



**Centro de Investigación en  
Alimentación y Desarrollo, A.C.**

**DESARROLLO, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN  
*in vitro* DE UNA BEBIDA FUNCIONAL A BASE DE  
EXTRACTOS OPTIMIZADOS DE JAMAICA Y TÉ  
VERDE**

---

Por:

**Alejandra Montserrat Preciado Saldaña**

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN  
VEGETAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

**MAESTRÍA EN CIENCIAS**

Hermosillo, Sonora


Diciembre 2016

## APROBACIÓN


Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Alejandra Montserrat Preciado Saldaña, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Ciencias.




Dr. Gustavo Adolfo González Aguilar  
Director de Tesis



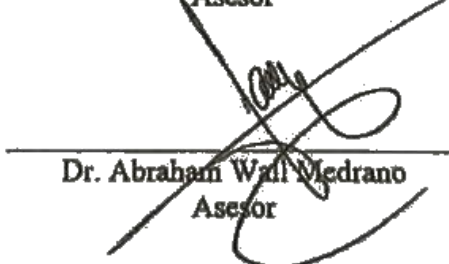
Dr. Jesús Fernando Ayala Zavala  
Asesor



Dr. Aarón Fernando González Córdova  
Asesor



Dra. Sonia Guadalupe Sáyago Ayerdi  
Asesor



Dr. Abraham Wall Medrano  
Asesor

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.



---

Dr. Pablo Wong González  
Director General

## AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)**, por la beca otorgada para los estudios de maestría.

Al **Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD, A.C)**, y a la **Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Vegetal (CTAOV)**, por el apoyo académico y de infraestructura.

A mi director de tesis **Dr. Gustavo Adolfo González Aguilar**, por permitirme formar parte de su equipo de trabajo durante los últimos dos años, por la confianza depositada en mí, el apoyo brindado tanto personal como académico y por su aportación en mi desarrollo profesional.

A mis asesores del comité de tesis **Dr. Jesús Fernando Ayala Zavala, Dr. Aarón Fernando González Córdova, Dr. Abraham Wall Medrano y Dra. Sonia Sáyago Ayerdi**, por su apoyo total y siempre estar pendientes de que el trabajo fluyera, por ser excelentes asesores y profesores y por las atenciones brindadas a pesar de su alta carga de trabajo. Gracias a todos por su apoyo académico, su asesoría, dedicación y paciencia para la realización de este trabajo.

A la **Q.B. Mónica A. Villegas Ochoa**, por tu amabilidad, tu apoyo constante, el conocimiento que a diario compartes con nosotros, la asesoría en el trabajo experimental y por los “jalones de oreja” todos los días. Gracias Moni!

A mis amigos y compañeros del **Laboratorio de Antioxidantes y Alimentos Funcionales**, a los que están y los que se fueron. **Maribel**, gracias por tu paciencia y confianza, por compartir tu conocimiento conmigo, tanto en lo académico como en lo personal, por tu invaluable amistad y acompañarme en todo momento. **Tavo**, por ser tan “preguntón”, y enseñarme que a pesar de que

todo puede parecer difícil las cosas tienen que ir bien, gracias equipo!. **Ramón**, por tu valiosa amistad, por ser tan divertido, advertirme y ayudarme con lo que no tenía que hacer, eres genial! **Elena**, por ser la “hermana mayor” que me enseñó que la perseverancia siempre da buenos frutos. **Marcos**, gracias por tu amistad y por ser como un hermanito al que cuidar y aconsejar. **Jacqueline**, gracias por tu ayuda, amistad y sabios consejos. **Ana**, por ser un buen ejemplo de eficacia y eficiencia. **Abraham**, por los conocimientos compartidos y las pláticas enriquecedoras. Los quiero y los llevo conmigo siempre.

A **Gaby Goñi, Cynthia Lizárraga, Cintia Mazzucotelli y Norma Salazar** por formar parte de esta aventura durante su estancia en el laboratorio, gracias por su ayuda y amistad.

Al personal de la Coordinación de Programas Académicos, especialmente a **Laura García**, gracias por tu gran calidad humana y excelente trato siempre.

A mis iniciadoras en el campo de la investigación, la **Dra. Barbara Vizmanos Lamotte** y la **Dra. Fabiola Márquez Sandoval**, de la Universidad de Guadalajara. Por ser una inspiración por medio de su trabajo y darme la oportunidad de estar con ustedes en veranos y proyectos de investigación dentro de su cuerpo académico, durante mi estancia en la universidad, sin ustedes no habría logrado estar aquí. Les aprecio y admiro mucho.

A los compañeros del **Laboratorio de Tecnologías Emergentes**, Julián, Melvin, Thalía, Pancho, Luis, Melissa, Aimara y Valeria, gracias por su amistad y las horas de diversión.

A **Sonia María Soto Cruz**, gracias por el apoyo técnico en el laboratorio.

A mis *roomies*: **Víctor, Ariel, Karen y Cecilia**, gracias por darme la oportunidad de conocerlos, vivir esta experiencia a su lado y ser como unos hermanos para mí. Los quiero y los voy a extrañar mucho

A los *VIP*, **Deyanira, Cristóbal, Víctor, Ariel, Cynthia, Alva, Pepe, Carmen, Julián, Karen, Rocío, Yuri**, gracias a todos por su amistad. A los demás amigos de CIAD, especialmente a **Isaac López**, por convertirse en un gran amigo en poco tiempo y apoyarme tanto los últimos meses, a **Caro Moreno, Edgar Valle, Estefanía Garibay, Valeria Segundo, Julio González, Ale Amavizca, Orlando Reyes, Félix Alba y Yoandris Castellanos** gracias por su valiosa amistad y por hacer mi estancia en CIAD y en Hermosillo mucho más amena. Los quiero mucho!

A mis amigos en Guadalajara, **Sandra, Paola, Anayeli, Jairo, Grecia, Karina, Marieel, Alex, Sergio, Ana Cristina, Ceci, Laura**, gracias por estar para mí siempre que los necesito, son los mejores.

Y a todos los que se me pueden olvidar... GRACIAS!

## DEDICATORIA

A mi familia, principalmente a mis padres **Everardo y Goretí**, les agradezco ser mi principal fuente de inspiración, gracias por no cortarme las alas y por el contrario dejar que vuele. A mis hermanos **Aarón, Edwin y Christian**, sin su apoyo y mensajes de ánimo no hubiera podido llegar aquí. A mis abuelitos **Rosario Ramírez (D.E.P.) y Antonio Plascencia**, por ser una fuente de inspiración, a mis tías **Lorenza Preciado y Lourdes Saldaña**, a mis padrinos **Lourdes Preciado y Andrés Hernández** por su invaluable amor y apoyo en todo momento. Gracias a todos por su cariño, comprensión y paciencia, agradezco enormemente que estuvieran siempre al pendiente de mi bienestar desde la distancia.

“La ciencia es bella y es por esa belleza que debemos trabajar en ella, y quizás, algún día, un descubrimiento científico como el radio, puede llegar a beneficiar a toda la humanidad”

(Marie Curie)

## CONTENIDO

APROBACIÓN .....	ii
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL .....	iii
AGRADECIMIENTOS .....	iv
DEDICATORIA .....	vii
CONTENIDO.....	viii
LISTA DE FIGURAS .....	x
LISTA DE CUADROS.....	xii
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
I.INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	4
II.1. Bebidas Funcionales como Productos de Fácil Consumo .....	6
II.2. Beneficios a la Salud de Compuestos Fenólicos en Bebidas Funcionales .....	8
II.3. Jamaica como Ingrediente Funcional para la Elaboración de Bebidas .....	10
II.4. Té Verde como Ingrediente Funcional en la Elaboración de Bebidas.....	12
II.5. Biodisponibilidad de Compuestos Fenólicos de Jamaica y Té Verde.....	14
II.6. Metodología de Superficie de Respuesta (MSR).....	15
III. HIPÓTESIS .....	18
IV. OBJETIVO GENERAL.....	19
V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	20
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
VI.1. Materia Prima .....	21
VI.2. Caracterización de Compuestos Fenólicos y Capacidad Antioxidante de jamaica y té verde.....	21
VI.2.1. Extracción de Compuestos Fenólicos.....	21
VI.2.2. Determinación del Contenido de Fenoles Totales (CFT) .....	22
VI.2.3. Determinación del Contenido de Flavonoides Totales .....	22
VI.2.4. Determinación de la Capacidad Antioxidante .....	23
VI.2.5. Identificación y Cuantificación de Compuestos Fenólicos .....	24



## CONTENIDO (CONTINUACIÓN)

VI.3. Optimización de las Condiciones de Extracción de los Compuestos Fenólicos de Jamaica y Té Verde.....	25
VI.4. Formulación y Evaluación Sensorial de la Bebida Funcional.....	29
VI.5. Digestión <i>in vitro</i> : Cinética de Liberación de Compuestos Fenólicos y Capacidad Antioxidante de la Bebida Funcional .....	29
VI.6. Análisis de Datos.....	30
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	31
VII.1. Caracterización de Compuestos Fenólicos y Capacidad Antioxidante de jamaica y té verde.....	31
VII.2. Optimización de las Condiciones de Extracción de Compuestos Fenólicos y Capacidad Antioxidante de Jamaica y Té Verde.....	42
VII.3. Optimización Simultánea del Contenido de Fenoles Totales y Capacidad Antioxidante y Validación del Modelo para Jamaica y Té Verde.....	56
VII.4. Formulación y Evaluación Sensorial de la Bebida Funcional a Base de Extractos Optimizados de Jamaica y Té Verde.....	59
VII.5. Digestión <i>in vitro</i> : Cinética de Liberación de Compuestos Fenólicos y Capacidad Antioxidante de la Bebida Funcional .....	63
VIII. CONCLUSIONES.....	72
IX. RECOMENDACIONES.....	74
X. REFERENCIAS .....	75

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1	Perfil de CF libres y unidos a la matriz alimentaria identificados por UPLC-DAD en extractos de jamaica.....	37
2	Perfil de CF libres y unidos a la matriz alimentaria identificados por UPLC-DAD en extractos de té verde.....	41
3	Gráficos de superficie de respuesta: A)efecto combinado de la cantidad de materia prima con la temperatura, B) efecto de la cantidad de materia prima con el tiempo y C) efecto de la combinación de la temperatura y el tiempo sobre el CFT de extractos de jamaica.....	46
4	Gráficos de superficie de respuesta: A) efecto combinado de la cantidad de materia prima con la temperatura, B) efecto de la cantidad de materia prima con el tiempo y C) efecto de la combinación de la temperatura y el tiempo sobre la CAOX de extractos de jamaica evaluados por el método de DPPH•.....	47
5	Gráficos de superficie de respuesta: A) efecto combinado de la cantidad de materia prima con la temperatura, B) efecto de la cantidad de materia prima con el tiempo y C) efecto de la combinación de la temperatura y el tiempo sobre la CAOX de extractos de jamaica evaluados por el método de FRAP.....	48
6	Gráficos de superficie de respuesta: A) efecto combinado de la cantidad de materia prima con la temperatura, B) efecto de la cantidad de materia prima con el tiempo y C) efecto de la combinación de la temperatura y el tiempo sobre el CFT en extractos de té verde.....	53

## LISTA DE FIGURAS (CONTINUACIÓN)

Figura		Página
7	Gráficos de superficie de respuesta: A) efecto combinado de la cantidad de materia prima con la temperatura, B) efecto de la cantidad de materia prima con el tiempo y C) efecto de la combinación de la temperatura y el tiempo sobre la CAOX de extractos de té verde evaluados por el método de DPPH•.....	54
8	Gráficos de superficie de respuesta: A) efecto combinado de la cantidad de materia prima con la temperatura, B) efecto de la cantidad de materia prima con el tiempo y C) efecto de la combinación de la temperatura y el tiempo sobre la CAOX de extractos de té verde evaluados por el método de FRAP.....	55
9	Diferencias absolutas entre rangos por formulación. A) jamaica y té verde (30:70 v/v); B) jamaica y té verde (50:50 v/v); C) jamaica y té verde (70:30 v/v).....	60
10	Diferencias absolutas entre rangos por formulación. B) jamaica y té verde (50:50 v/v); C) jamaica y té verde (70:30 v/v).....	62
11	Perfil de CF identificados por UPLC-DAD en la bebida funcional antioxidante.....	65
12	Perfil de CF identificados por UPLC-DAD en la bebida funcional antioxidante durante la etapa gástrica del proceso de digestión in vitro.....	66
13	Perfil de CF identificados por UPLC-DAD en la bebida funcional antioxidante durante la etapa intestinal dializada del proceso de digestión in vitro.....	67

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro</b>		<b>Página</b>
1	Rangos mínimos y máximos de los factores del Diseño Central Compuesto.....	27
2	Corridas experimentales del diseño central compuesto.....	28
3	Contenido de fenoles totales, flavonoides totales y capacidad antioxidante de los extractos metanólicos de jamaica y té verde...	33
4	Cuantificación de CF de jamaica después de cada etapa de hidrólisis.....	35
5	Cuantificación de CF de té verde después de cada etapa de hidrólisis.....	39
6	Valores experimentales de CFT y CAOX de la bebida optimizada de jamaica.....	45
7	Valores experimentales de CFT y CAOX de la bebida optimizada de té verde.....	52
8	Valores de predicción y experimentales para CFT, DPPH y FRAP..	58
9	CFT, flavonoides totales y CAOX durante la cinética de digestión <i>in vitro</i> de la BF antioxidante.....	64
10	Cuantificación de CF durante la cinética de digestión <i>in vitro</i> de la BF antioxidante.....	71

## RESUMEN

La jamaica y el té verde son utilizados tradicionalmente en la elaboración de bebidas, además de ser una buena fuente de compuestos fenólicos (CF), relacionados con el mantenimiento de una buena salud. La obtención de bebidas con una mayor calidad funcional es posible a través de una mejor comprensión de la estabilidad de sus constituyentes. Por esta razón, el objetivo de este trabajo fue desarrollar una bebida funcional (BF) a base de jamaica y té verde, con un perfil variado de CF y calidad sensorial aceptable. Se determinó el contenido de fenoles totales (CFT) y capacidad antioxidante (CAOX) de ambos ingredientes. Las condiciones óptimas de extracción fueron 4.9g de materia prima/100mL, 26°C y 291min, obteniendo un CFT de 14.80±1.4 y 33.02±0.34 mg EAG/mL en jamaica y té verde, respectivamente. La combinación de jamaica y té verde 70:30 v/v presentó una mayor aceptabilidad sensorial, un CFT de 33.07±0.71 mg EAG/mL y CAOX de 175.33±6.14 y 169.74±4.43 mg ET/mL por DPPH y FRAP, además de un perfil variado de CF (ácido gálico, protocatéico, clorogénico, caféico, vanílico, siríngico, *p*-cumárico, ferúlico, elágico, catequina, epicatequina, rutina, miricetina, quercetina y kaempferol) con respecto a las bebidas individuales.

**Palabras clave:** Bebidas funcionales, jamaica, té verde, capacidad antioxidante, optimización

## ABSTRACT

Hibiscus and green tea are traditionally used in the manufacture of beverages, as well as being a good source of phenolic compounds, related to maintenance of good health. Obtaining beverages with a higher functional quality is possible through a better understanding of the stability of its constituents. For this reason, the objective of this work was to develop a functional beverage (FB) based on hibiscus and green tea, with a varied PC profile and acceptable sensorial quality. The total phenolic content (TPC) and antioxidant capacity (AC) of both ingredients were determined. The optimum extraction conditions were 4.9g of raw material / 100mL, 26 ° C and 291min, obtaining a TPC of  $14.80 \pm 1.4$  and  $33.02 \pm 0.34$  mg GAE/ mL in hibiscus and green tea, respectively. The combination of hibiscus and green tea 70:30 v/v showed greater sensory acceptability, a TPC of  $33.07 \pm 0.71$  mg EAG / mL and AC of  $175.33 \pm 6.14$  and  $169.74 \pm 4.43$  mg ET / mL by DPPH and FRAP, in addition to a varied PC profile (gallic acid, protocatechic, chlorogenic, caffeic, vanillic, *p*-coumaric, ferulic, ellagic, catechin, epicatechin, rutin, myricetin, quercetin and kaempferol) with respect to individual beverages.

**Key Words:** Functional beverages, hibiscus, green tea, antioxidant capacity, optimization.

## I.INTRODUCCIÓN

Actualmente la industria alimentaria busca el desarrollo de nuevos productos que no sólo ofrezcan nutrientes, sino que también provean de efectos benéficos a la salud mediante una nutrición eficiente. Debido a esto se ha dado el incremento en el desarrollo de alimentos funcionales, los cuales son definidos como aquellos alimentos que se consumen en la dieta diaria y que además de cumplir con la característica básica de nutrir, son capaces de influir positivamente en alguna función biológica o de reducción del riesgo de padecer enfermedades. Entre esta nueva categoría de alimentos destacan las bebidas funcionales (BF), cuyo consumo ha aumentado aproximadamente 30% en los últimos años y se prevé un aumento muy importante en los próximos 10 años (Rodríguez-Roque *et al.*, 2014).

La mayoría de las BF son elaboradas a base de ingredientes de origen vegetal, que pueden estar en combinación con otro tipo de alimentos. De esta manera representan una buena fuente de sustancias bioactivas, como los CF, que son los principales metabolitos secundarios de las plantas (Zulueta *et al.*, 2013). Estos compuestos además de conferirle algunas características organolépticas a los productos, pueden ayudar en la mejora de la salud del consumidor.

En este sentido, la jamaica y el té verde son dos de las plantas tradicionalmente utilizadas en la elaboración de bebidas. Diversos estudios han mostrado efectos positivos en la salud, debido al consumo de estos dos ingredientes. Se ha reportado que la jamaica es una fuente importante de antocianinas como cianidina, delfinidina y malvidina, entre otras y su consumo se ha relacionado

con la mejora del estado antioxidante, la disminución de la presión sanguínea y el estrés oxidativo (Frank *et al.*, 2012; Westerterp-Plantenga, 2010). Mientras que el té verde, un vegetal rico en ácidos fenólicos, como el ácido gálico y flavonoides como catequinas. Actualmente forma parte de la dieta diaria en algunas regiones y desde hace algunos años ha sido utilizada como bebida terapéutica en países de medio oriente como China y Japón (da Silva Pinto, 2013). Es por ello que surge el interés de muchos investigadores por estudiar más a fondo los posibles beneficios de los CF presentes en lo alimentos y BF, debido a su creciente evidencia en los efectos potenciales en la salud.

Hoy en día existe gran interés en explorar los beneficios que confieren por el alto contenido de CF y fácil consumo que podrían representar estos productos. Generalmente se preparan infusiones de jamaica o té verde, en las cuales las hojas se dejan remojando en agua caliente durante unos minutos, luego se filtran y endulzan (McKay *et al.*, 2010). Sin embargo, es importante elaborar los nuevos productos funcionales considerando diferentes factores, siendo la extracción de los CF el paso más importante en este proceso. No obstante, en ella pueden influir algunos factores, como la proporción de agua y hojas utilizadas, la temperatura y el tiempo de infusión, estas son muy variadas y no están establecidas para cada ingrediente. Por lo que es necesario llevar a cabo estudios de optimización de estas variables.

Cuando se tiene un sistema con varios factores y no se cuenta con valores establecidos es necesario determinar las condiciones óptimas para la elaboración de los alimentos funcionales. Una herramienta valiosa para esto es la metodología de superficie de respuesta (MSR) (Montgomery, 2004). La optimización de las condiciones de extracción es importante debido a que altas concentraciones del ingrediente, pueden afectar los atributos sensoriales de las bebidas. Temperaturas altas pueden afectar la estabilidad de los CF presentes en



los ingredientes, además, tiempos prolongados pueden incrementar los costos en los procesos.

Una vez que se cuenta con la optimización de estos factores, es importante cerciorarse que la calidad de las BF es la adecuada y que pueden cumplir con las propiedades benéficas que ofrecen, conociendo la estabilidad de los CF mediante su bioaccesibilidad, así como su aceptabilidad sensorial. Se ha sugerido que los CF presentes en estos ingredientes pueden ser liberados y absorbidos en el estómago, sin embargo, la mayoría pasa al intestino delgado, donde pueden sufrir cambios debido a las condiciones químico-enzimáticas del tracto gastrointestinal. Aquellos que no llegan a ser absorbidos pueden llegar al colon, donde pueden ser hidrolizados por las bacterias colónicas y en consecuencia crear un ambiente antioxidante benéfico.

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo es desarrollar una BF con características sensoriales aceptables, diversidad de CF y mayor CAOX comparado con las bebidas individuales, a partir de extractos optimizados de jamaica y té verde.

## II. ANTECEDENTES

El origen de los alimentos funcionales tuvo lugar en Japón en los años 70, con el descubrimiento de las actividades especiales de algunos de los componentes de los alimentos. Sin embargo, fue hasta la década de 1980 cuando se comenzó con el diseño de alimentos que serían incluidos en dietas ajustadas a requisitos dietéticos muy estrictos. El concepto de alimentos funcionales se formalizó en el Ministerio de Salud, Trabajo y Bienestar Social de Japón, con el nombre de *Alimentos Específicos para su Uso en la Salud* (FOSHU, por sus siglas en inglés) (Wall-Medrano y López-Díaz, 2014). Aunque todavía no existe una definición aceptada para estos productos, el International Life Science Institute (ILSI, por sus siglas en inglés), ha establecido que un alimento puede considerarse funcional si logra demostrar satisfactoriamente que posee un efecto benéfico sobre una o varias funciones específicas en el organismo, que mejore el estado de salud o reduzca el riesgo de alguna enfermedad (Martirosyan, 2011).

En general los alimentos consumidos deben cumplir tres funciones, nutricional, sensorial y fisiológica. Es decir, deben ser esenciales para la existencia de los individuos y a la vez producir sensaciones placenteras a través de sus características sensoriales, así como mostrar efectos favorables en la salud de quienes los consumen (Brayden y Baird, 2013). En este sentido los alimentos funcionales deben cumplir principalmente con la última característica (Durán y Valenzuela, 2010).

