



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Desarrollo de una bebida con antioxidantes elaborada a partir de
Rubus spp. e Ilex paraguariensis

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

P R E S E N T A

MELISSA ROSAS ROSAS



DIRECTORA DE TESIS

M. en C. ARGELIA SÁNCHEZ CHINCHILLAS

Ciudad Universitaria, CD. MX. 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: AGUSTIN REYO HERRERA
VOCAL: ARGELIA SÁNCHEZ CHINCHILLAS
SECRETARIO: TANIA GÓMEZ SIERRA
1er. SUPLENTE: ANA LAURA OCAMPO HURTADO
2° SUPLENTE: JANELI SOLIS GARFIAS

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO 4C, EDIFICIO A,
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

ASESORA DEL TEMA

M. en C. ARGELIA SÁNCHEZ CHINCHILLAS

SUSTENTANTE

MELISSA ROSAS ROSAS

RECONOCIMIENTOS

Se agradece al proyecto PAPIME 204816 Desarrollo de protocolos experimentales con enfoque fisicoquímico para la asignatura Laboratorio de Alimentos II de la Licenciatura en Química de Alimentos, por los fondos para la realización de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la profesora Argelia por darme la oportunidad de realizar la tesis, los recursos brindados, su paciencia, palabras, motivación y tiempo invertido a la revisión de éste.

A la profesora Tania y al profe Reyo, les agradezco su tiempo invertido y observaciones realizadas en la revisión de la tesis, siempre con la búsqueda de la mejora.

Índice

1. Introducción	9
2. Hipótesis.....	11
3. Objetivo	11
3.1 Objetivos particulares	11
4. Marco teórico.....	12
4.1 Alimento	12
4.2 Alimentos funcionales.....	12
4.3 Bebidas funcionales.....	14
4.4 Compuestos fenólicos	16
4.5 Importancia biológica.....	21
4.6 Antocianinas	23
4.7 Vías de degradación de antocianinas.....	25
4.8 Mecanismos de estabilidad de antocianinas	29
4.8.1 Copigmentación	29
4.8.2 Microencapsulación.....	31
4.8.3 Comparación entre mecanismos	32
4.9 Zarzamora	33
4.10 Yerba Mate.....	35
4.11 Disminución en el uso de colorantes artificiales	39
5. Metodología general	40
5.1 Diagrama de metodología general	40
5.2 Caracterización de bebidas comerciales y diseño de formulaciones	41
5.3 Obtención de muestras	41
Zarzamora	41
Yerba Mate.....	41
5.4 Determinación de acidez.....	42
5.5 Determinación de sólidos solubles totales (grados °Bx).....	42
5.6 Medición de pH.....	42
5.7 Obtención de extractos de materia prima	42
5.8 Obtención de infusión de Yerba Mate.....	42
5.9 Obtención de pulpa.....	43
5.10 Formulación de bebida.....	43

5.11 Determinación del contenido de fenoles totales: por método de Folin-Ciocalteu	44
5.12 Determinación del contenido de antocianinas monoméricas totales.	44
5.13 Determinación de capacidad antioxidante: Método de FRAP	45
5.14 Evaluación microbiológica	45
5.15 Evaluación sensorial.....	46
5.16 Análisis estadístico	47
6. Resultados y discusión	48
6.1 Caracterización de bebidas comerciales.....	48
6.2 Determinación cuantitativa de materia prima	49
6.3 Desarrollo de formulaciones.....	55
6.4 Efecto del almacenamiento sobre el contenido de compuestos fenólicos, antocianinas totales y capacidad antioxidante.....	57
6.4 Caracterización final del desarrollo de bebidas	64
6.5 Análisis microbiológico	65
6.6 Evaluación sensorial.....	66
7. Conclusiones	68
8. Perspectivas	69
9. Anexos.....	70
Anexo 9.1 Fundamentos y equipos utilizados.....	70
Anexo 9.2. Cuestionario de evaluación sensorial.....	72
Anexo 9.3. Análisis estadístico de los datos experimentales	73
Anexo 9.4 Resultados de análisis microbiológicos	81
Anexo 9.5 Análisis estadístico de evaluación sensorial	85
10. Referencias.....	87

Índice de tablas

Tabla 1.	Ejemplos de compuestos biológicamente activos	13
Tabla 2.	Ejemplos de bebidas funcionales	15
Tabla 3.	Clasificación de compuestos fenólicos	16
Tabla 4.	Características de grupos de compuestos fenólicos	17
Tabla 5.	Ejemplos de características sensoriales aportadas por los compuestos fenólicos	21
Tabla 6.	Actividad biológica de los compuestos fenólicos	22
Tabla 7.	Aplicación de las antocianinas como aditivos en alimentos	25
Tabla 8.	Comparación entre mecanismos de estabilidad de antocianinas	32
Tabla 9.	Lugares de cultivo de hojas de Yerba Mate en Sudamérica	36
Tabla 10.	Información nutrimental de Yerba Mate marca Taragüi®	41
Tabla 11.	Especificaciones de las formulaciones de bebida propuestas	43
Tabla 12.	Claves utilizadas para evaluación sensorial	46
Tabla 13.	Caracterización de bebidas comerciales	48
Tabla 14.	Parámetros de propuesta de bebidas	48
Tabla 15.	Determinación cuantitativa de compuestos fenólicos, antocianinas totales y capacidad antioxidante en <i>Rubus spp.</i>	51
Tabla 16.	Determinación cuantitativa de compuestos fenólicos, antocianinas totales y capacidad antioxidante de extractos de <i>Ilex paraguariensis</i> (Yerba Mate)	52
Tabla 17.	Evaluación de capacidad antioxidante y fenoles totales de obtención de infusión (Yerba Mate)	54
Tabla 18.	Caracterización de pulpa de zarzamora	55
Tabla 19.	Caracterización de formulaciones iniciales	56
Tabla 20.	Estimado de composición en determinaciones cuantitativas	57
Tabla 21.	Determinación cuantitativa de formulación 2 con y sin infusión	60
Tabla 22.	Determinación cuantitativa de formulación 3 con infusión y sin infusión	60
Tabla 23.	Comparación del porcentaje de pérdida en determinaciones cuantitativas de la formulación 2	62
Tabla 24.	Comparación del porcentaje de pérdida en determinaciones cuantitativas de la formulación 3	63
Tabla 25.	Caracterización final de formulaciones (22 días)	64
Tabla 26.	Especificaciones microbiológicas de bebidas saborizadas no alcohólicas y bebidas adicionadas con cafeína	65
Tabla 27.	Resultados microbiológicos de bebidas	65

Índice de figuras

Figura 1.	Estructuras de las antocianidinas comunes (<i>Durst y Wrolstad, 2001</i>)	23
Figura 2.	Antocianina y antocianina acilada (<i>Salinas, et. al. 2013</i>)	24
Figura 3.	Estructuras de antocianinas ante cambios de pH (<i>Giusti y Wrolstad, 2001</i>)	26
Figura 4.	Esquema de degradación de antocianinas (<i>Andersen y Jordheim, 2014</i>)	28
Figura 5.	Interacciones de copigmentación (<i>Rein, 2005</i>)	29
Figura 6.	Copigmentación por complejación con iones metálicos (Al^{3+}) e intermolecular (cafeína). Efecto de copigmentación (A) en cambio de intensidad de color y (B) absorción de antocianinas (<i>Morata, et. al. 2019</i>)	31
Figura 7.	Zarzamora (<i>Rubus spp.</i>)	33
Figura 8.	Principales estados productores de zarzamora en México. Atlas agroalimentario 2020. (<i>SADER, 2021</i>)	33
Figura 9.	Yerba mate (<i>Ilex paraguariensis</i>)	35
Figura 10.	A) Estructura de ácidos cafeoilquínicos (<i>Urushisaki, et al. 2011</i>) B) Ejemplo de estructura (<i>Herradón, 2013</i>)	35
Figura 11.	Proceso de elaboración de Mate (<i>Schmalko y Alzamora, 2001</i>)	37
Figura 12.	Principales componentes de Yerba Mate según <i>Bracesco, et. al. 2011</i>	38
Figura 13.	Diagrama de metodología general	40
Figura 14.	Diagrama de determinación cuantitativa	41
Figura 15.	Valores del efecto del almacenamiento en: A) contenido de fenoles totales; B) contenido de antocianinas monoméricas totales; C) capacidad antioxidante	58
Figura 16.	Fotografía de formulación 2. A) 15% pulpa + infusión; B) 15% pulpa sin infusión	64
Figura 17.	Evaluación sensorial de formulaciones (datos de moda). Datos con asterisco representan diferencias estadísticamente significativas	66
Figura 18.	Intención de compra de bebidas. A) Formulación 2; B) Formulación 3	67
Figura 19.	Disposición de precio a pagar. A) Formulación 2; B) Formulación 3	68

1. Introducción

El creciente aumento en enfermedades cardiovasculares y la preocupación por el estado de salud, ha tenido como consecuencia el desarrollo de alimentos funcionales, los cuales se caracterizan por brindar un beneficio fisiológico adicional al nutrimental. Esto se ha logrado mediante la adición de antioxidantes, pro y prebióticos, entre otros.

Aquellos alimentos funcionales ricos en antioxidantes incorporan generalmente compuestos fenólicos, los cuales provienen de alimentos de origen vegetal. Éstos han sido asociados a efectos benéficos como disminución de enfermedades cardiovasculares, algunos tipos de cáncer, arterioesclerosis y algunas enfermedades neurodegenerativas.

Las bebidas como alimentos funcionales cuentan con ventajas debido a que brindan la posibilidad de la adición de distintos nutrimentos deseables y compuestos bioactivos. Además de la adaptación en términos de contenido, tamaño, forma, la facilidad en la distribución y almacenamiento; lo que resulta de interés para el desarrollo con la incorporación de antioxidantes de frutas como fuente principal.

En general, las moras se caracterizan por presentar un alto contenido de antocianinas y otros compuestos fenólicos, los primeros contribuyen al color y al aporte antioxidante. Dentro de este grupo se encuentra la zarzamora (*Rubus spp.*), con mayor producción en México. Sin embargo, la estabilidad de las antocianinas se ve afectada por varios factores, entre los que se incluyen: el pH, la temperatura, la presencia de otros compuestos fenólicos, enzimas, iones metálicos, ácido ascórbico y el oxígeno. Debido a esto, resulta un reto la aplicación y preservación de estos compuestos. Cabe resaltar que el color en productos alimenticios es el primer atributo con el que el consumidor tiene contacto y lo relaciona como un criterio de calidad.

Se ha observado que existen compuestos que actúan como agentes estabilizantes de las antocianinas, entre los cuales se encuentran los ácidos cafeoilquínicos. Dicho fenómeno de estabilización se da por la copigmentación mediante interacciones intermoleculares.

Estos compuestos se encuentran presentes en las infusiones de Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*), que también se caracteriza por ser una fuente rica de compuestos fenólicos bioactivos.

El objetivo de este trabajo fue desarrollar una bebida elaborada a partir de zarzamora y una infusión de Yerba Mate, para la obtención de un producto funcional con antioxidantes. Además de evaluar si la concentración de antocianinas se mantenía estable por acción de los compuestos fenólicos de la Yerba Mate.

2. Hipótesis

Una bebida funcional con antioxidantes puede desarrollarse a base de pulpa de zarzamora e infusión de Yerba Mate, dicha infusión contribuirá a estabilizar a las antocianinas y consecuentemente mantendrá su capacidad antioxidante. De tal manera que al aplicarle el tratamiento térmico como la pasteurización y almacenarlo durante 22 días, la degradación de las antocianinas, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante será menor en comparación con la bebida sin infusión.

