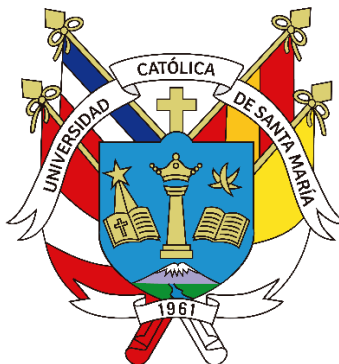


Universidad Católica de Santa María

Facultad de Ciencias e Ingenierías Biológicas y Químicas
Escuela Profesional de Ingeniería de Industria Alimentaria



**COMPARACIÓN DEL EFECTO PREBIOTICO DE EXTRACTOS DE ARÁNDANOS,
GLUCOSA E INULINA SOBRE EL DESARROLLO DE *Lactobacillus rhamnosus* EN
CONDICIONES CONTROLADAS.**

Tesis presentada por la bachiller:

Durand López, Verónica Leonor

Para optar el título profesional de
Ingeniera de industria alimentaria

Asesor: Ing. Salas Castro, Jorge
Enrique

Arequipa - Perú

2022

UCSM-ERP

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA
INGENIERIA DE INDUSTRIA ALIMENTARIA
TITULACIÓN CON TESIS
DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR

Arequipa, 22 de Agosto del 2022

Dictamen: 002055-C-EPIDA-2022

Visto el borrador del expediente 002055, presentado por:

2013201412 - DURAND LOPEZ VERONICA LEONOR

Titulado:

**COMPARACIÓN DEL EFECTO PREBIOTICO DE EXTRACTOS DE ARANDANOS, GLUCOSA E
INULINA SOBRE EL DESARROLLO DE LACTOBACILLUS RHAMNOSUS. EN CONDICIONES
CONTROLADAS.**

Nuestro dictamen es:

APROBADO

**1169 - ARENAS RODRIGUEZ MARTHA BEATRIZ
DICTAMINADOR**



**1355 - MORI NUÑEZ CARLOS LUIS
DICTAMINADOR**



**1569 - GARCIA LAZO HELARD ARTURO
DICTAMINADOR**



DEDICATORIA

A Dios, a mis padres y especialmente a mi madre por su ejemplo de trabajo esfuerzo y
dedicación.



AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios, a mis padres, especialmente a mi madre y a la Universidad Católica de Santa María.



RESUMEN

Los probióticos son microorganismos muy beneficiosos para la salud, y la forma de mantenerlos estables y activos en nuestro organismo es consumir alimentos considerados como prebióticos. La presente tesis evaluó el efecto prebiótico sobre el desarrollo de *Lactobacillus rhamnosus* de seis tipos de extractos obtenidos por decocción a 60 °C (E1) y 92,5 °C (E2); extracción con etanol al 70 % (E3) y 96 % (E4), y extracción por ultrasonido con 325 W (E5) y 650 W (E6) de potencia. Se determinó la capacidad antioxidante mediante el método CuPRAC, fenoles totales por el método de Folin – Ciocalteu y antocianinas monoméricas por el método de pH diferencial, por otro lado se evaluó el efecto prebiótico de los extractos en sistemas que contuvieron caldo Man Rogosa and Sharpe con 10 mL/L y fueron contrastados con un control negativo (solo medio de cultivo) y un control positivo con caldo de cultivo más 10 g/L de inulina, adicionalmente se hicieron cultivos en placa para determinar la población microbiana de cada sistema. El extracto que presentó mayor capacidad antioxidante, concentración de fenoles totales y antocianinas monoméricas fue el extracto E4 con 3,207 mg de ácido ascórbico por 100 mL de extracto; 0,496 mg de ácido gálico por 100 mL de extracto y 216 mg de cianidina 3 glucósido por 100 mL de extracto, el sistema que fue enriquecido con este extracto alcanzó una velocidad específica de crecimiento máxima (μ_{max}) de 0,2745 h⁻¹ y el tiempo de duplicación (Td) de 2,53 h se logró demostrar una relación directa entre el alto contenido de fenoles, antocianinas y capacidad antioxidante con el desarrollo óptimo del prebiótico *Lactobacillus rhamnosus*.

Palabras clave: antocianinas, arándanos, capacidad antioxidante, fenoles, *Lactobacillus rhamnosus* y prebiótico.

ABSTRACT

Probiotics are beneficial microorganisms for health, and the way to keep them stable and active in our organism is to consume foods considered as prebiotics. This thesis evaluated the prebiotic effect on the development of *Lactobacillus rhamnosus* of six types of extracts obtained by decoction at 60 °C (E1) and 92.5 °C (E2); extraction with 70% (E3) and 96% (E4) ethanol and extraction by ultrasound with 325 W (E5) and 650 W (E6) of power. The antioxidant capacity was decided by the CuPRAC method, total phenols by the Folin-Ciocalteu method and monomeric anthocyanins by the differential pH method. On the other hand, the prebiotic effect of the extracts was evaluated in systems that contained Man Rogosa and Sharpe broth with 10 mL/L and were contrasted with a negative control (culture medium only) and a positive control with culture broth plus 10 g/L of inulin, additionally plate cultures were made to determine the microbial population of each system. The extract that presented the highest antioxidant capacity, concentration of total phenols and monomeric anthocyanins was the E4 extract with 3,207 mg of ascorbic acid per 100 mL of extract; 0.496 mg of gallic acid per 100 mL of extract and 216 mg of cyanidin 3 glucoside per 100 mL of extract, the system that was enriched with this extract reached a maximum specific growth rate (μ_{max}) of 0.2745 and the doubling time (Td) of 2.53 h, it was possible to demonstrate a direct relationship between the high content of phenols, anthocyanins and antioxidant capacity with the optimal development of the prebiotic *Lactobacillus rhamnosus*.

Keywords: antioxidant capacity, anthocyanins, blueberries, *Lactobacillus rhamnosus*, phenols and prebiotic.

INTRODUCCIÓN

Vaccinium es un género de arbustos que incluye a todas las especies llamadas arándanos. Este género contiene alrededor de 450 especies incluyendo la especie *Corymbosum* la cual es conocida comercialmente como el arándano azul, Mirtilos o “*Blueberry*” (Medina & Sánchez, 2014). Los arándanos son uno de los pocos cultivos de frutas que son nativos de América del Norte y junto a las fresas son la segunda baya más importante en los EE. UU. El mercado de los arándanos cultivados casi ha cuadruplicado su tamaño desde la década de 1970, y desde 2000 con un ritmo tasa de 10 a 20 % anual (USDA, 2020).

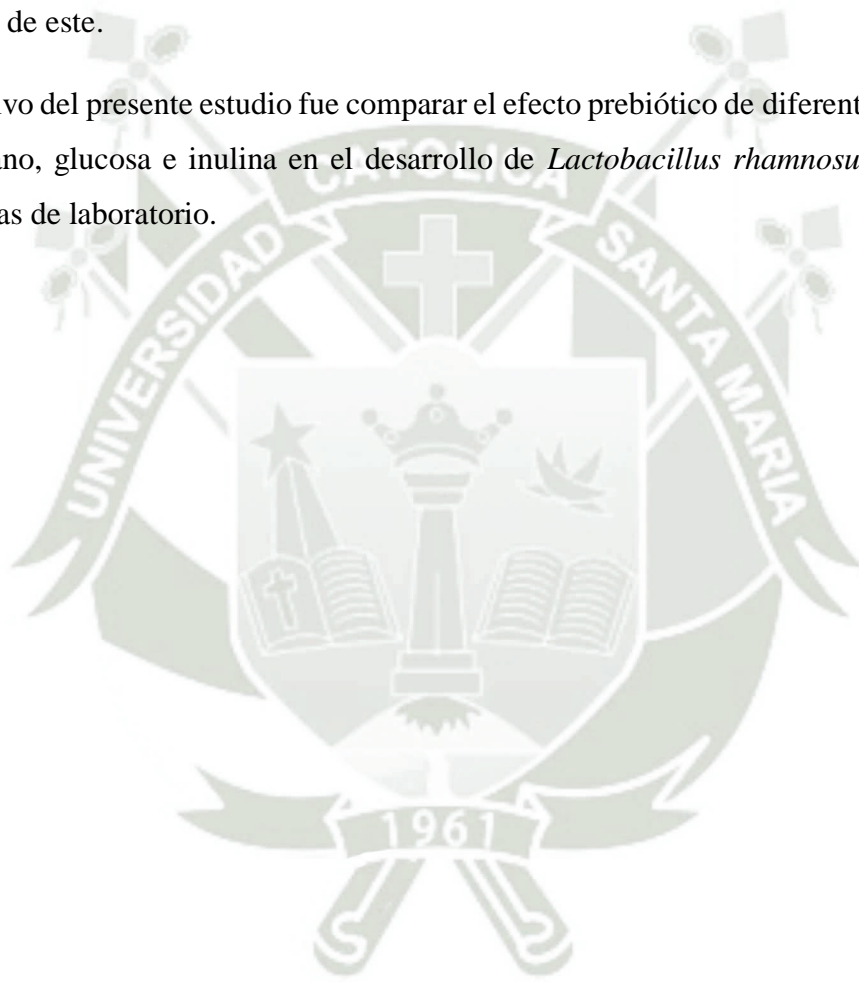
Martínez-Flórez et al. (2002) indica que estos frutos contienen kaempferol, un flavonoide, cuyos efectos positivos para la salud han sido probados en numerosos estudios, además, tiene la capacidad de reducir el riesgo de ataque cardíaco, este componente inhibe el crecimiento de células cancerosas en el ovario; esta planta es una de las más ricas en ácido clorogénico, después del café, el girasol o las ortigas; este componente tiene muchas propiedades medicinales, entre ellas la capacidad de inhibir el crecimiento de células cancerosas, especialmente las del estómago, hígado, colon y piel.

Los probióticos pueden definirse como microorganismos vivos que ingeridos en cantidad adecuada, ejercen efectos beneficiosos en la salud, más allá de los inherentes a la nutrición básica (Ferrer & Dalmau, 2001).

Zhou et al. (2020), llevaron a cabo la investigación de la composición, la actividad antioxidante de las antocianinas de arándano y sus efectos sobre la microbiota intestinal humana. Los hallazgos de los autores sugieren que el consumo de arándanos y extractos de arándanos podría ejercer una actividad prebiótica que se asocia con beneficios para la salud. Jiao et al. (2019) precisan en su investigación que los arándanos son una fuente de polifenoles y que este compuesto a su vez regula la microbiota intestinal y se les relaciona también con la mejora en ratones con obesidad inducida. Yang et al. (2014), indican que las bayas como el arándano poseen varias actividades biológicas que incluyen efectos antimicrobianos y nutricionales. Castagnini (2014) determinó las condiciones experimentales para obtener jugo de arándanos de elevada calidad, a la vez, prueba diferentes tecnologías para la mejora de este jugo. La parte más relevante es el uso de lactobacillus para potencializar la funcionalidad del jugo. (Chaccha & Granados, 2014) obtuvieron los siguientes resultados en una bebida de arándanos: 84,26 % de inhibición de radicales libres, 1,656 mg EAG/mL y 332,029 mg de cianidina 3-glucósido/L. Miller et al. (2019), demuestran que las bayas de arándano se

caracterizan por sus compuestos altamente nutritivos, que incluyen minerales, vitaminas, ácidos grasos y fibra dietética, así como su alto contenido y amplia diversidad de compuestos bioactivos, como los compuestos fenólicos y ácidos orgánicos. Murthy et al. (2017), demuestran mediante experimentos el potencial bioactivo en este caso antitumoral de una bebida a base de granada con bacterias acidolácticas, el panorama que da este reciente artículo es muy importante ya que otorga viabilidad a la temática principal del presente la presente tesis, que es utilizar bacterias probióticas para mejorar las propiedades alimenticias de un fruto o derivados de este.

El objetivo del presente estudio fue comparar el efecto prebiótico de diferentes tipos extractos de arándano, glucosa e inulina en el desarrollo de *Lactobacillus rhamnosus* en condiciones controladas de laboratorio.



ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	v
ABSTRACT.....	vi
INTRODUCCIÓN	vii
1. CAPÍTULO I: EL PROBLEMA DE LA INVESTIGACIÓN.....	1
1. Problema de investigación	2
1.1. Descripción del problema.....	2
2. Justificación de la Investigación	3
3.1. Social.....	3
3.2. Científica – tecnológica	4
3.3. Económica.....	4
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO.....	5
1. Bases teóricas de la investigación	6
1.1. Arándanos.....	6
1.2. Clasificación taxonómica.....	7
1.3. Características fisicoquímicas.....	8
1.4. Estadísticas de producción y proyección	11
1.5. Bacterias probióticas.....	12
1.5.1. Genero Lactobacillus.....	13
1.5.2. <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	14
1.6. Alimentos prebióticos.....	15
1.7. Antecedentes.....	21
1.7.1. Antecedentes internacionales	21
1.7.2. Antecedentes Nacionales.....	24

1.8.	Objetivos.....	24
1.8.1.	Objetivo general	24
1.8.2.	Objetivos específicos.....	24
1.9.	Hipótesis	25
CAPÍTULO III: PLANTEAMIENTO OPERACIONAL		26
1.	Ubicación espacial y temporal	27
2.	Metodología	27
2.1.	Materias primas:.....	27
2.2.	Insumos	27
2.3.	Material biológico.....	27
2.4.	Equipos, materiales de laboratorio y reactivos	27
2.5.	Operacionalización de variables	29
2.6.	Métodos de análisis	29
2.6.1.	Generación de extractos de arándano por decocción, extracción alcohólica y ultrasonido.	29
2.6.2.	Determinación de la capacidad antioxidante mediante el método CUPRAC. 30	
2.6.3.	Determinación de compuestos fenólicos totales por el método Folin-Ciocalteu 31	
2.6.4.	Determinación de antocianinas	32
2.6.5.	Estudio cinético y poblacional de bacterias lácticas (<i>L. rhamnosus</i>).	33
CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIONES		35
1.	Determinación de capacidad antioxidante, fenoles totales y antocianinas del arándano. 36	

2. Generación de extractos de arándano por decocción, extracción alcohólica y ultrasonido.....	36
3. Capacidad antioxidante por el método CUPRAC de los extractos	36
3. Determinación de compuestos fenólicos totales por el método Folin Ciocalteu	39
4. Determinación de antocianinas totales por el método pH diferencial.....	42
5. Estudio cinético y poblacional de <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	45
6. Determinación de la viabilidad de las bacterias probióticas	50
CONCLUSIONES.....	52
Primera.....	52
Segunda.....	52
Tercera	52
RECOMENDACIONES	53
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
ANEXOS	69

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cantidades reportadas por diferentes autores de algunos compuestos fenólicos en arándano.....	8
Tabla 2. Información nutricional de 100 g. de arándanos frescos.....	10
Tabla 3. Cuadro de variables generales.....	29
Tabla 4. Procedimiento para obtener la recta de calibración del ácido ascórbico como componente antioxidante.....	31
Tabla 5. Condiciones de trabajo de los sistemas (biorreactores) utilizados.....	33
Tabla 6. Codificación y detalles de los métodos de obtención de extractos de arándanos.....	36
Tabla 7. Lecturas de absorbancia a 450 nm de las concentraciones estándar para método CUPRAC.....	37
Tabla 8. Capacidad antioxidante expresada como mM de ácido ascórbico de los extractos obtenidos.....	38
Tabla 9. Lecturas de absorbancia a 725 nm de las concentraciones estándar de ácido gálico.....	40
Tabla 10. Fenoles totales expresado como concentración de ácido gálico de los extractos obtenidos.....	41
Tabla 11. Absorbancias a 510 y 720 nm de los extractos llevados a pH 1 y pH 4,5.....	42
Tabla 12. Antocianinas totales expresadas como mg de C3G en cada extracto.....	43

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de la superficie mundial cultivada de arándanos.	11
Figura 2. Cultivo de arándanos en Perú Proyección de la Superficie cultivada de Arándanos en el Perú 2012-2022 (Proyectado).....	12
Figura 3. <i>Lactobacillus bulgaricus</i> utilizado para la producción casera de yogur.	14
Figura 4. Apariencia macroscópica y microscópica de <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	15
Figura 5. Recta de calibración ácido ascórbico.	37
Figura 6. Capacidad antioxidante (CUPRAC) de los extractos expresada como mM de ácido ascórbico.	39
Figura 7. Curva de calibración ácido gálico.	40
Figura 8. Fenoles totales (Folin – Ciocalteu) expresado como mg/L de ácido gálico.	42
Figura 9. Concentración de antocianinas expresadas como mg de C3G por 100 mL de extractos.	44
Figura 10. Curva de crecimiento de <i>L. rhamnosus</i> en caldo MRS.	45
Figura 11. Curva de crecimiento de <i>L. rhamnosus</i> en caldo MRS con extracto de arándano obtenido por decocción (H ₂ O, 60°C).	46
Figura 12. Curva de crecimiento de <i>L. rhamnosus</i> en caldo MRS con extracto de arándano obtenido por extracción alcohólica (EtOH 96 %).	47
Figura 13. Curva de crecimiento de <i>L. rhamnosus</i> en caldo MRS con extracto de arándano obtenido por extracción ultrasónica (650 W).	48
Figura 14. Curva de crecimiento de <i>L. rhamnosus</i> en caldo MRS con 10 g/L de inulina.	49
Figura 15. Unidades formadoras de colonia obtenidas con medio de cultivo enriquecido con extractos de arándanos.	51
Figura 16. Frasco de Inulina grado analítico marca Sigma Aldrich ®.	76

Figura 17. Extractos E1 – E6 (derecha a izquierda) en botellas de vidrio. Frascos con caldo MRS con 10 mL/L de cada extracto	76
Figura 18. Fotografía de la configuración del equipo de ultrasonido utilizado (1 hora de proceso, 5 segundos de funcionamiento con 10 de descanso y alarma al superar los 50 °C.	77
Figura 19. Curva de crecimiento de <i>L. rhamnosus</i> en caldo MRS con extracto de arándano obtenido por decocción (H ₂ O, 92,5 °C).....	78
Figura 20. Curva de crecimiento de <i>L. rhamnosus</i> en caldo MRS con extracto de arándano obtenido por decocción (EtOH, 60 %).....	78
Figura 21. Curva de crecimiento de <i>L. rhamnosus</i> en caldo MRS enriquecido con extracción ultrasónica (350 W).....	79
Figura 22. Curva de crecimiento de <i>L. rhamnosus</i> en caldo MRS con 10 g/L de glucosa.	79
Figura 23. Curvas de crecimiento con medio MRS con todos los extractos (E1 – E6), glucosa, inulina y control.	80



CAPÍTULO I: EL PROBLEMA DE LA INVESTIGACIÓN

1. Problema de investigación

¿Los extractos de arándanos, glucosa e inulina pueden tener un efecto en el desarrollo de microorganismos prebióticos como *Lactobacillus rhamnosus* en condiciones controladas?

1.1. Descripción del problema

A nivel nacional y regional la población en general consume bebidas de baja calidad, que no proceden de fuentes naturales. La presente investigación científico-experimental pretende demostrar y comparar el efecto prebiótico de extractos de arándano (*Vaccinium myrtillus*) sobre el desarrollo de *Lactobacillus rhamnosus*, con esto se pretende dar a conocer que se puede elaborar un producto de interés comercial, altamente nutritivo, bioactivo y con efectos prebióticos. Hoy en día en el mundo se viene dando un desenfrenado interés por los productos de origen natural, que contengan altos contenidos de componentes beneficiosos para el cuerpo y para la salud humana. A una bebida probiótica se le incorporan moléculas o componentes que cumplen una función beneficiosa para la flora intestinal natural, por otro lado, se les puede atribuir otras propiedades como es la capacidad antioxidante, protección gástrica, mejora en la digestión, etc.

Según Figueroa-González et al. (2011) y Syngai et al. (2016) las bebidas funcionales poseen de por sí pequeñas cantidades de moléculas que aportan beneficios para la salud del consumidor. En una sociedad en la que el tiempo es la principal limitante, la población económicamente activa busca maneras de utilizar este de forma eficiente y en reiteradas oportunidades se tiende al consumo de bebidas de alto poder alimenticio y con bioactividad, los ingredientes alimentarios funcionales consisten en probióticos, prebióticos, vitaminas y minerales; que se utilizan actualmente para el consumo humano en forma de leches fermentadas y yogures, bebidas deportivas, alimentos para bebés, dulces sin azúcar y chicles. No es fácil encontrar en el mercado productos elaborados a partir de fuentes naturales como frutos selectos, que tengan un sabor agradable y altos beneficios para la salud. Numerosos artículos científicos demostraron mediante diferentes métodos la presencia de compuestos antioxidantes y propiedades bioactivas en arándanos (Mazza & Kay, 2008; Stojanovic & Silva, 2007; S. Y. Wang et al., 2010; Yi et al., 2005), a la par, las bacterias probióticas como *Lactobacillus* muestran numerosas aplicaciones en bebidas nutritivas de diferentes tipos (Delgado et al., 2019; Kim et al., 2012; Saarela, 2009). Lo anteriormente descrito abre un

camino muy interesante en el campo de industria alimentaria para desarrollar productos nutritivos. En la presente investigación se pretende comparar el efecto prebiótico de los extractos de arándanos, glucosa como control negativo e inulina como control positivo sobre el desarrollo de la bacteria *Lactobacillus rhamnosus*.

2. Justificación de la Investigación

El presente estudio se justifica sólidamente en la búsqueda de propiedades benéficas de los productos a base de frutos y la generación de alimentos con capacidad prebiótica que cada vez toma mayor protagonismo, debido a que las personas buscan mejorar o mantener la buena salud.

El estudio es pertinente, puesto que la era de la globalización en que vivimos demanda productos inocuos y de elevada calidad, ricos en nutrientes y al alcance del consumidor. Es trascendental en la medida que el incremento de la demanda por el producto nos muestra una conciencia social sobre la necesidad de mejorar su salud. La importancia de este estudio descansa sobre los impactos positivos que trae consigo el conocimiento que se va a generar y a su vez el bienestar de la población que requiere de una mejor nutrición, y la evaluación de productos a partir de frutos como los arándanos. Los estudios de componentes funcionales o probióticos generan conocimiento valioso para fortalecer líneas de investigación y formular o crear nuevos productos alimentarios de alto valor nutritivo. Por último, los resultados que se generen en este estudio serán de importancia social, económica y tecnológica, ya que se tendrá beneficios para la salud humana, dicho aporte trae consigo oportunidades de negocio e industrialización del producto.

3.1. Social

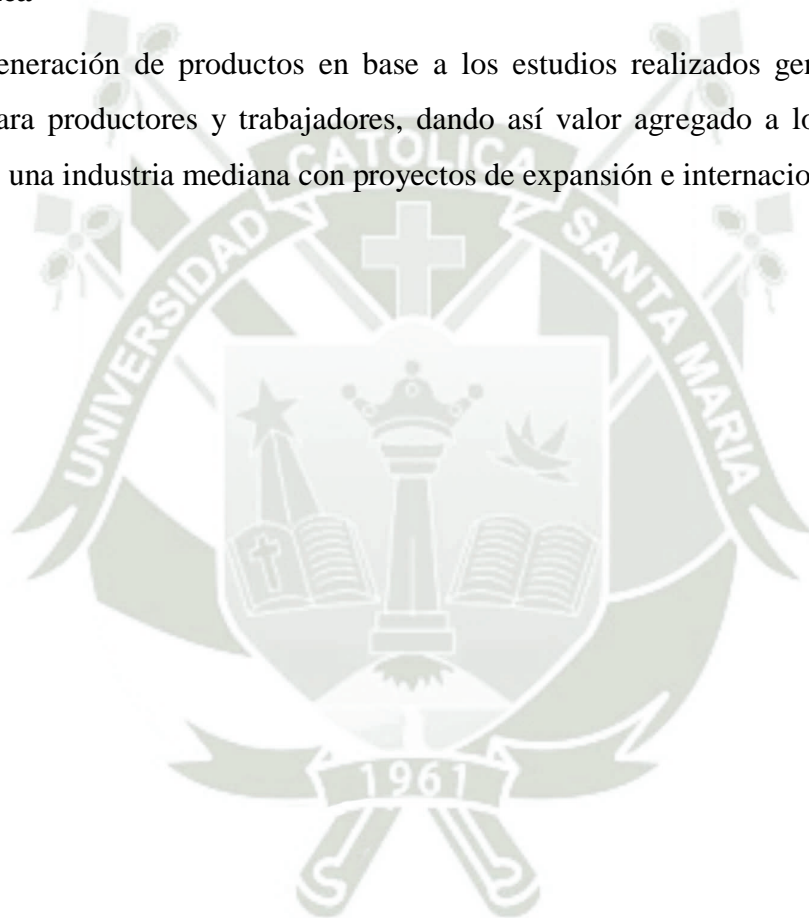
El uso de cultivos como los arándanos aporta notablemente al desarrollo de comunidades campesinas y agricultores de valles del Perú, tomando en cuenta que estos cultivos se encuentran en etapa de crecimiento y poseen un alto potencial para la exportación y desarrollo de productos alimentarios, por otra parte, el estudio contribuirá al conocimiento para la mejora de la salud humana.

