



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS

ESTUDIO DE ESTABILIDAD DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN UNA
BEBIDA DE FLOR DE JAMAICA Y ESTEVIA, DURANTE SU
ALMACENAMIENTO.

TORRES MAZA GISSELLA CELESTE
INGENIERA EN ALIMENTOS

VASQUEZ DOTA YANDRI CARLOS
INGENIERO EN ALIMENTOS

MACHALA
2022



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS

ESTUDIO DE ESTABILIDAD DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN
UNA BEBIDA DE FLOR DE JAMAICA Y ESTEVIA, DURANTE SU
ALMACENAMIENTO.

TORRES MAZA GISSELLA CELESTE
INGENIERA EN ALIMENTOS

VASQUEZ DOTA YANDRI CARLOS
INGENIERO EN ALIMENTOS

MACHALA
2022



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS

TRABAJO TITULACIÓN
TRABAJO EXPERIMENTAL

ESTUDIO DE ESTABILIDAD DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN UNA BEBIDA DE
FLOR DE JAMAICA Y ESTEVIA, DURANTE SU ALMACENAMIENTO.

TORRES MAZA GISSELLA CELESTE
INGENIERA EN ALIMENTOS

VASQUEZ DOTA YANDRI CARLOS
INGENIERO EN ALIMENTOS

MATUTE CASTRO NUBIA LISBETH

MACHALA, 22 DE FEBRERO DE 2022

MACHALA
2022

ESTUDIO DE ESTABILIDAD DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN UNA BEBIDA DE FLOR DE JAMAICA Y ESTEVIA, DURANTE SU ALMACENAMIENTO

INFORME DE ORIGINALIDAD

5%

EN

INDICE DE SIMILITUD

4%

FUENTES DE INTERNET

4%

PUBLICACIONES

3%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	etd.repository.ugm.ac.id Fuente de Internet	1%
2	ouci.dntb.gov.ua Fuente de Internet	<1%
3	Submitted to Liberty University Trabajo del estudiante	<1%
4	Renata Fialho Teixeira, Laís Benvenuto, Vivian Maria Burin, Trilicia Margarida Gomes et al. "An eco-friendly pressure liquid extraction method to recover anthocyanins from broken black bean hulls", Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2020 Publicación	<1%
5	ejournal.unsri.ac.id Fuente de Internet	<1%
6	researchspace.ukzn.ac.za Fuente de Internet	<1%

CLÁUSULA DE CESIÓN DE DERECHO DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO DIGITAL INSTITUCIONAL

Los que suscriben, TORRES MAZA GISSELLA CELESTE y VASQUEZ DOTA YANDRI CARLOS, en calidad de autores del siguiente trabajo escrito titulado ESTUDIO DE ESTABILIDAD DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN UNA BEBIDA DE FLOR DE JAMAICA Y ESTEVIA, DURANTE SU ALMACENAMIENTO., otorgan a la Universidad Técnica de Machala, de forma gratuita y no exclusiva, los derechos de reproducción, distribución y comunicación pública de la obra, que constituye un trabajo de autoría propia, sobre la cual tienen potestad para otorgar los derechos contenidos en esta licencia.

Los autores declaran que el contenido que se publicará es de carácter académico y se enmarca en las disposiciones definidas por la Universidad Técnica de Machala.

Se autoriza a transformar la obra, únicamente cuando sea necesario, y a realizar las adaptaciones pertinentes para permitir su preservación, distribución y publicación en el Repositorio Digital Institucional de la Universidad Técnica de Machala.

Los autores como garantes de la autoría de la obra y en relación a la misma, declaran que la universidad se encuentra libre de todo tipo de responsabilidad sobre el contenido de la obra y que asumen la responsabilidad frente a cualquier reclamo o demanda por parte de terceros de manera exclusiva.

Aceptando esta licencia, se cede a la Universidad Técnica de Machala el derecho exclusivo de archivar, reproducir, convertir, comunicar y/o distribuir la obra mundialmente en formato electrónico y digital a través de su Repositorio Digital Institucional, siempre y cuando no se lo haga para obtener beneficio económico.

Machala, 22 de febrero de 2022



TORRES MAZA GISSELLA CELESTE
0705692077



VASQUEZ DOTA YANDRI CARLOS
0705834869

DEDICATORIA

Dedicamos el presente trabajo con mucho esfuerzo y amor a nuestros padres y hermanos por nunca dudar de nuestras capacidades y ser la motivación de que cada día nos superemos para crecer tanto personal como profesionalmente, por brindarnos su apoyo incondicional a lo largo de estos años de estudio, siempre con sus buenos consejos para mantener la confianza en nosotros y no decaer, enfrentando con positivismo las adversidades que se presenten en el camino.

AGRADECIMIENTO

Queremos agradecer principalmente a Dios por brindarnos salud y sabiduría para lograr cumplir nuestra meta de manera satisfactoria. A nuestras familias por todo el apoyo brindado, motivándonos día a día para dar nuestro mayor esfuerzo.

Gracias a cada docente de la Universidad que ha colaborado con nuestra formación académica y por la predisposición de siempre implantar conocimientos que servirán como base para desempeñarnos en la vida profesional.

De manera especial agradecer a nuestra tutora de tesis Ing. Nubia Lizbeth Matute C. y a la Ing. Mercedes Campo por el tiempo dedicado al desarrollo de esta investigación.

RESUMEN

El consumo de bebidas funcionales contribuye a la mejora de la salud de las personas debido a las múltiples propiedades nutricionales y beneficios que posee, sin embargo, la funcionalidad de este tipo de productos puede verse afectada por los cambios que se generan en los componentes esenciales durante el tiempo de almacenamiento, lo que conlleva a la pérdida de su calidad nutricional y por ende su vida útil. El objetivo de la presente investigación es determinar la estabilidad de los compuestos fenólicos en una bebida de flor de jamaica y estevia, durante su almacenamiento.

El procedimiento parte de la utilización de cálices de jamaica secos y molidos en el cual se aplicó el método de extracción asistida por ultrasonido (EAU) a 30 °C por 30 minutos con la finalidad de potenciar la extracción de sus compuestos bioactivos. La formulación de la bebida comprende el uso de cáliz de jamaica de 2 g/100 mL de solución acuosa junto con 0,5 % de estevia comercial. Se evaluaron los cambios en la calidad química de la bebida mediante el análisis de la concentración de antocianinas monoméricas totales por el método de pH diferencial, el contenido de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu y la capacidad antioxidante por la técnica 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazil (DPPH), todo esto con la finalidad de poder evaluar la estabilidad de estos metabolitos de interés, paralelamente se evaluaron pH y sólidos solubles (°Brix) para presenciar posibles cambios. Las condiciones para el estudio de estabilidad de la bebida de flor de jamaica y estevia, fueron a temperatura ambiente por un tiempo de 35 días, en el cual las mediciones efectuadas tuvieron una periodicidad de siete días. Todos los resultados obtenidos de la evaluación química fueron tabulados y procesados mediante un análisis de varianza (ANOVA) y posterior a esto se realizó una prueba de múltiples rangos LSD de Fisher con un nivel de confianza del 95 % y de esta manera evaluar el nivel de significancia entre cada tiempo.

Durante el almacenamiento de la bebida de flor de jamaica y estevia a temperatura ambiente se pudo evidenciar un incremento paulatino tanto en el pH como en °Brix. Caso contrario ocurrió con los componentes bioactivos, en donde se observó una disminución de la concentración de antocianinas (60,78 a 44,33 expresado en mg cianidina-3-glucósido/L), el mismo efecto, pero no de manera drástica sucede con el contenido de fenoles totales (66,05 a 55,68 expresado en mg Equivalente Ácido Gálico/g de Extracto Seco). La capacidad de secuestro de radicales libres se vio disminuida en el tiempo (101,16 a 98,22 %), lo cual es lógico pensar que pudo deberse a la disminución de compuestos fenólicos dentro de los cuales puede contarse las antocianinas.

Se puede concluir que el tiempo de almacenamiento incide en la estabilidad de las antocianinas y de igual forma en los compuestos fenólicos totales de la bebida de jamaica, lo cual afecta de manera significativa en la capacidad antioxidante de la bebida, este efecto se ve marcado a partir de los 28 días de almacenamiento.

Palabras claves: *bebida funcional, antocianinas, fenoles totales, capacidad antioxidante, estabilidad en bebidas.*

ABSTRACT

The consumption of functional drinks contributes to the improvement of people's health due to their multiple nutritional properties and benefits. However, the functionality of these products can be affected due to the changes generated in the essential components during the storage time, which leads to the loss of their nutritional quality and therefore their shelf life. The objective of this study is to determine the stability of phenolic compounds in a drink made from jamaica flower and stevia, during storage.

The procedure is based on the use of dry and ground jamaica calyces in which the ultrasound-assisted extraction method (UAE) was applied at 30 °C for 30 minutes in order to enhance the extraction of its bioactive compounds. The formulation of the beverage comprises the use of jamaica calyx of 2 g/100 mL of aqueous solution and 0,5 % commercial stevia. The changes in the chemical quality of the beverage were evaluated by analyzing the concentration of total monomeric anthocyanins by the differential pH method, the content of total phenols by the Folin-Ciocalteu method and the antioxidant capacity by the 2,2-Diphenyl-1-Picrilhidrazil (DPPH) technique, in order to evaluate the stability of these metabolites of interest, in parallel, pH and soluble solids (°Brix) were evaluated to witness possible changes. The conditions for the study of stability of the drink from flower of jamaica and stevia, were at room temperature during 35 days, in which the measurements made had a periodicity of seven days.

The results obtained from the chemical evaluation were tabulated and processed using ANOVA factorial. Then, a Fisher LSD multiple range test was performed with a confidence level of 95% evaluating in this way the level of significance between each time.

During the storage of the drink at room temperature, a gradual increase in both pH and °Brix could be evidenced. The opposite occurred with the bioactive components, where a decrease in the concentration of anthocyanins (60.78 to 44.33 expressed in mg cyanidin-3-glucoside/L) was observed. The same effect, but not drastically happens with the content of total phenols (66.05 to 55.68 expressed in mg Equivalent Gallic Acid / g of Dry Extract). The ability to capture free radicals decreased over time (101.16 to 98.22%), which shows it could be due to the decrease in phenolic compounds in which anthocyanins can be counted.

The general conclusion is the storage time affects the stability of the anthocyanins and in the same way in the total phenolic compounds of the roselle drink, which significantly affects the antioxidant capacity of the drink, this effect is marked to from 28 days of storage.

