

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias e Ingenierías

**UTILIZACIÓN DE SEMILLAS DE CÁÑAMO Y MARACUYÁ
EN LA ELABORACIÓN DE UNA BEBIDA SIMBIÓTICA**

**Marcela Vanesa Cadena Cabezas
Mateo Joaquín Villacís Lizano**

Ingeniería en Alimentos

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito
para la obtención del título de
Ingeniero en Alimentos

Quito, 14 de diciembre de 2022

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias e Ingenierías

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

**Utilización de semillas de cáñamo y maracuyá en la elaboración de una
bebida simbiótica**

Marcela Vanesa Cadena Cabezas

Mateo Joaquín Villacís Lizano

Nombre del profesor, Título académico

Lucía de los Ángeles Ramírez, PhD.

Quito, 14 de diciembre de 2022

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en la Ley Orgánica de Educación Superior del Ecuador.

Nombres y apellidos: Marcela Vanesa Cadena Cabezas

Código: 00205744

Cédula de identidad: 1750976233

Lugar y fecha: Quito, 14 de diciembre de 2022

Nombres y apellidos: Mateo Joaquín Villacís Lizano

Código: 00206819

Cédula de identidad: 1726207747

Lugar y fecha: Quito, 14 de diciembre de 2022

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

Nota: El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETHeses>.

UNPUBLISHED DOCUMENT

Note: The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETHeses>.

RESUMEN

Las semillas de cáñamo están teniendo un realce en el mercado mundial, y en el Ecuador es un producto nuevo que se ha incorporado al mercado tras la despenalización del cáñamo no psicoactivo. Estas semillas presentan propiedades funcionales por su perfil lipídico, además de sus proteínas y polifenoles presentes. Por otro lado, en Ecuador la maracuyá es una de las frutas más comercializadas, que también aporta con propiedades funcionales y elimina posibles regustos de las semillas de cáñamo. El objetivo del estudio fue desarrollar una bebida funcional, tanto prebiótica como probiótica, utilizando estas dos materias primas. Se utilizó un diseño completamente aleatorizado $2^2 \times 3$ con 2 repeticiones. Los factores corresponden a la proporción cáñamo: agua (1:5, 1:6) concentración de maracuyá (22%, 24%) y proporción azúcar- sucralosa (12% Azúcar, 6% Azúcar + 0.08% Sucralosa, 3% Azúcar + 0.13% Sucralosa). Además, se inoculó el probiótico *Bifidobacterium lactis spp.* exitosamente dentro de la bebida.

ABSTRACT

Hemp seeds are having a prominence in the world market, and in Ecuador it is a new product that has been incorporated into the market after the decriminalization of non-psychoactive hemp. These seeds have functional properties due to their lipid profile, in addition to its proteins and polyphenols present. On the other hand, in Ecuador, passion fruit is one of the most commercialized fruits, which also provides functional properties and eliminates possible aftertaste from the hemp seeds. The objective of the study was to develop a functional drink, both prebiotic and probiotic, using these two raw materials. A completely randomized $2^2 \times 3$ design with 2 replicates was used. The factors correspond to the hemp: water ratio (1:5, 1:6), passion fruit concentration (22%, 24%) and sugar-sucralose ratio (12% Sugar, 6% Sugar + 0.08% Sucralose, 3% Sugar + 0.13% Sucralose). In addition, the probiotic *Bifidobacterium lactis* spp. successfully inside the drink.

TABLA DE CONTENIDO

Objetivos	11
General	11
Específicos.....	11
Introducción.....	11
Materiales y Métodos.....	14
Materiales	14
Pruebas previas	14
Focus group.....	15
Preparación de la bebida.....	16
Preparación del extracto hidrosoluble del cáñamo.....	16
Corrección de Agua.....	17
Dispersión y homogeneización de ingredientes.....	17
Temperatura y tiempo de pasteurización.....	18
Reemplazo de Azúcar por Sucralosa.....	19
Dispersión del cultivo probiótico.....	19
Recuento microbiológico	19
Recuento de probióticos	20
Diseño experimental.....	20
Variables de salida.	21
Análisis proximal	23
Resultados y discusión	23
Pruebas previas	23
Focus group.....	25
Variables de salida	26
Evaluación Sensorial.....	30
Recuento microbiológico	32
Recuento de probióticos	33
Análisis proximal	35
Conclusión.....	36
Referencias	37
Anexos.....	45
Anexo A. Tratamientos del diseño experimental.....	45

Anexo B. Coeficiente de determinación de las variables.....	45
Anexo C. Consentimiento informado evaluación sensorial	46
Anexo D. Cuestionario evaluación sensorial.....	47
Anexo E. ANOVA variables de salida.....	48
Anexo F. Prueba de normalidad Anderson- Darling de la viscosidad	51
Anexo G. ANOVA atributos evaluación sensorial	52
Anexo H. Resultados escala hedónica	55
Anexo I. Tabla nutricional.....	55
Anexo J. Semáforo nutricional	56

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Factores y niveles.....	21
Tabla 2. Especificaciones de las variables de salida.....	22
Tabla 3. Evaluación de muestras en focus group.	25
Tabla 4. Resumen de análisis de varianza (ANOVA) de la viscosidad, pH y ° Brix de los tratamientos.	26
Tabla 5. Viscosidad, pH y sólidos solubles de los tratamientos.....	27
Tabla 6. Ponderación de los tratamientos.....	30
Tabla 7. Tratamientos codificados para evaluación sensorial	30
Tabla 8. Recuento de Bifidobacterium lactis en la bebida.....	33
Tabla 9. Análisis proximal de la bebida.....	35
Tabla 10. Análisis de varianza (ANOVA) de la viscosidad de los tratamientos.....	48
Tabla 11. Análisis de varianza (ANOVA) del pH de los tratamientos.....	49
Tabla 12. Análisis de varianza (ANOVA) de los sólidos solubles de los tratamientos..	50
Tabla 13. Análisis de varianza (ANOVA) de acidez de los tratamientos.....	52
Tabla 14. Análisis de varianza (ANOVA) de viscosidad de los tratamientos	52
Tabla 15. Análisis de varianza (ANOVA) de dulzor de los tratamientos.....	53
Tabla 16. Análisis de varianza (ANOVA) de Sabor de los tratamientos.....	53
Tabla 17. Análisis de varianza (ANOVA) de Percepción Global de los tratamientos ...	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de flujo de bebida simbiótica de cáñamo y maracuyá.	16
Figura 2. Efectos principales de viscosidad	28
Figura 3. Interacción de factores para sólidos soluble.....	29
Figura 4. Diagrama de tela de araña.	31

UTILIZACIÓN DE SEMILLAS DE CÁÑAMO Y MARACUYÁ EN LA ELABORACIÓN DE UNA BEBIDA SIMBIÓTICA.

Directora de Investigación: Lucía de los Ángeles Ramírez Cárdenas.

OBJETIVOS

General

Desarrollar una bebida funcional simbiótica mediante el aporte nutricional de la semilla de cáñamo.

Específicos

- Combinar las propiedades funcionales de las semillas de cáñamo, maracuyá e inulina con una cepa *Bifidobacterium animalis subs. Lactis*.
- Analizar el efecto de la relación agua: semillas de cáñamo, azúcar: sucralosa y concentración de pulpa de maracuyá en la viscosidad, ° Brix y pH de la bebida.
- Determinar la posibilidad de inserción mediante pruebas sensoriales.
- Innovar en el mercado de bebidas no lácteas, a partir de un producto nuevo y funcional.

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial se estima que el 75% de la población padece de intolerancia a la lactosa, debido a la carencia de la enzima lactasa, encargada de desdoblar los azúcares presentes en la leche (Juárez, 2020). Los lácteos fermentados constituyen por excelencia la principal matriz alimentaria para ser utilizada como vehículo de los probióticos, definidos por la FAO/OMS (2001) como “microorganismos vivos que cuando son administrados en cantidad adecuada confieren un efecto beneficioso sobre la salud del

huésped". Sin embargo, la intolerancia a la lactosa en conjunto con preocupaciones medioambientales y éticas en el consumo de bebidas lácteas ha impulsado de manera significativa a empresas del sector alimenticio y a los consumidores a la búsqueda de productos de origen vegetal (Tetrapack, 2021). La principal ventaja de las bebidas vegetales es que no contienen lactosa, ni generan reacción alérgica a las proteínas de la leche (Haas et al., 2019), por lo que se considera que estos sustitutos pueden ser un medio adecuado para probióticos al brindar una nueva alternativa a aquellas personas que no pueden consumir productos de origen lácteo.

Según la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (2012) en el Ecuador existe una prevalencia de sobrepeso y obesidad del 26% en la población adolescente (>12 a 19 años), y en la población adulta (>19 a 59 años) alcanza un valor del 62.8%. Estas enfermedades han sido asociadas a la ingesta de grasas y ácidos grasos saturados, (Vizmanos, Hunot & Capdevila, 2006). No obstante, a pesar de existir un consumo de grasas, la calidad y tipo de grasa determinará su efecto en el cuerpo humano. Se han realizado estudios de suplementación con semillas de cáñamo y se ha verificado que pueden atenuar parcialmente los trastornos inducidos por alimentación rica en grasas saturadas y reducir el estrés oxidativo en dietas que inducen hipertensión (Jurgoński, Opyd & Fotschki, 2020; Girgih et al., 2014). Los beneficios previamente mencionados de las semillas de cáñamo se fundamentan en su alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados como el ácido linoléico y ácido α -linolénico; que se encuentran en una proporción 3:1 (omega 6:omega 3) (Callaway, 2004).

El aumento de la demanda del cáñamo (*Cannabis Sativa*) es una tendencia a nivel global e impulsada por varios países que han legislado su cultivo y procesamiento al reconocer las propiedades funcionales del mismo. Desde el año 2019 el cultivo de

cáñamo no psicoactivo es legal en el Ecuador y desde el 2020 se emitió el acuerdo ministerial No. 109 que regula y otorga licencias para la importación, siembra, procesamiento y almacenamiento de esta planta (MAGAP, 2020). Además, dictamina que para la comercialización de alimentos y suplementos alimenticios que contengan cáñamo deben cumplir con un porcentaje inferior al 0.3% de Delta-9-Tetrahidrocannabinol (THC); sustancia psicoactiva que actúa en el sistema nervioso central. En el país existen 131 licencias de las cuales 95 fueron dadas para la importación, siembra y cultivo y solo 21 para el procesamiento (Onofre, 2022).