3.2. Científica – tecnológica

La investigación es de carácter científico-tecnológico, por lo que se generará conocimiento y tecnología para que sea aplicada en beneficio de los consumidores y la industria. Al utilizar el arándano como fuente de extractos, se pretende estudiar su influencia tanto en la capacidad prebiótica y en la preservación de las bacterias probióticas.

3.3. Económica

La posible generación de productos en base a los estudios realizados generaría un beneficio económico para productores y trabajadores, dando así valor agregado a los cultivos locales y desarrollando una industria mediana con proyectos de expansión e internacionalización.





CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

1. Bases teóricas de la investigación

1.1. Arándanos

Según (Medina & Sánchez, 2014) es un alimento muy rico en antocianinas y otros componentes antioxidantes. Lo más resaltante del arándano es su contenido en componentes antioxidantes, entre todos ellos destacan los flavonoides, antocianidinas o antocianinas. Los arándanos son ricos en cianidina, delfinidina, malvidina, peonidina y petunidina. En las principales virtudes que debemos destacar de las antocianinas destacan sus prioridades antiinflamatorias. Es muy recomendable que consuman abundantes raciones de arándano las personas con artritis, alergias, asma, reuma u otros procesos inflamatorios. Otra de las propiedades de estos componentes es su capacidad para fluidificar la sangre y preservar la integridad del colágeno de las arterias, fortaleciendo las arterias y capilares mejorando la circulación sanguínea.

Por sus propiedades anticoagulantes evita la formación de trombos o ayuda a disolverlos. Comer este fruto mejora la salud de las personas con varices o aparición de venitas superficiales, arteriosclerosis, colesterol, hemorroides o problemas de corazón (Alcalde, 2018). No menos importante resultan los antioxidantes de este fruto para la salud de la vista. Se ha comprobado que comer estos frutos en abundancia o ingerir el zumo de arándanos ayudara a conservar la visión en mejor estado (Medina & Sánchez, 2014). Adicionalmente a las antocianidinas, los arándanos son ricos en otros flavonoides (epicatequinas, mirecitina y quercetina). Todos ellos contribuyen a configurar este fruto como uno de los mejores antioxidantes, capaz de evitar los desperfectos que la oxidación produce en el organismo (Hidalgo & Raymondi, 2021). Los arándanos contienen también vitamina C, otro importante antioxidante que también contribuye a solventar muchas de las anomalías mencionadas anteriormente (Alcalde, 2018).

Coronado H. et al. (2015) han realizado estudios en animales que han llegado a la conclusión que, debido a las propiedades antioxidantes, este fruto es capaz de mejorar la capacidad mental y a preservar las neuronas del proceso de degeneración que ocurre con el paso de los años. De esta manera una dieta que incluye este fruto podría ser útil en la prevención de enfermedades mentales como el alzhéimer, problemas de pérdida de memoria, de poca concentración mental, de demencia, etc. Lo que sí que resulta evidente es el que el cerebro necesita azúcar para poder rendir al máximo y que los arándanos contienen muchos azúcares en forma de fructosa, glucosa y sacarosa. Estos

proporcionan mucha energía y resultan muy interesantes no solo para potenciar la actividad intelectual, sino que constituyen una buena fuente de energía para hacer frente al esfuerzo diario. Los azúcares contenidos en este fruto se vierten al torrente sanguíneo de una manera paulatina, de manera que mantienen los niveles de azúcar en la sangre bastante constantes. Por ello es un fruto que resulta adecuado para las personas con diabetes. Por su contenido en mirtilina, inositol, pectina, fructosa, rutina y ácido ascórbico, se le considera como un antidiabético y se piensa que podría tener efectos positivos en personas con diabetes mellitus no-insulino dependiente.

Los arándanos contienen mucha agua y muy poca grasa. Son alimentos con muy pocas calorías. Además, contienen muchos componentes diuréticos entre los que cabe mencionar los ácidos ascórbico, cafeico, clorogénico y ursólico; la arbutina, magnesio y el potasio (Alcalde, 2018). Comer este tipo de alimentos incrementará la micción y ayudará a eliminar líquidos retenidos, así como contribuirá a “llenar el estómago” aumentando la sensación de saciedad (Medina & Sánchez, 2014).

Los azúcares contenidos en esta fruta presentan una absorción paulatina por lo que contribuyen a mitigar el hambre y a no tener que recurrir a alimentos con más calorías (Badui Dergal, 2016). Medina & Sánchez (2014) mencionan que se recomienda su consumo en personas que deseen realizar una dieta para adelgazar, es una fruta reguladora del intestino que es capaz al mismo tiempo de evitar la aparición del estreñimiento o de detener la diarrea. Su contenido en fibra le otorga propiedades laxantes y su contenido en taninos lo convierte en un buen astringente. Un alimento para prevención del cáncer. Por su contenido en antioxidantes y fibra, este alimento, al igual que la mayoría de las bayas resulta ideal para prevenir el cáncer de colon. Los antioxidantes neutralizan la acción de las partículas potencialmente cancerosas sobre las paredes del intestino. La fibra aumenta el contenido de masa fecal por lo que consigue evacuarla más rápidamente sin que las partículas dañinas tengan tiempo para actuar. Por otra parte, hay que considerar que esta fruta es muy rica en pectina, un tipo de fibra soluble, que envuelve las toxinas no permitiendo que estas sean absorbidas por el intestino.

1.2. Clasificación taxonómica.

El arándano (*Vaccinium myrtillus*), es un frutal menor nativo de Norteamérica, pertenece al reino Plantae, división Magnoliophyta, clase Magnoliopsida, orden Ericales, familia Ericaceae,

subfamilia Vaccinioideae, tribu Vaccinieae, género *Vaccinium*, especie *Vaccinium corymbosum* (Butkus & Pliszka, 1993).

1.3. Características fisicoquímicas

Es particularmente activo en la neutralización de las nitrosaminas, que, los nitratos añadidos a los alimentos producen en el organismo. Las nitrosaminas son muy tóxicas y son uno de los compuestos mayormente responsables de la aparición de numerosos tipos de cáncer, además del ácido clorogénico, esta baya también contiene ácido p-cumárico que es otro de los principales componentes antinitrosamínicos (Alcalde, 2018). La Tabla 1 presenta algunos compuestos fenólicos y flavonoides presentes en *Vaccinium mirtyllus L.* (Pires et al., 2020).

Tabla 1. Cantidades reportadas por diferentes autores de algunos compuestos fenólicos en arándano.

Compuesto fenólico	(Zorenc et al., 2018)	(Šaponjac et al., 2015)	(Stanoeva et al., 2017)
Catequina	29.67 mg/100 g	15.04 µg/100 g	96 mg/100 g
Epicatequina	59.14 mg/100 g	ND	7.9 mg/100 g
Dímeros de procianidina	72.10 mg/100 g	ND	117 mg/100 g
Trímeros de procianidina	59.33 mg/100 g	ND	109 mg/100 g
Galocatequina	35.72 mg/100 g	ND	ND
Quercitina	ND	243.30 µg/100 g	146 mg/100 g
Kaempferol	ND	15.64 µg/100 g	30 mg/100 g
Ácido clorogénico	ND	21.0 mg/100 g	6.40 mg/g
Ácido elágico	ND	9.99 mg/100 g	ND
Ácido ferúlico	4.84 mg/100 g	22.76 mg/100 g	7.3 mg/100g
Compuestos fenólicos totales	968.02 mg/100 g	181.03 mg/100 g	20.32 mg/g

*ND: no detectado.

Fuente: Zorenc et al. (2018); Šaponjac et al. (2015) y Stanoeva et al. (2017).

El arándano es muy bueno para la vista pues previene afecciones como catarata y glaucoma. Posee un alto contenido de vitamina C en la cual tiene acción directa de absorción de hierro. Tiene efectos positivos en infecciones urinarias (Falcon, 2017). Contiene un alto contenido en fibras, carece de colesterol (ver Tabla 1). Contiene componentes antioxidantes que combaten con los

radicales libres que son los causantes del envejecimiento. Son una buena fuente de hierro, fibra y vitamina C (Bonilla & Rivera, 2016). Una ración de 125 g contiene un 15% de la ingesta diaria recomendada de vitamina C. La vitamina C es un poderoso antioxidante, y de este modo puede proteger contra diversos tipos de cáncer e intensificar las funciones inmunológicas (Bruttomesso, 2012). Los arándanos contienen un bactericida que puede brindar protección contra la cistitis (inflamación de la vejiga) (Sandulachi et al., 2020). Los arándanos son un alimento rico en vitaminas A y C, y aportan muy pocas calorías, ya que contienen pocas grasas y proteínas (Rashidinejad, 2020). Son ricos en antocianos, sustancias que tienen efectos beneficiosos sobre el aparato digestivo (Kalt et al., 2020). Ayuda a controlar el estreñimiento (Katsirma et al., 2021). Señala también que “las hojas del arándano contienen cantidades importantes de tanino, quercetina, arbutina, ácido quínico; y una sustancia amarga, la ericolina, a la que se atribuyen propiedades glucosídicas, pero que, según otros, no es sino la arbutina misma (Falcon, 2017; Kaplan, 2012).

Tabla 2. Información nutricional de 100 g. de arándanos frescos.

Nombre	Valor	Unidad	Nombre	Valor	Unidad
Agua	84.2	g	Tocoferol, beta	0.01	mg
Energía	57	kcal	Tocoferol, gamma	0.36	mg
Energía	240	kJ	Tocoferol, delta	0.03	mg
Proteína	0.74	g	Tocotrienol, alfa	0	mg
Lípidos totales (grasa)	0.33	g	Tocotrienol, beta	0	mg
Ceniza	0.24	g	Tocotrienol, gamma	0.07	mg
Carbohidratos, por diferencia	14.5	g	Tocotrienol, delta	0	mg
Fibra	2.4	g	Vitamina D (D2 + D3), Unidades Internacionales	0	IU
Azúcares, totales	9.96	g	Vitamina D (D2 + D3)	0	µg
Sacarosa	0.11	g	Vitamina K (filoquinona)	19.3	µg
Glucosa	4.88	g	Vitamina K (dihidrofiloquinona)	0	µg
Fructosa	4.97	g	Ácidos grasos saturados totales	0.03	g
Lactosa	0	g	Ácidos grasos monoinsaturados totales	0.05	g
Maltosa	0	g	Ácidos grasos, poliinsaturados totales	0.15	g
Galactosa	0	g	Ácidos grasos, trans total	0	g
Almidón	0.03	g	Colesterol	0	mg
Calcio, Ca	6	mg	Triptófano	0	g
Hierro, Fe	0.28	mg	Treonina	0.02	g
Magnesio, Mg	6	mg	Isoleucina	0.02	g
Fósforo, P	12	mg	Leucina	0.04	g
Potasio, K	77	mg	Lisina	0.01	g
Sodio, Na	1	mg	Metionina	0.01	g
Zinc, Zn	0.16	mg	Cistina	0.01	g
Cobre, Cu	0.06	mg	Fenilalanina	0.03	g
Manganeso, Mn	0.34	mg	Tirosina	0.01	g
Selenio, Se	0.1	µg	Valina	0.03	g
Vitamina C, ácido ascórbico total	9.7	mg	Arginina	0.04	g
Tiamina	0.04	mg	Histidina	0.01	g
Riboflavina	0.04	mg	Alanina	0.03	g
Niacina	0.42	mg	Ácido aspártico	0.06	g
Ácido pantoténico	0.12	mg	Ácido glutámico	0.09	g
Vitamina B-6	0.05	mg	Glicina	0.03	g
Folato, total	6	µg	Prolina	0.03	g
Ácido fólico	0	µg	Serina	0.02	g
Colina, total	6	mg	Caroteno, alfa	0	µg
Betaína	0.2	mg	Criptoxantina, beta	0	µg
Vitamina B-12	0	µg	Vitamina A, UI	54	IU
Vitamina A, RAE	3	µg	Licopeno	0	µg
Retinol	0	µg	Luteína + zeaxantina	80	µg
Caroteno, beta	32	µg	Vitamina E (alfa-tocoferol)	0.57	mg
			Vitamina E, añadida	0	mg

Fuente: Aranaz et al. (2017); USDA (2020).

1.4. Estadísticas de producción y proyección

Entre 2012 - 2013 la superficie mundial de arándanos llegó a las 93 617 hectáreas (has) (Medina & Sánchez, 2014). El 54% de esta superficie se encuentra distribuida en América del Norte (50 055 has), seguido por Sudamérica (17 688 has), que representa el 20% del área plantada en el mundo (Alcalde, 2018). A continuación, se muestra la distribución por zona de la superficie mundial de arándanos.

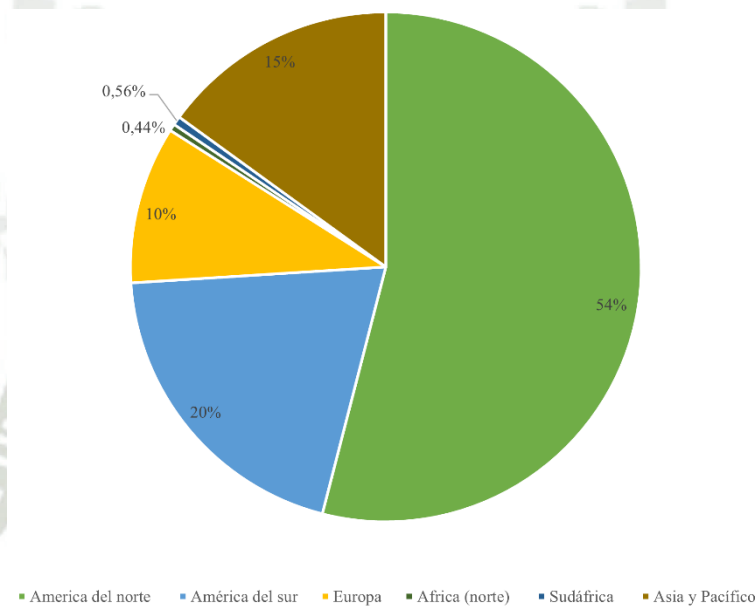


Figura 1. Distribución de la superficie mundial cultivada de arándanos.

Fuente: Adaptado de (Medina & Sánchez, 2014).

En el Perú, en el año 2013 ya se tenían sembradas más de 500 has, donde la costa concentra el 75% del área cultivada, se pronostica que en el 2022 se superen las 5000 has (Medina & Sánchez, 2014).

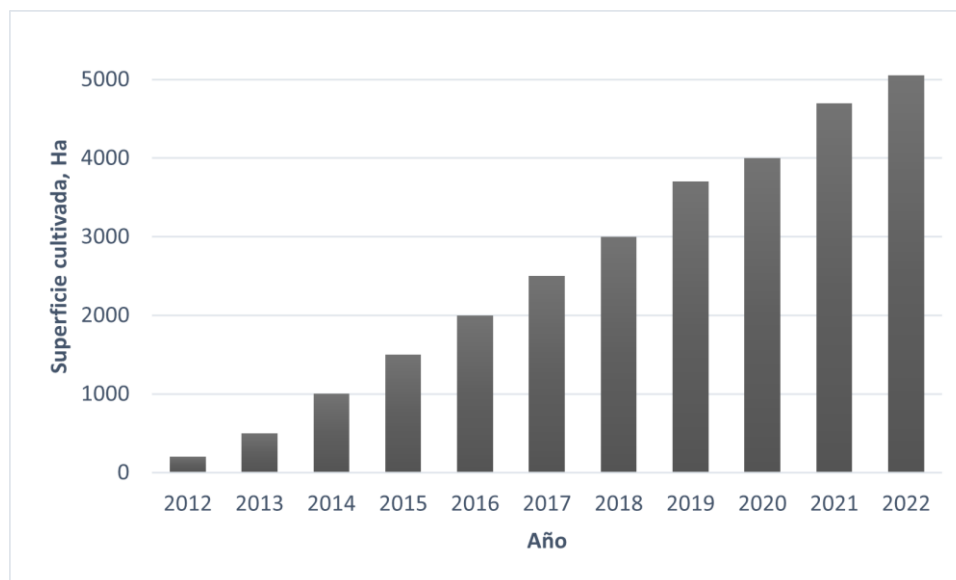


Figura 2. Cultivo de arándanos en Perú Proyección de la Superficie cultivada de Arándanos en el Perú 2012-2022 (Proyectado).

Fuente: Adaptado de (Medina & Sánchez, 2014).

Con relación a las empresas exportadoras, se puede apreciar los reportes estadísticos de la SUNAT, que muestran el número de empresas exportadoras que año tras año se han incrementado (Bonilla & Rivera, 2016). En ese sentido, de 13 empresas exportadoras registradas en el 2013, se pasa a 15 empresas en el 2014 y a 24 empresas en el 2015. Esto refleja un incremento significativo que muestra la existencia de oportunidades que tienen las empresas de poder acceder a este rubro productivo a fin de exportar un producto tan especial, costoso en su desarrollo, pero rentable. Actualmente existen dos grandes empresas tradicionalmente exportadoras de frutas y hortalizas, como son Camposol y TALSA, que representan en promedio el 88% del total exportado por el Perú, el resto corresponde a nuevas empresas exportadoras como Ortifrutal, Blueberries Perú, Hass Perú, Complejo Agroindustrial Beta, Agrícola la Venta, Danper Trujillo. (MINAGRI-DGPA-DEEIA, 2016)

1.5. Bacterias probióticas

Las bacterias más comunes relacionadas con la actividad probiótica son: *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. reuteri*, *L. plantarum*, *L. casei GG*; *Bifidobacterium brevis*, *B. longum*, *B. infantis*, *B. animalis*; *Streptococcus salivaris* subespecie *thermophilus*, y algunas levaduras como

Saccharomyces boulardii (Ljungh & Wadstrom, 2006). Los mecanismos de acción implicados incluyen inducción a pH inferior a 4, inhibición del crecimiento de bacterias patógenas, producción de ácido láctico, disminución de la permeabilidad intestinal (Mangell et al., 2002), aumento en la actividad de la lactasa, efecto competitivo en otras bacterias patógenas, incremento en la producción de los linfocitos T helper, y aumento de la inmunoglobulina A secretora (Tormo Carnicé, 2006). Es importante señalar que no todos los *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son iguales presentando especialidad según cepa y dosis, por lo que las propiedades pueden ser diferentes (Ferrer & Dalmau, 2001).

1.5.1. Genero *Lactobacillus*

Es un género de bacterias Grampositivas, facultativas o microaerófilas, baciliforme, no productora de esporas. Habitan en el cuerpo humano y en el de otros animales; están presentes en el tracto gastrointestinal, sistema urinario y genital. Muchas especies participan en la descomposición de la materia vegetal y animal. (Delgado et al., 2019)

La producción de ácido láctico hace que su ambiente sea ácido, lo cual inhibe el crecimiento de bacterias patógenas. Algunas especies de *Lactobacillus* se usan industrialmente para la producción de yogur, quesos y de otros alimentos fermentados (Figueroa-González et al., 2011).

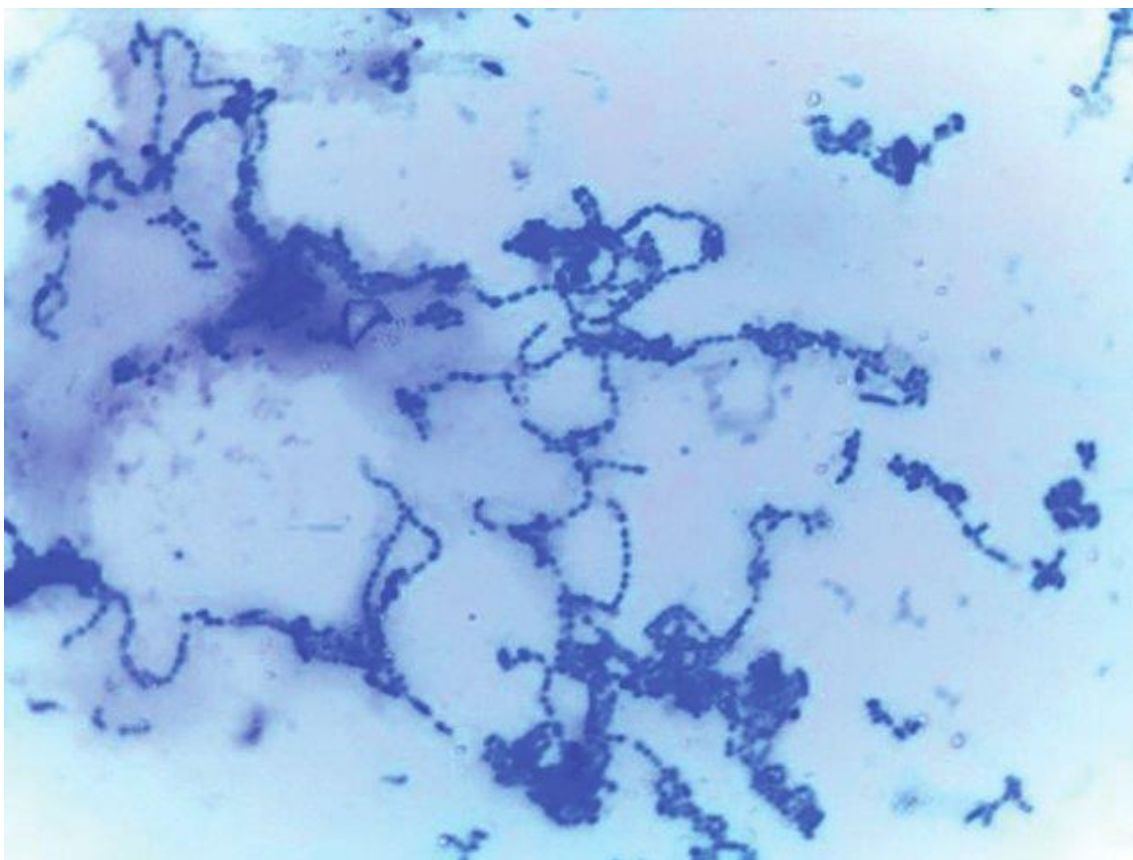


Figura 3. *Lactobacillus bulgaricus* utilizado para la producción casera de yogur.

Fuente: Tomado de Monteiro et al. (2019).

Algunos lactobacilos poseen un metabolismo homofermentativo y son aerotolerantes a pesar de la ausencia de cadena respiratoria. Esta aerotolerancia es dependiente del manganeso y ha sido estudiada en *Lactobacillus plantarum* (Delgado et al., 2019).

1.5.2. *Lactobacillus rhamnosus*.