3. Objetivo

- ✓ Desarrollar una bebida funcional a base de zarzamora (*Rubus spp.*) con infusión de Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) para obtener una bebida funcional y evaluar si la adición de la infusión tiene un efecto en la preservación de la capacidad antioxidante y el color.

3.1 Objetivos particulares

- Diseñar una bebida de zarzamora, mediante la caracterización de bebidas comerciales con perfiles similares para la formulación del prototipo.
- Caracterizar la materia prima de la bebida de zarzamora, mediante análisis fisicoquímicos (°Brix, pH, %acidez) y cuantitativos (capacidad antioxidante, contenido de antocianinas y fenoles totales) para el desarrollo de las formulaciones prototipo.
- Extraer la infusión de Yerba Mate por medio de métodos físicos para la incorporación a la bebida prototipo de zarzamora.
- Determinar la capacidad antioxidante, contenido de antocianinas y fenoles totales de la bebida con y sin la infusión en un intervalo de 22 días para observar el efecto de la adición de la infusión.
- Realizar un análisis microbiológico de la bebida prototipo para evaluar su cumplimiento con la NOM-218-SSA1-2011 Productos y servicios. Bebidas saborizadas no alcohólicas, sus congelados, productos concentrados para prepararlas y bebidas adicionadas con cafeína.
- Determinar la aceptabilidad e intención de compra por el consumidor a través de una evaluación sensorial.

4. Marco teórico

4.1 Alimento

Se define como alimento a los órganos, tejidos o secreciones que contienen cantidades apreciables de nutrimentos biodisponibles, cuyo consumo en cantidades y formas habituales es inocuo, de suficiente disponibilidad, atractivo a los sentidos y seleccionado por alguna cultura (Meléndez-Mier, 2008).

Los nutrimentos corresponden a las sustancias químicas contenidas en los alimentos que permiten al organismo obtener energía, formar y mantener la estructura corporal y regular los procesos metabólicos. En estos se incluyen los hidratos de carbono, proteínas, grasas, vitaminas y minerales (Castillo, 2012).

4.2 Alimentos funcionales

En la actualidad un mayor número de consumidores considera que los alimentos tienen una contribución directa a su estado de salud. De esta manera se explica el incremento en la demanda de alimentos funcionales asociado al incremento en el costo del cuidado a la salud, expectativa de vida y la calidad a través de los años (Kotilainen, *et. al.* 2006).

El término "alimento funcional" fue inicialmente usado en Japón en los 80's. Éste era aplicado para alimentos con ingredientes o compuestos que brindaban efectos fisiológicos benéficos como la disminución en el nivel de colesterol en la sangre y modificación en las condiciones gastrointestinales (Kwak y Jukes, 2001).

Este concepto se promovió en 1984 por los científicos japoneses. Posteriormente, tras los estudios y desarrollo de dichos productos en 1991, el Ministerio de Salud de Japón introduce parámetros para la categorización de alimentos para usos específicos de salud "FOSHU" *Food for Specified Health Uses* por sus siglas en inglés (Kwak y Jukes, 2001; Burdock, *et. al.* 2006).

Los alimentos funcionales contienen compuestos biológicamente activos como los glucosinolatos y polifenoles, por mencionar algunos ejemplos. Estos compuestos proporcionan un efecto benéfico a la salud más allá de los considerados como nutrición básica. Estos componentes se encuentran en general en pequeñas cantidades en productos de origen vegetal y en alimentos ricos en lípidos (Herrera, *et. al.* 2014), en la Tabla 1 se indican algunos ejemplos.

Tabla 1. Ejemplos de compuestos biológicamente activos

Compuesto	Ejemplo	Alimento
Carotenoides	Carotenos: β -caroteno y licopeno	Zanahoria y mango Jitomates
	Xantofilas: Luteína y zeaxantina	Espinacas y acelgas
Fitoesteroles	β -sitosterol, estigmasterol	Aceites vegetales (maíz, girasol, soja, oliva), frutos secos
Polifenoles	Flavonoides: Flavonoles (Quercetina, kaempferol), y Antocianinas (cianidina 3-glucósido)	Cebolla y lechuga Zarzamora, frambuesa, cerezas
	Estilbenos (resveratrol)	Piel de uva y jugo de uva
Glucosinolatos	Isotiocianato	Coliflor

Fuente: adaptación de Martínez y Carbajal, 2012.

La incorporación de estos alimentos a la dieta habitual proporcionará beneficios fisiológicos como la promoción de la salud o propiedades de prevención de enfermedades, algunos ejemplos de ingredientes adicionados a alimentos son:

- Los prebióticos, los cuales son hidratos de carbono no digeribles para el ser humano, tienen la función de ser sustrato selectivo para bacterias del colon. Los probióticos, son microorganismos viables los cuales tienen la función de balancear la microbiota. En conjunto muestran tener actividad sobre el desempeño de enzimas fecales asociado a la prevención del cáncer de colon (Charalampopoulos, *et. al.* 2003; Stanton *et. al.* 2005).
- Los antioxidantes, son compuestos presentes en frutas y vegetales entre los cuales se encuentran las antocianinas que han mostrado prevenir el estrés oxidante reduciendo el riesgo de contraer enfermedades coronarias (Rincón-León, 2003).

Los alimentos funcionales contemplan una amplia variedad de productos entre los que se encuentran: panes, bebidas deportivas, barras de cereales y yogures que incorporan distintos ingredientes funcionales (Kaur y Das, 2011).

Sin embargo, a pesar de la investigación científica, la adición de ingredientes funcionales a un alimento no garantiza el éxito del producto en el mercado, pues éste debe ser diseñado para que los consumidores lo acepten con facilidad, es decir, que sea atractivo sensorialmente, que sea económicamente accesible o acorde al sector al que el producto está dirigido y con una presentación acorde al estilo de vida (Kaur y Singh, 2017).

4.3 Bebidas funcionales

En la actualidad los países con un mayor desarrollo en alimentos funcionales corresponden a Japón y China. Se estima un crecimiento de \$276.68 billones de dólares de esta industria durante el 2020-2024 (Technavio, 2020).

A pesar de ello, en cuanto al mercado de las bebidas funcionales, Estados Unidos ofrece una mayor variedad, debido a que éstas suelen ser enfocadas a distintos grupos de edad y estratos sociales. Las bebidas funcionales se definen como bebidas no alcohólicas las cuales pueden contener hierbas, vitaminas, minerales, aminoácidos, proteínas, frutas o vegetales que se adicionan con la intención de proveer un efecto benéfico a la salud. Algunos de los productos que están adquiriendo dominio son los jugos de frutas y vegetales, bebidas energéticas, con pre y probióticos, té listo para su consumo. El incremento del desarrollo de bebidas surge tras la factibilidad que éstas presentan en términos de tamaño, forma, apariencia; la facilidad en distribución y almacenamiento. Y la más importante, la oportunidad de incorporar diferentes ingredientes funcionales (Raman, *et. al.* 2019). Algunos ejemplos de bebidas funcionales tradicionales y populares son las infusiones, café y jugos de frutas. Recientemente se han desarrollado bebidas que contienen ingredientes funcionales de frutas, otras partes de plantas medicinales y con probióticos, debido al efecto benéfico que éstos proporcionan (Aadil, *et. al.* 2019). En la Tabla 2 se indican algunos ejemplos de bebidas funcionales.

Tabla 2. Ejemplos de bebidas funcionales

Tipo de bebida		Ingrediente	Ejemplo	Características	Actividad	Referencia
Fermentadas	Lácteas	Probióticos	Keffir	<i>L. kefir</i>	Antihipertensiva	Grishina, <i>et.al.</i> , 2011
			Yakult	<i>Lactobacillus casei Shirota</i>	Anticancerígena	Kano, <i>et al.</i> , 2013
	Bebidas no-lácteas		Cupuassu	<i>L.casei</i>	Antioxidante	Pereira, <i>et. al.</i> 2017
	Jugo de granada		<i>L.plantarum</i>	Antimicrobiana	Filannino, <i>et. al.</i> , 2013	
No fermentados	Café	Compuestos fenólicos		Ácido cafeoilquinico	Antioxidante y antiinflamatoria	Tajik, <i>et. al.</i> 2017
	Té herbal		Té de Yerba Mate	Ácido cafeico, clorogénico, catequinas	Antioxidante	Boaventura, <i>et al.</i> , 2012
	Jugos de frutas y vegetales	Compuestos fenólicos	Jugo de cítricos y moras	Flavonoides antocianinas, vitamina C	Antioxidante	Bernabé, <i>et. al.</i> , 2015

El desarrollo de una bebida funcional depende de distintos factores entre los que se encuentran: el concepto (enfermedades que atañen a la población a la que el producto es dirigido), la preferencia de los consumidores, los ingredientes funcionales añadidos, factores de procesamiento (térmico y no térmico) y factores fisicoquímicos (Domínguez, *et. al.* 2017; Raman, *et. al.* 2019; Yilmaz-Akyuz, *et. al.* 2019).

4.4 Compuestos fenólicos

Son moléculas que tienen uno o más grupos hidroxilo unidos a un anillo aromático, se encuentran presentes en alimentos de origen vegetal. En las plantas presentan una serie de funciones metabólicas en el crecimiento, reproducción, protección contra patógenos externos y el estrés, así como contra la radiación ultravioleta y los depredadores, (Peñarrieta, *et. al.* 2014). La clasificación de estos compuestos varía en función del autor, Harborne y Simmonds en 1989, lo clasifican de acuerdo con el número de carbonos y la estructura de las moléculas (Tabla 3), en ésta a su vez se enlistan ejemplos de cada uno de los grupos.

Tabla 3. Clasificación de compuestos fenólicos

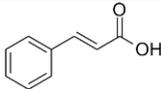
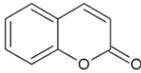
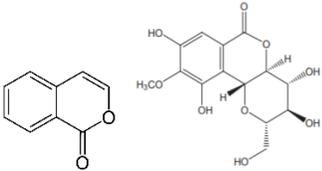
Grupos	Ejemplos	
1. Fenoles, ácidos fenólicos y fenilacéticos	Fenoles simples	Resorcinol, hidroquinona, catecol
	Ácidos fenólicos	Ácido gálico, ácido salicílico, ácido vanilínico
	Ácidos fenilacéticos	Ácido 2-hidroxifenilacético
2. Ácidos cinámicos, cumarina e isocumarinas	Ácidos cinámicos	Ácido p-cumarínico, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido sinápico, ácido clorogénico
	Cumarinas	Umbeliferona
	Isocumarinas	Bergenina
3. Flavonoides	Chalconas	Buteina, florizina, isoliquiritigenina
	Aurones	4-cloro-2-hidroxiaurona
	Flavonoides	<ul style="list-style-type: none"> • Flavanones: Naringenina • Flavanoles: Taxifolina • Antocianidinas: cianidina, pelargonidina, petunidina • Leucoantocianidinas: Leucocianidina, leucodelfinidina, galocatequina • Flavonas: Kaempferol, quercitina • Antocianinas: cianidina 3-glucósido, petunidina 3-glucósido
4. Lignanos		(+)-Pinoresinol, (+)-sesamina
5. Taninos		<ul style="list-style-type: none"> • Condensados: Procianidina B₂ • Complejos: Acutissimin A • Hidrolizables: 1,2,3,3,6- pentagalailglucosa

Fuente: adaptación de Nicholson, y Vermerris, 2009.