A nivel industrial se ha utilizado el cannabis en la industria textil, farmacéutica, cosmética, recreativa y recientemente en la industria de alimentos (Burton et al., 2022). El uso de esta planta es bastante amplio y su procesamiento adecuado puede fomentar la economía circular. Hasta el 2021, el mercado general de Cannabis y derivados se encuentra avaluado en 17.8 billones de dólares, y se espera un crecimiento aproximado del 25.3% para 2030 (Grand View Research, 2022). El cannabis y derivados son una de las principales tendencias en el desarrollo de nuevos productos alimenticios. Con base en datos de la encuestadora Innova Market Insights se ha determinado que los lanzamientos de bebidas y alimentos con cannabis o sus derivados representan el 76% a nivel mundial. El mercado de mayor interés para esta clase de productos actualmente es la Unión Europea, Estados Unidos y Canadá (Juárez, 2020).

Por otro lado, el maracuyá (*Passiflora edullis*) se destaca por su sabor intenso, acidez y diversos usos en la industria alimentaria, siendo la pulpa el componente principal debido al contenido de vitamina C, β -caroteno y flavonoides (Landázuri et al., 2021). Estas características han llamado la atención del mercado mundial, y han impulsado la economía de Brasil, Ecuador, Colombia y Perú que son los principales productores

(Ocampo et al., 2013). Por su parte Ecuador es el principal exportador de concentrado de maracuyá (Viera, 2020).

Los probióticos son bacterias viables, no patógenas, que mejoran la salud gastrointestinal al regular la función sensoriomotora. Previenen el cáncer colorrectal, mejoran la inmunidad, reducen el nivel de colesterol plasmático, entre otros efectos (Abreu-Abreu, 2012; Domingo, 2017; Gu, et al., 2023). Las bacterias más usadas como probióticos son *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Estudios han demostrado que el jugo de maracuyá en conjunto con inulina, son una matriz adecuada para la prevalencia de *Bifidobacterium* en secado por aspersion (Dias, et al., 2018).

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Las semillas de cáñamo descascaradas fueron obtenidas de la empresa Proalmex, con humedad 2.51%, y contenido de THC 0.049%. La pulpa de maracuyá fue de la marca Yucho y los probióticos NUTRISH® BB-12 (marca CHR HANSEN) correspondieron a la cepa *Bifidobacterium animalis subs. Lactis*. La sucralosa fue dispersada con maltodextrina para obtener un dulzor equivalente a 70 veces el patrón (sacarosa). Los demás materiales fueron proporcionados por la planta piloto de la Universidad San Francisco de Quito (USFQ)

Pruebas previas

Se realizaron para establecer el dulzor específico de la bebida, las proporciones cáñamo:agua y el nivel de hidratación de las semillas. Además, se realizó un focus group para determinar el pH y la concentración óptima de goma xanthan.

Focus group.

Los grupos focales es un tipo de investigación cualitativa en el cual se espera una interacción de un grupo de personas para observar y entender las actitudes, intereses, necesidades y motivaciones ante un producto que se quiere lanzar al mercado (Ivankovich & Araya, 2011).

Se desarrolló en la sala de evaluación sensorial de la USFQ de 11:30-12:30 con 7 jueces no entrenados. Se presentaron un total de 5 muestras (0.25% goma, pH4.4; 0.25% goma, pH 3.9; 0.25% goma pH 3.5; 0.50% goma, pH 4.4; 0.75% goma, pH 4.4) de 20 mL c/u en vasos plásticos transparentes de poliestireno, variando la concentración de goma xanthan y el pH. En las primeras tres muestras se evaluó la acidez, y entre las muestras 1, 4 y 5 se evaluó la viscosidad. Cada participante calificó con una escala de 0 (menor agrado) a 5 (mayor agrado). Además, se consideraron los comentarios de todos los participantes.

Preparación de la bebida

La preparación de la bebida se dividió en tres fases: extracción, adición de ingredientes e inoculación del cultivo probiótico (Figura 1).

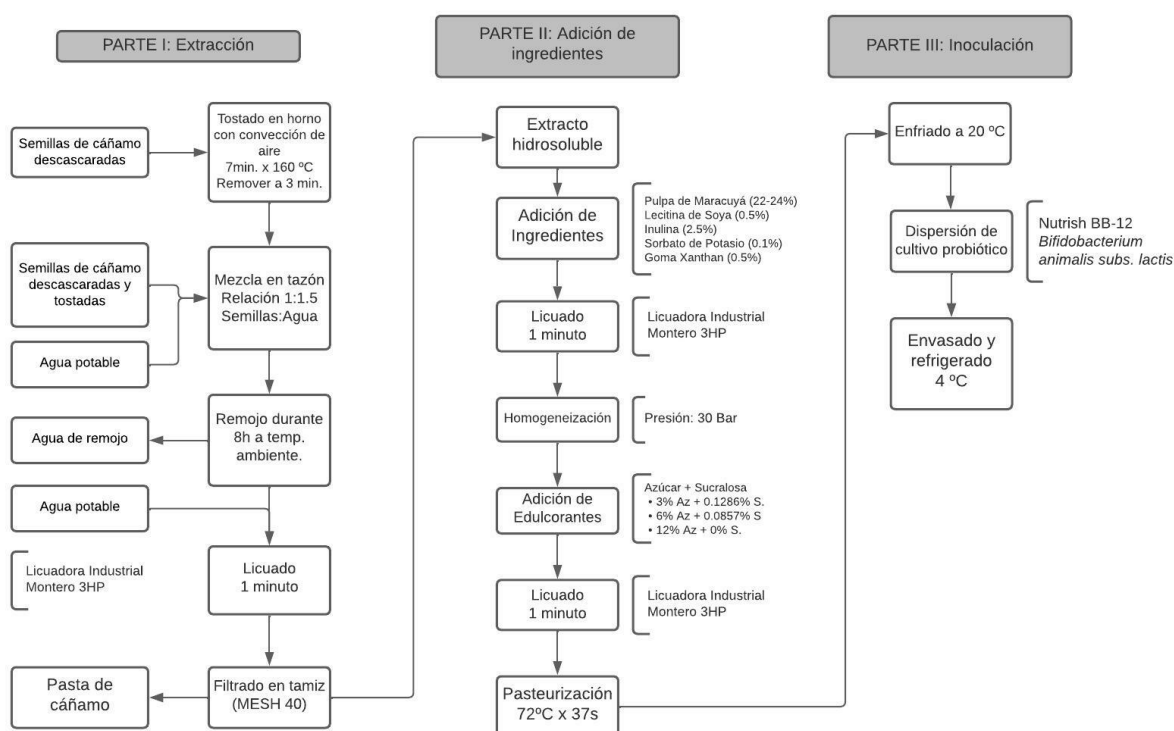


Figura 1. Diagrama de flujo de bebida simbiótica de cáñamo y maracuyá.

Preparación del extracto hidrosoluble del cáñamo.

El extracto fue preparado siguiendo las metodologías propuestas por Berghofer et al. (2012) y Mitchell & Shammet (2008) con algunas modificaciones. Inicialmente se realizó un tostado de las semillas en un horno con convección de aire, ya que según Babiker et al. (2021) el contenido de ácido linoleico y polifenoles incrementa significativamente al tostar las semillas durante un tiempo de 7 minutos a 160 °C. Posteriormente, se colocaron las semillas de cáñamo en agua potable a temperatura ambiente (20 °C) durante 8 horas y se eliminó el agua de remojo.

Corrección de Agua.

Con base en las pruebas preliminares se determinó que al aplicar la Ecuación 1, una vez transcurrido el tiempo de remojo de 8 horas, la hidratación promedio de las semillas de cáñamo descascaradas fue del 64.5%.

$$\% \text{ Hidratación} = \frac{\text{Peso Final} - \text{Peso Inicial}}{\text{Peso Inicial}} * 100\% \quad (\text{Ecuación 1})$$

Se tomó en consideración el porcentaje de hidratación de las semillas y se corrigió el cálculo del agua (Ecuación 2 y 3).

$$\text{Corrección de agua} = \text{Agua}_{\text{formulación}} - \text{Agua}_{\text{semillas}} \quad (\text{Ecuación 2})$$

$$\text{Agua}_{\text{semillas}} = \% \text{ Hidratación} * \text{Peso semillas hidratadas} \quad (\text{Ecuación 3})$$

Dispersión y homogeneización de ingredientes.

El prebiótico (inulina), conservante (sorbato de potasio), estabilizante (goma xanthan), emulsificante (lecitina de soya), pulpa de maracuyá y edulcorantes (azúcar y sucralosa) fueron dispersados y homogeneizados. El extracto hidrosoluble de cáñamo y la pulpa de maracuyá se licuaron en una Licuadora Montero de 3 HP de manera simultánea durante 1 minuto y se homogeneizó a 30 bares de presión en un homogeneizador Armfield FT9, tres veces para simular un homogeneizador de tres efectos.

Después se añadieron los edulcorantes en sus tres niveles, se licuó 1 minuto y se pasteurizó a 72°C durante 36.59 segundos. No se utilizaron temperaturas mayores debido a que las proteínas presentes en las semillas de cáñamo bajan su estabilidad y empiezan

a desnaturalizarse formando agregados insolubles al superar 80 °C durante 10 minutos (Besir et al., 2022).