Lactobacillus rhamnosus es el probiótico más estudiado a nivel científico (Senedese et al., 2015). Pertenece a los organismos mesófilos, pero dependiendo de la cepa, sus cultivos pueden crecer a temperaturas inferiores a 15 °C o superiores a 40 °C; en la Figura 4 se presenta la apariencia macro y microscópica de *L. rhamnosus*. Para crecer, requiere muchas vitaminas, incluido el ácido fólico, la riboflavina, la niacina, el ácido pantoténico y el calcio mineral. (Hill et al., 2018)

El valor de pH inicial óptimo para el crecimiento está entre 4,5 y 6,5. Crece en forma de bastoncillos. La dimensión de las células es de 0,8 a 1,0 μm de ancho y de 2,0 a 4,0 μm de largo (Wood & Holzapfel, 1995). El metabolismo de *L. rhamnosus* es facultativamente heterofermentativo (lactobacilos Grupo 2). Convierte las hexosas en ácido L(+) láctico, según la vía de Embden-Meyerhof, y debido a la aldolasa y la fosfoctolasa también se fermentan las pentosas. El ácido láctico se produce normalmente hasta un 1,5% en el medio de glucosa. (Muñoz Caicedo, 2012)

En ausencia de glucosa, produce ácido láctico, ácido acético, ácido fórmico y etanol (Valik & Lipatkova, 2008). *L. rhamnosus* GG representa una cepa probiótica que se estudió clínicamente y se descubrió que mejora la resistencia natural humana y el sistema digestivo saludable (Hickey, 2005).

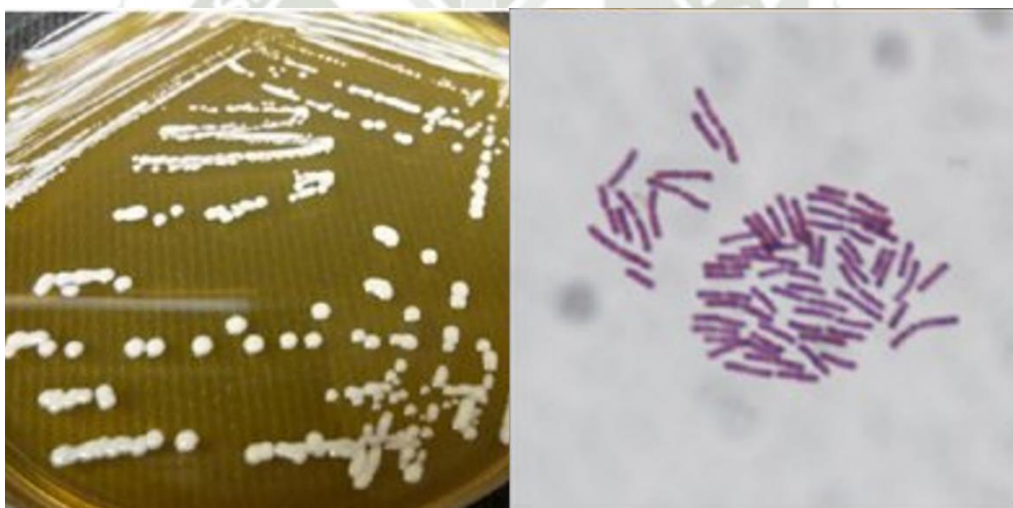


Figura 4. Apariencia macroscópica y microscópica de *Lactobacillus rhamnosus*.

Fuente: Tomado de Boonma et al. (2014).

1.6. Alimentos prebióticos

Algunos componentes presentes de la fibra son denominados prebióticos, son alimenticios no digeribles de los alimentos que afectan de positivamente al huésped, estimulando de forma selectiva el crecimiento y/o la actividad metabólica de algunas cepas de bacterias colónicas (Slavin, 2013). Estos compuestos se caracterizan por ser moléculas de gran tamaño que no pueden ser digeridas por las enzimas digestivas del tracto gastrointestinal alto, alcanzando el intestino

grosso donde son degradados por la microflora bacteriana, principalmente por las Bifidobacterias y Lactobacilos (Hurtado-Romero et al., 2020).

Según Marx et al. (2020) para que un ingrediente alimenticio sea considerado prebiótico debe cumplir con los siguientes criterios listados:

- No debe ser hidrolizado o absorbido en la parte alta del tracto digestivo;
- Debe ser fermentado selectivamente por una o un número limitado de bacterias potencialmente benéficas del colon, por ejemplo, bifidobacterias y lactobacilos;
- Debe ser capaz de alterar la microflora colónica tornándola saludable, por ejemplo reduciendo el número de organismos putrefactivos e incrementado las especies sacarolíticas.

En la actualidad los oligosacáridos más estudiados y reconocidos con actividad prebiótica son los fructanos (Rivera-Quixchan et al., 2018). Este es un término genérico empleado para describir a todos los oligo o polisacáridos de origen vegetal, y se refiere a cualquier carbohidrato el cual una o más uniones fructosil-fructosa predominan dentro de las uniones glucosídicas (Olagnero et al., 2007). La cantidad de fructanos presente en la dieta varía dependiendo de las costumbres alimentarias de la población y de la disponibilidad de alimentos que los contengan. Las fuentes más importantes de fructanos en la dieta son los derivados del trigo, cebollas, ajo, bananas y puerro. (Ashaolu, 2020)

La Inulina es un fructano polidisperso que consiste en una mezcla de oligómeros y polímeros mayores formados por uniones β -(2-1) fructosil-fructosa (Olagnero et al., 2007). El grado de polimerización (GP) proveniente de la achicoria oscila entre 3 y 60, con un valor promedio de aproximadamente 10 (Santana Legorreta et al., 2016). Esta se encuentra en una gran variedad de plantas, pero principalmente en la raíz de la achicoria, puerro, ajo, banana, cebada, trigo, miel, cebolla, espárrago y alcaucil (Marx et al., 2020). También se localiza en las partes aéreas de las gramíneas (cereales, pastos) de las cuales es más difícil extraerla, ya que se encuentra asociada a carbohidratos complejos e insolubles (celulosa, hemicelulosa) y polifenoles (Ashaolu, 2020; Marx et al., 2020).

La inulina puede ser sintetizada a partir de la raíz de la achicoria y desde la sacarosa a través de la acción de la β -fructo-furanosidasa (origen: *Aspergillus Níger*) (Hurtado-Romero et al., 2020).

La inulina posee un sabor neutral suave, es moderadamente soluble en agua (Madrigal & Sangronis, 2007). Tiene diversas aplicaciones en la industria de alimentos, puede ser utilizada como sustituta del azúcar, reemplazante de las grasas, agente texturizante y/o estabilizador de espuma y emulsiones (Madrigal & Sangronis, 2007). Por este motivo son incorporados a los productos lácteos, fermentados, jaleas, postres aireados, mousses, helados y productos de panadería (Arruda et al., 2020). La dosis máxima permitida de inulina es hasta 10 g/día y en dosis múltiples hasta 20 g/día. En dosis mayores a las permitidas puede provocar intolerancias, como efectos osmóticos (diarrea), ruidos intestinales y flatulencia como consecuencia del proceso de fermentación (W. Y. Cheng et al., 2020).

La oligofructosa se obtiene mediante la hidrólisis enzimática parcial de la inulina, está compuesta por cadenas lineares de glucosil-fructosil. El GP oscila entre 2 y 8, con un valor promedio de aproximadamente 4 (Madrigal & Sangronis, 2007). Se encuentra presente en alimentos como cereales, cebolla, ajo, banana y choclo (Arruda et al., 2020; W. Y. Cheng et al., 2020). En combinación con edulcorantes intensos genera un paladar más acabado y un gusto frutal más duradero con menor sabor residual (Salazar, 2017). En la industria se la puede utilizar en yogures con fruta, leches fermentadas, quesos frescos, helados y bebidas lácteas con un posicionamiento de alimentos reducidos en calorías (Hurtado-Romero et al., 2020). La Polidextrosa posee características de fibra dietaria, es un polímero sintético de glucosa con terminales de sorbitol y ácido cítrico (Madrigal & Sangronis, 2007). Es un buen humectante, efectivo para controlar la humedad de los productos. Puede ser utilizado en grandes cantidades sin influir en el sabor del producto final, dado que posee un sabor neutro (Olagnero et al., 2007). Puede ser utilizada como fuente de fibra o como prebiótico con efectos benéficos para la flora intestinal (Costa et al., 2019). Los galactooligosacáridos pertenecen a la serie rafinosa y están formados por moléculas de galactosa (Naranjo & Rodríguez, 2017). Los más frecuentes en el mundo vegetal son la rafinosa, estaquiosa y verbascosa de 3 a 5 galactosas respectivamente (Salazar, 2017). Se encuentran presentes principalmente en las legumbres (da Silva et al., 2020). La industria alimentaria utiliza estas sustancias como espesantes, ya que incorporan en su estructura agua otorgando a la preparación una consistencia homogénea que posibilita la sustitución de grasas en lácteos, crema de leche, yogures, etc. (Marx et al., 2020).

1.6.1. Aspectos saludables de los prebióticos

El principal sustrato para las bacterias anaeróbicas del colon son los carbohidratos de la dieta que escapan a la digestión en el tracto gastrointestinal alto (Olagnero et al., 2007). El aumento de la concentración de lactato y acetato disminuye el pH intraluminal, inhibiendo el crecimiento de *E. coli*, *Clostridium* y otras bacterias patógenas pertenecientes a los géneros *Listeria*, *Shigella*, o *Salmonella*; pero aumenta el recuento de *Lactobacillus* y Bifidobacterias (Guanga & Geovanna, 2018). Grandes cantidades de ácidos grasos de cadena corta (acético, propiónico y butírico) incrementan la absorción del calcio y magnesio a través del aumento de la solubilización de sales de calcio (Hurtado-Romero et al., 2020). El butirato es fuente de energía del epitelio colónico, ejerce efectos funcionales, como el aumento de la irrigación sanguínea, reduce el crecimiento de células tumorales epiteliales de origen colónico, induce a la diferenciación de células y la apoptosis (Marx et al., 2020). La administración de inulina y/u oligofruktosa (5-15 g durante 15 a 20 días) modifica la flora intestinal estimulando el crecimiento de las bifidobacterias, y junto con esta variación disminuyen los recuentos de bacteroides, fusobacterias y clostridios (Olagnero et al., 2007). Todos estos efectos persisten mientras se administra este tipo de fructanos (4-5 g/día), y su actividad comienza a decrecer progresivamente transcurridas dos semanas de su interrupción, lo cual avala que estos cambios no perduran en el tiempo (Orezzoli Llorente, 2014). Mientras más bajo es el recuento inicial de bifidobacterias en las heces, mayor es la estimulación ejercida por los fructanos sobre este tipo de bacterias, esto también se traduce en la inexistencia de una relación lineal de dosis/efecto (Neri-Numa et al., 2020). Muchas especies de lactobacilos y bifidobacterias son capaces de excretar naturalmente antibióticos, los cuales poseen un amplio espectro de actividades (Curbelo et al., 2005). Algunas especies de bifidobacterias ejercen efecto antibacteriano en varios patógenos intestinales gram-negativos y gram-positivos incluidos *Campilobacter*, *Escherichia Coli*, y *Salmonella* (Charteris et al., 1998). Por otra parte, se ha evidenciado que la fibra soluble interactúa con los ácidos biliares incrementando la excreción fecal, lo cual conlleva a disminuir la concentración plasmática del colesterol LDL (Arruda et al., 2020).

1.6.2. Rutas metabólicas involucradas en la capacidad prebiótica.

Los prebióticos se han definido como “ingredientes alimentarios no digeribles que afectan beneficiosamente al huésped al estimular selectivamente el crecimiento y/o la actividad de las

bacterias” (Figuroa-González et al., 2011); sin embargo, en 2016, la definición fue modificada por la Asociación Científica Internacional de Probióticos y Prebióticos (ISAPP) como “un sustrato que es utilizado selectivamente por los microorganismos hospedadores que confieren beneficios para la salud” (Slavin, 2013). Los prebióticos se pueden clasificar como fibras; los compuestos prebióticos incluyen oligosacáridos, fructooligosacáridos (FOS), galactooligosacáridos (GOS), β -glucanos e inulina (Olagnero et al., 2007). Éstos estimulan selectivamente la proliferación de *Lactobacillus spp.* y *Bifidobacterium spp.*, atenúan el crecimiento de especies patógenas, disminuyen el pH intestinal, son resistentes a la hidrólisis ya las enzimas gastrointestinales, y no se absorben en el tracto gastrointestinal superior (Anadón et al., 2021).

El estrés oxidativo se refiere a niveles intracelulares elevados de radicales de oxígeno que causan daño a los lípidos, las proteínas y el ADN, las especies reactivas de oxígeno (ROS), incluidos los radicales anión superóxido, los radicales hidroxilo y el peróxido de hidrógeno, son uno de los radicales libres de oxígeno altamente activos (Y. Wang et al., 2017). Durante la evolución, la mayoría de los organismos vivos poseen defensas enzimáticas (superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR)), defensas antioxidantes no enzimáticas (glutatión, tioredoxina, vitamina C, vitamina E) y sistemas de reparación para protegerlos contra el estrés oxidativo (Mishra et al., 2015). Sin embargo, estos sistemas antioxidantes nativos generalmente no son suficientes para evitar que los organismos vivos sufran daño oxidativo. Los aditivos antioxidantes que utilizan sustancias que retrasan o previenen la oxidación de los sustratos celulares han demostrado capacidad para proteger al organismo humano frente al daño oxidativo. Aunque varios antioxidantes sintéticos, incluidos el hidroxianisol butilado y el hidroxitolueno butilado, se han utilizado ampliamente para retardar la oxidación de lípidos, recientemente se ha cuestionado su seguridad debido al daño hepático y la carcinogenicidad (Luo & Fang, 2008). Por lo tanto, en los últimos años, la búsqueda de antioxidantes más seguros y naturales a partir de recursos biológicos para reemplazar los antioxidantes sintéticos ha recibido mucha atención.

Los probióticos pueden producir varios metabolitos con actividad antioxidante, como el glutatión (GSH), el butirato y el folato (Y. Wang et al., 2017).

Los probióticos son una de las fuentes naturales de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. Estos provienen de células probióticas intactas, extractos libres de células e intracelulares,

metabolitos intracelulares y extracelulares o componentes de la pared celular como exopolisacáridos (EPS) y proteínas (Mounir et al., 2022).

Un radical libre puede definirse como cualquier especie molecular capaz de existir de forma independiente que contiene un electrón desapareado en un orbital atómico. La presencia de un electrón desapareado da como resultado ciertas propiedades comunes que comparten la mayoría de los radicales. Muchos radicales son inestables y altamente reactivos. Pueden donar un electrón o aceptar un electrón de otras moléculas, por lo que se comportan como oxidantes o reductores. (Lobo et al., 2010)

Los radicales libres que contienen oxígeno más importantes en muchos estados patológicos son el radical hidroxilo, el radical anión superóxido, el peróxido de hidrógeno, el oxígeno singulete, el hipoclorito, el radical óxido nítrico y el radical peroxinitrito. Estas son especies altamente reactivas, capaces en el núcleo y en las membranas de las células de dañar moléculas biológicamente relevantes como el ADN, las proteínas, los carbohidratos y los lípidos. (Young & Woodside, 2001)

Los radicales libres atacan macromoléculas importantes que conducen al daño celular y la alteración homeostática. Los objetivos de los radicales libres incluyen todo tipo de moléculas en el cuerpo. Entre ellos, los lípidos, los ácidos nucleicos y las proteínas son los principales objetivos. A continuación, en la Figura 5 se presenta la interacción entre los radicales libres y los antioxidantes.

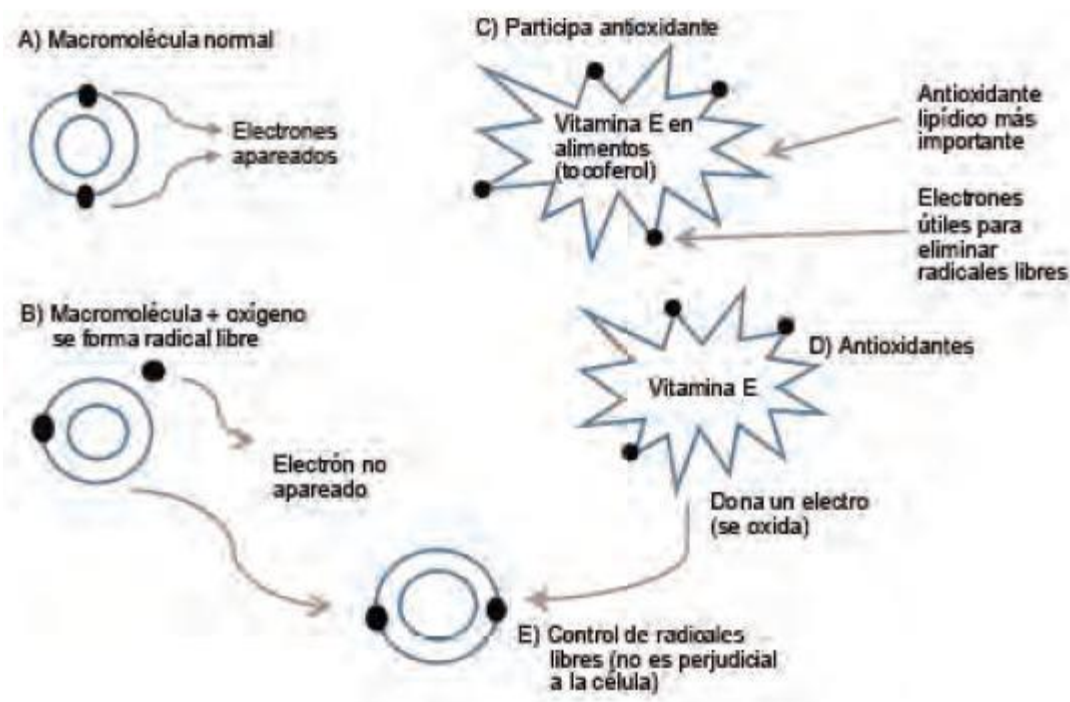


Figura 5. Interacción entre radicales libres y antioxidantes.

Fuente: Tomado de Coronado H. et al., (2015b).

2. Antecedentes

2.1. Antecedentes internacionales

Zhou et al. (2020), llevaron a cabo la investigación de la composición, la actividad antioxidante de las antocianinas de arándano y sus efectos sobre la microbiota intestinal humana. Los resultados demostraron que las antocianinas de arándano tienen un impacto en la diversidad microbiana. Podrían aumentar la abundancia relativa de algunas comunidades determinadas, incluida *Bifidobacterium spp.* Los hallazgos de los autores sugieren que el consumo de arándanos y extractos de arándanos podría ejercer una actividad prebiótica que se asocia con beneficios para la salud.

Jiao et al. (2019), en su artículo titulado “ Blueberry polyphenols extract as a potential prebiotic with anti-obesity effects on C57BL/6 J mice by modulating the gut microbiota” precisan en su

investigación que los arándanos son una fuente de polifenoles y que este compuesto a su vez regula la microbiota intestinal y se les relaciona también con la mejora en ratones con obesidad inducida.

Yang et al. (2014), indican que las bayas como el arándano, la mora y la frambuesa poseen varias actividades biológicas que incluyen efectos antimicrobianos y nutricionales. En este estudio, se evaluaron las actividades antimicrobianas de algunas bayas contra patógenos transmitidos por los alimentos, incluidos *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium* y también se investigó la leche desnatada y leche entera suplementada con jugo de mora al 10% en diferentes momentos (0, 24, 48 y 72 h). También se investigaron los efectos del jugo de mora sobre el crecimiento de *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus rhamnosus*. Como resultados más importantes se tiene que *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* y *E. coli* O157: H7 fueron inhibidos significativamente por el jugo de mora tanto en leche como en caldo. También reportaron que los crecimientos de cepas de *Lactobacillus* fueron estimulados significativamente, por el jugo de mora tanto en la leche como en el caldo MRS. Estos datos demuestran claramente que el jugo de mora diluido se puede utilizar como conservante en el procesamiento de alimentos y preventivo en infecciones transmitidas por alimentos como antimicrobiano natural.

Castagnini (2014), Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, en su tesis doctoral titulada: “Estudio del proceso de obtención de zumo de arándanos y su utilización como ingrediente para la obtención de un alimento funcional por impregnación a vacío”. Determina las condiciones experimentales para obtener jugo de arándanos de elevada calidad, a la vez, prueba diferentes tecnologías para la mejora de este jugo. La parte más relevante es el uso de *Lactobacillus* para potencializar la funcionalidad del jugo. Donde obtiene resultados muy interesantes, principalmente en la evaluación de la viabilidad de las bacterias a diferentes pH.

(Chaccha & Granados, 2014), Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, en su tesis titulada “Elaboración de bebida de arándano” *Vaccinium corymbosum* y la determinación de su actividad antioxidante”, obtuvieron una bebida de arándano con alta capacidad antioxidante. Para su elaboración se utilizó el fruto de la variedad Misty cultivado en Huaura – Lima, se determinó su actividad antioxidante, se cuantificó los polifenoles y antocianinas. Se emplearon los métodos oficiales de la AOAC para determinar el comportamiento de la bebida a lo largo del tiempo, bajo condiciones de almacenamiento (temperatura ambiente y de refrigeración) durante 60 días, y se

evaluó la actividad antioxidante. Se obtuvieron los siguientes resultados en la bebida: 84,26% de inhibición de radicales libres, 1,656 mg EAG/mL y 332,029 mg de cianidina 3-glucósido/L.

Miller et al. (2019), Technical University of Munich, Munich 2019, en su artículo científico titulado: “*Bioactive compounds of strawberry and blueberry and their potential health effects based on human intervention studies: A brief overview*” – “Compuestos bioactivos de fresas y arándanos y sus posibles efectos en la salud basados en estudios de intervención humana: Una breve descripción”, demuestran que las bayas se caracterizan por sus compuestos altamente nutritivos, que incluyen minerales, vitaminas, ácidos grasos y dietéticos fibra, así como su alto contenido y amplia diversidad de compuestos bioactivos, como los compuestos fenólicos y ácidos orgánicos. En el artículo científico se demuestra la capacidad de los compuestos está asociado con efectos protectores contra enfermedades crónicas, como enfermedades cardiovasculares, cáncer, Alzheimer y otros trastornos. En este documento se revisaron 16 estudios de intervención humana que investigan los efectos beneficiosos para la salud de la fresa dietética o consumo de arándanos en inflamación, enfermedad cardiovascular o función cognitiva y salud mental.

Murthy et al. (2017) en su artículo titulado: “*Fermentative preparation of functional drink from Punica granatum using lactic acid bacteria and exploring its anti-tumor potential*” – “Preparación fermentativa de bebida funcional de *Punica granatum* utilizando bacterias del ácido láctico y explorando su potencial antitumoral”. Demuestran mediante experimentos el potencial bioactivo en este caso antitumoral de una bebida a base de granada con bacterias acidolácticas, el panorama que da este reciente artículo es muy importante ya que otorga viabilidad a la temática principal del presente plan de tesis, que es utilizar bacterias probióticas para mejorar las propiedades alimenticias de la bebida.

2.2. Antecedentes Nacionales

Hurtado-Romero et al. (2020) y Neri-Numa et al. (2020), en sus recientes revisiones tituladas “Innovative technologies for the production of food ingredients with prebiotic potential: Modifications, applications, and validation methods” y “Natural prebiotic carbohydrates, carotenoids and flavonoids as ingredients in food systems” mencionan que los arándanos por ser fuente de antocianinas y polifenoles tienen un alto potencial para ser considerados como óptimos probióticos y que deben ser incorporados en la dieta humana para mejorar la salud intestinal.

Curo Díaz & Montenegro Deza (2018), Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, en su tesis titulada: “Evaluación Físicoquímica y Sensorial de una Bebida Funcional a Base de Betarraga (*Beta vulgaris*) y Arándanos (*Vaccinium myrtillus*)”. Elaboraron una bebida funcional a partir de arándano y betarraga, ambos destacados por sus propiedades antioxidantes. Se ensayó la combinación con diferentes concentraciones de la materia prima. Demostrándose así alta capacidad antioxidante del jugo de arándanos el tratamiento más activo $49.76 \pm 0.578 \mu\text{M}$ trolox/ml fue el que contenía mayor porcentaje de arándano y de antocianinas. El análisis sensorial se llevó a cabo con 26 panelistas no entrenados, para así, evaluar el grado de aceptación de cada tratamiento. La tesis anterior ofrece valiosa información en métodos de elaboración de jugo de arándanos y principalmente en su alta capacidad antioxidante.