Los alimentos funcionales deben seguir siendo alimentos y mostrar sus efectos en las cantidades en que son consumidos en un régimen alimenticio regular

(Ashwell, 2004). En los últimos años ha surgido gran interés por este tipo de alimentos, la tendencia en su desarrollo va creciendo y su mercado se ha visto incrementado, a pesar de que algunas instituciones comienzan a poner límites a las declaraciones de propiedades saludables (Brownie y Coutts, 2013).

Desde el punto de vista nutricional, la alimentación se ha centrado en el consumo de los nutrimentos esenciales. Sin embargo, en las últimas décadas, además de la insistencia en la importancia de una nutrición adecuada para la prevención de determinados problemas en la salud, se comenzó a orientar el interés hacia los compuestos bioactivos presentes en los alimentos y el papel de la alimentación en la promoción de la salud. De esta forma, llevar a los consumidores hacia una nutrición óptima, lo cual conlleva a que la dieta diaria tenga un papel que va más allá de su contribución nutricional (Bernabeu-Mestre *et al.*, 2014; Trescastro-López y Bernabeu-Mestre, 2015).

Durante la última década el campo de los alimentos funcionales se ha posicionado como uno de los más interesantes en materia de investigación e innovación en la industria alimentaria (Annunziata y Vecchio, 2011). Actualmente el grupo de los alimentos funcionales incluye alimentos infantiles, productos de panadería, lácteos, platillos listos para su consumo (“ready to eat”), productos cárnicos y bebidas (Ofori y Peggy, 2013). Siendo estas últimas las de mayor conveniencia, al ofrecer una gran posibilidad de satisfacer las demandas de los consumidores.

Las bebidas funcionales han ganado popularidad como productos que pueden ofrecer una gran cantidad de nutrimentos e ingrediente bioactivos, ya sea de manera natural o incorporándolos en su formulación (Wootton-Beard y Ryan, 2011). Sin embargo, la aceptación de este tipo de productos no puede darse por sentado, no basta con comunicar a los consumidores sobre sus posibles efectos

positivos en la salud, también resulta importante la aprobación de los consumidores con respecto a los nuevos alimentos desarrollados.

## II.1. Bebidas Funcionales como Productos de Fácil Consumo

En la actualidad, la población ha aumentado su consumo por aquellos alimentos que contienen ingredientes que pueden mostrar beneficios para la salud, más allá de la nutrición básica. Las bebidas funcionales han surgido en respuesta al acelerado ritmo de vida que lleva la población, siendo utilizadas como artículos que ayudan a la promoción de la salud (Rocha-Guzmán *et al.*, 2012). Debido al moderno estilo de vida, el tiempo de preparación de alimentos se ha visto reducido, incrementando así la ingestión de aquellos alimentos en presentaciones listas para el consumo. A la par, se ha visto disminuido el consumo de frutas y vegetales a nivel mundial lo que genera la ingestión de bajas concentraciones de nutrimentos y compuestos bioactivos relacionados con la buena alimentación y salud (Dembitsky *et al.*, 2011).

Debido a los cambios de hábitos alimenticios, el incremento en el consumo de alimentos y bebidas densamente energéticos, la población se ha visto seriamente afectada por enfermedades relacionadas con la inflamación y el estrés oxidativo, tales como obesidad, diabetes mellitus tipo 2, enfermedades cardiovasculares, entre otras (Barquera *et al.*, 2008). Se ha informado que la población mexicana es una de las mayores consumidoras de refresco a nivel mundial, lo que ocasiona desequilibrios en la ingesta dietética diaria. Aproximadamente el 21% de las calorías consumidas por día provienen de las bebidas, particularmente de aquellas cuyo contenido calórico es alto, las BF deben contribuir al satisfacer las

necesidades diarias de líquidos, con menor cantidad de calorías y mayores beneficios, promoviendo un buen estado de nutrición y salud en general.

Hoy en día las BF juegan un papel importante en la industria alimentaria, incluyen entre sus categorías a las bebidas energéticas y aguas enriquecidas con vitaminas A, C y E, así como con otros ingredientes funcionales (Siro *et al.*, 2008). La aparición y venta de estos productos ha ido en aumento en los últimos años alrededor del mundo, debido a que los consumidores prefieren los productos elaborados a partir de sustancias naturales sobre los realizados con productos químicos, ya que los primeros suelen ser sinónimo de natural o saludable (Gruenwald, 2009). En este sentido, las BF representan un medio adecuado para el consumo de compuestos bioactivos, además de ser un producto de fácil consumo. Dichos productos han generado el ingreso de nuevas presentaciones, siendo una de las áreas que presenta mayor crecimiento en la industria en los últimos años (Rivera *et al.*, 2008). Sin embargo, los beneficios del consumo de las BF han sido poco documentados y existe insuficiente información sobre su contenido de compuestos bioactivos y los mecanismos por los cuales proporcionan beneficios a la salud.

Los alimentos de origen vegetal, son los ingredientes más utilizados en la elaboración de BF. Dichos alimentos son una fuente rica en fitoquímicos, lo que los hace atractivos para la elaboración de estos productos, ya que proporcionan de una manera natural grandes cantidades de estas sustancias bioactivas, las cuales han demostrado ejercer diversos beneficios a la salud (Poiroux-Gonord *et al.*, 2010; Prado *et al.*, 2008). En los últimos años, se han reportado los efectos positivos de estos alimentos, de los cuales se recomienda ingerir al menos cinco porciones por día (400 g, aproximadamente) (FAO/OMS, 2016).

## II.2. Beneficios a la Salud de Compuestos Fenólicos en Bebidas Funcionales

Las BF no son sólo consumidas por su valor nutritivo, sino también por los efectos positivos que pueden producir en el metabolismo. Por ejemplo, se ingieren con la expectativa de ayudar en la hidratación y mejorar algunas situaciones fisiológicas (Martínez-Álvarez y Iglesias-Rosado, 2012; Zbakh y El Abbassi, 2012). Las bebidas, son matrices que facilitan la incorporación de ingredientes bioactivos y el fácil consumo de diversos alimentos naturales, especialmente, frutas y verduras (Wootton-Beard *et al.*, 2011). Es importante resaltar que la mayoría de las personas consume bebidas elaboradas a base de flores o frutos naturales, pues representan una alternativa económica y práctica para el consumo de compuestos bioactivos (Rodríguez-Roque *et al.*, 2015). Varios de estos materiales vegetales muestran sus beneficios a la salud mediante mecanismos de acción antioxidante.

Existe una amplia variedad de materiales de origen vegetal que son aprovechables para el desarrollo de nuevas BF. En México, existen diversos frutos y flores que contienen altas cantidades de fitoquímicos, que previenen enfermedades (Rocha-Guzmán *et al.*, 2012). Con estos materiales de origen vegetal pueden elaborarse infusiones, de las cuales se ha incrementado el consumo en los últimos años, probablemente debido a su aporte de agua y su bajo contenido de azúcar, además de que contribuyen al aumento en la ingestión de los ingredientes bioactivos.

Los efectos positivos a la salud, han permitido que las infusiones sean incluidas dentro de la categoría de BF. Algunas de las materias primas más utilizadas para la elaboración de este tipo de bebidas son las raíces, tallos y hojas, como la flor o las hojas de jamaica (Rodríguez-Roque *et al.*, 2014). Actualmente el

consumo de estos tejidos vegetales ha incrementado, debido a que en algunas poblaciones son utilizadas como bebidas terapéuticas para algunas patologías (da Silva Pinto, 2013; Rein *et al.*, 2013). Diversos estudios señalan que las propiedades funcionales del té verde se deben a su alto contenido de flavonoles, como: epicatequina, galato de epicatequina, epigallocatequina y galato de epigallocatequina (Westerterp-Plantenga, 2010). Por otra parte, a la flor de jamaica contiene importantes concentraciones de antocianinas y ácidos fenólicos como: ácido gálico, ácido caféico y ácido clorogénico, entre otros (Frank *et al.*, 2012).

Los CF son considerados constituyentes importantes en la dieta humana, ya que al consumirlos se promueven algunos de los efectos mencionados anteriormente (Gironés-Vilaplana *et al.*, 2012). Sus propiedades químicas, como secuestradores de radicales libres a través de sus grupos OH sugieren su fuerte CAOX. Se ha reportado que la CAOX de estas sustancias es mayor que el de las vitaminas A, E y carotenoides. Varios estudios sugieren que los CF pueden disminuir la oxidación de LDL y disminuir los niveles de peróxido de hidrógeno. Debido a esto, se buscan compuestos de origen vegetal, que puedan utilizarse en la elaboración de nuevas bebidas funcionales, de manera que dichas bebidas puedan ser utilizadas como una alternativa en el control de algunas enfermedades crónico degenerativas.

Algunos estudios, como los de Alarcon-Aguilar *et al.* (2007), Prieto *et al.* (2013) y Al-salafe *et al.* (2014) reportaron que el efecto del consumo de extractos de jamaica y té verde, utilizados como infusiones, están relacionados con mecanismos de acción antiobesogénicos. Dichos mecanismos incluyen la disminución de la absorción de glucosa en sangre, inhibición de la enzima lipasa pancreática, y de la proliferación de adipocitos, entre otros. Se sugiere que estos

mecanismos están relacionados con el contenido de CF, una de las principales sustancias encontradas en materiales vegetales (Gironés-Vilaplana *et al.*, 2012). Debido a la gama de posibilidades que la naturaleza ofrece para desarrollar nuevas BF; en nuestros días existe gran interés por explorar a fondo los beneficios de estos productos. Sin embargo, para el desarrollo de una nueva BF deben tomarse en cuenta varios puntos importantes, entre ellos, la selección de materias primas que en su composición presenten compuestos bioactivos prometedores, la identificación y cuantificación de dichos compuestos, así como, información sobre su bioaccesibilidad a nivel intestinal para ejercer su efecto biológico. La flor de jamaica y té verde presentan importantes cantidades de estos compuestos, que les permiten proporcionar efectos benéficos contra procesos de inflamación en el cuerpo humano, mediante diversos mecanismos de acción.

### II.3. Jamaica como Ingrediente Funcional para la Elaboración de Bebidas

La flor de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) es una planta anual que crece hasta 2.4 metros, sus inflorescencias consisten en un cáliz carnosos con cinco pétalos color rojo, las cuales son cosechadas cuando presentan una tonalidad rojo oscuro (Frank *et al.*, 2012). La jamaica proporciona micronutrientes, fibra dietética y compuestos bioactivos como ácidos orgánicos, fitoesteroles y polifenoles, sustancias que poseen CAOX (Sáyago-Ayerdi *et al.*, 2007). Respecto a su composición química, se ha encontrado que la flor de jamaica contiene algunas antocianinas como delphinidina-glucósido, sambubiósido y cianidina-3-sambubiósido, quercetina 3-glucósido, además de ácido gálico, ácido



clorogénico, ácido caféico, ácido protocatéico, kaempferol-3-glucósido, entre otros (Peng *et al.*, 2011).

La infusión de jamaica es una bebida popular en algunos países del mundo. En México, el extracto acuoso es consumido frecuentemente como bebida fría o caliente. En la medicina tradicional, esta bebida se utiliza con fines diuréticos, para aliviar desórdenes del tracto gastrointestinal, prevenir y/o controlar enfermedades del hígado, fiebre, hipercolesterolemia e hipertensión (Monroy-Ortíz y Castillo-España, 2007; Serban *et al.*, 2015). Además, el consumo de la infusión de flor de jamaica, se ha relacionado con mecanismos de acción antiobesogénicos. Dichos mecanismos van desde la disminución en la absorción de glucosa, inhibición de la enzima lipasa, estimulación de la termogénesis, inhibición de la proliferación de adipocitos y de la sintasa de ácidos grasos (Castañeda y Cáceres, 2014). Estos beneficios han sido asociados a la acción de las antocianinas, que son las responsables del color rojo en la jamaica.

Algunos estudios en animales han demostrado el efecto de la flor de jamaica en la disminución de la ganancia de peso. Por ejemplo, Alarcon-Aguilar *et al.* (2007), realizaron un estudio en ratones con obesidad inducida, en el cual encontraron que la administración de una infusión elaborada con cálices de jamaica, favoreció la pérdida de peso en un 9.6%, así como la reducción de glucosa en sangre. Además, en el mismo estudio, se encontró que los ratones presentaron un aumento en la ingestión de líquidos, se sugiere que este efecto pudo haberse dado debido a la propiedad diurética de la infusión. De la misma forma, observó que el suministro de un extracto acuoso de jamaica en ratones con obesidad, ocasionó una reducción del tejido adiposo, reducción en la ganancia de peso y aparición de dislipidemias (Villalpando-Arteaga *et al.*, 2013). Dichos efectos fueron relacionados con la regulación de PPAR- $\gamma$  y SREBP-1c,

factores de transcripción que participan en la determinación y diferenciación de los adipocitos.

Los CF presentes en mayor proporción en la flor de jamaica son las antocianinas. Estas, se encuentran ampliamente distribuidas en la dieta humana, lo que sugiere que diariamente se ingieren cantidades significativas de antocianinas. Estos pigmentos son estables en condiciones ácidas, pero inestables y rápidamente hidrolizadas en condiciones neutras (Tsuda, 2008). Las antocianinas, pueden presentar efectos en la inhibición de la acumulación de grasa corporal, actúan en adipocitos, modulando la expresión de la adiponectina, que aumenta la sensibilidad a la insulina en los adipocitos humanos. Los CF encontrados en la jamaica son de gran importancia, debido a que muestran tener relación con la salud y la protección frente al estrés oxidativo (Etcheverry *et al.*, 2012).

#### II.4. Té Verde como Ingrediente Funcional en la Elaboración de Bebidas

El té verde es el producto no oxidado o fermentado de las hojas de *Camellia sinensis* L., perteneciente a la familia *Theaceae*. Es consumido principalmente en China, Japón y algunos países de África y Medio Oriente, pero debido a los efectos benéficos en la salud, su consumo ha ido en aumento en los últimos años (Al-salafe *et al.*, 2014; Westerterp-Plantenga, 2010). El té verde contiene altas cantidades de sustancias bioactivas, especialmente catequinas. De acuerdo a varios autores, los principales CF encontrados en éste son: epicatequina, galato de epicatequina, epigalocatequina y galato de epigalocatequina, siendo éste último es el compuesto con mayor actividad antioxidante (Ahmad *et al.*, 2015; Butt *et al.*, 2015; Westerterp-Plantenga, 2010).

Generalmente, se preparan infusiones de las hojas secas de este vegetal. El extracto resultante se ha utilizado en todo el mundo como una bebida terapéutica y es la bebida más consumida después del agua, ya que es considerada un nutraceutico debido a su alto contenido de CF (Mak, 2012). Varios estudios han relacionado a las catequinas presentes en el té verde con algunos efectos benéficos en la salud, por ejemplo, efectos antioxidantes, antiaterogénicos, hipocolesterolémico, anticancerígeno y con la disminución de triglicéridos en sangre (Basu *et al.*, 2010; Hsu *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2012).

La actividad fisiológica y la biodisponibilidad de cada monómero de catequina es única debido a cada una de sus estructuras químicas (Yu *et al.*, 2014). Por lo general, se utiliza un tratamiento térmico para la fabricación de bebidas y otros alimentos con té verde (Ananingsih *et al.*, 2013; Sharma y Zhou, 2011). Sin embargo, las catequinas pueden sufrir cambios químicos en tratamientos de calor, que a menudo se asocian con la calidad negativa en nuevos productos, por ejemplo, sabor desagradable, así como cambios en sus propiedades benéficas (Lin *et al.*, 2010). Algunos autores informan que la epimerización es una de las reacciones más importantes que se producen en las catequinas sometidas a tratamientos térmicos, mientras que otros han reportado que también se observan reacciones de hidrólisis, oxidación y polimerización (Ananingsih *et al.*, 2013).

Comúnmente, el té verde es preparado por infusión remojando las hojas secas en agua caliente durante unos minutos, después se filtra y endulza. Sin embargo, la cantidad de hojas, el contenido de agua, la temperatura y el tiempo de infusión utilizados son muy variados y no han sido establecidos. Teniendo en cuenta la susceptibilidad de los CF a los factores antes mencionados, la optimización de los procesos de extracción podría ser de gran importancia con el fin de obtener la máxima cantidad de CF y la CAOX.

## II.5. Biodisponibilidad de Compuestos Fenólicos de Jamaica y Té Verde

La biodisponibilidad, se refiere a la fracción que alcanza la circulación sistémica a partir del TGI y que está disponible para promover su acción dentro del organismo. Es importante conocer el contenido de CF en un alimento o ingrediente, no obstante, también es necesario conocer qué porcentaje de estos es biodisponible dentro del contenido total en un alimento.

Este concepto es de gran importancia, dado que en algunas ocasiones los CF con mayor presencia, no suelen ser los más activos dentro del organismo, en parte debido a que su absorción en el TGI es muy baja. La mayoría de los CF está presente en los alimentos en forma de glucósidos, de tal manera que no pueden ser absorbidos directamente. Durante el paso de los CF por el TGI, estos pueden sufrir diversas modificaciones, se ha reportado que algunos de ellos resisten las condiciones ácidas del estómago y pueden pasar directamente al intestino delgado, donde enzimas como la  $\beta$ -glucosidasa o la lactasa-florizina hidrolasa podrían hidrolizarlos. No obstante, al no ser absorbidos en el intestino, estos compuestos pueden pasar al colon donde la microbiota intestinal puede degradarlos y convertirlos en compuestos asimilables (D'Archivio *et al.*, 2010).

La biodisponibilidad de los CF puede ser determinada sabiendo cuáles compuestos se absorben mejor, y cuáles pueden dar lugar a la caracterización de la actividad biológica de estos compuestos. Igualmente, puede medirse por medio del incremento de la CAOX en el plasma sanguíneo una vez que se han ingerido (Fitó *et al.*, 2007; Pecorari *et al.*, 2010). La estructura química de los CF determina su absorción y los metabolitos que alcanzan la circulación (D'Archivio *et al.*, 2010). Algunos estudios en humanos han mostrado que la concentración de CF en el plasma sanguíneo puede variar en función de varios factores, los más importantes son la estructura del CF, la matriz alimentaria de

la que provienen, además de la cantidad y tiempo de consumo de estos compuestos (Quiñones *et al.*, 2012).

La biodisponibilidad de los CF presentes en la jamaica y té verde, han sido estudiados previamente por varios autores. Por ejemplo, estudios experimentales en ratas han demostrado que la quercetina, que se encuentra en ambas materias primas, puede absorberse a nivel gástrico, pero su forma glucosilada pasa a nivel intestinal donde se facilita su absorción (Pandey y Rizvi, 2009). Se sabe que al ser absorbidos los CF están sujetos a modificaciones, tales como metilación, sulfatación o glucoronidación, lo cual puede facilitar su excreción por vía urinaria o biliar debido al aumento de su hidrofiliidad (Quiñones *et al.*, 2012). Es por ello que es necesario establecer un método de extracción óptimo de estos CF y una vez llevada a cabo las bebidas funcionales, conocer la bioaccesibilidad y biodisponibilidad que tienen para ser absorbidos y pasar al torrente sanguíneo y llegar a los tejidos diana. Por lo que el presente estudio, se establecen condiciones para extraer los CF a partir de jamaica y té verde para el desarrollo de una BF con un perfil variado de CF

## II.6. Metodología de Superficie de Respuesta (MSR)

La MSR es una herramienta muy útil para el desarrollo de nuevos productos alimenticios. Por medio de un conjunto de modelos matemáticos y estadísticos se modelan y analizan variables de interés. Dichas variables son influenciadas por varios factores, con el objetivo de optimizar la respuesta, midiendo los efectos lineales, cuadráticos y de interacción de estos factores (Montgomery, 2004).

Generalmente, la optimización comienza seleccionando los factores a evaluar y procede con la utilización de algún diseño de optimización. Entre los diseños más utilizados en la optimización de procesos se encuentran: diseño factorial completo, diseño Plackett-Burman (PBD), diseño de Taguchi, diseño de Box Behnkem y el diseño central compuesto (DCC) (Sharif *et al.*, 2014). Esta metodología es eficiente, ya que ahorra tiempo, y el modelo matemático obtenido proporciona información acerca de las interacciones de los factores (Duarte y Duarte, 2011).

Algunos autores reportan la utilización de la MSR con diferentes diseños en los que buscan la optimización de la extracción de compuestos bioactivos. Por ejemplo, Prasad *et al.* (2011) analizaron las condiciones óptimas de extracción de CF y CAOx en piel de *Mangifera Pajang*, utilizando la MSR estudiaron los efectos de la concentración de etanol, temperatura de extracción y la relación sólido-líquido. Las condiciones óptimas para la extracción de CF fueron 68% de etanol, 55°C y 32.7 mL/g de muestra, mientras que para la CAOx fueron 68%, 56°C y 31.8 mL/g de muestra. Además, bajo estas condiciones se encontraron como principales fitoquímicos la mangiferina, ácido gálico, catequina y epicatequina.

Se ha reportado la optimización de condiciones de extracción de CF en açai (*Euterpe oleracea*), en este trabajo las variables de estudio fueron la concentración de etanol, concentración de ácido clorhídrico y temperatura. Las condiciones que maximizaron la respuesta fueron entre 70 y 80% de etanol, entre 0.065 y 0.074 mol/L de ácido clorhídrico y una temperatura de 58 °C (Pompeu, *et.al.*, 2009). Por otro lado, Gan, y Latiff (2011), estudiaron el efecto de la relación de buffer y sólido, la temperatura de incubación y el tiempo sobre la extracción de CF y flavonoides totales en *Parkia speciosa*. Las condiciones óptimas fueron 20 mL de buffer/g de muestra, 35-36°C y de 100 a 102 min, con las cuales se

obtuvieron entre 664-668 mg EAG para el contenido de CF y 47.4-49.6 mg equivalentes de pirocatecol. Además se determinó la CAOX de *Parkia speciosa*, para la que se obtuvieron hasta 82% y casi 80% de inhibición de los radicales DPPH y ABTS, respectivamente.