Keywords: *functional drink, anthocyanins, total phenols, antioxidant capacity, stability in beverages.*

ÍNDICE

RESUMEN	III
ABSTRACT	V
INTRODUCCIÓN	10
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	12
JUSTIFICACIÓN	14
OBJETIVOS	15
Objetivo general	15
Objetivos específicos	15
CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO	16
1.1. Flor de Jamaica	16
1.1.1. Composición nutricional	16
1.1.2. Composición química	16
1.2. Componentes bioactivos	17
1.2.1. Compuestos fenólicos	18
1.2.1.1. Degradación de compuestos fenólicos	19
1.2.2. Antocianinas	19
1.2.2.1. Degradación de las antocianinas	20
1.2.2.2. Factores que influyen en la degradación de las antocianinas	21
1.3. Capacidad antioxidante	22
1.4. Análisis de compuestos bioactivos y capacidad antioxidante	24
1.4.1. Determinación del contenido de antocianinas totales por el método de pH diferencial	24
1.4.2. Determinación del contenido de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu	24
1.4.3. Determinación de la capacidad antioxidante por el método DPPH	25
1.5. Alimentos funcionales	26

1.5.1. Bebidas funcionales.....	26
1.5.1.1. Bebidas antioxidantes	27
CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS	28
2.1. Ubicación del sitio experimental.....	28
2.2. Materia prima	28
2.3. Preparación de materia prima	28
2.4. Extracción de compuestos bioactivos	29
2.5. Elaboración de la bebida	29
2.6. Estudio de estabilidad	30
2.7. Control de pH y sólidos solubles durante el almacenamiento de la bebida	31
2.8. Evaluación de los compuestos bioactivos de la bebida	31
2.8.1. Determinación de antocianinas monoméricas totales	31
2.8.2. Determinación de fenoles totales	33
2.8.3. Determinación de capacidad antioxidante	34
2.9. Análisis estadístico	35
CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	36
3.1. Control de pH y Sólidos solubles	36
3.2. Determinación de antocianinas monoméricas totales	37
3.3. Determinación de fenoles totales	40
3.4. Determinación de capacidad antioxidante	43
CAPÍTULO IV: CONCLUSIONES	45
CAPÍTULO V: RECOMENDACIONES	46
BIBLIOGRAFÍA	47

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Control de pH y sólidos solubles de la bebida durante el almacenamiento	36
Tabla 2. Análisis de varianza de la concentración de antocianinas.....	38
Tabla 3. Prueba LSD de la concentración de antocianinas.....	38
Tabla 4. Análisis de varianza de la concentración de fenoles totales.....	40
Tabla 5. Prueba LSD de la concentración de fenoles.....	41
Tabla 6. Análisis de varianza de la capacidad antioxidante.....	43
Tabla 7. Prueba LSD de la capacidad antioxidante.....	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de flujo del proceso de elaboración de bebida de jamaica.....	30
---	----

INTRODUCCIÓN

Las bebidas funcionales representan al grupo de alimentos que abarca un mercado grande a nivel mundial y cada día va en crecimiento, ya que estos productos tienen la intención de proveer algún tipo de función fisiológica específica y generar beneficios en la salud de las personas (Buglass, 2015).

Dentro de las bebidas funcionales, las frutas y hortalizas representan la materia prima más utilizada debido a los nutrientes esenciales que contienen.

La flor de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) es una planta herbácea altamente valorada por sus propiedades medicinales, lo cual es respaldado por muchas investigaciones. Sus propiedades han sido objeto de interés por parte de las industrias alimentarias, quienes cada día buscan alternativas para el desarrollo de nuevos productos que estén direccionados al cumplimiento de algunas funciones en la salud de las personas.

Los extractos de flor de jamaica presentan un gran contenido de compuestos bioactivos tales como, fenoles, flavonoides y antocianinas, los cuales le otorgan la actividad antioxidante que ejercen efectos biológicos y exhibe actividades contra la diabetes, el cáncer y otras enfermedades metabólicas (Lin et al., 2011).

Cornejo & Párraga, (2021) han evidenciado mediante evaluaciones química que la bebida de flor de jamaica presenta una gran actividad antioxidante, siendo el contenido fenólico uno de los principales responsables de dicho atributo.

En este sentido, se puede mencionar que la presencia de compuestos bioactivos en las bebidas contribuye a la calidad nutricional, lo que determina que la bebida sea de carácter funcional, sin embargo, estos componentes pueden sufrir una degradación durante el almacenamiento, afectando su estabilidad y cambios en la calidad química del producto.

Existen diversos factores, tanto intrínsecos como extrínsecos que intervienen en la estabilidad de los compuestos bioactivos. En un estudio de estabilidad de una bebida de berenjena, Arrazola et al., (2014) concluyeron que la temperatura de almacenamiento es uno de los factores principales que intervienen en la estabilidad de las antocianinas, de igual manera, la pérdida del contenido fenólico tiene relación con la temperatura de almacenamiento, acelerando la degradación oxidativa lo cual se ve reflejado en el descenso de la actividad antioxidante (Camelo Méndez & Sotelo Díaz, 2012).

Resulta fundamental evaluar los cambios que se presentan en la bebida con referente a las antocianinas, fenoles totales y capacidad antioxidante, a fin de determinar qué factor influye en la disminución de la calidad química. Considerando lo que se ha mencionado con anterioridad, el objetivo de esta investigación fue determinar la estabilidad de los compuestos bioactivos y capacidad antioxidante presentes en una bebida de flor de jamaica con estevia, durante su almacenamiento.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los extractos de flor de jamaica presentan un alto contenido de componentes bioactivos actuando como antioxidantes en la salud de las personas, convirtiéndola en una materia prima potencial para la producción de alimentos saludables como son las bebidas funcionales (Peñarrieta et al., 2014). La presencia de antioxidantes en este tipo de bebidas retarda la degradación oxidativa, sin embargo, con el pasar del tiempo las propiedades saludables de esta bebida pueden verse afectada por la disminución de alguno de sus componentes.

Desde el enfoque de la conservación de las bebidas funcionales es muy usual la aplicación de tratamientos térmicos que permitan extender la vida útil de este tipo de productos, pero en cierto punto puede resultar desfavorable debido a que esto puede causar efectos adversos en la estabilidad de sus componentes (Maciel et al., 2018). Por lo tanto, en la etapa final del desarrollo de esta bebida es de vital importancia evaluar el contenido de sus componentes, tales como sustancias bioactivas y su capacidad antioxidante (Flores-Aguilar & Flores-Rivera, 2018).

Cornejo & Párraga, (2021) evaluaron la capacidad antioxidante y el contenido de fenoles totales en una bebida elaborada a partir de flor de jamaica, reportando un 50,45 $\mu\text{mol ET}/100\text{ g}$ de extracto en cuanto a la capacidad antioxidante y para el caso de fenoles totales 671 mg EAG/100 g de muestra.

Moreno, (2017) estudió la estabilidad de compuestos fenólicos en una bebida de flor de jamaica durante su almacenamiento, reportó un contenido inicial de 214,48 mg EAG/100 g de extracto y durante su almacenamiento se redujeron un 55,25 %.

Varios estudios han demostrado que existen diversos factores que van a influir en la estabilidad de los compuestos bioactivos, entre los cuales están la temperatura, el pH,

oxígeno, humedad, azúcares, presencia de ácidos, enzimas, entre otros (Galicía-Flores et al., 2008).

El problema actual que encontramos en las bebidas funcionales es que se desconoce el comportamiento que tienen los compuestos bioactivos que intervienen en la calidad del producto y por ende su tiempo de vida útil. De modo que, el estudio de estabilidad de la bebida de flor de jamaica es de suma importancia, ya que nos permitirá conocer como sus compuestos bioactivos se comportan durante el almacenamiento.

JUSTIFICACIÓN

El consumo de alimentos antioxidantes permite que en el cuerpo se interrumpan las reacciones oxidativas que se generan en las células a causa de los radicales libres. Por lo cual, su función es crucial en la reducción de enfermedades crónico degenerativas, que afectan la calidad de vida de las personas (Vilaplana, 2007).

Conocedores del problema de estabilidad que afrontan los compuestos bioactivos en las bebidas funcionales durante el tiempo de conservación, han demostrado mediante diversas investigaciones que existe una disminución del contenido de antocianinas y fenoles totales cuando el producto es expuesto a temperaturas no adecuadas y a otras condiciones que hacen que estas bebidas sean fácilmente degradables mientras están en almacenamiento (Santander-M. et al., 2017), por lo que esta investigación tiene como destino el estudio de la estabilidad de los compuestos bioactivos y su aporte a esta problemática.

Esta investigación aportará conocimiento sobre el comportamiento de los compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante presente en la bebida durante su almacenamiento, por lo tanto los beneficios que presenta los resultados de esta investigación, es que serán base para futuros trabajos, debido a que se podrían aplicar métodos nuevos o más específicos que permitan mantener de manera estable el contenido de compuestos bioactivos en bebidas funcionales o establecer condiciones favorables de almacenamiento sin que su tiempo de vida útil sea afectada.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar la estabilidad de los compuestos fenólicos en una bebida de flor de jamaica y estevia, durante su almacenamiento.

Objetivos específicos

- Evaluar los cambios de pH y sólidos solubles de la bebida de flor de jamaica con inclusión de estevia durante su almacenamiento.
- Evaluar los cambios en la calidad nutricional (contenido de fenoles totales, antocianinas y capacidad antioxidante) de la bebida de flor de jamaica con inclusión de estevia.

CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO

1.1. Flor de Jamaica

Hibiscus sabdariffa L. llamada comúnmente acedera roja, jamaica o roselle es una hierba perenne que integra la familia de las *Malvaceae* y cultivada ampliamente en muchos países en desarrollo. Alrededor del mundo existen más de 300 especies distribuidas en regiones tropicales y subtropicales (G. Riaz & Chopra, 2018).

La tradición de su cultivo se enfoca en la importancia que tiene su tallo, hojas, cáliz y semilla, tanto para la industria alimentaria y farmacéutica (Islam et al., 2021). El cáliz de *Hibiscus sabdariffa* L. presenta un elevado valor económico como cultivo alimenticio lo que le permite ser comercializado por todo el mundo, siendo utilizado como ingrediente para tés, bebidas, mermeladas, jaleas y otros alimentos (Alañón et al., 2020).

1.1.1. Composición nutricional

Independientemente de factores genéticos, ambientales o de cosecha, los cálices de jamaica son fuente importante de proteínas, hidratos de carbono, fibra, grasa y cenizas, lo cual le adjudican propiedades funcionales, nutracéuticas y farmacológicas (Hinojosa-Gómez et al., 2018). Su uso como tópico es muy tradicional para contrarrestar enfermedades biliosas, tos, malestar estomacal, cansancio físico, presión arterial, dolencias cardíacas, etc. (Richardson & Arlotta, 2021).

1.1.2. Composición química

Se ha evidenciado que además de su valor nutricional, los cálices son ricos en vitaminas, minerales y compuestos bioactivos; además contienen ácidos orgánicos, ácido málico, cítrico, oxálico y tartárico (G. Riaz & Chopra, 2018). Se detectaron que presentan buena fuente de

vitaminas, como vitamina A, riboflavina, ácido ascórbico y niacina (Richardson & Arlotta, 2021).

La presencia de varios metabolitos secundarios en los cálices de *Hibiscus* como los flavonoides, ácidos fenólicos y antocianinas, lo hacen responsable de varias actividades biológicas (El-Shiekh et al., 2020). Estos compuestos contribuyen en gran medida a generar un potencial antioxidante, antimicrobiano, antihipertensivo, anticancerígenos, antiinflamatorios y antidiabéticos de los extractos de *Hibiscus sabdariffa* (Prasetyoputri et al., 2021).

1.2. Componentes bioactivos

Los compuestos bioactivos son sustancias químicas que están presentes en pequeñas cantidades en los alimentos comúnmente de origen vegetal (Chalé et al., 2014). Al ser ingeridas intervienen en las actividades celulares y fisiológicas del cuerpo humano, aportando un beneficio a la salud, aún mayor que los denominados como nutrición básica (E. Martínez, 2015).

Los compuestos bioactivos, al igual que los ácidos orgánicos, poseen una actividad captadora de radicales libres mediante su capacidad antioxidante, lo cual permite su neutralización y reduce su efecto perjudicial (G. Riaz & Chopra, 2018). Estas sustancias también se denominan fitoquímicos o fitonutrientes. En todo el reino vegetal se pueden diferenciar cuatro grupos, como son las sustancias nitrogenadas, las terpénicas, las azufradas y las fenólicas. En cada grupo se encuentran sustancias de diversas familias químicas (Martínez-Navarrete et al., 2008).