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

Comparar el efecto prebiótico de extractos de arándano, glucosa e inulina en el desarrollo de *Lactobacillus rhamnosus* en condiciones controladas de laboratorio.

3.2. Objetivos específicos.

- Generar extractos de arándano mediante métodos de extracción alcohólica y decocción.
- Determinar la capacidad antioxidante, concentración de fenoles totales y antocianinas monoméricas en cada extracto obtenido.
- Comparar el efecto prebiótico con los extractos de arándanos con la glucosa como control negativo e inulina como control positivo.

4. Hipótesis

Se sabe que los arándanos poseen compuestos altamente nutritivos, que incluyen minerales, vitaminas, ácidos grasos y fibra, y amplia diversidad de compuestos bioactivos, como los compuestos fenólicos y ácidos orgánicos, por otra parte las bacterias probióticas son ampliamente usadas para enriquecer alimentos y otorgar más propiedades beneficiosas para la salud, por lo tanto, es posible generar extractos de arándanos con dos métodos diferentes y posteriormente comparar su efecto prebiótico en el desarrollo de *L. rhamnosus* con un control negativo de glucosa y control positivo de inulina.





CAPÍTULO III: PLANTEAMIENTO OPERACIONAL

1. Ubicación espacial y temporal

La investigación se desarrolló en los laboratorios de la Universidad Católica de Santa María, específicamente en el laboratorio H-205 y H - 405, algunos experimentos fueron ejecutados en ambientes destinados a labores cotidianas de manipulación y preparado de alimentos. La presente tesis se desarrolló entre los meses de setiembre y diciembre de 2021.

2. Metodología

2.1. Materias primas:

- Arándanos (*vaccinium myrtillus*): Frutos con características organolépticas aceptables, maduros, listos para el consumo, variedad (*O Neil*) de la localidad de Yuramayo, Arequipa.

2.2. Insumos

- Inulina grado alimentario – Sigma Aldrich
- Glucosa químicamente pura
- Agua destilada

2.3. Material biológico

Se utilizaron cepas puras de *Lactobacillus rhamnosus* (Lyofast CRL 1505) de la compañía biotecnológica SACCO. La ficha técnica de producto se encuentra en el Anexo 1.

2.4. Equipos, materiales de laboratorio y reactivos

Equipos

- Balanza analítica (5 decimales), marca OHAUS G-9120
- Campana de extracción (Marca Nacional)
- Espectrofotómetro UV/VIS, marca Thermoscientific modelo Genesys 50
- Refrigeradora de laboratorio marca BOSH (150 L)
- Incubadora de microorganismos marca Eppendorf
- Sonda de ultrasonido Ningbo Sjian Equipment

Materiales de laboratorio

- Fiolas (5, 10, 25, 50 100 y 250 ml)
- Micropipetas de 0-100 μ L y 100-1000 μ L
- Papel aluminio
- Papel filtro lento y rápido (Merk Milipore)
- Pipetas de 0.5, 1, 2, 5 y 10 ml
- Probetas de 10 y 100 ml
- Tubos de ensayo
- Vasos de precipitado de 10, 50, 100, 250 y 500 ml 28
- Picetas
- Cubetas de cuarzo 1cm
- Baguetas
- Pipetas 1, 2, 5 y 10 ml
- Capilares de vidrio
- Erlenmeyer 100 ml
- Bureta 25 ml
- Cernidor de acero inoxidable

Reactivos

- Etanol 70 y 96 %
- Agua destilada o desionizada
- Ácido sulfúrico concentrado
- Ácido clorhídrico 37 %
- Hidróxido de sodio (perlas) q.p
- Inulina grado analítico Sigma Aldrich ® (Figura 17 del Anexo 4)
- Caldo Man Rogosa and Sharpe
- Agar Man Rogosa and Sharpe
- Acetato de amonio
- Neocuproína
- Cloruro de cobre dihidratado

- Ácido ascórbico
- Ácido fosfotúngstico
- Ácido fosfomolibdico
- Ácido gálico
- Carbonato de sodio

2.5. Operacionalización de variables

Tabla 3. Cuadro de variables generales.

Experimento	Variables	
	Independientes	Dependiente (Indicadores)
1	<p>Metodología de extracción</p> <ul style="list-style-type: none"> • Temperatura de agua • Porcentaje de etanol • Frecuencia de ultrasonido 	<ul style="list-style-type: none"> • Capacidad antioxidante del extracto
2	<ul style="list-style-type: none"> • Extracto 1 • Extracto 2 • Extracto 3 • Inulina • Glucosa 	<ul style="list-style-type: none"> • Población microbiana • Velocidad específica de crecimiento microbiano

Fuente: Elaboración propia.

2.6. Métodos de análisis

2.6.1. Generación de extractos de arándano por decocción, extracción alcohólica y ultrasonido.

Obtención de extractos de arándano por decocción.

Se pesó 50 g de arándanos frescos, posteriormente se realizó una homogenización en un mortero, después se adicionaron 200 mL de agua destilada a dos diferentes temperaturas 60 °C y temperatura de ebullición (92,5 °C), luego se filtró utilizando un cernidor de acero inoxidable de >1 mm de diámetro. El filtrado se depositó en una botella esterilizada de vidrio y pasó a refrigeración a $4 \pm 0,5$ °C.

Obtención de extractos alcohólicos de arándano.

Se pesó cuidadosamente 50 g de arándanos frescos, posteriormente se realizó una homogenización en un mortero de piedra, después se adicionaron 200 mL de etanol al 70 % y al 96 % a temperatura ambiente (20 ± 1), luego se filtró utilizando un cernidor de acero inoxidable de >1 mm de diámetro. Finalmente, se procedió a evaporar el exceso de etanol de ambos extractos controlando la temperatura para que no supere los $50 \text{ }^\circ\text{C}$ para evitar daños a los componentes de interés (Faria et al., 2005). El extracto se depositó en una botella esterilizada de vidrio y pasó a refrigeración a $4 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$.

Obtención de extractos de arándano por ultrasonido

Se procedió a pesar cuidadosamente 50 g de arándanos frescos, posteriormente se realizó una homogenización en un mortero de piedra, después se adicionaron 200 mL agua destilada a temperatura ambiente, luego se sometió a pulsos ultrasónicos a una potencia de 325 y 650 W en un equipo de sonda de ultrasonido marca Ningbo Sjilan Equipment. Se programó pulsos de 5 segundos con pausas de 15 segundos, por un total de 60 minutos. Se programó el equipo para que alerte y pause el proceso al momento de superar los $50 \text{ }^\circ\text{C}$. El extracto se depositó en una botella esterilizada de vidrio y pasó a refrigeración a $4 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$. Ver la Figura 18 del Anexo 4.

3. Estadística.

CuPRAC.

Tabla 13. Análisis de Varianza – Conc. Ac. Ascórbico vs. Tipo de extracto.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tipo de Extracto	6	0.072673	0.012112	1352.96	0.000
Error	14	0.000125	0.000009		
Total	20	0.072799			

Tabla 14. Agrupación según el método de Tukey y una confianza de 95% (AA).

Tipo de Extracto	N	Media	Agrupación
E4	3	1.95367	A
E1	3	1.91733	B
E3	3	1.90200	C
E5	3	1.82167	D

E2	3	1.81467	D
E6	3	1.80200	E
m1	3	1.80067	E

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

FOLIN CIUCALTEAU

Tabla 15. Análisis de Varianza – Conc. Ac. Gálico vs. Tipo de extracto.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tipo de Extracto	6	0.081367	0.013561	2757.97	0.000
Error	14	0.000069	0.000005		
Total	20	0.081436			

Tabla 16. Agrupación según el método de Tukey y una confianza de 95% (FC).

Tipo de Extracto	N	Media	Agrupación			
E4	3	0.49598	A			
E1	3	0.40399	B			
E6	3	0.36158	C			
E3	3	0.33851	D			
E5	3	0.332273		E		
E2	3	0.31045		F		
m1	3	0.30421			G	

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ANTOCIANINAS MONOMÉRICAS

Tabla 17. Análisis de Varianza – Conc. C3G vs. Tipo de extracto.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tipo de Extracto	6	0.005329	0.000888	22.40	0.000
Error	14	0.000555	0.000040		
Total	20	0.005884			

Tabla 18. Agrupación según el método de Tukey y una confianza de 95% (AM)

Tipo de Extracto	N	Media	Agrupación			
E4	3	0.26000	A			
E6	3	0.245500	A	B		
E5	3	0.238000		B		
E1	3	0.23300		B	C	
E3	3	0.22800		B	C	
E2	3	0.21600			C	D
m1	3	0.209500				D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Tipos de extracto Vs. UFC/mL.

Tabla 19. Análisis de Varianza – UFC/mL vs. Tipo de extracto.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tipo de extracto	8	1.42159E+12	1.77698E+11	48.81	0.000
Error	18	65533333333	3640740741		
Total	26	1.48712E+12			

Tabla 20. Agrupación según el método de Tukey y una confianza de 95% (UFC).

C	N	Media	Agrupación				
I	3	1170000	A				
E4	3	1026667	A	B			
E6	3	986667		B			
E3	3	880000		B	C		
E1	3	753333			C	D	
E5	3	633333				D	E
G	3	540000					E
E2	3	533333					E
C	3	520000					E

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Anexo 4

2.6.2. Determinación de la capacidad antioxidante mediante el método CUPRAC.

Se prepararon reactivos como el acetato de amonio solución Buffer 1 M a pH 7 (19,2706 g en 250 ml), neocuproína solución 7.5×10^{-3} M en etanol (39.04 mg en 25 ml), solución cloruro de cobre di hidratado 1.2×10^{-2} M en Agua (403,35 mg en 250 ml) y ácido Ascórbico: Stock 2.0×10^{-4} M en Etanol (8.8 mg en 250 ml).

Posteriormente se elaboró una recta de calibración, utilizando como componente antioxidante el ácido ascórbico en 6 tubos de ensayo donde un tubo fue el blanco de la curva y los otros 5 contuvieron las diferentes concentraciones de ácido ascórbico. El procedimiento se resume en la Tabla 4. Se prepararon las concentraciones finales de 0.01, 0.02, 0.04, 0.06 y 0.08 mM de ácido ascórbico.

Finalmente, los tubos se agitaron cuidadosamente y se dejaron en reposo por 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad, pasado este tiempo se realizó la lectura por espectrofotometría a 450 nm (Chávez et al., 2011).

Tabla 4. Procedimiento para obtener la recta de calibración del ácido ascórbico como componente antioxidante.

Reactivo	blanco	Est* 1	Est 2	Est 3	Est 4	Est 5
Buffer acetato, mL	1	1	1	1	1	1
Sol. Neocuproína, mL	1	1	1	1	1	1
Sol. CuCl ₂ , mL	1	1	1	1	1	1
Sol. Ácido ascórbico, mL	-	0.25	0.5	1.0	1.5	2
Etanol, mL	2	1.75	1.5	1.0	0.5	-
Concentración, mM	-	0.01	0.02	0.04	0.06	0.08

*Estándar.

Fuente: Adaptado de Mixcan (2015).

2.6.3. Determinación de compuestos fenólicos totales por el método Folin-Ciocalteu

El método de Folin- Ciocalteu, adaptado por Singleton et al. (1999) consiste en que los compuestos fenólicos (CF), presentes en la muestra se oxidan por acción del reactivo de Folin (mezcla de ácido fosfotúngstico y ácido fosfomolibdico), el reactivo de Folin en cambio se reduce por acción de los fenoles, en una mezcla de óxidos azules de tungsteno y de molibdeno. La oxidación de los fenoles, presentes en la muestra, causa la aparición de una coloración azul que presenta un máximo de absorción a 755 nm, esta se cuantifica por espectrofotometría con base a una curva patrón de ácido gálico (Prior et al., 2005).

Preparación de la curva estándar se siguió la metodología realizada por Mixcan (2015), disolviendo 5 mg de ácido gálico en 10 ml de etanol, el ácido gálico actuó como estándar, el carbonato de sodio se trabajó al 20 % y el reactivo de Folin se llevó a concentración de 1 N, se trabajó con fioles de 25 ml donde se preparó concentraciones de ácido gálico de 2 a 10 mg/L de concentración, donde se usó 1 ml de Folin, 2.1 ml de carbonato y se enrasaron con agua destilada hasta 5 ml, a continuación se leyeron los estándares a 725 nm en el espectrofotómetro.

Para obtener cuantitativamente los fenoles totales en cada una de las muestras se siguió la metodología realizada por Mixcan (2015), se llevaron las muestras a tubos de ensayo: 200 µl de la muestra concentrada o diluida según sea el caso, 300 µl de Folin al 1N y 2500 µl de Carbonato de

sodio al 20%, las muestras se dejaron reposar por 15 minutos y se leyeron a 725 nm. El contenido de compuestos fenólicos totales se expresó en mg de ácido gálico/g de muestra fresca utilizada.

2.6.4. Determinación de antocianinas

Extracción de antocianinas.

Las muestras (extractos y arándano) fueron homogenizados en un mortero, luego, 4 g de homogenizado fueron contactados con 40 mL de disolvente etanol: HCl 0,1 M (85:15 %, v:v) y se sonó durante 10 minutos. Después se centrifugó y se recogió el sobrenadante y se usó para la determinación de antocianinas (Tonutare et al., 2014a).

Determinación de antocianinas totales por método espectrofotométrico de pH diferencial. Las antocianinas totales se determinaron de acuerdo con el método espectrofotométrico diferencial de pH (G. W. Cheng & Breen, 1991). Se diluyeron 3 ml de extracto en 5 ml de dos tampones diferentes; cloruro de potasio 0,025 M, pH = 1,0; y acetato de sodio 0,4 M, pH = 4,5, respectivamente. Después de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente, la absorción (A) se midió a = 510 y 700 nm. Para el cálculo de las antocianinas totales como Cianidina-3-glucosido (C3G), el coeficiente de absorción molar (ϵ) tiene un valor de 26900 M⁻¹cm⁻¹ y peso molecular 449 g/mol (Tonutare et al., 2014b). Los resultados se calcularon de manera similar a Giusti & Wrolstad (2001) utilizando la Ecuación 1 y Ecuación 2 :

$$Abs T = (Abs_{510} - Abs_{700})_{pH 1,0} - (Abs_{510} - Abs_{700})_{pH 4,5} \quad \text{Ecuación 1}$$

El contenido de antocianinas totales (AT) se calculó utilizando la Ecuación 2 :

$$AT = \frac{(Asp \times M \times FD \times 1000)}{(\epsilon \times b)} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde FD es el factor de dilución, b es el paso óptico de la cubeta (1 cm). El contenido de antocianinas totales se expresó en mg de antocianinas 100 g de peso fresco o 100 mL de extracto (según corresponda).

2.6.5. Estudio cinético y poblacional de bacterias lácticas (*L. rhamnosus*).

Se montaron sistemas por triplicado para evaluar el efecto probiótico de los extractos sobre el crecimiento de *Lactobacillus rhamnosus*. Cada extracto (E1 – E6) obtenido fue agregado al caldo de cultivo MRS, contemplando una concentración de 10 mL de extracto/L de caldo MRS, adicionalmente se incorporó un control que solo contenía caldo MRS, un control positivo al cual se le agregó el conocido prebiótico inulina (Cardarelli et al., 2008a) y otro con glucosa como control (Coman et al., 2018). Las condiciones de trabajo de los 9 pequeños biorreactores que se montaron fueron las que se detallan en la Tabla 5. La temperatura de cultivo fue de 30 °C. El crecimiento microbiano se determinó cada 24 h durante 7 días.

Tabla 5. Condiciones de trabajo de los sistemas (biorreactores) utilizados.

Sistema	Propiedades				
	Extracto	Glucosa, g	Inulina, g	Inóculo, µL	MRS, mL
E1	1 mL del Extracto 1	-	-	100	99
E2	1 mL del Extracto 2	-	-	100	99
E3	1 mL del Extracto 3	-	-	100	99
E4	1 mL del Extracto 4	-	-	100	99
E5	1 mL del Extracto 5	-	-	100	99
E6	1 mL del Extracto 6	-	-	100	99
G	-	1	-	100	99
I	-	-	1	100	99
Control	-	-	-	100	99

Fuente: Elaboración propia.

Cinética de crecimiento microbiano.

La investigación de la cinética de crecimiento de cada cultivo se realizó usando una fermentación de caldo de *Man, Rogosa and Sharpe* (MRS) específico para lactobacillus (Coman et al., 2018), se determinó la velocidad de crecimiento específica (μ) con la Ecuación 3:

$$\mu = \frac{(DO_{560\ 2} - DO_{560\ 1})}{(t_2 - t_1)} \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde DO_2 y DO_1 son las densidades ópticas en los tiempos t_1 y t_2 .

El tiempo medio de duplicación (T_d) se calculó como indica la Ecuación 4

$$T_d = \frac{\ln 2}{\mu} \quad \text{Ecuación 4}$$

Determinación de densidad óptica y pH.

La densidad óptica (DO) de cada cultivo se determinó utilizando un espectrofotómetro UV / visible a $\lambda = 560$ nm (Vega et al., 2017), mientras que el pH se determinó con un potenciómetro marca HANNA 3510 por triplicado (Coman et al., 2018).

Determinación de la viabilidad de las bacterias probióticas.

La viabilidad de las bacterias probióticas se determinó mediante el método de placa estándar y se expresó como UFC/mL. Para cada muestra, se tomó 100 μ l y se diluyó en serie en solución salina. Se utilizaron diluciones seriadas de diez veces para el recuento de bacterias mediante la técnica de vertido en placa en agar MRS, después de la incubación aeróbica a 30 ° C durante 72 h (Coman et al., 2018).

CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIONES



1. Determinación de capacidad antioxidante, fenoles totales y antocianinas del arándano.

Se hizo la caracterización de los arándanos utilizados a través de un extracto acuoso simple como se detalla más adelante la codificación empleada para esta unidad experimental es “m1” y se puede ver en la Tabla 10, Tabla 11 y Tabla 12.

2. Generación de extractos de arándano por decocción, extracción alcohólica y ultrasonido.

Se obtuvieron un total de 6 extractos utilizando los métodos listados en el capítulo anterior. La codificación de los extractos y resumen de procedimientos ejecutados se detallan a continuación en la Tabla 6. La apariencia de los extractos se puede apreciar en la Figura 18 del Anexo 4.

Tabla 6. Codificación y detalles de los métodos de obtención de extractos de arándanos.

Código	Tipo de extracción	Condición
E1	Decocción	Agua destilada a 60 °C
E2		Agua destilada a 92,5 °C
E3	Extracción etanólica	Etanol al 70 %
E4		Etanol al 96 %
E5	Extracción por ultrasonido	Potencia de ultrasonido 325 W
E6		Potencia de ultrasonido 650 W
m1	Ninguna	Agua destilada a 20 °C

Fuente: Elaboración propia.

3. Capacidad antioxidante por el método CUPRAC de los extractos

Los valores de absorbancia a 450 nm para la construcción de la recta de calibración se obtuvieron por triplicado y los datos se encuentran plasmados en la Tabla 7.

Tabla 7. Lecturas de absorbancia a 450 nm de las concentraciones estándar para método CUPRAC.

Conc. Ác. Ascórbico, mM	Lectura 1	Lectura 2	Lectura 3	Promedio
0,01	0,275	0,275	0,275	0,275
0,02	0,419	0,419	0,418	0,419
0,04	0,599	0,599	0,598	0,599
0,06	0,752	0,752	0,752	0,752
0,08	0,984	0,984	0,984	0,984

Fuente: Elaboración propia.

Utilizando los promedios de las tres replicas mostrados en la Tabla 7 y los valores de concentración conocida de ácido ascórbico se elaboró la siguiente recta de calibración.

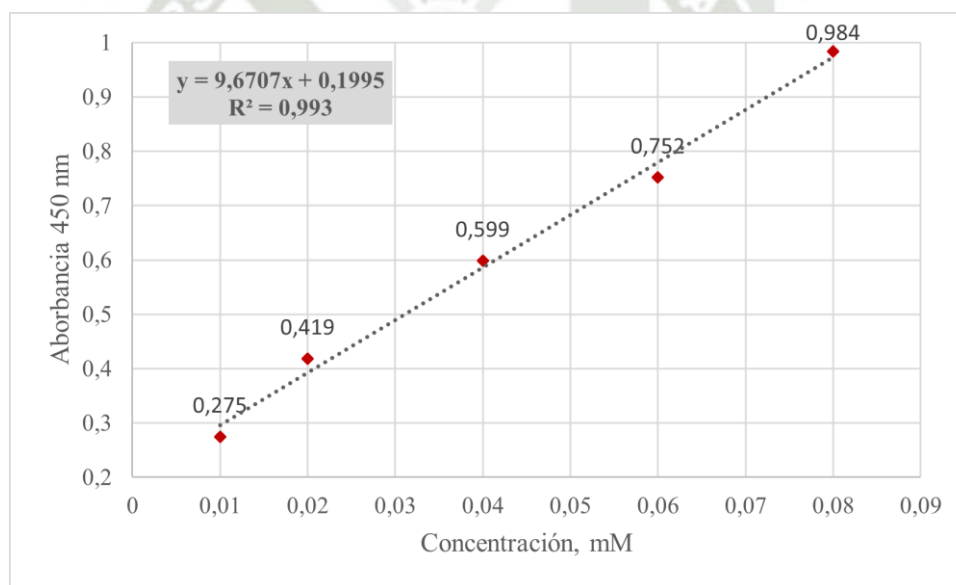


Figura 6. Recta de calibración ácido ascórbico.

Fuente: Elaboración propia.

Se procedió a graficar la absorbancia versus la concentración, posteriormente se ajustó la línea de tendencia a un modelo lineal debido a que con este modelo se obtuvo un coeficiente de correlación R^2 : 0,993. La curva de calibración y su respectiva ecuación se presentan en la Figura 6. Con la ecuación de esta recta, más adelante se determinó la concentración de ácido ascórbico en los extractos.

Tabla 8. Capacidad antioxidante expresada como mM de ácido ascórbico de los extractos obtenidos.

Cod. Muestra	R*1	R2	R3	Promedio Abs	Concentración mM AA	mg	DE**
						AA/100 mL	
E1	1,912	1,922	1,918	1,917	1,78E-01	3,128	9,17E-03
E2	1,813	1,812	1,819	1,815	1,67E-01	2,941	6,89E-03
E3	1,901	1,905	1,900	1,902	1,76E-01	3,101	4,82E-03
E4	1,951	1,952	1,958	1,954	1,81E-01	3,195	6,89E-03
E5	1,821	1,822	1,822	1,822	1,68E-01	2,954	1,05E-03
E6	1,801	1,802	1,803	1,802	1,66E-01	2,918	1,82E-03
m1	1,801	1,801	1,800	1,801	1,66E-01	2,916	1,05E-03

*Repetición; **Desviación Estándar.

Fuente: Elaboración propia.

Para el ensayo se agregaron 0.25 mL de cada extracto, cada uno se realizó mezclando 50 g. de arándanos frescos con 200 mL de agua destilada o etanol (según corresponda), por lo tanto, en el volumen tomado para la prueba CUPRAC se tuvo 0,0625 g de arándano haciendo los cálculos correspondientes se obtienen los valores presentados en la Tabla 8.