Asimismo, en otro estudio se evaluó el efecto de la temperatura, la relación de líquido y sólido y la concentración de etanol sobre la CAOX de extractos de tallo de uva. En dicho trabajo la máxima actividad antioxidante fue de 260.8 y 1378.7  $\mu\text{mol}$  de ET/g de muestra seca en las técnicas de TEAC y ORAC, respectivamente. Lo anterior fue obtenido con 40.4% y 55.4% de concentraciones de etanol y 84°C (Karacabey y Mazza, 2008).

### **III. HIPÓTESIS**

La combinación de extractos de jamaica y té verde permitirá generar una bebida funcional con una diversidad de compuestos fenólicos bioaccesibles, con mayor capacidad antioxidante y aceptable sensorialmente.



#### **IV. OBJETIVO GENERAL**

Desarrollar una bebida funcional con características sensoriales aceptables, un perfil variado de compuestos fenólicos y la mayor capacidad antioxidante posible, a base de la mezcla de extractos optimizados de jamaica y té verde.

## V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Optimizar las condiciones de extracción de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante en jamaica y té verde.

Evaluar sensorialmente la bebida una vez optimizada y formulada.

Evaluar la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos presentes en la bebida funcional mediante un proceso de digestión *in vitro*.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### VI.1. Materia Prima

Se adquirieron cálices de jamaica cv. *Criolla* y hojas secas de té verde cv. Sencha en supermercados de Hermosillo, Sonora y de San Luís Potosí.

### VI.2. Caracterización de Compuestos Fenólicos y Capacidad Antioxidante de jamaica y té verde

#### VI.2.1. Extracción de Compuestos Fenólicos

Se prepararon extractos metanólicos de los cálices enteros de acuerdo a la metodología descrita por (Palafox-Carlos *et al.*, 2012). Se utilizó 1 g de ingrediente al que se le agregaron 20 mL de una solución de metanol: agua (80:20, v/v). Se colocó durante 30 min en un sonicador Bransonic 2510 (Bransonic Ultrasonic Co Danbury, EUA) y se centrifugó (Beckman Coulter, Allegra™64R, EUA) a 14 000 rpm durante 15 min a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante y los residuos de la extracción se lavaron dos veces más con 10 mL de metanol al 80% bajo las condiciones antes descritas. Posteriormente, los sobrenadantes se filtraron a través de papel Whatman N°1 y el volumen obtenido se enrasó a 30

mL con metanol 80%. El extracto obtenido se almacenó a -20 °C para ser utilizado en la determinación del CFT y CAOX

### **VI.2.2. Determinación del Contenido de Fenoles Totales (CFT)**

La determinación de CFT se llevó a cabo de acuerdo a la metodología de Singleton, y Rossi (1965). Esta metodología se basa en la reducción del reactivo Folin-Ciocalteu (solución de fosfomolibdato y fosfotungstato) en presencia de un agente reductor, en este caso los CF, en medio alcalino formando un complejo de molibdeno – tungsteno de color azul. El ensayo se realizó en microplaca (NUNC 96), se colocaron 30 µL de muestra, 150 µL de reactivo Folin y 120 µL de carbonato de sodio al 7.5%, se mantuvo en oscuridad por 30 min. Posteriormente, las mediciones se realizaron en un espectrofotómetro FLUOstar Omega (BMG Labtech, Chicago, IL, EUA) a una longitud de onda de 765nm, los resultados son expresados como mg equivalentes de ácido gálico (mg EAG/g).

### **VI.2.3. Determinación del Contenido de Flavonoides Totales**

La determinación del contenido de flavonoides totales fue realizada por el método colorimétrico de identificación por cloruro de aluminio, descrito por Zhishen *et al.* (1999) con algunas modificaciones. En este método los flavonoides, el cloruro de aluminio y el nitrito de sodio forman un complejo coloreado. Se prepararon las siguientes soluciones: A) nitrito de sodio 5% (NaNO<sub>2</sub> 5%), B) cloruro de aluminio 10% (AlCl<sub>3</sub> 10%), C) hidróxido de sodio 1 M (NaOH 1M). Se utilizaron 250 µL de muestra, se agregó 1mL de agua destilada y 75 µL de NaNO<sub>2</sub>5%, se incubó por 5 min, se agregaron 75 µL de AlCl<sub>3</sub>10%; tras 1 min de espera se agregaron 500 µL de NaOH 1M y 600 µL de agua destilada. Se agitó vigorosamente y se pasaron 300 µL a un pocillo de microplaca (NUNC 96) para leer su absorbancia en un espectrofotómetro FLUOstar Omega (BMG Labtech,

Chicago, IL, EUA) a una longitud de onda de 496nm, los resultados son expresados como mg equivalentes de quercetina (mg EQ/g) para jamaica y mg equivalentes de catequina (mg EC/g) para té verde.

#### **VI.2.4. Determinación de la Capacidad Antioxidante**

VI.2.4.1. DPPH• (2,2-difenil-1-picril-hidrácil). La CAOX de los extractos metanólicos se realizó de acuerdo al método propuesto por (Brand-Williams *et al.*, 1995). Se añadieron 2.5 mg del radical estable DPPH• en 100 mL de metanol puro. La absorbancia de la solución de DPPH• se ajustó a una absorbancia de  $0.700 \pm 0.020$  a 515 nm con un espectrofotómetro FLUOstar Omega (BMG Labtech, Chicago, IL, EUA). Posteriormente, se mezclaron 20  $\mu$ L de muestra con 280  $\mu$ L de solución DPPH•, éstos se mantuvieron en oscuridad durante 30 min y se midió la pérdida de absorbancia nuevamente a 515 nm. La actividad antioxidante fue expresada como mg equivalentes trolox (ácido 6- hidroxil-2, 5, 7, 8-tetrametilroman-2-carboxílico) (mg ET/g) que fueron calculados usando una ecuación de regresión entre la concentración estándar y el porcentaje de inhibición del radical DPPH•.

VI.2.4.2. Poder Antioxidante de Reducción de Hierro (FRAP). La CAOX medida como FRAP se realizó de acuerdo al método descrito por Benzie, y Strain (1996). Se prepararon 3 soluciones A) Buffer de acetato de sodio (0.03 M, pH3.6) (NaAc) B) solución TPTZ 10 mM (0.031 g en 10 mL de HCL 40 mM) y C) solución de cloruro férrico ( $\text{FeCl}_3$ ) 20 mM (0.05406 g en 10 mL de  $\text{H}_2\text{O}$ ). Para preparar el reactivo FRAP se mezclaron 5 mL de NaAc, 0.5 mL de TPTZ y 0.5 mL de  $\text{FeCl}_3$ . Para la determinación de CAOX se mezclaron 20  $\mu$ L de muestra con 280  $\mu$ L del reactivo FRAP, posteriormente se incubaron 30 min en la oscuridad a temperatura ambiente. La absorbancia fue leída a 595 nm usando un espectrofotómetro FLUOstar Omega (BMG Labtech, Chicago, IL, EUA). La

concentración de  $FE^{+2}$  fue calculada con la comparación de la absorbancia a 595 nm con el estándar trolox de la curva de concentración. La CAOX fue expresada como mg ET/ g.

#### **VI.2.5. Identificación y Cuantificación de Compuestos Fenólicos**

Se realizó la identificación y cuantificación de CF por la técnica de cromatografía líquida de ultra resolución con un detector de arreglo de diodos (UPLC-DAD)(Sistema ACQUITY, clase H; Waters, EUA) a 270 nm, siguiendo la técnica descrita por Mattila, y Kumpulainen (2002) con algunas modificaciones. Se utilizó una columna BEH C18 de 3.0 x 100 mm. Las fases móviles utilizadas fueron ácido fórmico al 0.5% y metanol. El tiempo total de corrida fue de 30 min, la temperatura de la columna se fijó en 60 °C y se inyectó un volumen de 1  $\mu$ L.

Se pesaron 0.2 g de muestra seca a la que se le adicionaron 7 ml de una solución de trabajo realizada con metanol /BHT (2, (6) – Di-tert-Butyl-p-cresol) (2 g/L) y ácido acético 85% (90:10). Se colocó durante 30 minutos en un sonicador Bransonic 2510 (Bransonic Ultrasonic Co Danbury, EUA), al finalizar este tiempo se tomó una alícuota de 1 mL y se inyectó en el equipo UPLC-DAD para conocer la fracción de CF que se encuentran libres en el extracto. Se procedió a una hidrólisis alcalina del residuo, al cual se le agregaron 12 mL de agua destilada, 5 mL de NaOH (10 M) y gas nitrógeno, la muestra se dejó a temperatura ambiente en agitación constante por 16 h. Una vez transcurrido este tiempo se ajustó el pH de la muestra con HCl y se llevó a cabo la extracción de CF de la fracción de la hidrólisis alcalina mediante tres lavados de 15 mL con una mezcla de éter etílico y etil acetato (50:50). Se recogió la fase líquida y se concentró a sequedad en un rotavapor (Yamato RE 200), el extracto se resuspendió en 1.5 mL de metanol y se inyectó en UPLC-DAD.

Para la hidrólisis ácida se agregaron 2.5 mL de HCl al residuo de la extracción, el cual se incubó a 85°C por 30 min, se dejó enfriar y nuevamente se ajustó a pH2. Se repitió la extracción con la solución de éter etílico y etil acetato (50:50), se llevó a sequedad y resuspendió con 1.5 mL de metanol. Todas las muestras fueron filtradas con acrodiscos de 0.22 µm previo a su inyección y se colocaron en viales correspondientes para su inyección.

### VI.3. Optimización de las Condiciones de Extracción de los Compuestos Fenólicos de Jamaica y Té Verde

Se utilizó un DCC en la optimización de las condiciones para maximizar el CFT y CAOx, mediante los factores: cantidad de materia prima ( $X_1$ :g/100 mL), temperatura ( $X_2$ :7 -100 °C) y tiempo ( $X_3$ :60- 1200 min) para la bebida de jamaica y té verde, los rangos de las variables pueden verse en el Cuadro 1. Los rangos de alfa fueron introducidos de acuerdo a las condiciones utilizadas en estudios previos. El diseño experimental fue aplicado después de seleccionar los rangos y aplicar los 20 experimentos. Se realizaron 8 corridas factoriales, 6 puntos axiales a una distancia de  $\pm 1.682$  del centro y 6 corridas como réplicas del punto central (Cuadro 2).

De la realización de este experimento se obtuvieron extractos acuosos de jamaica y té verde a los cuales se les determinó el CFT y CAOx, mediante las metodologías previamente descritas, estas fueron las variables respuesta evaluadas (CFT, DPPH• y FRAP). El análisis de regresión se realizó con los datos experimentales ajustados con el siguiente modelo matemático:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon$$

Donde  $Y$  es la variable respuesta,  $\beta_0$  es la constante del modelo,  $\beta_i$ ,  $\beta_{ii}$  y  $\beta_{ij}$  son los coeficientes de regresión de la intercepción lineal (Wang y Chen, 2008), cuadrática ( $X_i^2$ ) y los efectos de las interacciones ( $X_i X_j$ ), respectivamente.  $\epsilon$ , corresponde al error residual.



**Cuadro 1.** Niveles reales y codificados de los rangos mínimos y máximos de los factores del Diseño Central Compuesto.

Factores independientes	-1.682	-1	0	1	1.682
X <sub>1</sub> : Cantidad de materia prima (g/100 mL)	1	4.9	10.5	16.2	20
X <sub>2</sub> : Temperatura (°C)	7	26	53.5	82	100
X <sub>3</sub> : Tiempo (min)	60	291	630	969	1200

**Cuadro 2.**Corridas experimentales del Diseño Central Compuesto.

Tratamiento	Niveles codificados	Cantidad (g/100 mL)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	000	10.5	53.5	630
2	++	16.2	26	969
3	A00	20	53.5	630
4	000	10.5	53.5	630
5	000	10.5	53.5	630
6	--	4.9	26	969
7	0a0	10.5	7	630
8	-+-	4.9	82	291
9	---	4.9	26	291
10	000	10.5	53.5	630
11	+--	16.2	26	291
12	A00	1	53.5	630
13	0A0	10.5	100	630
14	000	10.5	53.5	630
15	+++	16.2	82	969
16	++-	16.2	82	291
17	-++	4.9	82	969
18	000	10.5	53.5	630
19	00A	10.5	53.5	1200
20	00a	10.5	53.5	60

Corridas factoriales (+,-), axiales (A, a) y centrales (0) del DCC

#### VI.4. Formulación y Evaluación Sensorial de la Bebida Funcional

La formulación se realizó tomando como punto central la mezcla de ambos extractos optimizados 50:50 v/v, con dos mezclas más en una proporción 30:70 y 70:30 v/v de jamaica y té verde, respectivamente. Para la evaluación sensorial se realizó una prueba de preferencia (“preference test”), la cual tiene como objetivo ordenar, según las opiniones de un grupo de consumidores una serie de muestras de acuerdo con un aprecio personal o una preferencia. Esta prueba se realizó en dos etapas, con posibles consumidores potenciales o habituales de la BF en estudio (n=110). Los datos fueron tabulados y analizados con ordenamiento por rangos (Pedrero y Pangborn, 1989).

#### VI.5. Digestión *in vitro*: Cinética de Liberación de Compuestos Fenólicos y Capacidad Antioxidante de la Bebida Funcional

La cinética de liberación de CF y CAOX de la bebida funcional se determinó por medio de un proceso de digestión *in vitro* en dos fases secuenciales: digestión gástrica e intestinal (incluyendo diálisis), de acuerdo a la metodología descrita por (Granfeldt *et al.*, 1992) con algunas modificaciones. Se tomaron 100 mL de BF en un vaso de cristal, se agregaron 10 mL de buffer de fosfatos (0.05 M, pH 1.5) y 0.2 mL de una solución de pepsina (300 mg/ mL). Las muestras se incubaron a 37 °C por 1 h en un baño con agitación. Mientras que, se tomaron alícuotas en los minutos 0, 40 y 60 para las determinaciones del CFT y CAOX. Transcurrido ese tiempo, se agregaron 4.5 mL de buffer de fosfatos (0.05 M, pH 6.9), se transfirieron a bolsas de diálisis, se agregó 1 mL de  $\alpha$ -amilasa pancreática (110U/mL) y se selló la bolsa. La muestra se introdujo en 500 mL de

buffer de fosfatos (0.05 M, pH 6.9) previamente estabilizado a 37 °C, se incubó durante 3 h a 37 °C y se tomaron alícuotas a los 0, 60, 120 y 180 min para la posterior determinación de CFT y CAOX. Los resultados se expresaron como mg EAG/ mL y mg ET/ mL para CFT y CAOX, respectivamente.

## VI.6. Análisis de Datos

Las variables de CFT y CAOX por FRAP y DPPH de los objetivos 1 y 3 fueron analizadas con estadística descriptiva y un análisis de varianza (ANOVA) de una vía. El nivel de agrado en la evaluación sensorial (objetivo 2) se evaluó mediante un análisis de ordenamiento por rangos, con un nivel de significancia de  $p \leq 0.05$ , en caso de existir diferencias entre medias se realizó una comparación de ellas con la prueba Tukey-Kramer, para establecer diferencias significativas, a un 95% de confianza. Para el análisis de datos fue utilizado el paquete estadístico JMP®, versión 11.0.0 (SAS Institute Inc., 2013). Todos los análisis llevados a cabo se realizaron al menos por triplicado.

## VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### VII.1. Caracterización de Compuestos Fenólicos y Capacidad Antioxidante de jamaica y té verde

El Cuadro 3 muestra los resultados del CFT y CAOX de los extractos metánolicos obtenidos a partir de las materias primas. En el caso de jamaica, el CFT fue de  $31.89 \pm 0.39$ , el valor obtenido fue mayor al de Ariza-Flores *et al.* (2014) y Mohd-Esa *et al.* (2010) quienes reportan  $5.09 \pm 0.1$  mg EAG/ 100 g de muestra seca y  $2.91 \pm 0.07$  mg EAG/ g de muestra seca, respectivamente. La mayoría de los trabajos en cálices de jamaica reportan valores que van desde 20.6 hasta 64.0 mg EAG/ g de muestra, por lo que se puede decir que los cálices utilizados en este trabajo se encuentran dentro del rango normal en el CFT. Por ejemplo, Sirag *et al.* (2014) obtuvieron 41.07 mg EAG/ g, en jamaica procedente de Sudán, en la cual utilizaron como solvente etanol. Por otro lado, en extracciones con metanol acidificado se han reportado 20.6 g EAG/ Kg, en jamaica 'Criolla' originaria de Huajicori, Nayarit (Sáyago-Ayerdi *et al.*, 2014).

El contenido de flavonoides totales en jamaica fue de  $12.99 \pm 1.64$  mg EQ/ g de muestra seca (Cuadro 3). Estos resultados muestran una concentración más alta en comparación con lo reportado por Borrás-Linares *et al.* (2015), quienes obtuvieron 8.9 mg EQ/g de muestra seca. Por otro lado, otros autores han obtenido resultados más altos 36.7 mg EQ/g de peso seco (Anokwuru *et al.*, 2011). Con base en estos resultados, se puede decir que alrededor del 50% del

CFT pertenece a flavonoides, por lo que puede sugerirse que estos son los compuestos bioactivos de mayor abundancia en jamaica.

Respecto a la CAOX los valores obtenidos por el método de FRAP ( $154.01 \pm 0.87$  mg ET/ g), fueron mayores que los de DPPH• ( $64.59 \pm 0.20$  mg ET/ g) (Cuadro 3). Tales diferencias podrían deberse al tipo de mecanismo evaluado en cada ensayo. La inhibición del radical DPPH• está basada en la reducción de dicho radical mediante un mecanismo HAT (donación de hidrógenos, por sus siglas en inglés) ocurrido entre los antioxidantes y el DPPH•. Mientras que el ensayo FRAP está basado en un mecanismo SET (transferencia de electrones, por sus siglas en inglés), en dicho ensayo la forma férrica del complejo hierro-tripiridiltriazina ( $Fe^{+3}$ -TPTZ) es reducida a su forma ferrosa ( $Fe^{+2}$ -TPTZ) produciendo una coloración azul intensa que es proporcional a la concentración de los antioxidantes (Rodríguez-Roque *et al.*, 2015).

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran una CAOX mayor en comparación con lo reportado previamente por Borrás-Linares *et al.* (2015) ( $22.32$  mg ET/ g de peso seco), quienes también determinaron la CAOX de jamaica por DPPH•. Sin embargo, son bajos de acuerdo a lo reportado por Mercado-Mercado *et al.* (2015), donde mostraron un valor de  $85.48$  mg ET/ g en cálices enteros. Mientras que para FRAP otros autores han reportado de  $12.95$  a  $53.93$  mg ET/ g de muestra (Mercado-Mercado *et al.*, 2015; Sáyago-Ayerdi *et al.*, 2014). Estudios previos han mostrado que el método de FRAP para la determinación de CAOX detecta la actividad de las antocianinas como las principales moléculas reductoras en jamaica (Sáyago-Ayerdi *et al.*, 2014; Tsai *et al.*, 2002).

**Cuadro 3.** CFT (mg EAG/g muestra seca), flavonoides totales (mg EQ/ g muestra seca y mg EC/ g muestra seca) y CAOX (mg ET/ g de muestra seca) de los cálices de jamaica y té verde.

Muestra	Fenoles Totales	Flavonoides Totales	Capacidad Antioxidante	
			DPPH•	FRAP
Jamaica	31.89±0.39	12.99±1.64	64.59±0.20	154.01±0.87
Té Verde	182.77±0.80	32.67±4.68	525.01±13.12	674.35±8.54

\*Valores expresados en medias ± desviación estándar. EAG= Equivalentes de ácido gálico;EQ= Equivalentes de quercetina; EC= Equivalentes de catequina; ET= Equivalentes Trolox.

Con respecto a los resultados de té verde, se puede observar un alto contenido de fenoles y flavonoides totales. Los resultados obtenidos de CFT en este trabajo difieren a los presentados por otros autores, en donde son reportados 40.82 mg EAG/g y de 547.81 a 947.60 mg EAG (Carlioni *et al.*, 2013; de Feria Cardet, 2011; Muniandy *et al.*, 2016). Por otro lado, algunos estudios afirman que los niveles de flavonoides en té varían de acuerdo al cultivar utilizado. El té verde de este estudio mostró una concentración de  $32.67 \pm 4.68$  mg EC/g de peso seco. Sin embargo, para esta variedad de té se ha reportado una concentración de 50 mg EC, por lo que se puede sugerir que las diferencias encontradas entre este y otros trabajos pueden ser atribuidas al tamaño de las hojas, las condiciones pre y poscosecha, las condiciones de almacenamiento, secado y fermentación, entre otros factores, que podrían tener inferencia en la concentración de fenoles y flavonoides totales.

El perfil de CF se evaluó mediante la extracción de los CF liberados directamente de la matriz alimentaria (CF libres), y los extraídos después de una hidrólisis alcalina y una hidrólisis ácida (CF unidos a la matriz alimentaria). En total, se identificaron 11 compuestos.

En los cálices de jamaica se identificaron; ácido gálico, protocatéico, clorogénico, vanílico, siríngico, p-cumárico y ferúlico, además de flavonoides como rutina, miricetina, quercetina y kaempferol (Fig. 1 A, B y C) (Cuadro 4). Dichos resultados se relacionan con lo reportado por Mercado-Mercado *et al.* (2015) donde los principales CF encontrados fueron ácido gálico y caféico. Además, estos autores también reportan ácido siríngico y ferúlico como CF asociados a fibra dietaria en esta matriz. De igual manera, se ha reportado la presencia de quercetina y kaempferol en jamaica (Camelo-Méndez *et al.*, 2013; Zhen *et al.*, 2016).

