

<https://doi.org/10.69639/arandu.v13i1.1990>

Caracterización de una bebida fermentada a base de granada (*Punica granatum*) y mucílago de cacao (*Theobroma cacao* L.) con potencial probiótico

*Characterization of a fermented beverage made from pomegranate (*Punica granatum*) and cocoa mucilage (*Theobroma cacao* L.) with probiotic potential*

Andry Annabel Alvarez-Aspiazu

aalvareza@uteq.edu.ec

<https://orcid.org/0000-0003-4668-1596>

Universidad Técnica Estatal de Quevedo
Quevedo, Los Ríos, Ecuador

Andrés Fernando Ramírez Cruz

aramirez3c@uteq.edu.ec

<https://orcid.org/0000-0003-3758-7952>

Universidad Técnica Estatal de Quevedo
Quevedo, Los Ríos, Ecuador

Dustin Jesús Zambrano Pérez

dzambranop4@uteq.edu.ec

<https://orcid.org/0009-0001-8396-1012>

Universidad Técnica Estatal de Quevedo
Quevedo, Los Ríos, Ecuador

Karla Stefania Tapia Garcia

ktapiag@uteq.edu.ec

<https://orcid.org/0009-0005-9157-3852>

Universidad Técnica Estatal de Quevedo
Quevedo, Los Ríos, Ecuador

Artículo recibido: 10 enero 2026 -Aceptado para publicación: 20 febrero 2026
Conflictos de intereses: Ninguno que declarar.

RESUMEN

La importancia de este estudio radica no solo en la creación de un producto innovador, sino también en la valorización de subproductos como el mucílago de cacao. Este proyecto de investigación tiene como objetivo la caracterización tanto fisicoquímica, sensorial y microbiológica de una bebida fermentada a partir de la fermentación de granada (*Punica granatum*) y mucílago de cacao (*Theobroma cacao* L.). Para su elaboración se implementó un DCA aleatorio de 3 tratamientos x 5 repeticiones dando como resultados 15 unidades experimentales cada una de 1 litro. Para los análisis fisicoquímicos establecimos sólidos solubles (°brix), pH, acidez titulable, mientras que para la tabulación de datos se utilizó un modelo ANOVA con prueba de Tukey (>0.05) con el fin de determinar si la adición de microorganismos probióticos podría cambiar los aspectos fisicoquímicos de la bebida. Para analizar el perfil sensorial y la aceptabilidad de la bebida se estableció una prueba de cata con 75 panelistas. Se

establecieron análisis de crecimiento microbiano con variabilidad de los tratamientos en el tiempo (0, 7, 14, 21) días, *E-coli*, *Salmonella spp.* y mohos y levaduras del mejor tratamiento, estos resultados se tabularon con un ANOVA con prueba de Tukey (>0.05). Los microorganismos utilizados no afectaron notablemente la concentración de azúcares ni el pH, pero sí tuvieron un papel importante en la modificación de la acidez del producto final. Por otra parte, Si bien los tratamientos evaluados mostraron viabilidad microbiana y aceptabilidad sensorial, los conteos finales no alcanzaron el umbral mínimo establecido por normativas internacionales para considerar el producto como probiótico. Existió ausencia de microorganismos perjudiciales los cuales determinaron que la bebida es apta para el consumo humano.

Palabras clave: Antioxidante, Bebida natural, sostenibilidad, prebióticos

ABSTRACT

The importance of this study lies not only in the development of an innovative product but also in the valorization of by-products such as cocoa mucilage. This research project aimed to carry out the physicochemical, sensory, and microbiological characterization of a fermented beverage obtained from the fermentation of pomegranate (*Punica granatum*) and cocoa mucilage (*Theobroma cacao* L.). For its preparation, a completely randomized design (CRD) with 3 treatments $\times$ 5 replications was implemented, resulting in 15 experimental units of 1 liter each. Physicochemical analyses included soluble solids ($^{\circ}$ Brix), pH, and titratable acidity. Data were analyzed using an ANOVA model with Tukey's test ($p > 0.05$) to determine whether the addition of probiotic microorganisms could modify the physicochemical properties of the beverage. To evaluate the sensory profile and acceptability, a sensory evaluation was conducted with 75 panelists. Microbial growth analyses were performed considering treatment variability over time (0, 7, 14, and 21 days), as well as the determination of *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, and molds and yeasts in the best treatment. These results were also analyzed using ANOVA with Tukey's test ($p > 0.05$). The microorganisms used did not significantly affect sugar concentration or pH; however, they played an important role in modifying the acidity of the final product. Although the evaluated treatments showed microbial viability and sensory acceptability, the final microbial counts did not reach the minimum threshold established by international regulations to classify the product as probiotic. The absence of harmful microorganisms indicated that the beverage is suitable for human consumption.

Keywords: Antioxidant, natural beverage, sustainability, prebiotics

INTRODUCCIÓN

Los alimentos funcionales están atrayendo una gran atención por parte de personas de todo el mundo, en ese sentido el uso de bacterias probióticas confiere efectos beneficiosos para la salud, como mejorar el sistema inmunológico y prevenir enfermedades catastróficas como el cáncer, la diabetes y las enfermedades cardiovasculares [1], mientras que las frutas y verduras, junto con otros alimentos vegetales, son componentes importantes de una dieta saludable que se basa en una gran cantidad de investigaciones científicas que demuestran que su consumo ayuda a prevenir enfermedades crónicas, lo cual en conjunto al uso de probióticos permitiría la elaboración de alimentos con características excepcionales [2].

Sin embargo, la innovación en este mercado es limitada, y la mayoría de los productos disponibles están basados en ingredientes tradicionales como la leche o derivados lácteos o en matrices de frutas tradicionales. Esto deja un nicho poco explorado, el desarrollo de bebidas fermentadas a partir de ingredientes naturales y sostenibles [3].

La granada (*Punica granatum* L.), una fruta originaria del sur de Asia, y actualmente cultivada en zonas tropicales y subtropicales, se destaca por su rico sabor y propiedades funcionales, por lo que ha ganado aceptación en diferentes países en la comercialización de productos variados como jaleas, mermeladas, bebidas y su efectividad contra enfermedades y microorganismos patógenos [4].