Temperatura y tiempo de pasteurización

Para determinar el tiempo y temperatura de pasteurización se tomó en consideración la resistencia al calor que presentan diferentes microorganismos, siendo *Lysteria monocytogenes* una de las bacterias con mayor tiempo de resistencia (valor D_{60} : 5-8.3 min) (Adam & Moss, 2016). Según Breymann, Chaves & Arias (2013) las pulpas de maracuyá pueden contener este patógeno ya que es resistente a bajas A_w , es ácido tolerante y los carbohidratos disponibles sirven como sustrato para su crecimiento. Barón (2018) estudió la termorresistencia de *Lysteria monocytogenes* a un pH simulado de 4.2 en cremas de verduras, donde se obtuvo un valor D_{70} :0.33 minutos y un valor Z de 7.5°C. En base a estos parámetros se calculó el valor D_{72} para la pasteurización. Despejando la Ecuación 4 se obtiene un D_{72} de 36.59 segundos, aproximadamente 37s.

$$z = \frac{T_2 - T_1}{\log D_1 - \log D_2} \quad (\text{Ecuación 4})$$

Estudios sugieren que de acuerdo a la variante de *L. monocytogenes*, el tiempo usual de pasteurización a 72 °C durante 15 segundos -como es el caso de la leche de vaca- puede traducirse en una reducción decimal 10D (Lemaire, Cerf & Audurier, 1989). Tomando en consideración esta reducción se calculó la constante $KT_{72\text{ }^\circ\text{C}}$ presente en la Ecuación 5 con un valor de $KT_{72\text{ }^\circ\text{C}} = -1,5350$ y se despejó C_f en la Ecuación 6 para verificar la concentración final de microorganismos en la bebida después del tratamiento térmico a 72°C durante 37s, la cual dio un resultado de $C_f = 2,16 \times 10^{-12} \text{ UFC/g}$

$$KT_{72\text{ }^\circ\text{C}} = \frac{\ln\left(\frac{C_f}{C_i}\right)}{t} \quad (\text{Ecuación 5})$$

$$DT_{72^{\circ}C} = \frac{\ln\left(\frac{C_f}{C_i}\right)}{KT_{72^{\circ}C}} \quad (\text{Ecuación 6})$$

Reemplazo de Azúcar por Sucralosa

Para calcular la cantidad de sucralosa a usar se usó la Ecuación 7.

$$Cantidad_{sucralosa} = \frac{\%Sacarosa \text{ a reemplazar} * \text{Tamaño de porción}}{\text{Poder edulcorante sucralosa}} * 100\% \quad (\text{Ecuación 7})$$

Dispersión del cultivo probiótico

Se enfrió la bebida hasta 20 °C, se tomó una alícuota de 50 ml y se disolvió 0.04000 y 0.08000 g/L respectivamente del cultivo probiótico Nutrish BB12 ® en 10 mL de agua hervida a 20 °C, y se mezcló esta alícuota con el agua con probióticos y por último se integró con el resto de la bebida. Para la dosificación se siguieron las recomendaciones del proveedor con base en la concentración final deseada de probióticos (mínimo 10⁶ UFC/g) en concordancia con la norma NTE INEN 1334-3 (2011) que estipula que para poder declarar la relación entre consumo de probióticos con una mejor función digestiva, el microorganismo debe cumplir con 5 requisitos: estar vivo y no ser patógeno, resistir a jugos gástricos y ácidos biliares, tener la capacidad de adherirse a la mucosa intestinal, colonizar el intestino y sobrevivir a lo largo de la vida útil del producto y mantener la concentración de 10⁶ UFC/g de bacterias viables hasta terminado el final de la vida útil.

Recuento microbiológico

Antes de la dispersión del probiótico se realizó el recuento microbiológico de acuerdo a los requisitos de la Norma NTE INEN 3028 (2018) de bebida de soya no fermentada en cuanto a mohos y levaduras y aerobios mesófilos para asegurar que el medio es apto para el crecimiento de los probióticos. Para el caso de mohos y levaduras se realizó por método vertido en placa en el medio RBC (Rosa de Bengala) con 1 mL de

cada muestra de diluciones seriadas en agua de peptona de 10^0 , 10^{-1} y 10^{-2} , después incubación a 30°C por 72h. Mientras que el recuento de aerobios mesófilos se realizó por método directo en placas Petri film AC con 1mL de cada muestra de diluciones seriadas en agua de peptona de 10^0 , 10^{-1} y 10^{-2} , e incubación a 37°C por 48h. Todas las diluciones se sembraron por duplicado para el posterior recuento.

Recuento de probióticos

El recuento de probióticos viables en la bebida, siguió la metodología de Fachin et. al. (2008). Se preparó un cultivo en medio MRS agar con pH ajustado a 5.4 con HCl 37%. Se realizó una dilución seriada de la muestra en agua de peptona de 10^{-1} hasta 10^{-6} , y se usaron las diluciones 10^{-4} y 10^{-6} para la siembra en el medio MRS. Se aplicó un vertido en placa, con 1 mL de la muestra y 30 mL del medio de cultivo. Posteriormente se colocaron las cajas en fundas Gaspak con Anaerogen, se cerraron y almacenaron todas las fundas en una jarra Gaspak y se mantuvo a una temperatura de incubación de 37°C durante 72 horas en condiciones anaeróbicas. Las diluciones 10^{-4} y 10^{-6} se sembraron por duplicado para el posterior recuento. Para verificar la morfología de las bacterias y su pureza en el medio se realizó una tinción Gram.

Diseño experimental

Se aplicó un diseño completamente aleatorizado con arreglo factorial $2^2 \times 3$ (Tabla 1) con 2 réplicas, 12 tratamientos (Anexo A) y 24 unidades experimentales.

Tabla 1. Factores y niveles

Factores	Niveles
Proporción Cáñamo: Agua	1:5 1:6
Concentración de Maracuyá (%)	22 24
Relación azúcar + sucralosa (%)	12% Azúcar + 0% Sucralosa 6% Azúcar + 0.09% Sucralosa 3% Azúcar + 0.13% Sucralosa

Variables de salida.

La Tabla 2 muestra las variables de salida establecidas para evaluar los tratamientos y su orden de importancia. La medición de viscosidad siguió el método de García & Pacheco (2010) con ciertas modificaciones y se utilizó un viscosímetro marca Brookfield modelo DV-III Ultra, con el spindle LV2 a 30 rpm. Las especificaciones de las variables y los métodos utilizados estuvieron de acuerdo con la literatura, normas y métodos oficiales y datos del focus group.

Por otro lado, las variables también fueron ponderadas en función de la percepción de consumidores y la influencia en costos de producción. La relación existente entre el cáñamo y agua determina la viscosidad este es el factor más importante (Puntuación 3), a mayor viscosidad los consumidores pueden apreciar el producto como un tipo de yogurt vegano, mientras que, si se mantienen valores medios, se lo asocia con bebidas de avena. Las semillas de cáñamo son la segunda materia prima más costosa del producto con un precio de \$16,46 por Kg. Además, a mayor viscosidad la homogeneidad de dispersión de células probióticas en la matriz presenta mayor dificultad, reduciendo la probabilidad de crecimiento de los probióticos (Marcial, Knøchel & Nielsen, 2019). El pH de la bebida fue tomado en consideración como segundo factor más importante en la ponderación (Puntuación 2) debido a que afectaba de manera significativa al sabor y el regusto que

dejaba al consumir. Por último, el contenido de sólidos solubles tiene el último lugar en la ponderación (Puntuación 1), ya que afecta en la percepción de aporte nutricional y saludable de la bebida.

Tabla 2. Especificaciones de las variables de salida

Orden de importancia	Variable de salida	Mín	Max	Referencia rangos	Referencia métodos
3	Viscosidad (cP)	550	750	(Grasso, Miravalles & Mahony 2020)	(García & Pacheco, 2010)
2	pH	4,2	4,5	Focus group	AOAC 981.12
1	Sólidos solubles (°Brix)	0	15	(INEN NTE 2304)	NTE INEN-ISO 2173

Evaluación sensorial

Los mejores tratamientos del diseño experimental fueron evaluados mediante una prueba afectiva de aceptación con una escala hedónica de 5 puntos (5: “me gusta mucho” y 1: “me disgusta mucho”). Se analizaron 4 atributos (acidez, viscosidad, dulzor y sabor), además de la aceptación global (Anexo C y D). Se aplicó un diseño en bloques completamente al azar. Participaron 63 jueces consumidores (Ramírez, 2012), el día 17 de noviembre del 2022 entre las 9h30 hasta las 13h30 en el aula de evaluación sensorial de la Universidad San Francisco. El rango de edad fue entre 17 a 55 años teniendo proporciones semejantes entre hombres y mujeres. Se presentaron 25 mL de cada muestra a 4 °C, en vasos plásticos transparentes de poliestireno de 1 onza codificados con números aleatorios de tres dígitos (Tabla 7) con tres cucharas plásticas de HDPE para evaluar el atributo de viscosidad. Además, se añadió una galleta de soda cracker y agua para evitar interferencias en los sabores de cada muestra y limpiar el paladar.

Los datos fueron analizados en el software Minitab 19 a partir de un diseño completamente aleatorizado donde cada juez es un bloque.

Análisis proximal

Se realizó un análisis proximal de la formulación final determinada después del diseño experimental y evaluación sensorial. Para la cuantificación de nitrógeno proteico se usó el método de Kedhjal (AOAC 991.2), el método de Gerber para las grasas (AOAC 2000), el método de estufa de tiro forzado para la humedad y cenizas a 110°C y 550°C por 24 horas respectivamente (AOAC 925.10 & AOAC 923.03). Los carbohidratos como sugiere Nissen (1998) se determinaron por diferencia utilizando la Ecuación 6. Todas las muestras se realizaron por duplicado.

$$\%CHO = 100 - (\% Humedad + \%Proteínas + \% Cenizas + \%Grasa) \quad (\text{Ecuación 6})$$

Análisis estadístico

Mediante el software Minitab 19 los datos fueron evaluados usando análisis de varianza (ANOVA) y las medias por la prueba post hoc de Tukey con un nivel de significancia de 5%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Pruebas previas

La norma NTE INEN 2337 (2008) establece que los sólidos solubles mínimos de un jugo de maracuyá son de 12 °Brix y la norma NTE INEN 2304 (2017) de bebidas no carbonatadas un máximo de 15 °Brix. Se tomaron en consideración las normas previamente mencionadas debido a que actualmente no existe ninguna normativa que se ajuste al tipo de producto que se desarrolló. Se elaboraron diferentes prototipos para determinar el dulzor de la bebida, y se definió que el 12% de sacarosa era la mejor concentración. La mezcla entre azúcar y sucralosa determinó el dulzor final de la bebida, por lo que se realizó un reemplazo de sucralosa con base en la cantidad de sacarosa correspondiente para tener el mismo dulzor relativo (Ecuación 5).

La proporción semillas de cáñamo:agua utilizada para elaborar un extracto vegetal en el estudio de Mitchell & Shammet (2008) fue de 1:5. En el presente estudio en las pruebas preliminares se varió la proporción de semillas de cáñamo para encontrar una concentración apropiada y determinar los niveles del diseño factorial. Se pudo observar que concentraciones menores al 16.66% (relación cáñamo:agua 1:6) de agua generaron bebidas muy diluidas y de bajo sabor. Mientras que concentraciones mayores al 20% (relación cáñamo:agua 1:5) de cáñamo dejaban mayor regusto y viscosidad superior a la esperada. Berghofer et al. (2012) sugieren utilizar las semillas en un porcentaje del 15 al 25% y mantenerlas en remojo durante un tiempo de 5 a 12 horas en agua potable a temperatura de 5 a 35 °C.

