceso metodológico se dividió en dos fases: 1) se termoultrasonificaron 13 tratamientos a diferentes condiciones de temperatura y tiempo (obtenidos con el programa JMP versión 7.0.2) y se monitoreó con aguamiel fresco como muestra control. Posteriormente se realizaron las siguientes determinaciones por triplicado a cada uno de los tratamientos y la muestra control: calidad microbiológica (mesófilos aerobios, enterobacterias) y bacterias ácido lácticas, propiedades fisicoquímicas (pH, sólidos solubles totales, acidez titulable, índice de oscurecimiento, índice de turbidez y estabilidad), contenido de ácido ascórbico y fenoles totales, por último se realizó la capacidad antioxidante por el método de FRAP, DPPH• y ABTS•+, y actividad quelante. Y se llevó a cabo el análisis estadístico de las variables de respuesta, en donde las que presentaron una $r^2 > 0.90$ indicaron que se ajustaron al modelo matemático (JMP versión 7.0.2) y mediante el programa SigmaPlot 12.0 se obtuvo la condición óptima de termoultrasonido en aguamiel con el traslape de las figuras de contorno. Después se realizó la reproducibilidad de los valores predichos (JMP versión 7.0.2) con los valores experimentales utilizando t-student, para conocer si la condición óptima de proceso fue reproducible; 2) El aguamiel optimizado termoultrasonificado se comparó con una muestra pasteurizada y una control, se evaluaron las determinaciones que alcanzaron una $r^2 > 0.90$, las cuales fueron: índice de turbidez, estabilidad, contenido de ácido ascórbico, fenoles totales y capacidad antioxidante por los métodos de DPPH• y ABTS•+, al igual que actividad quelante, los resultados se compararon mediante las pruebas estadísticas ANOVA y Tukey (Figura 4).

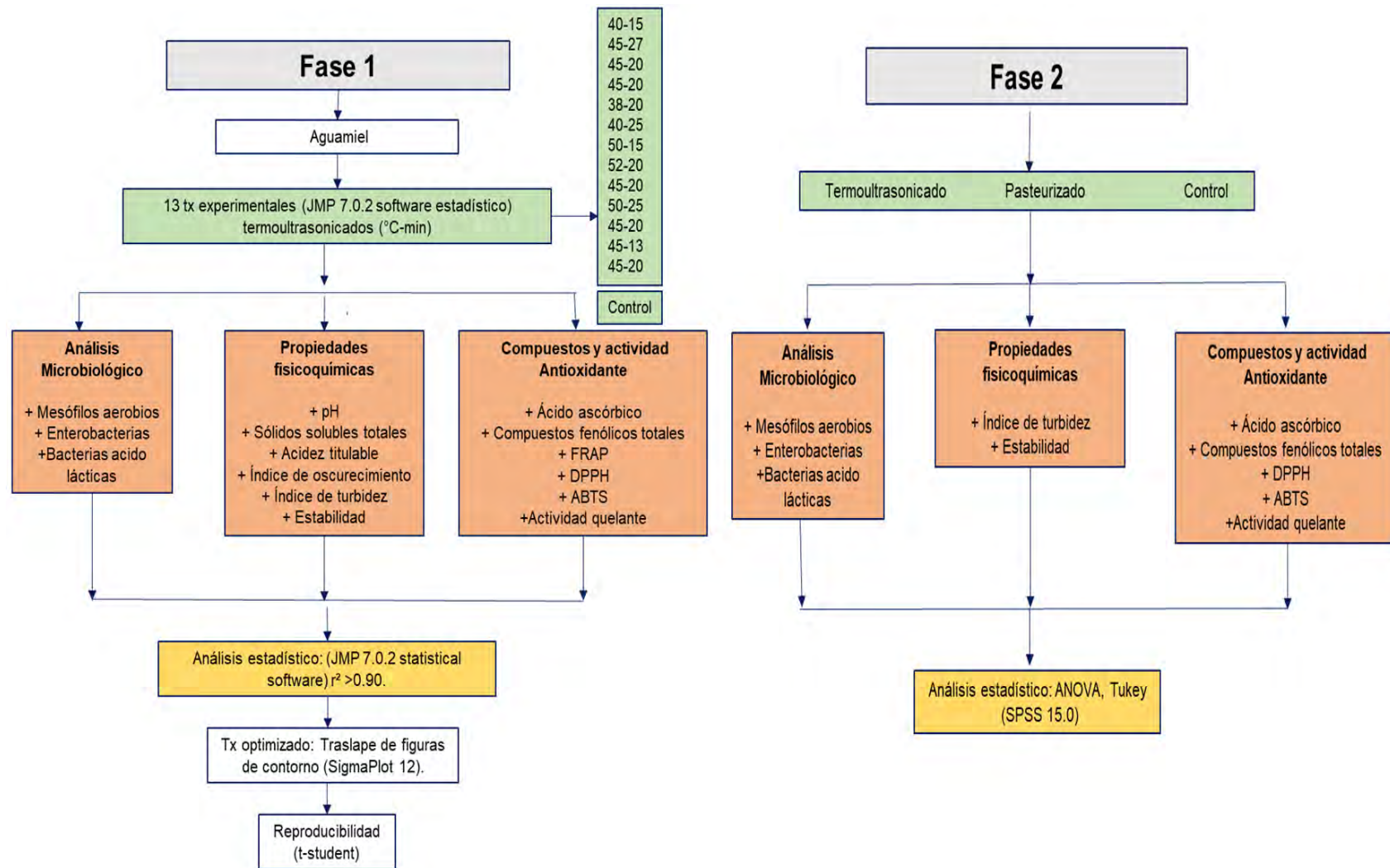


Figura 4. Diagrama del diseño metodológico.

6.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

Para optimizar las variables de proceso en aguamiel por termoultrasonido se empleó la metodología de superficie de respuesta (RMS, por sus siglas en inglés: *Response Surface Methodology*).

Se consideraron dos variables (temperatura y tiempo) para el tratamiento de termoultrasonido y se empleó un diseño experimental central compuesto rotatorio, en cinco niveles. El orden de experimentación fue al azar. El nivel de amplitud del ultrasonido fue fijado a 80%. Las variables independientes o de proceso fueron: X1 = Temperatura (40 – 50 °C), X2 = Tiempo (15 – 25 minutos).

El diseño generó 13 tratamientos con 5 puntos centrales, para estimar la reproducibilidad de método; 4 puntos axiales, al igual que 4 puntos factoriales (Tabla 3), a una distancia de 1.414, de cada diseño central.

Valores medios fueron sometidos a un análisis de regresión múltiple utilizando el programa estadístico JMP versión 7.0.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, Estados Unidos, 2007) y se ajustaron a un modelo polinomial de segundo orden, dado en la siguiente ecuación:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^2 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^2 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_i \sum_{j=i+1} \beta_{ij} X_i X_j$$

Donde:

Y = respuesta prevista

β_0 = coeficiente constante

β_i = coeficiente lineal

β_{ii} = coeficiente cuadrático

β_{ij} = coeficiente de interacción

X_i y X_j = variables independientes

Y es la variable de prevista o de respuesta, β_0 son los coeficientes constantes de regresión de variables para interceptar el termino lineal, cuadrático y la interacción, mientras que X_1 y X_2 son las variables independientes utilizadas, temperatura (40 – 50 °C) y tiempo (15 – 25 minutos), respectivamente.

Tabla 3. Tratamientos obtenidos del diseño experimental compuesto central rotatorio para el método de termoultrasonido.

Tratamiento	Modelo	X ₁ : Temperatura (°C)	X ₂ : Tiempo (min)
1	--	40	15
2	0A	45	27.07
3	00*	45	20
4	00*	45	20
5	a0	37.92	20
6	-+	40	25
7	+ -	50	15
8	A0	52.07	20
9	00*	45	20
10	++	50	25
11	00*	45	20
12	0a	45	12.92
13	00*	45	20

*Puntos centrales

La adecuación del modelo matemático se determinó utilizando el coeficiente r^2 . La significación (p) de los coeficientes de regresión del modelo se evaluó mediante análisis de varianza.

Se realizaron gráficas tridimensionales de la superficie de respuesta para la interpretación gráfica de los efectos de interacción en las variables independientes sobre la respuesta obtenida, también fueron elaboradas gráficas de contorno para representar la extrapolación e interpretar la optimización de las variables, para lo cual fue utilizado el programa SigmaPlot 12.0 software de gráficos (SYSTAT Software Inc., San José, CA, Estados Unidos). La validez del modelo se determinó mediante la comparación de los valores predichos con los datos experimentales, utilizando el análisis de medias empleando la prueba t - student ($p < 0.05$) para dos muestras.

6.2 Obtención de la muestra

La muestra de aguamiel fue obtenida de la comunidad de Aguayutla, ubicada en el municipio de Singuilucan, Hidalgo, de magueyes con una edad promedio de 8 años. Previo a la recolección se tuvo una capacitación impartida por un experto, la muestra se recogió una vez a la semana a las ocho de la mañana. Los utensilios utilizados fueron esterilizados previamente, con el fin de evitar contaminación.

El aguamiel fue extraído del cajete del maguey con la ayuda de un recipiente de plástico, se filtró mediante un colador convencional con el propósito retirar materia suspendida como partículas del tallo de la planta de maguey, que pudiera originar error en los análisis, se trasladó al laboratorio de Tecnofuncionalidad de Alimentos del Instituto de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo en frascos de vidrio de 500 mL con taparrosca para un perfecto sellado y fueron colocados en hieleras con bolsas de gel refrigerante para eludir el proceso de fermentación, posteriormente se aplicó el tratamiento de termoultrasonido.

6.3 Tratamientos de termoultrasonido

El tratamiento de termoultrasonido se llevó a cabo con un equipo de ultrasonido (VCX-1500HV, Sonics & Materials, Inc. Newtown, CT, Estados Unidos) (Figura 5), con

potencia de 1500 W, se utilizó una frecuencia constante de 20 KHz. El parámetro de amplitud fija fue de 80% y temperatura de 40–50°C por un tiempo de 15-25 min. Las duraciones de pulso fueron de cuatro segundos encendido y dos segundos apagado. Se colocaron 400 mL de aguamiel en un recipiente de acero inoxidable con doble pared a través del cual circulaba agua a una velocidad de flujo de 0.5 L/min. Para controlar la temperatura fue empleado un baño de agua (12108-10, Cole Parmer, USA). Durante los diferentes tratamientos experimentales se monitoreó la temperatura de entrada y salida y fueron tratados según el diseño experimental (Tabla 3). Una vez optimizado, el aguamiel se termoultrasonizó por triplicado bajo las condiciones óptimas según el diseño de superficie de respuesta.

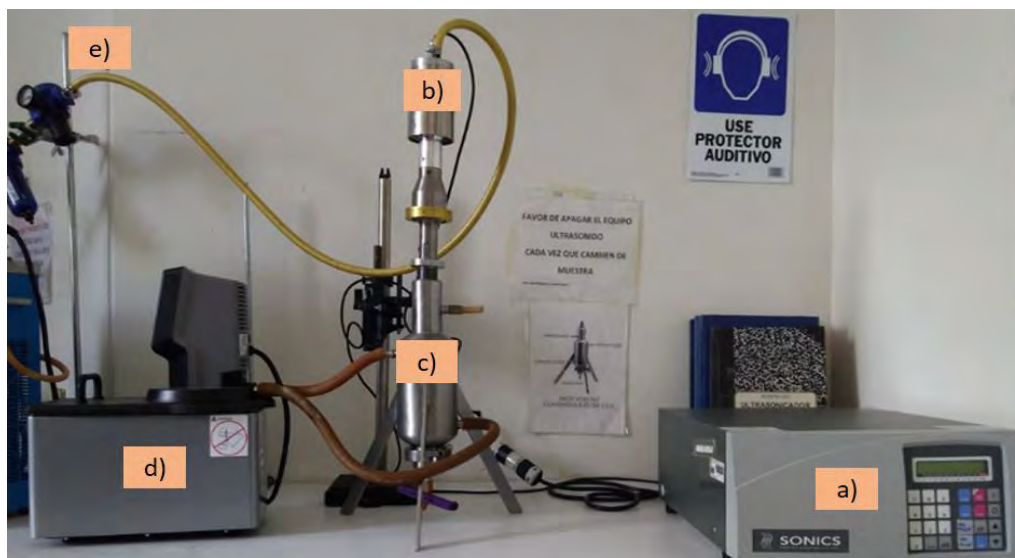


Figura 5. Procesador de ultrasonido VCX – 1500, Sonic & Materials, Inc. Newtown, CT, Estados Unidos. **a)** procesador ultrasónico, **b)** sensor, **c)** celda de flujo continuo, **d)** baño de agua y **e)** sistema de flujo de aire.

6.4 Tratamiento por pasteurización

Se utilizó una celda de flujo continuo con capacidad de 400 mL, el aguamiel fue colocado en la celda y se elevó la temperatura hasta llegar a los 85 °C, con la ayuda de un baño de agua (12108-10, Cole Parmer, USA) y se mantuvo por 25 segundos a

esa temperatura, monitoreado con un termómetro. Pasado este tiempo la muestra de aguamiel se vació en un frasco de vidrio con taparrosca (previamente esterilizado), el cual se depositó en un recipiente con hielo para efectuar un choque térmico (Tapia, 2016).

6.5 Determinación de microorganismos

Los análisis microbiológicos se realizaron mediante la técnica de vaciado en placa, haciendo una siembra por inclusión utilizando diluciones decimales (de -1 a la -3) por triplicado, en una solución de agua peptona. Se realizó conteo de mesófilos aerobios (MA), en agar para métodos estándar (PCA), incubado a 30 °C durante 48 h (LSI-3016^a, Labtech, Korea). El recuento de enterobacterias (EB) se obtuvo en agar bilis rojo violeta glucosado (VRBG), incubado a 37 °C durante 24 h, mediante la metodología descrita por Cruz, Capellas, Hernández, Trujillo, Guamis y Ferragut (2007). También fue realizado el conteo de bacterias ácido lácticas (BAL) en medio ATP, se incubaron 48 horas a 30 °C según lo reportado por Evans y Niven (1951). Se realizó un conteo en placa y los resultados del contenido microbiológico se expresaron como logaritmo base 10 de unidades formadoras de colonias por mililitro (\log^{10} UFC/mL) de aguamiel.

6.6 Determinación de propiedades fisicoquímicas

6.6.1 Determinación de pH

Para medir pH de las muestras de aguamiel se utilizó un potenciómetro digital (HANNA, pH 210, USA) el cual fue previamente calibrado con soluciones tampón comercial de pH 7.0 y 4.0 estandarizados para el análisis. Se colocaron 20 mL de muestra en un vaso de precipitado de 50 mL y se sumergió el potenciómetro con la parte del electrodo dentro del líquido y se tomó la lectura, tomando en cuenta que el electrodo no debe tener contacto con las paredes del recipiente.

6.6.2 Sólidos solubles totales

Los sólidos solubles totales se determinaron con un refractómetro (Trading Co., Brix/ATC FG-133, Chincan). Con la ayuda de una pipeta Pasteur, se depositó una cantidad de 0.2 mL (una gota) de aguamiel y se tomó directamente la lectura en el refractómetro. La medición fue realizada por triplicado a temperatura ambiente, el refractómetro se limpió con agua desionizada y algodón después de cada análisis y los resultados fueron expresados en °Brix.

6.6.3 Acidez titulable

Se realizó por el método de la AOAC (1999). La determinación de la acidez titulable con una solución 0.1 N de hidróxido de sodio, está basada en el hecho de que el número de mL de una solución 0.1 N de NaOH necesaria para neutralizar el ácido láctico en la muestra multiplicado por 0.09 dará el número de gramos de ácido láctico en la muestra (Kirk, Sawyer y Egan, 2009). La prueba se llevó a cabo colocando 5 mL de muestra más 20 mL de agua desionizada y 4 gotas de indicador fenolftaleína en un matraz Erlenmeyer, fue homogenizada y posteriormente se tituló con solución de NaOH al 0.1 N hasta que la muestra presentó un color ligeramente rosado. El porcentaje de acidez titulable fue calculado con la siguiente ecuación registrando los mL de NaOH gastados:

$$\% \text{ acidez titulable} = \frac{(V * N * 0.09)}{V_m} \times 100$$

Donde:

V: mililitros de NaOH gastados

N: normalidad del NaOH de 0.1

V_m: mililitros de muestra utilizados

6.6.4 Índice de oscurecimiento

El índice de oscurecimiento se determinó de acuerdo con la metodología descrita por Meydav, Saguy y Kopelman (1977), la cual consistió en centrifugar 15 mL de muestra (Hamilton Bell, V6500, USA) durante 10 minutos a 3,400 rpm. En un tubo, se adicionó 5 mL del sobrenadante y 5 mL de etanol (95%) para volver a centrifugar a las mismas condiciones. La absorbancia del sobrenadante fue medida a 420 nm en el lector de microplacas (Power Wave XS UV-Biotek, software KC Junior, USA). Los resultados se expresaron tomando el valor de absorbancia, el cual se considera como el índice de oscurecimiento.