Por su parte, el mucílago del cacao (*Theobroma cacao* L.), un recurso natural que posee valiosas cualidades nutricionales, como su riqueza en fibra y compuestos antioxidantes, enfrenta un desaprovechamiento significativo en las industrias alimentarias. Esta subutilización surge de dos desafíos clave: el escaso conocimiento sobre sus propiedades fisicoquímicas y la insuficiente innovación tecnológica para optimizar su manejo y transformarlo en productos viables que puedan integrarse al mercado, lo que limita su potencial como alternativa sostenible y saludable [5].

El objetivo de este estudio fue caracterizar una bebida fermentada obtenida a partir de granada y mucílago de cacao, evaluando sus propiedades fisicoquímicas, microbiológicas y sensoriales. Este trabajo se justifica en la necesidad de valorizar el mucílago de cacao, un subproducto con alto nivel de desaprovechamiento en la industria, y en la búsqueda de nuevas matrices frutales sostenibles para el desarrollo de alimentos funcionales en la región.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del sitio experimental

La elaboración del producto se llevó a cabo en el Laboratorio de Operaciones Unitarias, mientras que los análisis fisicoquímicos se realizaron en el Laboratorio de Química y los análisis microbiológicos se realizaron en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas y Pecuarias, todos los Laboratorios se encuentran situados en el campus “La María”

pertenecientes a la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, ubicado en la entrada al cantón Mocache, en el km 7 Vía Quevedo- Mocache.

Diseño experimental y análisis estadístico

Se empleó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con tres tratamientos y cinco repeticiones. Los mismos estuvieron conformados por diferentes combinaciones de cepas probióticas incorporadas a una base de granada, mucílago de cacao, agua y azúcar, manteniendo constantes las proporciones de cada componente (50%, 30%, 15% y 5%, respectivamente). El tratamiento testigo corresponde a la formulación sin la adición de cepa probiótica, utilizada como control. El tratamiento T₁ incorpora *Lactobacillus casei* a la mezcla, mientras que el tratamiento T₂ contiene una combinación de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*.

Para realizar el análisis estadístico y determinar las diferencias entre los tratamientos propuestos, se evaluó la normalidad de los datos, para determinar si los datos siguen una distribución normal o no. Cuando siguieron una distribución normal, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar si existen diferencias significativas entre los tratamientos.

Posteriormente, se aplicó la prueba de Tukey para comparar las medias de los tratamientos y localizar las diferencias específicas. En el caso del análisis sensorial, al ser datos no paramétricos se empleó la prueba Kruskal Wallis. La herramienta estadística empleada para este propósito fue el software InfoStat. Las muestras de 1 L se prepararon para cada proceso de procesamiento en cada repetición.

Se seleccionó *Lactobacillus casei* por su reconocida capacidad de sobrevivir en matrices frutales y por su historial de uso seguro en alimentos funcionales (GRAS/QPS). La combinación *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* fue considerada por su relevancia tecnológica en fermentaciones lácteas y como alternativa para explorar su viabilidad en matrices vegetales.

Procedimiento

A continuación, se va a detalla cada operación unitaria del proceso para la elaboración de la bebida fermentada:

Recepción

Se recepta la materia prima, asegurándose de que esté en condiciones óptimas para su procesamiento junto con los insumos necesarios que se van a utilizar para la elaboración de la bebida fermentada se utilizó como materia prima granada, será adquirida en el mercado de frutas.

Selección y clasificación

Los frutos se seleccionaron de forma manual y visual, retirando aquellos que presentan daños, ataque biológico y defectos fisiológicos entre los defectos físicos tendremos en cuenta si se observará que presenten daños (golpes, grietas o pudrición).

Lavado-Desinfectado

El lavado se realizó con agua potable por inmersión y frotamiento de los frutos en agua, de este modo se eliminaron sustancias y partículas extrañas.

Cortado y Pelado

Con un cuchillo afilado se realizó un corte superficial alrededor de la cáscara evitando dañar los arilos internos, luego se separó la fruta en secciones siguiendo las membranas blancas con cuidado, se desprendieron los arilos golpeando la cáscara con una cuchara y retirándolos manualmente. Por otra parte, se descartaron las partes no comestibles.

Prensado

Se procede a colocar los granos del fruto en la prensa, luego se hace un prensado manual para obtener el zumo de granada sin pepas y fibra.

Extracción de mucilago de cacao CCN-51

La extracción de mucilago de cacao CCN-51 tiene las siguientes operaciones unitarias:

- **Cosecha-selección:** El cacao fue seleccionado directamente en el cultivo, cosechando únicamente las mazorcas que estén bien maduras y sanas.
- **Recepción:** Una vez cosechado el cacao, fue trasladado a un lugar adecuado para acopiar en un solo sitio.
- **Lavado:** Las mazorcas de cacao fueron lavadas usando agua potable para eliminar impurezas.
- **Cortado y desemillado:** Las mazorcas de cacao se partieron con herramientas para el caso y se extrajeron las almendras colocando en un recipiente limpio, desechando las cascaras.
- **Estrujado:** Se realizó manualmente con el objetivo de lograr el mayor desprendimiento de mucilago.
- **Prensado:** Una vez estrujado dentro del recipiente sin perforaciones, seguidamente, el contenido se colocó en un saco perforado para que sirva como tamiz y se extraiga el mucilago que será recolectado en un recipiente acerado y limpio.
- **Recolección de mucilago:** Se midió el volumen del mucilago de conformidad al requerimiento de la unidad experimental y se envaso en fundas de polietileno de alta densidad. El mucilago contenido en las fundas de polietileno fue congelado por un tiempo no mayor a 8 días hasta ser usadas en la experimentación de la bebida. Antes de añadirlo al zumo de granada, se descongeló.

Pesado

Colocar un recipiente sobre la balanza y tarar (poner en cero) la misma. Verter la cantidad de la granada requerida en el recipiente y registrar el peso. Así mismo, se pesan los demás ingredientes a añadir según la formulación seleccionada en el proceso de elaboración de la bebida.