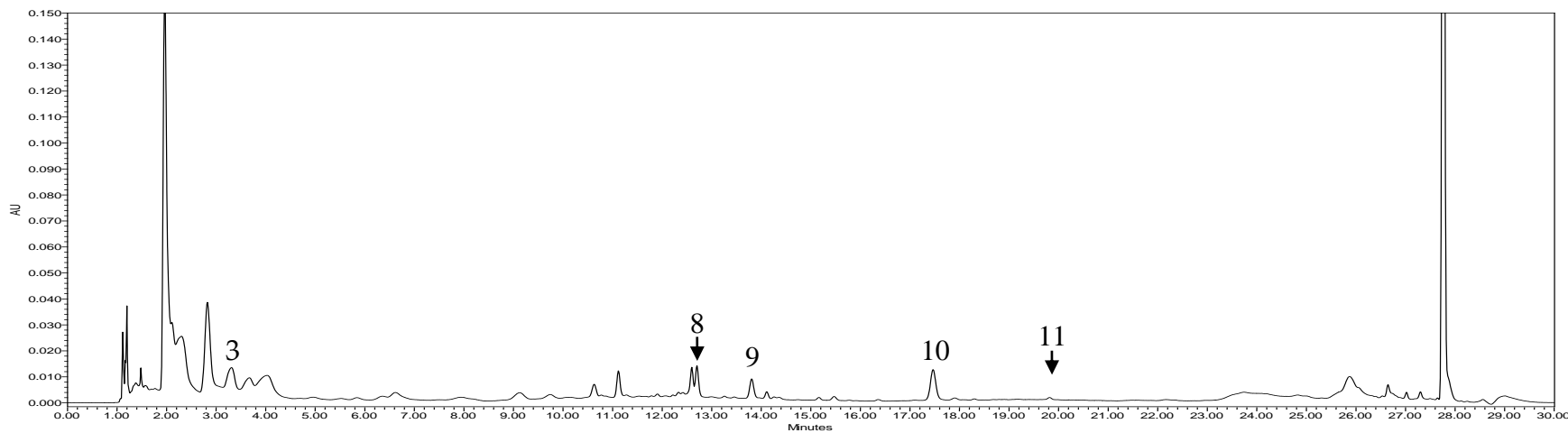


**Cuadro 4.** Cuantificación de CF de jamaica (mg/g de muestra seca) después de cada etapa de hidrólisis.

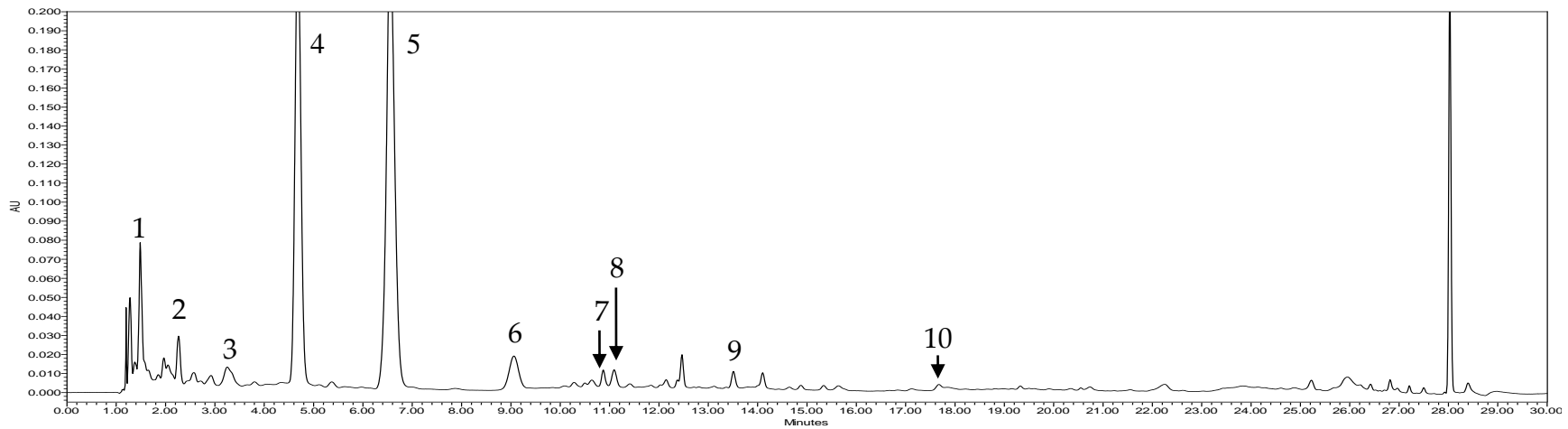
	<b>Compuesto</b>	<b>Fracción Libre</b>	<b>Fracción Alcalina</b>	<b>Fracción Ácida</b>	<b>Total</b>
1	Ácido gálico	ND	1.50 ± 0.09	0.11 ± 0.00	1.61
2	Ácido protocatéico	ND	0.51 ± 0.01	ND	0.51
3	Ácido clorogénico	0.48 ± 0.00	30.14 ± 0.04	ND	30.62
4	Ácido vanílico	ND	0.15 ± 0.00	ND	0.15
5	Ácido siríngico	ND	1.25 ± 0.01	0.05 ± 0.00	1.30
6	Ácido p-cumárico	ND	0.61 ± 0.00	ND	0.61
7	Ácido ferúlico	ND	0.46 ± 0.03	0.03 ± 0.00	0.49
8	Rutina	0.10 ± 0.00	0.34 ± 0.04	ND	0.44
9	Miricetina	0.08 ± 0.01	0.25 ± 0.00	0.07 ± 0.00	0.33
10	Quercetina	0.12 ± 0.00	0.08 ± 0.00	0.11 ± 0.00	0.31
11	Kaempferol	0.02 ± 0.00	ND	0.02 ± 0.00	0.04

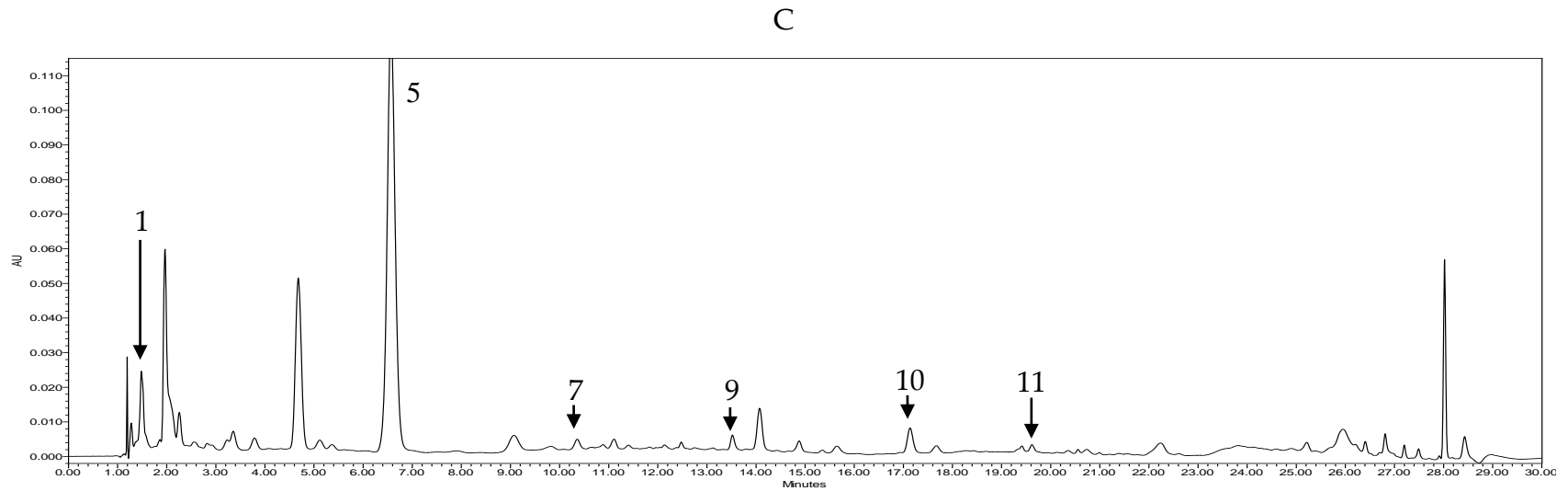
\*Valores expresados en medias ± desviación estándar. ND= No detectado.

A



B





**Figura 1.** Perfil de CF libres y unidos a la matriz alimentaria identificados por UPLC-DAD en extractos de jamaica. A) CF de la fracción libre; B) CF de la fracción alcalina; C) CF de la fracción ácida. Los picos están enumerados de acuerdo a su tiempo de retención: (1) ácido gálico, (2) ácido protocatéico, (3) ácido clorogénico, (4) ácido vanílico, (5) ácido siríngico, (6) ácido p-cumárico, (7) ácido ferúlico, (8) rutina, (9) miricetina, (10) quercetina, (11) kaempferol.

La CAOX del té verde siguió la misma tendencia que los valores de jamaica, en este caso se obtuvieron los más altos por el método de FRAP (Cuadro 3). En general la CAOX de los flavonoides está dada por la captación de radicales del grupo OH, debido a que el número de estos ha mostrado correlación con dicha capacidad (Roy *et al.*, 2010). En el caso del té verde, se ha reportado que las catequinas y otros CF de bajo peso molecular, podrían contribuir a su alto potencial antioxidante (Muniandy *et al.*, 2016).

Los resultados anteriores sugieren que algunos de los factores involucrados en las diferencias encontradas son la variedad de jamaica o té verde utilizados, las prácticas de cultivo, la cantidad de material utilizado para realizar la extracción, además de los tiempos, temperaturas y solventes utilizados para llevarla a cabo (Chandrasekara y Shahidi, 2011; Medini *et al.*, 2011). Por lo que es importante que en cada estudio se especifique el origen de las muestras, ya que la mayoría de las publicaciones encontradas sólo mencionan que los materiales vegetales son obtenidos de supermercados locales o simplemente mencionan “jamaica” o “té verde” lo cual puede llegar a hacer difíciles las comparaciones con trabajos anteriores. A pesar de ello, es importante destacar que tanto la jamaica como el té verde representan una importante fuente de compuestos bioactivos, por lo que dichos ingredientes pueden ser utilizados para la elaboración de una BF.

Por otro lado, en té verde se han identificado varios CF, principalmente catequinas (epicatequina, galato de epicatequina, epigalocatequina y galato de epigalocatequina). En la variedad de té verde utilizada en este trabajo (cv. Sencha) se identificaron 11 CF, entre los cuales están ácidos gálico, clorogénico, p-cumárico, elágico y cinámico, además también se identificaron: catequina, epicatequina, rutina, miricetina, quercetina y kaempferol (Fig. 2 A, B y C) (Cuadro 5). Estos resultados muestran similitud con lo reportado por (de Feria

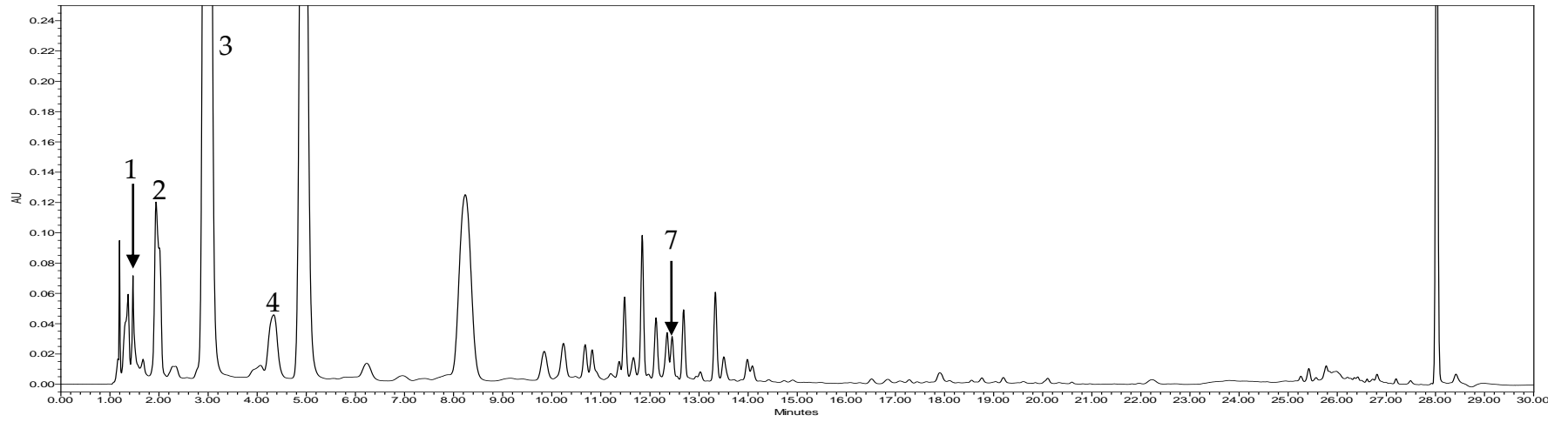
Cardet, 2011) en donde se observó la presencia de flavonoides como quercetina y kaempferol, además de sus glucósidos.

**Cuadro 5.** Cuantificación de CF (mg/ g de muestra seca) de té verde después de cada etapa de hidrólisis.

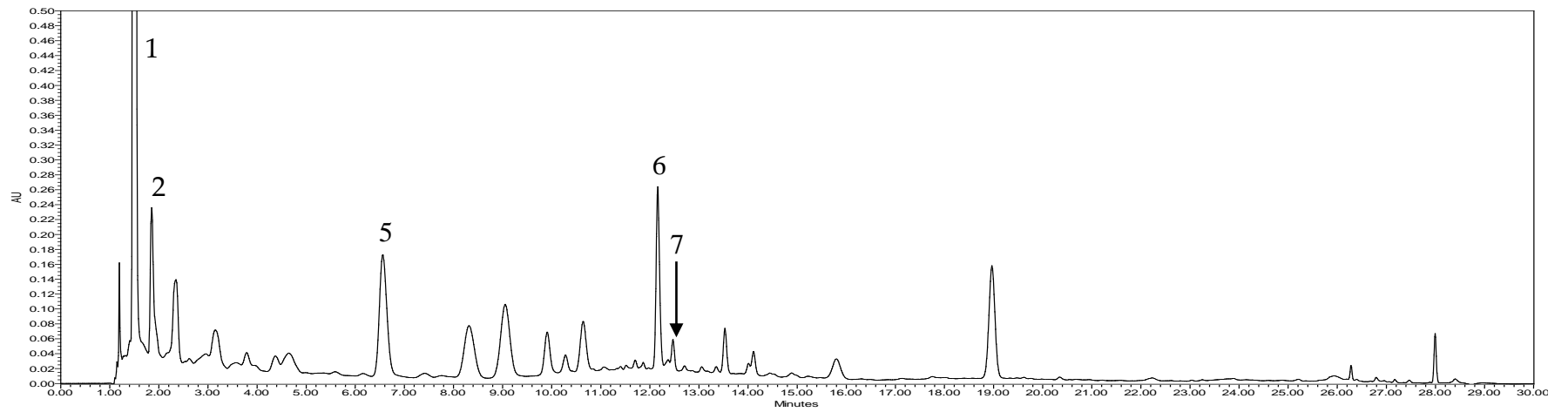
	<b>Compuesto</b>	<b>Fracción Libre</b>	<b>Fracción Alcalina</b>	<b>Fracción Ácida</b>	<b>Total</b>
1	Ácido gálico	0.31±0.02	27.09±0.24	16.19±0.20	43.59
2	Catequina	1.84±0.02	18.07±0.36	3.25±0.04	23.16
3	Ácido clorogénico	0.99±0.038	ND	ND	0.99
4	Epicatequina	1.14±0.15	ND	0.09±0.00	1.23
5	Ácido p-cumárico	ND	2.07±0.01	0.30±0.01	2.37
6	Ácido elágico	ND	0.63±0.00	0.71±0.00	1.34
7	Rutina	1.01±0.03	0.40±0.00	ND	1.41
8	Miricetina	ND	ND	0.43±0.01	0.43
9	Quercetina	ND	ND	0.79±0.01	0.79
10	Ácido cinámico	ND	ND	0.14±0.00	0.14
11	Kaempferol	ND	ND	0.31±0.00	0.31

\*Valores expresados en medias ± desviación estándar. ND= No detectado.

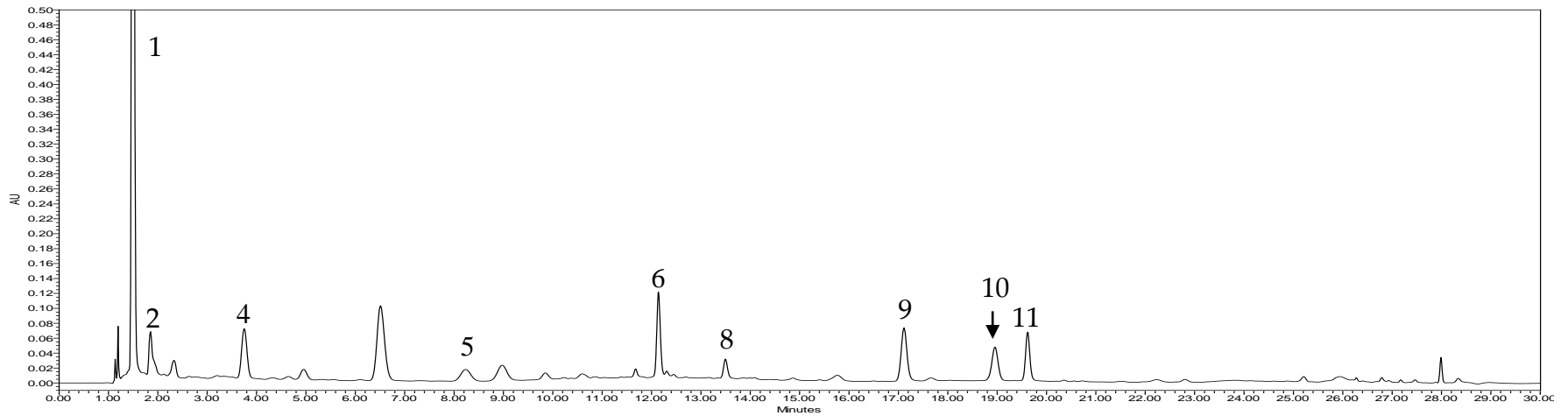
A



B



C



**Figura 2.** Perfil de CF libres y unidos a la matriz alimentaria identificados por UPLC-DAD en extractos de té verde. A) CF de la fracción libre; B) CF de la fracción alcalina; C) CF de la fracción ácida. Los picos están enumerados de acuerdo a su tiempo de retención: (1) ácido gálico, (2) catequina, (3) ácido clorogénico, (4) epicatequina, (5) ácido p-cumárico, (6) ácido eláxico, (7) rutina, (8) miricetina, (9) quercetina, (10) ácido cinámico, (11) kaempferol.

## VII.2. Optimización de las Condiciones de Extracción de Compuestos Fenólicos y Capacidad Antioxidante de Jamaica y Té Verde

El proceso de optimización se realizó con el fin de obtener el valor máximo de las tres variables a analizar. En el cuadro 6 se muestran los resultados de CFT y CAOX de jamaica en las corridas experimentales del Diseño Central Compuesto. Los valores de CFT se encuentran en un rango de 5.48 a 21.47 mg EAG/100 mL, el valor más elevado se encontró bajo las condiciones experimentales de  $X_1= 4.9$  g /100 mL,  $X_2= 82$  °C y  $X_3= 291$  min. En el caso de la CAOX, los valores para DPPH• fueron más elevados que para FRAP, además, en este último se encontró un amplio rango en la respuesta entre cada tratamiento. Los valores encontrados fueron de 0.18 a 28.03 mg ET/100 mL para DPPH• y 2.98 a 105.80 mg ET/100 mL para el ensayo de FRAP. La respuesta máxima fue encontrada bajo las condiciones  $X_1= 4.9$  g /100 mL,  $X_2= 26$  °C y  $X_3= 969$  min para ambos ensayos.

Los datos experimentales obtenidos se ajustaron a una ecuación de segundo orden usando un análisis de regresión múltiple. Los modelos ajustados se muestran en las ecuaciones 1, 2 y 3 para CFT, DPPH• y FRAP, respectivamente. Los valores positivos indican que esos factores aumentan las respuestas, mientras que los valores negativos la disminuyen (Martins *et al.*, 2013).

El efecto de  $X_3$  muestra valores positivos, lo que indica que un aumento de este factor puede promover el incremento de los valores de CFT y CAOX en FRAP. Los coeficientes negativos en algunas de las interacciones entre factores y de los efectos cuadráticos, pueden mostrar la reducción de las variables respuesta.



**Ecuación 1:**

$$\text{CFT} = 11.75 - 1.17X_1 - 1.07X_2 + 1.03X_3 + 2.13X_1X_2 - 1.02X_1X_3 - 0.70X_2X_3 + 0.52X_1^2 + 0.19X_2^2 + 0.68X_3^2$$

**Ecuación 2:**

$$\text{DPPH} = 7.72 + 2.06X_1 + 0.79X_2 - 4.71X_3 - 1.34X_1X_2 - 170.73X_1X_3 - 167.79X_2X_3 - 0.81X_1^2 - 1.21X_2^2 + 3.83X_3^2$$

**Ecuación 3:**

$$\text{FRAP} = 11.22 - 14.75X_1 + 8.55X_2 + 5.50X_3 + 2.36X_1X_2 - 1.42X_1X_3 + 2.25X_2X_3 + 2.25X_1^2 + 2.36X_2^2 - 0.45X_3^2$$

Con el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) se mide la aptitud de los modelos desarrollados. Es decir,  $R^2$ , es definida como la relación de la variación que explica la variación total, además mide el grado de ajuste del modelo (Nath y Chattopadhyay, 2007). Un valor pequeño de  $R^2$  indica que las variables no tienen relevancia en la respuesta, los valores son explicados correctamente cuando los datos se ajustan a una  $R^2$  que se aproxime a uno (Sin *et al.*, 2006). Las  $R^2$  de las ecuaciones 1, 2, y 3 fueron 0.97, 0.94 y 0.98 para CFT, DPPH• y FRAP, respectivamente. Esto indica que más del 90% de la variación total de CF y la CAOx es atribuible a los factores experimentales estudiados. Además, en las variables estudiadas el modelo fue significativo ( $p \leq 0.05$ ).