6.6.5 Índice de turbidez

Se centrifugaron 5 mL de muestra (Hamilton Bell, V6500, USA) a 3,400 rpm durante 10 minutos. Posteriormente se leyó la absorbancia del sobrenadante obtenido a 660 nm en un lector de microplacas (Power Wave XS UV-Biotek, software KC Junior, USA), utilizando agua desionizada como blanco; de acuerdo con lo descrito por Versteeg, Rombouts, Spaansen y Pilnik (1980). Los resultados se expresaron tomando el valor de absorbancia, el cual se considera como el índice de turbidez.

6.6.6 Estabilidad

La determinación de la estabilidad del aguamiel se realizó de acuerdo a Zafra-Rojas, Cruz-Cansino, Ramírez-Moreno, Delgado-Olivares, Villanueva-Sánchez y Alanís-García (2013). Se centrifugaron 10 mL de aguamiel (Hamilton Bell, V6500, USA) a 3,400 rpm durante 20 minutos y los resultados de estabilidad se expresaron como el porcentaje de sólidos sedimentados (%SS) obtenidos después de la centrifugación. Un valor alto de este parámetro indica una baja estabilidad como consecuencia de la sedimentación de las partículas. A su vez, este parámetro puede relacionarse con la percepción de granulosidad en la boca.

6.7 Contenido de compuestos antioxidantes

6.7.1 Ácido ascórbico

La cantidad de ácido ascórbico se determinó de acuerdo con Dürüst, Dogan y Dürüst (1997), el cual utilizó el reactivo 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPI) que tiene una coloración azul-violeta y al entrar en contacto con ácido ascórbico ocurre una decoloración a rosa tenue o incoloro, según la concentración de ácido ascórbico.

Se preparó una solución de 2,6-Diclorofenol-indofenol con 3 mg de DCPI diluido en 250 mL de agua desionizada; solución de ácido oxálico con 1 g de ácido oxálico diluido a 250 mL de agua desionizada; solución de 5 mg de ácido ascórbico diluido con 100 mL de la solución de ácido oxálico antes preparada y con una solución amortiguadora (3 g de acetato de sodio aforado con 10 mL de ácido acético glacial y 7 mL de agua desionizada). Se realizó una curva estándar de ácido ascórbico usando concentraciones de 0, 10, 20, 30, 40 y 50 mg/L (ácido ascórbico/agua desionizada). La concentración se determinó por espectrofotometría y la absorbancia se midió a 520 nm mediante un lector de microplacas (Power Wave XS UV-Biotek, Software KC Junior, Estados Unidos), utilizando como blanco ácido oxálico.

Para realizar la técnica se tomaron 100 μ L de aguamiel y se adicionó 100 μ L de amortiguador y 800 μ L de DCPI vertidos en viales Eppendorf y se agitaron en vortex (Vortex – Genie 2, Scientific Industries, Inc., NY, Estados Unidos). Se determinó la concentración de ácido ascórbico igual que en la curva estándar, las muestras se realizaron por triplicado, expresando los resultados como miligramos equivalentes de ácido ascórbico por litro (mg EAA/L).

6.7.2 Fenoles totales

Para determinar los compuestos fenólicos totales se utilizó la metodología según Stintzing, Herbach, Mobhammer, Carle, Yi, Sellappa, Akoh, Brunch y Felker (2005), el cual utiliza el reactivo Folin-Ciocalteu. Este reactivo es una mezcla de ácido fosfotúngstico y fosfomolibdico, la cual es reducida a óxidos azules de tungsteno y molibdeno durante la oxidación fenólica que ocurre en condiciones alcalinas. La condición azul refleja la cantidad total de polifenoles presentes en la muestra.

Se realizó utilizando el reactivo Folin-Ciocalteu, aplicando una solución de 1 mL de Folin aforando a 10 mL con agua desionizada; solución de Carbonato de sodio (7.5 g en 100 mL de agua desionizada) solución de ácido gálico (15 mg en 500 mL de agua desionizada).

Se construyó una curva estándar de ácido gálico de 0, 100, 200 y 300 mg/L (ácido gálico/agua desionizada). La concentración se determinó por espectrofotometría y la absorbancia se midió a 765 nm un lector de microplacas utilizando como blanco agua desionizada.

Se tomaron 100 μ L de aguamiel y se adicionaron 500 μ L de Folin y 400 μ L de carbonato de sodio en un vial Eppendorf y se agitó en Vortex (Vortex – Genie 2, Scientific Industries, Inc., NY, Estados Unidos), dejando reposar 30 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se realizó la lectura de absorbancia en el lector de microplacas (Power Wave XS UV-Biotek, Software KC Junior, Estados Unidos) a 765 nm. El análisis de las muestras se realizó por triplicado, expresando los resultados como miligramos equivalentes de ácido gálico por litro (mg EAG/L).

6.8 Determinación de capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante del aguamiel fue evaluada por las determinaciones de capacidad de captación de los radicales libres de FRAP, DPPH• y de igual manera fue realizada la determinación de ABTS•+.

6.8.1 Capacidad antioxidante por el método de FRAP

Mide la capacidad antioxidante para reducir el hierro a través de un complejo férrico, desarrollando un color azul intenso. Se realizó mediante la metodología de Pérez-Jiménez, Arranz, Tabernero, Díaz-Rubio, Serrano y Goñi (2008).

La técnica se llevó a cabo preparando el reactivo de FRAP en una concentración 10:1:1 con 100 mL de solución amortiguador (0.3 M con un pH de 3.6), 10 mL de TPTZ (10 nM en ácido clorhídrico) y 10 mL de FeCL₃ (20 nM en agua). Se elaboró una curva

estándar de sulfato ferroso con las siguientes concentraciones de Fe (II): 0, 20, 30, 40 y 50 μM Fe (II)/l. Posteriormente en un vial se colocaron 30 μL de aguamiel, 90 μL de agua desionizada y 900 μL de FRAP, las muestra se agitaron en vortex (Vortex – Genie 2, Scientific Industries, Inc., NY, Estados Unidos) y se dejaron reposar en baño maría a 37 °C durante 10 minutos; una vez transcurrido este tiempo se leyó la absorbancia mediante un lector de microplacas (Power Wave XS UV-Biotek, Software KC Junior, Estados Unidos) a 593 nm. Las muestras se realizaron por triplicado, expresando los resultados de la capacidad antioxidante como micromoles de hierro (II) por litro (μmol Fe (II)/L).

6.8.2 Capacidad antioxidante por el método de DPPH•

La capacidad antioxidante en base al radical DPPH• se evaluó de acuerdo con procedimiento reportado por Morales y Jiménez-Pérez (2001). El reactivo DPPH• es un radical libre estable, que en solución etanólica presenta una coloración violeta intenso. Si se adiciona a este medio una sustancia susceptible de atrapar radicales libres, como lo es el Trolox, el electrón no apareado del DPPH• se aparea e inmediatamente se presenta una decoloración de la solución que puede ir hasta amarillo en razón del número de electrones apareados.

Para realizar esta determinación fue necesario preparar una solución con 7.4 mg de DPPH• aforando a 100 mL de etanol, se utilizó una curva estándar de Trolox (3.75 mg en 50 mL de etanol) con las concentraciones 0, 50, 100, 200 y 300 μmol ET/l, posteriormente en un vial se agregaron 100 μL de aguamiel y 500 μL de DPPH•, la mezcla se agitó con la ayuda del vortex (Vortex – Genie 2, Scientific Industries, Inc., NY, Estados Unidos) y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 1 hora. Transcurrido el tiempo, se determinó la absorbancia a 520 nm, empelando un lector de microplacas (Power Wave XS UV-Biotek, Software KC Junior, Estados Unidos). Las muestras se realizaron por triplicado. Los resultados de capacidad antioxidante, fueron expresados en micromoles equivalentes de Trolox por litro (μmol ET/L).

6.8.3 Capacidad antioxidante por el método de ABTS•+

La determinación de capacidad antioxidante en base al catión libre de ABTS•+, se realizó de acuerdo al método descrito por Kuskoski, Asuero, Troncoso, Mancini-Filho y Fett (2005). El ABTS•+ es un radical con un nitrógeno central que presenta un color característico azul-verde, cuando este catión radical es reducido por un antioxidante a la forma no radical, presenta una pérdida de color.

Esta determinación se llevó a cabo mediante la formación del catión radical ABTS•+, el cual se obtuvo tras la reacción de ABTS•+ 7 mM (76.8 mg de ABTS•+ diluido en 20 mL de agua desionizada) con persulfato potásico (2.45 mM, concentración final), incubados a temperatura ambiente (± 25 °C) en la oscuridad durante 16 horas. Una vez formado el radical ABTS•+ se diluyó en agua desionizada hasta obtener un valor de absorbancia comprendido entre 0.70 ± 0.10 a 754 nm (longitud de onda de máxima absorción). Se utilizó una curva estándar, con una solución con 3.75 mg de Trolox en 50 mL de etanol, realizando concentraciones 0, 5, 10, 20, 30, 40 y 50 $\mu\text{mol/L}$, utilizando el lector de microplacas (Power Wave XS UV-Biotek, Software KC Junior, Estados Unidos).

En la técnica se agregaron 20 μL de aguamiel y 980 μL de solución de ABTS•+, se agitó en el vortex (Vortex – Genie 2, Scientific Industries, Inc., NY, Estados Unidos) y se dejó reposar a temperatura ambiente por 7 minutos, posteriormente se determinó la absorbancia a 754 nm empleando el lector de microplacas. Las muestras se realizaron por triplicado. Los resultados se expresaron en miligramos equivalentes de ácido ascórbico por litro de muestra (mg EAA/L).

6.9 Actividad quelante

La actividad quelante fue determinada a través del método de Gülcin, Buyukokuroglu y Kufrevioglu (2003), el cual se basa en la reacción de la molécula quelante de referencia con el ion ferroso (Fe^{2+}), posteriormente el ion ferroso que no fue quelado reacciona con la ferrozina generando color.

Se tomaron 100 μL de aguamiel, se adicionó 50 μL de solución de cloruro férrico (II) tetrahidratado (2 mM), 450 μL de metanol, se agitó y se mantuvo en reposo 5 minutos.

Posteriormente se agregaron 400 μL de ferrozina al 5 mM, se agitó vigorosamente con vortex y se dejó reposar a temperatura ambiente, durante 10 minutos, la absorbancia se midió espectrofotométricamente a 562 nm con un espectrofotómetro de microplacas (Power Wave XS UV-Biotek, Software KC Junior, Estados Unidos). Se utilizó EDTA a 0.1 M como agente quelante de referencia y bajo las mismas condiciones para muestra control, se utilizó agua desionizada. El análisis de las muestras se realizó por triplicado, expresando resultados como porcentaje (%) de actividad quelante y se calculó utilizando la siguiente ecuación.

$$\% \text{ actividad quelante} = \left[\frac{A_0 - A_1}{A_0} \right] * 100$$

Donde:

A_0 = absorbancia de la muestra control

A_1 = absorbancia del aguamiel

6.10 Análisis estadístico

Todas las técnicas se realizaron por triplicado. Una vez obtenidos los resultados del proceso de optimización ($51 \pm 1^\circ\text{C}/19 \text{ min}$), se realizó el análisis del aguamiel bajo las condiciones óptimas de proceso de termoultrasonido y se comparó con aguamiel pasteurizado y aguamiel fresco como control, mediante análisis de varianza (ANOVA) con el paquete estadístico SPSS versión 15.0, para Windows (SPSS Inc., Chicago, Illinois) y se le aplicó el test de Tukey con nivel de significancia del 95%. Fue comparado el índice de turbidez, porcentaje de estabilidad, ácido ascórbico, contenido de fenoles totales, capacidad antioxidante por el método de ABTS $\bullet+$ y DPPH \bullet , y porcentaje de actividad quelante.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Contenido de microorganismos

Se realizó un análisis microbiológico a cada tratamiento de aguamiel termoultrasonificado para conocer la cantidad de microorganismos en diferentes condiciones de temperatura y tiempo aplicados, el cual constó de mesófilos aerobios, enterobacterias (EB) y bacterias ácido lácticas (BAL). En la Tabla 4 se muestran los resultados de la calidad microbiológica, en mesófilos aerobios, se observó que el tratamiento de 52°C por 20 min, exhibió menor cantidad de bacterias ($0.78 \pm 0.18 \log^{10}$ UFC/mL) obteniendo así, una reducción de $3.75 \log^{10}$ UFC/mL, comparado con la muestra control ($4.53 \pm 0.01 \log^{10}$ UFC/mL). Para el caso de enterobacterias, no fueron detectadas en ninguno de los tratamientos realizados en aguamiel termoultrasonificado, mientras que la muestra control presentó $2.83 \log^{10}$ UFC/mL. La mayor cantidad de BAL se obtuvo a una condición de 40 °C durante 15 minutos, con un valor de $3.70 \pm 0.00 \log^{10}$ UFC/mL, mientras que el valor menor se encontró a 50 °C por 25 min ($0.64 \pm 0.19 \log^{10}$ UFC/mL).

En cuanto al tratamiento de termoultrasonido sobre los microorganismos, se ha encontrado que la termoultrasonificación provoca mayor inactivación en jugos de zarzamora, piña, uva, arándano y mango. El termoultrasonido incrementa la sensibilidad de los microorganismos al calor, altas presiones y bajo pH, debido a la cavitación que se genera con las ondas del ultrasonido, provocando cambios en la permeabilidad de la membrana celular, pérdida de homeostasis y muerte celular (Cervantes-Elizarrarás et al., 2017; Bermúdez-Aguirre y Barbosa-Cánovas, 2012; Kiang, Bhat, Rosma y Cheng, 2013). La disminución de los microorganismos puede explicarse por los fenómenos físicos y químicos combinados que ocurren durante el tratamiento con ultrasonido, lo que lleva a un adelgazamiento de las membranas de las células microbianas (Bhat, Kamaruddin, Min-Tze y Karim, 2011).

Estos resultados están de acuerdo con lo encontrado por Cervantes-Elizarrarás et al., (2017), en jugo de zarzamora, en donde no se detectó crecimiento de mesófilos aerobios en los jugos tratados por termoultrasonido a diferentes condiciones de tiempo

y temperatura. Por otra parte, Kiang et al., (2013), lograron inactivar completamente *Salmonella Enteritidis* en jugo de mango aplicando 5 minutos con una temperatura de 60 °C, mientras que en el recuento de *Escherichia coli* se reportó una disminución considerable bajo las mismas condiciones de termosonicación. Indicaron que se obtuvieron resultados favorables en ambos microorganismos cuando el jugo fue analizado a condiciones de tiempo y temperatura mayor.

Tabla 4. Efecto de la temperatura y el tiempo sobre el contenido de microorganismos

Condiciones		Contenido de microorganismos	
Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Mesófilos aerobios (log ¹⁰ UFC/mL)	Bacterias ácido lácticas (log ¹⁰ UFC/mL)
40	15	3.91±0.03	3.70±0.00
45	27	1.53±0.05	3.02±0.02
45	20	1.37±0.01	1.30±0.00
45	20	2.64±0.02	1.63±0.31
38	20	3.42±0.06	1.59±0.11
40	25	2.87±0.00	2.76±0.04
50	15	1.53±0.03	1.49±0.20
52	20	0.78±0.18	1.16±0.08
45	20	1.98±0.02	1.48±0.21
50	25	1.15±0.03	0.64±0.19
45	20	2.13±0.06	2.84±0.06
45	13	2.14±0.11	2.06±0.00
45	20	1.77±0.01	0.74±0.04
Control		4.53±0.01	5.59±0.00

±: desviación estándar

Cabe mencionar que los resultados del análisis microbiológico en el presente trabajo no se ajustaron al modelo matemático. Sin embargo, se consideraron los valores obtenidos en los tratamientos con menor cantidad en recuento de mesófilos aerobios, así como también con cierta cantidad de bacterias ácido lácticas (por su importancia en el organismo humano a través de sus efectos en la microbiota intestinal); además de los parámetros que si se ajustaron al modelo matemático con la finalidad de elegir con mayor certeza el tratamiento de optimización del aguamiel por termoultrasonido en condiciones asépticas.