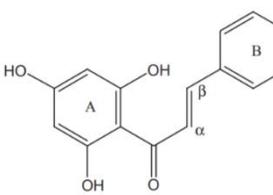
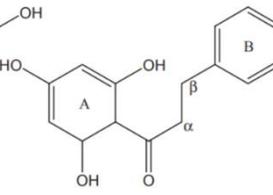
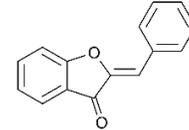
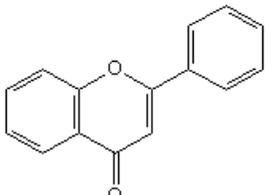
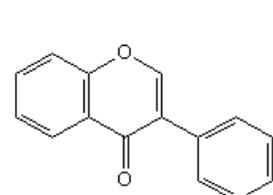
Además, en dicha clasificación, cada compuesto fenólico tiene subgrupos con distintas características, las cuales se describen en la Tabla 4.

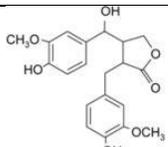
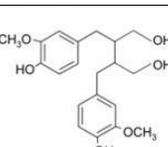
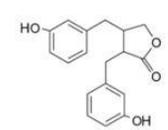
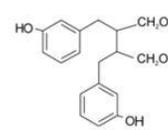
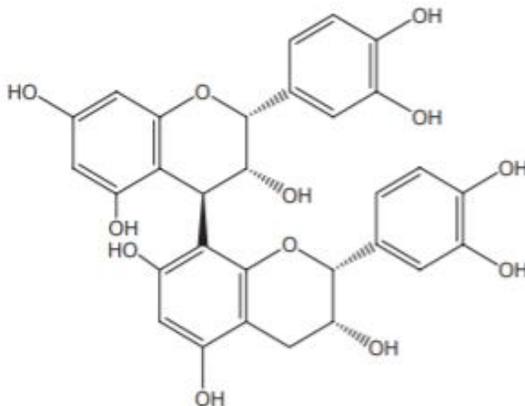
Tabla 4. Características de grupos de compuestos fenólicos

1. Fenoles, Ácidos fenólicos y fenilacéticos		
	Características	Estructura
Fenoles simples	Estructura de un fenol sustituido en las posiciones orto, meta y para, las cuales pueden ser di o tri sustituidas.	<p style="text-align: center;">ortho meta para meta-tri vic-tri</p> <p style="text-align: center;"><i>Nicholson, y Vermerris, 2009</i></p>
Ácidos fenólicos	Se caracterizan por la presencia de un grupo carboxi sustituido en un fenol.	<p style="text-align: center;">Ácido p-hidroxibenzoico <i>Nicholson y Vermerris, 2009</i></p>
Ácidos fenilacéticos	Raramente se encuentran en la naturaleza.	<p style="text-align: center;">Ácido fenil acético <i>Stea, 2019</i></p>

2. Ácidos cinámicos, cumarina e isocumarinas			
	Características		Estructura
Ácidos cinámicos	En las plantas se encuentran generalmente esterificados con el ácido quínico.	$C_6 - C_3$	 <p>Ácido cinámico UNIIQUIM, 2017</p>
Cumarinas	Tienen una estructura $C_6 - C_3$, además de un átomo de oxígeno como parte del heterociclo de la unidad $-C_3$.	$C_6 - C_3$	 <p>Cumarina Hemeroteca Natural, 2017</p>
Isocumarinas	Estructura similar a las cumarinas, la diferencia radica en la posición del oxígeno y del grupo carbonil, pues éstos se encuentran al revés en el heterociclo.	$C_6 - C_3$	 <p>Isocumarina Bergenina Yikrazuul, 2008</p>

3. Flavonoides

3. Flavonoides			
	Características	Estructura	
Chalconas	<p>Estructura formada por dos anillos benzoicos que se unen por una cadena lineal de carbonos, la cual cuenta con un doble enlace.</p> <p>Dentro de este grupo también se encuentran la dihidrochalconas las cuales se diferencian debido a que tienen la cadena C₃ saturada</p>	<p>C₆-C₃- C₆</p>	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>Chalcona</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Dihidrochalcona</p> </div> </div> <p style="text-align: center;">UNIIQUIM, 2017</p>
Aurones	<p>Estructura formada por un heterociclo con la cadena C₃ de la chalcona.</p>	<p>C₁₅</p>	 <p style="text-align: center;">ZooFari, 2010</p>
Flavonoides	<p>Los flavonoides tienen un anillo A, B y C, y son típicamente representados con el anillo A en el lado izquierdo, los cuales son resultado de la síntesis de <i>p</i>-cumaril y malonil. Las isoflavonas difieren en la posición del anillo B.</p> <p>En este grupo se encuentran:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Flavanonas • Antocianidinas • Leucoantocianidinas • Flavonas • Antocianinas 	<p>C₆-C₃- C₆</p>	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p><u>FLAVONA</u></p> </div> <div style="text-align: center;">  <p><u>ISOFLAVONA</u></p> </div> </div> <p style="text-align: center;">Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, 2017</p>

<p>4. Lignan</p>	<p align="center">Características</p> <p>Dímeros u oligómeros que resultan del acoplamiento de monolignoles.</p>	<p align="center">Estructura</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;">  <p>7-hidroximatairesinol</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>secoisolaricresinol</p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 20px;"> <div style="text-align: center;">  <p>enterolactona</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>enterodiol</p> </div> </div> <p align="center">Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, 2017</p>
<p>5. Taninos</p>	<p align="center">Características</p> <p>En cuanto a su estructura comprende a un grupo de compuestos de gran diversidad. Pueden estar presentes en las hojas, tallos y frutas. A su vez se segmentan en:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Condensados • Complejos • Hidrolizables 	<p align="center">Estructura</p> <div style="text-align: center;">  <p>Procianidina B₂ <i>Nicholson y Vermerris, 2009</i></p> </div>

Fuente: adaptación de Nicholson y Vermerris 2009.

Adicionalmente, los compuestos fenólicos son responsables de proveer las características sensoriales (aroma, color y sabor) de los alimentos que los contienen (Tabla 5).

Tabla 5. Ejemplos de características sensoriales aportadas por los compuestos fenólicos

Propiedad sensorial	Compuesto	Alimento
Color	Antocianinas	Frutos rojos como la zarzamora, fresa y frambuesa.
Sabor amargo	Flavanonas (Narangenina, neohesperidina)	Cítricos como la naranja
Astringencia	Taninos	Vinos
Olor	Eugenol	Clavo de olor

Fuente: adaptación de Creus, 2004.

La concentración de estos compuestos en alimentos es variable, depende de diversos factores tales como el origen, el grado de maduración del vegetal y el órgano de la planta del cual se obtiene (Creus, 2004).

4.5 Importancia biológica

En términos generales los compuestos fenólicos tienen la propiedad de ser capaces de actuar sobre los radicales libres para estabilizarlos, por lo que se les confiere propiedades antioxidantes. Los radicales adquieren importancia debido a que son muy reactivos y tienen la capacidad de causar daño oxidante en las células, generando así impactos negativos en el metabolismo celular (Nicholson y Vermerris, 2009).

La absorción y metabolismo de los compuestos fenólicos se lleva a cabo en el tracto digestivo, está determinado por la estructura, el grado de acilación o glicosilación, así como su interacción con otras moléculas (Tarko, *et. al.* 2013).

Existen diferentes evidencias que demuestran que los compuestos fenólicos pueden presentar un efecto benéfico sobre la salud, sin embargo, dichos estudios son inconclusos. Algunos de los efectos benéficos sobre la salud se enlistan en la Tabla 6:

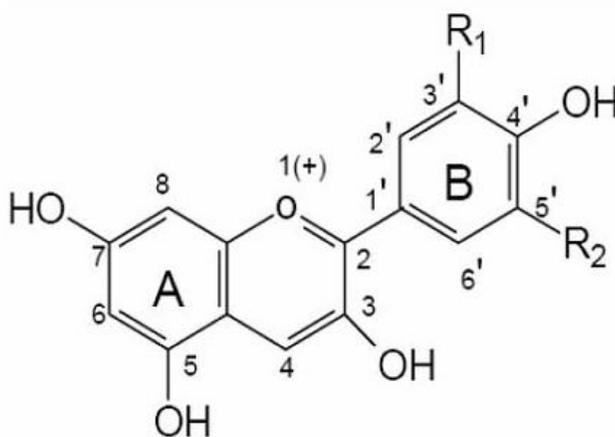
Tabla 6. Actividad biológica de los compuestos fenólicos

Actividad	Descripción	Compuesto	Referencias
Actividad antimutagénica	Acción sobre los radicales libres para la protección del ADN.	Ácidos fenólicos, taninos hidrolizables, flavonoides, ácidos cinámicos, ácido clorogénico, ácido cafeico	Rice-Evans, 1996
Actividad antioxidante	Disminuyen la oxidación de LDL (lipoproteínas de baja densidad).	Flavonoides, proantocianidinas, antocianinas	Santos-Buelga y Scalbert, 2000; Creus, 2004
Actividad antiinflamatoria y antiséptica	Son incluidos por los japoneses y chinos como medicina natural.	Taninos, antocianinas	Khanbabaee y Van Ree, 2001
Prevención de enfermedades neurodegenerativas	Evitan la formación de agregados de la proteína Tau y péptidos β -amiloides formados durante el Alzheimer.	Catequinas y derivados	Baptista, <i>et. al.</i> 2014; Bakhtiari, <i>et al.</i> 2017
Actividad anticarcinogénica	Inhibición de la formación de compuestos N-nitroso. Evitan cambios epiteliales en las primeras etapas del cáncer de mama.	Ácidos cinámicos, ácido clorogénico, ácido cafeico, antocianinas	Rice-Evans, 1996; Pan, <i>et. al.</i> 2015

En términos generales, su consumo se ha asociado a la contribución de un posible efecto benéfico en la prevención del cáncer, así como de las enfermedades cardiovasculares, arterioesclerosis y artritis (Creus, 2004).

4.6 Antocianinas

Las antocianinas son compuestos fenólicos del grupo de los flavonoides. Se conforman por una estructura primaria de antocianidinas (Figura 1) mayoritariamente (89.9%); cianidina, delphinidina, pelargonidina, peonidina, malvidina y petunidina, las cuales son glicosiladas en las posiciones 3 y/o 5 con mono, di o trisacáridos que incrementan su solubilidad; los principales hidratos de carbono son la glucosa, galactosa, ramnosa, rutinosa y soforosa (Andersen y Jordheim, 2014).

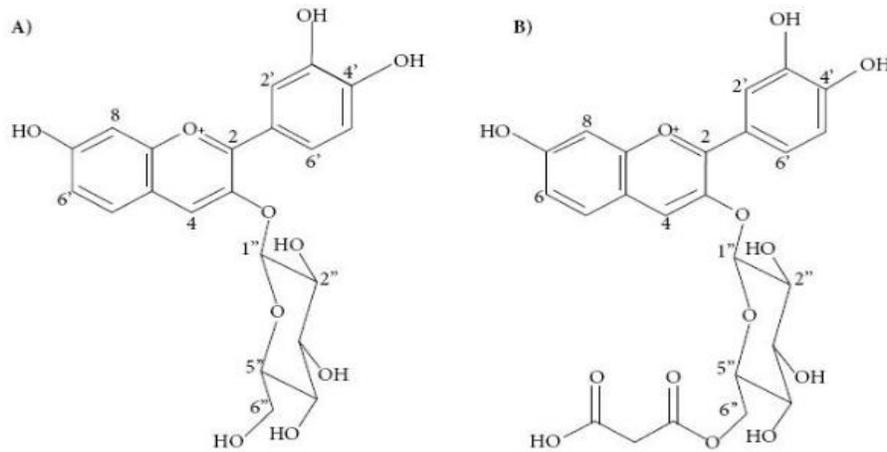


Antocianidina	Sustitución		λ_{\max} (nm) espectro visible
	R1	R2	
Pelargonidina	H	H	494 (naranja)
Cianidina	OH	H	506 (naranja-rojo)
Delfinidina	OH	OH	508 (azul-rojo)
Peonidina	OCH ₃	H	506 (naranja-rojo)
Petunidina	OCH ₃	OH	508 (azul-rojo)
Malvidina	OCH ₃	OCH ₃	510 (azul-rojo)

Figura 1. Estructuras de las antocianidinas comunes (Durst y Wrolstad, 2001)

Su estructura puede presentar acilación de los residuos de azúcares de la molécula con ácidos orgánicos, los cuales pueden ser alifáticos, tales como malónico y acético; o aromáticos: *p*-cumárico, cafeico y ferúlico como se observa en la Figura 2 (Andersen, y Jordheim, 2014).