Los extractos de cálices de jamaica contienen compuestos bioactivos tales como flavonoides, antocianinas, fitoesteroles, ácidos polifenólicos, fibra, vitaminas, minerales y otros antioxidantes (Medina-Carrillo et al., 2013).

1.2.1. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios distribuidos ampliamente en las plantas, ejerciendo funciones importantes durante el crecimiento y reproducción de las mismas, siendo gran protector contra patógenos y depredadores (Vuolo et al., 2019).

Su estructura se caracteriza por la presencia de un anillo aromático que contiene uno o más grupos hidroxilo (Saranraj et al., 2019). La posición y el número de grupos hidroxilo en relación con el grupo funcional carboxilo interviene en la actividad de los compuestos fenólicos (Vuolo et al., 2019).

Existe un amplio estudio de los compuestos fenólicos debido a su capacidad para neutralizar el estrés oxidativo gracias al poder antioxidante que contiene, lo cual está conexas a sus propiedades reductoras como agente donante de átomos de hidrógeno, electrones o cationes, lo que asegura su potencial actividad como captador de radicales libres (Vuolo et al., 2019). Esta capacidad de inactivar los radicales libres es comúnmente conocida como relación estructura-actividad (Minatel et al., 2017).

Además de contribuir en el color y características sensoriales de verduras y frutas (Vuolo et al., 2019), tienen una función importante al momento de reducir el riesgo de desarrollar enfermedades (Minatel et al., 2017). Entre sus efectos beneficiosos comprenden propiedades cardioprotectoras, neuroprotectoras, antiinflamatorios, antidiabéticos, antitumorales y antienvjecimiento (Zhang et al., 2018).

De acuerdo a su estructura química, los compuestos fenólicos pueden estar divididos en distintos subgrupos, como los flavonoides, ácidos fenólicos, taninos, lignanos, estilbenos, quinonas y curcuminoides (Gan et al., 2019).

Existen diversos factores que son responsables del contenido de compuestos fenólicos presentes en vegetales, tales como las condiciones ambientales, cultivo, poscosecha, procesamiento y almacenamiento (Saranraj et al., 2019).

1.2.1.1. Degradación de compuestos fenólicos

Por lo general las bebidas requieren de la pasteurización, sin embargo, este proceso tiene efecto en la actividad de los compuestos fenólicos, cuando la temperatura y el tiempo de exposición son elevados se generan procesos oxidativos lo que conlleva a una degradación química del contenido fenólico (Morales, 2020).

1.2.2. Antocianinas

Son un grupo de compuestos fenólicos que se localizan en una extensa variedad de flores y frutos (Jabeur et al., 2017), siendo los responsables de los colores amarillo, naranja, rojo, magenta, violeta y azul (Martín et al., 2017).

Son glucósidos constituidos principalmente por una molécula de antocianidina, unido a esta por un azúcar a través de un enlace β -glucosídico (Ortíz et al., 2011). En general las antocianinas contienen una sola unidad de glucósido, aunque algunas antocianinas contienen dos o más azúcares unidos en diversas posiciones (Martín et al., 2017).

El tipo de color y la intensidad con la que se presentan puede verse afectados por la cantidad de grupos hidroxilo y metoxilo, por lo tanto, si hay una gran cantidad de grupos hidroxilo el

color se torna más azulado y si hay una mayor cantidad de grupos metoxilo el enrojecimiento es mayor (Ayash et al., 2020).

A pesar de la disparidad estructural que presentan las antocianinas son uno de los pigmentos naturales de mayor importancia para el reemplazo de pigmentos sintéticos en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética (Marquez-Rodriguez et al., 2021).

Una de las funciones de gran interés es su actividad antioxidante, aunque su potencial depende de la estructura química (Martín et al., 2017), su efecto de incrementar numerosas funciones biológicas después de la ingestión es de gran importancia en la salud de los seres humanos (Majdoub et al., 2021).

Los cálices de *Hibiscus sabdariffa* L. presentan un gran contenido de antocianinas, siendo las responsables del color rojo de esta planta (Jabeur et al., 2017). Contienen antocianinas tales como cianidina-3-sambubiosido y delphinidina-3-sambubiosido como los principales componentes y delphinidina-3-O-glucósido, cianidina-3,5-diglucósido y cianidina-3-O-rutinósido como sustituyentes minoritarios (Lim, 2014).

Estudios muestran que la delphinidina-3-sambubiosido y cianidina-3-sambubiosido representan el 85% de las antocianinas en extractos de jamaica (G. Riaz & Chopra, 2018), contribuyendo a las actividades anticolesterol y antihipertensivas (Prasetyoputri et al., 2021).

1.2.2.1. Degradación de las antocianinas

Estudios han evidenciado que las antocianinas son susceptibles a degradarse, no solo en la extracción, sino también en el proceso y durante el tiempo de almacenamiento (G. Riaz & Chopra, 2018).

Las antocianinas presentes en bebidas se degradan a medida que transcurre el tiempo de almacenamiento (Zapata et al., 2016), esto puede deberse a una correlación entre el catión flavilio y el agua, formando una pseudobase inestable a causa del incremento en la actividad de agua (Sepúlveda & Zapata, 2019).

1.2.2.2. Factores que influyen en la degradación de las antocianinas

Las antocianinas son moléculas muy reactivas y sensibles a las reacciones de degradación, por ende, su estabilidad depende de factores como el oxígeno, el pH, la temperatura, presencia de enzimas y la luz; factores que llegan a afectar la estructura química de las antocianinas y por consiguiente el color (Martín et al., 2017).

Oxígeno

La presencia de oxígeno juega un papel importante en la estabilidad de las antocianinas, ya que puede acelerar su degradación mediante un proceso oxidativo directo o a través de la acción de enzimas oxidantes (Patras et al., 2010).

pH

Las antocianinas son muy susceptibles a los cambios de pH en el medio en que se encuentran (M. Riaz et al., 2016), siendo estables en ambientes ácidos e inestables en ambientes alcalinos (Aşkın & Küçüköner, 2019).

Peanparkdee et al., (2020) en su trabajo sobre la estabilidad de antocianinas en extractos de salvado de arroz, evidenciaron que existe un mayor contenido de antocianinas a valores de pH ácido de 3 y 5 que a pH neutro y básico.

Temperatura

El aumento de la temperatura reduce la estabilidad de las antocianinas durante el procesamiento y almacenamiento (M. Riaz et al., 2016).

Flores-Aguilar & Flores-Rivera, (2018) en su estudio sobre la estabilidad de antocianinas en una bebida de maíz morado concluyeron que las antocianinas tienden a degradarse en menor proporción a temperatura de refrigeración que a temperatura ambiente.

Sinela et al., (2017) mencionan que la degradación de la delfinidina-3-O-sambubiosido tiende a ser más sensible al aumento de la temperatura que la cianidina-3-O-sambubiosido en extractos de *Hibiscus sabdariffa* durante su almacenamiento.

Enzimas

Una de las enzimas que comúnmente degradan a las antocianinas son las glucosidasas, quienes se encargan de romper el enlace glucosídico y dando como resultado antocianinas muy inestables (M. Riaz et al., 2016).

1.3. Capacidad antioxidante

La oxidación es una reacción química en la cual una sustancia transfiere electrones a un agente oxidante. Esta reacción produce moléculas conocidas como radicales libres, lo cual dañan a las células mediante reacciones en cadena. La culminación de estas reacciones se debe a la presencia de antioxidantes, los cuales son moléculas capaces de prevenir o retardar la oxidación de las células, eliminando los radicales libres (Hamid et al., 2010).

Los antioxidantes pueden ser agentes reductores tales como el ácido ascórbico, tioles o polifenoles y su acción implica dos mecanismos (Hamid et al., 2010):

- Primero se presenta una ruptura de la cadena en el cual los antioxidantes primarios ceden electrones a los radicales libres que se encuentran en el medio.
- Segundo se da la eliminación del indicador RNS (especies reactivas de nitrógeno) y ROS (especies reactivas de oxígeno) a través de eliminación del catalizador que inició la cadena.

La presencia de antioxidantes en los alimentos es de suma importancia para su conservación (Shi & Noguchi, 2001) y su utilización es muy amplia como ingredientes en suplementos dietéticos lo cual permite prevenir enfermedades coronarias y el cáncer (Hamid et al., 2010). Los compuestos fenólicos tales como los flavonoides son antioxidantes muy típicos (Shi & Noguchi, 2001).

Los alimentos que contienen antioxidantes presentan una función muy particular conocida como actividad antioxidante. Dicha función es la capacidad que tiene el alimento para retardar o inhibir la degradación oxidativa de las moléculas producidas por los radicales libres (Leos-Rivas et al., 2016).

Varios estudios han demostrado que la capacidad antioxidante de un alimento está determinada por (Londoño, 2012):

- Reactividad química del antioxidante
- Capacidad que tiene el antioxidante para llegar al sitio de la reacción
- Estabilidad de los productos formados luego de la inhibición de los radicales libres.

Se ha evidenciado que los extractos de flor de jamaica presentan una considerable actividad antioxidante (Cornejo & Párraga, 2021), siendo una de las especies más estudiadas por su elevado contenido en antioxidantes como compuestos fenólicos, flavonoides, ácidos polifenólicos y antocianinas (López et al., 2019).

Medina-Carrillo et al., (2013) concluyeron que, la actividad antioxidante de los extractos de cálices de jamaica tiene una principal relación con el contenido de antocianinas monoméricas y en menor cantidad con los compuestos fenólicos. Por ende, a medida que aumenta el contenido de antocianinas, aumenta la actividad antioxidante.

1.4. Análisis de compuestos bioactivos y capacidad antioxidante

1.4.1. Determinación del contenido de antocianinas totales por el método de pH diferencial

Este método se basa en la transformación reversible que experimentan los pigmentos de antocianinas en su estructura debido al cambio de pH (Martínez-Cruz et al., 2011), logrando ser observado mediante los espectros de absorbancia UV-Vis a una longitud de onda de 520 nm y 700 nm, utilizando soluciones tampón para lecturas a pH 1 y pH 4,5 (H. Martínez, 2015).

Al incrementar el pH a 4,5 se crea una condición en la cual las antocianinas no presentan color y tienen una menor absorción de energía, mientras que al descender el pH a 1, los pigmentos antociánicos muestran una coloración intensa. La diferencia de absorbancia permite estimar el contenido de antocianinas presentes en la muestra (Teixeira et al., 2008).

1.4.2. Determinación del contenido de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu

El método de Folin-Ciocalteu es el más utilizado para la determinación del contenido fenólico en productos naturales (L. Y. Chen et al., 2015). Se fundamenta en la capacidad que tienen los compuestos fenólicos y polifenólicos para reaccionar con el reactivo de Folin-Ciocalteu (Ramirez-Sanchez et al., 2010).

Esta reacción de óxido/reducción se presenta en condiciones básicas, con el propósito de que se origine un ion fenolato que reduce al reactivo y se crea un complejo de molibdeno (Muñoz-Bernal et al., 2017), adquiriendo un color azul intenso cuya absorbancia puede ser medida por espectrofotometría a una longitud de 765 nm y los resultados se expresan en equivalente de ácido gálico (Leos-Rivas et al., 2016).

Una desventaja de este método es su falta de especificidad, por lo cual la medición puede ser afectada por otras moléculas reductoras no fenólicas (Rover & Brown, 2013).

1.4.3. Determinación de la capacidad antioxidante por el método DPPH

La capacidad antioxidante de un alimento es determinada de manera cualitativa por el método DPPH (Leos-Rivas et al., 2016). Este método fue propuesto originalmente para medir la capacidad que tienen los compuestos actuando como captadores de radicales libres (Kedare & Singh, 2011) y para cuantificar la actividad antioxidante de los alimentos, extractos de plantas y bebidas, utilizando estándares antioxidantes como el ácido ascórbico, ácido gálico y Trolox (de Menezes et al., 2021).

El DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) es un radical sintético comúnmente utilizado para el estudio de actividad antioxidante de compuestos fenólicos (Nenadis & Tsimidou, 2010), siendo este uno de los pocos radicales orgánicos estables y disponibles comercialmente (Londoño, 2012). Este radical tiene un electrón de valencia no apareado en un átomo del puente de nitrógeno (Vuolo et al., 2019), el cual se reduce al obtener un átomo de hidrógeno de los antioxidantes, provocando la formación de la hidracina y un cambio de color de la solución, pasando de violeta a amarillo pálido (X. Chen et al., 2020).

La medición de la capacidad antioxidante se la realiza por espectrofotometría, en la cual se sigue el decaimiento de la absorbancia a 517 nm y su actividad es expresada como equivalente de Trolox (Vuolo et al., 2019).

Su simplicidad, el bajo costo, poca habilidad del operador y bajo requerimiento instrumental, son parte de las ventajas que presenta este método (de Menezes et al., 2021), sin embargo, la difícil interpretación de los resultados cuando el espectro de absorbancia de una sustancia se junta con el radical, puede verse como una desventaja de este método (Londoño, 2012).

1.5. Alimentos funcionales

Los alimentos funcionales son aquellos que en su formulación contiene algún ingrediente funcional que genera efectos beneficiosos y nutricionales (Kaur & Das, 2011), mejorando el sistema inmune del consumidor y logrando así reducir el riesgo de contraer alguna enfermedad (Fuentes-Berrio et al., 2015).

1.5.1. Bebidas funcionales

Se denominan bebidas funcionales a aquellas bebidas no alcohólicas las cuales han sido fortificadas con uno o más ingredientes funcionales, cuyo propósito es mejorar las condiciones generales del cuerpo (Wu et al., 2015). Estas bebidas contienen grandes cantidades de compuestos bioactivos y con una alta actividad antioxidante, siendo beneficioso en la prevención de enfermedades relacionadas al metabolismo (Paladines-Santacruz et al., 2021).

En el grupo de los alimentos funcionales las bebidas representan la clase más activa, debido a que representan un medio propicio para poder incorporar nutrientes esenciales y compuestos bioactivos que permitan satisfacer la demanda de los consumidores (Istrati et al., 2018).

1.5.1.1. Bebidas antioxidantes

Los compuestos fenólicos son las principales clases de antioxidantes que se encuentran en las bebidas siendo estos excelentes para estabilizar los radicales libres, previniendo enfermedades patológicas como el cáncer y enfermedades cardiovasculares (Derkyi et al., 2018).

La capacidad antioxidante presente en la bebida depende de la concentración de compuestos bioactivos contenidos en la materia prima, además, del procesamiento empleado y las condiciones de almacenamiento del producto (Silván et al., 2014).

CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Ubicación del sitio experimental

El Estudio Experimental tuvo su realización en el laboratorio de investigación de Alimentos, conjuntamente con el laboratorio de investigación de fitoquímica, ambos pertenecientes a la Facultad de Ciencias Químicas y de la Salud, de la Universidad Técnica de Machala.

2.2. Materia prima

Los cálices frescos de flor de jamaica de la especie *Hibiscus sabdariffa* Linn se obtuvieron de los cultivos del Sr. Carlos Oyola, dicho cultivo se encuentra ubicado en la comuna de San José, de la parroquia Bellavista, del cantón Santa Rosa, provincia de El Oro.

2.3. Preparación de materia prima

Los cálices frescos se sometieron a un proceso de lavado y desinfección con agua potable y una solución desinfectante para frutas y hortalizas (STAR-BAC), se dejó escurrir el agua en exceso para posteriormente realizar una separación de las semillas. Luego se procedió a secar los cálices en una estufa (MEMMERT UF 55) con trampilla abierta al 100% y circulación de aire forzado del 100%, este proceso fue realizado a una temperatura de 45 ± 2 °C por tiempo cercano de 48 horas. Una vez que los cálices fueron deshidratados se procedió a colocar en un molino de cuchillas semi industrial y la harina que se obtuvo fue filtrada a través de un tamiz de 425 micrones para luego ser envasado en bolsas de plástico y conservados a temperatura ambiente.

2.4. Extracción de compuestos bioactivos

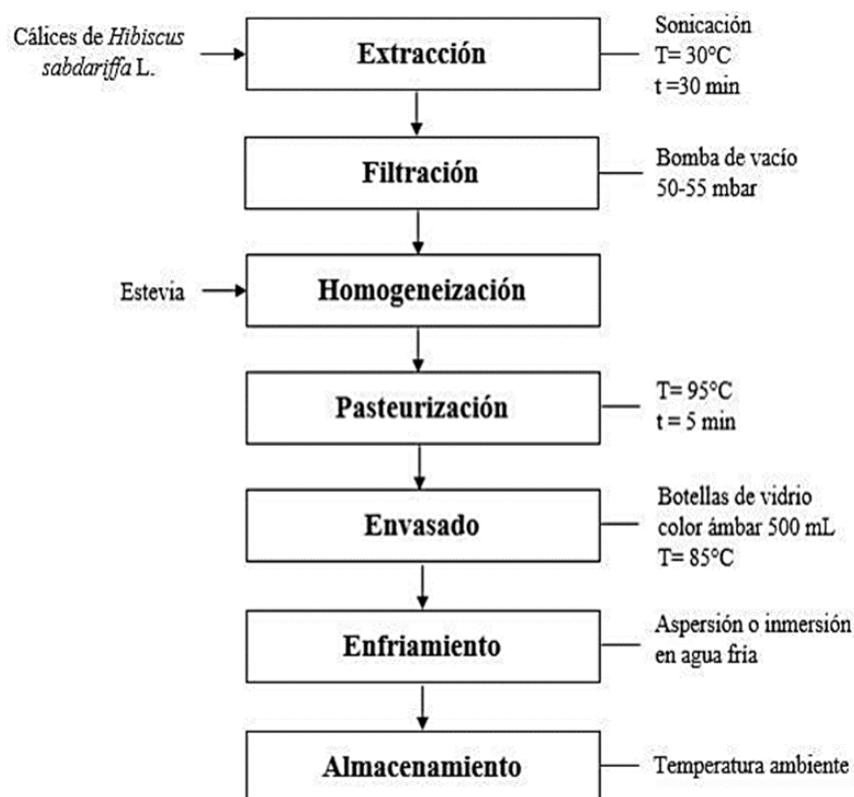
Para extraer los compuestos bioactivos de los cálices de jamaica se aplicó el método de Extracción Asistida por Ultrasonido (EAU), siendo el más efectivo según lo descrito por Jaramillo & Valarezo, (2020), quienes establecen un parámetro de temperatura de 30 °C y un tiempo de 30 minutos. En un matraz Erlenmeyer se colocó 2 g de extracto seco por cada 100 mL de solución acuosa y se aforó a 500 ml utilizando agua como disolvente, para luego ser llevado a baño ultrasónico (ULTRASONIC BATH 5,7L, Fisher Scientific). Posterior a esto se filtró con ayuda de papel filtro.

2.5. Elaboración de la bebida

Para la elaboración de la bebida de flor de jamaica con inclusión de estevia se utilizó la fórmula propuesta por Jaramillo & Valarezo, (2020), quienes establece la utilización de cáliz de jamaica en una concentración de 2 g/100 mL y 0,5 % de estevia, como componentes principales de la bebida. Cabe mencionar que esta formulación presentó una mayor aceptación sensorial por parte de los jueces evaluadores. La metodología se muestra en el diagrama de flujo presentado en la figura 1.

Figura 1.

Diagrama de flujo del proceso de elaboración de bebida de jamaica.



Nota. Adaptado del Diagrama de flujo del proceso de elaboración de la bebida, por Jaramillo & Valarezo, (2020), Universidad Técnica de Machala.

2.6. Estudio de estabilidad

Para evaluar la estabilidad de los compuestos bioactivos (antocianinas y fenoles totales) y la capacidad antioxidante, se requirió de un diseño eficiente que permita mantener el control del número de mediciones indispensables. El tiempo estimado de evaluación fue de 35 días, realizando evaluaciones periódicas cada semana, a la par de estos ensayos se plantea realizar una caracterización fisicoquímica con la finalidad de identificar posibles cambios en el pH y °Brix del producto durante su almacenamiento.

2.7. Control de pH y sólidos solubles durante el almacenamiento de la bebida

Se realizó la evaluación del pH y sólidos solubles a cada muestra en su estado acuoso. La medición del pH en cada una de las muestras se efectuó mediante el método de potenciometría y la determinación de sólidos solubles (°Brix) por el método de ensayo NTE INEN-ISO 2173. Cabe destacar que se efectuaron tres repeticiones por cada evaluación.

2.8. Evaluación de los compuestos bioactivos de la bebida

La evaluación de los compuestos bioactivos fue realizada a extractos secos. Para la obtención del extracto, cada muestra se colocó en un balón de 500 ml y fue concentrado a 44 °C en un rotaevaporador (HEIDOLPH LABOROTA 4001), acoplado a un criostato (LAUDA ALPHA RA-8) a -4,5 °C y con una bomba de vacío (VACUUBRAND-PC600) a una presión de 39 mbar. Cada extracto concentrado fue trasvasado a cajas de Petri para posteriormente ser secados en una estufa (MEMMERT UF 55) con trampilla abierta al 100% y circulación de aire forzado del 100%. Luego de esto, los extractos fueron cubiertos con papel aluminio para protegerlos de la luz y almacenados a temperatura de refrigeración para su posterior evaluación. La evaluación de cada muestra se realizó por triplicado.

2.8.1. Determinación de antocianinas monoméricas totales

En la preparación de las muestras se procedió a utilizar vasos de precipitación de 50 mL, en el cual se pesó 0,02 g de extracto seco de cada muestra y se diluyó completamente con agua destilada para luego ser trasvasado a un balón volumétrico aforado a 10 mL.

El contenido de antocianinas totales se determinó por el método de pH diferencial descrito por Giusti & Wrolstad, (2005). Se colocaron 0,4 mL de cada extracto diluido en tubos de ensayo, con 1,6 mL de solución buffer de Cloruro de potasio (0,025 M a pH 1) y en otros

tubos de ensayo 1,6 mL de solución buffer de Acetato de sodio (0,4 M a pH 4,5). Las muestras se agitaron en un vortex, se taparon y se dejaron reposar por 15 minutos.

Finalmente, para medir la absorbancia se utilizó un espectrofotómetro (SPECTROPHOTOMETER UV-Visible Thermo Scientific Evolution 201) y se realizó la lectura a una longitud de onda de 700 y 510 nm, en la cual se utilizó agua destilada como blanco.

La absorbancia de cada muestra fue calculada utilizando la Ec. (1) y la concentración del pigmento de antocianina monomérica presente en cada muestra fue calculado en base a la cianidina-3-glucósido, utilizando la Ec. (2).

$$A = [(A_{510} - A_{700})]_{pH 1.0} - [(A_{510}) - A_{700}]_{pH 4.5} \quad (1)$$

$$\text{Antocianinas monoméricas (mg/L)} = \frac{(A * PM * FD * 1000)}{(\epsilon * 1)} \quad (2)$$

Donde:

A = Absorbancia calculada de la muestra

PM = Peso molecular de la cianidina-3-glucósido (449,2 g/mol)

FD = Factor de dilución (5)

1000 = Factor de conversión de molar a ppm (mg/L)

ϵ = Absortividad molar de la cianidina-3-glucósido (26900 L mol⁻¹cm⁻¹)

1 = Grosor de la celda (1 cm)

2.8.2. Determinación de fenoles totales

En la preparación de las muestras se procedió a utilizar vasos de precipitación de 50 mL, en el cual se pesó 0,07 g de extracto seco de cada muestra y se diluyó completamente con agua destilada para luego ser trasvasado a un balón volumétrico aforado a 10 mL.