7.2 Propiedades fisicoquímicas

Para determinar las propiedades fisicoquímicas del aguamiel termoultrasonificado, se midió pH, sólidos solubles totales (°Brix), acidez titulable, índice de oscurecimiento, índice de turbidez y estabilidad física. Los resultados mostraron un rango de 6.77 ± 0.01 - 7.55 ± 0.07 en pH, 10.80 ± 0.07 - 12.60 ± 0.00 de sólidos solubles totales, 0.05 ± 0.00 - 0.16 ± 0.01 % de acidez titulable, 0.038 ± 0.00 - 0.068 ± 0.00 , 0.012 ± 0.00 - 0.023 ± 0.00 , 81.87 ± 1.14 - 95.88 ± 2.60 % de índice de oscurecimiento, índice de turbidez y porcentaje de estabilidad, respectivamente (Tabla 5). Los valores obtenidos de pH se encontraron dentro de los parámetros establecidos por la Norma Mexicana NMX-V-022 (1972), en donde indica que el valor de pH no debe ser inferior a 6.6 ni mayor de 7.5. Esta determinación es muy importante durante el manejo del aguamiel, debido a que es un indicativo de calidad para este producto de agave (Romero-López et al., 2015).

De los parámetros anteriores solo el índice de turbidez y porcentaje de estabilidad se ajustaron al modelo matemático, presentando una $r^2 > 0.91$. Los resultados del coeficiente de regresión se pueden observar en la Tabla 6, tanto para índice de turbidez como para el porcentaje de estabilidad, la variable temperatura en su forma lineal (β_1) tuvo un mayor efecto significativo con $p < 0.001$ y $p < 0.0001$ respectivamente. Gráficamente se puede apreciar un incremento de la turbidez y porcentaje de estabilidad conforme se aumenta la temperatura (Figuras 6 y 7). Diferente comportamiento se reporta en jugo de zarzamora termoultrasonificado, en donde la

temperatura en su término cuadrático mostró efecto significativo ($p < 0.0001$) sobre el índice de turbidez, mencionando que la turbidez aumenta conforme aumenta la temperatura (Cervantes-Elizarrarás et al., 2017). Con respecto a estabilidad en un estudio con néctar de yaca termoultrasonificado, también tuvieron un comportamiento diferente, manifestando que la temperatura y el tiempo en su forma lineal influyeron de manera significativa ($p < 0.001$), indicando que a menor temperatura y menor tiempo existe una mayor estabilidad física (Valdez-López y Cruz-Cansino, 2015).

Tabla 5. Efecto del tratamiento por termoultrasonido sobre pH, sólidos solubles, acidez titulable, índice de oscurecimiento, índice de turbidez y estabilidad

Condiciones		Propiedades fisicoquímicas					
Temperatura (°C)	Tiempo (min)	pH	Sólidos solubles (°Brix)	Acidez titulable (%)	Índice de oscurecimiento	Índice de turbidez	Estabilidad (%)
40	15	7.55±0.07	10.93±0.04	0.06±0.00	0.039±0.00	0.017±0.00	95.88±2.60
45	27	7.33±0.03	10.80±0.07	0.05±0.00	0.062±0.00	0.016±0.00	90.10±1.18
45	20	6.97±0.02	12.50±0.00	0.10±0.01	0.040±0.00	0.015±0.00	88.57±3.27
45	20	6.79±0.01	11.90±0.00	0.15±0.01	0.044±0.00	0.015±0.00	88.32±1.31
38	20	7.52±0.02	11.50±0.00	0.14±0.01	0.061±0.00	0.014±0.00	87.06±3.42
40	25	7.46±0.01	10.90±0.00	0.07±0.01	0.068±0.00	0.012±0.00	90.41±4.03
50	15	7.03±0.01	12.60±0.00	0.10±0.01	0.038±0.00	0.019±0.00	88.16±2.20
52	20	7.12±0.01	11.40±0.00	0.16±0.01	0.065±0.00	0.023±0.00	90.68±0.81
45	20	6.92±0.01	12.40±0.00	0.10±0.01	0.041±0.00	0.012±0.00	88.64±1.14
50	25	7.06±0.01	11.90±0.00	0.16±0.01	0.040±0.00	0.023±0.00	81.87±1.14
45	20	6.98±0.01	11.84±0.01	0.07±0.00	0.047±0.00	0.015±0.00	90.11±2.21
45	13	7.21±0.00	11.20±0.00	0.13±0.01	0.059±0.01	0.017±0.00	90.19±1.81
45	20	6.77±0.01	11.87±0.01	0.16±0.01	0.039±0.01	0.017±0.00	84.10±3.18
r^2		-	-	-	-	0.91	0.94

±: desviación estándar

Tabla 6. Coeficiente de regresión y ANOVA de los parámetros del modelo cuadrático de predicción de superficie de respuesta

Coefficiente	Índice de turbidez	Estabilidad%
β_0 (intercepto)	0.014 ^a	88.15 ^a
β_1 (temperatura)	0.003 ^b	1.15 ^a
β_2 (tiempo)	-0.0003	0.20
β_{12} (temperatura*tiempo)	0.002	-0.38
β_{11} (temperatura*temperatura)	0.0019 ^c	0.22
β_{22} (tiempo*tiempo)	0.0009	0.41
r^2	0.91	0.94

Niveles de significancia: ^a $p < 0.0001$; ^b $p < 0.001$; ^c $p < 0.01$; ^d $p < 0.05$

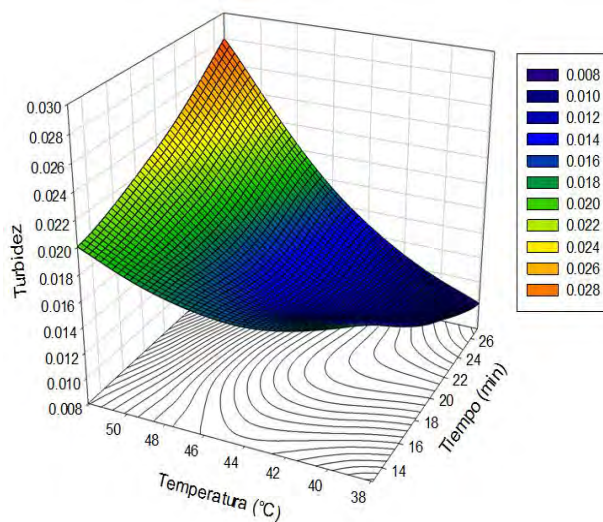


Figura 6. Efecto del termoultrasonido sobre el índice de turbidez del aguamiel.

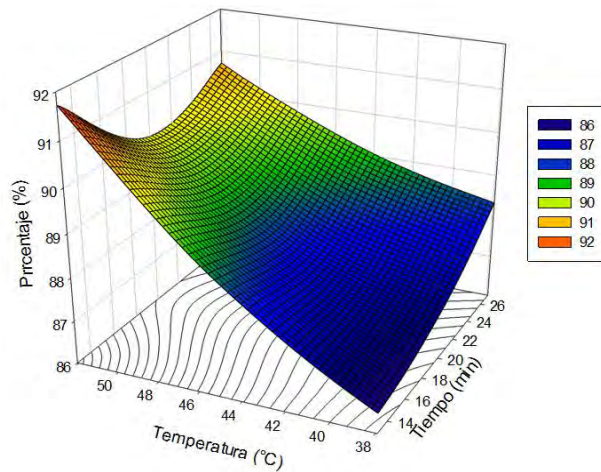


Figura 7. Efecto del termoultrasonido sobre el porcentaje de estabilidad del aguamiel.

7.3 Contenido de compuestos antioxidantes

7.3.1 Ácido ascórbico

El ácido ascórbico es uno de los antioxidantes hidrosolubles altamente biodisponible y más importantes en las células, que proporciona protección contra el daño causado por especies reactivas de oxígeno (ROS), debido a su eficaz absorción (Gardner, White, McPhail y Duthie, 2000). También se considera como un indicador de la calidad nutricional de los jugos (Khandpur y Gogate, 2015); la vida útil finaliza cuando su cantidad disminuye al 50% (Abid et al., 2014) siendo el calor y el oxígeno los principales factores responsables de su degradación (Aadil, Zeng, Han y Sun, 2013).

Los resultados de antioxidantes evaluados de ácido ascórbico en el aguamiel termoultrasonificado se muestran en la Tabla 7, se puede visualizar que el tratamiento realizado a 40°C durante 15 min, tuvo un valor mayor de 34.37 ± 2.13 mg EAA/L, mientras que el tratamiento bajo condiciones de 45 °C por 20 minutos presentó 20.09 ± 0.09 mg EAA/L, como el menor valor. Por lo que se obtuvieron mayores valores a menor temperatura y menor tiempo. En un estudio realizado con jugo de sandía termoultrasonificado, mostraron que hay una degradación de ácido ascórbico cuando el

tiempo de procesamiento se incrementa, indicando que el ácido ascórbico se reduce al 50% al momento de aplicar el tiempo más largo para su procesamiento (Rawson, Tiwari, Patras, Brunton, Brennan, Cullen y O'Donnell, 2011). Mientras que en otro estudio en jugo de manzana termoultrasonificado, la pérdida de ácido ascórbico se exacerbo en la temperatura más alta (Abid et al., 2014). La oxidación del ácido ascórbico se produce principalmente durante el procesamiento de los jugos y depende de muchos factores, como la presencia de oxígeno, calor y luz (Oms-Oliu, Odriozola-Serrano, Soliva-Fortuny y Martín-Belloso, 2009). La degradación reportada de ácido ascórbico se presenta al incrementar el tiempo y temperatura durante la termosonización, esto podría ser resultado de las condiciones físicas extremas que ocurren dentro de las burbujas durante el colapso de la cavitación a microescala (Tiwari, Muthukumarappan, O'Donnell, y Cullen, 2008). El ácido ascórbico no es un compuesto estable, ya que se descompone fácilmente en condiciones menos deseables; por lo tanto, cuanto más suave sea el procesamiento, mayor será la retención de ácido ascórbico en los jugos (Odriozola-Serrano, Soliva-Fortuny, Gimeno-Añó y Martín-Belloso, 2008). Los valores de ácido ascórbico se ajustaron al modelo matemático, presentando una r^2 de 0.94. Para lo que respecta al coeficiente de regresión (Tabla 8), la temperatura (β_1) en su forma lineal influyó de manera significativa arrojando $p < 0.0001$, esta tendencia se muestra en la Figura 8, en donde se visualiza que cuando la muestra es tratada en condición de menor temperatura, el contenido de ácido ascórbico es mayor. En jugo de zarzamora se observó diferente comportamiento, reportando que el tiempo en su forma lineal y su interacción con la temperatura tuvieron un efecto significativo sobre el contenido de ácido ascórbico ($p < 0.0001$), manifestando que al incrementar el tiempo el compuesto disminuyó, mientras que la interacción de tiempo y temperatura al ir disminuyendo, aumenta el contenido de ácido ascórbico (Cervantes-Elizarrarás et al, 2017).

7.3.2 Fenoles totales

Los compuestos fenólicos juegan un papel muy importante, ya que presentan un beneficio para la salud humana como prevención de muchas enfermedades, tanto fisiológicas como degenerativas, muy comunes en el cuerpo humano (Martínez-Valverde, Periago y Ros, 2000). Sin embargo, la relevancia nutricional de dichos compuestos fenólicos es incierta, debido a que pueden absorberse poco y metabolizarse rápidamente y, por lo tanto, tienen una capacidad antioxidante limitada *in vivo* (Gardner et al., 2000). La capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos se debe a su capacidad para eliminar radicales libres, donar átomos de hidrogeno o electrones, o por la quelación de cationes metálicos (Balasundram, Sundram y Samman, 2006).

Para el contenido de fenoles totales, el tratamiento con las condiciones de temperatura de 38°C por 20 minutos mostró el mayor contenido (217.70 ± 0.21 mg EAG/L), mientras que el tratamiento de 45 °C por 27 min presentó un valor menor (187.02 ± 0.70 mg EAG/L) (Tabla 7). En un estudio de jugo de sandía termoultrasonificado, también se encontró una disminución en el contenido fenólico a medida que la temperatura aumentaba y el efecto fue más pronunciado a tiempos de procesamiento más altos (88). Los valores de r^2 fueron de 0.96, lo que indica que los promedios obtenidos en el estudio se ajustaron al modelo matemático de superficie de respuesta. La temperatura en su término cuadrático influyó de forma significativa ($p < 0.0001$) sobre el contenido de fenoles totales (Tabla 8). Este comportamiento se observa en la Figura 9, en donde a menores temperaturas existe mayor liberación de estos compuestos. Un comportamiento similar se reportó en jugo combinado de tuna púrpura y tuna verde, en donde la temperatura en su término cuadrático influyó de manera significativa ($p < 0.001$) (Cruz-Cansino, Montiel-Columna, Bautista-Velúeta, Pérez-Tinoco, Alanís-García y Ramírez-Moreno, 2016).

Tabla 7. Efecto de la temperatura y el tiempo sobre el contenido de antioxidantes

Condiciones		Antioxidantes	
Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ácido ascórbico (mg EAA/L)	Fenoles totales (mg EAG/L)
40	15	34.37±2.13	214.25±0.91
45	27	29.77±0.48	187.02±0.70
45	20	20.55±0.32	195.29±0.49
45	20	21.23±0.09	195.09±0.10
38	20	29.83±0.35	217.70±0.21
40	25	30.56±0.21	197.59±2.66
50	15	21.66±0.26	196.88±1.28
52	20	20.26±0.05	201.15±0.49
45	20	20.13±0.43	189.20±0.75
50	25	20.15±0.33	196.39±0.68
45	20	20.58±0.23	195.10±1.18
45	13	27.08±0.42	201.77±0.44
45	20	20.09±0.09	195.53±0.76
	r ²	0.94	0.96

±: desviación estándar

Tabla 8. Coeficiente de regresión y ANOVA de los parámetros del modelo cuadrático de predicción de superficie de respuesta

Coeficiente	Fenoles totales (mg EAG/L)
β_0 (intercepto)	194.04 ^a
β_1 (temperatura)	-5.37 ^b
β_2 (tiempo)	-4.63 ^b
β_{12} (temperatura*tiempo)	4.29 ^c
β_{11} (temperatura*temperatura)	7.47 ^a
β_{22} (tiempo*tiempo)	-0.04
r^2	0.96

Niveles de significancia: ^a $p < 0.0001$; ^b $p < 0.001$; ^c $p < 0.01$; ^d $p < 0.05$.

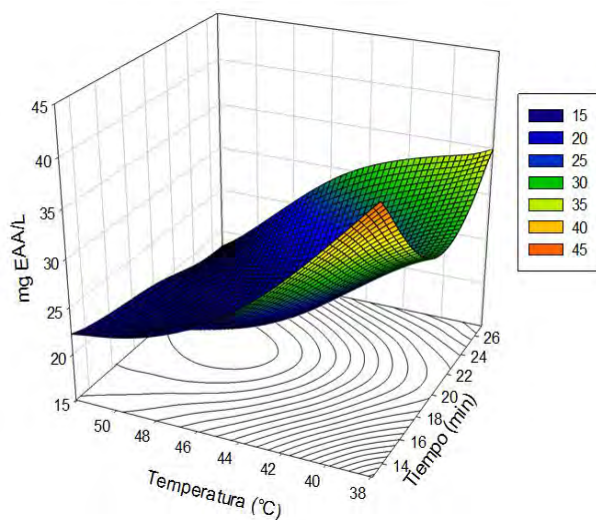


Figura 8. Efecto del termoultrasonido sobre el contenido de ácido ascórbico en el aguamiel.

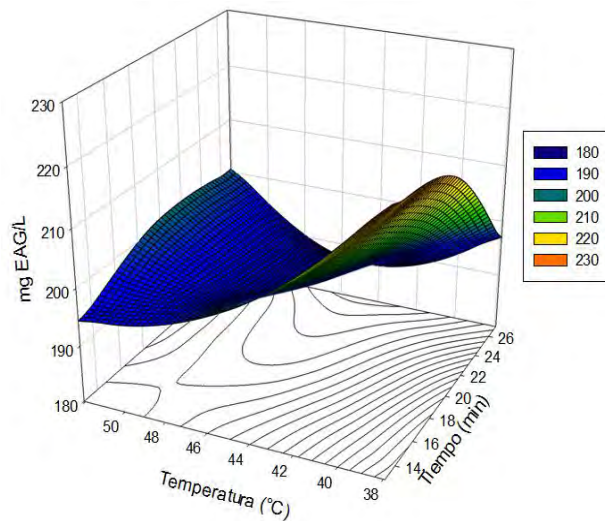


Figura 9. Efecto del termoultrasonido sobre el contenido de fenoles totales.