Dichos ácidos proveen de una mayor estabilidad debido a que las antocianinas son más resistentes a la hidratación del catión flavilio, sin embargo, éstas se encuentran en menor proporción en la naturaleza (Zhao, *et. al.* 2017).



a) cianidina 3-glucósido

b) cianidina-3(6-malonilglucósido)

Figura 2. Antocianina y antocianina acilada (Salinas, *et. al.* 2013)

Estos pigmentos naturales son responsables de la mayoría de los colores de flores, frutos, hojas, tallos e incluso de algunas raíces (naranja, rojo, magenta, violeta y azul); tienen un papel importante en el crecimiento, reproducción y protección contra patógenos, depredadores y exceso de luz (Galaffu, *et. al.* 2015).

Las antocianinas son utilizadas como aditivo de color (E163), en México identificado en el “Acuerdo por el que se determinan los aditivos y coadyuvantes en alimentos, bebidas y suplementos alimenticios” como extracto de piel de uva, extracto de tegumento de uva, enocianinas y antocianinas.

Sin embargo, su uso se ve limitado por la poca estabilidad que presenta ante diversas condiciones en diferentes matrices alimenticias tal como se muestra en la Tabla 7 (Galaffu, *et. al.* 2015).

Tabla 7. Aplicación de las antocianinas como aditivos en alimentos

Color	Hue	Condiciones		Confitería	Helados	Bebidas
Antocianinas		Procesamiento	T: 0-85°C	m	m	p
			T: > 85°C	p	-	p
		Almacenamiento	pH	m	m	p
			Oxígeno	b	b	p
			Luz	b	b	P
p: pobre; m: medio; b: bueno						

Fuente: Galaffu, et. al. 2015.

Algunos estudios clínicos y epidemiológicos sugieren que el consumo de antocianinas y otros flavonoides que se pueden encontrar en la mayoría de las frutas y vegetales, pueden disminuir el riesgo asociado a la obesidad, enfermedades coronarias, enfermedades neurodegenerativas y algunos tipos de cáncer. Estos beneficios han sido estudiados de manera *in vitro* e *in vivo* (Jensen, et. al. 2008; Krikorian, et. al. 2010).

4.7 Vías de degradación de antocianinas

Las antocianinas son altamente reactivas por lo que se degradan fácilmente, las condiciones de almacenamiento tienen un papel crítico en el mantenimiento de la pigmentación. La luz y la temperatura son los principales factores que tienen efecto sobre la degradación de estos pigmentos (Welch, et. al. 2008).

En condiciones aerobias las antocianinas tienden a oxidarse, este efecto se favorece con calentamiento y tiene un efecto sobre el color (Galaffu, et al. 2015).

Otro de los factores que tiene un efecto sobre la coloración de las antocianinas corresponde al pH el cual genera cambios en la estructura como se observa en la Figura 3 (Giusti y Wrolstad, 2001).

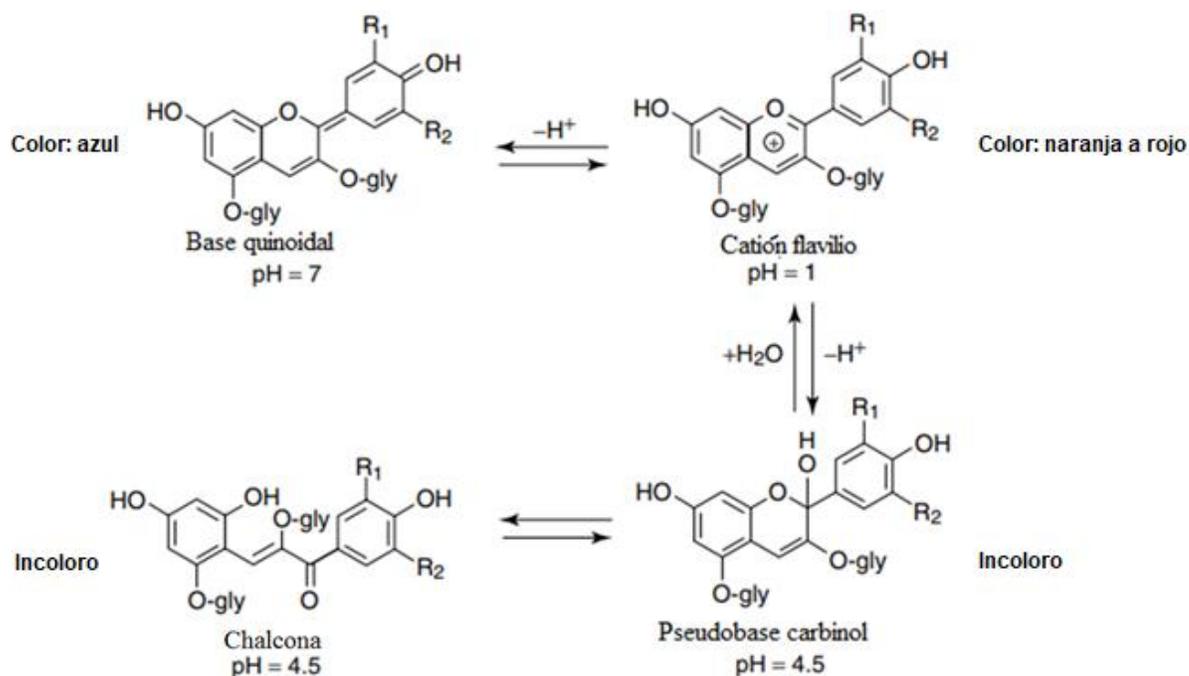


Figura 3. Estructuras de antocianinas ante cambios de pH (Giusti y Wrolstad, 2001).

Sin embargo, los productos de degradación dependen de la combinación de ambos factores (temperatura y pH); a mayores temperaturas, esta degradación se lleva a cabo con mayor rapidez. Como se observa en la Figura 4, con una antocianina diglicosilada a pH 7, el tratamiento térmico ocasiona la pérdida del anillo B, con la formación de una chalcona como intermediario para la posterior formación de 3,5-diglicosil-7-hidroxicumarina **(a)**. Dicho producto no presenta la hidrólisis de las moléculas de glucosa (Andersen y Jordheim, 2014).

En un estudio realizado en 2006 por Sadilova y colaboradores muestran con un calentamiento de 95°C durante 1 hora a pH de 1, **(b)** las antocianinas aciladas y no aciladas, pierden los hidratos de carbono a los que están unidas, sin embargo, las antocianidinas formadas continúan su degradación hasta la formación de 2,4,6-trihidroxi benzaldehído (floroglucinaldehído) y ácido 3,4-hidroxibenzoico (ácido protocatecuico). Con lo que respecta al pH de 3.5 **(c)**, inicialmente se lleva a cabo la apertura del anillo central para la formación de una chalcona con una posterior hidrólisis del hidrato de carbono para finalmente continuar la degradación a la formación de 2,4,6-trihidroxi benzaldehído y ácido 3,4-hidroxibenzoico.

El almacenamiento también tiene efecto sobre la degradación de las antocianinas, Brownmiller y colaboradores en 2008, evaluaron el efecto del almacenamiento de purés de mora azul. Observaron que, transcurridos 6 meses, la pérdida de antocianinas monoméricas era mayor al 50% acompañado de un incremento en las antocianinas poliméricas. Este efecto se puede relacionar con diversos factores como la actividad residual enzimática o la condensación de antocianinas con otros compuestos fenólicos.

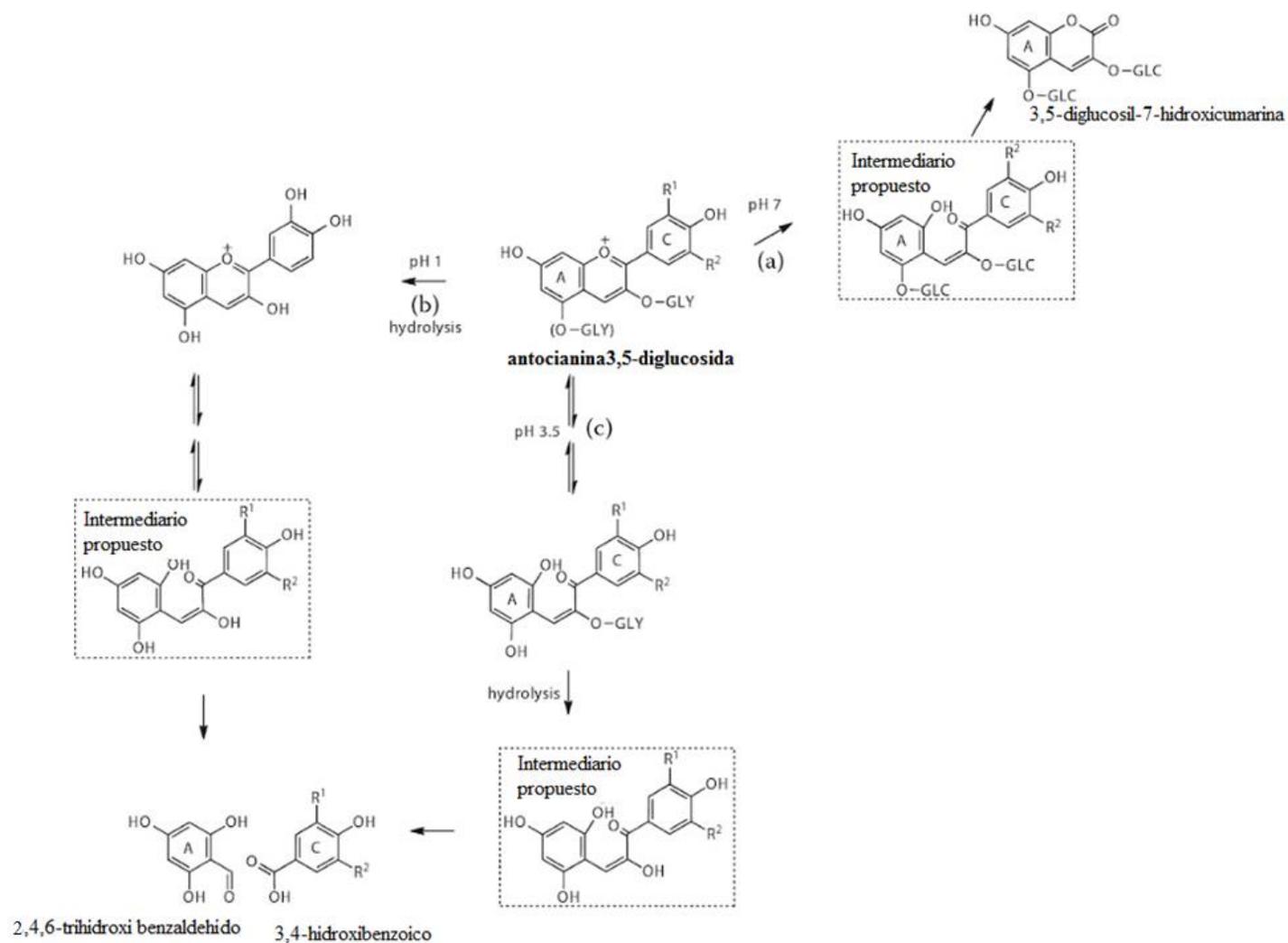


Figura 4. Esquema de degradación de antocianinas (Andersen y Jordheim, 2014)

4.8 Mecanismos de estabilidad de antocianinas

Existen diversos mecanismos para estabilizar las antocianinas, entre los que destacan la microencapsulación y la copigmentación, los cuales se explican a continuación.