La determinación del contenido de fenoles totales se realizó por el método de Folin-Ciocalteu siguiendo la metodología expuesta por Singleton et al., (1999) con ciertas modificaciones. En tubos de ensayo se adicionaron 50 μ L de muestra acuosa, junto con 2,5 mL de solución de Folin-Ciocalteu al 10% (10 mL de reactivo diluido con 100 mL de agua destilada) y 450 μ L de agua destilada. Se procedió a agitar en un vortex (Analog Vortex Mixer) para luego dejarlo en reposo por 5 minutos. Posteriormente, se le adicionaron 2 mL de solución de Na_2CO_3 al 7,5% (7,5 g de Na_2CO_3 disueltos en 100 mL de agua destilada) agitando nuevamente y dejándolo en reposo por 2 horas.

La absorbancia de cada muestra se midió usando un espectrofotómetro (SPECTROPHOTOMETER UV-Visible Thermo Scientific Evolution 201) a una longitud de onda de 765 nm. Se realizó una curva de calibración utilizando concentraciones de: 0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9 mg/ml a partir de una disolución patrón de ácido gálico (10 mg/mL) con la finalidad de cuantificar el contenido fenólico total.

El contenido de fenoles totales se expresa en mg EAG/g de ES y se calculó en base a la curva de calibración aplicando un análisis de regresión simple, comprobando el comportamiento lineal y en la cual se obtuvo la Ec. (3).

$$\text{Absorbancia} = 0,0249667 + 1,00367 * \text{concentración}(\text{mg/mL}) \quad (3)$$

2.8.3. Determinación de capacidad antioxidante

En la preparación de las muestras se procedió a utilizar vasos de precipitación de 50 mL, en el cual se pesó 0,07 g de extracto seco de cada muestra y se diluyó completamente con agua destilada para luego ser trasvasado a un balón volumétrico aforado a 10 mL.

En la preparación de la disolución del DPPH a 0,1 mM se pesó 0,0024 g del reactivo y se colocó en un balón volumétrico a 100 mL con etanol.

La capacidad antioxidante se determinó mediante el método 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) propuesto por Brand-Williams et al., (1995). Para el ensayo de cada una de las muestras (A_1) se tomó 100 μ L de cada extracto diluido y se adiciono 3,9 de la disolución del DPPH (0,1 mM), se agitó en un vortex (Analog Vortex Mixer) y se mantuvieron en oscuridad a temperatura ambiente por 30 minutos.

Se preparó una solución correctora de color para cada una de las muestras (A_2), en tubos de ensayo se colocó 100 μ L de muestra y 3,9 mL de etanol, se agitó y se almacenó en oscuridad. Para el control del DPPH (A_0) se mezclaron 3,9 mL de DPPH y 100 μ L de etanol.

La lectura de la absorbancia se realizó en un espectrofotómetro (SPECTROPHOTOMETER UV-Visible Thermo Scientific Evolution 201) con una longitud de onda de 517 nm y como blanco se utilizó etanol.

El porcentaje de captura del DPPH se calculó mediante la Ec. (4).

$$\% \text{ Captura de DPPH} = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0} \right) * 100 \quad (4)$$

Donde:

A_1 = Absorbancia de la muestra + DPPH

A_2 = Absorbancia de la muestra + metanol

A_0 = Absorbancia de solución DPPH + metanol

2.9. Análisis estadístico

Los datos obtenidos en cuanto a la determinación de antocianinas monoméricas totales, fenoles totales y capacidad antioxidante durante los 35 días de almacenamiento, fueron procesados mediante un análisis de varianza (ANOVA) para identificar si los cambios que se presentan en el tiempo de estudio son estadísticamente significativos, para lo cual el valor de $p < 0,05$ fue considerado como diferencia significativa. También se aplicó una prueba de múltiples rangos (LSD) de Fisher con un nivel de confiabilidad del 95% para evaluar la significancia entre cada tiempo. El programa empleado para el análisis estadístico fue el STATGRAPHICS Centurion XVI.I.

CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Control de pH y Sólidos solubles

Los resultados obtenidos en la evaluación de pH y sólidos solubles durante el almacenamiento de la bebida de flor de jamaica con inclusión de estevia se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1.

Evaluación fisicoquímica de la bebida durante el almacenamiento.

Tiempo	pH	°Brix
0	2,57 ± 0,04	1,70 ± 0,00
1	2,58 ± 0,01	1,77 ± 0,06
2	2,61 ± 0,02	1,87 ± 0,06
3	2,66 ± 0,04	1,93 ± 0,06
4	2,70 ± 0,02	1,90 ± 0,00
5	2,73 ± 0,01	1,90 ± 0,00

De acuerdo a los valores promedio que se obtuvieron se puede observar que existe un leve incremento en el pH y los °Brix de la bebida durante los 35 días de almacenamiento. Sin embargo, estos valores aún se encuentran dentro del límite permitido por la NTE-INEN 2304, (2017) para bebidas no carbonatadas.

En el tiempo 0 el pH tuvo un promedio de $2,57 \pm 0,04$, mientras que Cornejo & Párraga, (2021) en su investigación de una bebida de flor de jamaica obtiene un valor menor de 2,39 de pH y de igual manera Paraíso et al., (2021) con un valor de pH de $2,39 \pm 0,04$. De acuerdo a la variación presente en estos resultados se puede decir que el uso de estevia en la

formulación de la bebida podría influir en el aumento de pH, no obstante, no se puede perder de vista que existen factores medioambientales de la zona de cultivo, así como factores endógenos de la especie que también pudiese influir.

En esta investigación el valor del pH de la bebida a temperatura ambiente pasó de 2,57 a 2,73. García, (2018) que en su tesis sobre la estabilidad de una bebida de jengibre-zarzamora identificó una disminución del pH, partiendo de 4,09 y con el paso del tiempo manteniendo la bebida a temperatura ambiente presentó un valor final de 3,4.

Basándose en estos resultados se puede ver que la variación del pH de una bebida durante su almacenamiento se debe a factores como la composición del producto. Sin embargo, Aday et al., (2013) en su trabajo acerca de extender la vida útil de las fresas, informaron que la aplicación de tratamiento por ultrasonido aumenta el nivel de pH durante su almacenamiento.

Los °Brix en la bebida en estudio mostraron un comportamiento similar a lo reportado por Lele & Kadam, (2016) en su estudio del jugo de zanahoria y calabaza, mostrando un incremento de los sólidos solubles. Según Raj et al., (2011) el aumento de los sólidos solubles podría tener como causa la hidrólisis de polisacáridos y su posterior conversión en azúcares simples. Además, el valor de los °Brix dependerá de diversos factores tales como la relación extracto:agua, la variedad y características de jamaica utilizada (Salinas-Moreno et al., 2012).

3.2. Determinación de antocianinas monoméricas totales

En la Tabla 2 se muestra el análisis de varianza (ANOVA) en cuanto a la concentración de antocianinas monoméricas totales (mg equivalente a cianidina-3-glucósido/L) presentes en la bebida de flor de jamaica durante su almacenamiento.

Tabla 2.*Análisis de varianza de la concentración de antocianinas.*

Fuente	Suma de cuadrados	G.l.	Cuadrado medio	F	Sig.
Entre grupos	455,047	5	91,0094	86,93	0,0000
Intra grupos	10,4697	10	1,04697		
Total	465,516	15			

Como se puede observar existe una diferencia significativa ($p < 0,05$) entre la media de la concentración de antocianinas y los tiempos de estudio, teniendo en cuenta el nivel de significancia del 95%. Los resultados de la prueba de múltiples rangos presentados en la Tabla 3, muestran las medias correspondientes a cada tiempo de estudio y la homogeneidad entre los grupos.

Tabla 3.*Prueba LSD de la concentración de antocianinas.*

Tiempo	Media Antocianinas (mg cianidina-3-glucósido/L)	Grupos Homogéneos
0	60,78	X
1	54,48	X
2	54,19	X
3	54,48	X
4	49,54	X
5	44,33	X

Los resultados estadísticos obtenidos durante los 35 días de almacenamiento de la bebida de flor de jamaica determinan que existe diferencia significativa entre la concentración de antocianinas del tiempo 0 para el tiempo 1 disminuyendo aproximadamente en un 13%, para el tiempo 2 y 3 se presentó una leve disminución lo cual no presenta una diferencia

significativa y para el tiempo 4 y 5 se puede apreciar una disminución considerable lo cual presenta una diferencia significativa con relación a los otros tiempos.

El contenido de antocianinas monoméricas en la bebida fresca, es decir estudiada al tiempo cero fue de 60,78 mg cianidina-3-glucósido/L y después de cinco semanas hubo una disminución del 27%, lo cual muestra cierta similitud con los resultados obtenidos por Ruangsri et al., (2008) obteniendo una disminución de antocianinas monoméricas de hasta un 73%, en su estudio sobre los cambios en las propiedades bioactivas del extracto de Roselle en un tiempo de 90 días. Flores-Aguilar & Flores-Rivera, (2018) durante la evaluación de la estabilidad de antocianinas en la bebida de maíz morado y uña de gato evidenciaron una disminución del 29% respecto al contenido inicial, en un tiempo de estudio de 86 días.

Según lo expuesto por estos autores, la disminución de antocianinas monoméricas en extractos de *Hibiscus sabdariffa* como de otras fuentes botánicas, presentan una tasa de degradación más alta cuando el producto se encuentra almacenado a temperatura ambiente. Esta acelerada degradación puede deberse a la pérdida de azúcar originada por la hidrólisis de los enlaces glucosídico, quien tiene un efecto protector en las antocianinas (Laleh et al., 2006).

Además, de la temperatura, el pH afecta de una manera significativa la estabilidad de las antocianinas, cambiando su estructura a medida que cambia el pH del medio (Vidana et al., 2021). Esta teoría fue demostrada por Laleh et al., (2006) que en su trabajo evidencian una degradación de las antocianinas a causa del aumento de pH en el medio, debido a que las sales del ion flavilio pierden el protón a valores de pH más altos transformándose en una base quinoidal, la cual es un pigmento inestable que al unirse con el agua forman un compuesto incoloro llamado cromenol. Tal como puede verse en la Tabla 1, el pH de la bebida tiende a

incrementarse, lo cual, según diversos estudios podría ser uno de los causantes de la degradación de los pigmentos antociánicos.

3.3. Determinación de fenoles totales

En la Tabla 4 se muestra el análisis de varianza (ANOVA) en cuanto a la concentración de fenoles totales (mg EAG/g de ES) presentes en la bebida de flor de jamaica durante su almacenamiento.

Tabla 4.

Análisis de varianza de la concentración de fenoles totales.

Fuente	Suma de cuadrados	G.l.	Cuadrado medio	F	Sig.
Entre grupos	280,6	5	56,1201	24,07	0,000
Intra grupos	23,3119	10	2,33119		
Total	303,912	15			

Como se puede observar existe una diferencia significativa ($p < 0,05$) entre la media del contenido de fenoles totales y los tiempos de estudio, teniendo en cuenta el nivel de significancia del 95%. Los resultados de la prueba de múltiples rangos presentes en la Tabla 5, muestran las medias correspondientes a cada tiempo de estudio.

Tabla 5.

Prueba LSD de la concentración de fenoles.