Homogenización

Se realizó con la finalidad uniformizar la mezcla de todos los insumos que constituyen la bebida (zumo de granada, agua, mucilago de cacao y azúcar). Y removerlos hasta lograr la completa disolución de todos los insumos.

Envasado y sellado

Una vez concluido los procesos anteriores se procedió a envasar la bebida elaborada en botellas de vidrio de 1 L previamente esterilizadas (100 °C por 5 min) y para garantizar la inocuidad del producto se sella herméticamente, para así lograr evitar la proliferación de cualquier tipo de microorganismos que llegue a afectar la salud del consumidor.

Pasteurización

Se procedió a realizar tratamiento térmico a baño maría con temperaturas de 75 °C por 15 minutos, con el objetivo de inactivar la carga microbiana y de este modo asegurar la conservación por el tiempo que durará la investigación.

Inoculación

Se procedió a enfriar pasando de estar en una temperatura de 75 °C a una temperatura de 37 °C para la cepa *Lactobacillus casei* y 42 °C para la cepa combinada *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* ya que estas son las temperaturas aptas para la inoculación de estas cepas, mientras que los gramos que se usaron fueron 1 gramo por litro para cada cepa probiótica.

Fermentado

Para la fermentación de la bebida luego de haber inoculado las cepas probióticas se almacenaron en unas incubadoras (MEMMERT UN 55) para poder controlar su temperatura. Por el mismo motivo se dejó incubando el tratamiento 1 a 37 °C para la cepa *Lactobacillus casei* por 24 horas y para el tratamiento 2 a 42 °C para la cepa combinada *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* por 24 horas. El tratamiento 0 (testigo) se dejó en la misma incubadora que el tratamiento 1, ya que este no tenía cepas probióticas integradas y no se necesitaba una temperatura exacta para la fermentación.

Almacenamiento

Para garantizar su conservación, las bebidas se almacenaron en las refrigeradoras del laboratorio de microbiología donde se mantuvo a una temperatura de 4 a 71°C, todo esto para una mejor conservación y que así se pueda mantener la integridad de la bebida.

Luego del respectivo procedimiento, se procedió a realizar el análisis fisicoquímico, análisis sensorial, que es la evaluación de la apariencia, aroma y sabor de la bebida y análisis microbiológico, para la detección, identificación y enumeración de microorganismos en un material.

Debe incluir el diseño de estudio, la población, la muestra, las variables y el análisis estadístico.

Variables evaluadas

Método para evaluar el crecimiento de los probióticos

Se utilizó el método de dispersión en placa, para evaluar la viabilidad de microorganismos a lo largo del tiempo mediante el análisis de su crecimiento en medios de cultivo sólidos. En este

estudio, se empleó esta metodología para monitorear la supervivencia y proliferación de probióticos en diferentes tratamientos durante un período de 21 días con evaluaciones en los días 0, 7, 14 y 21, mohos y levaduras, *Salmonella* spp. y *Escherichia coli*. Se utilizó la siguiente fórmula para describir la tasa de crecimiento microbiano.

$$UFC = \frac{N_{col} \times F_d}{Vol. siembra}$$

Donde

UFC: Unidades formadoras de colonias

Ncol: Numero de colonias

Fd: Diluciones

Vol siembra: Cantidad de la muestra

Análisis físicos químicos

Para la valoración de las características físicas y químicas de una bebida a partir de la fermentación de granada y mucilago de cacao se tomaron muestras de 1 L aproximadamente por unidad experimental. La determinación de las características se realizará bajo los siguientes métodos:

Sólidos solubles (°Brix)

Para la determinación de los Sólidos solubles, se utilizó un refractómetro portátil ATC Luzer previamente calibrado con agua destilada. Se depositaron unas gotas de muestra clarificada sobre la superficie prismática, se cerró la tapa y se esperó a que el compensador automático de temperatura (ATC) estabilizara la lectura, anotando el valor indicado en la escala de azúcar.

pH

Para el pH, se empleó un pH-metro Starter 2100, calibrado diariamente con soluciones tampón de pH 4.01 y 7.00. La sonda, enjuagada con agua destilada y secada ligeramente, se sumergió en 10 ml de la muestra a temperatura ambiente; tras estabilizarse la lectura (± 0.01 pH), se registró el valor correspondiente.

Acidez Titulable

El contenido del nombre de ácido se determinó por la titulación de base ácida utilizando una resolución de NaOH 0.1N como título, y también se midió una muestra de 10 ml, que se diluyó en 40 ml de agua destilada en un vaso de precipitados. La titulación se realizó gradualmente para agregar resolución NaOH 0.1N, revolviendo constantemente.

En lugar de usar el indicador visual, el destino de titulación se determinó por el iniciador de pH-metro, midiendo la mezcla de valor de pH hasta que se alcanzó el valor de 8.20, se registró la cantidad de NaOH consumida.

Se calculó la acidez de la muestra después de dicha ecuación:

acidez

$$= \frac{ml \text{ de NaOH} \times \text{Normalidad de NaOH} \times \text{Peso equivalente del ácido predominante} \times 100}{\text{Volumen de la muestra}}$$

Análisis sensorial

Par validar la aceptación de los tratamientos se evaluó las principales características externas tales como:

- Apariencia.
- Aroma.
- Sabor.
- Aceptabilidad

El análisis sensorial se llevó a cabo a los 5 días de haber elaborado la bebida y esta se encontraba a una temperatura de 4 °C ya que estuvo almacenada en refrigeración, este análisis tuvo como objetivo el evaluar las características organolépticas de la bebida de granada (*Punica granatum*) y mucilago de cacao (*Theobroma cacao L.*) en términos de apariencia, aroma y sabor para determinar el mejor tratamiento, para ello se empleó una prueba descriptiva basada en el perfil sensorial la cual contaba con una escala de 5 puntos, empezando desde el 1 como calificación más baja hasta el 5 con calificación más alta.