La Figura 3 muestra la superficie de respuesta del efecto combinado de la cantidad de materia prima con la temperatura (A) el efecto de la cantidad de materia prima con el tiempo (B) el efecto de la combinación de la temperatura y el tiempo (C) sobre el CFT (manteniendo la tercera variable en un valor determinado). El efecto significativo del tiempo puede observarse en la Figura 3 B y C. El coeficiente positivo para este factor indicó que el CFT se incrementa con el aumento del tiempo alcanzando el máximo de concentración a los 1200 minutos (24 h). Por otro lado, puede observarse que en temperaturas menores a

40 °C existe también un alto CFT (Fig. 3 A y B). Varios autores han reportado que entre los 70 y 90°C puede comenzar a haber pérdidas de los CF de jamaica (Domínguez-López *et al.*, 2008; Patras *et al.*, 2009; Rhim, 2002).

Por otro lado, en la figura 4 A, B y C se observan las interacciones entre los factores con respecto a la CAOX por DPPH•. En este caso (Figura 4 B y C), se muestra que en tiempos menores se tiene una mayor respuesta, y un comportamiento de los factores similar con respecto al CFT. Además, se puede percibir que la mejor respuesta respecto a la CAOX se encuentra entre 14 y 20 g de materia prima y de 20 a 60 °C (Figura 4A).

La CAOX por el método de FRAP muestra una tendencia similar a la encontrada por el ensayo de DPPH•, se observa que en tiempos de extracción menores se obtiene una mayor CAOX (Figura 5 B y C). Además, en la interacción entre la cantidad de materia prima y la temperatura, se puede observar una gráfica parecida a la presentada por los mismos factores en el ensayo de DPPH•. Sin embargo, los valores en los que se encuentran los puntos máximos de CAOX difieren levemente pues estos se encuentran entre 0 y 10 g a los 40 °C. Ramirez-Rodrigues *et al.* (2011) reportaron que al utilizar altas temperaturas (90°C) y tiempos prolongados de extracción ( $\geq 240$  min) en cálices de jamaica existe una degradación de CF. Algunos autores han reportado que las temperaturas altas en la extracción pueden mejorar la solubilidad de los CF, no obstante, un proceso de este tipo puede causar la degradación de los compuestos antioxidantes y en consecuencia mostrar una baja CAOX (Pinelo *et al.*, 2005; Ramirez-Rodrigues *et al.*, 2011; Spigno y De Faveri, 2007).

**Cuadro 6.** Valores experimentales de CFT (mg EAG/ mL) y CAOX (mg ET/ mL) de la bebida optimizada de jamaica.

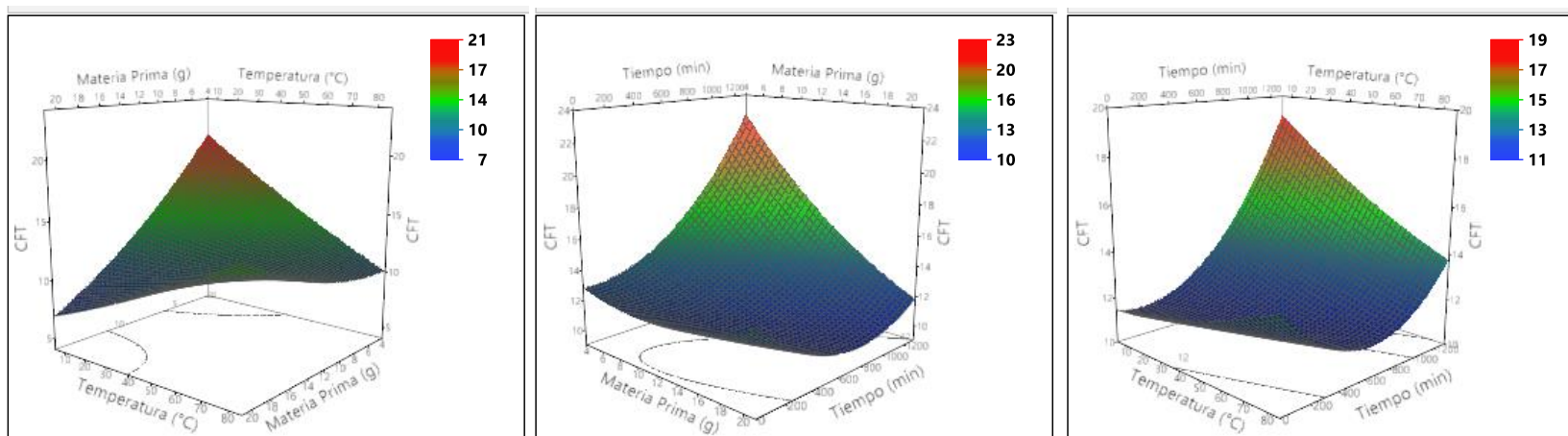
Corrida Experimental	Variables Codificadas			Valores Experimentales <sup>a</sup>		
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	CFT <sup>1</sup>	DPPH• <sup>2</sup>	FRAP <sup>2</sup>
1	-1	-1	-1	14.80	25.95	61.91
2	1	-1	-1	10.23	19.81	50.58
3	-1	1	-1	21.47	11.37	68.76
4	1	1	-1	13.77	0.52	15.14
5	-1	-1	1	16.08	28.03	105.80
6	1	-1	1	11.66	4.50	37.46
7	-1	1	1	12.48	7.83	15.74
8	1	1	1	12.36	1.62	35.91
9	-1.682	0	0	5.48	0.18	12.62
10	1.682	0	0	11.21	8.93	20.69
11	0	-1.682	0	14.15	2.94	2.98
12	0	1.682	0	16.43	5.76	72.20
13	0	0	-1.682	11.94	18.88	53.46
14	0	0	1.682	15.51	18.19	51.35
15	0	0	0	8.73	10.68	36.42
16	0	0	0	12.10	9.34	23.79
17	0	0	0	13.19	5.55	20.96
18	0	0	0	11.08	5.68	22.34
19	0	0	0	15.58	7.25	15.62
20	0	0	0	12.18	22.37	50.52

<sup>a</sup>Los valores mostrados son el promedio de tres repeticiones.

A

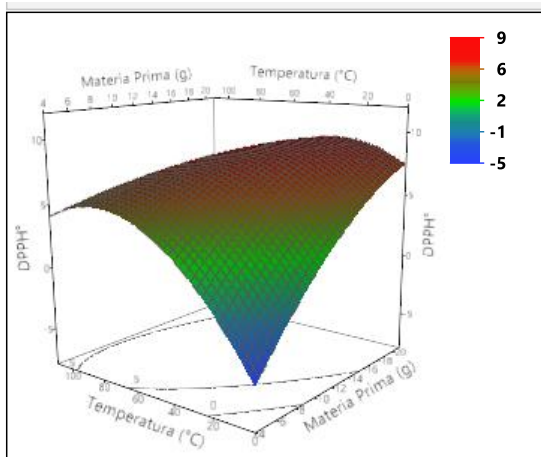
B

C

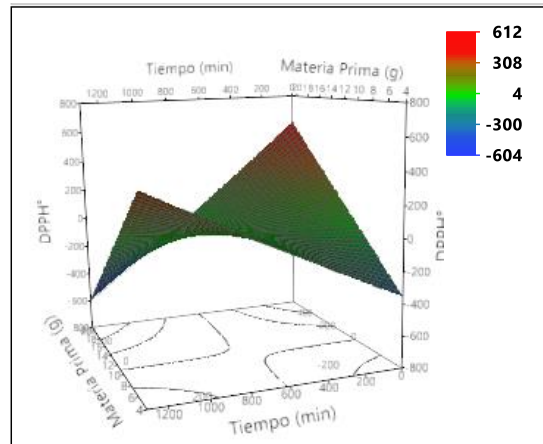


**Figura 3.** Gráficos de superficie de respuesta: A) efecto combinado de la cantidad de materia prima con la temperatura, B) efecto de la cantidad de materia prima con el tiempo y C) efecto de la combinación de la temperatura y el tiempo sobre el CFT de extractos de jamaica.

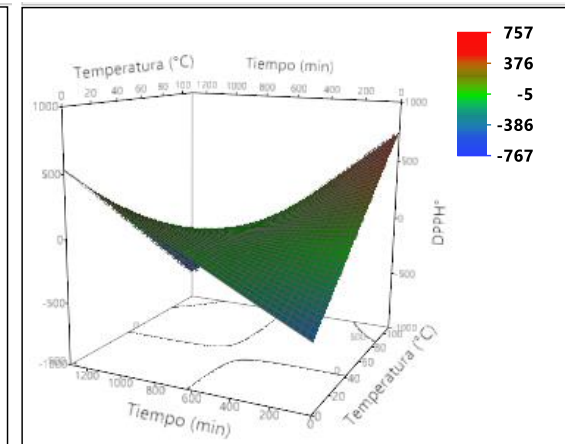
A



B

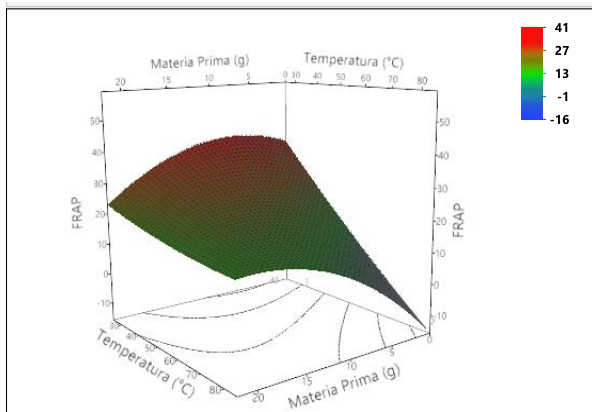


C

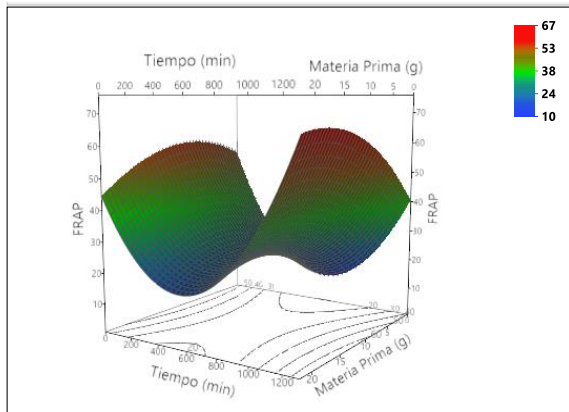


**Figura 4.** Gráficos de superficie de respuesta: A) efecto combinado de la cantidad de materia prima con la temperatura, B) efecto de la cantidad de materia prima con el tiempo y C) efecto de la combinación de la temperatura y el tiempo sobre la CAOX de extractos de jamaica evaluados por el método de DPPH•.

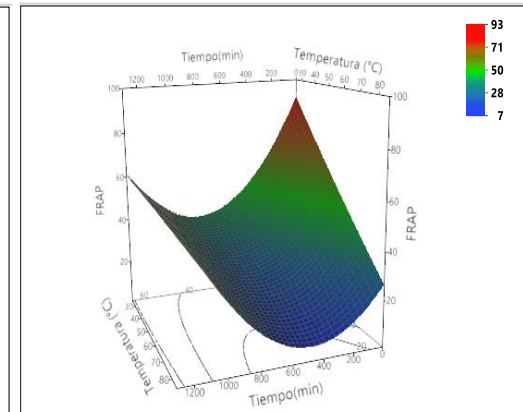
A



B



C



**Figura 5.** Gráficos de superficie de respuesta: A) efecto combinado de la cantidad de materia prima con la temperatura, B) efecto de la cantidad de materia prima con el tiempo y C) efecto de la combinación de la temperatura y el tiempo sobre la CAOX de extractos de jamaica evaluados por el método de FRAP.

El Cuadro 7 muestra los valores experimentales de la MSR obtenidos en la optimización de la extracción de CF y CAOX del té verde. Los valores de CFT variaron entre 2.13 y 66.77 mg EAG/100 mL, el valor más alto se encontró bajo las condiciones experimentales  $X_1= 4.9$  g/100mL,  $X_2=26$  °C and  $X_3= 969$  min. En la CAOX se encontraron rangos similares en los valores para los dos ensayos. En DPPH• los valores encontrados oscilaron entre 6.92 y 143.42 mg ET/100 mL, mientras que en FRAP fueron de 0.77 a 236.32 mg ET/100 mL, en ambos se encontró un amplio rango entre valores. Los puntos máximos de CAOX fueron encontrados en  $X_1= 4.9$  g/100 mL,  $X_2=26$  °C and  $X_3= 969$  min y en FRAP  $X_1= 4.9$  g/100mL,  $X_2=26$  °C y  $X_3= 291$  min.

Las Ecuaciones 4, 5 y 6 representan los modelos ajustados de las variables CFT, DPPH• y FRAP, respectivamente. Igual que para los modelos de la optimización de la bebida de jamaica, los valores positivos indican que estos factores pueden incrementar la respuesta, en tanto que los negativos la disminuyen. Los efectos de los términos lineales ( $X_1$ ,  $X_2$  y  $X_3$ ) en CFT, DPPH• y FRAP tienen valores negativos, esto indica que una disminución en estos factores puede promover una reducción en las respuestas de las tres variables. De la misma forma, los coeficientes negativos de los términos cuadráticos ( $X_1^2$ ,  $X_2^2$  y  $X_3^2$ ) y de las interacciones entre los factores indican una posible reducción de los CFT y la CAOX por el método de DPPH•.

**Ecuación 4:**

$$\text{CFT} = 28.09 - 4.90X_1 - 2.84X_2 - 3.13X_3 + 10.60X_1X_2 - 9.25X_1X_3 - 11.07X_2X_3 + 6.54X_1^2 - 2.83X_2^2 - 1.69X_3^2$$

**Ecuación 5:**

$$\text{DPPH} = 127.74 - 0.25X_1 - 8.79X_2 - 12.17X_3 - 6.84X_1X_2 + 6.57X_1X_3 + 12.61X_2X_3 - 32.45X_1^2 - 28.27X_2^2 - 19.09X_3^2$$

### Ecuación 6:

$$\text{FRAP} = 6.46 - 55.54X_1 - 36.10X_2 - 31.58X_3 - 35.50X_1X_2 + 32.78X_1X_3 + 47.18X_2X_3 + 19.86X_1^2 + 22.04X_2^2 + 39.82X_3^2$$

La significancia de los modelos se justifica mediante el análisis ANOVA. Los términos de los modelos muestran un valor de  $p \leq 0.05$ , lo que se considera estadísticamente significativo y la falta de ajuste muestra valores de  $p \geq 0.05$ , lo cual indica que la contribución de los modelos es significativa. La precisión adecuada para los valores de CFT fue de 25.33 y de 38.98 y 51.92 para DPPH• y FRAP, respectivamente. La precisión adecuada es una medida de la relación estrecha de los coeficientes, un valor mayor a 4 generalmente implica una señal adecuada, y por lo tanto este modelo puede ser fácilmente utilizado (Garba y Rahim, 2014).

Por otro lado, sólo los efectos de los términos lineales de  $X_1$  y  $X_2$  en el CFT, el término cuadrático de  $X_1$  en DPPH• y los efectos lineales de  $X_1$ ,  $X_2$  y el término cuadrático de  $X_3$  en FRAP fueron significativos ( $p \leq 0.05$ ). Sin embargo, pueden observarse interacciones leves entre los factores estudiados a pesar de que estos no son significativos ( $p \geq 0.05$ ). En infusiones de otro tipo de plantas se ha informado de interacciones significativas entre las temperaturas y tiempos de extracción de CF (Wong *et al.*, 2003). Además, se ha reportado la extracción de CF en *Rubuscoreanus* Miq., en la cual la temperatura y el tiempo utilizados también juegan un rol importante en la concentración de estos compuestos en las infusiones (Ku y Mun, 2008).

La Figura 6 muestra la superficie de respuesta de los efectos en la combinación entre factores. Los comportamientos son similares a los encontrados en la optimización de la bebida de jamaica. El tiempo presenta un rol importante, pues a medida que este incrementa, aumentará también la respuesta en el CFT



(Figura 6 B y C). De igual manera, la Figura 6 A y B, muestran que en temperaturas menores a 40 °C existe también un alto CFT. Como se mencionó antes, en temperaturas altas existe degradación de algunos compuestos antioxidantes. Por lo tanto, es evidente que el uso de las condiciones óptimas es necesario para obtener el máximo rendimiento de los CF de ambas matrices.

La respuesta en la CAOX por el método de DPPH• se encuentra en la Figura 7 A, B y C. En ellas puede observarse que en los valores medios de cada uno de los factores se encuentra la máxima respuesta a la CAOX. Es decir, entre 10 y 15 g de materia prima ( $X_1$ ), 40 y 80 °C ( $X_2$ ) y de 400 a 800 min ( $X_3$ ). Por otro lado, en los gráficos de la CAOX por FRAP (fig. 8 A, B y C) se observa que con bajas cantidades de materia prima se encuentran los valores más altos en la respuesta, además, los tiempos y temperaturas en rangos bajos también muestran valores de CAOX altos (Figura 8 C). Después de tratamientos térmicos pueden presentarse pérdidas en la CAOX en algunas muestras de plantas, sólo aquellas que contengan antioxidantes termoestables podrían ser adecuadas para la extracción de estos compuestos en temperaturas elevadas y tiempos prolongados (Chan *et al.*, 2009; Thoo *et al.*, 2010).

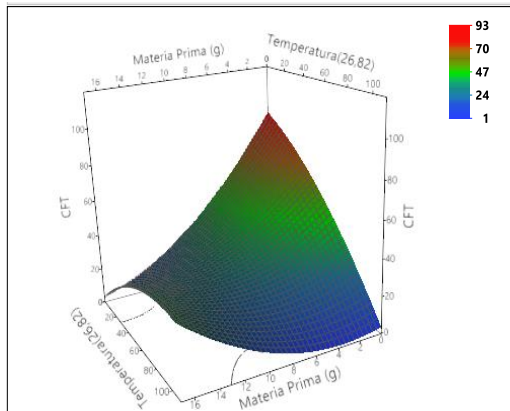
La cantidad de materia prima en jamaica tuvo un efecto significativo y coeficientes positivos en los ensayos de CAOX, lo cual significa que a medida que incrementa la cantidad de jamaica, aumentan los valores en la respuesta. Caso contrario del té verde donde puede observarse que en menores concentraciones, existen valores máximos a las variables respuesta evaluadas.

**Cuadro 7.** Valores experimentales de CFT (mg EAG/mL) y CAOX (mg ET/mL) de la bebida optimizada de té verde.

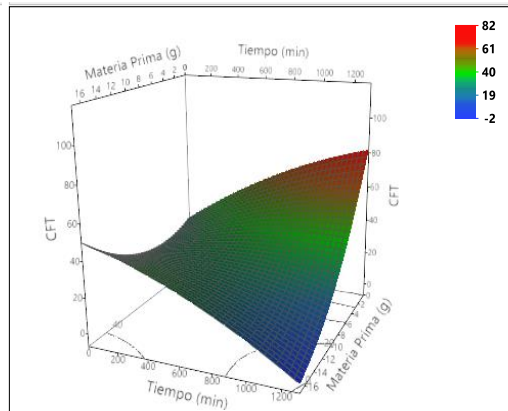
Corrida Experimental	Variables Codificadas			Valores Experimentales <sup>a</sup>		
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	CFT <sup>1</sup>	DPPH• <sup>2</sup>	FRAP <sup>2</sup>
1	-1	-1	-1	33.02	93.81	236.32
2	1	-1	-1	24.89	79.11	188.08
3	-1	1	-1	32.48	75.52	198.06
4	1	1	-1	2.13	6.92	0.82
5	-1	-1	1	66.77	143.42	14.14
6	1	-1	1	11.34	21.68	3.51
7	-1	1	1	11.76	42.54	71.89
8	1	1	1	9.14	27.58	12.69
9	-1.682	0	0	53.73	13.13	180.62
10	1.682	0	0	8.12	59.40	0.77
11	0	-1.682	0	23.21	70.77	153.52
12	0	1.682	0	15.79	28.47	7.51
13	0	0	-1.682	20.56	75.24	133.75
14	0	0	1.682	24.49	72.32	130.82
15	0	0	0	20.44	48.81	107.54
16	0	0	0	24.24	110.89	4.83
17	0	0	0	36.76	133.22	6.61
18	0	0	0	35.99	130.50	7.52
19	0	0	0	26.71	131.55	6.61
20	0	0	0	25.19	133.22	7.47

<sup>a</sup>Los valores mostrados son el promedio de tres repeticiones.

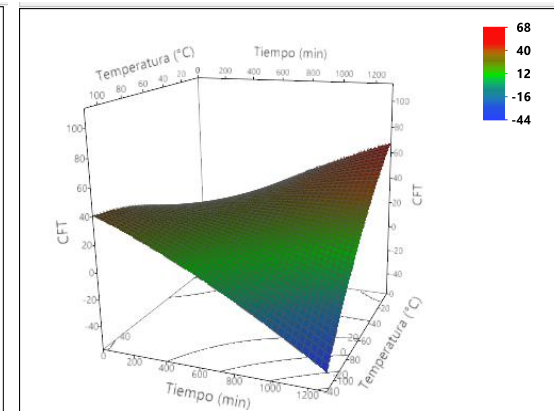
A



B

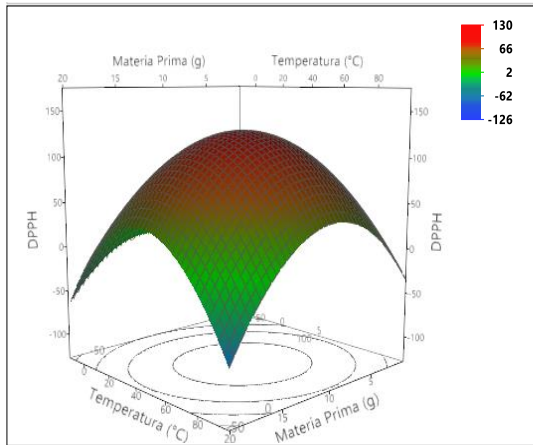


C

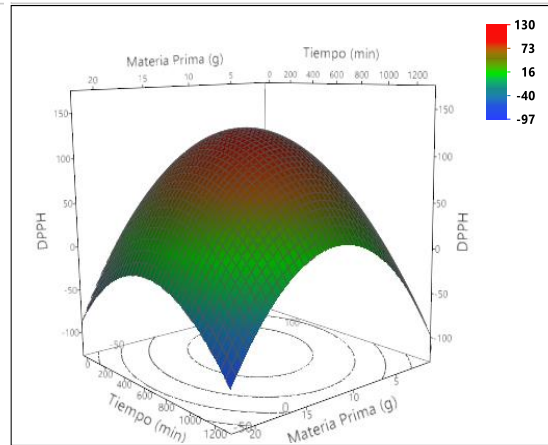


**Figura 6.** Gráficos de superficie de respuesta: A) efecto combinado de la cantidad de materia prima con la temperatura, B) efecto de la cantidad de materia prima con el tiempo y C) efecto de la combinación de la temperatura y el tiempo sobre el CFT en extractos de té verde.