7.4 Capacidad antioxidante

En años recientes, se han adaptado ensayos espectrofotométricos para medir capacidad antioxidante de los alimentos, siendo los más populares, capacidad de reducción férrica (FRAP), ácido 2,2-azino-bis-(3-etil-benzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS•+) y el 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH•), entre otros (Thaipong, Boonprakob, Crosby, Cisneros-Zevallos y Byrne, 2006). La mayoría de estos ensayos emplean el mismo principio, generando un radical coloreado sintético o un compuesto activo redox, de tal manera que, la capacidad de una muestra biológica para secuestrar el radical o para reducir el compuesto activo redox, es controlada mediante técnicas espectrofotométricas aplicando un estándar apropiado para cuantificar la capacidad antioxidante (Floegel, King, Chung, Koo y Chun, 2011).

7.4.1 Capacidad antioxidante por el método de FRAP

El método de FRAP mide la capacidad que tienen los antioxidantes para reducir el complejo férrico-tripiridil-triazina (Fe^{3+} -TPTZ) en la forma ferrosa de color azul que

absorbe la luz a 593nm, el color intenso es relacionado con la cantidad de antioxidantes presentes (Gardner et al., 2000). La metodología de FRAP es diferente a los demás métodos, en su caso no se ven implicados los radicales libres; sin embargo, es controlada la reducción de hierro férrico (Fe^{3+}) a hierro ferroso (Fe^{2+}) (Floegel et al., 2011). En la Tabla 9, se muestran los resultados obtenidos de FRAP, los valores encontrados fueron de 10.36 ± 0.18 a 18.26 ± 0.12 $\mu\text{mol Fe (II)/L}$, este parámetro no se ajustó al modelo matemático, ya que presentó una $r^2 < 0.90$.

7.4.2 Capacidad antioxidante por el método de DPPH•

El DPPH• es un radical libre estable con un color morado oscuro, sus reacciones deben realizarse en disolventes orgánicos, por ser hidrófobo. La capacidad antioxidante puede evaluarse como la capacidad total para eliminar radicales libres, midiendo espectrofotométricamente la desaparición del radical 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH•) libre. La reacción con otros radicales, electrones o átomos de hidrógeno provoca la pérdida de color (Schaich, Tian y Xie, 2015).

Los resultados de capacidad antioxidante mediante DPPH• en el aguamiel termoultrasonificado se muestra en la Tabla 9, se puede resaltar que el mayor valor fue de 125 ± 0.67 $\mu\text{mol ET/L}$, en condiciones de temperatura y tiempo de 50°C por 15 min, respectivamente. En un jugo de manzana ultrasonificado se encontró también que, mientras mayor temperatura se utilice, la eliminación de radicales libres DPPH• aumenta (Abid, Jabbar, Wu, Hashim, Hu, Lei y Zeng, 2013). Los resultados de DPPH• presentaron una r^2 de 0.96. Los coeficientes de regresión del modelo (Tabla 10), muestran que tanto la temperatura (β_1), como el tiempo (β_2) en sus términos lineal presentaron un efecto altamente significativo ($p < 0.0001$), lo cual se puede observar en la Figura 10, en donde se visualiza que la mayor capacidad antioxidante se obtiene al aplicar temperaturas altas y menor tiempo de aplicación de termoultrasonido. Este comportamiento fue observado en jugo combinado de tuna púrpura y tuna verde termoultrasonificado, donde la temperatura y el tiempo en sus términos lineal, afectaron

significativamente ($p < 0.05$) la actividad de eliminación de radicales libres (Cruz-Cansino et al., 2016).

7.4.3 Capacidad antioxidante por el método de ABTS•+

La prueba de decoloración de cationes radicales ABTS•+, es también un método espectrofotométrico ampliamente utilizado para la evaluación de la capacidad antioxidante de varias sustancias. Es aplicado tanto para compuestos lipófilos como hidrófilos (Miliauskas, Venskutonis y Van Beek, 2004). Éste mide la capacidad de las sustancias puras o extractos crudos para atrapar los radicales libres, mediante la donación de átomos de hidrógeno o electrones, en consecuencia, se produce el blanqueo de la solución radical de color y la formación de especies menos reactivos del antioxidante (Cayupán, Ochoa y Nazareno, 2011).

Los valores de ABTS•+ se encontraron en un rango de 54.28 ± 2.93 a 81.62 ± 0.63 $\mu\text{mol ET/L}$ (Tabla 9), siendo el tratamiento de $50^\circ\text{C}/15$ minutos el que tuvo los valores mayores (81.62 ± 0.63 $\mu\text{mol ET/L}$), por lo tanto, en este estudio la mayor capacidad antioxidante por ABTS•+ se encontró en condiciones altas de temperatura y un menor tiempo de procesamiento. En un estudio, en jugo de tuna púrpura tratado por ultrasonido donde utilizaron amplitud y tiempo, mostraron que la sonicación a mayor amplitud y tiempo libera gran cantidad de antioxidantes (Zafra-Rojas et al., 2013), siendo diferente a este trabajo. Los resultados de la capacidad antioxidante por ABTS•+ presentaron una r^2 de 0.96, la temperatura (β_1) así como el tiempo (β_2) en su término lineal influyeron de manera significativa ($p < 0.0001$) (Tabla 10), como puede apreciarse en la Figura 11, en donde se observa mayor capacidad antioxidante cuando se aplica mayor temperatura y menor tiempo de termoultrasonido. Diferente comportamiento se reporta en jugo hecho a base de tuna púrpura y tuna verde, donde el cuadrático de temperatura y lineal de tiempo sobre la capacidad antioxidante ABTS•+ fueron significativos ($p < 0.01$), logrando una alta capacidad antioxidante a temperaturas de $44-47^\circ\text{C}$ (Cruz-Cansino et al., 2016).

7.4.4 Actividad quelante

La ferrozina produce un complejo violeta con Fe^{2+} en presencia de un agente quelante, la formación del complejo se interrumpe y como resultado se reduce el color violeta del complejo (Hazra, Biswas y Mandal, 2008), esta reducción del color, por lo tanto, permite la estimación de la actividad quelante (Ebrahimzadeh, Pourmorad y Bekhradnia, 2008), siendo los compuestos fenólicos, los principales responsables de la actividad quelante (Sumaya-Martínez, Cruz-Jaime, Madrigal-Santillán, García-Paredes, Cariño-Cortés, Cruz-Cansino y Alanís-García, 2011).

La Tabla 9, muestra resultados del porcentaje de actividad quelante en aguamiel termoultrasonificado, de los cuales, se puede resaltar que el valor mayor se encontró en condiciones de temperatura y tiempo de 45°C durante 13 minutos ($76.38 \pm 0.05 \%$). En otro estudio se ha encontrado, que la actividad quelante en jugo de tuna púrpura aumentó cuando la muestra se sónico por mayor tiempo (25 minutos) (Zafra-Rojas et al., 2013). Los valores tuvieron una r^2 de 0.99 y de acuerdo al análisis de regresión (Tabla 10) la temperatura en su forma lineal, así como la interacción entre temperatura y tiempo (β_{12}), influyeron significativamente ($p < 0.0001$), esto se puede observar en la Figura 12, en donde se aprecia un aumento de la capacidad quelante del aguamiel cuando se somete a mayores condiciones de temperatura y/o combinación de tiempo y temperatura de aplicación de termoultrasonido. Reportes en jugo de zarzamora termoultrasonificado indicaron un comportamiento en parte similar, en donde la temperatura en su forma lineal mostró un efecto positivo aumentando el porcentaje de actividad quelante, sin embargo, la interacción de temperatura y tiempo ejerció un efecto opuesto (Cervantes-Elizarrarás et al, 2017).

Tabla 9. Efecto de la temperatura y el tiempo sobre la capacidad antioxidante

Condiciones		Capacidad antioxidante			
Temperatura (°C)	Tiempo (min)	FRAP ($\mu\text{mol Fe (II)/L}$)	DPPH• ($\mu\text{mol ET/L}$)	ABTS•• ($\mu\text{mol ET/L}$)	Quelante (%)
40	15	17.33±0.24	99.00±0.00	67.07±1.95	74.26±0.47
45	27	18.09±0.15	83.22±0.94	57.36±0.72	74.30±0.52
45	20	12.48±0.53	108.11±5.09	72.65±2.72	76.30±0.46
45	20	13.09±0.43	114.56±0.39	73.65±1.41	75.08±0.79
38	20	12.91±0.16	96.17±0.54	60.91±1.69	65.40±0.59
40	25	18.26±0.12	72.33±3.08	54.28±2.93	66.10±2.28
50	15	12.57±0.21	125.00±0.67	81.62±0.63	70.06±0.52
52	20	10.36±0.18	124.33±8.51	75.12±1.04	70.14±1.19
45	20	14.98±0.33	111.22±1.50	71.43±0.90	75.24±0.15
50	25	13.64±0.24	106.78±4.54	72.72±0.89	76.21±0.07
45	20	11.91±0.88	114.83±3.77	72.58±1.72	74.76±0.83
45	13	15.50±0.16	113.89±7.13	76.06±2.02	76.38±0.05
45	20	16.49±0.12	108.33±0.31	71.18±1.19	74.28±0.32
r^2		-	0.96	0.96	0.99

±: desviación estándar

Tabla 10. Coeficiente de regresión y ANOVA de los parámetros del modelo cuadrático de predicción de superficie de respuesta

Coeficiente	DPPH• ($\mu\text{mol ET/L}$)	ABTS•• ($\mu\text{mol ET/L}$)	Quelante (%)
β_0 (intercepto)	111.41 ^a	72.30 ^a	75.13 ^a
β_1 (temperatura)	12.53 ^a	6.63 ^a	1.58 ^a
β_2 (tiempo)	-11.03 ^a	-6.01 ^a	-0.62
β_{12} (temperatura*tiempo)	2.11	0.97	3.58 ^a
β_{11} (temperatura*temperatura)	-1.49	-1.75	-3.65 ^a
β_{22} (tiempo*tiempo)	-7.33 ^c	-2.40	0.13
r^2	0.96	0.96	0.99

Niveles de significancia: ^a $p < 0.0001$; ^b $p < 0.001$; ^c $p < 0.01$; ^d $p < 0.05$.

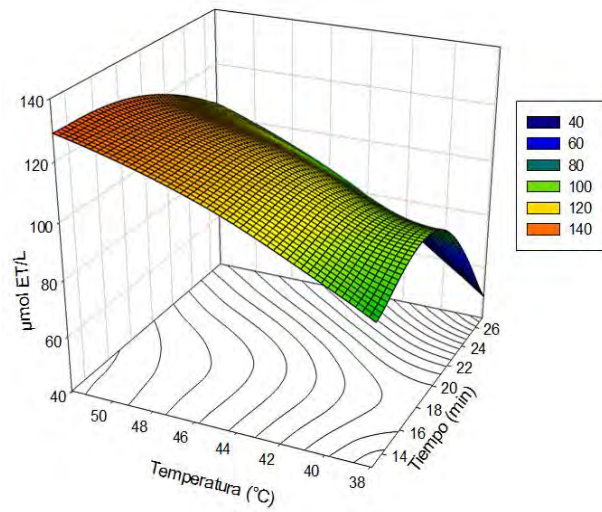


Figura 10. Efecto del termoultrasonido sobre la capacidad antioxidante del aguamiel medida por el método de DPPH•.

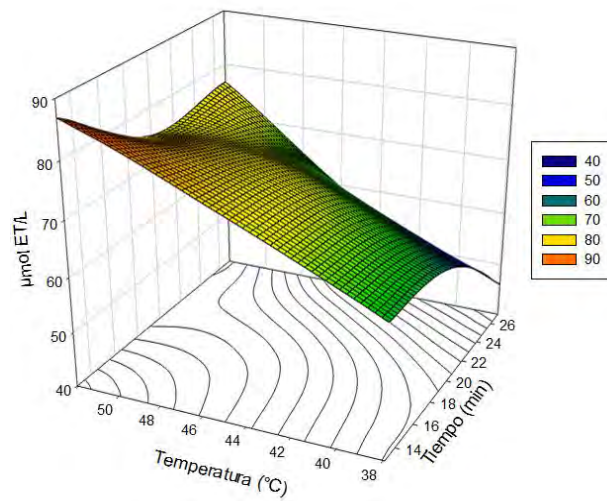


Figura 11. Efecto del termoultrasonido sobre la capacidad antioxidante del aguamiel medida por el método de ABTS•+.

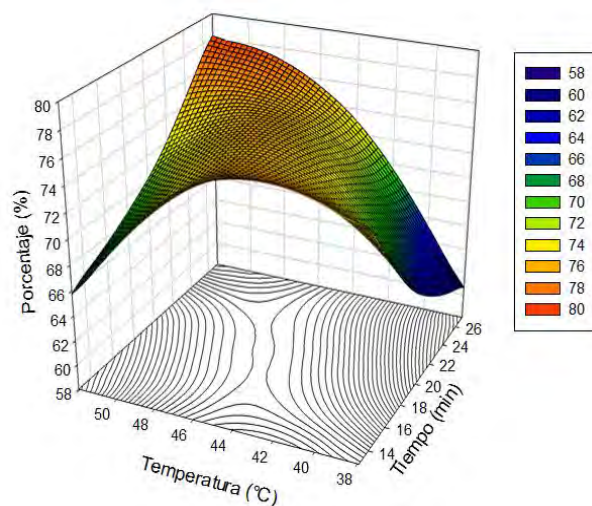


Figura 12. Efecto del termoultrasonido sobre el porcentaje de actividad quelante en aguamiel.

7.5 Optimización del aguamiel por termoultrasonido

La condición óptima fue seleccionada de acuerdo a la superposición de las gráficas tridimensionales de superficie de respuesta para obtener la zona con el valor más alto posible de las variables en consideración. Para fines de este estudio se tomaron en cuenta las variables de respuesta que se ajustaron al modelo matemático: índice de turbidez, porcentaje de estabilidad, ácido ascórbico, contenido de fenoles totales, capacidad antioxidante medida por el método de DPPH• y ABTS•+ y porcentaje de actividad quelante. Sin embargo, a pesar de que las variables de respuesta en los análisis microbiológicos no se ajustaron al modelo matemático, se consideró la condición de temperatura y tiempo (52 °C por 20 min), donde se encontraron los valores menores de mesófilos aerobios ($0.78 \pm 0.18 \log^{10}$ UFC/mL) y cierto contenido de bacterias ácido lácticas ($1.16 \pm 0.08 \log^{10}$ UFC/mL), con la posibilidad de ajustarlo con la superposición de las gráficas tridimensionales de variables de respuesta antes

mencionadas, con la intención de obtener un alimento en las mejores condiciones asépticas.

Los principales criterios para determinar el área óptima fueron, mayor índice de turbidez y porcentaje de estabilidad, mayor contenido de ácido ascórbico y de fenoles totales, capacidad antioxidante alta, así como también valores altos en cuanto a porcentaje de actividad quelante.

La Figura 13, muestra la optimización del aguamiel por termoultrasonido. Los resultados obtenidos señalan que a una temperatura de 51 ± 1 °C y un tiempo de 19 minutos, son las condiciones óptimas del proceso de termoultrasonido en aguamiel. En la zona óptima, los valores más altos obtenidos fueron: índice de turbidez 0.014, estabilidad con 88.14%, contenido de fenoles totales 194.04 mg EAG/L, DPPH• 111.41 $\mu\text{mol ET/L}$, ABTS•+ 72.29 $\mu\text{mol ET/L}$, 75.13% de actividad quelante, excepto para ácido ascórbico en donde no se alcanzaron los más altos niveles, pero se obtuvo 20.51 mg EAA/L. Las condiciones de procesos optimo que se obtuvieron resultan favorables, ya que los componentes podrían ser degradados después de una larga exposición al ultrasonido, haciendo que las concentraciones disminuyan (Zou, Wang, Gan y Ling, 2011).