4.8.1 Copigmentación

La copigmentación es un mecanismo empleado para el mejoramiento en el color de productos ricos en antocianinas ya que brinda estabilidad. Este se da mediante interacción de los pigmentos y otros compuestos orgánicos incoloros (intermoleculares), iones metálicos o autoasociación (intramoleculares) como se muestra en la Figura 5.

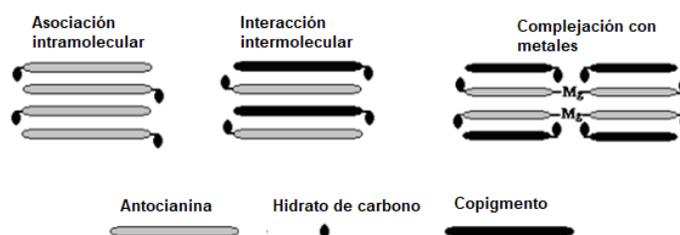


Figura 5. Interacciones de copigmentación (Rein, 2005)

Intramolecular

El mecanismo de la asociación intramolecular no es completamente conocido. Se sugiere que las antocianinas tienen interacciones tipo apilamiento, el cual se estabiliza mediante interacciones hidrofóbicas entre los anillos aromáticos. Sin embargo, ésta tiende a ser menos estable (Hoshino, *et. al.* 1982).

Complejación con iones metálicos

Algunos metales han demostrado que estabilizan los extractos de antocianinas, principalmente las que incluyen cianidina, delfinidina y petunidina son capaces de quelarse con metales porque cuentan con más de un grupo hidroxilo libre.

Para formar los complejos, el estado de oxidación del metal tiene un papel crucial (Tachibana, *et. al.* 2014). Los metales comúnmente usados son: estaño, cobre, hierro, aluminio, magnesio y potasio. Sin embargo, su uso se ve limitado, ya que la adición de los metales puede causar resabios metálicos indeseables (Cavalcanti, *et. al.* 2011).

Intermolecular

Existen diferentes moléculas copigmentantes como compuestos fenólicos, flavonoides, alcaloides, ácidos orgánicos, entre otros (Rustioni, *et. al.* 2012).

Esta copigmentación se da mediante interacciones intermoleculares, con el compuesto colorido (antocianinas) y un compuesto no colorido (copigmento); supone la superposición de las dos moléculas, que previene el ataque nucleofílico del agua sobre la molécula de antocianina (Rein, 2005). El complejo antocianina-copigmento está mediado por interacciones de tipo $\pi - \pi$ (Gras, *et. al.* 2016).

Se ha demostrado que la formación complejo pigmentario ralentiza la degradación de las antocianinas (Bakowska, *et. al.* 2003; Gradinaru, *et. al.* 2003).

Como todas las reacciones de las antocianinas, las reacciones de copigmentación también se ven afectadas por disolventes (Brouillard, *et. al.* 1991), la temperatura, las concentraciones y estructuras moleculares (Bakowska, *et. al.* 2003).

Algunos de los ejemplos asociados a la interacción antocianina-compuesto fenólico estudiadas son: extractos de té en los cuales se evaluó epigallocatequina (Chung, *et. al.* 2016); granos de café verde cuyo compuesto mayoritario es el ácido clorogénico (Gras, *et. al.* 2016); extracto de romero; antocianinas, entre otros.

Los compuestos fenólicos no solo actúan como agentes que mejoran la estabilidad del color, sino también aumentan la actividad antioxidante de los alimentos (Cavalcanti, *et.al.* 2011).

La copigmentación tiene el efecto batocrómico ($\Delta\lambda_{max}$), es decir, el desplazamiento de la longitud de onda de absorción máxima, y/o un efecto hiperocrómico (ΔA), en el que la intensidad de un color de antocianina se fortalece por la copigmentación como se observa en la Figura 6 (Rein, 2005).

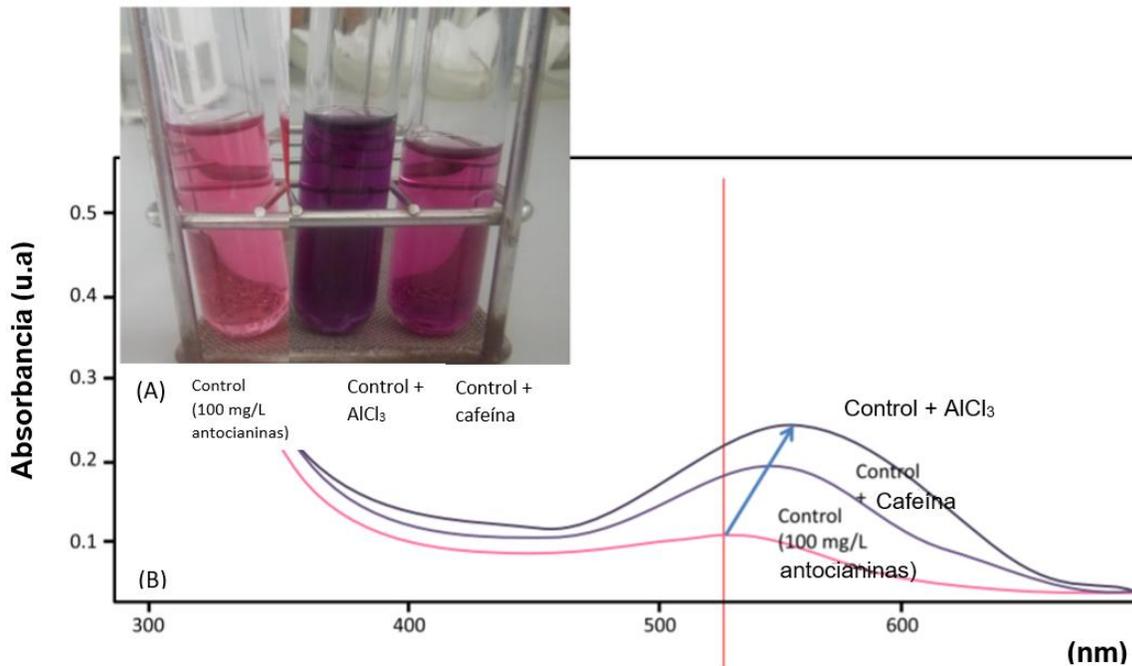


Figura 6. Copigmentación por complejación con iones metálicos (Al^{3+}) e intermolecular (cafeína). Efecto de copigmentación (A) en cambio de intensidad de color y (B) absorción de antocianinas (Morata, et. al. 2019)

4.8.2 Microencapsulación

Es una técnica empleada para la inmovilización e incorporación (atrapamiento) de un compuesto biológicamente activo dentro de partículas sólidas (microesferas) para estabilizar y proteger el compuesto activo (Heinzen, 2002).

Se han estudiado y empleado diversas técnicas para formar cápsulas entre las que se incluyen secado por aspersión, enfriamiento por aspersión, recubrimiento por extrusión, polimerización en emulsión, gelificación térmica e iónica, cocrystalización, etc (Cavalcanti, et. al. 2011).

4.8.3 Comparación entre mecanismos

A continuación, en la Tabla 8 se describen algunas de las ventajas y desventajas asociadas a la copigmentación y microencapsulación.

Tabla 8. Comparación entre mecanismos de estabilidad de antocianinas

Copigmentación		Encapsulación	
Ventajas	Desventajas	Ventajas	Desventajas
En la copigmentación intermolecular, generalmente la adición de mayor cantidad de copigmento favorece la estabilidad de pigmento	Es un mecanismo de conservación propio de antocianinas	Además de antocianinas es aplicable para varios tipos de compuestos bioactivos y otros como sabores, colores, grasas y aceites	Requiere de mayor procesamiento y maquinaria específica
Puede darse incluso en un concentrado de acuerdo con la composición de antocianinas mediante la interacción intramolecular	La aplicación de este mecanismo es generalmente a matrices en estado acuoso		Depende de las características, cantidad y la estabilidad del encapsulante
Los compuestos que pueden actuar como copigmentante pueden pertenecer a diversas clases como compuestos fenólicos incoloros (flavonoides), alcaloides, aminoácidos, entre otros	Los efectos copigmentantes son más pronunciados a bajas temperaturas	Existen diferentes técnicas: secado con aspersion, liofilización, entre otras	Depende de pH y temperatura
	Depende de pH y temperatura		Más costoso

Fuente: adaptación de Maite, *et. al.* 2018; Kammerer, 2016 y Ozkan *et. al.* 2018.

4.9 Zorzamora

La zorzamora es una baya cuyo color varía de rojo a morado como se observa en la Figura 7, la cual está formada por la unión de numerosos pequeños frutos semejantes a gotas, donde cada uno contiene una semilla.



Figura 7. Zorzamora (*Rubus spp.*)

De acuerdo con lo reportado en el Atlas Agroalimentario 2020 (SADER, 2021), la producción de zorzamora en México se ubica en el primer lugar mundial con la cantidad de 298,024 toneladas al año. En México, la producción se concentra principalmente en los estados del centro, como se observa en la Figura 8, se destacan Jalisco y Michoacán, siendo este último el que genera el 97.0% del total de la producción, equivalente a 44 mil 393 pesos por tonelada (SADER, 2021).



Figura 8. Principales estados productores de zorzamora en México. Atlas agroalimentario 2020. (SADER, 2021)

El mayor volumen de producción se obtiene en dos temporadas a lo largo del año, de abril a junio (38.6%) y de noviembre a diciembre (23.6%). Algunas de las características para el desarrollo de un cultivo de manera favorable son: alturas mayores a 500 metros sobre el nivel medio del mar, lluvia de 300 a 900 mm, temperatura de 5 a 22°C y suelos con buen drenaje (SADER, 2021).

Aproximadamente el 94% de las antocianinas presentes en la zarzamora son no aciladas, de las cuales el 90% están monoglicosiladas y las otras diglicosiladas (Wu, *et. al.* 2006).

Dentro de las que se han identificado, las mayoritarias son la cianidina-3-glucósido, seguida por la cianidina-3-arabinosa. Sin embargo, es posible que la presencia de dichas antocianinas sea diferente de acuerdo con las condiciones ambientales, el lugar de cultivo y el procesamiento posterior a la cosecha (Beattie, *et. al.* 2005). Entre las antocianinas variables en presencia y cantidad se encuentran: cianidina-3-rutinósido, perlargonidina-3-glucósido, cianidina-3-xilósido, cianidina-3-dioxalilglucósido, peonidina-3-glucósido, cianidina-3-(3-malonil) glucósido y cianidina 3-(6-malonil) glucósido (Wu, *et. al.* 2006).

Además, contiene una apreciable cantidad de flavonoles poco usuales en frutas, de los cuales nueve son derivados de la quercetina y tres del kaempferol. También cuenta con derivados de los ácidos hidroxicinámicos e hidroxibenzoicos, los cuales se han clasificado de la siguiente manera: ácido clorogénico, ácido neoclorogénico y ésteres de la glucosa de ácidos cafeico, *p*-cumárico, ferúlico (Schuster y Herrmann, 1985).

A pesar del alto contenido de antocianinas y otros compuestos fenólicos que contribuyen a la capacidad antioxidante y a la estabilidad; la zarzamora contiene en la pared celular algunas enzimas como polifenol oxidasa y peroxidasa que contribuyen al deterioro en la fruta fresca o en puré, cuyo resultado se refleja en la pérdida de textura y en la formación de pigmentos cafés afectando directamente sobre la aceptabilidad de la fruta (Kaume, *et. al.* 2012).