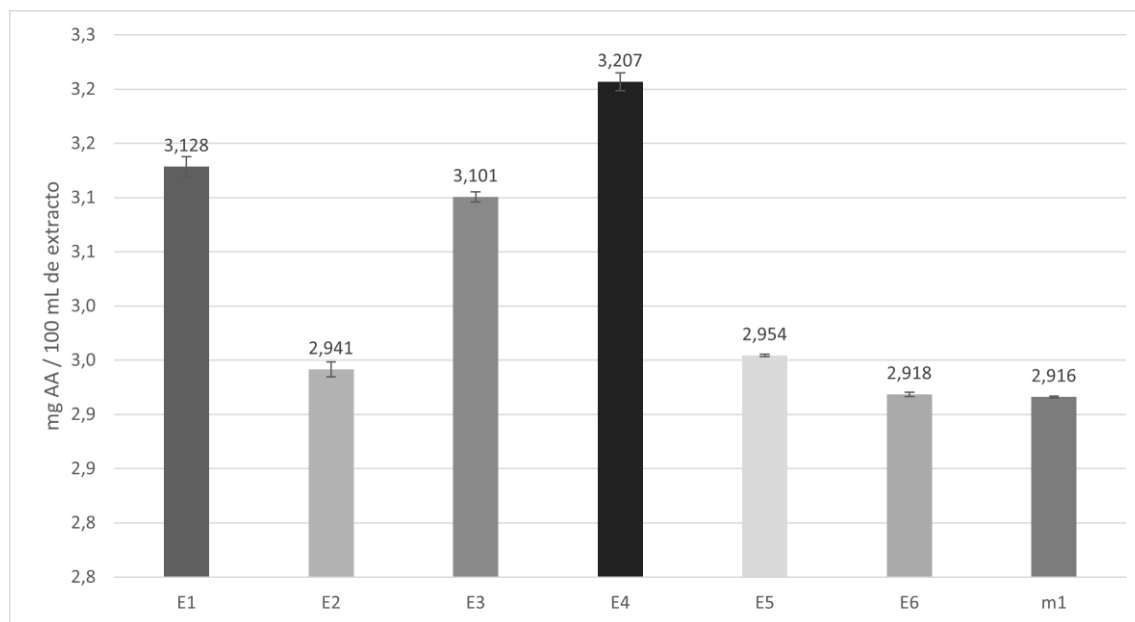


Figura 7. Capacidad antioxidante (CUPRAC) de los extractos expresada como mM de ácido ascórbico.

Fuente: Elaboración propia.

Para comprender mejor los resultados se procesó un gráfico de barras mismo que se presenta en la Figura 7. Los valores de ácido ascórbico son más grandes en los extractos E1 y E4, en el caso del E1 se entiende que al ser una decocción con agua a 60 °C no se alteró la estructura química del AA y se permitió una mejor extracción del fruto, por otro lado, el E4 al ser un extracto etanólico concentró un poco más de AA y cumple con la tendencia que indican Paes et al. (2014), que mencionan que a mayor concentración de etanol los extractos serán más ricos con compuestos antioxidantes. El análisis de varianza (ANOVA) permitió destacar que las diferencias entre los tratamientos son significativas, asimismo la prueba de Tukey permitió decir que no existen diferencias significativas entre E6 y m1; ni entre E5 y E2. Por otro lado, si existen diferencias estadísticamente significativas entre los demás métodos de extracción. Ver la Tabla 13 y Tabla 14 del Anexo 3.

3. Determinación de compuestos fenólicos totales por el método Folin Ciocalteu

Las absorbancias a 725 nm de las concentraciones estándar de ácido gálico se presentan en la Tabla 9, se registraron los valores por triplicado, para ejecutar la recta de calibración se consideraron los promedios correspondientes.

Tabla 9. Lecturas de absorbancia a 725 nm de las concentraciones estándar de ácido gálico.

Conc. Ac. gálico, mg/L	Lectura 1	Lectura 2	Lectura 3	Promedio	DE
2	0,401	0,402	0,405	0,187	0,0021
4	0,302	0,301	0,305	0,410	0,0044
6	0,329	0,334	0,335	0,588	0,0021
8	0,499	0,501	0,503	0,828	0,0031
10	0,325	0,328	0,325	1,047	0,0010

Fuente: Elaboración propia.

La recta de calibración con su respectiva ecuación se presenta en la Figura 8, donde se puede apreciar una correcta linealidad un valor de R^2 : 0,9982 bastante cercano a 1.

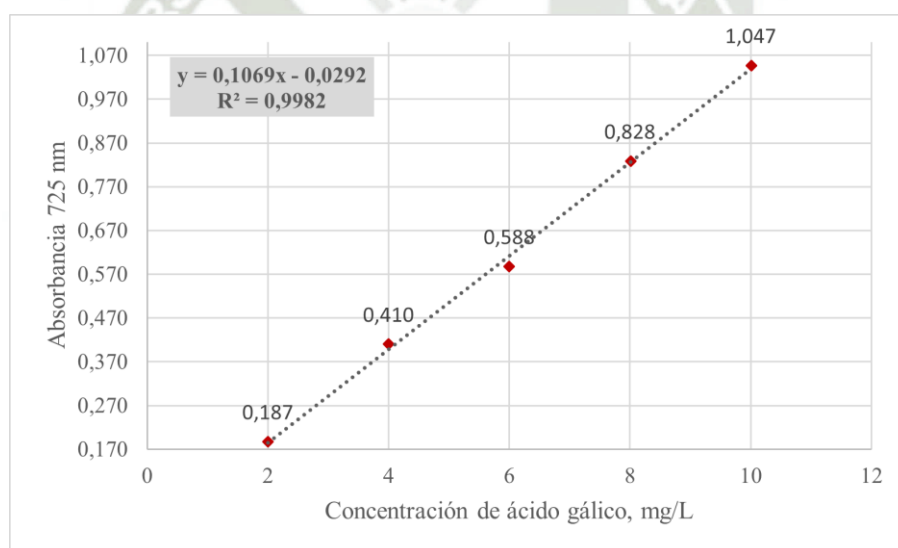


Figura 8. Curva de calibración ácido gálico.

Fuente: Elaboración propia.

Los valores de fenoles totales expresados como concentración de ácido gálico por 100 g de arándanos se presentan en la Tabla 10.

Tabla 10. Fenoles totales expresado como concentración de ácido gálico de los extractos obtenidos.

Cod. Muestra	R1	R2	R3	Promedio Abs	mg AG/ 100 mL	DE
E1	0,401	0,402	0,405	0,403	0,404	1,95E-03
E2	0,302	0,301	0,305	0,303	0,310	1,95E-03
E3	0,329	0,334	0,335	0,333	0,339	3,01E-03
E4	0,499	0,501	0,503	0,501	0,496	1,87E-03
E5	0,325	0,328	0,325	0,326	0,332	1,62E-03
E6	0,357	0,360	0,355	0,357	0,362	2,35E-03
m1	0,295	0,299	0,294	0,296	0,304	2,47E-03

*Repetición; **Desviación Estándar.

Fuente: Elaboración propia.

Para entender mejor los resultados de la Tabla 10 se realizó un gráfico de barras donde se pueden ver las claras diferencias entre las concentraciones de AG obtenidas con cada método de extracción. Los extractos que tuvieron mayores concentraciones de fenoles totales expresadas como contenido de ácido gálico fueron los extractos E1, E4 y E6 cuyas condiciones de extracción fueron decocción con agua a 60 °C, extracción etanólica con etanol al 96 % y extracción por ultrasonido (650 W) de potencia, respectivamente. Los valores equivalentes a los 0.304 mg AG/mL de la muestra “m1” (50 g de arándano con agua a 20°C) son equivalentes a 48,674 mg/g (como mg de ácido gálico por 100 g de fruto fresco) valor muy cercano a los 52,58 mg/g reportados por Li & Jeong (2015) y a los 66,5 mg/g reportados por Paes et al. (2014). Por otro lado, en lo que respecta al extracto E4 el valor obtenido 0,496 mg AG/mL es equivalente a 79,36 mg AG/g fruto fresco y perfectamente comparable con el valor reportado por Paes et al. (2014) que hizo una extracción alcohólica con etanol absoluto.

Finalmente, la extracción con el método de ultrasonido no fue superior a E1 ni a E4 sin embargo fue superior al resto de extractos, varios autores reportan buenos resultados con ultrasonido como He et al. (2016). Adicionalmente gracias al ANOVA se pudo determinar que existen diferencias significativas debido a los tratamientos utilizados, posteriormente con la prueba de Tukey se pudo decir que todos los tratamientos son diferentes entre si con un nivel de confianza del 95 %. En la Tabla 15 se presenta la tabla ANOVA donde se puede apreciar el valor p es menor a 0.05, por otro

lado, en la Tabla 16 se puede observar que ningún tratamiento tiene la misma letra, lo que indica que todos son estadísticamente diferentes.

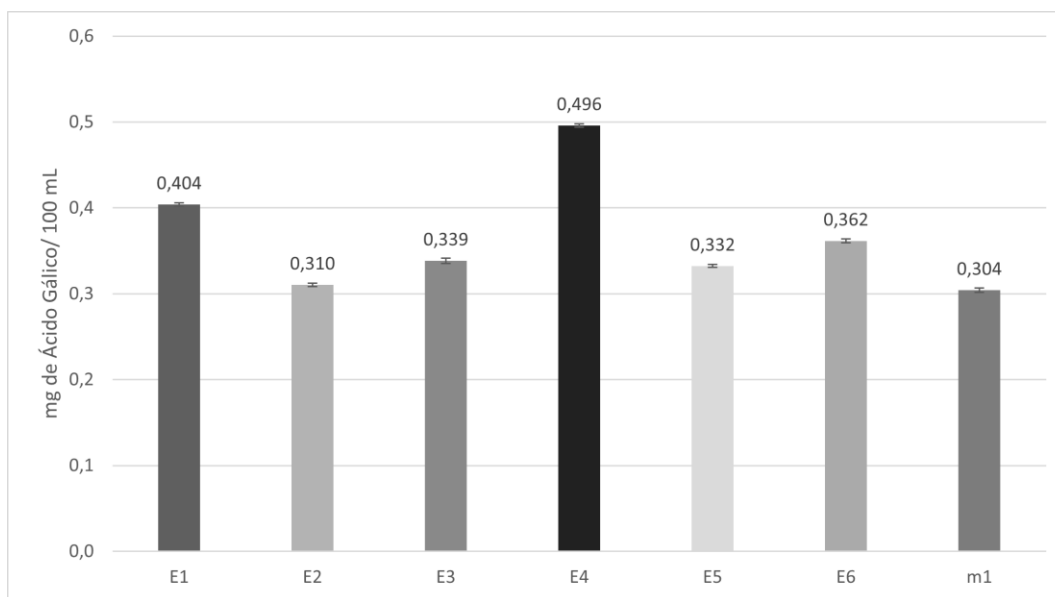


Figura 9. Fenoles totales (Folin – Ciocalteu) expresado como mg/L de ácido gálico.

Fuente: Elaboración propia.

4. Determinación de antocianinas totales por el método pH diferencial.

De acuerdo con la metodología ejecutada se tomaron las absorbancias a 510 y 720 nm de las muestras previamente llevadas a pH 1 y pH 4,5 con los buffers sugeridos por la metodología, en la Tabla 11 se presentan las absorbancias obtenidas. Se hicieron lecturas por duplicado, los promedios se encuentran sombreados en color gris claro.

Tabla 11. Absorbancias a 510 y 720 nm de los extractos llevados a pH 1 y pH 4,5.

Cod. Muestra	pH 1						pH 4,5					
	Abs 510	Abs 510	Promedi o Abs 510	Abs 720	Abs 720	Promedi o Abs 720	Abs 510	Abs 510	Promedi o Abs 510	Abs 720	Abs 720	Promedi o Abs 720
E1	0,349	0,333	0,341	0,09	0,091	0,0905	0,051	0,045	0,048	0,035	0,026	0,0305
E2	0,319	0,331	0,325	0,084	0,085	0,0845	0,05	0,051	0,0505	0,024	0,028	0,026
E3	0,321	0,322	0,3215	0,065	0,061	0,063	0,059	0,051	0,055	0,021	0,028	0,0245
E4	0,381	0,378	0,3795	0,088	0,087	0,0875	0,06	0,055	0,0575	0,022	0,029	0,0255
E5	0,356	0,354	0,355	0,08	0,079	0,0795	0,061	0,062	0,0615	0,022	0,026	0,024
E6	0,359	0,358	0,3585	0,084	0,086	0,085	0,052	0,051	0,0515	0,023	0,024	0,0235

m1	0,327	0,326	0,3265	0,087	0,084	0,0855	0,053	0,053	0,053	0,021	0,022	0,0215
-----------	-------	-------	--------	-------	-------	--------	-------	-------	-------	-------	-------	--------

Fuente: Elaboración propia.

Aplicando la Ecuación 1 y Ecuación 2 se pudo calcular las antocianinas totales (AT) expresadas como miligramos de Cianidina – 3 – glucósido (C3G) por 100 mL de extracto, los valores están plasmados en la Tabla 12, donde además se presentan los valores obtenidos por duplicado y la desviación estándar de cada experimento realizado.

Tabla 12. Antocianinas totales expresadas como mg de C3G en cada extracto.

Cod.	ABS R1	ABS R2	ABS promedio	R*1	R2	AT mg de C3G por 100 mL	DE**
E1	0,243	0,223	0,233	202,80	186,11	194,46	11,80
E2	0,209	0,223	0,216	174,43	186,11	180,27	8,26
E3	0,218	0,238	0,228	181,94	198,63	190,28	11,80
E4	0,255	0,265	0,260	212,82	221,16	216,99	5,90
E5	0,237	0,239	0,238	197,79	199,46	198,63	1,18
E6	0,246	0,245	0,246	205,30	204,47	204,89	0,59
m1	0,208	0,211	0,210	173,59	176,09	174,84	1,77

*Repetición; **Desviación Estándar.

Fuente: Elaboración propia.

Finalmente, para comprender de mejor forma los resultados se realizó un gráfico de barras que se presenta en la Figura 10.

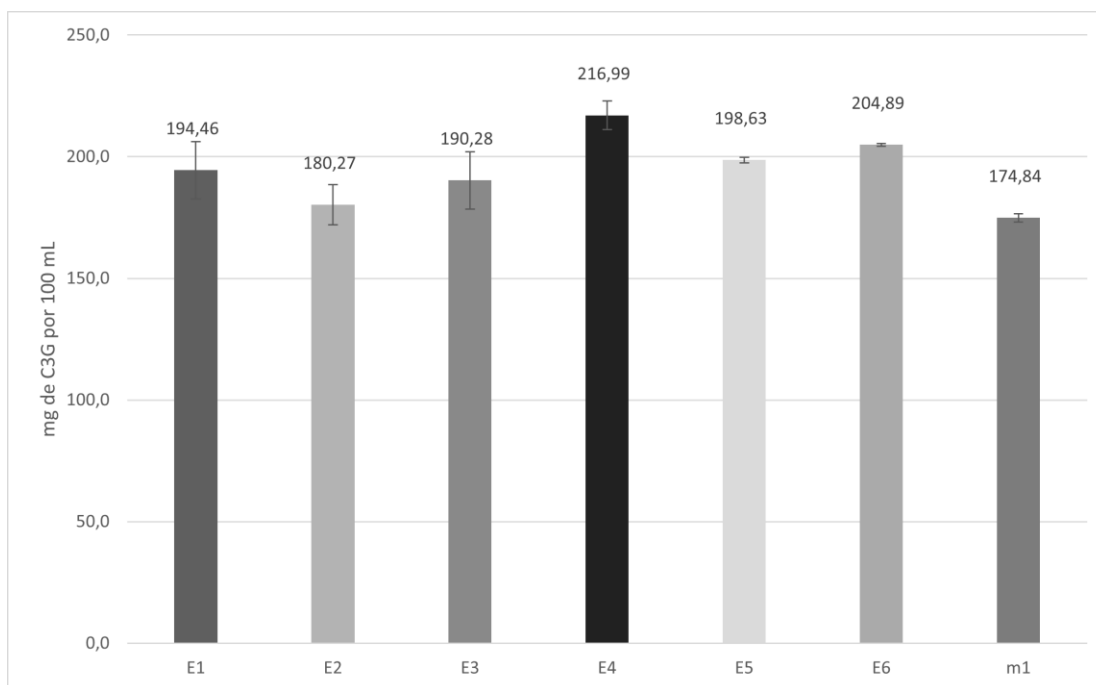


Figura 10. Concentración de antocianinas expresadas como mg de C3G por 100 mL de extractos.

Fuente: Elaboración propia.

Las barras de error representan la desviación estándar realizada con los valores por duplicado que se obtuvieron en la parte experimental. Se aprecia claramente que el extracto E4 es el que posee mayores valores de antocianinas (216,99 mg por 100 mL de extracto) este valor es muy cercano los 234 mg por 100 g reportados por Paes et al. (2014), la diferencia en la metodología de extracción se centra en que los autores utilizaron etanol absoluto y en este estudio se utilizó etanol al 96 %. Sin embargo, es rescatable la gran similitud entre los resultados, por otro lado, Paes et al. (2014) también reportaron el contenido de antocianinas en arándano fresco solamente disolviendo y triturando los frutos en agua destilada a temperatura ambiente y obteniendo un valor de 175 ± 17 mg de por 100 mL, valor muy cercano al obtenido por el mismo método de extracción en este estudio. El ANOVA (Tabla 17 del Anexo 3) nos permite decir que existen diferencias significativas entre los tratamientos, por otro lado la prueba Tukey nos permite decir que los tratamientos E4 y E6 no tiene diferencias estadísticamente significativas, de igual forma E2 y m1; E2, E1 y E3; y finalmente, E6, E5, E1 Y E3 esto se puede corroborar en la Tabla 18 del Anexo 3.

5. Estudio cinético y poblacional de *Lactobacillus rhamnosus*.

La evaluación del efecto de los extractos de arándanos por diferentes métodos se realizó con la determinación de la densidad óptica de cada sistema cada 24 h durante una semana, los resultados más relevantes de ello se presentan y discuten a continuación.

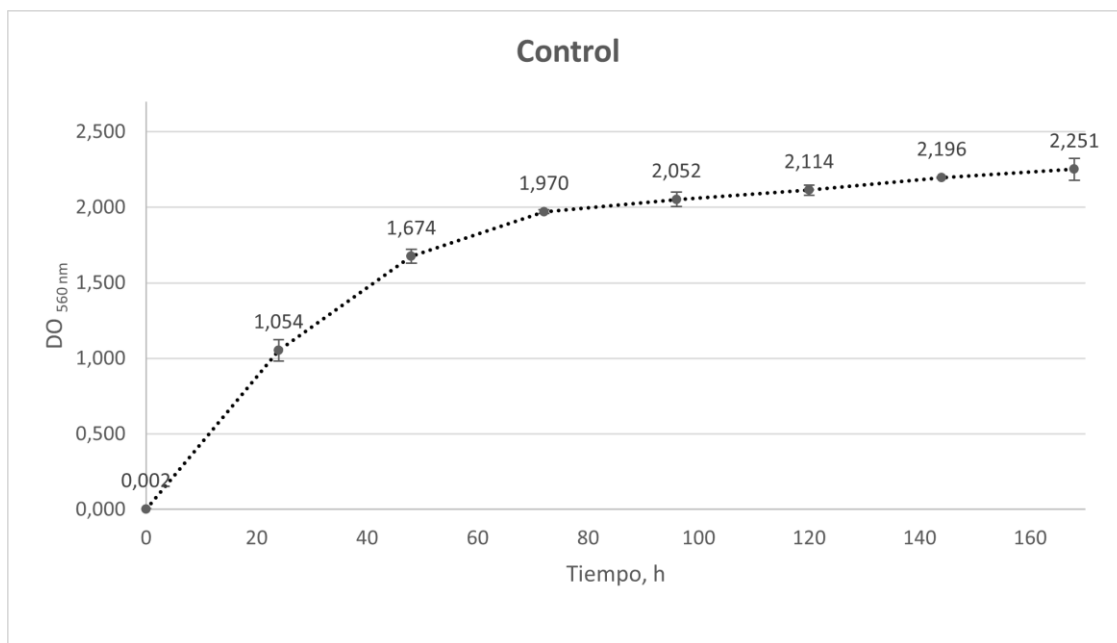


Figura 11. Curva de crecimiento de *L. rhamnosus* en caldo MRS.

Fuente: Elaboración propia.

En la Figura 11 se puede observar la curva de crecimiento de *Lactobacillus rhamnosus*, en caldo MRS, los valores graficados representan el promedio de tres repeticiones y las barras de error son las desviaciones estándar de cada sistema. El comportamiento y tendencia de la curva obtenida se asemeja a la curva de crecimiento reportada por (Yáñez et al., 2008) la cual se determinó por lecturas de absorbancia y el cultivo se hizo con el mismo caldo de cultivo utilizado en este estudio. La curva de crecimiento reportada por (Kang et al., 2020) también se asemeja mucho a la que se obtuvo en el presente estudio. El propósito de haber ejecutado este experimento (control) es para tener una línea base y poder comparar el efecto positivo de los extractos de arándano en el crecimiento de *L. rhamnosus* en condiciones controladas. La DO más alta en el control fue de 2,251 a las 168 h con una velocidad máxima de crecimiento específico (μ_{max}) de $0,2547 \text{ h}^{-1}$ y un tiempo de duplicación medio (Td) de 2,72 h. El extracto E1 (Agua, 60 °C) se pudo observar un

crecimiento bastante importante y parámetros cinéticos muy prometedores. En la Figura 12 se presenta la curva de crecimiento de *L. rhamnosus* en medio MRS con 10 mL/L del extracto E1.

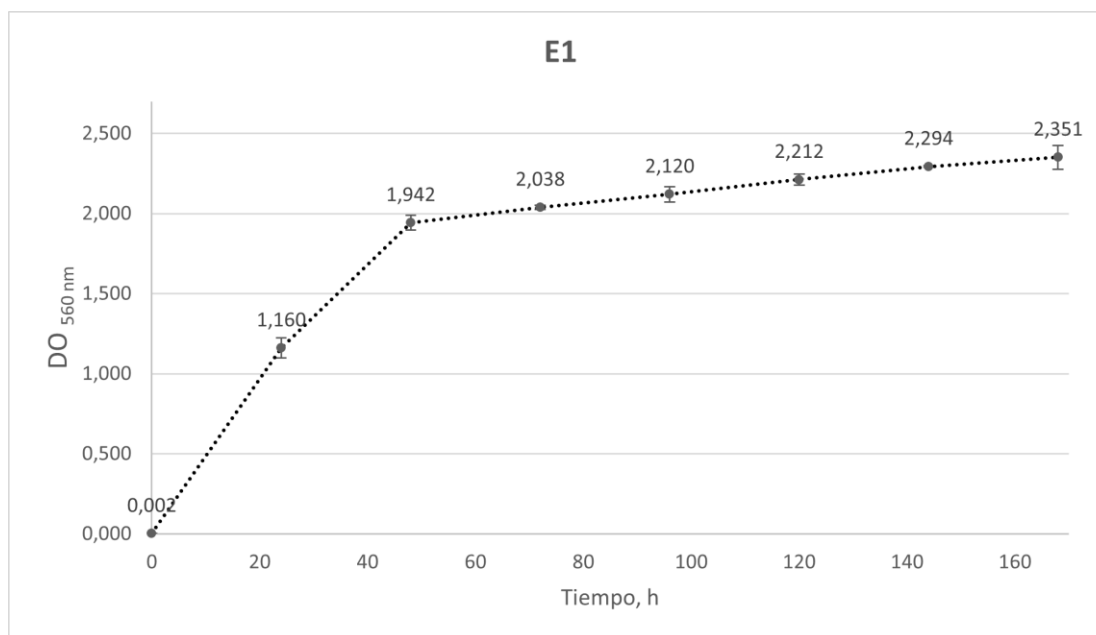


Figura 12. Curva de crecimiento de *L. rhamnosus* en caldo MRS con extracto de arándano obtenido por decocción (H₂O, 60°C).

Fuente: Elaboración propia.