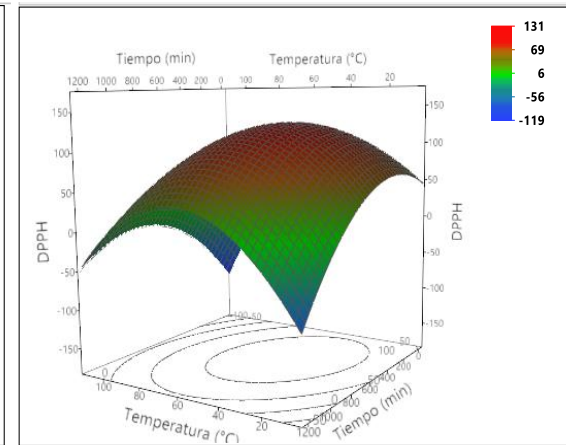
A



B

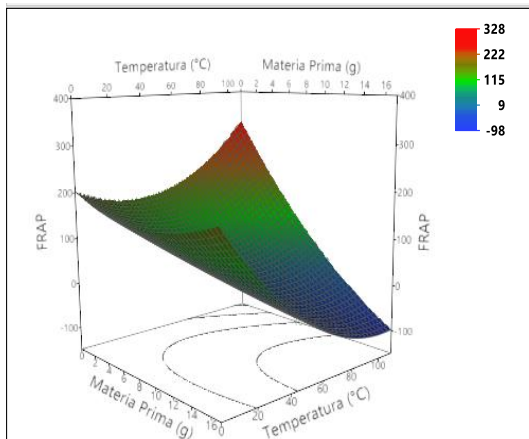


C

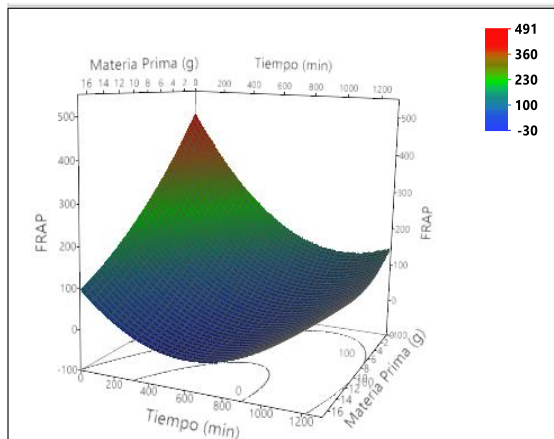


**Figura 7.** Gráficos de superficie de respuesta: A) efecto combinado de la cantidad de materia prima con la temperatura, B) efecto de la cantidad de materia prima con el tiempo y C) efecto de la combinación de la temperatura y el tiempo sobre la CAOX de extractos de té verde evaluados por el método de DPPH•.

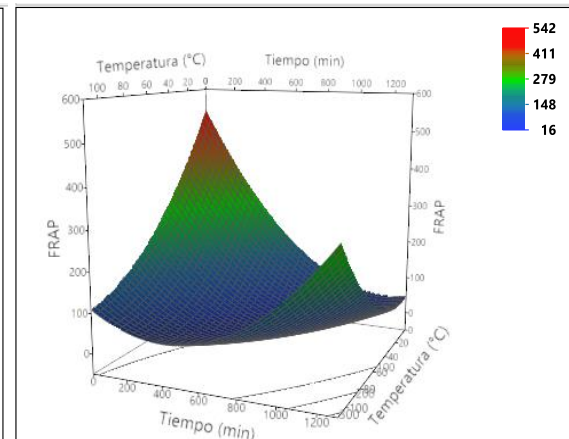
A



B



C



**Figura 8.** Gráficos de superficie de respuesta: A) efecto combinado de la cantidad de materia prima con la temperatura, B) efecto de la cantidad de materia prima con el tiempo y C) efecto de la combinación de la temperatura y el tiempo sobre la CAOX de extractos de té verde evaluados por el método de FRAP.

En general, se ha reportado que altas concentraciones de cálices de jamaica u hojas de té verde, pueden modificar el sabor en infusiones de estos ingredientes. Lo anterior, debido a que los CF presentes en estas matrices, se ha reportado que los ácidos orgánicos de la jamaica causan un sabor amargo (Wong *et al.*, 2003), mientras que las catequinas del té verde le confieren sabor amargo y astringente (pH ácidos) (Narukawa *et al.*, 2010; Scharbert y Hofmann, 2005; Yu *et al.*, 2014). Por ello, es importante corroborar la cantidad del ingrediente usado en la formulación de nuevas bebidas funcionales, ya que el desarrollo de estas no sólo depende del total de compuestos bioactivos, sino de que tengan también un sabor agradable para los consumidores.

### VII.3. Optimización Simultánea del Contenido de Fenoles Totales y Capacidad Antioxidante y Validación del Modelo para Jamaica y Té Verde

Al optimizar más de una variable de respuesta, su optimización independiente puede llevar a resultados contradictorios, ya que la mejoría en una respuesta puede tener el efecto contrario en otra. La función “deseabilidad”, es uno de los métodos más utilizados para optimizar variables respuesta de forma simultánea (Derringer, 1994). Los niveles óptimos para el CFT y CAOX por DPPH• y FRAP para la optimización de las bebidas de jamaica y té verde se determinaron utilizando la función deseabilidad. Los modelos polinomiales de segundo orden obtenidos para cada respuesta fueron utilizados con el fin de determinar las condiciones óptimas que maximizan la concentración de CF y la CAOX de las bebidas.

La optimización simultanea se aplicó para los rangos seleccionados de cantidad de materia prima ( $X_1= 1-20$  g/100 mL), temperatura ( $X_2= 7 - 100$  °C) y tiempo

( $X_3= 60 - 1200$  min). Los resultados de la optimización simultánea indicaron que los niveles de las condiciones optimizadas fueron  $X_1= 4.9$  g/100 mL,  $X_2= 26$  °C y  $X_3= 291$  min, para ambas materias primas. En jamaica, las respuestas predichas fueron 14.78 mg EAG/ 100 mL, 24.69 mg ET/ 100 mL y 55.06 mg ET/ 100 mL para CFT, DPPH• y FRAP, respectivamente. Mientras que para la optimización de té verde las respuestas de predicción del modelo para CFT fue de 31.23 mg EAG/ 100 mL y para DPPH• y FRAP de 86.69 mg ET/ 100 mL y 242.97mg ET/ 100 mL (Cuadro 8).

Con el fin de comprobar los resultados de predicción obtenidos en los modelos y de acuerdo con los resultados de optimización obtenidos a partir de MSR con la función deseabilidad, se llevaron a cabo pruebas de validación en los niveles óptimos encontrados para cada una de las variables. Los valores de predicción y los resultados experimentales de CFT, DPPH• y FRAP en jamaica y té verde.

**Cuadro 8.** Valores de predicción y experimentales para CFT (mg EAG/ mL), DPPH y FRAP (mg ET/ mL).

Materia Prima	Variables Respuesta					
	CFT		DPPH•		FRAP	
	V.P.	V.E.	V.P.	V.E.	V.P.	V.E.
<b>Jamaica</b>	14.78	14.80±1.41	24.69	61.91±0.76*	55.06	25.95±0.63*
<b>Té Verde</b>	31.23	33.02±0.34	86.69	93.81±0.04	242.97	236.30±14.70

V.P.= Valor de predicción. V.E.= Valor experimental. Los valores experimentales se muestran en medias±DE. Resultados de experimentos por triplicado. \*Diferencias estadísticamente significativas.

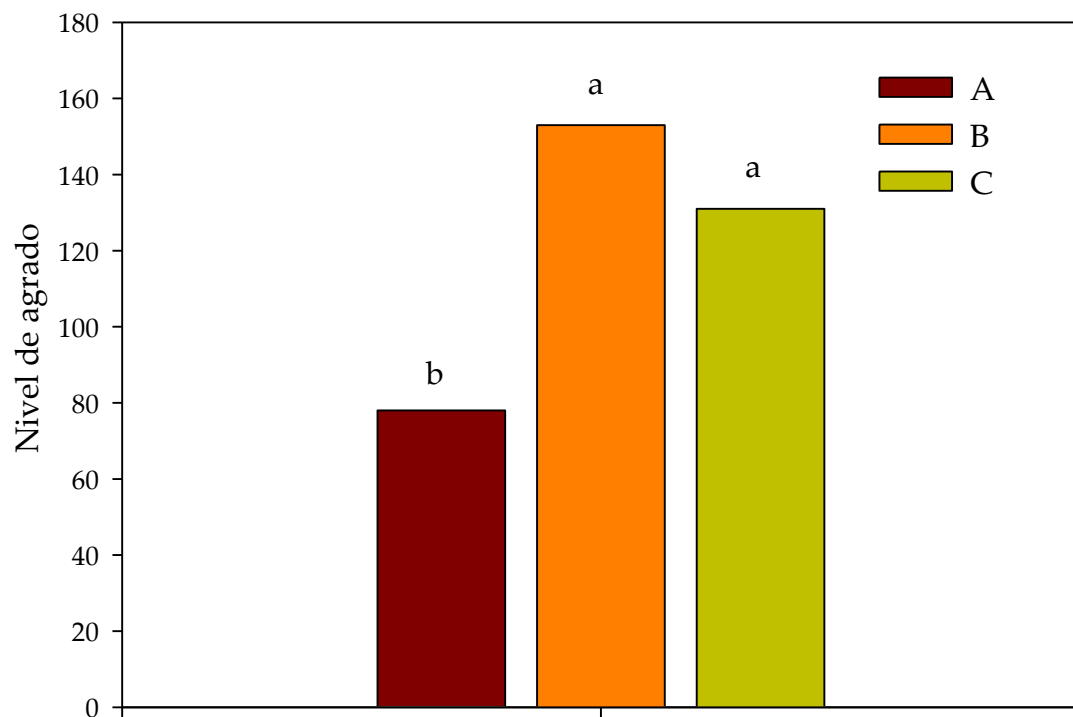


#### VII.4. Formulación y Evaluación Sensorial de la Bebida Funcional a Base de Extractos Optimizados de Jamaica y Té Verde

Dentro de esta primera etapa los panelistas evaluaron y ordenaron de menor a mayor su preferencia por las tres formulaciones antes descritas. El análisis por diferencias entre rangos fue estadísticamente diferente entre cada una. Se observó que la formulación B mostró mayor preferencia que las demás, sin embargo, no se obtuvieron diferencias significativas entre ésta y la formulación C.

Por otro lado, la formulación A fue la que mostró menor preferencia entre los consumidores, debido a que el sabor predominante era el té verde, lo que los consumidores percibieron como un sabor desagradable y con alta astringencia ( $p \leq 0.05$ ) (Figura 9). Se ha reportado que las catequinas no sólo presentan el astringencia al consumir té, sino que además pueden contribuir con el sabor amargo debido a su contribución como intensificadores del sabor de la cafeína, compuesto que también ha sido identificado en té verde (Narukawa *et al.*, 2010; Scharbert *et al.*, 2005). Por tanto, la aceptabilidad de bebidas con alto contenido de té verde, como en el caso de la formulación A, puede verse afectada. Narukawa *et al.* (2010) reportan que la epicatequina contenida en las hojas de té verde puede mostrar un sabor muy fuerte, astringente y desagradable en comparación con otras catequinas presentes en esta materia prima.

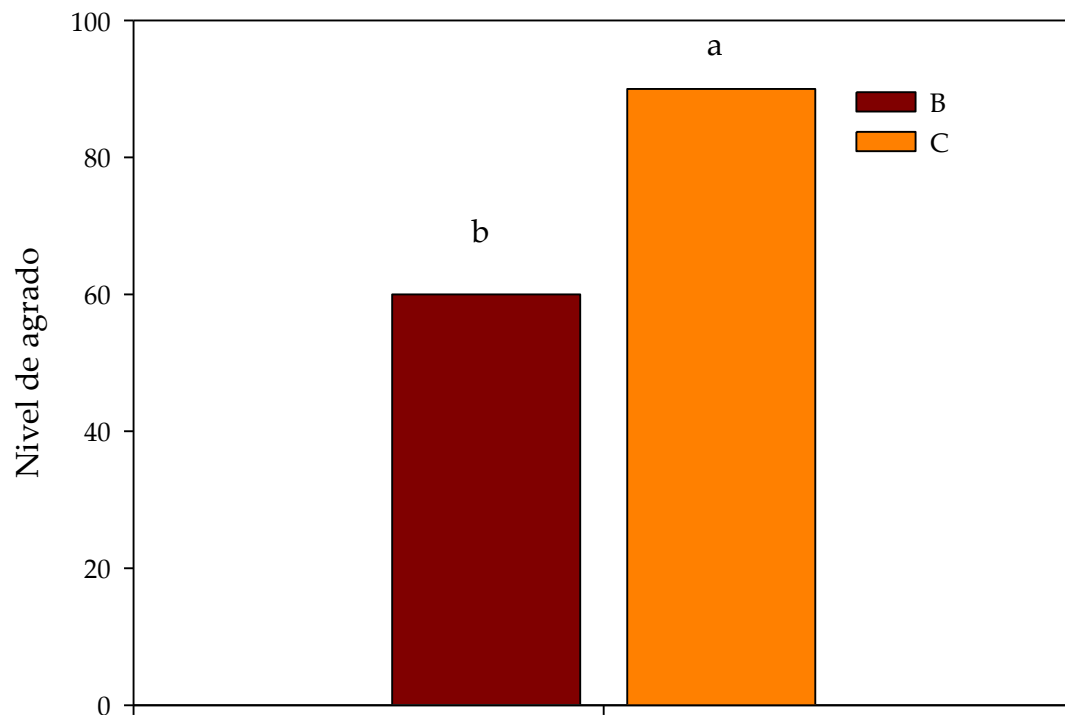
Derivado de los resultados de esta primera etapa, se realizó una segunda sesión de evaluación sensorial, en la que se determinó la preferencia entre las formulaciones B y C.



**Figura 9.** Diferencias absolutas entre rangos por formulación. A) jamaica y té verde (30:70 v/v); B) jamaica y té verde (50:50 v/v); C) jamaica y té verde (70:30 v/v). Literales diferentes muestran diferencias significativas entre rangos ( $p \leq 0.05$ ).

En la segunda etapa de la evaluación se llevó a cabo la misma prueba de preferencia, en este caso con las formulaciones B y C, para poder obtener la BF final. La jamaica tiene un sabor ácido característico, el cual anteriormente se ha correlacionado con su contenido de antocianinas (Bechoff *et al.*, 2014), algunos de los panelistas percibieron dicho sabor en las formulaciones B y C. Los resultados obtenidos mostraron que la formulación C (jamaica y té verde 70:30 v/v) fue la que tuvo mejor aceptación por el panel de consumidores.

La formulación C presentó los mejores comentarios por parte de los panelistas, sin embargo, algunos distinguieron un sabor ligeramente ácido y en ocasiones un poco amargo. Algunos autores han reportado que bebidas elaboradas con frutos con alto contenido de CF, como zarzamora y arándanos, suelen presentar sabores amargos, astringentes y ácidos, asociados al contenido de dichas sustancias (Jaeger *et al.*, 2009; Lawless *et al.*, 2012). Finalmente, el resultado del análisis por diferencias de rango mostró diferencias significativas entre las dos formulaciones evaluadas en la segunda etapa, por lo que se seleccionó la formulación C como la BF antioxidante para continuar con la última etapa del trabajo de tesis (Figura 10).



**Figura 10.** Diferencias absolutas entre rangos por formulación. B) jamaica y té verde (50:50 v/v); C) jamaica y té verde (70:30 v/v). Literales diferentes muestran diferencias significativas entre rangos ( $p \leq 0.05$ ).

## VII.5. Digestión *in vitro*: Cinética de Liberación de Compuestos Fenólicos y Capacidad Antioxidante de la Bebida Funcional

En esta etapa del trabajo se evaluaron la CFT y la CAOX (Cuadro 9) y el perfil y cuantificación de dichos compuestos (Cuadro 10) de la BF elegida durante la evaluación sensorial antes y después de un proceso de digestión *in vitro*. Como ya se ha mencionado los CF han demostrado tener efectos benéficos en la prevención y tratamiento de algunas enfermedades, sin embargo, estos pueden verse afectados por diversos factores, no obstante, la información al respecto ha sido escasamente reportada.

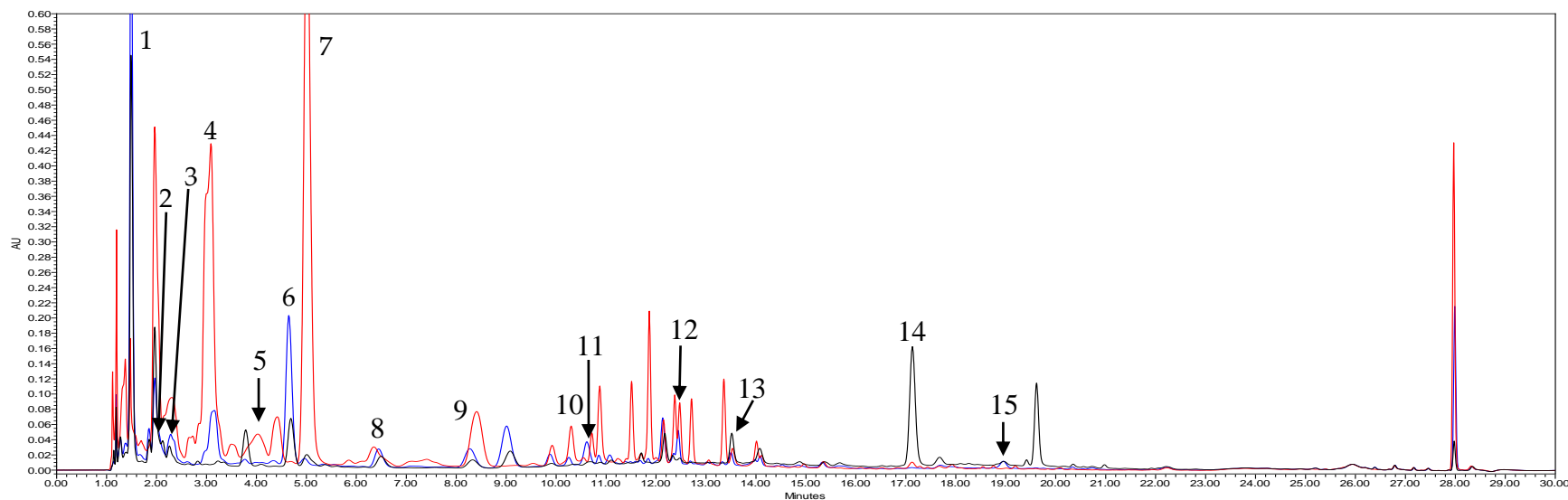
Durante el desarrollo de nuevos alimentos funcionales, es importante evaluar y cuantificar la proporción de los compuestos bioactivos que son ingeridos y se encuentran disponibles para su uso en el organismo (Wootton-Beard *et al.*, 2011). Algunos estudios han reportado el contenido de compuestos bioactivos en jugos de fruta, sin embargo, la información relacionada con el contenido de la bioaccesibilidad de dichos compuestos es escasa en la mayoría de estos (Rodríguez-Roque *et al.*, 2015).

La BF elegida en el proceso de evaluación sensorial mostró mayor CFT y CAOX con respecto a los extractos optimizados de jamaica y té verde (Cuadro 9). Con excepción de la CAOX por FRAP en el extracto individual de té verde el cual muestra  $236.30 \pm 14.70$  mg ET, esto podría ser debido a los CF identificados en esta bebida y el mecanismo de acción de este ensayo, antes mencionado.

**Cuadro 9.** CFT (mg EAG/ mL), flavonoides totales (mg EQ/mL) y CAOX (mg ET/mL) durante la cinética de digestión *in vitro* de la BF antioxidante.