El análisis sensorial contó con la participación de 75 panelistas, quienes firmaron consentimiento informado. Dichos panelistas fueron todos estudiantes de la Carrera de Alimentos, quienes fueron seleccionados por su familiaridad con productos similares y su disposición para realizar la prueba. Además, se realizó un análisis de aceptabilidad de la bebida, de las cuales los catadores compararon todos los tratamientos evaluados y eligieron el tratamiento que presento las mejores características.

Análisis microbiológicos

Los análisis microbiológicos se llevaron a cabo en base a la Norma Técnica Ecuatoriana jugos, pulpas, concentrados, néctares, bebidas de frutas y vegetales. NTE INEN 2 337:2008. Para el control microbiológico de la bebida fermentada.

- Viabilidad de microorganismos probióticos (UFC/mL)
- Recuento de mohos y levaduras (UFC/mL).
- Recuento de *Escherichia coli* (UFC/mL).
- Recuento de *Salmonella* (UFC/mL).

Como el diseño experimental es de 3 x 5 dando un total de 15 muestras, se consideró realizar 3 siembras por cada muestra dando un total de 45 cajas Petri las cuales siempre se esterilizaron antes de cada análisis en una autoclave (All American 25X) a 121 °C durante 20 minutos, todo esto se hizo para garantizar la confiabilidad de los resultados.

Todos los análisis microbiológicos se realizaron mediante el método de dispersión en placa, estos se llevaron a cabo en la cabina de seguridad biológica para evitar riesgos de contaminación, En presencia de un mechero iniciamos la siembra microbiológica, por cada placa Petri se depositaron 20 microlitros de la muestra los cuales fueron distribuidos uniformemente en la superficie del medio de cultivo con la ayuda de un asa de vidrio estéril.

Luego de la siembra, las placas fueron incubadas en una incubadora (MEMMERT UN 55) a temperaturas específica según el tipo de microorganismo:

- MRS agar: 37 °C por 48 horas
- PDA agar: 25-28 °C por 24 horas
- MacConkey agar: 37 °C por 24 horas
- S.S agar: 37 °C por 24 horas

Por último, se hizo el recuento microbiano mediante un contador de colonias (BOE 5157000) para determinar la presencia de microorganismos en cada tratamiento.

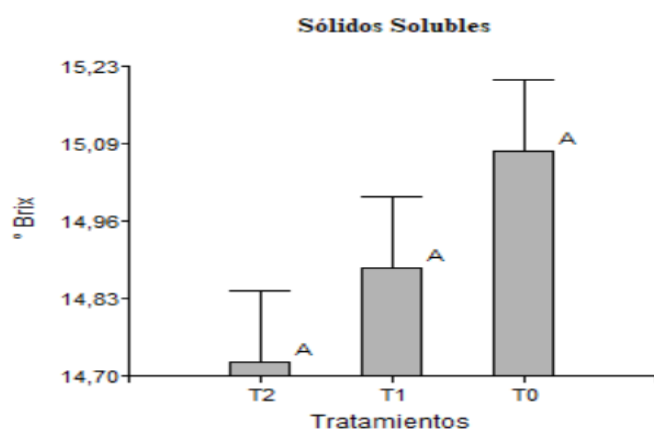
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Sólidos solubles (°Brix)

En la Figura 1 se observa los valores de solidos solubles (°brix) obtenidos fueron (15.08°Brix) en el tratamiento 0, (14.88°Brix) en el tratamiento 1 y (14.72°Brix) en el tratamiento 2. Se observa una leve reducción en esta variable cuando se añaden probióticos, lo que estuvo relacionado con el consumo de azúcares durante la fermentación. Sin embargo, el análisis estadístico determino que estas diferencias no son significativas ($p > 0.1581$), indicando que la presencia de microorganismos no tuvo un efecto considerable en la concentración de solidos solubles.

Figura 1

Medias de solidos solubles (°brix)



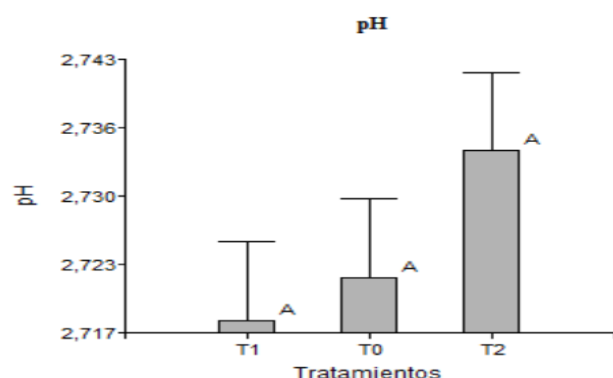
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$). **T₀**: Testigo (Sin cepa); **T₁**: *Lactobacillus casei*; **T₂**: *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*

pH

En la Figura 2 se muestran los resultados obtenidos para el pH fueron (2.72) en el tratamiento 0, (2.72) en el tratamiento 1 y (2.73) en el tratamiento 2 donde se nota una ligera disminución del pH en los tratamientos que contenían probióticos, lo cual sugiere una mayor producción de ácidos orgánicos como resultado de la fermentación. No obstante, el análisis estadístico reveló que las diferencias entre los tratamientos no fueron significativas ($p > 0.3165$), lo que indica que la actividad de los probióticos no generó cambios drásticos en el pH del producto.