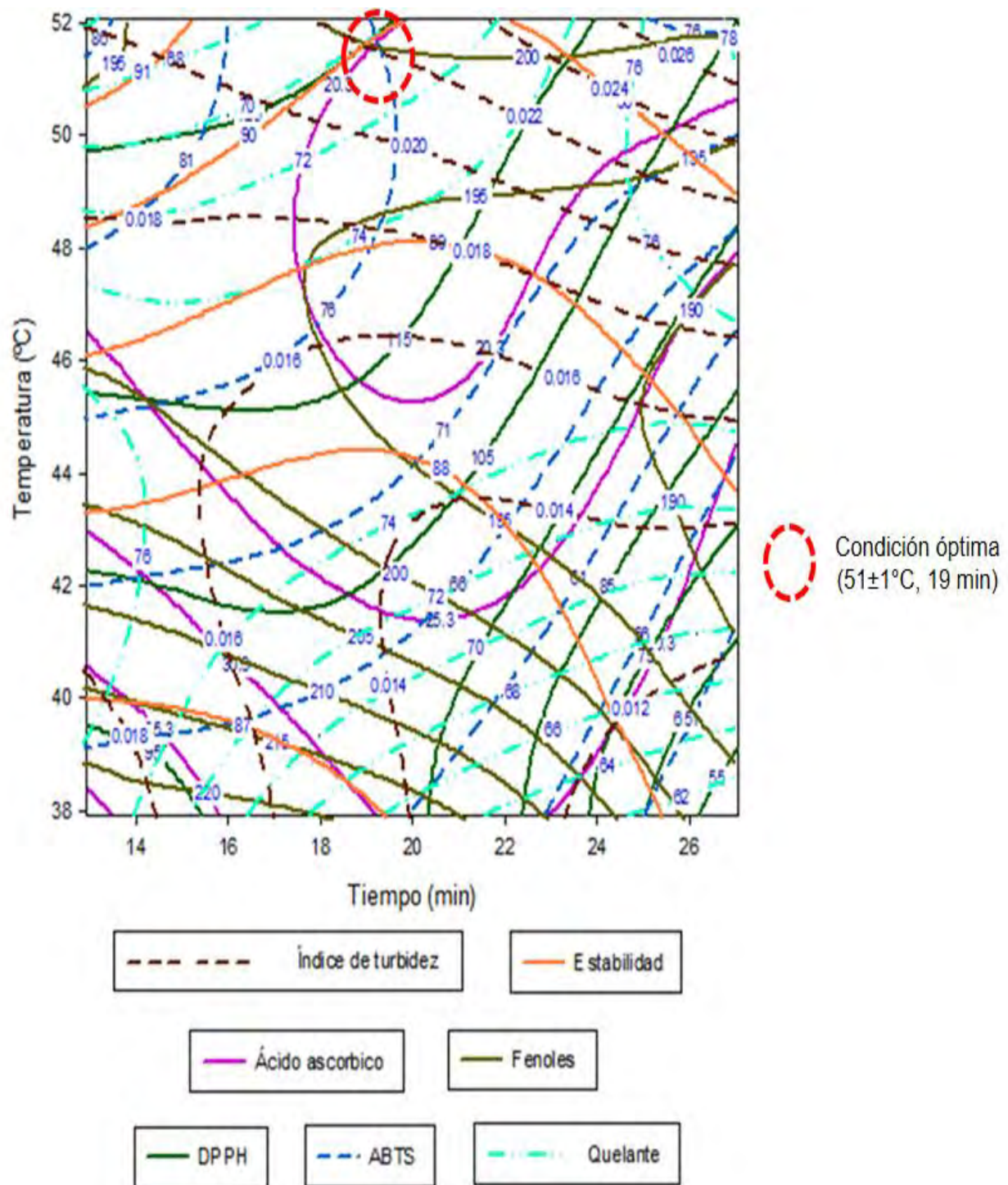


Figura 13. Condiciones óptimas de termoutrasonicación del aguamiel índice de turbidez, % estabilidad, ácido ascórbico, contenido de fenoles totales, capacidad antioxidante (DPPH• y ABTS••+) y actividad quelante.

7.6 Reproducibilidad del estudio

En la Tabla 8, se exponen los valores predichos por el modelo de superficie de respuesta (RSM) y los obtenidos mediante el análisis experimental.

Una vez que se realizó la reproducibilidad del proceso por termoultrasonido bajo las condiciones óptimas que proporcionó el modelo matemático de superficie de respuesta, se comparó con los valores predichos, en cuanto a índice de turbidez, estabilidad física, ácido ascórbico, fenoles totales, DPPH• y quelante, se encontró que no tuvieron diferencias significativas, con lo que se comprobó que es posible reproducir este proceso obteniendo similares valores de las determinaciones antes mencionadas, excepto en la capacidad antioxidante por ABTS•+ la cual presentó diferencias significativas ($p < 0.05$), ya que el aguamiel termoultrasonificado bajo las condiciones óptimas, obtuvo menor concentración en comparación a lo esperado.

Tabla 11. Reproducibilidad del modelo de superficie de respuesta

Determinaciones	Valor Predicho	Valor experimental
Índice de turbidez	0.014 ± 0.00	0.014 ± 0.00
Estabilidad (%)	88.14 ± 0.37	89.60 ± 1.24
Ácido ascórbico (mg EAA/litro)	20.51 ± 1.71	20.37 ± 0.33
Fenoles totales (mg EAG/litro)	194.04 ± 2.38	195.74 ± 1.78
DPPH• (µmol ET/litro)	111.41 ± 4.41	112.59 ± 2.77
ABTS•+ (µmol ET/litro)	72.29 ± 2.27	56.32 ± 0.14*
Quelante (%)	75.13 ± 0.62	75.94 ± 1.33

*Indica diferencia significativa $p < 0.05$

7.7 Comparación del aguamiel termoultrasonificado optimizado con pasteurizado y control.

7.7.1 Contenido de Microorganismos

El aguamiel es un alimento altamente perecedero, debido a la gran cantidad de microorganismos que se encuentran presentes de forma natural, y que son responsables de la fermentación, por tal motivo es necesario aplicar tratamientos que aseguren su estabilidad y calidad sensorial (Bautista y Arias, 2008). La pasteurización es usada comúnmente en la industria alimentaria para inactivar microorganismos. Sin embargo, este tratamiento puede causar el desarrollo de sabores indeseables, pérdida de nutrientes y propiedades funcionales en los alimentos (López-Malo et al., 2005). Al acoplar el ultrasonido con el tratamiento térmico se reducen las temperaturas y el tiempo del proceso de pasteurización y se pueden lograr niveles más altos de destrucción microbiana y al mismo tiempo se minimizan los cambios en las propiedades organolépticas de los alimentos (Mason, Paniwnyk y Lorimer, 1996). El termoultrasonido aumenta la inactivación microbiana mediante el calor combinado y la cavitación de burbujas (las microburbujas resultantes colapsan violentamente en sucesivos ciclos y se ven forzadas a oscilar en tamaño y forma) (Tiwari et al., 2008; Sagong, Lee, Chang, Heu, Ryu, Choi y Kang, 2011), que tienen lugar durante la sonicación (Anaya-Esparza, Velázquez-Estrada, Roig, García-Galindo, Sayago-Ayerdi y Montalvo-González, 2017), siendo esta última, responsable de provocar inactivación y ruptura celular, debido al efecto que produce sobre la membrana bacteriana (Robles-Ozuna y Ochoa-Martínez, 2012). La modificación, erosión y perforación de las membranas celulares exponen el contenido intracelular al medio ambiente generando un efecto letal (Lee, Zhou, Liang, Feng y Martin, 2009).

Para hacer la comparación entre muestras de aguamiel tratado por termoultrasonificado (T-U), pasteurizado y control se realizó el recuento de mesófilos aerobios, enterobacterias y bacterias ácido lácticas (Figura 14). Para recuento de mesófilos aerobios el aguamiel tratado por T-U exhibió valores significativamente menores que los obtenidos por pasteurización y la muestra control $4.19 \pm 0.10 \log^{10}$ UFC/mL, 4.68

$\pm 0.06 \log^{10}$ UFC/mL y $4.97 \pm 0.05 \log^{10}$ UFC/mL, respectivamente. Mostrando una reducción de $0.78 \log^{10}$ UFC/mL en el T-U y $0.29 \log^{10}$ UFC/mL en el aguamiel pasteurizado con respecto al control.

En los resultados de enterobacterias, en el aguamiel T-U y pasteurizado no se detectó presencia de microorganismos, en comparación con la muestra control, la cual arrojó un recuento de enterobacterias de $2.24 \pm 0.03 \log^{10}$ UFC/mL. En cuanto al análisis de bacterias ácido lácticas, los resultados indican que el aguamiel pasteurizado presentó valores menores significativamente ($4.31 \pm 0.15 \log^{10}$ UFC/mL) en comparación con la muestra control ($4.96 \pm 0.02 \log^{10}$ UFC/mL) y el aguamiel T-U ($4.64 \pm 0.07 \log^{10}$ UFC/mL), el cual presentó una ligera disminución de $0.32 \log^{10}$ UFC/mL con respecto al control. Los resultados obtenidos indican que la muestra tratada por termoultrasonido tuvo los mejores resultados, mostrando mayor disminución de mesófilos aerobios, inactivación total de enterobacterias, y permite mayor cantidad de bacterias ácido lácticas, comparado con la muestra pasteurizada.

La efectividad del ultrasonido en la eliminación de microorganismos Gram-negativos y Gram-positivos aún no está clara (Villamiel y Jong, 2000). En algunos informes indican que las bacterias Gram-negativas son más sensibles a la inactivación ultrasónica que las bacterias Gram-positivas (Drakopoulou, Terzakis, Fountoulakis, Mantzavinos y Manios, 2009; Ahmed y Russell, 1975; Cameron, McMaster y Britz, 2008), ya que cuanto más grande es el organismo, más se absorben las ondas de choque y se produce la muerte, por tal motivo las bacterias con menor tamaño son más resistentes al efecto del ultrasonido (Ahmed y Russell, 1975). Las bacterias Gram-positivas, entre ellas bacterias ácido lácticas, tienen una capa de peptidoglucano más gruesa y más adherente que las bacterias Gram-negativas, es por eso que se sugiere que es el grosor de la pared celular es lo que protege contra el daño del ultrasonido (Scherba, Weigel y O'brien, 1991).

Las bacterias ácido lácticas tienen diversas aplicaciones, siendo una de las principales la fermentación de alimentos como leche, carne y vegetales, es por ello que son muy utilizadas en la industria alimentaria, no solo por su habilidad para acidificar y, por

ende, preservar los alimentos (inhibición de un gran número de microorganismos patógenos y dañinos), sino también para mejorar las características sensoriales como el sabor, olor, textura y aumentar su calidad nutritiva (Parra, 2010). Además los probióticos son cultivos puros, o mezcla de cultivos de microorganismos vivos, que al ser consumidos por el hombre y los animales en cantidades adecuadas aportan efectos benéficos al huésped mejorando las propiedades de la microbiota nativa (Ramírez, Ulloa, Velázquez, González y Romero, 2011), misma que ejerce funciones nutricionales, metabólicas y protectoras que la vuelven indispensable para el huésped mientras que éste le entrega nutrientes y condiciones adecuadas para su crecimiento (Morales, Brignardello y Gotteland, 2010).

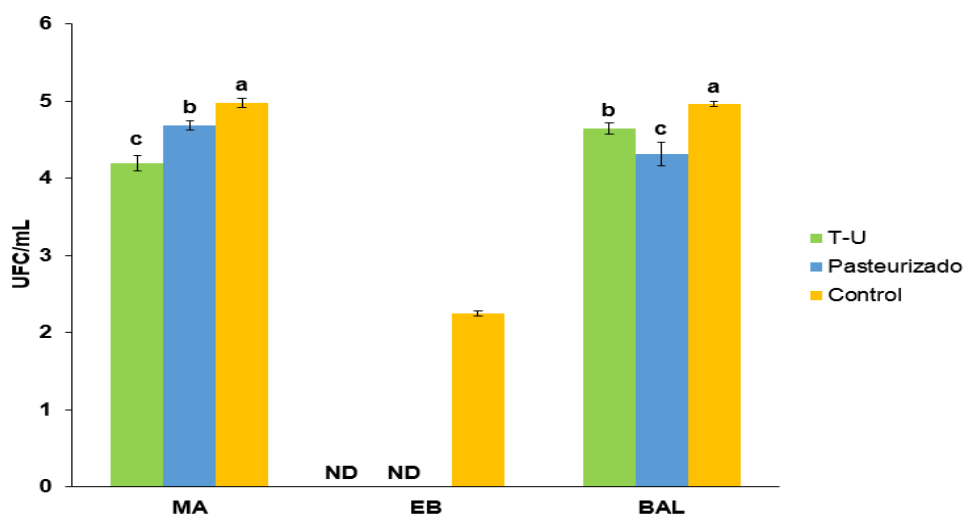


Figura 14. Recuento microbiológico de Mesófilos aerobios (MA), Enterobacterias (EB) y Bacterias ácido lácticas (BAL) de aguamiel tratado por termoultrasonido (T-U), pasteurizado y Control. No detectado (ND). ^{a-c} Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos.

7.7.2 Índice de turbidez

El índice de turbidez es un parámetro de calidad importante, que es evaluado normalmente en bebidas a base de frutas procesadas industrialmente, incluidos los

vinos, jugos y néctares de fruta, la percepción visual de la turbidez y la turbidez en los jugos de frutas es el resultado de la dispersión de la luz causada por las sustancias suspendidas (Pinelo, Zeuner y Meyer, 2010). Puede ser un atributo positivo o negativo según las expectativas de los consumidores. Para un jugo clarificado, una turbidez inestable considerada “turbia” es inaceptable para ser comercializada como jugo clarificado (Sin, Yusof, Hamid y Rahman, 2006). La Figura 15, muestra el índice de turbidez en el aguamiel termoultrasonificado, pasteurizado y control. En los resultados se puede apreciar que el aguamiel tratado por termoultrasonido arrojó valores menores significativamente (0.014 ± 0.00), a diferencia de la muestra pasteurizada y control, los cuales obtuvieron valores de 0.040 ± 0.00 y 0.050 ± 0.00 , respectivamente. Durante la sonicación se presentan cambios en la turbidez que podrían estar asociados a la cavitación, ya que provoca dispersión de agregados o rompimiento de partículas susceptibles, como enzimas y microorganismos (Tiwari et al., 2008). La claridad en un jugo o bebida es un factor importante con respecto a la calidad, ya que la elección del consumidor se debe principalmente a la apariencia visual, de esta manera, se atrae la atención para el producto en el mercado (Jacob, Sukumaran y Prema, 2008; Cerreti, Liburdi, Benucci y Esti, 2016).

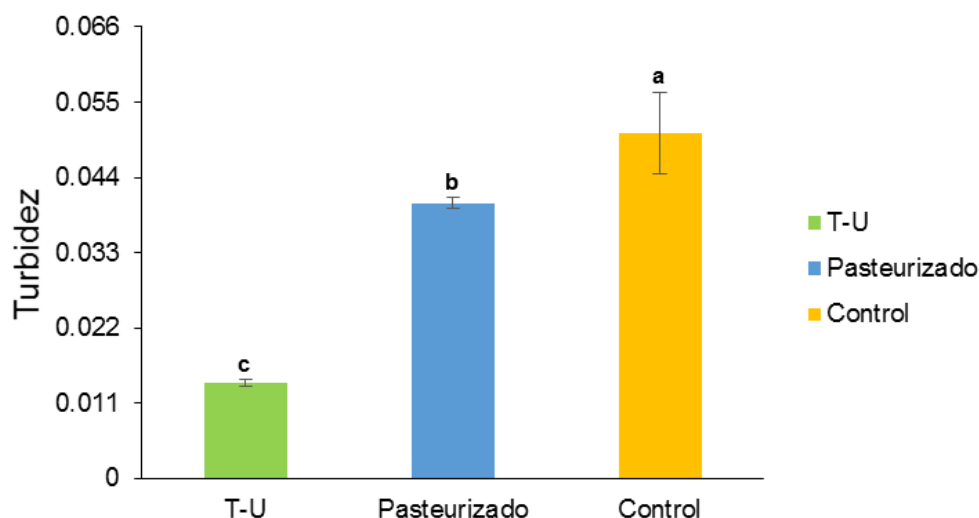


Figura 15. Índice de turbidez del aguamiel tratado por termoultrasonido (T-U), pasteurizado y Control. ^{a-c} Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos.

7.7.3 Estabilidad

Los resultados obtenidos del porcentaje de estabilidad del aguamiel optimizado, pasteurizado y control se expresan en la Figura 16. Los resultados indicaron que el aguamiel T-U mostró un porcentaje de estabilidad mayor ($89.60 \pm 1.24\%$) en comparación con las muestras de aguamiel pasteurizado y control ($87.65 \pm 1.16\%$ y $86.68 \pm 2.50\%$), respectivamente. El procesamiento de termoultrasonido pudo haber reducido la sedimentación al fragmentar partículas suspendidas, debido al colapso de las burbujas de cavitación formadas en la superficie, esto permite que las partículas finas permanezcan en el sobrenadante después de la centrifugación proporcionando una mejor uniformidad y estabilidad a la muestra (Cruz-Cansino, Ramírez-Moreno, León-Rivera, Delgado-Olivares, Alanís-García, Ariza-Ortega y Jaramillo-Bustos, 2015). Es importante resaltar que este resultado es muy interesante desde el punto de vista industrial. Al reducir la sedimentación la tecnología del ultrasonido minimiza la necesidad de agregar aditivos como estabilizantes, lo que es deseable por muchas razones, como satisfacer la demanda del consumidor (Aguilar et al., 2017).