En el presente estudio se hidrataron las semillas de cáñamo en agua proporción 1:1.5 durante 8 horas y se eliminó el agua de remojo. Varios estudios han demostrado en algunas leguminosas como la soya y el fréjol que el remojo promueve de manera significativa la reducción de ácido fítico, lo cual puede ser beneficioso para poblaciones que tienen ingestas pobres de minerales como el Magnesio, Zinc, Calcio y Hierro (Karkle & Beleia, 2010). El ácido fítico tiene una acción importante en la absorción de micro y macronutrientes, promueve la quelación de minerales divalentes y trivalentes como los previamente mencionados, además inhibe la enzima pepsina lo cual puede afectar la digestión de proteínas en el intestino delgado (Alamilla, 2018). Sin embargo, el consumo de fitatos en bajas cantidades por medio de la dieta ha reportado una diversidad de beneficios como la prevención de cálculos renales, protección contra la diabetes mellitus, caries, aterosclerosis y enfermedades coronarias, así como la protección contra varios tipos de cáncer (Fekadu, 2014).

Focus group.

La calificación promedio de cada muestra del focus group realizado se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Evaluación de muestras en focus group.

	Muestras	Calificación
1	0.25% goma xanthan pH 4.4	2,6
2	0.25% goma xanthan pH 3.9	2,1
3	0.25% goma xanthan pH 3.5	2,3
4	0.50% goma xanthan pH 4.4	3,9
5	0.75% goma xanthan pH 4.4	3,4

La muestra con mayor agrado de viscosidad fue la de 0.5%, sin embargo, ambas tenían un regusto amargo del maracuyá. Se comentó que el sabor de la muestra 3 y la viscosidad de la muestra 2 serían las más adecuadas para esta bebida. En cuanto a la acidez las muestras 4 y 5 que contenían ácido cítrico, no fueron del agrado de los jueces debido a su excesiva acidez. El punto isoeléctrico es el pH en el cual las proteínas tienen carga cero, esto provoca que tengan una mínima solubilidad y precipiten (Serpa, Hincapié & Álvarez, 2014). Es decir, que a pesar de que la bebida se homogenice, se añada emulsificantes y estabilizantes, las proteínas tenderán a precipitar y formar dos fases. Según Liu et al. (2022) en un pH de 3 a 5 existe una menor solubilidad que en un pH 2.5 a 3. Sin embargo, con base en el focus group un pH menor a 4.2 no fue agradable al paladar de los consumidores. Por tanto, no se ajustó el pH con ácido cítrico a valores menores de 4 en las muestras del diseño experimental a pesar de que estas presentaban precipitación leve.

VARIABLES DE SALIDA

El R^2 del pH fue de 88.84%, de los sólidos solubles 97,44% y de la viscosidad 80.07% (Anexo B). Sin embargo, el R^2 ajustado de este último parámetro fue menor al 70% por tanto se realizó una prueba de normalidad Anderson-Darling. El valor-p de esta prueba fue de 0.423, es decir, los datos siguieron una distribución normal, con un 95% de confianza (Anexo F). Además, todas las variables de salida cumplieron los supuestos de ANOVA que confirma una distribución normal. En el Anexo E se encuentra el análisis de varianza (ANOVA) de cada variable.

Tabla 4. Resumen de análisis de varianza (ANOVA) de la viscosidad, pH y ° Brix de los tratamientos.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Cuadrados medios		
		Viscosidad (cP)	pH	Sólidos solubles (° Brix)
Total	23	-	-	-
Modelo	11	12227,5*	0,021*	26,397*
Relación Cáñamo: Agua (A)	1	55994,2*	0,084*	0,602 ^{n.s.}
Concentración de Maracuyá (B)	1	26783,5*	0,115*	0,082 ^{n.s.}
Combinación Azúcar + Sucralosa (C)	2	19490,1*	0,002*	142,091*
Interacción A*B	1	3846,9 ^{n.s.}	0,007 ^{n.s.}	3,375*
Interacción A*C	2	355,9 ^{n.s.}	0,003 ^{n.s.}	0,208 ^{n.s.}
Interacción B*C	2	952,3 ^{n.s.}	0,006 ^{n.s.}	0,688 ^{n.s.}
Interacción A*B*C	2	3140,8 ^{n.s.}	0,004 ^{n.s.}	0,166 ^{n.s.}
Error	12	2789,5 ^{n.s.}	0,002 ^{n.s.}	0,636 ^{n.s.}

*Significativo a valor $p \leq 0,05$
^{n.s.} No significativo a valor $p > 0,05$

Tabla 5. Viscosidad, pH y sólidos solubles de los tratamientos.

Viscosidad (cP)			pH			Sólidos solubles (°Brix)		
T	Media ± DS		T	Media ± DS		T	Media ± DS	
4	858,05±2,47	A	9	4,62±0,00	A	12	18,03±0,04	A
3	834,80±4,95	A B	11	4,54±0,01	A B	9	17,88±1,45	A
8	745,05±2,47	A B C	7	4,53±0,02	A B	1	17,38±0,11	A
12	725,80±24,75	B C	8	4,51±0,01	A B	2	17,08±0,60	A
6	724,05±6,72	B C	10	4,49±0,02	A B C	4	13,08±0,04	B
11	716,60±83,01	B C	6	4,47±0,04	A B C	5	11,93±0,11	B C
10	703,13±94,36	B C	2	4,45±0,03	A B C D	8	11,83±0,04	B C
5	695,85±109,53	B C	1	4,44±0,05	A B C D	11	11,63±0,32	B C D
1	673,15±20,15	C	5	4,43±0,06	A B C D	7	9,98±2,02	B C D
2	653,90±7,07	C	3	4,36±0,11	B C D	3	9,68±0,32	C D
7	634,65±20,86	C	12	4,30±0,09	C D	6	8,98±0,88	C D
9	577,15±63,99	C	4	4,25±0,01	D	10	8,58±0,32	D

Las medias que no comparten letra son significativamente diferentes, por la prueba de Tukey con un 95% de confianza.

En la Tabla 4, se observó que la viscosidad estuvo influenciada por la relación cáñamo:agua, la concentración de pulpa de maracuyá y la combinación azúcar + sucralosa. Como es de esperar una mayor concentración de semillas y de pulpa implica una mayor viscosidad, no obstante, no se observó esta relación directamente proporcional con combinación de azúcar y sucralosa (Figura 2). Ramos (2021) reportó que un reemplazo parcial de azúcar por sucralosa en mermeladas tuvo un comportamiento no lineal en la viscosidad, que puede deberse a que la sucralosa se dispersa en maltodextrina

(Savitha, Indrani & Prakash, 2008). El tratamiento 4, 3 y 8 presentaron viscosidades mayores estadísticamente iguales (Tabla 5). Estos tratamientos tienen en común la relación cáñamo:agua (1:5), por lo que mayor concentración de la semilla tuvo un efecto significativo en el aumento de viscosidad. Dentro de las pruebas preliminares, las semillas tuvieron una alta capacidad de retención de líquido (64,5%), aumentando la viscosidad final de la bebida.

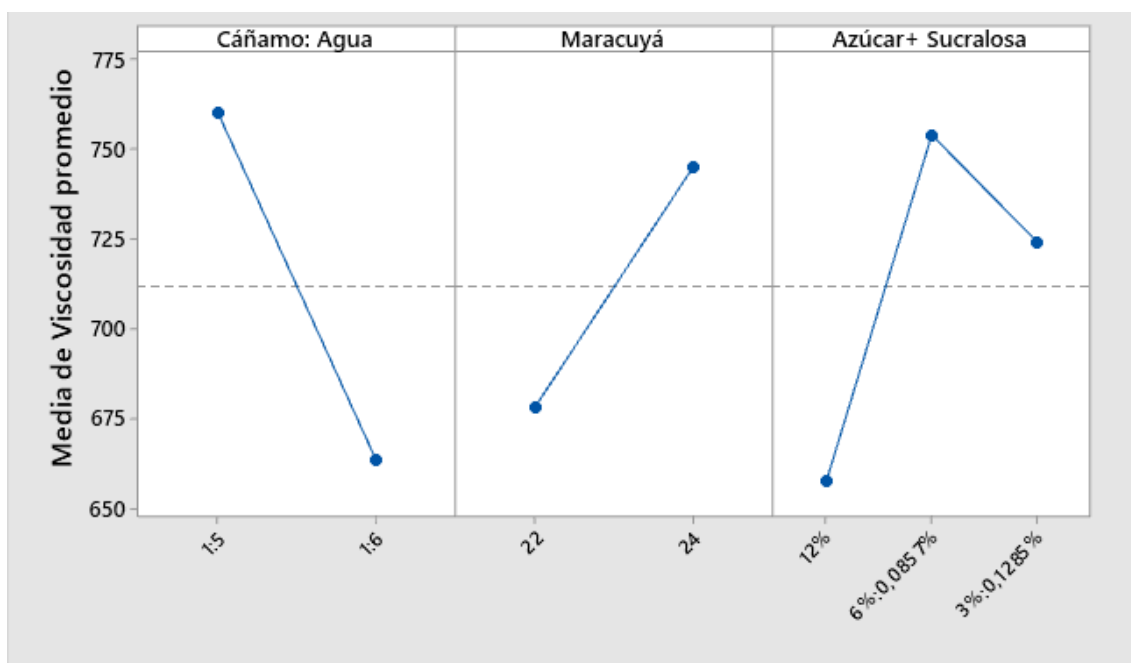


Figura 2. Efectos principales de viscosidad

Solo la concentración de cáñamo y maracuyá afectaron significativamente al pH ($p \leq 0.05$), a mayor concentración de estos más bajo es el pH. Este es el caso de los tratamientos 3,4 y 12 que comparten la relación cáñamo: agua (1:5) y concentración de maracuyá (24%), tuvieron un valor de pH significativamente diferente a los demás ($p \leq 0.05$).