Figura 2

Medias del pH



Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$). **T₀**: Testigo (Sin cepa); **T₁**: *Lactobacillus casei*; **T₂**: *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*

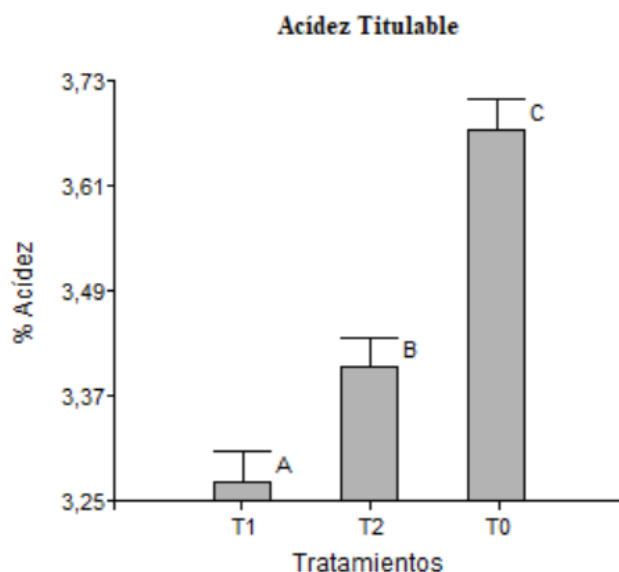
La Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 2337:2008 establece que las bebidas de frutas deben tener un pH inferior a 4,5, determinado según la NTE INEN 389, por lo tanto, el pH de los tratamientos estudiados cumple con este requisito, ya que se obtuvieron resultados entre 2.717 a 2.743. Este requisito asegura la acidez necesaria para la estabilidad microbiológica del producto y para prevenir el crecimiento de microorganismos patógenos.

Acidez titulable (% de acidez)

La Figura 3 muestra que los resultados del contenido de ácido se obtuvieron (3.67%) para el tratamiento de 0, (3.27%) 1. Para el tratamiento y (3.40%) para el tratamiento 2. En este caso, en este caso, se observaron diferencias significativas entre el tratamiento ($p < 0.05$), lo que indica que la fermentación con probióticos afecta la producción de ácido, que por lo tanto alteró el ácido.

Figura 3

Medias de la acidez titulable (% de acidez)



Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$). **T0:** Testigo (Sin cepa); **T1:** *Lactobacillus casei*; **T2:** *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*

Perfil sensorial

En la Figura 4 se observa los resultados del análisis sensorial realizado por 75 panelistas que contemplaron aspectos como la apariencia el aroma y el sabor de la bebida fermentada de granada y mucilago de cacao.

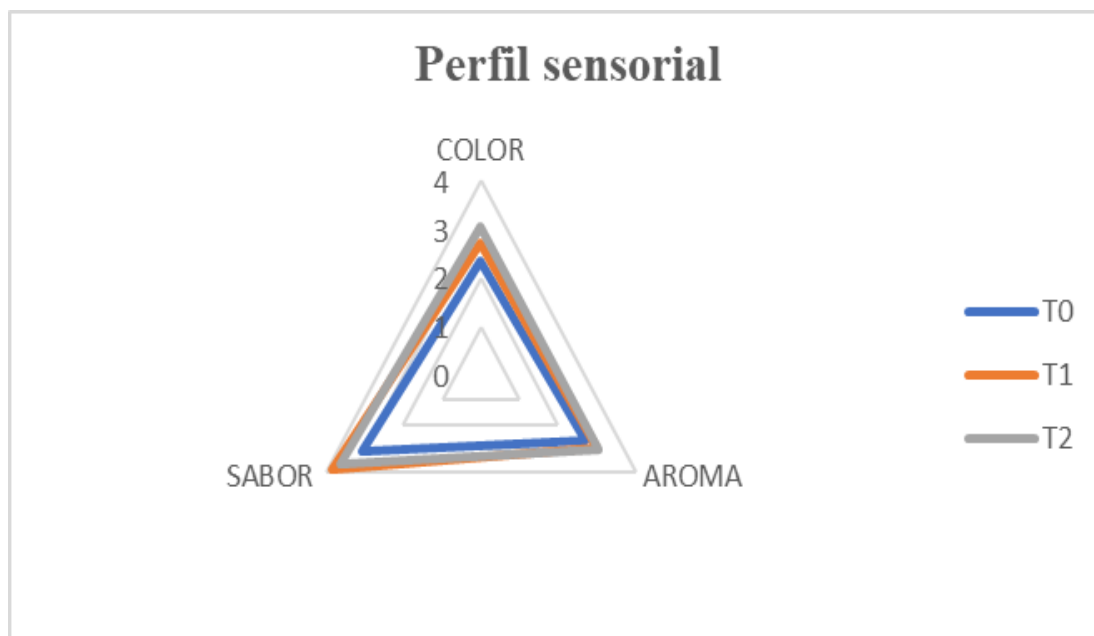
En cuanto al color, los promedios obtenidos fueron Vinotinto con el (2.33) para el tratamiento 0, Burdeos Clairet con el (2.71) para el tratamiento 1 y Borgoña con el (3.05) para el tratamiento 2 indicando que hubo diferencias significativas entre los tratamientos ($p = 0.0088$). Dentro de la escala utilizada el tratamiento 2 mostró la mayor puntuación dando a conocer una mejor aceptación visual en comparación con T0 y T1, lo que significa que la adición de probióticos influyó en la percepción del color de la bebida.

En el caso del aroma, los promedios fueron de fermentado con el (2.69) para el tratamiento 0, Cítrico afrutado con el (2.97) para el tratamiento 1 y Cítrico afrutado con el (3.03) para el tratamiento 2. Dentro de la escala utilizada el tratamiento 2 mostró la mayor puntuación, aunque donde no hubo diferencias significativas ($p = 0.33342$), lo que nos indica que la adición de probióticos no influyó de manera considerable en el aroma de la bebida.

Respecto al sabor, los promedios fueron de Granada acida con el (3.08) para el tratamiento 0, Granada dulce (3.85) para el tratamiento 1 y Granada dulce con el (3.64) para el tratamiento 2. En este caso si se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ($p = 0.0004$). Donde se observó en la escala utilizada, que el tratamiento 1 obtuvo el mejor sabor, pero no con mucha diferencia del tratamiento 2.

Figura 4

Gráfica de araña del perfil sensorial de los tratamientos de la bebida



T0: Testigo (Sin cepa); T1: *Lactobacillus casei*; T2: *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*

Aceptabilidad

Los resultados mostraron que el tratamiento 2 fue el mejor valorado con el 45%, seguido por el tratamiento 1 con el 43% y finalmente el tratamiento 0 con el 12%. Esto indica que la adición de probióticos no solo influyó en las propiedades fisicoquímicas de la bebida, sino que también en su percepción sensorial, mejorando su aceptación por parte de los evaluadores.