En general el contenido de fenoles totales y antocianinas es un importante potenciador del crecimiento de microorganismos probióticos como *L. rhamnosus* (Coman et al., 2018). La DO más alta en el sistema E1 (enriquecido con el extracto E1) fue de 2,351 a las 168 h con una μ_{\max} de 0,2727 h⁻¹ y un Td de 2,54 h. En comparación con los resultados obtenidos en el sistema E2 enriquecido con el extracto E2 (DO: 2,322; μ_{\max} de 0,2547 h⁻¹; Td de 2,72 h.) se puede considerar que la alta temperatura de extracción tuvo un rol antagónico, debido a que las antocianinas son bastante sensibles al calor (Patras et al., 2010), asimismo la degradación de estas podría causar la disminución de actividad antioxidante efecto que también se observó en este estudio. Akowuah et al. (2009) demostraron la disminución de contenido fenólico total a partir de una temperatura de extracción superior a los 60 °C, dato que explica también el crecimiento bastante diferenciado entre estos dos sistemas (1 y 2). La curva de crecimiento de *L. rhamnosus* se puede observar en la Figura 20 del Anexo 5. En síntesis, se puede decir que la alta temperatura de extracción del extracto E2 hizo que el contenido de fenoles totales, antocianinas y capacidad antioxidante disminuya y

por ende no hubo un efecto positivo en el desarrollo de *L. rhamnosus* en el sistema E2, por otro lado, en el sistema E1 hubo un contenido de fenoles, antocianinas y capacidad antioxidante bastante mayor y por consiguiente hubo un mejor desarrollo de *L. rhamnosus*. El siguiente sistema importante fue el que se realizó con el extracto E4 (etanol al 96 %) se pudo observar un crecimiento bastante importante y parámetros cinéticos muy prometedores. En la Figura 13 se presenta la curva de crecimiento de *L. rhamnosus* en medio MRS con 10 mL/L del extracto E4.

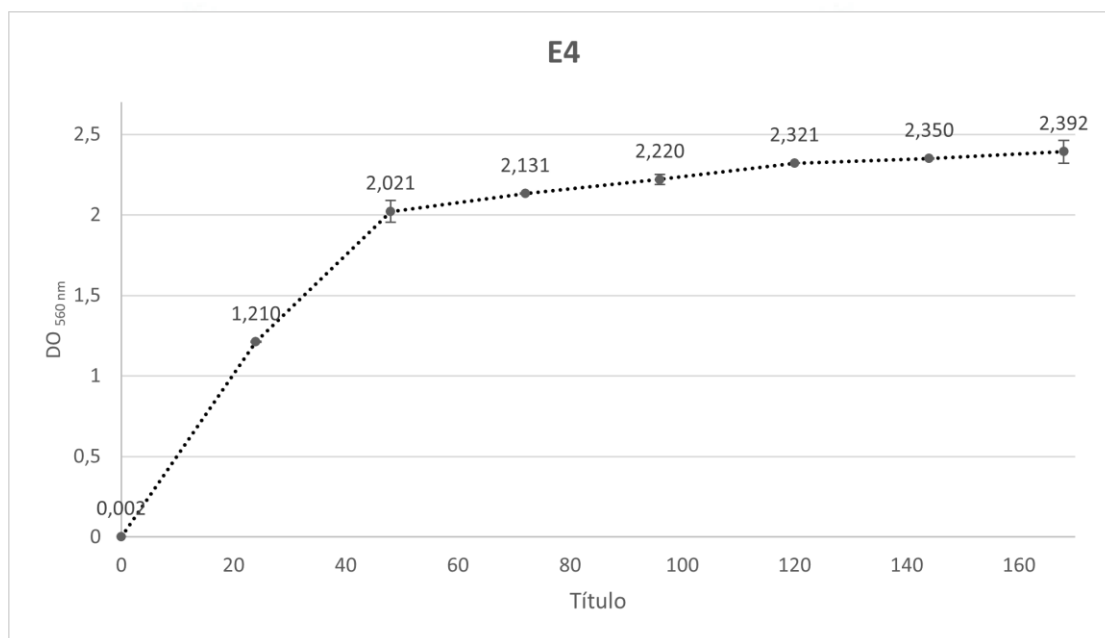


Figura 13. Curva de crecimiento de *L. rhamnosus* en caldo MRS con extracto de arándano obtenido por extracción alcohólica (EtOH 96 %).

Fuente: Elaboración propia.

La DO más alta en sistema E4 fue de 2,392 a las 168 h con μ_{\max} de $0,2745 \text{ h}^{-1}$ y un tiempo Td de 2,53 h. En comparación con el control se tiene una gran diferencia tanto en DO como en parámetros cinéticos de crecimiento, esto se debe principalmente al contenido de fenoles totales, antocianinas y capacidad antioxidante del extracto agregado. Coman et al. (2018) señalan en su estudio que extractos ricos en fenoles, antocianinas y altamente antioxidantes de frutos rojos como ciruela y sauco, tienen un efecto significativo en el tiempo medio de duplicación de cultivos probióticos como *L. rhamnosus* IMC 501®, *L. paracasei* IMC 502®, SYN BIO® and *L. plantarum* IMC 509. Esto es perfectamente extrapolable al arándano debido que también contiene los mismos

componentes y en concentraciones considerables en el extracto E4. En lo que concierne al sistema E3 podemos decir que la concentración de etanol al 70 % no es muy favorable para extraer componentes prebióticos, es por ese motivo que las condiciones fueron menores; en el sistema E3 se logró una DO máxima de 2,376; a las 168 h con una μ_{\max} de 0,2562 h⁻¹ y un Td de 2,71 h. La curva de crecimiento del sistema E3 se puede apreciar en la Figura 21 del Anexo 5.

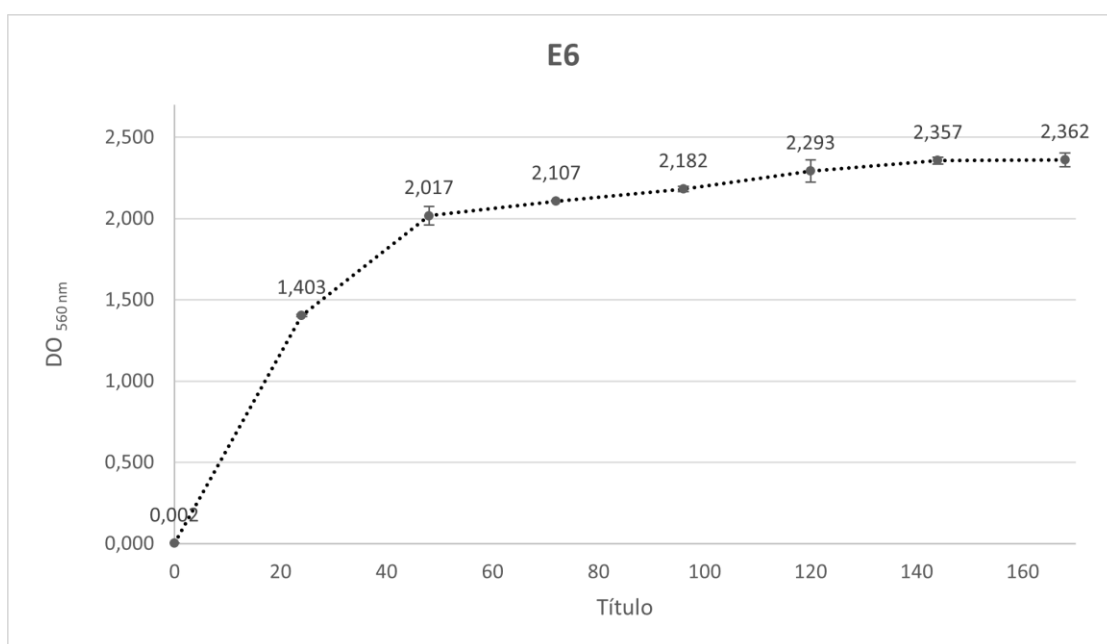


Figura 14. Curva de crecimiento de *L. rhamnosus* en caldo MRS con extracto de arándano obtenido por extracción ultrasónica (650 W).

Fuente: Elaboración propia.

Otro sistema que dio como resultado un crecimiento superior fue el sistema E6 enriquecido con el extracto E6 realizado con ultrasonido (650 W). En la Figura 14 se presenta la curva de crecimiento correspondiente. La DO más alta en el sistema E6 fue de 2,362 a las 168 h con una μ_{\max} de 0,2731 h⁻¹ y un Td de 2,54 h. La extracción por ultrasonido es muy eficiente, así lo afirman diversos autores que han logrado optimizar la extracción de compuesto fenólicos Carrera et al. (2012), antocianinas He et al. (2016); Jiang et al. (2017). Por ello, cantidades considerables de estos componentes enriquecieron al medio MRS en el sistema E6 lo que dio como resultado en un importante aumento en la μ_{\max} y Td. En el caso del sistema E5 se lograron crecimientos un poco más bajos que en el sistema E6, la DO más alta en el sistema E5 fue de 2,354 a las 168 h con una μ_{\max} de 0,2450 h⁻¹ y un Td de 2,83 h, esta pequeña diferencia se puede deber a la menor potencia

de extracción ultrasónica utilizada. La curva de crecimiento del *L. rhamnosus* en el sistema E5 se puede ver en la Figura 22 del Anexo 5.

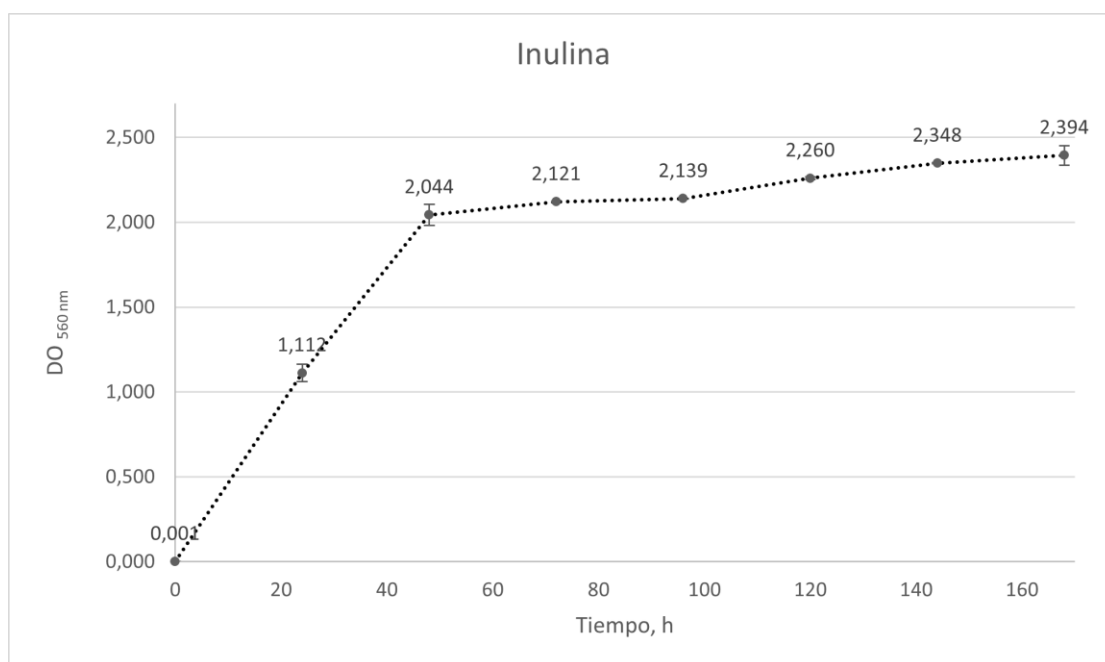


Figura 15. Curva de crecimiento de *L. rhamnosus* en caldo MRS con 10 g/L de inulina.

Fuente: Elaboración propia.

Para poder conocer el efecto de un prebiótico comprobado, se utilizó una concentración de 10 g/L de inulina grado analítico Sigma Aldrich®. En la Figura 15 se presenta la curva de crecimiento de *L. rhamnosus* del sistema denominado “I” (enriquecido con inulina) según la Tabla 5. La DO más alta en el sistema “I” fue de 2,374 a las 168 h con una μ_{\max} de $0,2923 \text{ h}^{-1}$ y un Td de 2,37 h. de Souza Oliveira et al. (2012) demostraron que la inulina estimuló tanto el crecimiento de la biomasa de *L. rhamnosus* y *Streptococcus thermophilus* como también en las concentraciones de productos de fermentación. Esta referencia indica que efectivamente la inulina tiene un efecto prebiótico sobre el microorganismo evaluado en este estudio, asimismo, Cardarelli et al. (2008) demostraron en su estudio que el uso de inulina, junto con la cepa potencialmente probiótica de *Lactobacillus paracasei*, es ventajoso, confiriendo un buen desarrollo de biomasa y estabilidad en productos como chocolates. Por otro lado, Srisuvor et al. (2013) demostraron que la cantidad inulina tiene un efecto sobre la población de *Lactobacillus paracasei* en productos como el yogurt. Para tener un control sobre el efecto de la inulina se hizo un ensayo con medio MRS con 10 g/L

de glucosa. En este caso solo se agregó un poco más de fuente de carbono a lo que ya posee en si en caldo MRS, la composición del caldo MRS se presenta en el Anexo 2. La DO más alta en el sistema “G” fue de 2,303 a las 168 h con una μ_{\max} de $0,2527 \text{ h}^{-1}$ y un Td de 2,74 h estos valores son ligeramente superiores a los del sistema control que solo tenía caldo MRS. Este ligero incremento se es muy usual el *L. rhamnosus* cuando se tienen grandes cantidades de glucosa como lo reporta Senedese et al. (2015). La curva de crecimiento de *L. rhamnosus* se presenta en la Figura 22 del Anexo 5. Para tener una idea general de todas las curvas de crecimiento en la Figura 24 del Anexo 5, se presentan todas las curvas de crecimiento de *L. rhamnosus* en un solo gráfico, en donde se observa claramente las diferencias entre los extractos con mayores contenidos de fenoles, antocianinas y capacidad antioxidante y el control de caldo MRS y caldo MRS + glucosa, asimismo, se observa la superioridad del cultivo con caldo MRS + inulina.

6. Determinación de la viabilidad de las bacterias probióticas

Las unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) se determinaron sembrando 100 μL de cultivo en medio a las 48 h líquido en placa con agar MRS por el método de superficie, los resultados de dicha experiencia se presentan en la Figura 16. En el gráfico se puede apreciar de forma clara que el cultivo en placa del caldo MRS con inulina tiene la mayor concentración de UFC, lo cual concuerda bastante con la curva de crecimiento reportada anteriormente, por otro lado, tanto E4 como E6 tienen concentraciones bastante considerables, cabe resaltar que la mayoría de los resultados son superiores al control. La presencia de compuestos como fenoles, antocianinas y altas capacidades antioxidantes genera un efecto positivo en el desarrollo microbiano del probiótico *L. rhamnosus* (Coman et al., 2018), lo reportado por dichos autores es muy comparable con lo que se ha obtenido en este estudio, sin embargo ellos probaron extractos de frutos rojos que antes de ser incorporados al medio de cultivo MRS fueron liofilizados, por ello es que se presentan ligeras diferencias, sin embargo la tendencia es la misma. El análisis estadístico del efecto de los extractos sobre las UFC/mL. muestra que, si existen diferencias significativas entre los valores de UFC/mL. con cada extracto, ver la Tabla 19, la prueba de Tukey permitió decir no existen diferencias estadísticas entre E5, E2, Control y Glucosa, por otro lado, no existen diferencias estadísticas entre el E4 y el control positivo con inulina, lo que quiere decir que el método de extracción con etanol al 96 % tiene un alto potencial prebiótico, asimismo el E6 tuvo muy buenos resultados, en la Tabla 20 se pueden apreciar el resto de las diferencias entre tratamientos.

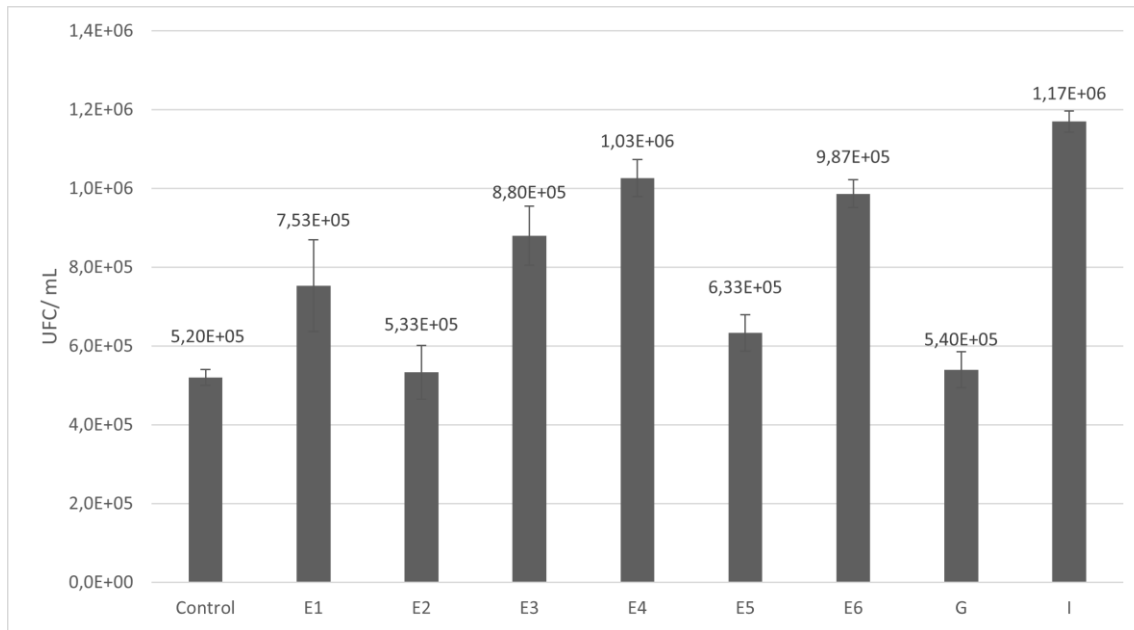


Figura 16. Unidades formadoras de colonia obtenidas con medio de cultivo enriquecido con extractos de arándanos.

Fuente: Elaboración propia.

CONCLUSIONES

De la parte experimental y discusión de los resultados se generaron las siguientes conclusiones:

Primera

Se lograron obtener extractos de arándanos por decocción (60 y 92,5 °C), por extracción etanólica (70 y 96 %) y por extracción por ultrasonido (325 y 650 W) de potencia. Adicionalmente se obtuvo en extracto control solamente con agua a 20 °C.

Segunda

La capacidad antioxidante de los extractos determinada por el método CuPRAC expresada como concentración de ácido ascórbico (mg/L) fueron de mayor a menor en los extractos, E4, E1, E3, E5, E2, E6 y m1. El contenido de fenoles totales determinado por el método de Folin – Ciocalteu expresado como mg de ácido gálico por 100 mL de extracto fue de mayor a menor en los extractos E4, E1, E6, E3, E5, E2 y m1. El contenido de antocianinas determinado por el método pH diferencial y fue expresado como mg de C3G por 100 mL de extracto fue de mayor a menor en los extractos E4, E6, E5, E1, E3, E2 y m1.

Tercera

Los extractos obtenidos por diferentes métodos tuvieron un efecto significativo en el desarrollo de la biomasa de *L. rhamnosus*, bajo condiciones controladas, lo cual permite decir que hubo un efecto prebiótico, asimismo se puede decir que existe una relación directa entre la concentración de fenoles, antocianinas y capacidad antioxidante con las velocidades de crecimiento específicas y los tiempos de duplicación del probiótico, el E4 tuvo concentraciones muy altas fenoles y capacidad antioxidante lo que le otorga un alto potencial prebiótico, por otro lado, el extracto E6 tuvo solo un alto contenido de antocianinas, manteniendo un buen desarrollo a pesar de no tener altas concentraciones de fenoles ni capacidad antioxidante.

RECOMENDACIONES

De la parte experimental, procesamiento y discusión de resultados se generaron las siguientes conclusiones.

1. Se recomienda estudiar a profundidad la extracción por ultrasonido, debido a que durante el desarrollo de esta tesis se identificaron muchas variables que podrían ser manipuladas y que desde luego arrojarían resultados óptimos y prometedores.
2. Para tener un resultado más concluyente sobre la capacidad antioxidante de los extractos se recomienda hacer más estudios empleando más de un método como por ejemplo DPPH o ABTS o DMPD.
3. La evaluación del efecto probiótico de los extractos fue evaluada in vitro mediante sistemas de cultivo microbiano en caldo MRS, se recomienda para investigaciones futuras poder evaluar el efecto prebiótico en algún organismo modelo como ratones.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akouwah, G. A., Mariam, A., & Chin, J. H. (2009). The effect of extraction temperature on total phenols and antioxidant activity of *Gynura procumbens* leaf. *Pharmacognosy Magazine*, 4(17), 81–85.
- Alcalde, S. C. J. (2018). *Descripción de la cosecha y postcosecha de 4 variedades de Vaccinium sp en Virú, Lla libertad*.
- Anadón, A., Ares, I., Martínez-Larrañaga, M.-R., & Martínez, M.-A. (2021). Prebiotics: safety and toxicity considerations. In *Nutraceuticals* (pp. 1061–1080). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-821038-3.00064-1>
- Aranaz, P., Romo-Hualde, A., Zabala, M., Navarro-Herrera, D., de Galarreta, M. R., Gil, A. G., Martínez, J. A., Milagro, F. I., & González-Navarro, C. J. (2017). Freeze-dried strawberry and blueberry attenuates diet-induced obesity and insulin resistance in rats by inhibiting adipogenesis and lipogenesis. *Food & Function*, 8(11), 3999–4013.
- Arruda, H. S., Silva, E. K., Pereira, G. A., Meireles, M. A. A., & Pastore, G. M. (2020). Inulin thermal stability in prebiotic carbohydrate-enriched araticum whey beverage. *LWT*, 128. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109418>
- Ashaolu, T. J. (2020). Immune boosting functional foods and their mechanisms: A critical evaluation of probiotics and prebiotics. In *Biomedicine and Pharmacotherapy* (Vol. 130). Elsevier Masson SAS. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110625>
- Badui Dergal, S. (2016). *Química de los alimentos*. México, Pearson Educación.

Bonilla, A. C. P., & Rivera, D. E. W. (2016). *Proyecto de inversión para la implementación de una planta exportadora de arándano en Chóchope Lambayeque para su exportación a EE. UU.*

http://tesis.usat.edu.pe/bitstream/20.500.12423/771/3/TL_BonillaArrilaCynthia_RiveraDelgadoEdson.pdf

Boonma, P., Spinler, J. K., Qin, X., Jittaprasatsin, C., Muzny, D. M., Doddapaneni, H., Gibbs, R., Petrosino, J., Tumwasorn, S., & Versalovic, J. (2014). Draft genome sequences and description of *Lactobacillus rhamnosus* strains L31, L34, and L35. *Standards in Genomic Sciences*, 9(3), 744–754.

Bruttomesso, G. (2012). *La dieta contra el cáncer*. Editorial AMAT.

Butkus, V., & Pliszka, K. (1993). The highbush blueberry-a new cultivated species. *V International Symposium on Vaccinium Culture 346*, 81–86.

Cardarelli, H. R., Aragon-Alegro, L. C., Alegro, J. H. A., de Castro, I. A., & Saad, S. M. I. (2008a). Effect of inulin and *Lactobacillus paracasei* on sensory and instrumental texture properties of functional chocolate mousse. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(8), 1318–1324.

Cardarelli, H. R., Aragon-Alegro, L. C., Alegro, J. H. A., de Castro, I. A., & Saad, S. M. I. (2008b). Effect of inulin and *Lactobacillus paracasei* on sensory and instrumental texture properties of functional chocolate mousse. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(8), 1318–1324.

Carrera, C., Ruiz-Rodríguez, A., Palma, M., & Barroso, C. G. (2012). Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from grapes. *Analytica Chimica Acta*, 732, 100–104.

Castagnini, J. M. (2014). *Estudio del proceso de obtención de zumo de arándanos y su utilización como ingrediente para la obtención de un alimento funcional por impregnación a vacío*. <https://doi.org/10.4995/Thesis/10251/38988>

Chaccha, R. R. F., & Granados, P. L. M. (2014). *Elaboración de bebida de "arándano" Vaccinium corymbosum y la determinación de su actividad antioxidante*. <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/10934>

Charteris, W. P., Kelly, P. M., Morelli, L., & Collins, J. K. (1998). Antibiotic susceptibility of potentially probiotic Bifidobacterium isolates from the human gastrointestinal tract. *Letters in Applied Microbiology*, 26(5), 333–337.