4.10 Yerba Mate

El té de Yerba Mate se elabora con hojas de *Ilex paraguariensis* (Figura 9), la cual es una planta nativa de Sudamérica. La bebida es conocida como mate, Yerba mate, té del Paraguay, *chimarrão*, y *tereré*. Se adoptó el nombre de *chimarrão* en Brasil, mate en Argentina y *tereré* en Uruguay. El mate y *chimarrão* se preparan adicionando agua caliente, pero difieren en el procesamiento de las hojas una vez cosechadas. Por su parte el *tereré* tiene el mismo proceso que las hojas de mate, pero se adiciona agua fría para su preparación (Bracesco, *et. al.* 2011).



Figura 9. Yerba mate (*Ilex paraguariensis*)

El mate se caracteriza por ser una fuente de compuestos fenólicos bioactivos, principalmente ácidos cafeoilquínicos los cuales como se observa en la Figura 10 se conforman de ácido quínico y ácido cafeico (Cardozo y Morand, 2016).

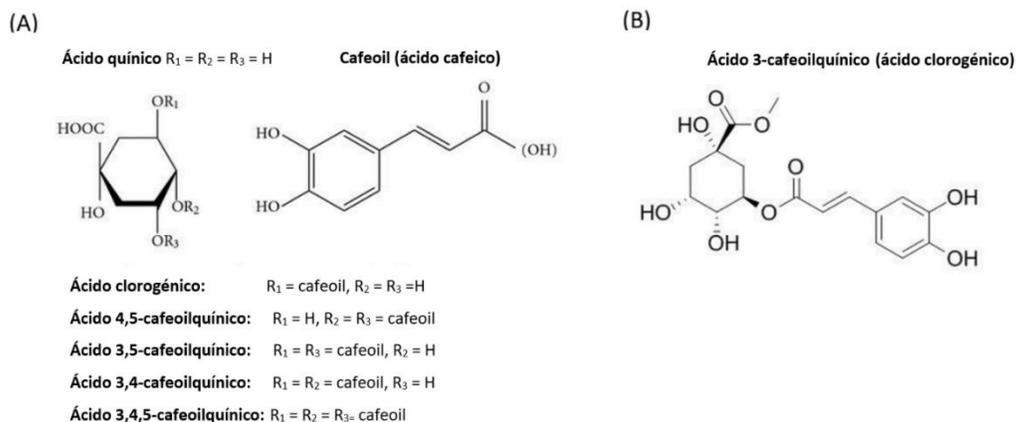


Figura 10. A) Estructura de ácidos cafeoilquínicos (Urushisaki, *et al.* 2011) B) Ejemplo de estructura (Herradón, 2013)

La planta se cultiva principalmente en Argentina, Brasil, Paraguay y Uruguay (Tabla 9); siendo Argentina el mayor productor de mate debido a que cuenta con 152,000 hectáreas de cultivo (Cardozo y Morand, 2016). De acuerdo con el Instituto Nacional de Yerba Mate Argentino hasta el mes de noviembre de 2019 se destinó una producción total de 37 mil toneladas al mercado externo.

Tabla 9. Lugares de cultivo de hojas de Yerba Mate en Sudamérica

Mapa	Nombre científico: <i>Ilex paraguariensis</i>	
 <p>1. Argentina</p> <p>2. Brasil</p> <p>3. Paraguay</p> <p>4. Uruguay</p>	Familia: Aquifoliaceae	
	País	Lugares de cultivo
	Argentina	Corrientes Misiones
	Brasil	Mato Grosso do Sul Minas Gerais Paraná Rio Grande do Sul Rio de Janeiro Santa Catarina Sao Paulo
	Paraguay	Alto Paraná Amambay Caaguazú Canindeyú Central Guairá Itapúa Misiones San Pedro
	Uruguay	Sin localidad destacada

Fuente: Heck y de Mejía, 2007.

Respecto a las condiciones de crecimiento, requiere de precipitación \geq a 1200 mm, puede soportar temperaturas de hasta -6°C , así como frecuentes nevadas; con una temperatura media anual de 21 a 22°C (Heck y de Mejía, 2007).

Para obtener el mate comercial argentino se sigue el proceso descrito en la Figura 11.

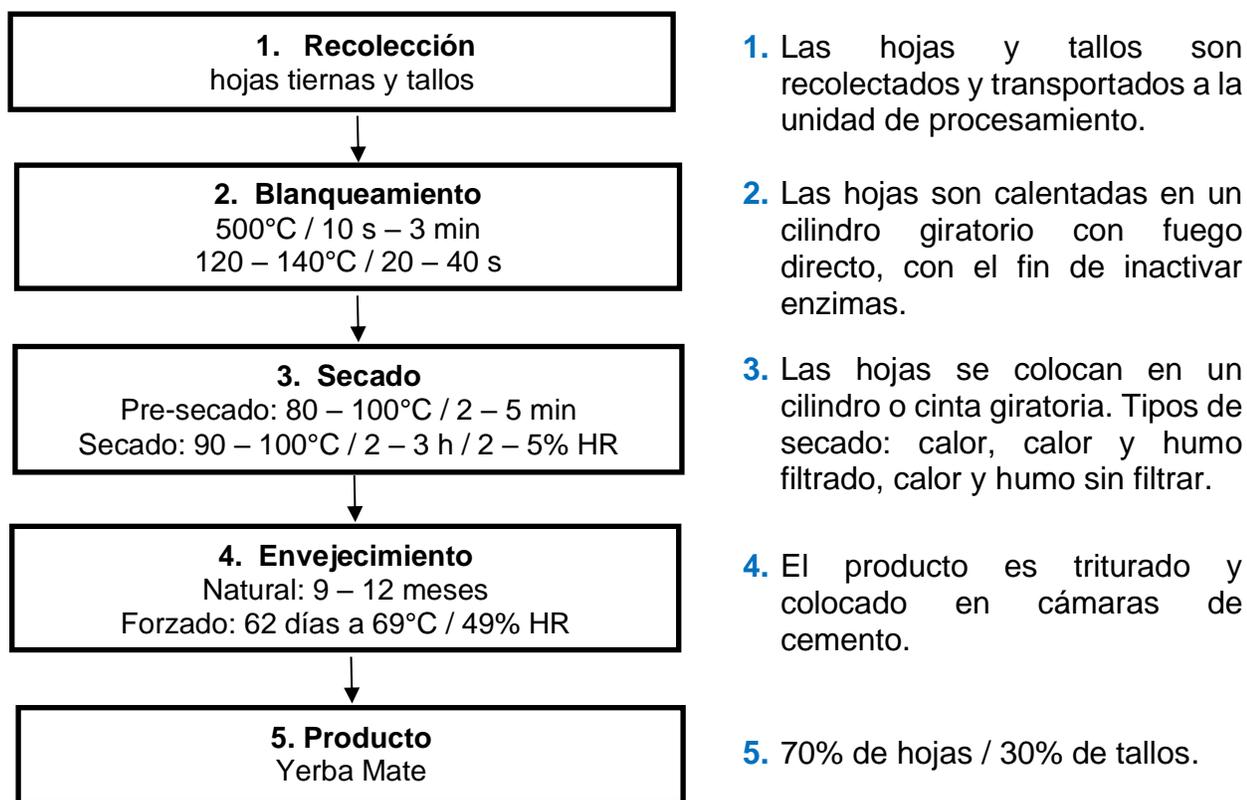


Figura 11. Proceso de elaboración de Mate (Schmalko y Alzamora, 2001)

Tiene un alto contenido en ácidos mono y dicafeoilquínicos: 74.03-78.52 mg/g de materia seca, equivalente al 90% del contenido fenólico (Bravo, *et. al.* 2007), conocidos por sus actividades biológicas (Upadhyay y Mohan, 2013) y la capacidad para estabilizar antocianinas. (Gras, *et. al.* 2018).

Además de diversos alcaloides como metilxantinas entre las que se incluyen la cafeína, teobromina y teofilina, adicionalmente contiene terpenos como saponinas (Heck y de Mejía, 2007).

Bracesco, N. y colaboradores reportaron en 2011 una composición de 5 g de compuestos fenólicos/L y 0.35 g de saponinas/L de extracto obtenido con agua caliente. A su vez, reportan una distribución mayoritaria observada en la Figura 12.

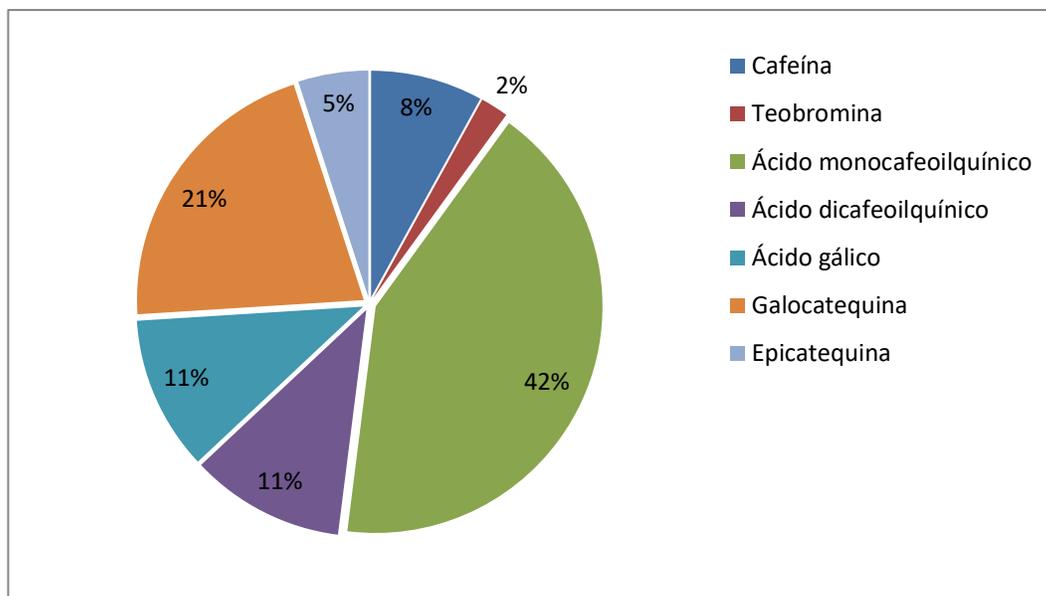


Figura 12. Principales componentes de Yerba Mate según Bracesco, et. al. 2011

Por su parte, Cardozo y Morand reportan en 2016 un contenido de compuestos fenólicos de 3767– 4085 mg, metixantinas de 303–962 mg y saponinas de 50–146 mg por una porción de 62.5 g de hojas secas considerado en la ingesta diaria por los consumidores. La composición varía en función del método de extracción, así como de las condiciones ambientales a las que está sometido previo a la recolección.

El ácido clorogénico se observa con mayor predominancia, no solo se encuentra como ácido 5-O-cafeoilquínico, sino como sus isómeros, ácido 3-O-cafeoilquínico y ácido 4-O-cafeoilquínico. Se observa lo mismo con los ácidos dicafeoilquínicos pues en mayor proporción se encuentra el ácido 3,5-dicafeoilquínico seguido de sus isómeros el ácido 4,5-dicafeoilquínico y finalmente el ácido 3,4-dicafeoilquínico (Marques y Farah, 2009; Bravo, et. al. 2007; Peres, et. al. 2013). De estos compuestos se han realizado diversos estudios *in vivo* e *in vitro* cuyos resultados muestran actividad antioxidante, antiinflamatoria (Sato, et. al. 2011); induce efectos hipoglucémicos (Ong, et. al. 2011), mejora el metabolismo de lípidos y presenta propiedades para evitar la ganancia de peso en dietas con alto contenido de grasa (37% de calorías provenientes de grasas) (Cho, et. al. 2010).