Microorganismos probióticos

Se evaluó la viabilidad de los microorganismos probióticos en la bebida fermentada a base de granada (*Punica granatum*) y mucilago de cacao (*Theobroma cacao L.*) durante un periodo de 21 días, la cuantificación de unidades formadoras de colonias (UFC/ml) se realizó en distintos intervalos de tiempo (0,7,14 y 21 días). Se analizaron tres tratamientos: T0 (testigo), T1 (con adición de *Lactobacillus casei*) y T2 (con adición de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*), por cada tratamiento se realizaron 5 repeticiones y en cada repetición se llevó a cabo 3 réplicas, lo que resultó en un total de 45 cajas Petri utilizadas en cada día de análisis.

Viabilidad de microorganismos probióticos (0, 7, 14, 21) días.

En la Figura 5 se observa que en el tratamiento testigo (T0), los microorganismos probióticos presentaron su mayor concentración al inicio del estudio, con aproximadamente 9.10×10^2 UFC/ml en el día 0. Sin embargo, a partir del día 7 se registró una reducción marcada en la cantidad de microorganismos viables, descendiendo a 3.76×10^2 UFC/ml. Esta disminución continuó de forma constante hasta el día 21, con conteos similares de 1.63×10^2 y 1.93×10^2 UFC/ml. El análisis estadístico confirmó que el día 0 fue significativamente distinto a los demás tiempos evaluados (letra "a"), mientras que los días 7, 14 y 21 no presentaron diferencias

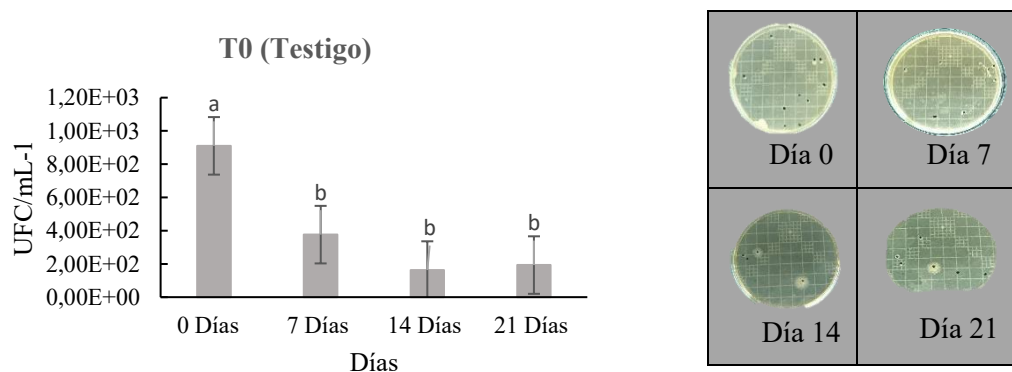
estadísticas entre sí (letra "b"). Estos hallazgos indican que la pérdida de viabilidad microbiana ocurre principalmente durante la primera semana, y posteriormente, la concentración se mantiene estable, lo que sugiere que las condiciones del T0 no favorecen la estabilidad prolongada de los probióticos.

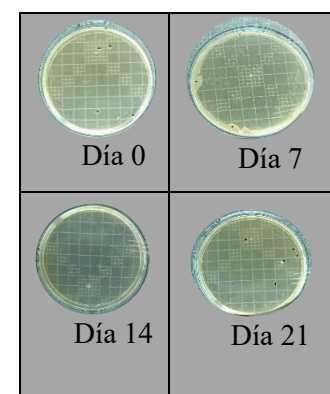
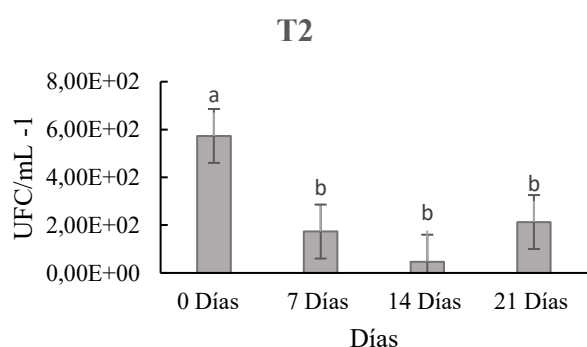
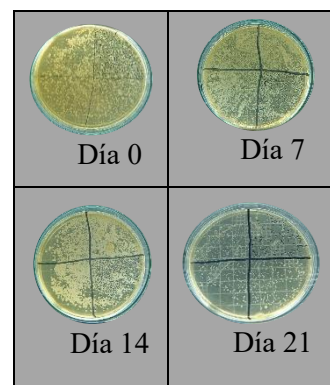
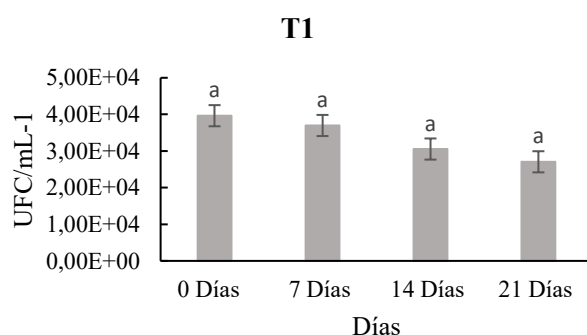
En cuanto al tratamiento 1 (T₁), que incluyó la adición de *Lactobacillus casei*, se observaron concentraciones más elevadas de microorganismos viables desde el inicio, con 3.96×10^4 UFC/ml, y una disminución leve y progresiva hasta alcanzar 2.71×10^4 UFC/ml al día 21. Estos valores se mantuvieron relativamente estables, lo que indica que esta cepa probiótica contribuyó a mejorar la estabilidad y supervivencia de los microorganismos durante el periodo de estudio. El análisis estadístico mostró que no hubo diferencias significativas entre los días evaluados (misma letra "a" en todas las barras), lo cual respalda la eficacia del tratamiento para conservar la viabilidad microbiana.