Chávez, F., Aranda, M., García, A., & Pastene, E. (2011). Los polifenoles antioxidantes extraídos del epicarpio de Palta (*Persea americana* var. Hass) inhiben la ureasa de *Helicobacter pylori*. *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 10(3), 265–280.

Cheng, G. W., & Breen, P. J. (1991). Activity of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and concentrations of anthocyanins and phenolics in developing strawberry fruit. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 116(5), 865–869.

Cheng, W. Y., Lam, K. L., Pik-Shan Kong, A., & Chi-Keung Cheung, P. (2020). Prebiotic supplementation (beta-glucan and inulin) attenuates circadian misalignment induced by shifted light-dark cycle in mice by modulating circadian gene expression. *Food Research International*, 137. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109437>

- Coman, M. M., Oancea, A. M., Verdenelli, M. C., Cecchini, C., Bahrim, G. E., Orpianesi, C., Cresci, A., & Silvi, S. (2018). Polyphenol content and in vitro evaluation of antioxidant, antimicrobial and prebiotic properties of red fruit extracts. *European Food Research and Technology*, 244(4), 735–745. <https://doi.org/10.1007/s00217-017-2997-9>
- Coronado H., M., Vega Y León, S., Gutiérrez T., R., Marcela, V. F., & Radilla V., C. (2015a). Antioxidantes: Perspectiva actual para la salud humana. *Revista Chilena de Nutricion*, 42(2), 206–212. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182015000200014>
- Coronado H., M., Vega Y León, S., Gutiérrez T., R., Marcela, V. F., & Radilla V., C. (2015b). Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. *Revista Chilena de Nutrición*, 42(2), 206–212. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182015000200014>
- Costa, M. F., Pimentel, T. C., Guimaraes, J. T., Balthazar, C. F., Rocha, R. S., Cavalcanti, R. N., Esmerino, E. A., Freitas, M. Q., Raices, R. S. L., Silva, M. C., & Cruz, A. G. (2019). Impact of prebiotics on the rheological characteristics and volatile compounds of Greek yogurt. *LWT*, 105, 371–376. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.02.007>
- Curbelo, Y. G., García, Y., López, A., & Boucourt, R. (2005). Probióticos: una alternativa para mejorar el comportamiento animal. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 39(2), 129–140.
- Curo Díaz, S. P., & Montenegro Deza, L. Y. (2018). *Evaluación Fisicoquímica y Sensorial de una Bebida Funcional a Base de Betarraga (Beta Vulgaris) y Arándanos (Vaccinium Myrtillus)*. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.
- da Silva, J. M., Klososki, S. J., Silva, R., Raices, R. S. L., Silva, M. C., Freitas, M. Q., Barão, C. E., & Pimentel, T. C. (2020). Passion fruit-flavored ice cream processed with water-soluble

extract of rice by-product: What is the impact of the addition of different prebiotic components? *LWT*, 128. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109472>

de Souza Oliveira, R. P., Perego, P., de Oliveira, M. N., & Converti, A. (2012). Effect of inulin on the growth and metabolism of a probiotic strain of *Lactobacillus rhamnosus* in co-culture with *Streptococcus thermophilus*. *LWT - Food Science and Technology*, 47(2), 358–363. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.01.031>

Delgado, S., Guadamuro, L., Flórez, A. B., Vázquez, L., & Mayo, B. (2019). Fermentation of commercial soy beverages with lactobacilli and bifidobacteria strains featuring high β -glucosidase activity. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 51, 148–155.

Falcon, R. P. E. (2017). *Determinación de los parámetros óptimos para la elaboración de una bebida fermentada a partir de arándano (*Vaccinium Myrtillus L*) al estado maduro* [THESIS]. Universidad Nacional Santiago Antunez de Mayolo.

Faria, A., Oliveira, J., Neves, P., Gameiro, P., Santos-Buelga, C., de Freitas, V., & Mateus, N. (2005). Antioxidant properties of prepared blueberry (*Vaccinium myrtillus*) extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(17), 6896–6902.

Ferrer, B., & Dalmau, J. (2001). Alimentos funcionales: probióticos. *Acta Pediatr Esp*, 59, 150–155.

Figueroa-González, I., Quijano, G., Ramírez, G., & Cruz-Guerrero, A. (2011). Probiotics and prebiotics—perspectives and challenges. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(8), 1341–1348.

Giusti, M. M., & Wrolstad, R. E. (2001). Anthocyanins. Characterization and measurement with UV-visible spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 1, 1–13.

Guanga, P., & Geovanna, N. (2018). *Desarrollo de un jugo funcional con la adición de un producto simbiótico a base de Lactobacilos e Inulina*. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

He, B., Zhang, L.-L., Yue, X.-Y., Liang, J., Jiang, J., Gao, X.-L., & Yue, P.-X. (2016). Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds and anthocyanins from blueberry (*Vaccinium ashei*) wine pomace. *Food Chemistry*, 204, 70–76.

Hickey, M. (2005). Current legislation of probiotic products. *Probiotic Dairy Products*, 73–97.

Hidalgo, S. D. I., & Raymondi, P. T. E. (2021). *Proyecto de prefactibilidad para la creación de una microempresa comercializadora de mantequilla de arándanos en el cantón Guayaquil*. <http://repositorio.sangregorio.edu.ec:8080/handle/123456789/2215>

Hill, D., Sugrue, I., Tobin, C., Hill, C., Stanton, C., & Ross, R. P. (2018). The *Lactobacillus casei* group: history and health related applications. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2107.

Hurtado-Romero, A., Del Toro-Barbosa, M., Garcia-Amezquita, L. E., & García-Cayuela, T. (2020). Innovative technologies for the production of food ingredients with prebiotic potential: Modifications, applications, and validation methods. In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 104, pp. 117–131). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.08.007>

Jiang, H.-L., Yang, J.-L., & Shi, Y.-P. (2017). Optimization of ultrasonic cell grinder extraction of anthocyanins from blueberry using response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 325–331.

- Jiao, X., Wang, Y., Lin, Y., Lang, Y., Li, E., Zhang, X., Zhang, Q., Feng, Y., Meng, X., & Li, B. (2019). Blueberry polyphenols extract as a potential prebiotic with anti-obesity effects on C57BL/6 J mice by modulating the gut microbiota. *Journal of Nutritional Biochemistry*, *64*, 88–100. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.07.008>
- Kalt, W., Cassidy, A., Howard, L. R., Krikorian, R., Stull, A. J., Tremblay, F., & Zamora-Ros, R. (2020). Recent research on the health benefits of blueberries and their anthocyanins. *Advances in Nutrition*, *11*(2), 224–236.
- Kang, W., Pan, L., Peng, C., Dong, L., Cao, S., Cheng, H., Wang, Y., Zhang, C., Gu, R., Wang, J., & Zhou, H. (2020). Isolation and characterization of lactic acid bacteria from human milk. *Journal of Dairy Science*, *103*(11), 9980–9991. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18704>
- Kaplan, B. (2012). *Species productivity schedule: Arctostaphylos uva-ursi*.
- Katsirma, Z., Eirini, E., Rodriguez-Mateos, A., & Whelan, K. (2021). Fruits and their impact on the gut microbiota, gut motility and constipation. *Food & Function*.
- Kim, N. J., Jang, H. L., & Yoon, K. Y. (2012). Potato juice fermented with *Lactobacillus casei* as a probiotic functional beverage. *Food Science and Biotechnology*, *21*(5), 1301–1307.
- Li, H., & Jeong, J. M. (2015). Antioxidant Activities of Various Berries Ethanolic Extract. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*, *23*(1), 49–56. <https://doi.org/10.7783/kjmcs.2015.23.1.49>
- Ljungh, A., & Wadstrom, T. (2006). Lactic acid bacteria as probiotics. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, *7*(2), 73–90.

- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. In *Pharmacognosy Reviews* (Vol. 4, Issue 8, pp. 118–126).
<https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902>
- Luo, D., & Fang, B. (2008). Structural identification of ginseng polysaccharides and testing of their antioxidant activities. *Carbohydrate Polymers*, 72(3), 376–381.
- Madrigal, L., & Sangronis, E. (2007). La inulina y derivados como ingredientes claves en alimentos funcionales [Universidad de Guayaquil]. In *Archivos Latinoamericanos De Nutricion* (Vol. 57, Issue 4). http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222007000400012
- Mangell, P., Nejdfors, P., Wang, M., Ahné, S., Weström, B., Thorlacius, H., & Jeppsson, B. (2002). *Lactobacillus plantarum* 299v inhibits *Escherichia coli*-induced intestinal permeability. *Digestive Diseases and Sciences*, 47(3), 511–516.
- Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J. M., & Tuñón, M. J. (2002). Los flavonoides: Propiedades y acciones antioxidantes. *Nutricion Hospitalaria*, 17(6), 271–278.
- Marx, W., Scholey, A., Firth, J., D’Cunha, N. M., Lane, M., Hockey, M., Ashton, M. M., Cryan, J. F., O’Neil, A., Naumovski, N., Berk, M., Dean, O. M., & Jacka, F. (2020). Prebiotics, probiotics, fermented foods and cognitive outcomes: A meta-analysis of randomized controlled trials. In *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* (Vol. 118, pp. 472–484). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2020.07.036>
- Mazza, G., & Kay, C. D. (2008). Bioactivity, absorption, and metabolism of anthocyanins. *Recent Advances in Polyphenols Research*, 1, 228–262.

Medina, G. M., & Sánchez, S. M. (2014). Producción y Exportación de arandanos para Estados Unidos. *Lima, Perú: Tesis Para Optar El Grado Acaemico de Magister En Administración de Empresas.*

Miller, K., Feucht, W., & Schmid, M. (2019). Bioactive compounds of strawberry and blueberry and their potential health effects based on human intervention studies: A brief overview. *Nutrients, 11(7)*, 1510.

MINAGRI-DGPA-DEEIA. (2016). *El arándano en el Perú y el mundo Producción, Comercio y Perspectivas.*

Mishra, V., Shah, C., Mokashe, N., Chavan, R., Yadav, H., & Prajapati, J. (2015). Probiotics as potential antioxidants: a systematic review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 63(14)*, 3615–3626.

Mixcan, M. C. D. (2015). *Evaluación de fenoles totales, antocianinas totales y capacidad antioxidante en diez clones mejorados de papa nativa (Solanum tuberosum sp.) de la región Cusco* [Bachelor thesis, Universidad Católica de Santa María]. <http://tesis.ucsm.edu.pe/repositorio/handle/UCSM/3416>

Monteiro, A., Loureiro, S., Matos, S., & Correia, P. (2019). Goat and sheep milk as raw material for yogurt. In *Milk Production, Processing and Marketing*. IntechOpen London, UK.

Mounir, M., Ibijbijen, A., Farih, K., Rabetafika, H. N., & Razafindralambo, H. L. (2022). Synbiotics and Their Antioxidant Properties, Mechanisms, and Benefits on Human and Animal Health: A Narrative Review. In *Biomolecules* (Vol. 12, Issue 10). MDPI. <https://doi.org/10.3390/biom12101443>

Muñoz Caicedo, M. N. (2012). Estudio del efecto de los fructooligosacáridos en la producción de bacteriocinas por aislados nativos de *Lactobacillus* spp. *Departamento de Química*.

Murthy, S. N., Patnaik, A., Srinivasan, N., Selvarajan, E., Nivetha, A., & Mohanasrinivasan, V. (2017). Fermentative preparation of functional drink from *Punica granatum* using lactic acid bacteria and exploring its anti-tumor potential. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 263(2). <https://doi.org/10.1088/1757-899X/263/2/022045>

Naranjo, C. I. E., & Rodríguez, T. A. V. (2017). *Determinación del porcentaje de remoción de Oligosacáridos (Rafinosa) en harina de arvejas secas (Pisumsativum)*. Universidad de Guayaquil, Facultad de Ingeniería Química.

Neri-Numa, I. A., Arruda, H. S., Geraldi, M. V., Maróstica Júnior, M. R., & Pastore, G. M. (2020). Natural prebiotic carbohydrates, carotenoids and flavonoids as ingredients in food systems. In *Current Opinion in Food Science* (Vol. 33, pp. 98–107). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.03.004>

Olagnero, G., Abad, A., Bendersky, S., Genevois, C., Granzella, L., & Montonati, M. (2007). Alimentos funcionales: fibra, prebióticos, probióticos y simbióticos. *Diaeta*, 25(121), 20–33.

Orezzoli Llorente, S. (2014). *Evaluación de la ingesta de fibra de estudiantes de nutrición y dietética de la Universidad Finis Terrae durante los meses de marzo y abril*. Universidad Finis Terrae.

Paes, J., Dotta, R., Barbero, G. F., & Martínez, J. (2014). Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from blueberry (*Vaccinium myrtillus* L.) residues using supercritical CO₂ and

pressurized liquids. *Journal of Supercritical Fluids*, 95, 8–16.

<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2014.07.025>

Patras, A., Brunton, N. P., O'Donnell, C., & Tiwari, B. K. (2010). Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. *Trends in Food Science and Technology*, 21(1), 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.07.004>

Pires, T. C. S. P., Caleja, C., Santos-Buelga, C., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2020). Vaccinium myrtillus L. Fruits as a Novel Source of Phenolic Compounds with Health Benefits and Industrial Applications - A Review. *Current Pharmaceutical Design*, 26(16), 1917–1928. <https://doi.org/10.2174/1381612826666200317132507>

Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290–4302.

Rashidinejad, A. (2020). Blueberries. In *Nutritional Composition and Antioxidant Properties of Fruits and Vegetables* (pp. 467–482). Elsevier.

Rivera-Quixchan, J. M., González-Cortés, N., García-Zarracino, R., & Jiménez-Vera, R. (2018). Componentes prebióticos del plátano: fibra dietética y almidón resistente. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 5(3), 40–50.

Saarela, M. (2009). Probiotics as ingredients in functional beverages. In *Functional and speciality beverage technology* (pp. 55–70). Elsevier.

Salazar, A. L. V. (2017). Evaluación del efecto de la adición de oligofruktosa sobre las características fisicoquímicas, sensoriales, microbiológicas y el aporte calórico de leche

condensada de búfala. *Vitae*, 24(2) (2), 46–54.

[https://doi.org/10.17533/10.17533/udea.vitae.v24n2\(2\)a06](https://doi.org/10.17533/10.17533/udea.vitae.v24n2(2)a06)

Sandulachi, E., Cojocari, D., Balan, G., Popescu, L., GHENDOV-MOȘANU, A., & Sturza, R. (2020). Antimicrobial Effects of Berries on *Listeria monocytogenes*. *Food and Nutrition Sciences*.

Santana Legorreta, S., Villanueva-Carvajal, A., Morales-Rosales, E. J., Laguna-Cerda, A., & Domínguez-López, A. (2016). Extracción y evaluación de inulina a partir de dalias silvestres mexicanas (*Dahlia coccinea* Cav.). *Phyton (Buenos Aires)*, 85(1), 63–70.

Šaponjac, V. T., Čanadanović-Brunet, J., Četković, G., Djilas, S., & Četojević-Simin, D. (2015). Dried bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) extract fractions as antioxidants and cancer cell growth inhibitors. *LWT-Food Science and Technology*, 61(2), 615–621.

Senedese, A. L. C., Maciel Filho, R., & Maciel, M. R. W. (2015). L-lactic acid production by *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863. *TheScientificWorldJournal*, 2015, 501029. <https://doi.org/10.1155/2015/501029>

Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152–178.

Slavin, J. (2013). Fiber and prebiotics: mechanisms and health benefits. *Nutrients*, 5(4), 1417–1435.

Srisuvor, N., Chinprahast, N., Prakitchaiwattana, C., & Subhimaros, S. (2013). Effects of inulin and polydextrose on physicochemical and sensory properties of low-fat set yoghurt with

probiotic-cultured banana purée. *LWT - Food Science and Technology*, 51(1), 30–36.

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.10.018>

Stanoeva, J. P., Stefova, M., Andonovska, K. B., Vankova, A., & Stafilov, T. (2017). Phenolics and mineral content in bilberry and bog bilberry from Macedonia. *International Journal of Food Properties*, 20(sup1), S863–S883.

Stojanovic, J., & Silva, J. L. (2007). Influence of osmotic concentration, continuous high frequency ultrasound and dehydration on antioxidants, colour and chemical properties of rabbiteye blueberries. *Food Chemistry*, 101(3), 898–906.

Syngai, G. G., Gopi, R., Bharali, R., Dey, S., Lakshmanan, G. M. A., & Ahmed, G. (2016). Probiotics-the versatile functional food ingredients. *Journal of Food Science and Technology*, 53(2), 921–933.

Tonutare, T., Moor, U., & Szajdak, L. (2014a). Strawberry anthocyanin determination by pH differential spectroscopic method - How to get true results? | Określenie poziomu antocyjanów w truskawkach metoda\{ogonek\} spektroskopii różnicowej - jak uzyskać prawdziwe wyniki? *Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus*, 13(3), 35–47.

Tonutare, T., Moor, U., & Szajdak, L. (2014b). Strawberry anthocyanin determination by pH differential spectroscopic method - How to get true results? | Określenie poziomu antocyjanów w truskawkach metoda\{ogonek\} spektroskopii różnicowej - jak uzyskać prawdziwe wyniki? *Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus*, 13(3), 35–47.

Tormo Carnicé, R. (2006). Probióticos. Concepto y mecanismos de acción. *An. Pediatr.(2003, Ed. Impr.)*, 30–41.

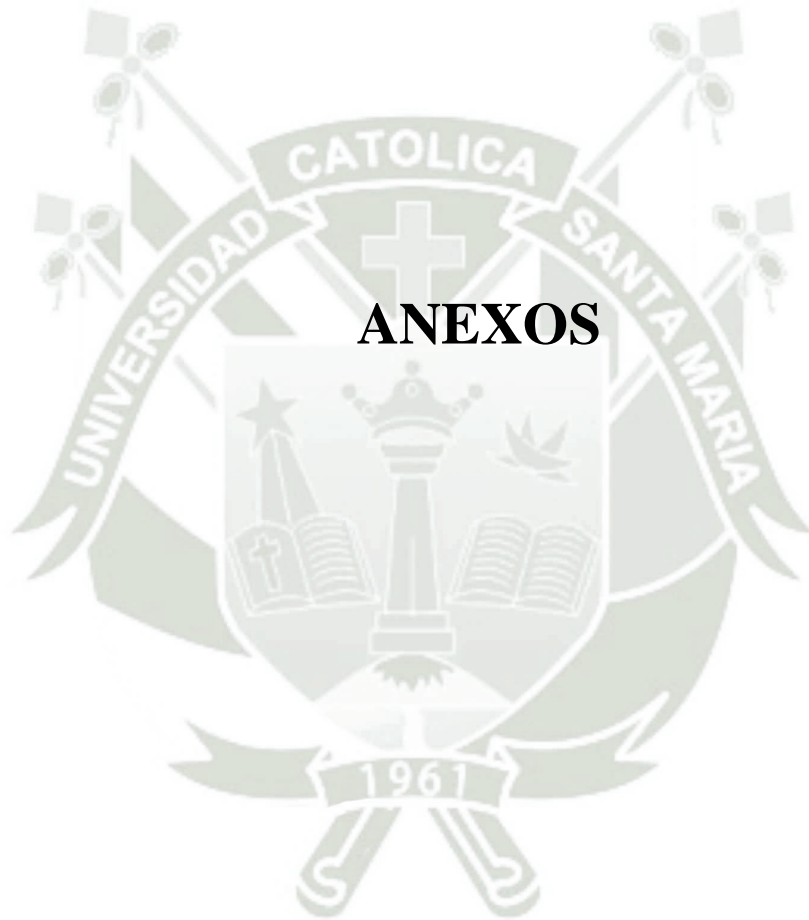
- USDA. (2020). *Food data central. Lettuce*. FoodData Central. <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/171711/nutrients>
- Valik, E., & Lipatkova, D. M. A. (2008). Characterization of the growth of *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Journal of Food and Nutrition Research*, 47(2), 60–67.
- Vega, M. F., Dieguez, S. N., Riccio, B., Aranguren, S., Giordano, A., Denzoin, L., Soraci, A. L., Tapia, M. O., Ross, R., Apás, A., & González, S. N. (2017). Zearalenone adsorption capacity of lactic acid bacteria isolated from pigs. *Brazilian Journal of Microbiology*, 48(4), 715–723. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.05.001>
- Wang, S. Y., Chen, C.-T., & Yin, J.-J. (2010). Effect of allyl isothiocyanate on antioxidants and fruit decay of blueberries. *Food Chemistry*, 120(1), 199–204.
- Wang, Y., Wu, Y., Wang, Y., Xu, H., Mei, X., Yu, D., Wang, Y., & Li, W. (2017). Antioxidant Properties of Probiotic Bacteria. *Nutrients*, 9(5). <https://doi.org/10.3390/NU9050521>
- Wood, B. J. B., & Holzapfel, W. H. (1995). *The lactic acid bacteria. Vol. 2, The genera of lactic acid bacteria*. Blackie Academic & Professional.
- Yáñez, R., Marques, S., Gírio, F. M., & Roseiro, J. C. (2008). The effect of acid stress on lactate production and growth kinetics in *Lactobacillus rhamnosus* cultures. *Process Biochemistry*, 43(4), 356–361. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2007.12.014>
- Yang, H., Hewes, D., Salaheen, S., Federman, C., & Biswas, D. (2014). Effects of blackberry juice on growth inhibition of foodborne pathogens and growth promotion of *Lactobacillus*. *Food Control*, 37(1), 15–20. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.08.042>

Yi, W., Fischer, J., Krewer, G., & Akoh, C. C. (2005). Phenolic compounds from blueberries can inhibit colon cancer cell proliferation and induce apoptosis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(18), 7320–7329.

Young, I. S., & Woodside, J. v. (2001). Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology*, 54(3), 176–186.

Zhou, L., Xie, M., Yang, F., & Liu, J. (2020). Antioxidant activity of high purity blueberry anthocyanins and the effects on human intestinal microbiota. *LWT*, 117. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108621>

Zorenc, Z., Veberic, R., & Mikulic-Petkovsek, M. (2018). Are processed bilberry products a good source of phenolics? *Journal of Food Science*, 83(7), 1856–1861.



Anexo 1. Ficha técnica del producto Lyofast CRL 1505 (*Lactobacillus rhamnosus*).



Lyofast CRL 1505

Technical Data Sheet

General information

Description

Lyofast CRL 1505 consists of a single strain of *Lactobacillus rhamnosus*.

Lyofast CRL 1505 may be applied in dairy products such as fermented milk products, yoghurt, and drink yoghurt.

Application

Sprinkle the culture powder directly into process milk under aseptic conditions ensuring that the culture is well dispersed by gentle stirring. The following may be used as inoculation guidelines:

Product	Dose/100 l	Product	Dose/100 l
Fermented milk	0.5-2.0	Drink yoghurt	0.5-2.0

Technical Information

1 dose is 10^{11} CFU and inoculated in 100 liters of milk 1 dose gives approx. 10^8 CFU/ml.

Data are obtained under standardised laboratory conditions, and consequently, should be considered as guidelines:

Trait	Result
Optimal temperature for growth	25-45 °C

Microbiological specifications

Assay	Result	Method (Reference)
<i>Bacillus cereus</i>	< 100 CFU/g	M10 (ISO 7932)
Coagulase positive staphylococci*	< 10 CFU/g	M11 (ISO 6888-1-2)
Enterobacteriaceae	< 10 CFU/g	M02 (ISO 21528-1-2-3)
<i>Escherichia coli</i>	< 1 CFU/g	M27 (ISO 11866-1-2/IDF 170)
<i>Listeria monocytogenes</i> *	Not detected in 25 g	M13 (ISO 11290-1-2)
Yeast and mould	< 10 CFU/g	M03 (ISO 6611/IDF 94)
<i>Salmonella</i> spp.*	Not detected in 25 g	M12 (ISO 6785/IDF 93)

* Analyzed on regular basis. Analytical methods are available upon request.

Safety information

Heavy metal analysis

Heavy metal*	Amount (ppm)
Lead (Pb)	< 1
Mercury (Hg)	< 0.03
Cadmium (Cd)	< 0.1

* Analyzed on a regular basis.