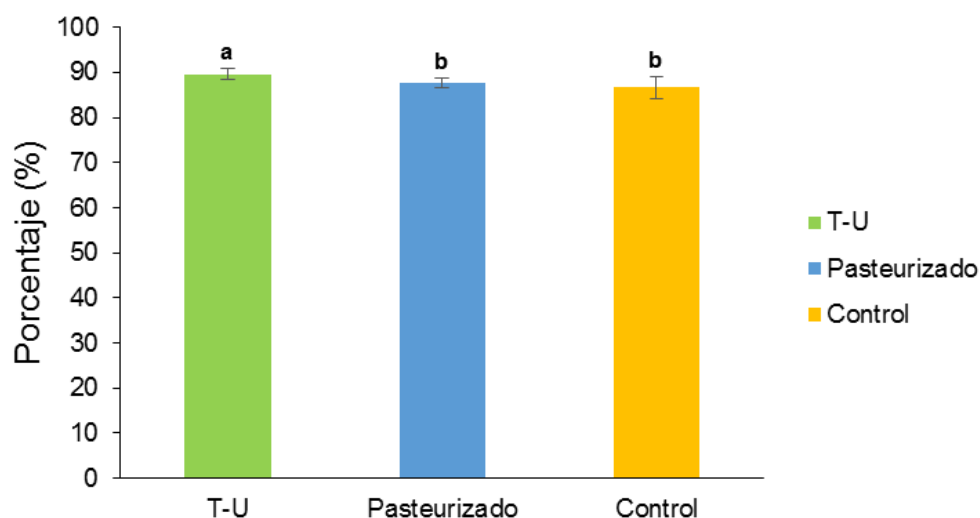


Figura 16. Estabilidad del aguamiel tratado por termoultrasonido (T-U), pasteurizado y Control. ^{a, b} Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos.

7.7.4 Ácido ascórbico

El ácido ascórbico es un nutriente esencial y uno de los factores de calidad nutricional más importante en los alimentos, tiene muchas actividades biológicas en el cuerpo humano. Sin embargo, es un compuesto termolábil y muy sensible a la luz, así como a diversas condiciones de procesamiento (Rojas, Leite, Cristianini, Alvim y Augusto, 2016; Vieira, Teixeira y Silva, 2000). El contenido de ácido ascórbico en el aguamiel tratado por termoultrasonido presentó un valor significativamente mayor (20.37 ± 0.33 mg EAA/L), comparado con la muestra control que arrojó valores de 19.26 ± 0.30 mg EAA/L y el tratado por pasteurización (16.90 ± 0.80 mg EAA/L) (Figura 17).

El alto contenido de ácido ascórbico en la muestra de aguamiel T-U se atribuye a la eliminación efectiva del oxígeno disuelto en los jugos (Knorr, Zenker, Heinz y Lee, 2004), el cual es responsable de la degradación del ácido ascórbico en las cavitaciones producidas durante el tratamiento de sonicación (Cheng, Soh, Liew y Teh, 2007). El ácido ascórbico exhibe capacidad antioxidante potencial y se sabe que protege las células del daño inducido por radicales libres, contribuye en el proceso de absorción de hierro y metabolismo de aminoácidos, entre otros. Asimismo, coadyuva

sustancialmente a la prevención de la aparición de enfermedades cardiovasculares y cáncer (Bhat et al., 2011; Marin, Martínez, Uribealago, Castillo y Frutos, 2002).

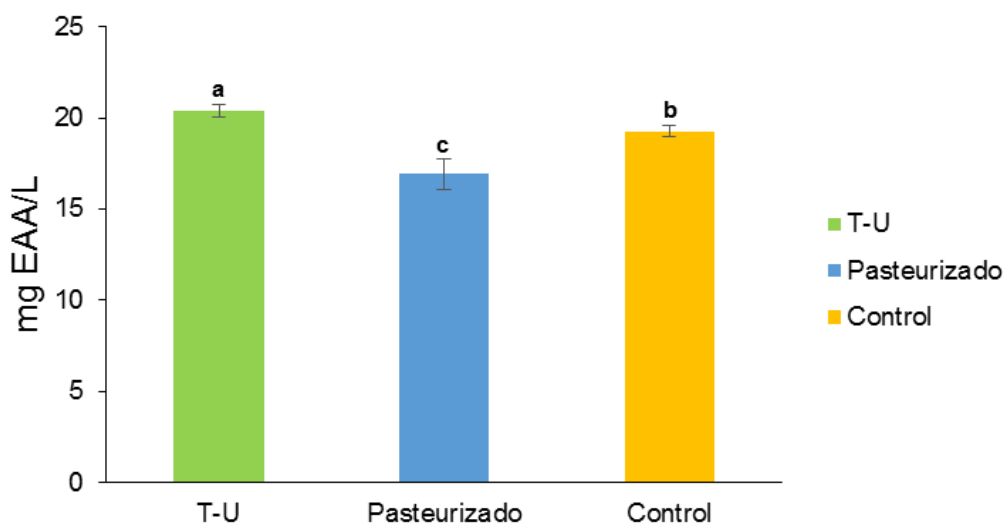


Figura 17. Contenido de ácido ascórbico en aguamiel tratado por termoultrasonido (T-U), pasteurizado y Control. ^{a-c} Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos.

7.7.5 Fenoles totales

Los compuestos fenólicos, son una parte esencial de la dieta humana y considerados de interés debido a sus propiedades antioxidantes, siendo las principales fuentes los alimentos de origen vegetal, las frutas y verduras (Balasundram et al., 2006). Los resultados del contenido de fenoles totales se pueden observar en la Figura 18, se aprecia que el aguamiel termoultrasonificado y el control presentaron los valores más altos (195.74 ± 1.78 mg EAG/L) y (195.97 ± 1.05 mg EAG/L) respectivamente, comparado con el aguamiel pasteurizado (185.85 ± 0.53 mg EAG/L).

Los valores obtenidos en el aguamiel termoultrasonificado podrían atribuirse a la liberación de la forma unida de contenidos fenólicos debido a la rotura de la pared

celular por la presión de cavitación ejercida sobre ella durante la sonicación, donde los polifenoles unidos podrían haberse liberado y volverse fácilmente viables (Aadil et al., 2013; Bhat y Goh, 2017). Los compuestos fenólicos son uno de los principales contribuyentes de la capacidad antioxidante, los cuales poseen varias propiedades biológicas y exhiben acciones anticancerígenas, antioxidantes, antivirales, antiinflamatorias y reducción del riesgo de obesidad (Bhat et al., 2011; Saucedo, Palafox, Sánchez y Aguilar, 2011).

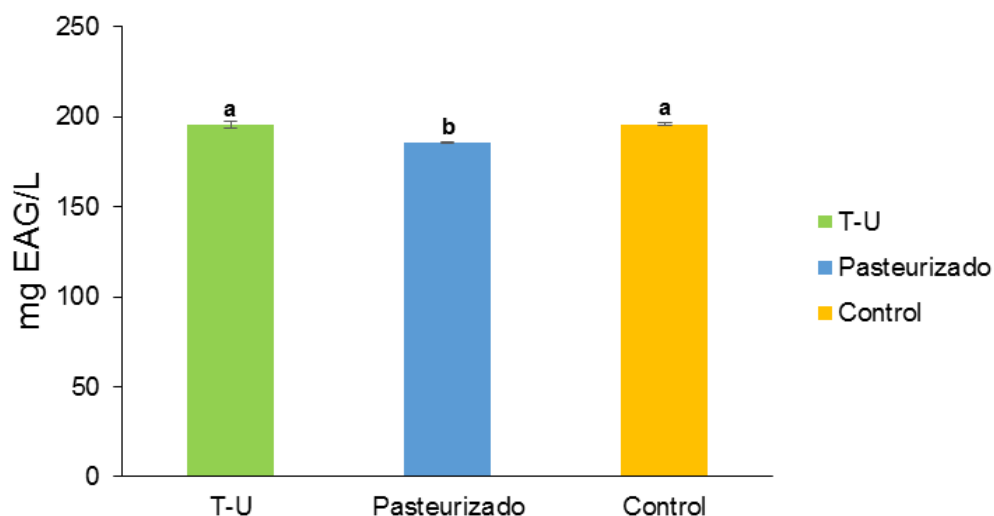


Figura 18. Contenido de fenoles totales en aguamiel tratado por termoultrasonido (T-U), pasteurizado y Control. ^{a, b} Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos.

7.7.6 Capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante de los alimentos ha despertado gran interés recientemente. Se conoce como capacidad antioxidante total o capacidad antioxidante total a la medición analítica de concentraciones de radicales libres de diferente naturaleza, en un sistema oxidativo controlado (Blasa, Candiracci, Accorsi, Piacentini y Piatti, 2007).

En los alimentos de origen vegetal, se atribuye esta capacidad a la presencia de compuestos fenólicos principalmente (Ciappini, Stoppani, Martinet y Álvarez, 2013). Para la capacidad antioxidante determinada por el método de DPPH•, los resultados indicaron que el aguamiel termoultrasonificado tuvo un valor de capacidad antioxidante significativamente menor ($112.59 \pm 2.77 \mu\text{mol ET/L}$), que el aguamiel fresco ($126.94 \pm 1.80 \mu\text{mol ET/L}$) y el obtenido por pasteurización ($118.96 \pm 2.00 \mu\text{mol ET/L}$), como se puede observar en la Figura 19a. Son pocos los estudios que reporten una disminución en cuanto a la capacidad antioxidante medida por DPPH• en muestras termoultrasonificadas. Sin embargo, en un estudio reportado por Ortega (2016), se indicó que la sonicación en un medio líquido puede conducir a la formación de radicales libres, debido a que el agua suele ser dividida por el fenómeno de sonolisis en OH^- y H^+ y se puede producir peróxido de hidrógeno (Earnshaw, 1998). Al aplicar la termoultrasonificación es posible que ocurra la oxidación de componentes antioxidantes por los radicales OH^- y H^+ (Ortega, 2016). Con respecto al efecto del ultrasonido sobre la capacidad antioxidante, Ashokkumar, Sunartio, Kentish, Mawson, Simons Vilku y Versteeg (2008), mencionan que durante la sonicación se generan radicales libres y la cantidad de estos aumenta conforme aumenta el tiempo de tratamiento.

En la Figura 19b, se expresan los resultados obtenidos de la capacidad antioxidante por el método ABTS•+, donde se observó que el aguamiel termoultrasonificado mostró un valor de capacidad antioxidante mayor ($56.32 \pm 0.14 \mu\text{mol ET/L}$), en comparación con la muestra pasteurizada ($51.15 \pm 2.68 \mu\text{mol ET/L}$) y el control ($44.17 \pm 0.68 \mu\text{mol ET/L}$). En el presente estudio, el mayor contenido de capacidad antioxidante en el aguamiel termoultrasonificado podría atribuirse directamente a los antioxidantes liberados por las cavitaciones inducidas en el ultrasonido, lo que podría haber causado los cambios observados (Bhat et al., 2011). Los compuestos fenólicos y la vitamina C son los principales componentes responsables de la capacidad antioxidante (Rawson et al., 2011). Generalmente, es un hecho bien aceptado que a medida que el contenido fenólico total aumenta en un producto vegetal después del procesamiento (o cualquier tipo de tratamiento), se produce un aumento correspondiente en la capacidad

antioxidante (Bhat et al., 2011). Estos compuestos tienen el potencial de secuestrar los radicales libres que causan daño al cuerpo, reduciendo el riesgo de muchas enfermedades que se originan del estrés oxidativo (Rawson et al., 2011).

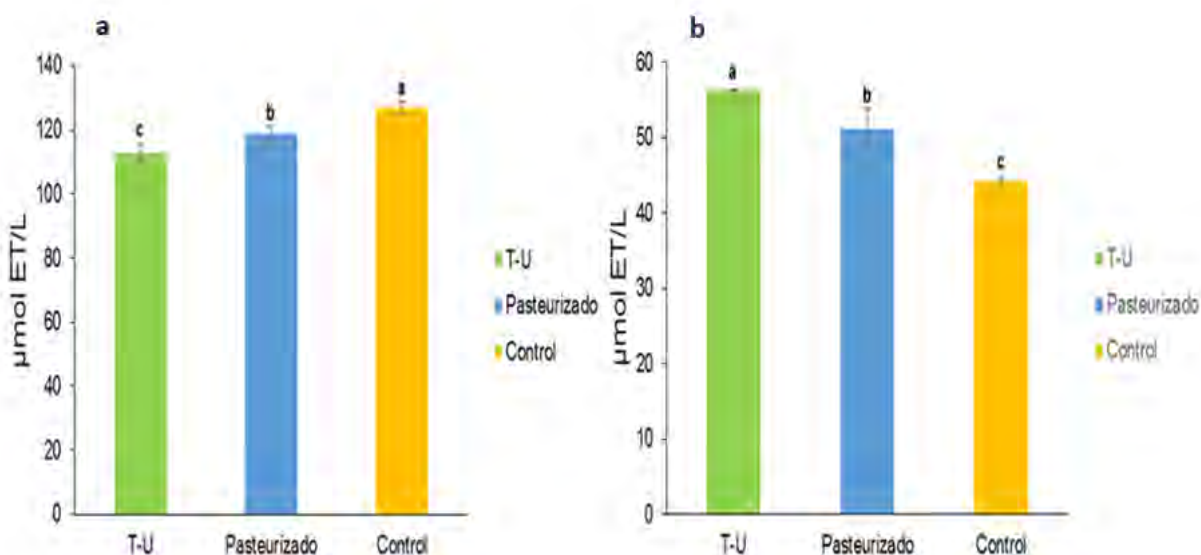


Figura 19. Capacidad antioxidante medida por los métodos de DPPH• (a) y ABTS•+ (b) en aguamiel tratado por termoultrasonido (T-U), y pasteurizado y Control. ^{a-c} Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos.

7.7.7 Actividad quelante

En cuanto al porcentaje de actividad quelante, se puede observar en la Figura 20 que el aguamiel tratado por termoultrasonido no tuvo diferencias significativas ($p < 0.05$), con respecto a la muestra pasteurizada y a la muestra control. Los compuestos fenólicos son los principales responsables de la actividad quelante (Sumaya-Martínez et al., 2011), como se describió anteriormente, estos compuestos se conservaron o incluso aumentaron después del tratamiento con termoultrasonido. Los compuestos

fenólicos pueden reaccionar como agentes quelantes de metales (forman enlaces σ) siendo efectivos como antioxidantes secundarios porque reducen el potencial redox, estabilizando la forma oxidada del ion metálico (Saravanan y Aradhya, 2011). Sin embargo, esta actividad depende del tipo de actividad quelante perteneciente a compuestos fenólicos liberados por ultrasonido (Khokhar y Apenten, 2003). En el organismo, los polifenoles y el ácido ascórbico solubizan el hierro y crean un complejo con éste para facilitar su excreción por medio de las heces y orina (Ebrahimzadeh et al., 2008), gracias a esto las complicaciones relacionadas con el hierro reducen y de este modo la calidad de vida mejora (Hebbel, Leung y Mohandas, 1990).

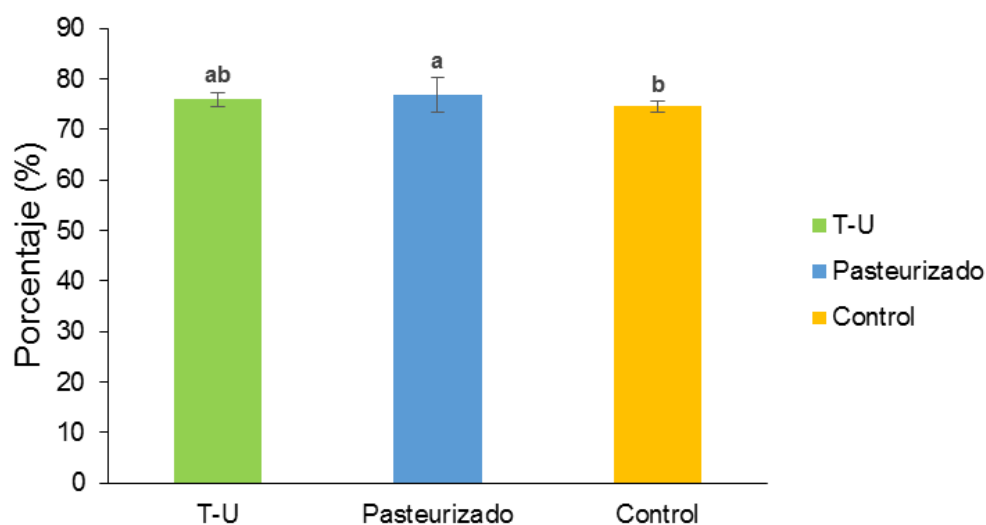


Figura 20. Actividad Quelante de aguamiel tratado por termoultrasonido (T-U), pasteurizado y Control. ^{a, b} Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos.