Tiempo	Media Fenoles totales (mg EAG/g de ES)	Grupos Homogéneos
0	66,05	X
1	64,30	X
2	64,21	X
3	58,36	X
4	56,47	X
5	55,68	X

Los resultados de los análisis permiten observar que el comportamiento de fenoles totales varía con el tiempo, presentando un descenso durante los 35 días de almacenamiento. Los valores obtenidos en la prueba de múltiple rango señalan que, partiendo del tiempo 0 hasta el tiempo 2 no existe diferencia significativa, debido a que el contenido de fenoles totales no disminuye de manera notable. Para el tiempo 3 se observa una disminución considerable lo cual no es constante hasta el tiempo 5, por tanto, no existe diferencia significativa entre los últimos tres tiempos.

Al tiempo cero el contenido de fenoles totales en la bebida fue de 66,05 mg EAG/g de ES, lo cual es un valor muy superior a lo reportado por Awe et al., (2013) quienes obtienen una concentración que varía de 14-22 mg EAG/g de extracto.

Preciado, (2016) desarrolló una bebida funcional a base de extractos de jamaica y reporto un contenido de compuestos fenólicos totales de $34,07 \pm 0,71$ expresado en mg EAG/ml de muestra.

Los resultados anteriores permiten determinar que la variación en cuanto al contenido de fenoles totales puede deberse a factores como, el tipo de cáliz utilizado y el procesamiento

empleado en la bebida. No obstante, en un estudio realizado por Sáyago-Ayerdi et al., (2007) mencionan que alrededor del 30% de los compuestos fenólicos encontrados en la bebida de roselle están asociados con la fibra dietética soluble presente en la materia prima.

En cuanto a la estabilidad, a temperatura ambiente se observó que el contenido de fenoles totales de la bebida presentó una reducción del 16% de su contenido inicial. Una disminución mucho menor (6%) obtuvieron Coelho et al., (2020) para fenoles totales en té verde y negro.

En varios estudios sobre la estabilidad al almacenamiento de los compuestos fenólicos en distintos tipos de bebidas, Sobottka et al., (2017) reportan una disminución del 28% en el contenido de fenoles totales en batidos de frutas a los 45 días de almacenamiento a 25 °C, mientras que (Wojdyło et al., 2014) señalan que los niveles de fenoles totales en el jugo de membrillo disminuyeron un 14% durante el 6 meses de almacenamiento a 4 °C.

Por lo tanto, al analizar estos resultados podemos darnos cuenta que la temperatura juega un papel clave en la degradación de los fenoles totales, lo cual puede generar impacto en las características nutricionales y sensoriales del producto.

Pérez-Ramírez et al., (2015) en su estudio sobre el efecto de la estevia en la estabilidad de los compuestos fenólicos, informa que este edulcorante aumenta la estabilidad del ácido gálico, ácido rosmarínico, quercitina, entre otros compuestos fenólicos.

De acuerdo a esta información, incorporar estevia a la bebida de jamaica disminuye la tasa de degradación de los compuestos fenólicos durante el almacenamiento, lo cual se evidencia con la leve disminución de fenoles totales obtenidos en este estudio, siendo la concentración de estevia una de las principales diferencias respecto a formulaciones evaluadas por otros autores.

3.4. Determinación de capacidad antioxidante

En la Tabla 6 se muestra el análisis de varianza (ANOVA) en cuanto a la capacidad antioxidante (% de captura de DPPH) presente en la bebida de flor de jamaica durante su almacenamiento.

Tabla 6.

Análisis de varianza de la capacidad antioxidante.

Fuente	Suma de cuadrados	G.l.	Cuadrado medio	F	Sig.
Entre grupos	18,2689	5	3,65378	14,85	0,0001
Intra grupos	2,95253	12	0,246044		
Total	21,2215	17			

Como se puede observar existe una diferencia significativa ($p < 0,05$) entre la media de la capacidad antioxidante y los tiempos de estudio, teniendo en cuenta el nivel de significancia del 95%. Los resultados de la prueba de múltiples rangos presentes en la Tabla 7, muestran que medias correspondientes a cada tiempo de estudio presentan una diferencia significativa entre sí.

Tabla 7.

Prueba LSD de la capacidad antioxidante.

Tiempo	Media Capacidad antioxidante (% de captura de DPPH)	Grupos Homogéneos
0	101,16	X
1	100,40	X
2	99,29	X
3	99,44	X
4	98,58	X X
5	98,22	X

De acuerdo con el análisis estadístico de la actividad antioxidante presente en la bebida de flor de jamaica se puede observar un leve descenso a medida que transcurría los 35 días de almacenamiento a temperatura ambiente. Se indica que no existe diferencia significativa entre el tiempo 0 y tiempo 1, no obstante, estos valores difieren con los valores obtenidos en el tiempo 2, 3 y 4 los cuales no muestran diferencia significativa entre sí. En el tiempo 5 de almacenamiento continúa el descenso de la capacidad antioxidante, no siendo tan notorio con respecto al tiempo 4 pero sí mostrando diferencia significativa con los demás tiempos de estudio.

Durante el almacenamiento a temperatura ambiente la capacidad antioxidante de la bebida de jamaica presentó una disminución del 3%, por lo que Baeza et al., (2017) mencionan que esta reducción de la capacidad antioxidante puede estar relacionada con la concentración de compuestos fenólicos.

Mgaya-Kilima et al., (2015) evaluaron las propiedades antioxidantes de una bebida de jamaica y mango, reportando que durante seis meses de almacenamiento a 28 °C se presentó una pérdida significativa de la capacidad antioxidante. Sin embargo, Sattar et al., (2020) constataron una disminución del 2% de la capacidad antioxidante de una bebida de durazno luego de 30 días de almacenamiento a temperatura de refrigeración.

Consecuentemente con estos resultados expuestos por diversos autores se puede mencionar que la actividad antioxidante de una bebida disminuye de manera independiente a la temperatura de almacenamiento. No obstante, existen otros factores tales como el tratamiento térmico aplicado a las bebidas que intervienen en la capacidad antioxidante, siendo la pasteurización causante de la disminución en la actividad antioxidante de algunas bebidas (Tembo et al., 2017).

CAPÍTULO IV: CONCLUSIONES

- El pH y los sólidos solubles de la bebida muestran una clara tendencia al aumento durante el almacenamiento, en el caso de pH esto podría asociarse a la inclusión de estevia en la formulación, la cual según algunos autores genera un aumento en la concentración de iones de hidrógeno de la bebida. El incremento de sólidos solubles se asocia a la formación de azúcares simples durante el tiempo de almacenamiento.
- En este estudio se evidenció que los compuestos fenólicos presentes en la bebida de flor de jamaica disminuyen durante el almacenamiento a temperatura ambiente, incluyendo dentro de este grupo de compuestos a los pigmentos antociánicos, lo cual provocó una caída en la capacidad de secuestro de los radicales libres de la bebida.
- Se puede concluir que el tiempo y la temperatura de almacenamiento incide en la estabilidad de las antocianinas y de los compuestos fenólicos totales de la bebida, lo cual afecta la capacidad antioxidante de la bebida, este efecto se ve marcado a partir de los 28 días de almacenamiento y podría deberse a diversos factores que afectan la estabilidad de las antocianinas, siendo uno de ellos la actividad de agua del medio, la cual lógicamente es muy alta en una bebida ya que más del 90% de una bebida es agua, otro factor que pudiese influir sobre la estabilidad de estos metabolitos de interés es el pH. Sean estos u otros factores los causantes de la disminución de estos compuestos, la calidad de la bebida se ve afectada en el tiempo, con lo cual disminuiría el tiempo de vida útil de la bebida si en ella se hiciesen alegaciones de salud ante el ente regulador.

CAPÍTULO V: RECOMENDACIONES

- Realizar un estudio de vida de anaquel con la finalidad de predecir la vida útil considerando a la temperatura de almacenamiento un variable de estudio.
- Efectuar una evaluación sensorial durante el tiempo de almacenamiento que permita determinar el tiempo en el que la bebida presentaría los primeros cambios en la calidad organoléptica.
- Evaluar la calidad microbiológica de la bebida durante el almacenamiento, con el propósito de determinar el tiempo en el que el producto dejaría de ser inocuo.

BIBLIOGRAFÍA

- Aday, M. S., Temizkan, R., Büyükcan, M. B., & Caner, C. (2013). An innovative technique for extending shelf life of strawberry: Ultrasound. *LWT - Food Science and Technology*, 52(2), 93–101. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2012.09.013>
- Alañón, M. E., Ivanović, M., Pimentel-Mora, S., Borrás-Linares, I., Arráez-Román, D., & Segura-Carretero, A. (2020). A novel sustainable approach for the extraction of value-added compounds from *Hibiscus sabdariffa* L. calyces by natural deep eutectic solvents. *Food Research International*, 137, 109646. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109646>
- Arrazola, G., Herazo, I., & Alvis, A. (2014). Obtención y evaluación de la estabilidad de antocianinas de berenjena (*Solanum melongena* L.) en bebidas. *Información Tecnológica*, 25(3), 43–52. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642014000300007>
- Aşkın, B., & Küçüköner, E. (2019). Factors Affecting the Stability of Anthocyanins. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 7(11), 1759–1765. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v7i11.1759-1765.2472>
- Awe, F. B., Fagbemi, T. N., Ifesan, B. O. T., & Badejo, A. A. (2013). Antioxidant properties of cold and hot water extracts of cocoa, Hibiscus flower extract, and ginger beverage blends. *Food Research International*, 52(2), 490–495. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2013.01.021>
- Ayash, A., Al-Tameemi, K., & Nassour, R. (2020). Anthocyanin pigments: Structure and biological importance. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences*, 13(4), 45–57. <https://www.jchps.com/issues/v13/i04/JCHPS20201304001.pdf>
- Baeza, G., Sarriá, B., Bravo, L., & Mateos, R. (2017). Polyphenol content, in vitro bioaccessibility and antioxidant capacity of widely consumed beverages. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(4), 1397–1406. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8607>
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)

- Buglass, A. J. (2015). Chemical Composition of Beverages and Drinks. In *Handbook of Food Chemistry*. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-36605-5_29
- Camelo Méndez, G., & Sotelo Díaz, L. (2012). Efecto de las condiciones de almacenamiento sobre el color, contenido de polifenoles y capacidad antioxidante de una bebida de Borojoa patinoi Cuatrecasas. *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 11(2), 196–205. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85622734010>
- Chalé, F. H., Ancona, D. B., & Campos, M. R. S. (2014). Compuestos bioactivos de la dieta con potencial en la prevención de patologías relacionadas con sobrepeso y obesidad; péptidos biológicamente activos. *Nutrición Hospitalaria*, 29(1), 10–20. <https://doi.org/10.3305/nh.2014.29.1.6990>
- Chen, L. Y., Cheng, C. W., & Liang, J. Y. (2015). Effect of esterification condensation on the Folin-Ciocalteu method for the quantitative measurement of total phenols. *Food Chemistry*, 170, 10–15. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.038>
- Chen, X., Liang, L., & Han, C. (2020). Borate suppresses the scavenging activity of gallic acid and plant polyphenol extracts on DPPH radical: A potential interference to DPPH assay. *Lwt*, 131, 109769. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109769>
- Coelho, K. Y., Oliveira, A. A., Nasser, M. H., & Fidelis, P. C. (2020). Stability of total phenolic and antioxidant capacity in ready-to-drink black and green tea formulations. *Research, Society and Development*, 9(10), 105–112. <https://doi.org/doi.org/10.33448/rsd-v9i10.8160>
- Cornejo, L. A., & Párraga, R. C. (2021). Capacidad antioxidante y contenido fenólico de una bebida a base de la flor de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*). *Cienciamatria*, 7(12), 229–249. <https://doi.org/10.35381/cm.v7i12.427>
- de Menezes, B. B., Frescura, L. M., Duarte, R., Villetti, M. A., & da Rosa, M. B. (2021). A critical examination of the DPPH method: Mistakes and inconsistencies in stoichiometry and IC50 determination by UV–Vis spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*, 1157, 338398. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.338398>