Mientras que el tratamiento 2 (T₂), que empleó una combinación de *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, no logró mantener la viabilidad a lo largo del tiempo, aunque comenzó con 5.73×10^2 UFC/ml el día 0, los conteos disminuyeron drásticamente a 1.73×10^2 UFC/ml al día 7 y a 4.70×10^1 UFC/ml al día 14, recuperándose levemente a 2.13×10^2 UFC/ml al día 21. Estas variaciones también resultaron estadísticamente significativas, siendo el día 0 diferente de los días 7, 14 y 21. Esto evidencia que el entorno no fue propicio para la supervivencia de las cepas en el tratamiento 2, afectando negativamente su estabilidad (Figura 5).

Figura 5

Viabilidad de microorganismos probióticos en el tiempo (0, 7, 14, 21 días) en los tratamientos





E. coli

Los resultados mostraron la ausencia total de crecimiento bacteriano en todas las muestras analizadas. Esto confirma que la bebida de granada (*Punica granatum*) y mucilago de cacao (*Theobroma cacao* L.) es microbiológicamente segura y cumple con los estándares sanitarios establecidos para su consumo.

Salmonella spp.

El análisis de *Salmonella* reveló la ausencia de esta bacteria en ninguna de las muestras evaluadas. La ausencia de *Salmonella* confirma que la bebida es microbiológicamente segura y cumple con los estándares requeridos para el consumo humano.

Mohos y levaduras del mejor tratamiento

Los resultados mostraron que el mejor tratamiento fue el T1 donde se observa un crecimiento excesivo de levaduras, haciendo que el recuento sea incontable debido a la alta concentración de colonias. Sin embargo, es importante destacar que no se detectó presencia de mohos, lo que indica que este tratamiento podría estar limitando el crecimiento de hongos no deseados.

Diversos estudios han demostrado que las bacterias ácido-lácticas pueden metabolizar los azúcares presentes en el medio, reduciendo así la cantidad de sólidos solubles en el producto final [7]. En este estudio, los tratamientos con cepas probióticas (T1 y T2) presentaron valores menores de sólidos solubles en comparación con el testigo, lo que sugiere que los microorganismos utilizaron parte de los azúcares disponibles para su crecimiento y producción de ácidos orgánicos.

La Norma INEN 2337 sobre productos derivados de frutas establece que la cantidad de sólidos solubles a base de frutas no especifica rangos exactos de grados Brix para las bebidas de frutas, sino que establece que estos deben estar en proporción al contenido de la fruta presente en la bebida [8]. En este sentido, la fermentación de frutas como la granada y el uso de mucílago oscilaron entre 14,83 y 15,09 °brix, cumpliendo con este criterio normativo.

Maldonado, *et al.* [9] desarrollaron una bebida fermentada a base de quinua (*Chenopodium quinoa*), evaluando variables como acidez y pH, encontraron que la relación de azúcares y la concentración de goma xantana afectaron significativamente la acidez del producto. Así mismo en la investigación de Taipe & Yugsi [10] evaluaron la acidez en una bebida ancestral fermentada de chonta (*Bactris gasipaes*) utilizando kéfir como agente fermentador obtuvieron una acidez de 0.029%, esto confirmó que la selección de ingredientes y microorganismos probióticos es determinante en la acidez titulable del producto final.

Estudios previos han evidenciado que los probióticos especialmente las bacterias del género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* incrementan la producción de ácidos debido a su metabolismo fermentativo, mientras que, en la industria alimentaria la adición de *Lactobacillus plantarum* en la fermentación de productos lácteos ha mostrado una mayor generación de ácido láctico, lo que mejora la conservación y estabilidad del producto [11,12]. Estos microorganismos al ser incorporados en adición de *Lactobacillus plantarum* en la fermentación de productos lácteos ha mostrado una mayor generación de ácido láctico, lo que mejora la conservación entornos adecuados, pueden modificar la composición microbiana y optimizar la generación de metabolitos incluyendo ácidos láctico, acético y propiónico, entre otros.

Desde el punto de vista sensorial, la inclusión de probióticos influyó positivamente en la percepción de color y sabor, con mayor aceptación en los tratamientos fermentados. Esto coincide con lo descrito por Jurado Gámez *et al.* [13], quienes destacan que la adición de *Lactobacillus reuteri* microencapsulado en bebidas frutales favorece atributos organolépticos sin comprometer la calidad del producto.

Diversos estudios han demostrado que ciertos ingredientes de origen natural pueden favorecer el desarrollo espontáneo de microorganismos con características probióticas, aún en ausencia de inoculación exógena, en la investigación de Vallejo *et al.* [14] el mucílago de cacao constituye una fuente natural de azúcares simples (glucosa, fructosa y sacarosa), así como de compuestos fenólicos y péptidos que pueden favorecer el crecimiento de bacterias ácido-lácticas y levaduras durante procesos fermentativos espontáneos.

Sin embargo, puede ocurrir una reducción de estos microorganismos, según Cerero *et al.* [15] donde evaluaron la viabilidad de probióticos en bebidas fermentadas mexicanas en la cual observaron una reducción superior al 40% de la población inicial tras 14 días de almacenamiento, lo cual señalaron que las matrices frutales si bien son buenas portadoras de probióticos, presentan

pH naturalmente bajo y una actividad de agua que favorece la oxidación, lo que limita la supervivencia a largo plazo.

En concordancia con lo señalado, Santana [16] evaluó una bebida hidratante elaborada con mucílago procedente de distintas variedades de cacao, encontrando diferencias estadísticamente significativas en el pH. El análisis de Tukey (0,05%) evidenció que la procedencia del mucílago incidió en este parámetro, reportándose un valor promedio de 4,05 para la variedad Nacional y de 3,86 para la variedad Trinitario.

En un estudio de Ranadheera *et al.* [17], se evaluó la viabilidad de *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis* y *Lactobacillus casei* en yogur durante 28 días de almacenamiento donde se observó que, aunque las cepas mantenían un conteo aceptable ($>10^6$ UFC/mL) durante la primera semana, la población disminuía significativamente hacia los 21 y 28 días, especialmente *B. lactis*. Esto fue atribuido a la disminución del pH y a la acumulación de ácidos orgánicos.