Los tratamientos con mayor concentración de azúcar (12%) tuvieron mayor contenido de sólidos solubles ($p \leq 0.05$) (Tabla 5). De igual forma la interacción entre la

concentración de semillas de cáñamo y maracuyá tuvieron un efecto significativo de tendencia inversa (Figura 3).

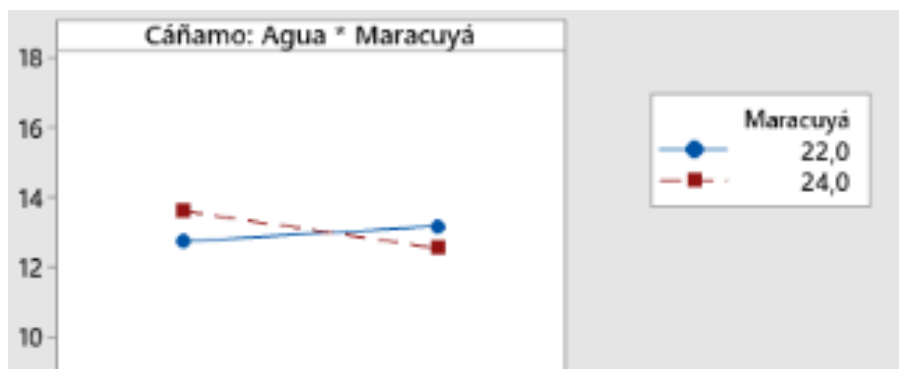


Figura 3. Interacción de factores para sólidos soluble

El orden de importancia de las variables de respuesta (Tabla 2), determinó a los tratamientos 5, 6 y 10 como los mejores (Tabla 6) y fueron analizados sensorialmente.

Tabla 6. Ponderación de los tratamientos

Tabla de ponderación				
Trat.	Parámetros			Suma
	Viscosidad	pH	Brix	
1	3	2	0	5
2	3	2	0	5
3	0	2	1	3
4	0	2	1	3
5	3	2	1	6
6	3	2	1	6
7	3	0	1	4
8	3	0	1	4
9	3	0	0	3
10	3	2	1	6
11	3	0	1	4
12	3	2	0	5

Evaluación Sensorial

Los tratamientos evaluados sensorialmente con su codificación respectiva se presentan en la Tabla 7.

Tabla 7. Tratamientos codificados para evaluación sensorial

N° de muestra	Variables de entrada	Codificación
5	1:6 cáñamo: agua, 24% maracuyá, 6% Az+0.09% Su	531
6	1:5 cáñamo: agua, 22% maracuyá, 3% Az+0.13% Su	745
10	1:6 cáñamo: agua, 24% maracuyá, 3% Az+0.13% Su	396

El análisis de varianza (ANOVA) de los atributos y de la percepción global no mostró diferencia significativa entre los tratamientos ($p \geq 0.05$), pero si existió para los jueces ($p \leq 0.05$), que puede deberse a que en esta prueba participaron consumidores. (Anexo G).

En el gráfico de araña se observa que las medias de todos los atributos y la percepción se ubicaron en la zona positiva de la escala (Figura 4) (Anexo H).

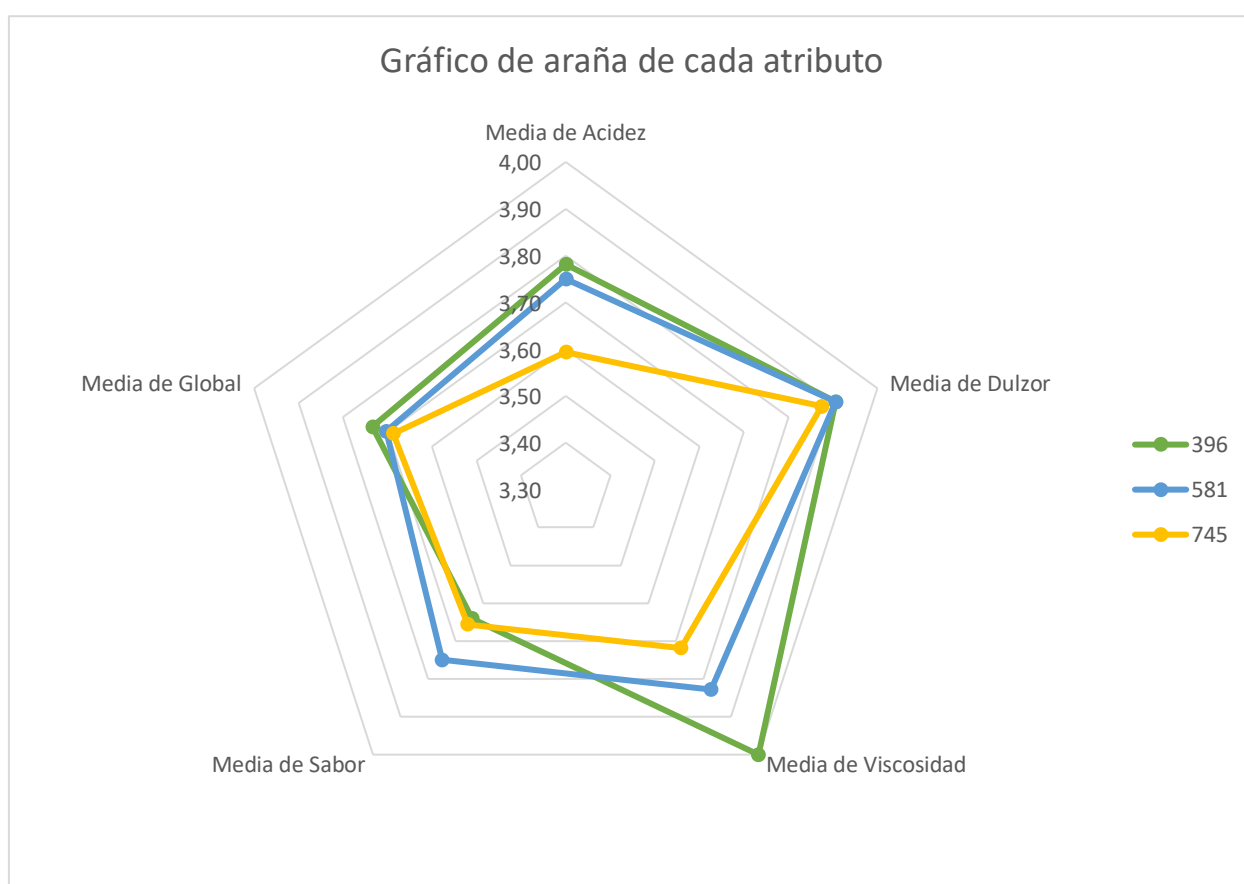


Figura 4. Diagrama de tela de araña.

Debido a que el tratamiento 5 (581) contenía mayor concentración de azúcar fue descartada, por el enfoque funcional y nutricional de la bebida. Los tratamientos 6 (745) y 10 (396), presentaban diferente concentración de pulpa de maracuyá y proporción cáñamo: agua. Tomando en consideración un análisis financiero el costo por porción del tratamiento 6 es de \$0.96 y del tratamiento 10 de \$0.89, lo cual se traduce en un

incremento aproximadamente de 7.8% . Por otro lado, tratamiento 10, al tener menos semillas de cáñamo, presentaría una menor rancidez oxidativa y por tanto una mayor vida útil. La rancidez oxidativa cuando los ácidos grasos insaturados en presencia de oxígeno reaccionan formando aldehídos, cetonas, alcoholes, entre otros compuestos que causan cambios sensoriales como aromas desagradables (Valenzuela, Sanhueza & Nieto, 2003). De igual forma, antioxidantes naturales como el ácido ascórbico y otros compuestos fenólicos presentes en el maracuyá pueden ayudar a reducir la rancidez oxidativa (Velazco, 2018; Carrera, 2016). El consumo de las semillas de cáñamo todavía es nuevo en el Ecuador y los consumidores no están acostumbrados al sabor por lo que menor cantidad de semillas de cáñamo y mayor concentración de pulpa de maracuyá se asemejaría a sabores conocidos para este mercado. Por estas razones se escogió la muestra 10 para los posteriores análisis de recuento microbiológico, inoculación de probiótico y análisis proximal.

Recuento microbiológico

El recuento microbiológico de Aerobios mesófilos totales realizado por duplicado en placas Petrifilm AC, mostró un resultado de 1000 UFC/g que se encuentra en el límite máximo de aceptación presente en la norma NTE INEN 3028 (2018) de bebida de soya. Debido a esto, se propuso un incremento en el tiempo de pasteurización y se mantuvo la temperatura para cumplir con criterios microbiológicos. Tomando en consideración esta concentración final de microorganismos tras la pasteurización a 72 °C durante 15 segundos, se calculó la concentración inicial con un valor de $C_i = 1 \times 10^{13}$ UFC/g. Después del tratamiento térmico propuesto de 37 segundos, la reducción decimal equivalente fue de 25D. Pasando de un valor inicial de 10^{13} UFC/g a uno final de $2,16 \times 10^{-12}$ UFC/g. De esta manera se asegura la calidad microbiológica de la bebida

para que sea apta para el cultivo de *Bifidobacterium* que se pretende inocular. En cuanto al recuento de mohos y levaduras no se encontraron estos microorganismos por lo que se descarta esta clase de contaminación.

Recuento de probióticos

La tinción gram permite caracterizar fenotípicamente de acuerdo a su tamaño y morfología celular a las bacterias presentes en una muestra. La observación realizada en un microscopio permitió verificar que las bacterias presentes eran bacilos gram positivos correspondiente con la definición de bacterias ácido-lácticas presentada por Sánchez (2020) y que no había contaminación significativa con otros microorganismos.

El recuento de probióticos viables en la bebida, con las dos concentraciones utilizadas se encuentran en la Tabla 8.