- Derkyi, N. S. A., Acheampong, M. A., Mwin, E. N., Tetteh, P., & Aidoo, S. C. (2018). Product design for a functional non-alcoholic drink. *South African Journal of Chemical Engineering*, 25, 85–90. <https://doi.org/10.1016/j.sajce.2018.02.002>
- El-Shiekh, R. A., Ashour, R. M., Abd El-Haleim, E. A., Ahmed, K. A., & Abdel-Sattar, E. (2020). Hibiscus sabdariffa L.: A potent natural neuroprotective agent for the prevention of streptozotocin-induced Alzheimer's disease in mice. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 128, 110303. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110303>
- Flores-Aguilar, E., & Flores-Rivera, E. P. (2018). Estabilidad de Antocianinas, Fenoles totales y Capacidad Antioxidante de Bebidas de Maíz Morado (*Zea mays* L.) y Uña de Gato (*Uncaria tomentosa* sp) Stability of Anthocyanin Le. *Información Tecnológica*, 29(2), 175–184. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642018000200175>
- Fuentes-Berrio, L., Acevedo-Correa, D., & Gelvez-Ordoñez, V. M. (2015). Alimentos Funcionales: Impacto Y retos Para El Desarrollo Y Bienestar De La Sociedad Colombiana. *Biotecnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 13(2), 140–149. [https://doi.org/10.18684/bsaa\(13\)140-149](https://doi.org/10.18684/bsaa(13)140-149)
- Galicia-Flores, L. A., Salinas-Moreno, Y., Espinoza-García, B. M., & Sánchez-Feria, C. (2008). Caracterización fisicoquímica y actividad antioxidante de extractos de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) nacional e importada. *Revista Chapingo. Serie Horticultura*, 14(2), 121–129. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1027-152X2008000200004
- Gan, R. Y., Chan, C. L., Yang, Q. Q., Li, H. Bin, Zhang, D., Ge, Y. Y., Gunaratne, A., Ge, J., & Corke, H. (2019). Bioactive compounds and beneficial functions of sprouted grains. In *Sprouted Grains: Nutritional Value, Production, and Applications* (AACC Inter). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811525-1.00009-9>
- García, B. (2018). *Estabilidad de la actividad antioxidante y del color de una bebida de jengibre-zarzamora*. [Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo]. <http://dgsa.uaeh.edu.mx:8080/bibliotecadigital/handle/231104/2197>

- Giusti, M., & Wrolstad, R. E. (2005). Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. In *Handbook of Food Analytical Chemistry*. <https://doi.org/10.1002/0471709085.ch18>
- Hamid, A., Aiyelaagbe, O., Usman, L., Ameen, O., & Lawal, A. (2010). Antioxidants: Its medicinal and pharmacological applications. *African Journal of Pure and Applied Chemistry*, 4(8), 142–151. <https://academicjournals.org/journal/AJPAC/article-abstract/3103CDF2184>
- Hinojosa-Gómez, J., Martin-Hernández, C. S., Heredia, J. B., León-Félix, J., Osuna-Enciso, T., & Muy-Rangel, M. D. (2018). Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) cultivars calyx produced hydroponically: Physicochemical and nutritional quality. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 78(4), 478–485. <https://doi.org/10.4067/S0718-58392018000400478>
- Islam, A. K. M. A., Osman, M. Bin, Mohamad, M. Bin, & Islam, A. K. M. M. (2021). Vegetable Mesta (*Hibiscus sabdariffa* L. var *sabdariffa*): A Potential Industrial Crop for Southeast Asia. *Roselle*, 25–42. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85213-5.00016-0>
- Istrati, D., Pricop, E., Profir, A., & Vizireanu, C. (2018). Fermented Functional Beverages. *Functional Foods*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.81019>
- Jabeur, I., Pereira, E., Barros, L., Calhelha, R. C., Soković, M., Oliveira, M. B. P. P., & Ferreira, I. C. F. R. (2017). *Hibiscus sabdariffa* L. as a source of nutrients, bioactive compounds and colouring agents. *Food Research International*, 100(May), 717–723. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.07.073>
- Jaramillo, L. H., & Valarezo, K. P. (2020). Evaluación de dos métodos de extracción de compuestos fenólicos en *Hibiscus sabdariffa* L., para la formulación de una bebida antioxidante [Universidad Técnica de Machala]. In *Repositorio Universidad Técnica de Machala*. <http://repositorio.utmachala.edu.ec/handle/48000/16330>
- Kaur, S., & Das, M. (2011). Functional foods: An overview. *Food Science and Biotechnology*, 20(4), 861–875. <https://doi.org/10.1007/s10068-011-0121-7>

- Kedare, S. B., & Singh, R. P. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*, 48(4), 412–422. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0251-1>
- Laleh, G. H., Frydoonfar, H., Heidary, R., Jameei, R., & Zare, S. (2006). The effect of light, temperature, pH and species on stability of anthocyanin pigments in four Berberis species. *Pakistan Journal of Nutrition*, 5(1), 90–92. <https://doi.org/10.3923/pjn.2006.90.92>
- Lele, S., & Kadam, D. (2016). Studies on the Physicochemical and Nutritional Characteristics of Ash Gourd-Carrot Juice. *Nutrafoods*, 15, 39–47. <https://doi.org/10.17470/NF-016-1015-1>
- Leos-Rivas, C., Rivas-Morales, C., & García-Hernández, D. G. (2016). *Actividad antioxidante y toxicidad* (Investigac). OmniaScience. <https://doi.org/10.3926/oms.333>
- Lim, T. K. (2014). Hibiscus sabdariffa. In *Edible Medicinal and Non Medicinal Plants: Volume 8, Flowers* (Vol. 8). Springer, Dordrecht. <https://doi.org/10.1007/978-94-017-8748-2>
- Lin, H.-H., Chen, J.-H., & Wang, C.-J. (2011). Chemopreventive Properties and Molecular Mechanisms of the Bioactive Compounds in Hibiscus Sabdariffa Linne. *Current Medicinal Chemistry*, 18(8), 1245–1254. <https://doi.org/10.2174/092986711795029663>
- Londoño, J. L. (2012). *Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad*. Editorial Lasallista. <http://repository.unilasallista.edu.co/dspace/handle/10567/133>
- López, C., González Gallardo, C. E., Guerrero Ochoa, M. J., Mariño, G., Jácome, B., & Beltrán Sinchiguano, E. (2019). Estudio de la Estabilidad de los Antioxidantes del Vino de Flor de Jamaica (Hibiscus sabdariffa L) en el Almacenamiento. *LA GRANJA: Revista de Ciencias de La Vida*, 29(1), 105–118. <https://doi.org/10.17163/lgr.n29.2019.09>
- Maciel, L. G., do Carmo, M. A. V., Azevedo, L., Daguer, H., Molognoni, L., de Almeida, M. M., Granato, D., & Rosso, N. D. (2018). Hibiscus sabdariffa anthocyanins-rich extract:

- Chemical stability, in vitro antioxidant and antiproliferative activities. *Food and Chemical Toxicology*, *113*, 187–197. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.01.053>
- Majdoub, Y. O. El, Ginestra, G., Mandalari, G., Dugo, P., Mondello, L., & Cacciola, F. (2021). The digestibility of hibiscus sabdariffa L. Polyphenols using an in vitro human digestion model and evaluation of their antimicrobial activity. *Nutrients*, *13*(7), 1–14. <https://doi.org/10.3390/nu13072360>
- Marquez-Rodriguez, A. S., Guimarães, M., Mateus, N., de Freitas, V., Ballinas-Casarrubias, M. L., Fuentes-Montero, M. E., Salas, E., & Cruz, L. (2021). Disaccharide anthocyanin delphinidin 3-O-sambubioside from Hibiscus sabdariffa L.: Candida antarctica lipase B-catalyzed fatty acid acylation and study of its color properties. *Food Chemistry*, *344*, 128603. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128603>
- Martín, J., Navas, M. J., Jiménez-Moreno, A. M., & Asuero, A. G. (2017). Anthocyanin Pigments: Importance, Sample Preparation and Extraction. *Phenolic Compounds - Natural Sources, Importance and Applications*, 117–152. <https://doi.org/10.5772/66892>
- Martínez-Cruz, N., Arévalo-Niño, K., Verde-Star, M. J., Morales-Rivas, C., Oranday-Cárdenas, A., Núñez-González, M. A., & Morales-Rubio, M. E. (2011). Antocianinas y actividad anti radicales libres de rubus adenotrichus Schltdl (zarzamora). *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéutica*, *42*(4), 66–71. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-01952011000400007
- Martínez-Navarrete, N., del Mar Camacho Vidal, M., & José Martínez Lahuerta, J. (2008). Los compuestos bioactivos de las frutas y sus efectos en la salud. *Actividad Dietética*, *12*(2), 64–68. [https://doi.org/10.1016/S1138-0322\(08\)75623-2](https://doi.org/10.1016/S1138-0322(08)75623-2)
- Martínez, E. (2015). Compuestos bioactivos y salud: mitos y realidades. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, *65*(1), 42–44. <https://www.alanrevista.org/ediciones/2015/suplemento-1/art-47/#>
- Martínez, H. (2015). *Técnica de análisis espectrofotométrica de antocianinas en materias primas de la región de Ayacucho* [Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga].

<https://docplayer.es/95819698-Universidad-nacional-de-san-cristobal-de-huamanga-facultad-de-ingenieria-quimica-y-metalurgia.html>

- Medina-Carrillo, R. E., Sumaya-Martínez, M. T., Machuca-, M. C. M. L., Sánchez-Herrera, L. M., Balois-Morales, R., & Jiménez-Ruiz, E. I. (2013). Actividad antioxidante de extractos de cálices deshidratados de 64 variedades de jamaica (*hibiscus sabdariffa* l.) en función de fenólicos y antocianinas totales. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias*, 22, 41–44. <http://scielo.sld.cu/pdf/rcta/v22s1/rcta06513.pdf>
- Mgaya-Kilima, B., Remberg, S. F., Chove, B. E., & Wicklund, T. (2015). Physiochemical and antioxidant properties of roselle-mango juice blends; Effects of packaging material, storage temperature and time. *Food Science and Nutrition*, 3(2), 100–109. <https://doi.org/10.1002/fsn3.174>
- Minatel, I. O., Borges, C. V., Borges, C. V., Alonzo, H., Hector, G., Gomez, G., Chen, C. O., Chen, C. O., Pace, G., & Lima, P. (2017). Phenolic compounds: functional properties, impact of processing and bioavailability. *Open Science*, 1–24. <https://doi.org/10.5772/66368>
- Morales, F. S. (2020). *Cinética de degradación de polifenoles y formación de hidroximetilfurfural en extractos de vainas de tara (Caesalpinia spinosa) sometidos a tratamientos térmicos* [Universidad de Chile]. <https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/176782>
- Moreno, B. M. (2017). *Estudio de estabilidad de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante del vino microfiltrado de flor de jamaica (Hibiscus sabdariffa L.) durante el almacenamiento*. [Universidad Tecnológica Equinoccial]. https://node2.123dok.com/dt02pdf/123dok_es/000/807/807833.pdf.pdf?X-Amz-Content-Sha256=UNSIGNED-PAYLOAD&X-Amz-Algorithm=AWS4-HMAC-SHA256&X-Amz-Credential=aa5vJ7sqx6H8Hq4u%2F20220209%2F%2Fs3%2Faws4_request&X-Amz-Date=20220209T183441Z&X-Amz-SignedHeaders=ho
- Muñoz-Bernal, Ó. A., Torres-Aguirre, G. A., Núñez-Gastélum, J. A., de la Rosa, L. A., Rodrigo-García, J., Ayala-Zavala, J. F., & Álvarez-Parrilla, E. (2017). Nuevo Acercamiento a La Interacción Del Reactivo De Folin-Ciocalteu Con Azúcares Durante