8. CONCLUSIONES

La metodología de superficie de respuesta es un método adecuado para las variables de respuesta evaluadas en el presente estudio, ya que la mayoría de estas se ajustan al modelo matemático. Esta metodología permite definir las condiciones óptimas de termoultrasonido para procesar el aguamiel a una temperatura de 51 ± 1 °C y un tiempo de 19 minutos, brindando así, un producto de calidad, inocuo y con mayor propiedad antioxidante. En la condición óptima, los valores más altos obtenidos fueron: índice de turbidez 0.014, estabilidad con 88.14%, contenido de fenoles totales de 194.04 mg EAG/L, capacidad antioxidante por DPPH• y ABTS•+ (111.41 μ mol ET/L y 72.29 μ mol ET/L, respectivamente) y 75.13% de actividad quelante, excepto para ácido ascórbico en donde no alcanza los niveles más altos, sin embargo, presenta un contenido considerable (20.51 mg EAA/L).

El tratamiento de termoultrasonido demuestra ser mejor con respecto a la pasteurización, permite mayor inactivación de mesófilos aerobios, mostrando una reducción de $0.78 \log^{10}$ UFC/mL en el T-U y $0.29 \log^{10}$ UFC/mL en el aguamiel pasteurizado con respecto al control. También se obtiene menor eliminación de bacterias ácido lácticas, ya que el aguamiel termoultrasonificado presenta una ligera disminución ($0.32 \log^{10}$ UFC/mL) con respecto al control, mientras que, en el aguamiel pasteurizado la disminución es de $0.65 \log^{10}$ UFC/mL, por esta razón el termoultrasonido permite obtener un alimento en las mejores condiciones asépticas para el consumidor.

El uso de esta tecnología, también reduce el índice de turbidez (0.014 ± 0.00), el cual es un parámetro de calidad en las bebidas clarificadas, aumenta el porcentaje de estabilidad ($89.68 \pm 2.50\%$), proporcionando una mejor uniformidad y estabilidad a la muestra. Además, el contenido de antioxidantes en el aguamiel se favorece, ya que el contenido de ácido ascórbico (20.37 ± 0.33 mg EAA/L) y de fenoles totales aumenta (195.74 ± 1.78 mg EAG/L), comparado con el aguamiel pasteurizado (16.90 ± 0.80 mg EAA/L y 185.85 ± 0.53 mg EAG/L, respectivamente). Y en la capacidad antioxidante

por ABTS•+ también se obtienen valores altos ($56.32 \pm 0.14 \mu\text{mol ET/L}$), con respecto a la muestra pasteurizada ($51.15 \pm 2.68 \mu\text{mol ET/L}$).

Finalmente, la mayor concentración de compuestos bioactivos que se obtiene, permite la obtención de una bebida con mayor capacidad antioxidante, lo que podría aportar un valor agregado al producto por su contenido de fenoles y microorganismos probióticos, por lo tanto, esta tecnología emergente podría ser una alternativa como proceso tecnológico de conservación y obtener un producto inocuo para su comercialización.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aadil, R.M. Zeng, X.A., Han, Z., Sun, D.W. (2013). Effects of ultrasound treatments on quality of grapefruit juice. *Food Chemistry*, 141, 3201-3206.
- Abid, M., Jabbar, S., Hu, B., Hashim, M.M., Wu, T., Lei, S., Khan, M.A., Zeng, X. (2014). Thermosonication as a potential quality enhancement technique of apple juice. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21, 984-990.
- Abid, M., Jabbar, S., Wu, T., Hashim, M. M., Hu, B., Lei, S., Zeng, X. (2013). Effect of ultrasound on different quality parameters of apple juice. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20, 1182-1187.
- Adiamo, O. Q., Ghafoor, K., Al-Juhaimi, F., Babiker, E. E., & Ahmed, A. M. (2018). Thermosonication process for optimal functional properties in carrot juice containing orange peel and pulp extracts. *Food Chemistry*, 245, 79-88.
- Aguilar, K., Garvín, A., Ibarz, A., y Augusto, P. E. (2017). Ascorbic acid stability in fruit juices during thermosonication. *Ultrasonics Sonochemistry*, 37, 375-381.
- Aguilar-Juárez, B., Enríquez Del Valle, R., Rodríguez-Ortiz, G., Granados Sánchez, D., & Cerero, B. M. (2014). El estado actual de agave salmiana y a. mapisaga del valle de México. *Revista Mexicana de Agroecosistemas*, 1, 2007-9559.
- Ahmed, F. I. K., y Russell, C. (1975). Synergism between ultrasonic waves and hydrogen peroxide in the killing of microorganisms. *Journal of Applied Microbiology*, 39, 31-40.
- Alanís-Flores, G. J., González-Álvarez, M. (2011). Formas de uso de los magueyes (Agave spp.) en Nuevo León, México. *RESPYN*, 5, 287-299.
- Alfaro-Rojas, G., Legaria-Solano, J. P., y Rodríguez-Pérez, J. E. (2007). Diversidad genética en poblaciones de agaves pulqueros (Agave spp.) del nororiente del Estado de México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 30, 1-12.
- Álvarez-Duarte, M. C., García-Moya, E., Suárez-Espinosa, J., Luna-Cavazos, M., y Rodríguez-Acosta, M. (2018). Conocimiento tradicional, cultivo y aprovechamiento del maguey pulquero en los municipios de Puebla y Tlaxcala. *Polibotánica*, 205-222.

- Anaya-Esparza, L.M., Velázquez-Estrada, R.M., Roig, A.X., García-Galindo, H.S., Sayago-Ayerdi, S.G., Montalvo-González, E. (2017). Thermo-sonication: An alternative processing for fruit and vegetable juices. *Trends in Food Science & Technology*, 61, 26-37.
- AOAC. "Official Methods of Analysis of AOAC International"; 920.151 (Solids (Total) in fruits and fruits products); 940.26 (Ash of fruits and fruit products); 942.15 (Acidity (Titratable) of fruit products). 16^a ed. (1999).
- Ashokkumar, M., Sunartio, D., Kentish, S., Mawson, R., Simons, L., Vilku, K., y Versteeg, C. K. (2008). Modification of food ingredients by ultrasound to improve functionality: a preliminary study on a model system. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9, 155-160.
- Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99(1), 191-203.
- Bautista, N. D., Arias, G. C. (2008). Estudio químico bromatológico de aguamiel de agave Americana L. (maguey). *UNMSM*, 11, 46-51.
- Bermúdez-Aguirre, D., Barbosa-Cánovas, G. V. (2012). Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* in pineapple, grape and cranberry juices under pulsed and continuous thermo-sonication treatments. *Journal of Food Engineering*, 108, 383-392.
- Bhat, R., Kamaruddin, N. S. B. C., Min-Tze, L., Karim, A. A. (2011). Sonication improves kasturi lime (*Citrus microcarpa*) juice quality. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18, 1295-1300.
- Bhat, R., y Goh, K. M. (2017). Sonication treatment convalesce the overall quality of hand-pressed strawberry juice. *Food Chemistry*, 215, 470-476.
- Blasa, M., Candiracci, M., Accorsi, A., Piacentini, M. P., y Piatti, E. (2007). Honey flavonoids as protection agents against oxidative damage to human red blood cells. *Food Chemistry*, 104, 1635-1640.

- Cameron, M., McMaster, L. D., & Britz, T. J. (2008). Electron microscopic analysis of dairy microbes inactivated by ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, 15, 960-964.
- Carocho, M., y Ferreira, I. C. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 51, 15-25.
- Carrillo-López, A., Silos-Espino, H., Flores-Benítez, S., Espinoza-Sánchez, E. A., Ornelas-Tavares, J. R., Flores-Chávez, L., & Rossel-Kipping, D. (2016). Some evidences on effect of intake aguamiel (Agave sap). *Sustainable Agriculture Research*, 5, 49.
- Cayupán, Y. S. C., Ochoa, M. J., Nazareno, M. A. (2011). Health-promoting substances and antioxidant properties of *Opuntia* sp. fruits. Changes in bioactive-compound contents during ripening process. *Food Chemistry*, 126, 514-519.
- Cerreti, M., Liburdi, K., Benucci, I., & Esti, M. (2016). The effect of pectinase and protease treatment on turbidity and on haze active molecules in pomegranate juice. *LWT-Food Science and Technology*, 73, 326-333.
- Cervantes-Elizarrarás, A., Piloni-Martini, J., Ramírez-Moreno, E., Alanís-García, E., Güemes-Vera, N., Gómez-Aldapa, C. A., Zafra-Rojas, Q. Y., Cruz-Cansino, N. (2017). Enzymatic inactivation and antioxidant properties of blackberry juice after thermoultrasound: Optimization using response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 371-379.
- Chemat, F., Zill-e-Huma y Kamran, K. M. (2011). Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18, 813-835.
- Cheng, L. H., Soh, C. Y., Liew, S. C., y Teh, F. F. (2007). Effects of sonication and carbonation on guava juice quality. *Food Chemistry*, 104, 1396-1401.
- Ciappini, M. C., Stoppani, F. S., Martinet, R., y Alvarez, M. B. (2013). Capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos y flavonoides en mieles de tréboles, eucalipto y alfalfa. *Revista de Ciencia y Tecnología*, 19, 45-51.

- Cordeiro, D. D., Pimenta, Z. M., Oliveira, C. B., Araújo, H. F., Barbosa, G. N., Moreira, A. P. (2015). Effect of sonication on soursop juice quality. *LWT - Food Science and Technology*, 62, 883-889.
- Coronado, M., Vega-León, S., Gutiérrez, R., Vázquez, M., y Radilla, C. (2015). Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. *Revista Chilena de Nutrición*, 42, 206-212.
- Cruz, N., Cpellas, M., Hernández, M., Trujillo, A., Guamis, B., Ferragut, V. (2007). Ultra high pressure homogenization of soymilk: Microbiological, physicochemical and microstructural characteristics. *Food Res Int*, 40, 725-732.
- Cruz-Cansino, N. D. S., Montiel-Columna, N. I., Bautista-Velueta, P. G., Pérez-Tinoco, M. R., Alanís-García, E., Ramírez-Moreno, E. (2016). Optimization of thermoultrasound conditions for the processing of a prickly pear juice blend (*Opuntia ficus indica*) using response surface methodology. *Journal of Food Quality*, 39, 780-791.
- Cruz-Cansino, N. D. S., Ramírez-Moreno, E., León-Rivera, J. E., Delgado-Olivares, L., Alanís-García, E., Ariza-Ortega, J. A., Jaramillo-Bustos, D. P. (2015). Shelf life, physicochemical, microbiological and antioxidant properties of purple cactus pear (*Opuntia ficus indica*) juice after thermoultrasound treatment. *Ultrasonics Sonochemistry*, 27, 277-286.
- Cueto, C., y Aragón, S. (2012). Evaluación del potencial probiótico de bacterias ácido lácticas para reducir el colesterol in vitro. *Scientia Agropecuaria*, 3, 45-50.
- Demirdöven, A., Baysal, T. (2008). The use of ultrasound and combined technologies in food preservation. *Food Reviews International*, 25, 1-11.
- Drakopoulou, S., Terzakis, S., Fountoulakis, M. S., Mantzavinos, D., & Manios, T. (2009). Ultrasound-induced inactivation of gram-negative and gram-positive bacteria in secondary treated municipal wastewater. *Ultrasonics Sonochemistry*, 16, 629-634.

- Dubrović, I., Herceg, Z., Jambrak, A. R., Badanjak, M., & Dragović-Uzelac, V. (2011). Effect of high intensity ultrasound and pasteurization on anthocyanin content in strawberry juice. *Food Technology and Biotechnology*, 49(2).
- Dürüst, N., Dogan, S., Dürüst, Y. (1997). Ascorbic acid and element contents of foods of Trabzon (Turkey). *J. Agr. Food Chem*, 45, 2085-2087.
- Earnshaw, R. G. (1998). *Ultrasound: a new opportunity for food preservation*. En: *Ultrasound in food processing*. 1a. Povey, M. J. W y Mason, T. J. Editorial Black Academic and Professional, Estados Unidos. 183-192.
- Ebrahimzadeh, M. A., Pourmorad, F., Bekhradnia, A. R. (2008). Iron chelating activity, phenol and flavonoid content of some medicinal plants from Iran. *African Journal of Biotechnology*, 7, 3188-3192.
- Escalante, A., Rodríguez, M. A., Martínez, A., López-Munguía, A., Bolívar, F., & Gosset, G. (2004). Characterization of bacterial diversity in pulque, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage, as determined by 16S rDNA analysis. *FEMS Microbiology Letters*. 273-279.
- Evans, J. B., Niven, C. F. (1951). Nutrition of the heterofermentative lactobacilli that cause greening of cured meat products. *J. Bacteriology*, 62, 599-603.
- Floegel, A., King, D.O., Chung, S.J., Koo, S.I., Chun, O.K. (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24, 1043-1048.
- Flores-Maya, S., Vargas-Jurado, M. Á., Suárez-Mota, M. E., & Barrera-Escorcia, H. (2015). Análisis cariotípico de *Agave marmorata* y *Agave peacockii* (Agavaceae) ubicados en las terrazas aluviales del río Zapotitlán, Puebla, México. *Polibotánica*, 40, 109-125.
- Flores, M. A., Mora, E. R., Romero A. L. (2008). Evaluación fisicoquímica del aguamiel de tres variedades de maguey pulquero (*Agave spp*). *RESPYN*, 8, 1-9.
- García, L., Juárez, B., Aguirre, J., Pinos, J., Martínez, J., & Santoyo, M. (2009). Effects of *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dick high fructose syrup on non-diabetic and streptozotocin diabetic rats. *J. Med. Plants Research*, 3, 932-940.

- García-Herrera, J. E., Méndez-Gallegos, J. S., y Talavera-Magaña, D. (2010). El género agave spp. En México: Principales usos de importancia socioeconómica y agroecológica. *Revista de Salud Pública y Nutrición*, 5, 109-129.
- García-Mendoza, A. (2007). Los agaves de México. *UNAM*, 87, 14-23.
- García-Soto, M. J., Jiménez-Islas, H., Navarrete-Bolaños, J. L., Rico-Martínez, R., Miranda-López, R., & Botello-Álvarez, J. E. (2011). Kinetic study of the thermal hydrolysis of agave salmiana for mezcal production. *J. Agr. Food Chem*, 59, 7333-7340.
- Gardner, P.T., White, T., McPhail, D.B. Duthie, G. (2000). The relative contributions of vitamin C, carotenoids and phenolics to the antioxidant of fruit juices. *Food Chemistry*, 68, 471-474.
- Gentry, H. S. (1982). Agaves of Continental North America. *The University of Arizona Press, Tucson*. USA. 670.
- Gómez-Díaz, J., López-Malo, A. (2009). Aplicaciones del ultrasonido en el tratamiento de alimentos. *Ing. Alimentos*, 3, 59-73.
- Gómez-López, V. M., Buitrago, M. E., y Martínez-Yepez, A. (2018). Effect of ultrasonication on sensory and chemical stability of passion fruit juice during refrigerated storage. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 85-89.
- Gschaedler, A. C., Rodríguez, B., Prado R., y Flores, J.L. (2015). Ciencia y tecnología del tequila: avances y perspectivas. Guadalajara: Editorial CIATEJ.
- Gülcin, I., Buyukokuroglu, M.E., Kufrevioglu, O. I. (2003). Metal chelating and hydrogen peroxide scavenging effects of melatonin. *J. Pineal Research*, 34, 278-281.
- Hazra, B., Biswas, S., Mandal, N. (2008). Antioxidant and free radical scavenging activity of *Spondias pinnata*. *BMC complementary and Alternative Medicine*, 8, 63. DOI: 10.1186/1472-6882-8-63.
- Hebbel, R. P., Leung, A., y Mohandas, N. (1990). Oxidation-induced changes in microrheologic properties of the red blood cell membrane. *Blood*, 76, 1015-1020.