Tabla 8. Recuento de *Bifidobacterium lactis* en la bebida

Diluciones	Concentración Probióticos (UFC/g)	
	C ₁ = 0.04 g/L	C ₂ = 0.08 g/L
10 ⁻⁴	12,5 x 10 ⁶	19,89 x 10 ⁶
10 ⁻⁶	21 x 10 ⁶	48,5 x 10 ⁶
Promedio	16,75 x 10 ⁶	34,19 x 10 ⁶

La observación realizada en un microscopio as concentraciones C1 y C2 de *Bifidobacterium lactis* inoculados cumplieron con la normativa NTE INEN 1334-3 (2011), que estipula que para poder denominar un producto como probiótico debe existir un mínimo de bacterias vivas viables de 10⁶ UFC/g. Por motivos de tiempo, del estudio no se pudo llegar a determinar la viabilidad de los probióticos transcurrido un tiempo determinado. Sin embargo, para futura referencia el recuento debe realizarse al inicio de

la inoculación y una vez transcurrido el tiempo de vida útil propuesto para verificar que se mantenga la concentración mínima requerida. Bevilacqua et al. (2013) señala ciertas ecuaciones para poder calcular la viabilidad de los probióticos en jugos ácidos utilizando ecuaciones lineales y reducciones logarítmicas en periodos señalados, esto se asemeja al presente estudio ya que la pulpa de maracuyá de la bebida aporta una acidez similar a los jugos ácidos previamente mencionados.

En la actualidad, existe una demanda incremental de bebidas no lácteas con probióticos, entre las cuales destacan las matrices basadas en soya, arroz y coco. Estas se consideran como vehículos apropiados para conservar los probióticos durante su vida útil (Rasika et al., 2021). Además, Nissen, di Carlo & Gianotti (2020) sugieren que las bebidas con base en semillas de cáñamo tienen una fuerte acción prebiótica al promover el crecimiento de probióticos como *Lactobacillus fermentum*, *Lb. Plantarum* y *Bifidobacterium bifidum* e incrementan ciertos compuestos bioactivos favorables.

Los probióticos NUTRISH ® BB-12, constituyen la materia prima más costosa dentro de la bebida (\$71.39/sobre de 25g) por lo que, si ambas concentraciones se mantienen viables transcurrido el tiempo de almacenamiento, es recomendable utilizar C₁ debido a que representaría un menor costo de producción para el producto final. La bebida debe ser almacenada a temperatura de refrigeración (4 °C) para mantener viables las bacterias, y evitar una posible fermentación. Según CHR HANSEN (2019), el cultivo BB-12 es termofílico, por lo que temperatura ambiente o más elevada puede suponer un riesgo para la calidad microbiológica del producto y causar una fermentación no deseada de la bebida.

Análisis proximal

A continuación se presenta en la tabla 9 el análisis proximal.

Tabla 9. Análisis proximal de la bebida

Componentes	g/100g	Gramos por porción (240g)	VDR%
Humedad	77,79	-	-
Cenizas	0,47	-	-
Grasa total	3,40	8,16	12,6
Proteína	2,54	6,09	12,2
Carbohidratos Totales	15,80	37,92	12,6
Azúcares Totales	9,78	26,29	-
*Fibra Total	6,50	15,60	62,4

**Valor calculado por bibliografía*

La bebida de cáñamo aporta con 226,1 Kcal por porción (Anexo I). Además, (Anexo F) es una bebida media en grasa y azúcar según la rotulación RTE INEN 022 (2014).

La mayor proporción de grasa es dada por las semillas de cáñamo. Según Zajac et al., (2019) las semillas presentan un 33.6% de proteína y un 51.17% de grasa de la cual el 80% corresponde a ácidos grasos poliinsaturados destacándose el omega 3 y omega 6 en una proporción 1:3. La fibra alimentaria es aportada por la goma xanthan, la inulina y semillas de cáñamo. Según Pendergrass & Rafi (2019) la goma xanthan es 100% fibra dietaria, mientras que las semillas descascaradas tienen aproximadamente 13,5% de fibra (Zajac et al., 2019). Por su parte la pulpa de maracuyá utilizada (marca Yucho), declara

en su tabla nutricional que no contiene fibra dietaria, por lo que se descarta este ingrediente como aporte de fibra. Mediante datos bibliográficos y cálculos se determinó que la bebida aporta un 62% del VDR de fibra. Flores (2019) recomienda una ingesta entre 25 a 38 g de fibra por día, para una buena salud gastrointestinal.

A pesar de que se había calculado la adición de sacarosa para obtener un porcentaje de azúcares totales bajo, la pulpa de maracuyá aporta sólidos solubles propios de la fruta, dando como resultado una bebida media en azúcar. Además, se pudo constatar que la inulina causa una interferencia en la medición de °Brix con el refractómetro debido a que está compuesta por fructanos, los cuales tienen propiedades de refracción la luz y al momento de medir los sólidos solubles pueden generar valores incorrectos. Este es el mismo caso de las semillas de cáñamo. Es por esta razón que para el cálculo de azúcares totales se midió a partir de una bebida sin inulina.

CONCLUSIÓN

Se desarrolló una bebida de cáñamo y maracuyá, resaltando las propiedades funcionales de estas dos materias primas. La bebida es media en azúcar y grasa, siendo el 80% de estas grasas poliinsaturadas, con efecto positivo en el perfil lipídico. El mejor tratamiento por su pH, viscosidad y sólidos solubles fue el de proporción cáñamo: agua 1:6, concentración de pulpa de maracuyá de 24% y combinación Azúcar-Sucralosa 3% + 0.13%. Se logró inocular exitosamente los probióticos *Bifidobacterium lactis spp.* en la bebida. A pesar de que no existió diferencias significativas en la evaluación sensorial, los tres tratamientos analizados se ubicaron en la zona positiva de la escala en todos los atributos y en la percepción global (3.73-3.69) en una escala hedónica de 5 puntos, lo que muestra una posible inserción del producto en el mercado ecuatoriano.

REFERENCIAS

- Adams & Moss (2016). *Food microbiology*. Royal Society of chemistry. (4ta ed.). RSC publishing
- Alamilla, A. (2018). *Acción quelante del ácido fítico en relación con minerales esenciales*. Instituto Politécnico Nacional. Recuperado de:
<https://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/26851/Acción%20quelante%20del%20ácido%20f%C3%ADtico%20en%20relaci%C3%B3n%20a%20minerales%20esenciales.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Aluko, R. E. (2017). Hemp seed (*Cannabis sativa* L.) proteins: composition, structure, enzymatic modification, and functional or bioactive properties. In *Sustainable protein sources* (pp. 121-132). Academic Press.
- AOAC International. (2012). *Official methods of AOAC International*.
- Babiker, E. E., Uslu, N., Al Juhaimi, F., Ahmed, I. A. M., Ghafoor, K., Özcan, M. M., & Almusallam, I. A. (2021). *Effect of roasting on antioxidative properties, polyphenol profile and fatty acids composition of hemp (Cannabis sativa L.) seeds*. LWT, 139, 110537.
- Berghofer, E., Pollman, K., Traby, M., & Frenkenberger, C. (2012, May 15). *Method for Producing Hemp Milk*.
- Besir, A., Awad, N., Mortas, M. & Yazici, F. (2022). *A Plant-Based Milk Type: Hemp Seed Milk*. Akademik Gıda. Recuperado de:
https://www.researchgate.net/publication/362327090_A_Plant-Based_Milk_Type_Hemp_Seed_Milk
- Bevilacqua et al. (2013). *Suitability of Bifidobacterium spp. and Lactobacillus plantarum as Probiotics Intended for Fruit Juices Containing Citrus Extracts*.

Journal of Food Science, 78: M1764-M1771. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12280>

- Breyman, J., Chaves, C., & Arias, M. L. (2013). Análisis de la calidad microbiológica y potencial presencia de *Listeria monocytogenes* en pulpas de guanábana (*Annona muricata*), mango (*Mangifera indica*) y maracuyá (*Passiflora edulis*) costarricenses. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 63(1), 53-57.
- Burton, R. A., Andres, M., Cole, M., Cowley, J. M., & Augustin, M. A. (2022). *Industrial hemp seed: from the field to value-added food ingredients*. *Journal of Cannabis Research*, 4(1), 1-13.
- Callaway, J. C. (2004). *Hempseed as a nutritional resource: An overview*. *Euphytica*, 140(1), 65-72.
- Carrera, A. I. H. (2016). Evaluación del estilbeno piceatannol como posible inhibidor adipogénico y evaluación de la capacidad antioxidante del maracuyá (*Passiflora edulis*) ante el estrés oxidativo inducido en el modelo biológico *Caenorhabditis elegans*.
- CHR HANSEN. (2019). *Nu-trish® BB-12®*. Product Information.
- Fachin, L., Moryia, J., Neves Gândara, A. L., & Viotto, W. H. (2008). Evaluation of culture media for counts of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb 12 in yoghurt after refrigerated storage. *Brazilian journal of microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 39(2), 357–361. <https://doi.org/10.1590/S1517-838220080002000029>
- Fekadu, H. (2014). *Potential Health Benefits and Adverse Effects Associated with Phytate in foods: A Review*. *Global Journal of Medical research: (K)*. XIC Issue III Version I. 23-29. Recuperado de:

https://www.researchgate.net/publication/277813411_Potential_Health_Benefits_and_Adverse_Effects_Associated_with_Phytate_in_Foods_A_Review_Potential_Health_Benefits_and_Adverse_Effects_Associated_with_Phytate_in_Foods_A_Review

FMI. (2021). *Plant-based Milk Market*. Recuperado 26 de septiembre de 2022, de

<https://www.futuremarketinsights.com/reports/plant-based-milk-market>

García, A., & Pacheco-Delahaye, E. (2010). Evaluación de de una bebida láctea instantánea a base de harina de arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*) con la adición de ácido fólico. *Revista chilena de nutrición*, 37(4), 480-492.

Girgih, A. T., Alashi, A. M., He, R., Malomo, S. A., Raj, P., Netticadan, T., & Aluko, R. E. (2014). *A novel hemp seed meal protein hydrolysate reduces oxidative stress factors in spontaneously hypertensive rats*. *Nutrients*, 6(12), 5652-5666.

Grand View Research. (2022). *Legal Cannabis Market Size, Share & Trends Analysis Report By Source (Marijuana, Hemp), By Derivative (CBD, THC), By End Use (Medical Use, Recreational Use, Industrial Use), By Region, And Segment Forecasts, 2022 – 2030. Market Analysis Report*. Recuperado de: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/legal-cannabis-market>

Grasso, N., Alonso-Miravalles, L., & O'Mahony, J. A. (2020). Composition, physicochemical and sensorial properties of commercial plant-based yogurts. *Foods*, 9(3), 252.

Haas, R., Schnepps, A., Pichler, A., & Meixner, O. (2019). *Cow milk versus plant-based milk substitutes: A comparison of product image and motivational structure of consumption*. *Sustainability*, 11(18), 5046.