Por su parte, en humanos se han realizado pocos estudios, pero se ha observado un aumento significativo en la actividad antioxidante del plasma en sangre; así como la protección de la oxidación de los LDL esto a una hora posterior al consumo de una solución comercial estandarizada (Arçari, *et. al.* 2011; Silva, *et. al.* 2008).

Debido a la concentración de los compuestos biológicamente activos, el consumo de la Yerba Mate está ganando una rápida aceptación en el mercado mundial, ya sea simplemente como té o como ingrediente en alimentos formulados o suplementos (Heck y de Mejía, 2007).

4.11 Disminución en el uso de colorantes artificiales

El color es un atributo sensorial en alimentos que generalmente contribuye al éxito de un producto, debido a que el consumidor lo asocia al sabor, seguridad, valor nutrimental, entre otros factores. Históricamente los colores sintéticos adquirieron popularidad debido al bajo costo de producción, alta capacidad de tinción y la estabilidad química. No obstante, la demanda del consumidor ha sido impulsora para el reemplazo de colorantes artificiales con los derivados de fuentes naturales, esto debido a la búsqueda de productos más “naturales” y también asociado a los efectos vinculados al uso de colorantes artificiales (Sigurdson, *et. al.* 2017).

El uso de colorantes artificiales se ha asociado a trastornos de déficit de atención en niños, si bien no son la causa principal del déficit, puede contribuir en algunos casos (Arnold, *et. al.* 2012).

Algunos colorantes como rojo 40, amarillo 5 y amarillo 6 contienen bencidina, un carcinógeno humano y animal, el cual es permitido por la FDA en niveles bajos (1ppb) (Potera, 2010).

5. Metodología general

5.1 Diagrama de metodología general

La Figura 13 muestra la metodología general empleada para el desarrollo de una bebida de zarzamora (*Rubus spp.*) y Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*), así como las determinaciones posteriores: determinación cuantitativa (Figura 14), evaluación microbiológica y evaluación sensorial. Cuyos fundamentos se encuentran en el Anexo 9.1.

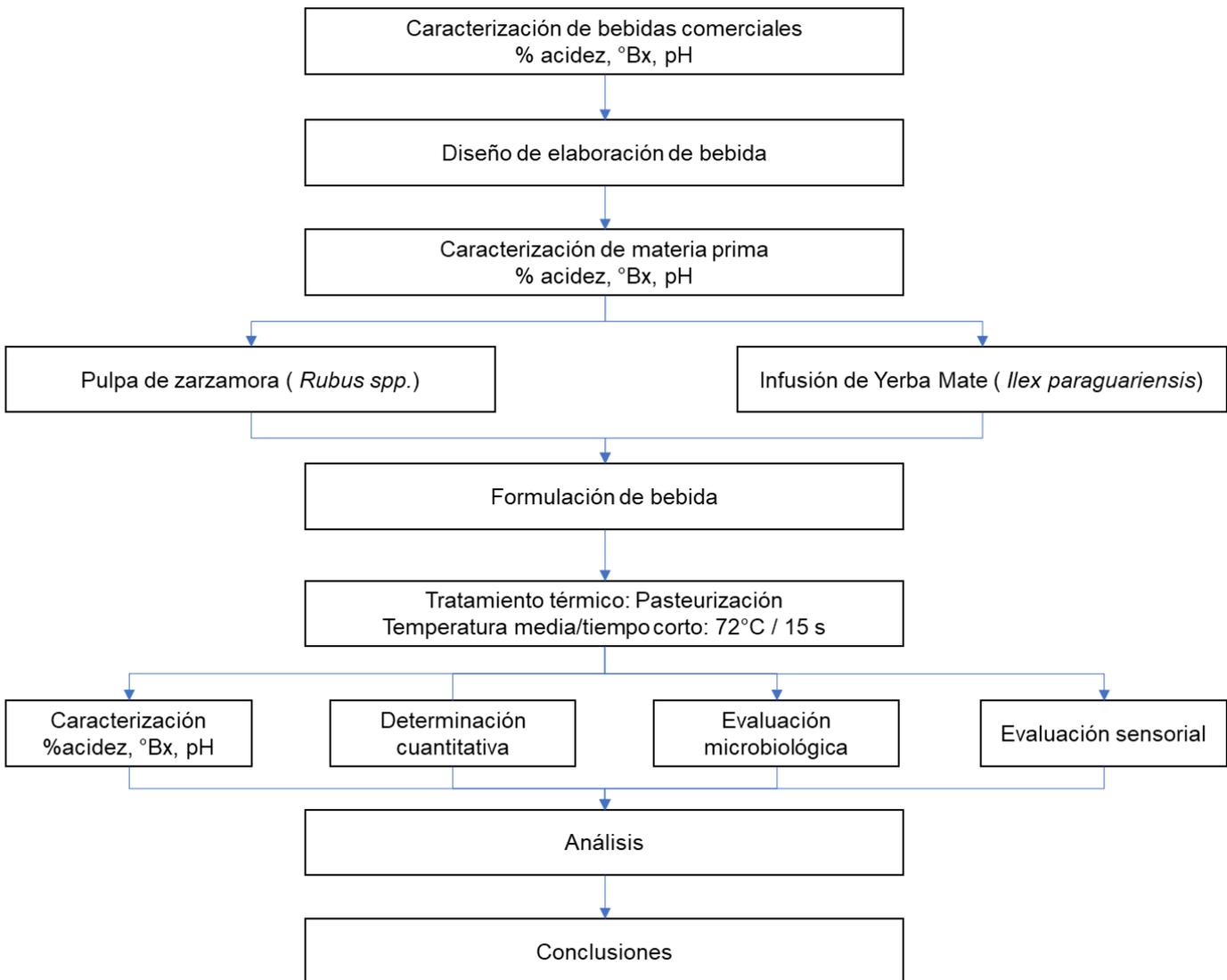


Figura 13. Diagrama de metodología general

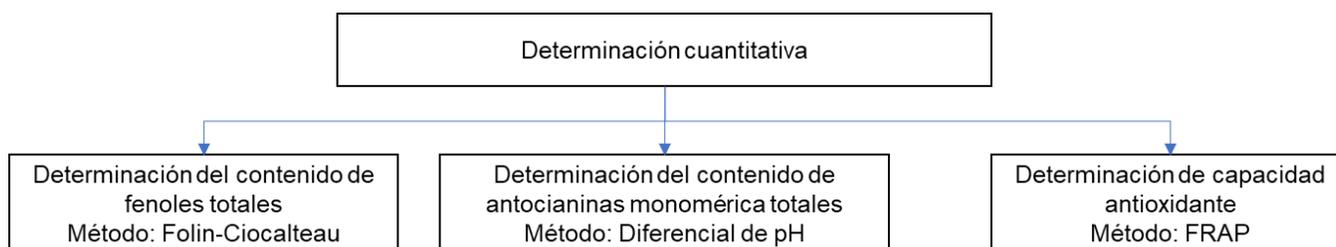


Figura 14. Diagrama de determinación cuantitativa

5.2 Caracterización de bebidas comerciales y diseño de formulaciones

Previo al desarrollo de la formulación, se caracterizaron bebidas comerciales y la pulpa de zarzamora mediante la medición de: % acidez, °Bx y pH. Las bebidas comerciales fueron evaluadas con el objetivo de definir los parámetros para el desarrollo de formulaciones y la pulpa con el fin de ajustar por medio de balance de materia la cantidad de azúcar, ácido cítrico y agua añadida para la elaboración de la bebida.

5.3 Obtención de muestras

Zarzamora

La fruta fue adquirida en el mercado de Xochimilco, durante los meses de febrero a marzo de 2018. Se utilizó para la obtención de extractos y elaboración de la bebida.

Yerba Mate

Se adquirió una muestra comercial de la marca Taragüi®, importada de Argentina cuya información adicional se encuentra en la Tabla 10.

Tabla 10. Información nutrimental de Yerba Mate marca Taragüi®

Lote: L12517 Fecha de consumo preferente: 06/2019 Contenido Neto: 1 kg	
Información nutrimental por 100 g	
Porciones por envase	10
Contenido energético	253.3 kJ (59.6 kcal)
Proteínas	2.9 g
Grasas (Lípidos)	0 g
Grasa Saturada	0 g
Carbohidratos	12 g
Azúcares	0 g
Fibra dietética	0 g
Sodio	122 mg

Una vez abierto, se almacenó en su envase original, sellado en un lugar fresco y seco.

5.4 Determinación de acidez

Se realizó de acuerdo con el método AOAC 942.15 mediante el uso del potenciómetro OAKTON ion 510 series hasta alcanzar un pH de 8.1 ± 0.2 con hidróxido de sodio 0.1 N.

El resultado se expresó en g de ácido málico por 100 g de muestra.

5.5 Determinación de sólidos solubles totales (grados °Bx)

Se realizó siguiendo la metodología establecida por AOAC 932.12 con un refractómetro Master-53M ATAGO.

5.6 Medición de pH

Se realizó la metodología AOAC 981.12 con un potenciómetro OAKTON ion 510 series.

5.7 Obtención de extractos de materia prima

Se utilizaron 30 mL de disolvente (etanol: agua 1:1) por cada gramo de muestra. La mezcla se mantuvo en agitación durante 45 min con parrilla de agitación magnética a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, se filtró dos veces a través de un embudo *Büchner* y se procedió a realizar las determinaciones cuantitativas.

5.8 Obtención de infusión de Yerba Mate

Se añadió en dos fracciones 40 mL de agua potable temperatura de $65^{\circ}\text{C} \pm 1.0^{\circ}\text{C}$ a 5.0 ± 0.5 g de Yerba Mate.

Se inició agregando aproximadamente 10 mL para humedecer y después se vertió la fracción restante y se mantuvo en agitación durante 20 minutos. Transcurrido el tiempo, se filtró a través de un embudo *Büchner*.

5.9 Obtención de pulpa

La fruta adquirida se desinfectó utilizando Mycrodyn[®], la dosificación se realizó con base en lo establecido por el producto. Posteriormente, se retiró de la disolución desinfectante, se pesó, se licuó y se filtró a través de un colador a fin de remover las semillas; la pulpa obtenida se colocó en recipientes de vidrio, se tapó y se almaceno en refrigeración hasta su uso.

5.10 Formulación de bebida

Se propusieron tres formulaciones modificando el contenido de pulpa como se muestran en la Tabla 11. Se adicionaron los ingredientes en el orden siguiente: pulpa, infusión de Yerba Mate, agua, azúcar y acidulante, se homogeneizó, posteriormente se sometió a pasteurización rápida (72°C, 15 s) y se envasó en caliente en envases de vidrio previamente esterilizados. Finalmente, se realizó el choque térmico y se almacenó en refrigeración para su posterior análisis.

Tabla 11. Especificaciones de las formulaciones de bebida propuestas

	Formulación 1	Formulación 2	Formulación 3
% Pulpa	25	15	10
°Bx	12	7	5
% Infusión de Mate	5	5	5
% Acidez	0.3	0.4	0.3

Un día después a la elaboración de las formulaciones 2 y 3, se caracterizaron bajo los mismos parámetros establecidos para la fruta (%acidez, °Bx y pH) además se determinó la capacidad antioxidante, el contenido de antocianinas monoméricas totales y fenoles totales. También, se realizó monitoreo durante 22 días de la capacidad antioxidante, antocianinas y fenoles totales. El último día de evaluación, cada formulación se caracterizó nuevamente mediante la medición de pH, %acidez y °Bx.