En ocasiones, ciertas cepas microbiológicas co-inoculadas o presentes naturalmente pueden reducir la viabilidad de los probióticos mediante mecanismos de competencia, inhibición o incompatibilidad metabólica, según Parvez *et al.* [18] observaron que, en productos fermentados mixtos, donde la introducción de cepas productoras de bacteriocinas reduce significativamente la viabilidad de los probióticos durante el almacenamiento.

A pesar de que T1 presentó la mejor retención de microorganismos probióticos a lo largo del estudio, es importante destacar que ninguno de los tratamientos logró alcanzar la concentración mínima establecida para ser considerada una bebida probiótica, la cual es de 10^6 UFC/g. Esto demuestra que, aunque el tratamiento 1 es superior a los demás, aún requiere modificaciones para optimizar y lograr un producto con características probióticas.

Cabe destacar que, ninguno de los tratamientos alcanzó la concentración mínima de 10^6 UFC/mL requerida para clasificar la bebida como probiótica, según NTE INEN 2395:2011 y lineamientos internacionales, por lo tanto, la bebida de granada (*Punica granatum*) y mucílago de cacao (*Theobroma cacao L.*) no alcanzo los estándares para determinarse como una bebida probiótica.

CONCLUSIONES

Aunque la adición de probióticos mejoró algunos atributos sensoriales y la estabilidad microbiana a corto plazo, los conteos no alcanzaron los niveles normativos para ser considerada una bebida probiótica. El tratamiento con *L. casei* mostró la mejor viabilidad y constituye una base para futuras optimizaciones del proceso

REFERENCIAS

- [1] Morales J. Bebidas con probióticos y su impacto en salud [Internet]. Guanajuato: Universidad de Guanajuato; 2015 [citado 9 sep 2025]. Disponible en: <https://www.ugto.mx/investigacionyposgrado/eugreka/index.php/contribuciones/458-bebidas-con-probioticos-y-su-impacto-en-la-salud>
- [2] Valero D. The whole pomegranate (*Punica granatum* L.): biological properties and important findings: a review. *Food Chem Adv.* 2023;2:100123.
- [3] Paz-Yépez CA, Campuzano-Vera A, Villamar M, Medina-Galarza GY, Palmay-Paredes JA. Capacidad antioxidante de una bebida fermentada tipo kombucha elaborada con jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*). *Rev Cient Multidiscip InvestiGo.* 2025;6(15):67–81.
- [4] Andrade L. La granada y su zumo: producción, composición y propiedades beneficiosas para la salud. Valencia: Grupo de Calidad y Seguridad Alimentaria; 2019.
- [5] Pizano J. El mucílago de cacao [Internet]. Guadalajara: CIATEJ; 2022 [citado 9 sep 2025]. Disponible en: <https://ciatej.mx/el-ciatej/comunicacion/Noticias/El-mucilago-de-cacao/289>
- [6] Gobierno Autónomo Descentralizado de Quevedo. Condiciones meteorológicas para lugares de desarrollo. Quevedo; 2017.
- [7] Miranda O, Fonseca P, Ponce I, Cedeño C, Rivero LS, Martí L. Elaboración de una bebida fermentada a partir del suero de leche que incorpora *Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus thermophilus*. *Rev Cub Aliment Nutr.* 2014;24(1):7–16.
- [8] Instituto Ecuatoriano de Normalización (INEN). Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 2337: productos derivados de frutas. Quito: INEN; 2014.
- [9] Maldonado R, Carrillo P, Ramírez L, Carvajal F. Elaboración de una bebida fermentada a base de quinua (*Chenopodium quinoa*). *Enfoque UTE.* 2019;9(3):1–11.
- [10] Taipe Toapanta CJ, Yugsi Chicaiza CA. Evaluación y caracterización de ácidos orgánicos presentes en la bebida fermentada ancestral de chonta (*Bactris gasipaes*) con kéfir [tesis de pregrado]. Latacunga: Universidad Técnica de Cotopaxi; 2021.
- [11] Arepally D, Ravula S, Goswami T. Applications of probiotics in dairy food products. In: Engineering practices for milk products. Waretown: Apple Academic Press; 2019. p. 351–363.
- [12] Saxelin M, Tynkkynen S, Mattila T, De Vos W. Probiotic and other functional microbes: from markets to mechanisms. *Curr Opin Biotechnol.* 2005;16(2):204–211.
- [13] Jurado Gámez H, Cerón Córdoba JF, Bolaños Bolaños JC. Aplicación de un probiótico (*Lactobacillus reuteri* ATCC 53608) microencapsulado en una bebida tipo sorbete a base de pulpa de fruta (banano y mango) como alimento funcional y su aplicación en la industria alimentaria. *Aglala.* 2021;12(2):249–263.

- [14] Vallejo C, Chang J, Quintana J, Verdezoto D, Cajas L, Mendoza T. Bacterias ácido lácticas presentes en el mucílago de cacao (*Theobroma cacao* L.) de dos variedades. *Rev Investig Talentos*. 2018;5(2):45–56.
- [15] Cerero C, Sánchez M, Pérez A, Pérez D, García I. Probióticos presentes en bebidas fermentadas mexicanas. *TIP Rev Esp Cienc Quím Biol*. 2022;25:1–10.
- [16] Santana P, Vera J, Vallejo C, Álvarez A. Mucílago de cacao Nacional y Trinitario para la obtención de una bebida hidratante. *Univ Cienc Tecnol*. 2019;4:179–189.
- [17] Ranadheera R, Baines S, Adams M. Importance of food in probiotic efficacy. *Food Res Int*. 2010;43(1):1–7.
- [18] Parvez S, Malik K, Kang S, Kim H. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *J Appl Microbiol*. 2006;100(6):1171–1185.
- [19] Instituto Ecuatoriano de Normalización (INEN). Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 2395: bebidas probióticas. Quito: INEN; 2011.