INEN (2011). Rotulado de productos alimenticios para consumo humano. Parte 3.

Requisitos para declaraciones nutricionales y declaraciones saludables. Servicio Ecuatoriano de Normalización. Recuperado de:

<https://www.controlsanitario.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2016/12/NTE-INEN-1334-3-Rotulado-de-Productos-Alimenticios-para-consumo-Humano-parte-3.pdf>

INEN (2014). *Rotulado de productos alimenticios procesados, envasados y*

empaquetados. Servicio Ecuatoriano de Normalización. Recuperado de:

https://www.controlsanitario.gob.ec/wpcontent/uploads/downloads/2018/09/RE2-2-2R_Rotulado_alimentos_procesados-1.pdf

INEN. (2008). *NTE INEN 2 337. JUGOS, PULPAS, CONCENTRADOS, NECTARES, BEBIDAS DE FRUTAS Y VEGETALES. REQUISITOS*. Servicio ecuatoriano de normalización. <https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/2337.pdf>

INEN. (2017). *INEN NTE 2304. REFRESCOS O BEBIDAS NO CARBONATADAS. REQUISITOS*. Servicio ecuatoriano de normalización.

https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/nte_inen_2304-1.pdf

INEN. (2018). *INEN NTE 3028 BEBIDAS DE SOYA NO FERMENTADA.*

REQUISITOS. Servicio ecuatoriano de normalización.

https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/nte_inen_3028.pdf

Ivankovich-Guillén, C. I., & Araya-Quesada, Y. (2011). *Focus groups: técnica de investigación cualitativa en investigación de mercados*. Revista de Ciencias Económicas, 29(1).

- Juárez, C. (2020). *Cannabis y los ingredientes de CBD, tendencia culinaria en EUA*. The Food Tech. Recuperado de: <https://thefoodtech.com/tendencias-de-consumo/cannabis-y-los-ingredientes-de-cbd-tendencia-culinaria-en-eua/>
- Juárez, C. (2020). *La intolerancia a la lactosa en America Latina*. The Food Tech. Recuperado de: <https://thefoodtech.com/ingredientes-y-aditivos-alimentarios/la-intolerancia-a-la-lactosa-en-america-latina/>
- Jurgoński, A., Opyd, P. M., & Fotschki, B. (2020). *Effects of native or partially defatted hemp seeds on hindgut function, antioxidant status and lipid metabolism in diet-induced obese rats*. *Journal of Functional Foods*, 72, 104071.
- Karkle, E. & Beleia, A. (2010). *Effect of soaking and cooking on phytate concentration, minerals, and texture of food-type soybeans*. *Science and Food Technology*, Campinas, 30(4): 1056-1060.
- Landázuri, P., Loango Chamorro, N., Aguillón Osma, J., Restrepo Cortés, B., Monsalve Bedoya, V., & Maldonado Celis, M. E. (2021). *Descripción, características y beneficios de Passiflora edulis: parchita, fruto de la pasión, maracuyá*.
- Lemaire, V., Cerf, O., & Audurier, A. (1989). Thermal resistance of *Listeria monocytogenes*. *Annales de recherches veterinaires. Annals of veterinary research*, 20(4), 493–500.
- Liu, M., Toth, J. A., Childs, M., Smart, L. B., & Abbasporrad, A. (2022). *Composition and Functional Properties of Hemp Seed Protein Isolates from Various Hemp Cultivars*. bioRxiv.
- MAGAP. (2020). *Acuerdo ministerial N° 109*. Ministerio de agricultura. Recuperado 5 de octubre de 2022, de <https://www.agricultura.gob.ec/wp-content/uploads/2020/10/109-2020-1.pdf>

- Marcial, M., Knöchel, S., & Nielsen, (2019). Low-moisture food matrices as probiotic carriers. *FEMS Microbiology Letters*, 366(2), fnz006.
- Mitchell, P. R., & Shammet, K. M. (2008, October 2). *Hemp Food Product Base and Processes*.
- MSP. (2013). *Reglamento sanitario de etiquetado de alimentos procesados para el consumo humano (acuerdo no. 00004522)*
- Nissen, S. (1998). *Food Analysis Second Edition*. An Aspen Publication. Gaithersburg, Maryland, USA.
- Nissen, L., di Carlo, E. & Gianotti, A. (2020). *Prebiotic potential of hemp blended drinks fermented by probiotics*. *Food Research International*, Volume 131. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109029>.
- Ocampo, J., Urrea, R., Wyckhuys, K., & Salazar, M. (2013). *Exploración de la variabilidad genética del maracuyá (Passiflora edulis f. flavicarpa Degener) como base para un programa de fitomejoramiento en Colombia*. *Acta agronómica*, 62(4), 352-360.
- Onofre, D. (2022). *Situación actual y análisis de la cadena productiva de cáñamo*. En *Bioable Primer congreso multisectorial de CBD agosto 2022*.
- Pendergrass, K., & Rafi, Z. (2019). *Should Xanthan Gum be allowed in Grain-Free, Paleo, and Keto Certified Standards?* Paleofoundation.com. <https://paleofoundation.com/wp-content/uploads/2021/09/Xanthan-Gum-Toxic.pdf>
- Ramírez-Navas, J. S. (2012). *Análisis sensorial: pruebas orientadas al consumidor*. *Revista ReCiTeIA*.

Ramos Romero, A. A. (2021). Efecto edulcorante de la sucralosa en la elaboración de mermeladas.

Rasika, D., et al. (2021). *Plant-based milk substitutes as emerging probiotic carriers*. Current Opinion in Food Science. Volume 38, Pages 8-20.
<https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.10.025>.

Sánchez, J. (2020). *Evaluación de la viabilidad de las bacterias ácido-lácticas usadas para la elaboración de yogurt frente a fluido gástrico simulado*. Universidad Central del Ecuador. Recuperado de:
<http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/21958/1/T-UCE-0008-CQU-242.pdf>

Savitha, Y. S., Indrani, D., & Prakash, J. (2008). Effect of replacement of sugar with sucralose and maltodextrin on rheological characteristics of wheat flour dough and quality of soft dough biscuits. *Journal of Texture studies*, 39(6), 605-616.

Serpa Guerra, A. M., Hincapié Llano, G., & Álvarez López, C. (2014). *Determinación del punto isoeléctrico de las proteínas presentes en cuatro fuentes foliares: yuca (Manihot esculenta Crank) variedades verónica y tai, jatropha (Jatropha curcas L.) y gmelina (Gmelina arborea)*. *Prospectiva*, 12(1), 30-39.

SIPA. Sistema de información pública agropecuaria (2022). *Cifras Agroproductivas*. Ministerio de Agricultura. Recuperado 21 de septiembre de 2022, de
<http://sipa.agricultura.gob.ec/index.php/cifras-agroproductivas>

Tetrapack. (2021). *Manténgase al día con las tendencias del consumidor*. Tetrapack Casos y Artículos. Recuperado de: <https://www.tetrapak.com/es-es/insights/cases-articles/stay-on-top-of-consumer-trends>

- Valenzuela, A., Sanhueza, J., & Nieto, S. (2003). *Natural antioxidants in functional foods: from food safety to health benefits*. *Grasas y aceites*, 54(3), 295-303.
- Velazco López, A. B. (2018). Aplicación del ácido L-ascórbico en la prevención del desarrollo de la rancidez oxidativa en filetes de jurel (*Trachurus Picturatus* Murphyi) congelado.
- Viera, W., Brito, B., Zambrano, E., Ron, L., Merino, J., Campaña, D., & Álvarez, H. (2020). *Genotype x environment interaction in the yield and fruit quality of passion fruit germplasm grown in the Ecuadorian Littoral*. *International Journal of Fruit Science*, 20(sup3), S1829-S1844.
- Vizmanos, B., Hunot, C. & Capdevila, F. (2006). *Alimentación y Obesidad*. Investigación en Salud, vol. VIII, núm. 2, agosto, 2006, pp. 79-85. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/pdf/142/14280204.pdf>
- Zajac, M.; Guzik, P.; Kulawik, P.; Tkaczewska, J.; Florkiewicz, A.; Migdał, W. (2019). *The quality of pork loaves with the addition of hemp seeds, de-hulled hemp seeds, hemp protein and hemp flour*. *LWT*, 105(), 190–199. doi:10.1016/j.lwt.2019.02.013

ANEXOS

Anexo A. Tratamientos del diseño experimental

Tratamientos	Variables de entrada		
	Cáñamo: Agua	Maracuyá (%)	Azúcar + Sucralosa (%)
1	1:5	22	12:0
2	1:6	24	12:0
3	1:5	24	3:0,13
4	1:5	24	6:0,09
5	1:6	24	6:0,09
6	1:5	22	3:0,13
7	1:6	22	3:0,13
8	1:5	22	6:0,09
9	1:6	22	12:0
10	1:6	24	6:0,09
11	1:6	22	6:0,09
12	1:5	24	12:0

Anexo B. Coeficiente de determinación de las variables

Variables	R ²	R ² ajustado
Viscosidad	80,07	61,81
pH	88,84	78,62
Sólidos solubles	97,44	95,09

Anexo C. Consentimiento informado evaluación sensorial

Consentimiento Informado

Yo _____ declaro que he sido informado e invitado a participar en una evaluación sensorial denominada “Escala Hedónica”, este es un proyecto de titulación con el respaldo y financiamiento de la Universidad San Francisco de Quito y la carrera de Ingeniería en Alimentos.

Entiendo que este estudio busca conocer el nivel de agrado de una bebida simbiótica a base de semillas de cáñamo y maracuyá y sé que mi participación consistirá en responder una encuesta que demorará alrededor de 15 minutos. Me han explicado que la información registrada será confidencial.

Estoy en pleno conocimiento de que las muestras pueden contener maracuyá, soya, azúcar y semillas de cáñamo (no contienen CBD ni THC) y que no tengo ninguna restricción personal o médica que me prohíba ingerir estos alimentos.

Asimismo, sé que puedo negar la participación o retirarme en cualquier etapa de la investigación, sin expresión de causa ni consecuencias negativas para mi.

Sí, acepto voluntariamente participar en este estudio.