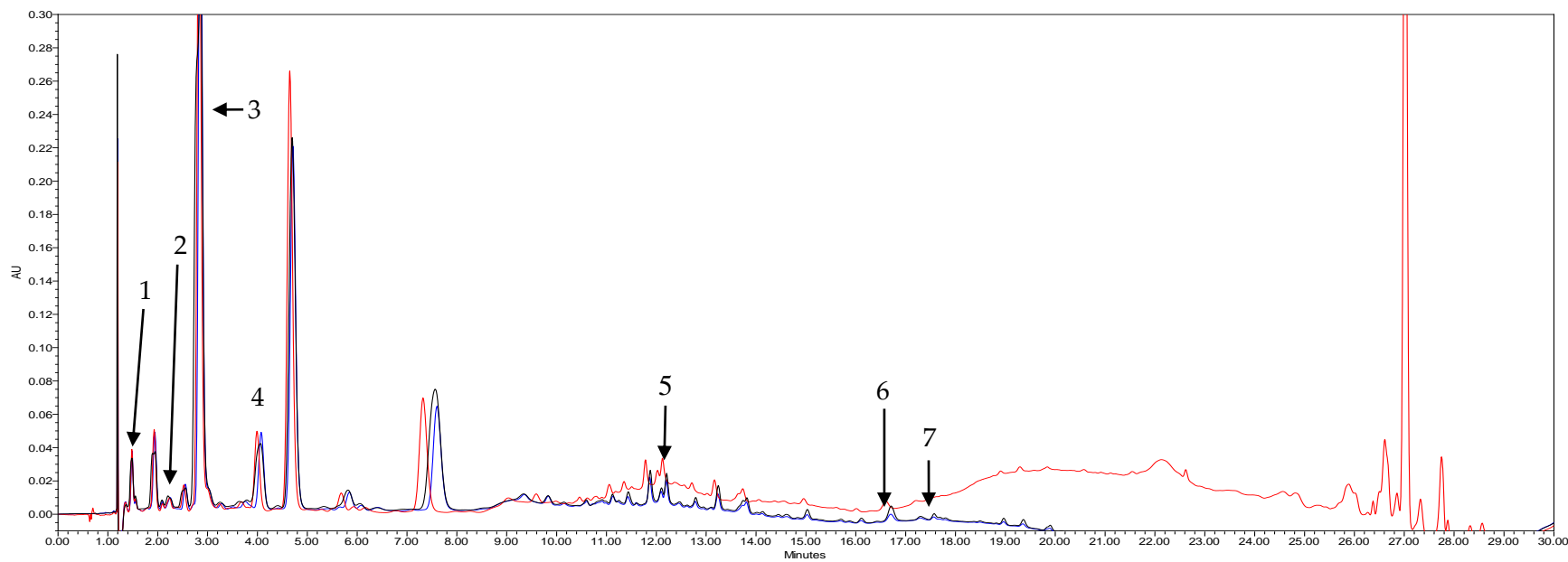
	Etapa								
	Bebida (no digerida)	Gástrica			Intestinal				Diálisis
		Inicial	40 min	60 min	Inicial	60 min	120 min	180 min	180 min
Fenoles Totales	34.07±0.71	14.60±1.9	13.09±1.4	12.15±1.1	87.33±1.6	2.63±0.1	4.12±0.20	6.33±0.43	1.62±0.1
		6	8	8	0	0			1
Flavonoides Totales	16.30±0.87	70.51±3.7	69.08±4.0	67.07±3.0	3.97±0.31	8.78±0.4	15.81±0.0	16.62±0.2	5.89±0.6
		5	4	5		0	4	5	6
DPPH•	175.33±6.1	51.18±1.1	52.18±0.2	50.52±0.2	27.32±0.2	5.44±0.2	6.52±1.36	8.79±0.41	3.40±0.1
	4	0	3	4	9	6			7
CAOX FRAP	169.74±4.4	40.02±3.0	48.67±2.2	47.42±4.1	27.93±0.3	4.56±0.0	9.29±0.95	8.87±0.24	1.47±0.0
	3	1	3	0	6	5			6

Los valores experimentales se muestran en medias ± DE. Resultados de experimentos por triplicado



**Figura 11.** Perfil de CF identificados por UPLC-DAD en la bebida funcional antioxidante. Los picos están enumerados de acuerdo a su tiempo de retención: (1) ácido gálico, (2) ácido protocatéico, (3) catequina, (4) ácido clorogénico, (5) epicatequina, (6) ácido caféico, (7) ácido vanílico, (8) ácido siríngico, (9) ácido *p*-cumárico, (10) ácido ferúlico, (11) ácido elágico, (12) rutina, (13) miricetina, (14) quercetina, (15) kaempferol.

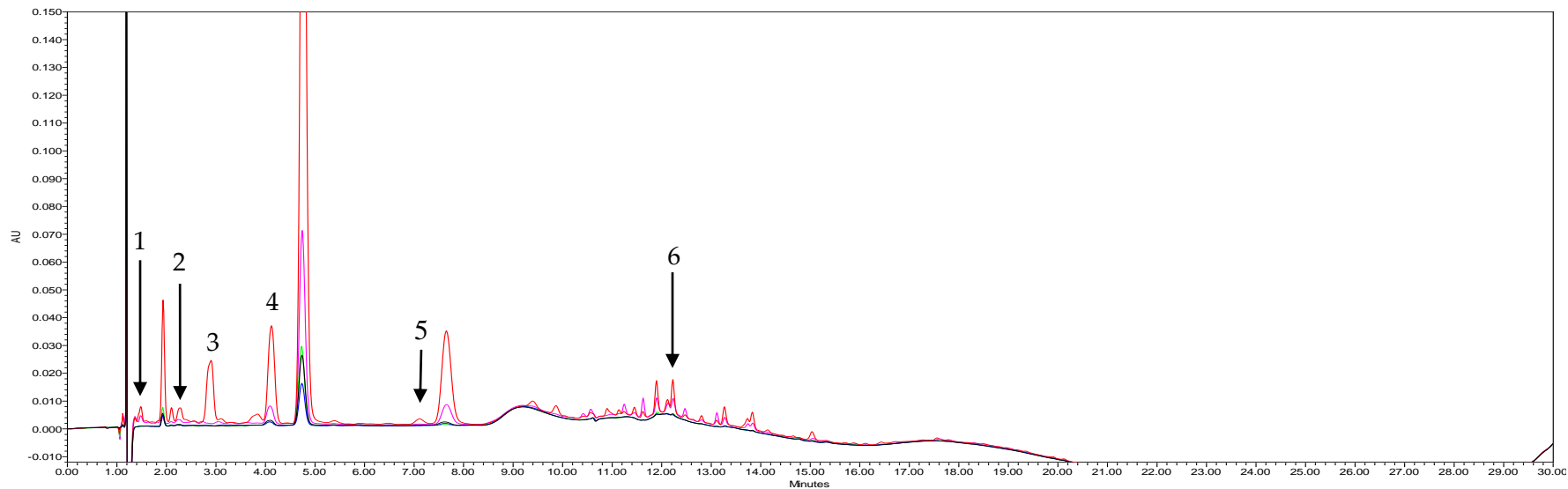
- CF de la fracción libre
- CF de la fracción alcalina
- CF de la fracción ácida.



**Figura 12.** Perfil de CF identificados por UPLC-DAD en la bebida funcional antioxidante durante la etapa gástrica del proceso de digestión *in vitro*. Los picos están enumerados de acuerdo a su tiempo de retención: (1) ácido gálico, (2) catequina, (3) ácido clorogénico, (4) epicatequina, (5) rutina, (6) quercetina, (7) kaempferol.

- CF del tiempo inicial (T0G)
- CF después de 40 minutos en etapa gástrica (T40)
- CF del tiempo final (TFG)





**Figura 13.** Perfil de CF identificados por UPLC-DAD en la bebida funcional antioxidante durante la etapa intestinal dializada del proceso de digestión *in vitro*. Los picos están enumerados de acuerdo a su tiempo de retención: (1) ácido gálico, (2) catequina, (3) ácido clorogénico, (4) epicatequina, (5) ácido caféico, (6) rutina.

- CF del tiempo inicial (T0I)
- CF después de 60 minutos en etapa intestinal (T60)
- CF después de 120 minutos en etapa intestinal (T120)
- CF del tiempo final (TFI)
- CF del interior de la membrana de la diálisis (TFD)

Durante el proceso de digestión *in vitro* se pudieron observar pérdidas significativas en la concentración de CF. Dichas pérdidas pueden ser debido al uso de la membrana de diálisis, que podría haber dificultado el proceso de traspaso de los CF (Bermúdez-Soto *et al.*, 2007). La cuantificación de los CF, podría verse afectada por el volumen y naturaleza de la muestra, el buffer utilizado y la facilidad de las moléculas de traspasar la membrana. En el estudio de Bermúdez-Soto *et al.* (2007), se reporta una disminución de algunos CF encontrados en frutos rojos durante las dos fases de digestión; estos autores sugieren que puede ser debido a las posibles interacciones con otros compuestos presentes durante el proceso de digestión los cuales podrían alterar su estabilidad. Además, los CF pueden ser muy sensibles al medio alcalino del intestino, por lo que como ha sido mencionado antes, podrían ser transformados en otras estructuras químicas con otras propiedades.

Por otro lado, Wootton-Beard *et al.* (2011), quienes realizaron un proceso de digestión *in vitro* en jugos de diferentes frutas y vegetales, reportan un incremento en el contenido de CF después de las fases gástrica e intestinal. Estos cambios en la concentración de los compuestos bioactivos, también pueden ser atribuidos a algunas transformaciones estructurales mostradas a lo largo del tracto gastrointestinal debido a la simulación de digestión *in vitro* (Ryan y Prescott, 2010).

El contenido de flavonoides totales en la bebida no digerida fue de  $16.30 \pm 0.87$  mg EQ/mL, este resultado fue mayor durante la etapa gástrica donde se mantuvo estable, mientras que en la etapa intestinal tuvo valores similares a los iniciales (Cuadro 9). Durante la primera fase de la digestión *in vitro* las condiciones de pH ácido (1.5) pueden influir en la detección de mayores concentraciones de flavonoides, debido a la estabilidad que muestran dichos compuestos en este estado. Bouayed *et al.* (2011) sugieren que la mayoría de los

flavonoides se encuentran disponibles bajo las condiciones de la fase gástrica, sin embargo no todos ellos están disponibles para la absorción en las condiciones de una diálisis. Adicionalmente, se ha reportado que el cambio del medio gástrico (pH ácido), al medio intestinal (alcalino), así como las enzimas utilizadas en este tipo de ensayos, podrían causar una disminución en la concentración de CF y flavonoides (Bouayed *et al.*, 2011; Tagliazucchi *et al.*, 2010).

La CAOX disminuyó con el paso del tiempo al someter la BF a cada una de las fases (gástrica e intestinal), sin embargo, se mantuvo relativamente estable en cada una de ellas (Cuadro 9). Por los resultados obtenidos puede inferirse que los CF presentes en la BF, pueden ser inhibidos, transformados o disminuir su disponibilidad durante el proceso de digestión. Las alteraciones que pueden sufrir los antioxidantes durante dicho proceso pueden afectar las reacciones sobre el radical DPPH• provocando como resultado valores bajos en la CAOX (Wootton-Beard *et al.*, 2011).

Adicionalmente, se identificaron los compuestos mayoritarios presentes en la formulación de la BF antioxidante mediante UPLC-DAD. En dicho producto, y como era de esperarse, se han encontrado compuestos presentes en ambas materias primas. Se identificaron un total de 15 compuestos entre los que se encuentran los flavonoides catequina, epicatequina, rutina, miricetina, quercetina y kaempferol, además de los ácidos fenólicos gálico, protocatéico, clorogénico, vanílico, sirínico, *p*-cumárico, ferúlico y elágico (Figura 11). Entre estos, el compuesto mayoritario fue el ácido gálico con  $10.38 \pm 0.05$  mg/ mL, seguido de catequina y epicatequina con  $6.88 \pm 1.77$  y  $6.21 \pm 0.51$  mg / mL de BF, respectivamente. Con estos resultados se puede inferir que los compuestos encontrados en los extractos caracterizados de la materia prima (en la primera etapa), se mantienen en la BF.

Por otro lado, durante la digestión *in vitro* se cuantificaron cantidades menores de CF, la mayoría de ellos fueron ácidos fenólicos, además de miricetina. Esto puede ser debido a que la mayoría de los ácidos fenólicos se encuentran ligados a otros compuestos. Además de que los CF pueden no ser estables a las condiciones alcalinas del tracto digestivo. La BF, fue sometida a un proceso de extracción con hidrólisis alcalina y ácida, mientras que las muestras de digestión no se hidrolizaron.

De manera general, se ha reportado que la actividad antioxidante de bebidas con alto contenido de CF puede ser el resultado de efectos sinérgicos de los diferentes fitoquímicos encontrados en tejidos vegetales que son utilizados como ingredientes principales en estas formulaciones (Nanasombat *et al.*, 2015). Este sinergismo es propuesto debido a que la actividad antioxidante de las mezclas suele ser mayor que la suma de la actividad antioxidante de uno solo de los ingredientes (Blasa *et al.*, 2010). En este sentido, se sugiere que el hecho de que el CFT y la CAOX de la BF elaborada en este trabajo sea mayor a la de los valores de los extractos individuales, puede ser debido a este tipo de interacciones entre compuestos. Sin embargo, esto no puede afirmarse sin antes realizar algunos ensayos, por ejemplo, de CAOX con los CF encontrados en ella de manera individual y en combinación.

**Cuadro 10.** Cuantificación de CF (mg/mL) durante la cinética de digestión *in vitro* de la BF antioxidante.

Compuestos <sup>1</sup>	Bebida Funcional	Etapa							
		Gástrica			Intestinal				Diálisis 180 min
		Inicial	40 min	60 min	Inicial	60 min	120 min	180 min	
Ác. gálico	10.38±0.05	11.47±1.45	13.26±3.05	10.47±0.12	3.07±0.18	ND	ND	ND	1.70±0.04
Ác. protocateico	0.37±0.01	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Catequina	6.88±1.77	32.03±7.12	34.46±4.48	32.57±1.30	25.87±2.71	ND	ND	ND	4.16±1.18
Ác. clorogénico	0.64±0.04	6.16±0.89	7.44±1.01	5.23±0.17	ND	ND	ND	ND	2.05±0.30
Epicatequina	6.21±0.51	174.51±25.35	195.76±54.98	190.21±0.14	148.89±0.98	4.67±0.05	5.14±0.10	8.27±0.43	27.27±1.42
Ác. caféico	5.72±0.05	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.68±0.07
Ác. vanílico	0.05±0.00	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ác. siríngico	0.27±0.00	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ác. p- cumárico	4.76±2.77	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ác. ferúlico	0.98±0.43	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Rutina	0.76±0.07	8.79±1.08	10.27±3.16	8.60±0.04	5.35±0.90	ND	ND	ND	2.97±0.55
Miricetina	0.36±0.01	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Quercetina	1.54±0.01	3.46±0.41	15.21±17.28	5.07±0.10	ND	ND	ND	ND	ND
Kaempferol	0.48±0.09	1.39±0.08	1.36±0.25	1.60±0.06	ND	ND	ND	ND	ND

Los valores experimentales se muestran en medias±DE. Resultados de experimentos por triplicado.<sup>1</sup>mg/mL de BF. ND= No detectado.

## VIII. CONCLUSIONES

Con base en los resultados de este trabajo se puede concluir que la jamaica y el té verde son ingredientes con los cuales se pueden desarrollar alimentos y bebidas funcionales. En nuestro caso, se desarrolló una bebida funcional antioxidante a partir de la mezcla de extractos optimizados de dichos ingredientes.

Se utilizó la metodología de superficie de respuesta para la optimización de las condiciones de extracción para maximizar el contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de los extractos individuales de jamaica y té verde. Los parámetros recomendados para la extracción fueron 4.9 g de materia prima en 100 mL de agua, a una temperatura de 26 °C durante 291 min para ambos ingredientes. Por lo tanto, estas condiciones fueron utilizadas para realizar la extracción de compuestos fenólicos y formular la bebida funcional.

Posteriormente se realizó una evaluación sensorial la cual arrojó una buena aceptación de la mezcla de los extractos de jamaica y té verde en una proporción 70:30 v/v. Por lo que dicha formulación fue utilizada para llevar a cabo la etapa final del trabajo.

Con base a la caracterización de la materia prima, la optimización de las condiciones de extracción y la evaluación sensorial, se encontró que la bebida funcional antioxidante elaborada en este trabajo mostró un perfil variado de compuestos fenólicos (ácido gálico, protocatéico, clorogénico, caféico, vanílico, siríngico, *p*-cumárico, ferúlico, elágico, catequina, epicatequina, rutina, miricetina, quercetina y kaempferol) con una alta capacidad antioxidante.

Además, la mezcla de ambos extractos tuvo mayor contenido de fenoles totales y mejor capacidad antioxidante con respecto a los extractos individuales.

Por todo lo anterior, se puede decir que esta bebida funcional podría ser colocada a futuro en el mercado de los alimentos funcionales y de la misma forma, ser recomendado como apto para el cuidado de la salud de la población en general.

## IX. RECOMENDACIONES

Debido a que la bebida funcional se evaluó solamente de forma *in vitro* se recomienda realizar la evaluación *in vivo*, por ejemplo, mediante un ensayo clínico aleatorizado, en el que se incluyan sujetos humanos que consuman el producto y a los cuales se les puedan tomar muestras sanguíneas y de orina en las que se muestre la disponibilidad de los compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de los mismos, así como su distribución en el organismo durante la ingestión de la misma.

Por otro lado, en relación con los comentarios recibidos durante la evaluación sensorial, es recomendable realizar la optimización del nivel de dulzor que podría tener la bebida funcional para obtener así mejor aceptabilidad por los consumidores. Asimismo, sería interesante evaluar los atributos individuales del producto con la ayuda de un panel sensorial entrenado.

Por último, se recomienda también llevar a cabo estudios de vida de anaquel de la bebida funcional antioxidante, de esta manera se conocería la estabilidad de los compuestos presentes, bajo distintas condiciones y además determinar la caducidad del producto.



## X. REFERENCIAS

- Ahmad, R. S., Butt, M. S., Sultan, M. T., Mushtaq, Z., Ahmad, S., Dewanjee, S., De Feo, V., y Zia-Ul-Haq, M. (2015). Preventive role of green tea catechins from obesity and related disorders especially hypercholesterolemia and hyperglycemia. *Journal of translational medicine*, 13(1), 79.
- Al-salafe, R., Irshad, M., y Abdulghani, H. M. A. (2014). Does green tea help to fight against obesity? An overview of the epidemiological reports. *Austin Journal of Clinical Medicine*, 1(3), 11.
- Alarcon-Aguilar, F. J., Zamilpa, A., Perez-Garcia, M. D., Almanza-Perez, J. C., Romero-Nuñez, E., Campos-Sepulveda, E. A., Vazquez-Carrillo, L. I., y Roman-Ramos, R. (2007). Effect of Hibiscus sabdariffa on obesity in MSG mice. *Journal of ethnopharmacology*, 114(1), 66-71.
- Ananingsih, V. K., Sharma, A., y Zhou, W. (2013). Green tea catechins during food processing and storage: a review on stability and detection. *Food Research International*, 50(2), 469-479.
- Annunziata, A., y Vecchio, R. (2011). Functional foods development in the European market: A consumer perspective. *Journal of Functional Foods*, 3(3), 223-228.
- Anokwuru, C. P., Esiaba, I., Ajibaye, O., y Adesuyi, A. O. (2011). Polyphenolic content and antioxidant activity of *Hibiscus sabdariffa* calyx. *Research Journal of Medicinal Plants*, 5(5), 557-566.
- Ariza-Flores, R., Serrano-Altamirano, V., Navarro-Galindo, S., Ovando-Cruz, M. E., Vázquez-García, E., Barrios-Ayala, A., Michel-Aceves, A. C., Guzmán-

- Maldonado, S. H., y Otero-Sánchez, M. A. (2014). Variedades mexicanas de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) 'Alma Blanca' y 'Rosalíz' de color claro, y 'Cotzaltzin' y 'Tecoanapa' de color rojo. *Revista fitotecnia mexicana*, 37(2), 181-185.
- Ashwell, M. (2004). *Conceptos sobre los alimentos funcionales*: International Life Sciences Institute (ILSI) Europe.
- Barquera, S., Hernandez-Barrera, L., Tolentino, M. L., Espinosa, J., Ng, S. W., Rivera, J. A., y Popkin, B. M. (2008). Energy intake from beverages is increasing among Mexican adolescents and adults. *The Journal of nutrition*, 138(12), 2454-2461.
- Basu, A., Sanchez, K., Leyva, M. J., Wu, M., Betts, N. M., Aston, C. E., y Lyons, T. J. (2010). Green tea supplementation affects body weight, lipids, and lipid peroxidation in obese subjects with metabolic syndrome. *Journal of the American College of Nutrition*, 29(1), 31-40.
- Bechoff, A., Cissé, M., Fliedel, G., Declémy, A.-L., Ayessou, N., Akissoe, N., Touré, C., Bennett, B., Pintado, M., y Pallet, D. (2014). Relationships between anthocyanins and other compounds and sensory acceptability of Hibiscus drinks. *Food Chemistry*, 148, 112-119.
- Benzie, I. F., y Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical biochemistry*, 239(1), 70-76.
- Bermúdez-Soto, M. J., Tomás-Barberán, F. A., y García-Conesa, M. T. (2007). Stability of polyphenols in chokeberry (*Aronia melanocarpa*) subjected to *in vitro* gastric and pancreatic digestion. *Food Chemistry*, 102(3), 865-874.
- Bernabeu-Mestre, J., Esplugues-Pellicer, J. X., y Trescastro-López, E. M. (2014). *Evolución histórica de las estrategias alimentarias y sus condicionantes*. Alicante: Universidad de Alicante.