- Herceg, Z., Lelas, V., Jambrak, A. R., Vukušić, T., Levaj, B. (2013). Influence of thermo-sonication on microbiological safety, color and anthocyanins content of strawberry juice. *J. Hygienic Engineering and Design*, 4, 26-37.
- Hoover, D. G. (2000). Kinetics of microbial inactivation for alternative food processing technologies. Ultrasound. *J. Food Science Supplement*, 65, 93-95.
- Jacob, N., Sukumaran, R. K., y Prema, P. (2008). Optimization of enzymatic clarification of sapodilla juice: a statistical perspective. *Applied biochemistry and biotechnology*, 151, 353-363.
- Jovanovic-Malinovska, R., Kuzmanova, S., y Winkelhausen, E. (2015). Application of ultrasound for enhanced extraction of prebiotic oligosaccharides from selected fruits and vegetables. *Ultrasonics Sonochemistry*, 22, 446-453.
- Khandpur, P., y Gogate, P. R. (2016). Evaluation of ultrasound based sterilization approaches in terms of shelf life and quality parameters of fruit and vegetable juices. *Ultrasonics sonochemistry*, 29, 337-353.
- Khandpur, P., y Gogate, P. R. (2015). Effect of novel ultrasound based processing on the nutrition quality of different fruit and vegetable juices. *Ultrasonics Sonochemistry*, 27, 125-136.
- Khokhar, S., y Apenten, R. K. O. (2003). Iron binding characteristics of phenolic compounds: some tentative structure–activity relations. *Food Chemistry*, 81, 133-140.
- Kiang, W. S., Bhat, R., Rosma, A., & Cheng, L. H. (2013). Effects of thermosonication on the fate of Escherichia coli O157: H7 and Salmonella Enteritidis in mango juice. *Letters in Applied Microbiology*, 56, 251-257.
- Kirk, R.S., Sawyer, R., Egan, H. (2009). Composición y Análisis de Alimentos de Pearson. 2ª Edición. Editorial Patria México.
- Knorr, D., Froehling, A., Jaeger, H., Reineke, K., Schlueter, O., y Schoessler, K. (2011). Emerging technologies in food processing. *Annual Review of Food Science and Technology*, 2, 203-235.

- Knorr, D., Zenker, M., Heinz, V., y Lee, D. U. (2004). Applications and potential of ultrasonics in food processing. *Trends in Food Science & Technology*, 15, 261-266.
- Kuskoski, E., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., Mancini-Filho, J., Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar capacidad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 25, 726-732.
- Lee, H., Zhou, B., Liang, W., Feng, H., & Martin, S. E. (2009). Inactivation of *Escherichia coli* cells with sonication, manosonication, thermosonication, and manothermosonication: microbial responses and kinetics modeling. *Journal of Food Engineering*, 93, 354-364.
- Levine, M., Rumsey, S. C., Daruwala, R., Park, J. B., & Wang, Y. (1999). Criteria and recommendations for vitamin C intake. *Jama*, 281, 1415-1423.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy reviews*, 4, 118.
- López-Malo, A., Palou, E., Jiménez, M., Alzamora, S. M., Guerrero, S. (2005). Multifactorial fungal inactivation combining thermosonication and antimicrobials. *J. Food Engineering*, 67(1), 87-93.
- Marin, F. R., Martinez, M., Uribesalgo, T., Castillo, S., & Frutos, M. J. (2002). Changes in nutraceutical composition of lemon juices according to different industrial extraction systems. *Food Chemistry*, 78, 319-324.
- Martinez-Valverde, I., Periago, M.J., Ros, G. (2000). Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 50, 5-18.
- Mason, T. J., Paniwnyk, L., y Lorimer, J. P. (1996). The uses of ultrasound in food technology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 3, S253-S260.
- Mason, T. J., Rivera, E., Vercet, A., López-Buesa, P. (2005). Application of ultrasound. En: D. Sun (Ed). *Emerging technologies for food processing*. Elsevier, Londres. Gran Bretaña. 323-351.
- Meydav, S., Saguy, I., Kopelman, I. J. (1977). Browning determination in citrus products. *J. Agr. Food Chem*, 25, 602-604.

- Miliauskas, G., Venskutonis, P. R., Van Beek, T. A. (2004). Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry*, 85, 231-237.
- Morales, F. J., Jiménez-Pérez, S. (2001). Free radical scavenging capacity of Maillard reaction products as related to colour and fluorescence. *J. Agr. Food Chem*, 72, 119-125.
- Morales, P., Brignardello, J., Gotteland, M. (2010). La microbiota intestinal: Un nuevo actor en el desarrollo de la obesidad. *Revista Médica de Chile*, 138, 1020-1027.
- Mora-López, J. L., Reyes-Agüero, J. A., Flores-Flores, J. L., Peña-Valdivia, C. B., y Aguirre-Rivera, J. R. (2011). Variación morfológica y humanización de la sección salmianae del género agave. *Agrociencia*, 45, 465-477.
- Muñoz-Márquez, D. B., Rodríguez-Jasso, R. M., Rodríguez-Herrera, R., Contreras-Esquivel, J. C., y Aguilar-González, C. N. (2013). Producción Artesanal del Agumiel: Una Bebida Tradicional Mexicana. *Rev UAC*, 5, 12-19.
- Muñoz, A., Caminiti, I. M., Palgan, I., Pataro, G., Noci, F., Morgan, D. J., & Lyng, J. G. (2012). Effects on Escherichia coli inactivation and quality attributes in apple juice treated by combinations of pulsed light and thermosonication. *Food Research International*, 45, 299-305.
- NMX-V-022-1972. Agumiel. Hydromel. Normas Mexicanas. Dirección general de normas.
- Odriozola-Serrano, I., Soliva-Fortuny, R., Gimeno-A ó, V., Martín-Belloso, O. (2008). Kinetic study of anthocyanins, vitamin C, and antioxidant capacity in strawberry juices treated by high-intensity pulsed electric fields. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 8387-8393.
- Olveria, F. G., González-Molero, I. (2007). Probióticos y prebióticos en la práctica clínica. *Nutr Hosp*, 22 (Supl. 2), 26-34.
- Oms-Oliu, G., Odriozola-Serrano, I., Soliva-Fortuny, R., Martín-Belloso, O. (2009). Effects of high-intensity pulsed electric field processing conditions on lycopene,

vitamin C and antioxidant capacity of watermelon juice. *Food Chemistry*, 115, 1312-1319.

- Ortega, Ma. A. (2016). Efecto del termoultrasonido sobre la extracción de aceite de semillas de tuna (*Opuntia ficus indica*) y su actividad antioxidante y antimicrobiana. (Tesis de pregrado). Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Pachuca de Soto, Hidalgo.
- Ortiz, R. I., Pourcelly, G., Doco, T., Williams, P., Dornier, M., Belleville, M. (2008). Analysis of the main components of the aguamiel produced by the maguey-pulquero (*Agave mapisaga*) throughout the harvest period. *J. Agr. Food Chem*, 56, 3682-3687.
- Ortiz, R. I., Williams, P., Belleville M. P., Doco, T. (2009). Presence of rhamnogalacturonan II in the juices produced by enzymatic liquefaction of *Agave pulquero* stem (*Agave mapisaga*). *Carbohydr Polym*, 77, 870-875.
- Parra, H. RA. (2010). Bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos. *Facultad de Ciencias Agropecuarias*, 8, 93-105.
- Patthamakanokporn, O., Puwastien, P., Nitithamyong, A., y Sirichakwal, P. P. (2008). Changes of antioxidant activity and total phenolic compounds during storage of selected fruits. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21, 241-248.
- Pérez-Jiménez, J., Arranz, S., Taberner, M., Díaz-Rubio, E., Serrano, J., Goñi, I. (2008). Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: extraction, measurement and expression of results. *Food Research International*. 41, 274-285.
- Pinelo, M., Zeuner, B., & Meyer, A. S. (2010). Juice clarification by protease and pectinase treatments indicates new roles of pectin and protein in cherry juice turbidity. *Food and Bioproducts Processing*, 88, 259-265.
- Ramírez, J., Ulloa, P. R., Velázquez, M. Y., González, J. A. U., y Romero, F. A. (2011). Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *Revista Fuente*, 2(7).
- Ramírez-Moreno, E., Zafra-Rojas, Q. Y., Arias-Rico, J., Ariza-Ortega, J. A., Alanís-García, E., y Cruz-Cansino, N. (2018). Effect of ultrasound on microbiological load

and antioxidant properties of blackberry juice. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42, e13489.

- Ramírez-Tobías, H. M., Peña-Valdivia, C. B., Aguirre, J. R., Reyes-Agüero, J. A., Sánchez-Urdaneta, A. B., y Valle, S. A. (2012). Seed germination temperatures of eight Mexican Agave species with economic importance. *Plant Species Biology*, 27, 124-137.
- Rawson, A., Tiwari, B. K., Patras, A., Brunton, N., Brennan, C., Cullen, P. J., O'Donnell, C. (2011). Effect of thermosonication on bioactive compounds in watermelon juice. *Food Research International*, 44, 1168-1173.
- Robles-Ozuna, L. E., Ochoa-Martínez, L. A. (2012). Ultrasonido y sus aplicaciones en el procesamiento de alimentos. *Rev. Iber. Tecnología Postcosecha*, 13, 109-122.
- Rojas, M. L., Leite, T. S., Cristianini, M., Alvim, I. D., & Augusto, P. E. (2016). Peach juice processed by the ultrasound technology: Changes in its microstructure improve its physical properties and stability. *Food Research International*, 82, 22-33.
- Romero-López M.R., Osorio-Díaz P., Flores-Morales A., Robledo N., & Mora-Escobedo R. (2015). Chemical composition, antioxidant capacity and prebiotic effect of aguamiel (agave atrovirens) during in vitro fermentation. *Rev. Mex. IQ*. 14, 281-292.
- Saeeduddin, M., Abid, M., Jabbar, S., Wu, T., Hashim, M. M., Awad, F. N., & Zeng, X. (2015). Quality assessment of pear juice under ultrasound and commercial pasteurization processing conditions. *LWT-Food Science and Technology*, 64, 452-458.
- Sagong, H. G., Lee, S. Y., Chang, P. S., Heu, S., Ryu, S., Choi, Y. J., Kang, D. H. (2011). Combined effect of ultrasound and organic acids to reduce *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella* Typhimurium, and *Listeria monocytogenes* on organic fresh lettuce. *International Journal of Food Microbiology*, 145, 287-292.
- Sánchez, M. A. (1998). Los agaves de México en la industria alimentaria. *CEESTEM*. 1-79.

- Sanchez-Marroquin, A., Hope, P. H. (1953). Agave juice, fermentation and chemical composition studies of some species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1, 246-249.
- Saravanan, K., & Aradhya, S. M. (2011). Polyphenols of pseudostem of different banana cultivars and their antioxidant activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 3613-3623.
- Saucedo, A. E. Q., Palafox, H., Sánchez, R. M. R., y Aguilar, G. A. G. (2011). Interacción de compuestos fenólicos y fibra dietaria: Capacidad antioxidante y biodisponibilidad. *Biotecnia*, 13, 3-11.
- Schaich, K.M., Tian, X., Xie, J. (2015). Reprint of “Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays”. *Journal of Functional Foods*, 18, 782-796.
- Scherba, G., Weigel, R. M., & O'brien, W. D. (1991). Quantitative assessment of the germicidal efficacy of ultrasonic energy. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 2079-2084.
- Sin, H. N., Yusof, S., Hamid, N. S. A., & Rahman, R. A. (2006). Optimization of enzymatic clarification of sapodilla juice using response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 73, 313-319.
- Sindhi, V., Gupta, V., Sharma, K., Bhatnagar, S., Kumari, R., & Dhaka, N. (2013). Potential applications of antioxidants—A review. *Journal of pharmacy research*, 7, 828-835.
- Soria, A. C., y Villamiel, M. (2010). Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 21, 323-331.
- Stintzing, F., Herbach, K., Mobhammer, M. R., Carle, R., Yi, W., Sellappa, S., Akoh, C. C., Brunch, R., Felker P. (2005). Color, betalains pattern, and antioxidant properties of cactus pear (*Opuntia* spp) clones. *J. Agr. Food Chem*, 53, 442-451.
- Sumaya-Martínez, M. T., Cruz-Jaime, S., Madrigal-Santillán, E., García-Paredes, J. D., Cariño-Cortés, R., Cruz-Cansino, N., Alanís-García, E. (2011). Betalain, acid

ascorbic, phenolic contents and antioxidant properties of purple, red, yellow and white cactus pears. *International Journal of Molecular Sciences*, 12, 6452-6468.

- Tapia, O. (2016). Estandarización de condiciones de producción de pulque a partir de savia de *Agave salmiana*. (Tesis de pregrado). Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coahuila.
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., Byrne, D. H. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of food composition and analysis*, 19, 669-675.
- Tiwari, B. K., Muthukumarappan, K., O'Donnell, C. P., Cullen, P. J. (2008). Colour degradation and quality parameters of sonicated orange juice using response surface methodology. *LWT-Food Science and Technology*, 41, 1876-1883.
- Tiwari, B. K., O'Donnell, C. P., Cullen, P. J. (2009). Effect of non-thermal processing technologies on the anthocyanin content of fruit juices. *Trends in Food Science and Technology*, 20, 137-145.
- Tiwari, B. K., O'Donnell, C. P., Patras, A., Cullen, P. J. (2008). Anthocyanin and ascorbic acid degradation in sonicated strawberry juice. *J. Agr. Food Chem*, 56, 10071-10077.
- Tiwari, B. K., Patras, A., Brunton, N., Cullen, P. J., O'Donnell, C.P. (2010). Effect of ultrasound processing on anthocyanins and color of red grape juice. *Ultrasonics Sonochemistry*, 17, 598-604.
- Tovar-Robles, C. L., Perales-Segovia, C., Cedillo, A. N., Valera-Montero, L. L., Gómez-Leyva, J. F., Guevara-Lara, F., y Silos-Espino, H. (2011). Effect of aguamiel (agave sap) on hematic biometry in rabbits and its antioxidant activity determination. *Italian Journal of Animal Science*, 10, 21.
- Trejo-Salazar, R. E., Scheinvar, E., y Eguiarte, L. E. (2015). ¿Quién poliniza realmente los agaves? Diversidad de visitantes florales en 3 especies de *Agave* (Agavoideae: Asparagaceae). *Revista mexicana de Biodiversidad*, 86, 358-369.
- Valdez-López, E.N., Cruz-Cansino, N. (2015). Optimización del néctar de yaca (*artocarpus heterophyllus*) termoultrasonificado sobre estabilidad física y ácido

ascórbico. Obtenido de Revista Educación y Salud del ICsA: <https://repository.uaeh.edu.mx/revistas/index.php/ICSA/article/view/864/862>.

- Vázquez-Díaz, E., García Nava, J. R., Peña Valdivia, C. B., Tobías, R., Hugo, M., y Morales-Ramos, V. (2011). Tamaño de la semilla, emergencia y desarrollo de la plántula de maguey (*Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck). *Revista Fitotecnia Mexicana*, 34, 167-173.
- Versteeg, C., Rombouts, F. M., Spaansen, C. H., Pilnik, W. (1980). Thermostability and orange juice cloud destabilizing properties of multiple pectinesterases from orange. *J. Food Science*, 45, 969-972.
- Vieira, M. C., Teixeira, A. A., y Silva, C. L. M. (2000). Mathematical modeling of the thermal degradation kinetics of vitamin C in cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) nectar. *Journal of Food Engineering*, 43, 1-7.
- Villamiel, M., & de Jong, P. (2000). Inactivation of *Pseudomonas fluorescens* and *Streptococcus thermophilus* in Trypticase Soy Broth and total bacteria in milk by continuous-flow ultrasonic treatment and conventional heating. *Journal of food engineering*, 45, 171-179.
- Wilches, F. AM. (2005). Estudio genético preliminar de bacterias ácido lácticas productoras de exopolisacáridos (EPS). *Universidad de Pamplona*, 3, 12-17.
- Wu, J., Gamage, T. V., Vilku, K. S., Simons, L. K., & Mawson, R. (2008). Effect of thermosonication on quality improvement of tomato juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9, 186-195.
- Yáñez, A. L., Ramírez, L. M., Pérez, A. B. (2012). Análisis de los factores que inciden en el consumo de una nueva bebida probiótica elaborada a partir de aguamiel. Nanacamilpa, Tlaxcala. *IPN*, 13, 185-202.
- Zafra-Rojas, Q. Y., Cruz-Cansino, N., Ramírez-Moreno, E., Delgado-Olivares, L., Villanueva-Sánchez, J., Alanís-García, E. (2013). Effects of ultrasound treatment in purple cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) juice. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20, 1283-1288.
- Zamora, J. D. (2007). Antioxidantes: micronutrientes en lucha por la salud. *Revista Chilena de Nutrición*, 34, 17-26.

- Zou, T. B., Wang, M., Gan, R. Y., Ling, W. H. (2011). Optimization of ultrasound-assisted extraction of anthocyanins from mulberry, using response surface methodology. *International Journal of Molecular Sciences*, 12, 3006-3017. DOI: 10.3390/ijms12053006.