Firma participante:

X _____

C.I. _____

Anexo D. Cuestionario evaluación sensorial

Nombre: _____
 Fecha: 17/11/2022

Sexo: M/F
 Edad: _____

Frente a usted se presentan tres muestras de bebida de semillas de cáñamo y maracuyá. Por favor, pruebe las muestras de izquierda a derecha y evalúe cada uno de los atributos indicados, además de su percepción global. Escriba el número de la escala establecida de acuerdo con su criterio en el casillero correspondiente a cada muestra según el atributo evaluado. Entre las evaluaciones de las muestras pruebe un trozo de galleta, enjuague su boca con agua y espere 30 segundos para evitar interferencias en los sabores entre las muestras.

En caso de tener algún comentario o anotación, se dispone el espacio al final para este propósito. Todas sus opiniones son tomadas en consideración.

5	Me gusta mucho
4	Me gusta moderadamente
3	No me gusta ni me disgusta
2	Me disgusta moderadamente
1	Me disgusta mucho

1. Acidez

581	745	396

2. Viscosidad

581	745	396

4. Sabor

581	745	396

3. Dulzor

581	745	396

5. Percepción global

581	745	396

Comentarios:

¡Gracias por participar!

Anexo E. ANOVA variables de salida

Tabla 10. Análisis de varianza (ANOVA) de la viscosidad de los tratamientos

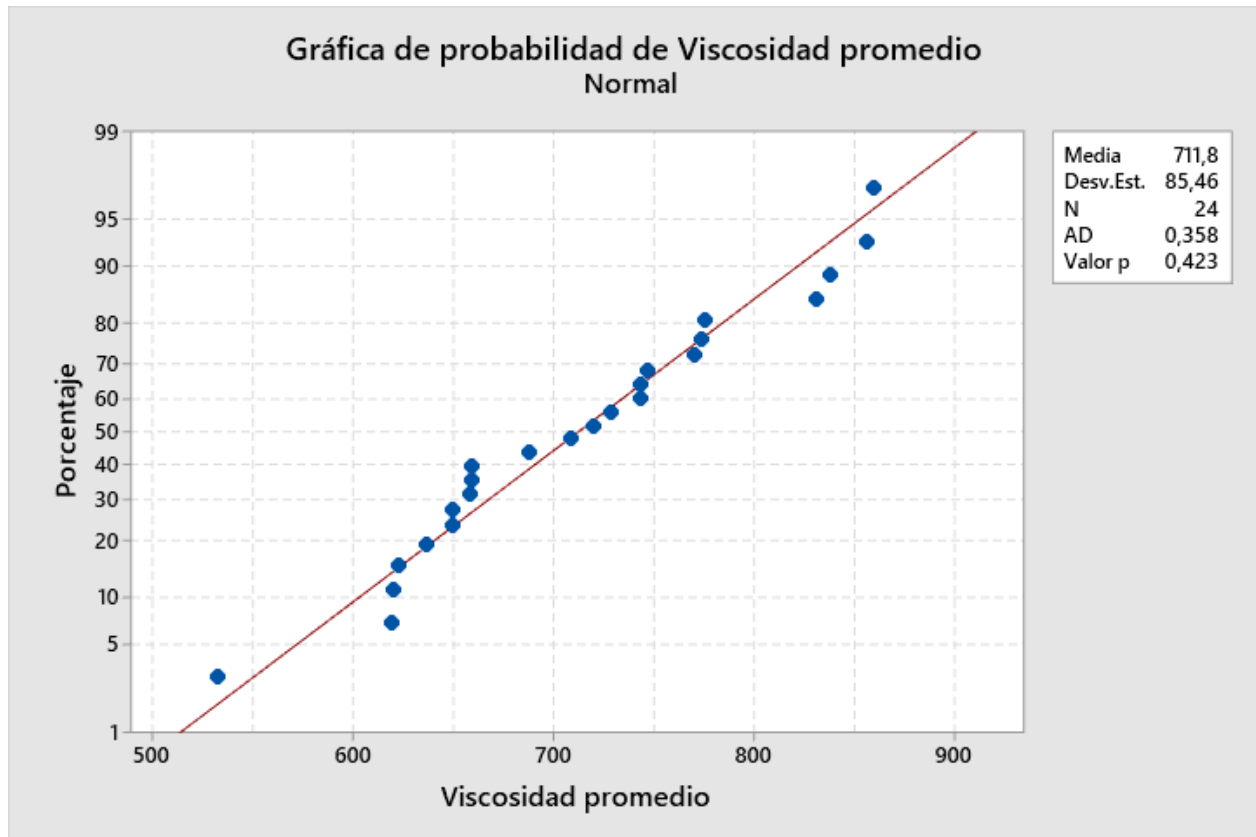
Fuentes de variación	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor P
Total	23	167976		
Modelo	11	134503	12227,5	0,009*
Factor A: Cáñamo: Azúcar	1	55994	55994,2	0,001*
Factor B: Maracuyá	1	26783	26783,5	0,009*
Factor C: Azúcar + Sucralosa	2	38980	19490,1	0,01*
Interacción A*B	1	3847	3846,9	0,263 ^{n.s}
Interacción A*C	2	712	355,9	0,881 ^{n.s}
Interacción B*C	2	1905	952,3	0,717 ^{n.s}
Interacción A*B*C	2	6282	3140,8	0,356 ^{n.s}
Error	12	33474	2789,5	

Tabla 11. Análisis de varianza (ANOVA) del pH de los tratamientos

Fuentes de variación	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor P
Total	23	0,265783		
Modelo	11	0,236133	0,021467	0,000*
Factor A: Cáñamo: Azúcar	1	0,084017	0,084017	0,000*
Factor B: Maracuyá	1	0,114817	0,114817	0,000*
Factor C: Azúcar + Sucralosa	2	0,003815	0,001907	0,484 ^{n.s}
Interacción A*B	1	0,006667	0,006667	0,126 ^{n.s}
Interacción A*C	2	0,005715	0,002857	0,347 ^{n.s}
Interacción B*C	2	0,012540	0,006270	0,120 ^{n.s}
Interacción A*B*C	2	0,008565	0,004282	0,218 ^{n.s}
Error	12	0,029650	0,002471	

Tabla 12. Análisis de varianza (ANOVA) de los sólidos solubles de los tratamientos

Fuentes de variación	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor P
Total	23	298,000		
Modelo	11	290,365	26,397	0,000*
Factor A: Cáñamo: Azúcar	1	0,602	0,602	0,350 ^{n.s}
Factor B: Maracuyá	1	0,082	0,082	0,726 ^{n.s}
Factor C: Azúcar + Sucralosa	2	284,182	142,091	0,000*
Interacción A*B	1	3,375	3,375	0,040*
Interacción A*C	2	0,416	0,208	0,727 ^{n.s}
Interacción B*C	2	1,376	0,688	0,370 ^{n.s}
Interacción A*B*C	2	0,333	0,166	0,774 ^{n.s}
Error	12	7,635	0,636	

Anexo F. Prueba de normalidad Anderson- Darling de la viscosidad

Anexo G. ANOVA atributos evaluación sensorial

Tabla 13. Análisis de varianza (ANOVA) de acidez de los tratamientos

Fuente de variación	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor p
Panelista	63	91,667	1,4550	0,013*
Muestra	2	1,292	0,6458	0,494 ^{n.s}
Error	126	114,708	0,9104	
Total	191	207,667		

*Significativo a valor $p \leq 0,05$

n.s. No significativo a valor $p > 0,05$

Tabla 14. Análisis de varianza (ANOVA) de viscosidad de los tratamientos

Fuente de variación	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor p
Panelista	63	94,620	1,5019	0,000*
Muestra	2	2,573	1,2865	0,161 ^{n.s}
Error	126	87,427	0,6939	
Total	191	184,620		

*Significativo a valor $p \leq 0,05$

n.s. No significativo a valor $p > 0,05$

Tabla 15. Análisis de varianza (ANOVA) de dulzor de los tratamientos

Fuente de variación	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor p
Panelista	63	97,917	1,55423	0,000*
Muestra	2	0,042	0,02083	0,972 ^{n.s}
Error	126	91,958	0,72983	
Total	191	189,917		

*Significativo a valor $p \leq 0,05$

n.s. No significativo a valor $p > 0,05$

Tabla 16. Análisis de varianza (ANOVA) de Sabor de los tratamientos

Fuente de variación	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor p
Panelista	63	88,286	1,4014	0,009*
Muestra	2	0,448	0,2240	0,768 ^{n.s}
Error	126	106,885	0,8483	
Total	191	195,620		

*Significativo a valor $p \leq 0,05$

n.s. No significativo a valor $p > 0,05$

Tabla 17. Análisis de varianza (ANOVA) de Percepción Global de los tratamientos

Fuente de variación	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor p
Panelista	63	67,000	1,06349	0,032*
Muestra	2	0,073	0,03646	0,951 ^{n.s}
Error	126	90,594	0,71900	
Total	191	157,667		

**Significativo a valor $p \leq 0,05$*

n.s. No significativo a valor $p > 0,05$

Anexo H. Resultados escala hedónica

Atributos	Muestras		
	396 ¹	581 ²	745 ³
Acidez	3,78±1,08	3,75±0,96	3,59±1,09
Dulzor	3,91±0,99	3,91±1,06	3,88±0,95
Viscosidad	4,00±0,89	3,83±0,94	3,72±1,11
Sabor	3,64±1,07	3,75±0,94	3,66±1,03
Global	3,73±0,84	3,70±1,02	3,69±0,87

Media ± DS (n=63). (1) 1:6 cáñamo: agua, 24% maracuyá, 3% Azúcar+0.13% Sucralosa (2) 1:6 cáñamo: agua, 24% maracuyá, 6% Azúcar+0.09% Sucralosa. (3) 1:6 cáñamo: agua, 24% maracuyá, 3% Azúcar +0.13% Sucralosa.

Anexo I. Tabla nutricional

Información Nutricional	
Tamaño por porción: 240g	
Cantidad por porción	
Energía (Calorías)	230 kcal (962 kJ)
Energía de grasa (calorías de grasa)	70 kcal (293 kJ)
%VDR*	
Grasa Total 8g	13%
Grasas saturadas 1g	6%
Grasas insaturadas 7g	-
Grasas trans 0mg	0%
Colesterol 0mg	0%
Sodio 0mg	0%
Carbohidratos totales 38g	13%
Azúcares totales 38g	-
Fibra total 23,5g	62%
Proteína 6g	12%
*Los porcentajes de Valor Diario recomendado (%VDR) están basados en una dieta de 8380KJ (2000Kcal)	

Anexo J. Semáforo nutricional