Safety sheet

This product is not hazardous; therefore provision of a Safety Data Sheet (SDS) is not mandatory (REACH Art. 31). A Safety Information Data Sheet has been made as a voluntary presentation of certain information that may assist the user in the handling. The safety information is available upon request.

GMO status

Sacco organisms are not genetically modified (GMO), in accordance to the European Directive 2001/18/EC. This product does not require labelling with regard to the use of GMO, in accordance to Regulation (EC) No. 1829/2003, and Regulation (EC) No. 1830/2003.



Allergens	The raw materials used are free of the following components and their products thereof: cereals containing gluten, crustaceans, eggs, fish, peanuts, soybeans, nuts, celery, mustard, sesame seeds, sulphur dioxide and sulphite, lupin and molluscs. This product contains MILK. The list of allergens is in compliance with Regulation (EC) 1169/2011.
BSE/TSE status	This product is considered safe with respect to bovine spongiform encephalopathy (BSE) or transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) transmissions in accordance to Regulation EMA 410/01 rev. 3.
Other information	
Colorants	This product does not contain added colorants, in accordance to Regulation (EC) 1333/2008.
Packaging information	The freeze-dried culture is packaged inside waterproof and airproof pouches, consisting of three layers (in order, going inwards): polyester, aluminium, and polyethylene. The packaging material used is food grade.
Storage and shelf-life	Cultures should be preferably stored, at -18 °C (-0.4 °F), or below. Under these conditions and in the original sealed package, the shelf-life of the product is 18 months.
Certificate of analysis	Lot's certificate of analysis is available upon request.
Certifications	
General	Sacco S.r.l. is ISO 22000:2005 and FSSC 22000 certified since 2014. Certificates are available in the web site www.saccosystem.com .
Kosher	Sacco cultures are generally Kosher approved. Please consult Certificates that are available in the web site www.saccosystem.com .
Halal	Sacco cultures are generally Halal approved. Please consult Certificates that are available in the web site www.saccosystem.com .
Service and technical support	Please contact your distributor for guidance and instructions for your choice of culture and processing. Information about additional package sizes and sales units is also available upon request.
Liability	The information provided is to the best of our knowledge true, and given in good faith. No guarantee against patent infringement is implied or inferred. This may not be the most updated version of the TDS. For the latest version of this document please visit our website or contact your distributor.

Anexo 2. Ficha técnica y composición del caldo MRS.

Millipore.

www.millipore.com

69964 MRS Agar (Lactobacillus Agar acc. to De Man, Rogosa and Sharpe)

For the enrichment, cultivation and isolation of all species of Lactobacillus from all types of material according to DeMan, Rogosa and Sharpe.

Composition:

Ingredients	Grams/Litre
Universal peptone	10.0
Meat extract	5.0
Yeast extract	5.0
D(+)-Glucose	20.0
Dipotassium hydrogen phosphate	2.0
Diammonium hydrogen citrate	2.0
Sodium acetate	5.0
Magnesium sulfate	0.1
Manganous sulfate	0.05
Agar	12.0
Final pH 6.5 +/- 0.2 at 25°C	

Store prepared media below 8°C, protected from direct light. Store dehydrated powder, in a dry place, in tightly-sealed containers at 2-25°C.

Directions :

Dissolve 61.15 g in distilled water, add 1 ml Tween 80 (Cat. No. P8074) and bring volume to 1000 ml. Boil to dissolve the medium completely. Autoclave at 121°C for 15 minutes. Incubate the culture up to 3 days at 35°C or up to 5 days at 30°C. If possible, incubate the plates in a CO₂-enriched atmosphere in an anaerobic jar. Do not allow the surface of the plates to dry as this will cause acetate concentration increasing at the surface, which inhibits the growth of lactobacilli.

Principle and Interpretation:

The MRS media formulation was developed by de Man, Rogosa and Sharpe to replace the tomato juice medium and the meat extract tomato juice medium. It is a medium supporting good growth of lactobacilli in general, even those strains which have shown poor growth in existing media, like strains of *L. brevis* and *L. fermenti*. The MRS culture media contain polysorbate (Tween 80), acetate, magnesium and manganese which are known to act as special growth factors for Lactobacilli as well as a rich nutrient base. As these media show a very low degree of selectivity, *Pediococcus* and *Leuconostoc* species as well as other secondary bacteria may grow on them. Most of the accompanying microflora can be inhibited by thallium acetate (Cat. No. T8266), sorbic acid (Cat. No. S1626), acetic acid (Cat. No. 33209), sodium nitrite (Cat. No. S2252), cycloheximide (Cat. No. 01810) and polymyxin (Cat. No. P4932). These substances can be used at varying concentrations and combinations, but inevitably a compromise has to be reached between selectivity and productivity of the organism sought.

Cultural characteristics:

Organisms (ATCC)	Growth
<i>Lactobacillus acidophilus</i> (4356)	++
<i>Lactobacillus fermentum</i> (9338)	++
<i>Bifidobacterium bifidum</i> (11863)	++ (anaerobic)
<i>Escherichia coli</i> (25922)	-/+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (27853)	none to poor



69964

Page 1 of 2

References:

1. J. C. de Man, M. Rogosa and M. Elisabeth Sharpe, *Appl. Bact.* 23, 130-135 (1960)
2. M. Briggs, *J. Dairy Res.* 20, 36-40 (1953)
3. G. Reuter, *Intern. J. Food Microbiol.* 2, 55-68 (1985)
4. ISO/TC 34/SC 6/WG 15, No.3 and 5, Enumeration of Lactobacteriaceae in meat and meat products (1984)
5. Lankaputhra W.E.V., Shah N.P. and Britz M.L. *Food Australia* 48, 113-118 (1996)
6. W. Hummel, et al., *Biocatalysis* 2, 293 (1989)
7. L.C. Laleye, et al., Involvement of heterofermentative lactobacilli in development of open texture in cheese, *J. Food Prot.* 50, 1009 (1987)
8. P. Laloi, et al., Cell-wall-associated proteinase of *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CNRZ 397, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36, 196 (1991)

The vibrant M, Millipore, and Sigma-Aldrich are trademarks of Merck KGaA, Darmstadt, Germany or its affiliates. Detailed information on trademarks is available via publicly accessible resources.
© 2018 Merck KGaA, Darmstadt, Germany and/or its affiliates. All Rights Reserved.

The life science business of Merck KGaA, Darmstadt, Germany operates as MilliporeSigma in the US and Canada.

69964

Page 2 of 2



Anexo 3. Estadística.

CuPRAC.

Tabla 13. Análisis de Varianza – Conc. Ac. Ascórbico vs. Tipo de extracto.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tipo de Extracto	6	0.072673	0.012112	1352.96	0.000
Error	14	0.000125	0.000009		
Total	20	0.072799			

Tabla 14. Agrupación según el método de Tukey y una confianza de 95% (AA).

Tipo de Extracto	N	Media	Agrupación
E4	3	1.95367	A
E1	3	1.91733	B
E3	3	1.90200	C
E5	3	1.82167	D
E2	3	1.81467	D
E6	3	1.80200	E
m1	3	1.80067	E

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

FOLIN CIUCALTEAU

Tabla 15. Análisis de Varianza – Conc. Ac. Gálico vs. Tipo de extracto.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tipo de Extracto	6	0.081367	0.013561	2757.97	0.000
Error	14	0.000069	0.000005		
Total	20	0.081436			

Tabla 16. Agrupación según el método de Tukey y una confianza de 95% (FC).

Tipo de Extracto	N	Media	Agrupación
E4	3	0.49598	A
E1	3	0.40399	B
E6	3	0.36158	C
E3	3	0.33851	D
E5	3	0.332273	E
E2	3	0.31045	F
m1	3	0.30421	G

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ANTOCIANINAS MONOMÉRICAS

Tabla 17. Análisis de Varianza – Conc. C3G vs. Tipo de extracto.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tipo de Extracto	6	0.005329	0.000888	22.40	0.000
Error	14	0.000555	0.000040		
Total	20	0.005884			

Tabla 18. Agrupación según el método de Tukey y una confianza de 95% (AM)

Tipo de Extracto	N	Media	Agrupación			
E4	3	0.26000	A			
E6	3	0.245500	A	B		
E5	3	0.238000		B		
E1	3	0.23300		B	C	
E3	3	0.22800		B	C	
E2	3	0.21600			C	D
m1	3	0.209500				D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Tipos de extracto Vs. UFC/mL.

Tabla 19. Análisis de Varianza – UFC/mL vs. Tipo de extracto.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tipo de extracto	8	1.42159E+12	1.77698E+11	48.81	0.000
Error	18	65533333333	3640740741		
Total	26	1.48712E+12			

Tabla 20. Agrupación según el método de Tukey y una confianza de 95% (UFC).

C	N	Media	Agrupación			
I	3	1170000	A			
E4	3	1026667	A	B		
E6	3	986667		B		
E3	3	880000		B	C	
E1	3	753333			C	D
E5	3	633333				D
G	3	540000				E
E2	3	533333				E
C	3	520000				E

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Anexo 4. Galería fotográfica.



Figura 17. Frasco de Inulina grado analítico marca Sigma Aldrich ®.



Figura 18. Extractos E1 – E6 (derecha a izquierda) en botellas de vidrio. Frascos con caldo MRS con 10 mL/L de cada extracto

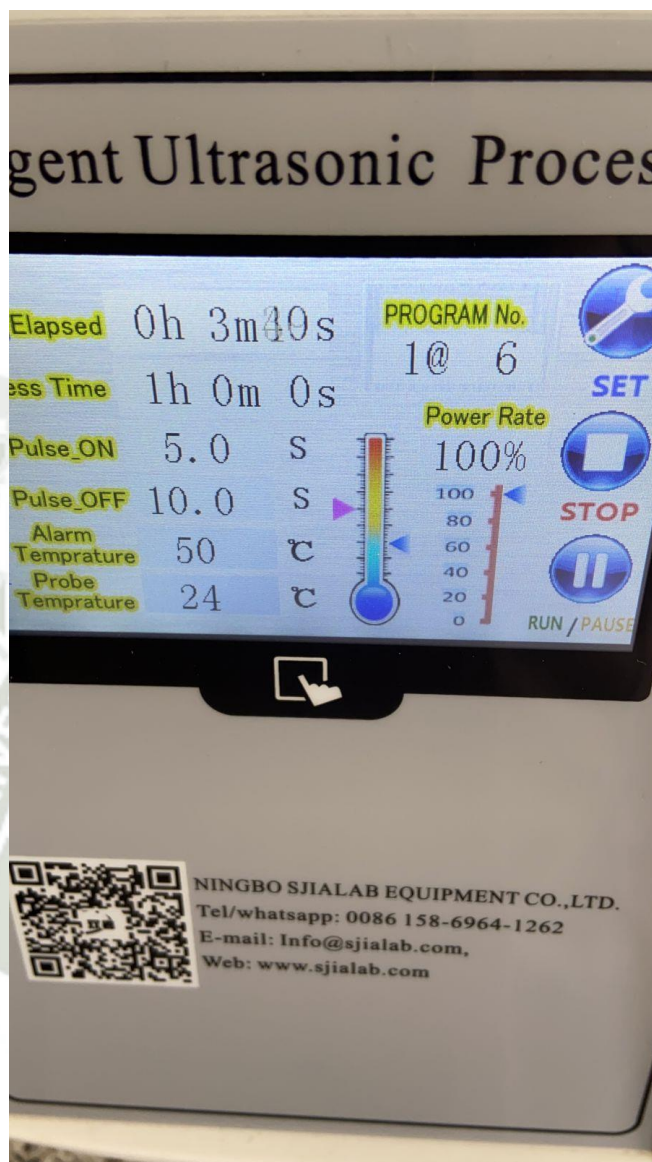


Figura 19. Fotografía de la configuración del equipo de ultrasonido utilizado (1 hora de proceso, 5 segundos de funcionamiento con 10 de descanso y alarma al superar los 50 °C.

Anexo 5. Curvas de crecimiento de *L. rhamnosus* en contacto con 6 extractos, glucosa, inulina y control.

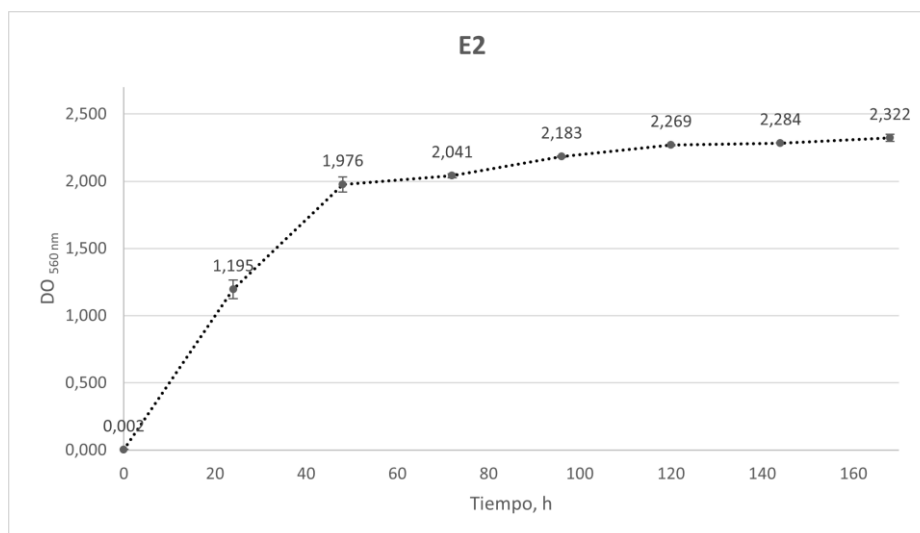


Figura 20. Curva de crecimiento de *L. rhamnosus* en caldo MRS con extracto de arándano obtenido por decocción (H₂O, 92,5 °C).

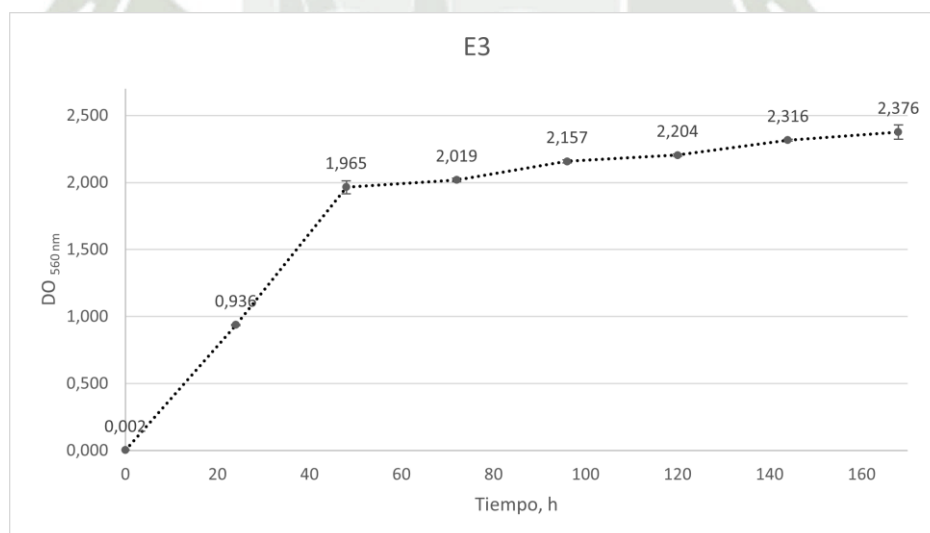


Figura 21. Curva de crecimiento de *L. rhamnosus* en caldo MRS con extracto de arándano obtenido por decocción (EtOH, 60 %).

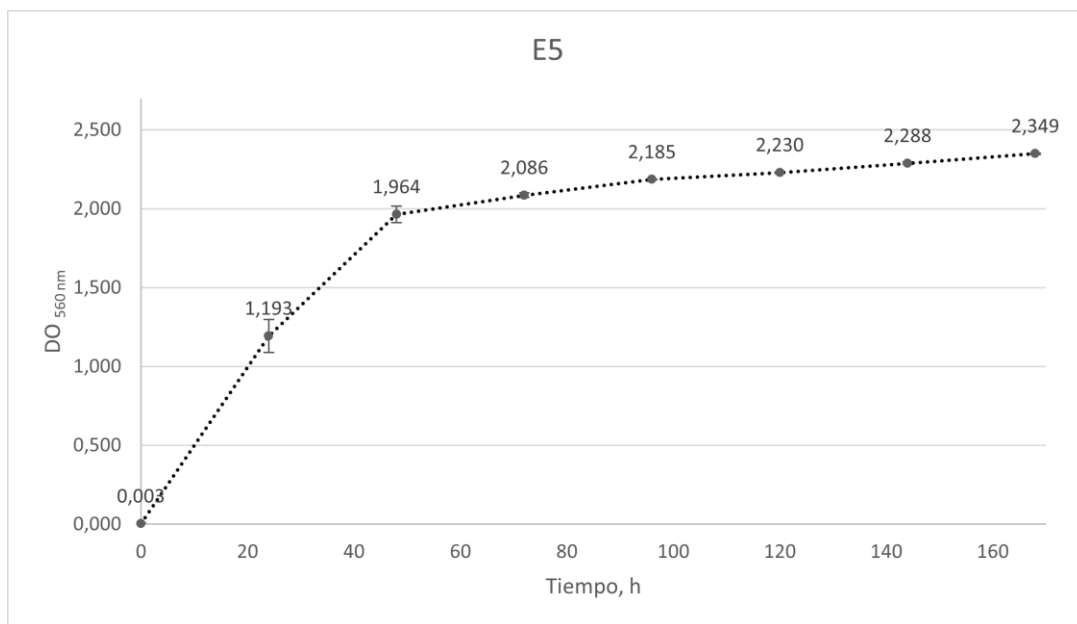


Figura 22. Curva de crecimiento de *L. rhamnosus* en caldo MRS enriquecido con extracción ultrasónica (350 W).

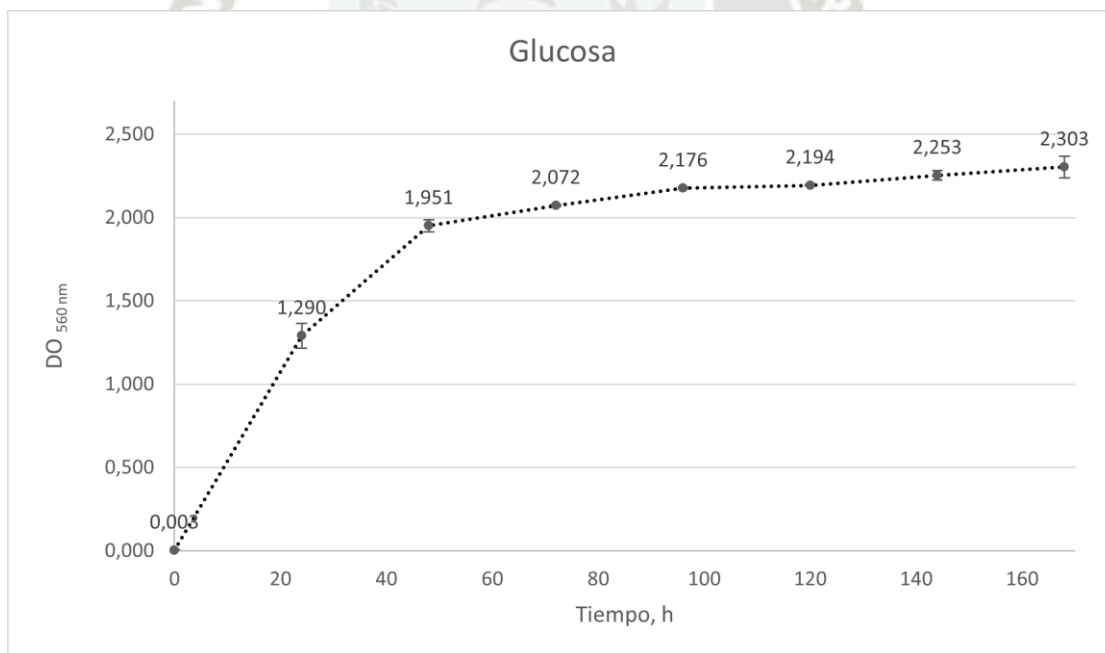


Figura 23. Curva de crecimiento de *L. rhamnosus* en caldo MRS con 10 g/L de glucosa.

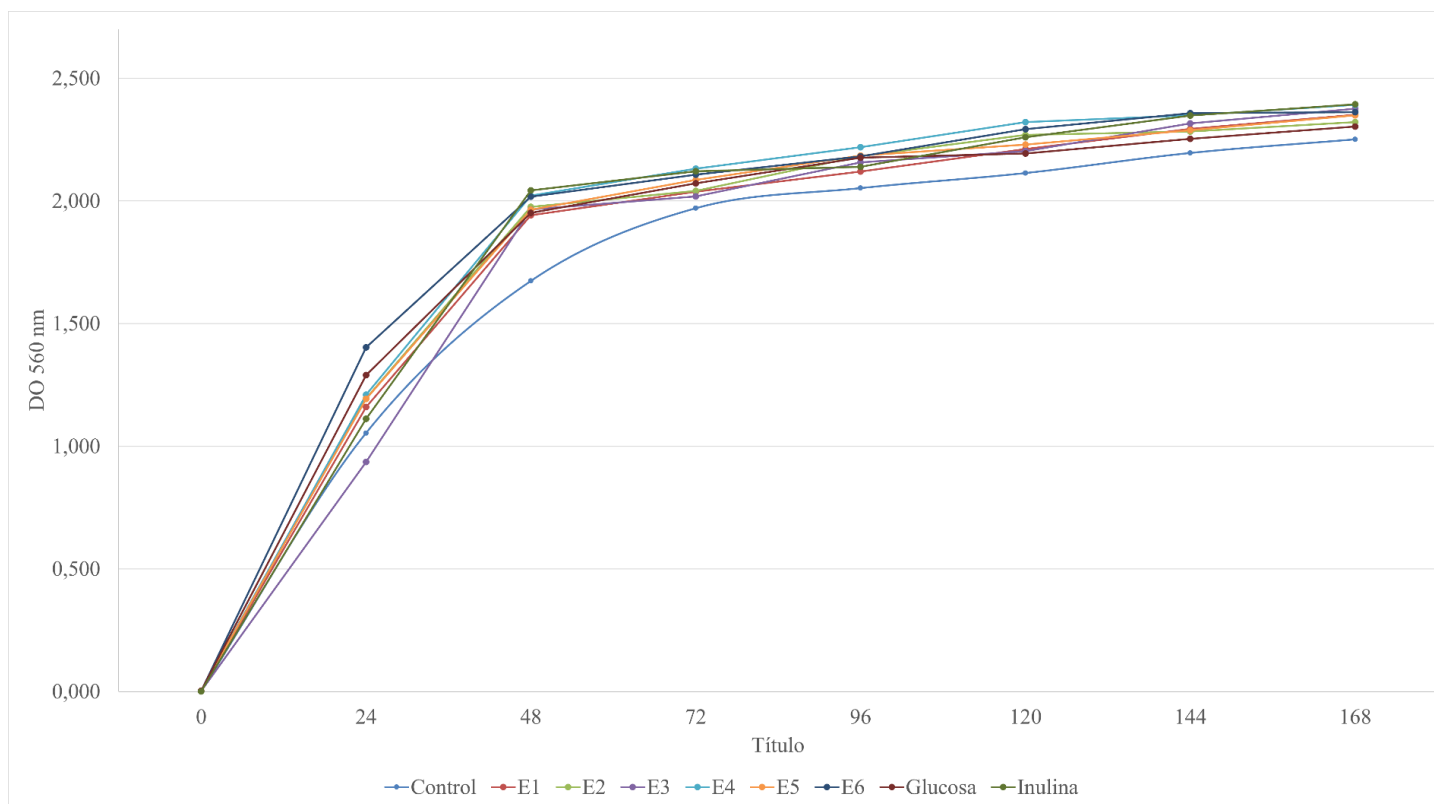


Figura 24. Curvas de crecimiento con medio MRS con todos los extractos (E1 – E6), glucosa, inulina y control.