- Blasa, M., Gennari, L., Angelino, D., y Ninfali, P. (2010). Fruit and vegetable antioxidants in health. *Bioactive foods in promoting health: fruits and vegetables*, 37-58.
- Borrás-Linares, I., Fernández-Arroyo, S., Arráez-Roman, D., Palmeros-Suárez, P. A., Del Val-Díaz, R., Andrade-González, I., Fernández-Gutiérrez, A., Gómez-Leyva, J. F., y Segura-Carretero, A. (2015). Characterization of phenolic compounds, anthocyanidin, antioxidant and antimicrobial activity of 25 varieties of Mexican Roselle (*Hibiscus sabdariffa*). *Industrial Crops and Products*, 69, 385-394.
- Bouayed, J., Hoffmann, L., y Bohn, T. (2011). Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastrointestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake. *Food Chemistry*, 128(1), 14-21.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.-E., y Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Brayden, D. J., y Baird, A. W. (2013). Opportunities for drug-delivery research in nutraceuticals and functional foods? *Therapeutic delivery*, 4(3), 301-305.
- Brownie, S., y Coutts, R. (2013). Older Australians' perceptions and practices in relation to a healthy diet for old age: A qualitative study. *The Journal of Nutrition, Health and Aging*, 17(2), 125-129.
- Butt, M. S., Ahmad, R. S., Sultan, M. T., Qayyum, M. M., y Naz, A. (2015). Green tea and anticancer perspectives: Updates from last decade. *Critical reviews in food science and nutrition*, 55(6), 792-805.
- Camelo-Méndez, G. A., Ragazzo-Sánchez, J. A., Jimenez-Aparicio, A. R., Vanegas-Espinoza, P. E., Paredes-López, O., y Del Villar-Martínez, A. A. (2013). Comparative study of anthocyanin and volatile compounds

- content of four varieties of Mexican roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) by multivariable analysis. *Plant foods for human nutrition*, 68(3), 229-234.
- Carloni, P., Tiano, L., Padella, L., Bacchetti, T., Customu, C., Kay, A., y Damiani, E. (2013). Antioxidant activity of white, green and black tea obtained from the same tea cultivar. *Food Research International*, 53(2), 900-908.
- Castañeda, R., y Cáceres, A. (2014). Compuestos bioactivos y propiedades terapéuticas de los cálices de rosa de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Revista Científica*(26).
- Chan, E. W. C., Lim, Y. Y., Wong, S. K., Lim, K. K., Tan, S. P., Lianto, F. S., y Yong, M. Y. (2009). Effects of different drying methods on the antioxidant properties of leaves and tea of ginger species. *Food Chemistry*, 113(1), 166-172.
- Chandrasekara, A., y Shahidi, F. (2011). Determination of antioxidant activity in free and hydrolyzed fractions of millet grains and characterization of their phenolic profiles by HPLC-DAD-ESI-MS n. *Journal of Functional Foods*, 3(3), 144-158.
- D'Archivio, M., Filesi, C., Vari, R., Scazzocchio, B., y Masella, R. (2010). Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(4), 1321-1342.
- da Silva Pinto, M. (2013). Tea: A new perspective on health benefits. *Food Research International*, 53(2), 558-567.
- de Feria Cardet, F. J. (2011). *Caracterización de la composición fenólica y capacidad antioxidante del té (Camellia sinensis) en productos de diferentes marcas comercializadas en Chile*. (Escuela de pregrado), Universidad de Chile, Santiago de Chile.
- Dembitsky, V. M., Poovarodom, S., Leontowicz, H., Leontowicz, M., Vearasilp, S., Trakhtenberg, S., y Gorinstein, S. (2011). The multiple nutrition

- properties of some exotic fruits: Biological activity and active metabolites. *Food Research International*, 44(7), 1671-1701.
- Derringer, G. C. (1994). A balancing act-optimizing a products properties. *Quality Progress*, 27(6), 51-58.
- Domínguez-López, A., Remondetto, G. E., y Navarro-Galindo, S. (2008). Thermal kinetic degradation of anthocyanins in a roselle (*Hibiscus sabdariffa* L. cv.'Criollo') infusion. *International journal of food science & technology*, 43(2), 322-325.
- Duarte, R. M., y Duarte, A. C. (2011). Optimizing size-exclusion chromatographic conditions using a composite objective function and chemometric tools: Application to natural organic matter profiling. *Analytica chimica acta*, 688(1), 90-98.
- Durán, R., y Valenzuela, A. (2010). LA EXPERIENCIA JAPONESA CON LOS ALIMENTOS FOSHU:¿ LOS VERDADEROS ALIMENTOS FUNCIONALES? *Revista chilena de nutrición*, 37(2), 224-233.
- Etcheverry, P., Grusak, M. A., y Fleige, L. E. (2012). Application of in vitro bioaccessibility and bioavailability methods for calcium, carotenoids, folate, iron, magnesium, polyphenols, zinc, and vitamins B6, B12, D, and E. *Frontiers in physiology*, 3, 317.
- FAO/OMS. (2016).
- Fitó, M., de la Torre, R., Farré-Albaladejo, M., Khymenetz, O., Marrugat, J., y Covas, M. I. (2007). Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenolic compounds in humans: a review. *Annali dell' Istituto Superiore di Sanita*, 43(4), 375-381.
- Frank, T., Netzel, G., Kammerer, D. R., Carle, R., Kler, A., Kriesl, E., Bitsch, I., Bitsch, R., y Netzel, M. (2012). Consumption of *Hibiscus sabdariffa* L. aqueous extract and its impact on systemic antioxidant potential in

- healthy subjects. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(10), 2207-2218.
- Gan, C.-Y., y Latiff, A. A. (2011). Optimisation of the solvent extraction of bioactive compounds from *Parkia speciosa* pod using response surface methodology. *Food Chemistry*, 124(3), 1277-1283.
- Garba, Z. N., y Rahim, A. A. (2014). Process optimization of K<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-activated carbon from *Prosopis africana* seed hulls using response surface methodology. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 107, 306-312.
- Gironés-Vilaplana, A., Mena, P., García-Viguera, C., y Moreno, D. A. (2012). A novel beverage rich in antioxidant phenolics: Maqui berry (*Aristotelia chilensis*) and lemon juice. *LWT-Food Science and Technology*, 47(2), 279-286.
- Granfeldt, Y., Bjorck, I., Drews, A., y Tovar, J. (1992). An in vitro procedure based on chewing to predict metabolic response to starch in cereal and legume products. *European Journal of Clinical Nutrition*, 46, 649-660.
- Gruenwald, J. (2009). Novel botanical ingredients for beverages. *Clinics in Dermatology*, 27(2), 210-216.
- Hsu, C.-H., Tsai, T.-H., Kao, Y.-H., Hwang, K.-C., Tseng, T.-Y., y Chou, P. (2008). Effect of green tea extract on obese women: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Clinical Nutrition*, 27(3), 363-370.
- Jaeger, S. R., Axten, L. G., Wohlers, M. W., y Sun-Waterhouse, D. (2009). Polyphenol-rich beverages: insights from sensory and consumer science. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(14), 2356-2363.
- Karacabey, E., y Mazza, G. (2008). Optimization of Solid– Liquid Extraction of Resveratrol and Other Phenolic Compounds from Milled Grape Canes (*Vitis vinifera*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(15), 6318-6325.
- Ku, C. S., y Mun, S. P. (2008). Optimization of the extraction of anthocyanin from Bokbunja (*Rubus coreanus* Miq.) marc produced during traditional

- wine processing and characterization of the extracts. *Bioresource Technology*, 99(17), 8325-8330.
- Lawless, L. J., Threlfall, R. T., Howard, L. R., y Meullenet, J.-F. (2012). Sensory, compositional, and color properties of nutraceutical-rich juice blends. *American journal of Enology and Viticulture*, ajev. 2012.11125.
- Lin, X., Lijing, Z., Lei, H., Zhang, H., Cheng, Y., Zhu, R., y Ruan, R. (2010). Effect of drying technologies on quality of green tea. *International Agricultural Engineering Journal*, 19(3), 30-37.
- Mak, J. C. (2012). Potential role of green tea catechins in various disease therapies: progress and promise. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 39(3), 265-273.
- Martínez-Álvarez, J. R., y Iglesias-Rosado, C. (2012). *La hidratación a través de las bebidas funcionales*.
- Martins, A. C., Bukman, L., Vargas, A. M., Barizão, É. O., Moraes, J. C., Visentainer, J. V., y Almeida, V. C. (2013). The antioxidant activity of teas measured by the FRAP method adapted to the FIA system: optimising the conditions using the response surface methodology. *Food Chemistry*, 138(1), 574-580.
- Martirosyan, D. M. (2011). *Functional foods and chronic diseases: science and practice*: Food Science Publisher Dallas, USA.
- Mattila, P., y Kumpulainen, J. (2002). Determination of free and total phenolic acids in plant-derived foods by HPLC with diode-array detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(13), 3660-3667.
- McKay, D. L., Chen, C. Y., Saltzman, E., y Blumberg, J. B. (2010). *Hibiscus sabdariffa* L. tea (tisane) lowers blood pressure in prehypertensive and mildly hypertensive adults. *The Journal of nutrition*, 140(2), 298-303.

- Medini, F., Ksouri, R., Falleh, H., Megdiche, W., Trabelsi, N., y Abdelly, C. (2011). Effects of physiological stage and solvent on polyphenol composition, antioxidant and antimicrobial activities of *Limonium densiflorum*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(31), 6719-6730.
- Mercado-Mercado, G., Blancas-Benitez, F. J., Velderrain-Rodríguez, G. R., Montalvo-González, E., González-Aguilar, G. A., Alvarez-Parrilla, E., y Sáyago-Ayerdi, S. G. (2015). Bioaccessibility of polyphenols released and associated to dietary fibre in calyces and decoction residues of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Journal of Functional Foods*, 18, 171-181.
- Mohd-Esa, N., Hern, F. S., Ismail, A., y Yee, C. L. (2010). Antioxidant activity in different parts of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extracts and potential exploitation of the seeds. *Food Chemistry*, 122(4), 1055-1060.
- Monroy-Ortíz, C., y Castillo-España, P. (2007). *Plantas medicinales utilizadas en el estado de Morelos*.
- Montgomery, D. C. (2004). *Diseño y análisis de experimentos* (L. Wiley Ed.).
- Muniandy, P., Shori, A. B., y Baba, A. S. (2016). Influence of green, white and black tea addition on the antioxidant activity of probiotic yogurt during refrigerated storage. *Food Packaging and Shelf Life*, 8, 1-8.
- Nanasombat, S., Thonglong, J., y Jitlakha, J. (2015). Formulation and characterization of novel functional beverages with antioxidant and anti-acetylcholinesterase activities. *Functional Foods in Health and Disease*, 5(1), 1 of 16.
- Narukawa, M., Kimata, H., Noga, C., y Watanabe, T. (2010). Taste characterisation of green tea catechins. *International Journal of Food Science and Technology*, 45(8), 1579-1585.
- Nath, A., y Chattopadhyay, P. K. (2007). Optimization of oven toasting for improving crispness and other quality attributes of ready to eat potato-



- soy snack using response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 80(4), 1282-1292.
- Ofori, J. A., y Peggy, Y. H. (2013). Novel technologies for the production of functional foods. *Bio-Nanotechnology: A Revolution in Food, Biomedical and Health Sciences*, 141-162.
- Palafox-Carlos, H., Yahia, E. M., y González-Aguilar, G. A. (2012). Identification and quantification of major phenolic compounds from mango (*Mangifera indica*, cv. Ataulfo) fruit by HPLC–DAD–MS/MS-ESI and their individual contribution to the antioxidant activity during ripening. *Food Chemistry*, 135(1), 105-111.
- Pandey, K. B., y Rizvi, S. I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2(5), 270-278.
- Patras, A., Brunton, N. P., Da Pieve, S., y Butler, F. (2009). Impact of high pressure processing on total antioxidant activity, phenolic, ascorbic acid, anthocyanin content and colour of strawberry and blackberry purées. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10(3), 308-313.
- Pecorari, M., Villaño, D., Testa, M. F., Schmid, M., y Serafini, M. (2010). Biomarkers of antioxidant status following ingestion of green teas at different polyphenol concentrations and antioxidant capacity in human volunteers. *Molecular nutrition & food research*, 54(S2), S278-S283.
- Pedrero, D. L., y Pangborn, R. M. (1989). *Evaluación sensorial de los alimentos. Métodos analíticos*: Editorial Alhambra Mexicana.
- Peng, C.-H., Chyau, C.-C., Chan, K.-C., Chan, T.-H., Wang, C.-J., y Huang, C.-N. (2011). Hibiscus sabdariffa polyphenolic extract inhibits hyperglycemia, hyperlipidemia, and glycation-oxidative stress while improving insulin resistance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(18), 9901-9909.

- Pinelo, M., Rubilar, M., Jerez, M., Sineiro, J., y Núñez, M. J. (2005). Effect of solvent, temperature, and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 2111-2117. doi:10.102/jf0488110
- Poiroux-Gonord, F., Bidel, L. P., Fanciullino, A. L., Gautier, H. I., Lauri-Lopez, F. I., y Urban, L. (2010). Health benefits of vitamins and secondary metabolites of fruits and vegetables and prospects to increase their concentrations by agronomic approaches. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(23), 12065-12082. doi:10.102/jf1037745
- Prado, F. C., Parada, J. L., Pandey, A., y Soccol, C. R. (2008). Trends in non-dairy probiotic beverages. *Food Research International*, 41(2), 111-123.
- Prasad, K. N., Hassan, F. A., Yang, B., Kong, K. W., Ramanan, R. N., Azlan, A., y Ismail, A. (2011). Response surface optimisation for the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities of underutilised *Mangifera pajang* Kosterm. peels. *Food Chemistry*, 128(4), 1121-1127.
- Prieto, D., Añez, R., Rojas, J., y Bermúdez, V. (2013). Effect of Hibiscus sabdariffa L aqueous infusion administration on body mass index, appetite and satiety in individuals with grade I obesity. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*, 32(3), 34-40.
- Quiñones, M., Miguel, M., y Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*, 27(1), 76-89.
- Ramirez-Rodrigues, M. M., Plaza, M. L., Azeredo, A., Balaban, M. O., y Marshall, M. R. (2011). Physicochemical and phytochemical properties of cold and hot water extraction from Hibiscus sabdariffa. *Journal of food science*, 76(3), C428-C435.

- Rein, M. J., Renouf, M., Cruz-Hernandez, C., Actis-Goretta, L., Thakkar, S. K., y da Silva Pinto, M. (2013). Bioavailability of bioactive food compounds: a challenging journey to bioefficacy. *British journal of clinical pharmacology*, 75(3), 588-602.
- Rhim, J.-W. (2002). Kinetics of thermal degradation of anthocyanin pigment solutions driven from red flower cabbage. *Food Science and Biotechnology*, 11(4), 361-364.
- Rivera, J. A., Muñoz-Hernández, O., Rosas-Peralta, M., Aguilar-Salinas, C. A., Popkin, B. M., y Willett, W. C. (2008). Consumo de bebidas para una vida saludable: recomendaciones para la población mexicana. *Salud Pública de México*, 50(2), 173-195.
- Rocha-Guzmán, N. E., Medina-Medrano, J. R., Gallegos-Infante, J. A., Gonzalez-Laredo, R. F., Ramos-Gómez, M., Reynoso-Camacho, R., Guzmán-Maldonado, H., y González-Herrera, S. M. (2012). Chemical evaluation, antioxidant capacity, and consumer acceptance of several oak infusions. *Journal of food science*, 77(2), C162-C166.
- Rodríguez-Roque, M. J., de Ancos, B., Sánchez-Moreno, C., Cano, M. P., Elez-Martínez, P., y Martín-Belloso, O. (2015). Impact of food matrix and processing on the in vitro bioaccessibility of vitamin C, phenolic compounds, and hydrophilic antioxidant activity from fruit juice-based beverages. *Journal of Functional Foods*, 14, 33-43.
- Rodríguez-Roque, M. J., Morales-de la Peña, M., y Martín-Belloso, O. (2014). Bebidas Funcionales. In G. A. González-Aguilar, A. F. González-Córdova, B. Vallejo-Cordoba, E. Álvarez-Parrilla, y H. S. García-Galindo (Eds.), *Los Alimentos Funcionales: Un nuevo reto para la industria de los alimentos*. México.

- Roy, M. K., Koide, M., Rao, T. P., Okubo, T., Ogasawara, Y., y Juneja, L. R. (2010). ORAC and DPPH assay comparison to assess antioxidant capacity of tea infusions: relationship between total polyphenol and individual catechin content. *International journal of food sciences and nutrition*, 61(2), 109-124.
- Ryan, L., y Prescott, S. L. (2010). Stability of the antioxidant capacity of twenty-five commercially available fruit juices subjected to an in vitro digestion. *International journal of food science & technology*, 45(6), 1191-1197.
- Sáyago-Ayerdi, S. G., Arranz, S., Serrano, J., y 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.
- Sáyago-Ayerdi, S. G., Velázquez-López, C., Montalvo-González, E., y Goñi, I. (2014). By-product from decoction process of *Hibiscus sabdariffa* L. calyces as a source of polyphenols and dietary fiber. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(5), 898-904.
- Scharbert, S., y Hofmann, T. (2005). Molecular definition of black tea taste by means of quantitative studies, taste reconstitution, and omission experiments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(13), 5377-5384.
- Serban, C., Sahebkar, A., Ursoniu, S., Andrica, F., y Banach, M. (2015). Effect of sour tea (*Hibiscus sabdariffa* L.) on arterial hypertension: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Journal of hypertension*, 33(6), 1119-1127.
- Sharif, K. M., Rahman, M. M., Azmir, J., Mohamed, A., Jahurul, M. H. A., Sahena, F., y Zaidul, I. S. M. (2014). Experimental design of supercritical fluid extraction—A review. *Journal of Food Engineering*, 124, 105-116.

- Sharma, A., y Zhou, W. (2011). A stability study of green tea catechins during the biscuit making process. *Food Chemistry*, 126(2), 568-573.
- Sin, H. N., Yusof, S., Hamid, N. S. A., y Rahman, R. A. (2006). Optimization of enzymatic clarification of sapodilla juice using response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 73(4), 313-319.
- Singleton, V. L., y Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
- Sirag, N., Elhadi, M. M., Algaili, A. M., y Ohaj, M. (2014). Determination of total phenolic content and antioxidant activity of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) Calyx ethanolic extract. *Gezira Journal of Health Sciences*, 10(1), 34-39.
- Siro, I., Kapolna, E., Kapolna, B., y Lugasi, A. (2008). Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance—A review. *Appetite*, 51(3), 456-467.
- Spigno, G., y De Faveri, D. M. (2007). Antioxidants from grape stalks and marc: Influence of extraction procedure on yield, purity and antioxidant power of the extracts. *Journal of Food Engineering*, 78(3), 793-801.
- Tagliazucchi, D., Verzelloni, E., Bertolini, D., y Conte, A. (2010). In vitro bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. *Food Chemistry*, 120(2), 599-606.
- Thoo, Y. Y., Ho, S. K., Liang, J. Y., Ho, C. W., y Tan, C. P. (2010). Effects of binary solvent extraction system, extraction time and extraction temperature on phenolic antioxidants and antioxidant capacity from mengkudu (*Morinda citrifolia*). *Food Chemistry*, 120(1), 290-295.
- Trescastro-López, E. M., y Bernabeu-Mestre, J. (2015). Alimentos funcionales: ¿necesidad o lujo? *Revista Española de Nutrición Humana y Dietética*, 19(1), 1-3.

- Tsai, P.-J., McIntosh, J., Pearce, P., Camden, B., y Jordan, B. R. (2002). Anthocyanin and antioxidant capacity in Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract. *Food Research International*, 35(4), 351-356.
- Tsuda, T. (2008). Regulation of adipocyte function by anthocyanins; possibility of preventing the metabolic syndrome. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(3), 642-646.
- Villalpando-Arteaga, E. V., Mendieta-Condado, E., Esquivel-Solís, H., Canales-Aguirre, A. A., Gálvez-Gastélum, F. J., Mateos-Díaz, J. C., Rodríguez-González, J. A., y Márquez-Aguirre, A. L. (2013). *Hibiscus sabdariffa* L. aqueous extract attenuates hepatic steatosis through down-regulation of PPAR- $\gamma$  and SREBP-1c in diet-induced obese mice. *Food & function*, 4(4), 618-626.
- Wall-Medrano, A., y López-Díaz, J. A. (2014). Alimentación saludable y funcional. In G. A. González-Aguilar, A. F. González-Córdova, B. Vallejo-Cordoba, E. Álvarez-Parrilla, y H. S. García-Galindo (Eds.), *Los Alimentos Funcionales: Un nuevo reto para la industria de alimentos*. México.
- Wang, X., y Chen, M. (2008). *Cluster-level feedback power control for performance optimization*. Paper presented at the The 14th IEEE International Symposium on High-Performance Computer Architecture (HPCA 2008).
- Westerterp-Plantenga, M. S. (2010). Green tea catechins, caffeine and body-weight regulation. *Physiology & behavior*, 100(1), 42-46.
- Wong, P. K., Yusof, S., Ghazali, H. M., y Che Man, Y. b. (2003). Optimization of hot water extraction of roselle juice using response surface methodology: a comparative study with other extraction methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(12), 1273-1278.

- Wootton-Beard, P. C., y Ryan, L. (2011). Improving public health?: The role of antioxidant-rich fruit and vegetable beverages. *Food Research International*, 44(10), 3135-3148.
- Yu, Y., Deng, Y., Lu, B. M., Liu, Y. X., Li, J., y Bao, J. K. (2014). Green tea catechins: a fresh flavor to anticancer therapy. *Apoptosis*, 19(1), 1-18.
- Zbakh, H., y El Abbassi, A. (2012). Potential use of olive mill wastewater in the preparation of functional beverages: A review. *Journal of Functional Foods*, 4(1), 53-65.
- Zhang, Y., Yu, Y., Li, X., Meguro, S., Hayashi, S., Katashima, M., Yasumasu, T., Wang, J., y Li, K. (2012). Effects of catechin-enriched green tea beverage on visceral fat loss in adults with a high proportion of visceral fat: a double-blind, placebo-controlled, randomized trial. *Journal of Functional Foods*, 4(1), 315-322.
- Zhen, J., Villani, T. S., Guo, Y., Qi, Y., Chin, K., Pan, M.-H., Ho, C.-T., Simon, J. E., y Wu, Q. (2016). Phytochemistry, antioxidant capacity, total phenolic content and anti-inflammatory activity of *Hibiscus sabdariffa* leaves. *Food Chemistry*, 190(1), 673-680.
- Zhishen, J., Mengcheng, T., y Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64(4), 555-559.
- Zulueta, A., Barba, F. J., Esteve, M. J., y Frígola, A. (2013). Changes in quality and nutritional parameters during refrigerated storage of an orange juice–milk beverage treated by equivalent thermal and non-thermal processes for mild pasteurization. *Food and Bioprocess Technology*, 6(8), 2018-2030.