La Cuantificación De Polifenoles Totales. *Tip*, 20(2), 23–28.
<https://doi.org/10.1016/j.recqb.2017.04.003>

Nenadis, N., & Tsimidou, M. Z. (2010). Assessing the activity of natural food antioxidants. In *Oxidation in Foods and Beverages and Antioxidant Applications: Understanding Mechanisms of Oxidation and Antioxidant Activity*. Woodhead Publishing Limited.
<https://doi.org/10.1533/9780857090447.2.332>

NTE-INEN 2304. (2017). Refrescos o bebidas no carbonatadas. Requisitos. *Servicio Ecuatoriano de Normalización*.
https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/nte_inen_2304-1.pdf

Ortíz, M. A., Reza, C., Gerardo, R., Madinaveitia, C., Ciencias, F. De, Universidad, Q., Durango, E. De, & Artículo, A. (2011). Propiedades Funcionales De Las Antocianinas. *Revista de Ciencias Biológicas y de La Salud*, 13(2), 16–22.
<https://biblat.unam.mx/hevila/Biotecnia/2011/vol13/no2/2.pdf>

Paladines-Santacruz, G., Orellana-Manzano, A., Sarmiento, G., Piloza, G., Iñiga, E., Zaruma-Torres, F., Ortíz-Ulloa, J., Quijano-Avilés, M., Di Grumo, D., Orellana-Manzano, S., Villacrés, M. del C., Manzano, P., & Vanden Berghe, W. (2021). Acute oral toxicity of a novel functional drink based on *Ilex guayusa*, *Vernonanthura patens*, and cocoa husk. *Toxicology Reports*, 8, 747–752.
<https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2021.03.026>

Paraíso, C. M., Januário, J. G. B., Mizuta, A. G., dos Santos, S. S., dos Santos Magon, T. F., Ogawa, C. Y. L., de Oliveira Silva, J. V., Sato, F., Visentainer, J. V., Mikcha, J. M. G., & Madrona, G. S. (2021). Comparative studies on chemical stability, antioxidant and antimicrobial activity from hot and cold hibiscus (*Hibiscus sabdariffa* L.) calyces tea infusions. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15(4), 3531–3538.
<https://doi.org/10.1007/s11694-021-00936-4>

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

- Peanparkdee, M., Patrawart, J., & Iwamoto, S. (2020). Physicochemical stability and in vitro bioaccessibility of phenolic compounds and anthocyanins from Thai rice bran extracts. *Food Chemistry*, 329, 127157. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127157>
- Peñarrieta, J. M., Tejeda, L., Mollinedo, P., Vila, J. L., & Bravo, J. A. (2014). Compuestos fenólicos y su presencia en alimentos. *Revista Boliviana De Química*, 31(2), 68–81. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=426339682006>
- Pérez-Ramírez, I. F., Castaño-Tostado, E., Ramírez-De León, J. A., Rocha-Guzmán, N. E., & Reynoso-Camacho, R. (2015). Effect of stevia and citric acid on the stability of phenolic compounds and in vitro antioxidant and antidiabetic capacity of a roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) beverage. *Food Chemistry*, 172, 885–892. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.126>
- Prasetyoputri, A., Rahmawati, S. I., Atikana, A., Izzati, F. N., Hapsari, Y., Septiana, E., Bustanussalam, & Putra, M. Y. (2021). A Mini Review on the Antibacterial Activity of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) Phytochemicals. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 1192(1), 012017. <https://doi.org/10.1088/1757-899x/1192/1/012017>
- Preciado, A. M. (2016). *Desarrollo, caracterización y evaluación in vitro de una bebida funcional a base de extractos optimizados de jamaica y té verde* [Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.]. <http://ciad.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1006/766>
- Raj, D., Sharma, P. C., & Vaidya, D. (2011). Effect of blending and storage on quality characteristics of blended sand pear-apple juice beverage. *Journal of Food Science and Technology*, 48(1), 102–105. <https://doi.org/10.1007/s13197-010-0098-x>
- Ramirez-Sanchez, I., Maya, L., Ceballos, G., & Villarreal, F. (2010). Fluorescent detection of (-)-epicatechin in microsamples from cacao seeds and cocoa products: Comparison with Folin-Ciocalteu method. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23(8), 790–793. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2010.03.014>

- Riaz, G., & Chopra, R. (2018). A review on phytochemistry and therapeutic uses of Hibiscus sabdariffa L. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 102(May 2017), 575–586. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.03.023>
- Riaz, M., Zia-Ul-Haq, M., & Saad, B. (2016). Biosynthesis and Stability of Anthocyanins. In *SpringerBriefs in Food, Health and Nutrition*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-26456-1_6
- Richardson, M. L., & Arlotta, C. G. (2021). Differential yield and nutrients of Hibiscus sabdariffa L. genotypes when grown in urban production systems. *Scientia Horticulturae*, 288, 110349. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110349>
- Rover, M. R., & Brown, R. C. (2013). Quantification of total phenols in bio-oil using the Folin-Ciocalteu method. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 104, 366–371. <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2013.06.011>
- Ruangsrri, P., Chumsri, P., Sirichote, A., & Itharat, A. (2008). Changes in quality and bioactive properties of concentrated Roselle (Hibiscus Sabdariffa Linn.) extract. *J. Food Ag-Ind*, 1(2), 62–67. <https://www.semanticscholar.org/paper/Changes-in-quality-and-bioactive-properties-of-Ruangsrri-Chumsri/ae4e1c86baa7d920e8acb8f5d3bb676584925ac>
- Salinas-Moreno, Y., Zúñiga-Hernández, A. R. E., Torre, L. B. J. D. La, Serrano-Altamirano, V., & Sánchez-Feria, C. (2012). Color en cálices de jamaica (Hibiscus Sabdariffa L.) y su relación con características fisicoquímicas de sus extractos acuosos. *Revista Chapingo, Serie Horticultura*, 18(3), 395–407. <https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2011.08.038>
- Santander-M., M., Osorio M., O., & Mejía-E., D. (2017). Evaluación de propiedades antioxidantes y fisicoquímicas de una bebida mixta durante almacenamiento refrigerado. *Revista de Ciencias Agrícolas*, 34(1), 84. <https://doi.org/10.22267/rcia.173401.65>
- Saranraj, P., Behera, S. S., & Ray, R. C. (2019). Traditional Foods From Tropical Root and Tuber Crops: Innovations and Challenges. In *Innovations in Traditional Foods* (Woodhead P). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814887-7.00007-1>

- Sattar, S., Imran, M., Mushtaq, Z., Ahmad, M. H., Arshad, M. S., Holmes, M., Maycock, J., Nisar, M. F., & Khan, M. K. (2020). Retention and stability of bioactive compounds in functional peach beverage using pasteurization, microwave and ultrasound technologies. *Food Science and Biotechnology*, 29(10), 1381–1388. <https://doi.org/10.1007/s10068-020-00797-5>
- Sáyago-Ayerdi, S. G., Arranz, S., Serrano, J., & Goñi, I. (2007). Dietary fiber content and associated antioxidant compounds in Roselle flower (*Hibiscus sabdariffa* L.) beverage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(19), 7886–7890. <https://doi.org/10.1021/jf070485b>
- Sepúlveda, C. T., & Zapata, J. E. (2019). Efecto de la Temperatura, el pH y el Contenido en Sólidos sobre los Compuestos Fenólicos y la Actividad Antioxidante del Extracto de *Bixa orellana* L. *Información Tecnológica*, 30(5), 57–66. <https://doi.org/10.4067/s0718-07642019000500057>
- Shi, H., & Noguchi, N. (2001). Introducing natural antioxidants. In *Antioxidants in Food*. Woodhead Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1016/9781855736160.3.147>
- Silván, J. M., Amigo-Benavent, M., & Dolores del Castillo, M. (2014). Antioxidant Properties of Soy-Based Drinks and Effects of Processing. In *Processing and Impact on Antioxidants in Beverages*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404738-9.00023-4>
- Sinela, A., Rawat, N., Mertz, C., Achir, N., Fulcrand, H., & Dornier, M. (2017). Anthocyanins degradation during storage of *Hibiscus sabdariffa* extract and evolution of its degradation products. *Food Chemistry*, 214, 234–241. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.071>
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. In *Methods in Enzymology* (Vol. 299). [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
- Sobottka, S. C., Vissotto, F. Z., García, S. A., Guerreriro, E., Parra, F. G., & Alves, P. J. (2017). Characterization and evaluation of stability of bioactive compounds in fruit

- smoothies. *Food Science and Technology*, 37(2), 216–223. <https://doi.org/10.1590/1678-457X.16616>
- Teixeira, L. N., Stringheta, P. C., & Oliveria, F. A. (2008). Comparação de métodos para quantificação de antocianinas. *Revista Ceres*, 55(4), 297–304. <http://www.locus.ufv.br/handle/123456789/20655>
- Tembo, D. T., Holmes, M. J., & Marshall, L. J. (2017). Effect of thermal treatment and storage on bioactive compounds, organic acids and antioxidant activity of baobab fruit (*Adansonia digitata*) pulp from Malawi. *Journal of Food Composition and Analysis*, 58, 40–51. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.01.002>
- Vidana, G. C., Lim, Y. Y., & Choo, W. S. (2021). Sources and relative stabilities of acylated and nonacylated anthocyanins in beverage systems. *Journal of Food Science and Technology*, 59, 831–845. <https://doi.org/10.1007/s13197-021-05054-z>
- Vilaplana, M. (2007). Antioxidantes presentes en los alimentos. Vitaminas, minerales y suplementos. *Ambito Farmaceutico Nutricion*, 26(10), 79–86. <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-antioxidantes-presentes-alimentos-vitaminas-minerales-13112893>
- Vuolo, M. M., Lima, V. S., & Maróstica Junior, M. R. (2019). Phenolic Compounds: Structure, Classification, and Antioxidant Power. In *Bioactive Compounds: Health Benefits and Potential Applications* (Woodhead P). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814774-0.00002-5>
- Wojdyło, A., Teleszko, M., & Oszmiański, J. (2014). Antioxidant property and storage stability of quince juice phenolic compounds. *Food Chemistry*, 152(1), 261–270. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.124>
- Wu, M., Gao, F., Zhang, Y., Wang, Q., & Li, H. (2015). Sensitive analysis of amino acids and vitamin B3 in functional drinks via field-amplified stacking with reversed-field stacking in microchip electrophoresis. *Talanta*, 131, 624–631. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.08.051>
- Zapata, L. M., Castagnini, J. M., Quinteros, C. F., Carlier, E., Jimenez-Veuthey, M., & Cabrera, C. (2016). Estabilidad de antocianinas durante el almacenamiento de jugos de

arándanos. *Vitae, Revista de La Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias*, 23(3), 173–183. <https://doi.org/10.17533/udea.vitae.v23n3a03>

Zhang, Y., Wu, S., Qin, Y., Liu, J., Liu, J., Wang, Q., Ren, F., & Zhang, H. (2018). Interaction of phenolic acids and their derivatives with human serum albumin: Structure–affinity relationships and effects on antioxidant activity. *Food Chemistry*, 240, 1072–1080. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.100>