5.11 Determinación del contenido de fenoles totales: por método de Folin-Ciocalteu

Una vez obtenidos los extractos, las formulaciones o diluciones, se tomaron 500 μ L y se colocaron en tubos de ensayo, se adicionaron 2.5 mL de reactivo Folin-Ciocalteu (0.2 N), transcurridos 5 minutos, se adicionaron 2.0 mL de Na_2CO_3 (75 g/L).

Se dejó reposar durante 2 horas en la oscuridad a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a través del espectrofotómetro UV/VIS a 760 nm.

La determinación se realizó por triplicado y en caso de ser necesario, se realizaron las diluciones correspondientes. Se expresó el promedio de contenido de fenoles totales en mg de ácido gálico (GAE)/g de muestra en los extractos y en las formulaciones en mg de equivalentes de ácido gálico (GAE)/g de bebida.

Curva de calibración

A partir de una disolución 0.1 g/L de ácido gálico (GAE) se realizó una curva de calibración de siete puntos: 0, 11, 34, 46, 56, 67 y 100 mg/L.

5.12 Determinación del contenido de antocianinas monoméricas totales.

Con los extractos previamente obtenidos y las distintas formulaciones, se realizaron diluciones en una disolución amortiguadora de cloruros pH 1.0. De las cuales se tomó 1.0 mL y se mezcló con 4.0 mL de una disolución amortiguadora de cloruros pH 1.0 en un tubo de ensayo. En otro tubo de ensayo se tomó 1.0 mL del extracto o formulación y se mezcló con 4.0 mL de una disolución amortiguadora de acetatos pH 4.5.

A cada solución, se le midió la absorbancia a 510 nm y 700 nm en un espectrofotómetro UV/VIS, utilizando una disolución amortiguadora de cloruros como blanco.

La medición se realizó por triplicado y se expresó el promedio del contenido de antocianinas en función del volumen del disolvente y la cantidad de muestra, en mg de cianidina 3-glucósido/g de muestra o bebida.

5.13 Determinación de capacidad antioxidante: Método de FRAP

Se empleó la metodología de Benzie y Strain (1996) con algunas modificaciones, previo a la reacción se preparó el reactivo de FRAP con una disolución amortiguadora de acetatos (pH 3.6, 300 mM), TPTZ (10 mM) y $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (20 mM) en proporciones 10:1:1.

Con los extractos y formulaciones previamente preparados o sus diluciones, en un tubo de ensayo se tomaron 150 μL y se adicionaron 2.85 mL de reactivo de FRAP. Para cada muestra se elaboró un blanco de muestra con la misma cantidad de extracto y 2.85 mL de disolución EtOH- H_2O .

Se agitó y se dejó reposar a temperatura ambiente, en oscuridad durante 20 minutos. Transcurrido el tiempo, se midió la absorbancia en un espectrofotómetro UV/VIS a 593 nm.

La medición se realizó por triplicado y se expresó el promedio de la capacidad antioxidante en función del volumen del disolvente y la cantidad de muestra en μmol de Fe^{2+} /L o g de muestra.

Curva de calibración

Simultáneamente se realizó una curva de calibración de seis puntos: 0, 5, 10, 15, 20 y 25 μmol de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ /L con una disolución patrón de sulfato ferroso $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1000 μM .

La curva de calibración se elaboró cada vez que se realizó la medición de capacidad antioxidante.

5.14 Evaluación microbiológica

La evaluación microbiológica se realizó a las formulaciones 2 y 3 posterior a su elaboración y después de 22 días de almacenamiento en condiciones de refrigeración: 6-8°C. Para ello, las formulaciones se elaboraron con el mismo lote de pulpa, una vez pasteurizadas se almacenaron en envases de vidrio, previamente esterilizados, se sellaron y almacenaron en refrigeración.

El análisis se llevó a cabo en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM de acuerdo con la NOM-218-SSA1-2011 Productos y servicios. Bebidas saborizadas no alcohólicas, sus congelados, productos concentrados para

prepararlas y bebidas adicionadas con cafeína. Especificaciones y disposiciones: mesófilos aerobios (UFC/mL) y coliformes totales (NMP/mL).

5.15 Evaluación sensorial

Para la evaluación sensorial se aplicó una prueba afectiva a 60 potenciales consumidores pertenecientes a la comunidad de la Facultad de Química. Para la prueba se empleó un cuestionario con escalas del nivel de agrado, *Just Right About* (JAR) además se evaluó la intención de compra. El cuestionario utilizado se muestra en el Anexo 9.2.

A las formulaciones 2 y 3, se les asignó claves aleatorias (Tabla 12), se evaluaron en frío. Los panelistas contaban con un vaso con agua purificada y se les pidió limpiar su paladar entre cada evaluación.

Tabla 12. Claves utilizadas para evaluación sensorial

Formulación	Claves	
2	524	599
3	272	719

De acuerdo con la escala del nivel de agrado, se evaluó la bebida en general y los atributos de apariencia tales como: color, espesor y acidez, la cual se presenta a continuación:

Clave	Me gusta muchísimo	Me gusta moderadamente	No me gusta ni me disgusta	Me disgusta moderadamente	Me disgusta muchísimo

Con la escala JAR se evaluaron los atributos de dulzor y nota herbal característica de Mate, cuya escala se presenta a continuación:

Clave	Mucho más dulce de lo que me gusta	Más dulce de lo que me gusta	Justo como me gusta	Menos dulce de lo que me gusta	Mucho menos dulce de lo que me gusta

5.16 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el paquete de cómputo SPSS versión 25. Para las determinaciones cuantitativas obtenidas durante el almacenamiento, se realizó un análisis de varianza de un factor (ANOVA) con un nivel de significancia de 0.05 para evaluar el deterioro a través del tiempo de cada una de las formulaciones, mientras que para las pruebas *a posteriori* se utilizó el método Tukey. Adicionalmente, se realizaron pruebas *t-student* para demostrar la diferencia entre cada una de las muestras con relación al porcentaje de pérdida cuantitativa del contenido de fenoles totales, antocianinas y capacidad antioxidante (Anexo 9.3). Para la evaluación sensorial se empleó el análisis *t-student* junto con la norma ISO 5495 empleada para pruebas pareadas (Anexo 9.5).

6. Resultados y discusión

6.1 Caracterización de bebidas comerciales

Se realizó la caracterización de dos bebidas comerciales mediante la determinación de °Bx, pH y %acidez (Tabla 13). El perfil de estas bebidas se relaciona con la bebida a desarrollar, ya que incorporan infusiones de té o algunos extractos ricos en antioxidantes.

Tabla 13. Caracterización de bebidas comerciales

	Bebida	
	Antiox del Valle [®]	Fuze Tea [®]
Descripción	Néctar de manzana con extracto de granada	Té verde con jugo de limón
Marca	Jugos del Valle S.A.P.I de CV	
Presentación	237 mL	600 mL
°Bx	13.50 ± 0.01	7.00 ± 0.01
pH	2.78 ± 0.01	3.13 ± 0.01
Contenido de azúcar en 200 mL (declarado en la etiqueta)	31.0 g	13.0 g
Contenido energético (declarado en la etiqueta)	527 kJ (124 kcal) en 250 mL	221 kJ (52 kcal) en 200 mL
Información adicional	No cuenta con edulcorantes artificiales ni conservadores	Cuenta con estevia (6.2 mg/100 g)

Con los análisis de las bebidas comerciales se fijaron los parámetros para el desarrollo de las formulaciones. Como se observa en la Tabla 14, se realizaron propuestas con un contenido en grados °Bx menor al reportado por las bebidas comerciales, esto con el fin de disminuir el aporte calórico y mantener a la pulpa como la principal fuente de aporte de azúcar. La incorporación de la infusión de Yerba Mate se propuso para obtener un producto funcional. A pesar de las modificaciones, se mantuvieron parámetros similares a los comerciales en cuanto a la acidez y dulzor para favorecer la aceptación por el consumidor.

Tabla 14. Parámetros de propuesta de bebidas.

	Formulación 1	Formulación 2	Formulación 3
°Bx	12	7	5
% Acidez	0.3	0.4	0.3
Infusión	Inclusión de infusión de Yerba Mate		

Se consultó la norma por la cual se rigen las bebidas analizadas, la NOM-218-SSA1-2011, (Productos y servicios. Bebidas saborizadas no alcohólicas, sus congelados, productos concentrados para prepararlas y bebidas adicionadas con cafeína. Especificaciones y disposiciones sanitarias. Métodos de prueba) con el fin de identificar parámetros de referencia a cumplir, no obstante, en ésta únicamente se muestran las especificaciones microbiológicas y del contenido de materia extraña.

6.2 Determinación cuantitativa de materia prima

Se llevó a cabo la caracterización de la materia prima: pulpa de zarzamora y extracto de Yerba Mate.

Con relación a la pulpa de zarzamora, la Tabla 15 muestra los resultados obtenidos de la determinación cuantitativa; debido a la naturaleza de la materia prima y a su variación por el estado de maduración, se caracterizó cada lote y se presentó el intervalo de los valores obtenidos.

Comparado con los resultados de referencia, se observa que los distintos lotes evaluados se encuentran en algunos casos por arriba o debajo de los reportados y esto se relaciona en gran medida por los factores indicados a continuación:

- La cantidad de extracciones y los métodos utilizados, debido a que los autores citados incorporan disolventes acidificantes (ácido acético y fórmico) y la combinación acetona-agua. El uso de ácidos débiles como ácido fórmico, acético, cítrico o tartárico, minimizan la descomposición de los pigmentos debido a que las mantiene en forma de catión flavilio (Rodríguez-Saona y Wrolstad, 2001). Por otro lado, el uso de acetona-agua ha mostrado favorecer la extracción de compuestos fenólicos en algunas moras por la solvatación de los componentes resultando en una mayor interacción con los disolventes (Boeing, *et. al.* 2014).
- El estado de maduración, debido a que en un estudio realizado por Acosta-Montoya y colaboradores en 2010, muestra que a medida que las zarzamoras maduran, adquieren un color rojizo de mayor intensidad, aumentando por ende el contenido de antocianinas, sin embargo, el contenido de fenoles no muestra un comportamiento específico. Relacionado

a los resultados obtenidos, se encuentran próximos a la mitad del intervalo reportado, lo que sugiere que las frutas analizadas se encontraban en un estado medio de maduración.

- Las condiciones climáticas, ya que al contrastar los estudios realizados por Šamec, D. y Piljac-Žegarac en Croacia en 2011, con De Souza, V. R. y colaboradores en Brasil en 2014, el contenido de compuestos fenólicos de este último ($8.50 + 0.05$ mg GAE / g de muestra fresca) es 133.51% más que el primero ($3.64 + 0.09$ mg GAE / g muestra fresca), contrario a lo observado en las antocianinas. Encontrándose así los valores experimentales en un intermedio entre estos dos.
- La especie, ya que en el estudio por Denardin y colaboradores en 2015, a pesar de ser zarzamoras procedentes de una misma región, la cantidad de compuestos fenólicos difiere. Éstos al tratarse de metabolitos secundarios para la planta, son afectados por la expresión genética, modificando así la cantidad (Peñarrieta, *et. al.* 2014).

Por otra parte, y a pesar de encontrarse cerca de los valores de referencia, es importante destacar que también se pueden ver afectados por la temporada de cosecha. La zarzamora se colectó entre los meses de febrero y marzo, mientras que la SADER indica que la mayor producción en México es entre los meses de mayo y junio.

Tabla 15. Determinación cuantitativa de compuestos fenólicos, antocianinas totales y capacidad antioxidante en *Rubus spp.*

Parámetro	Experimental	Valor de referencia	Región	Disolvente utilizado	Referencia
Concentración de fenoles totales (mg de equivalentes de ácido gálico/g de muestra fresca)	4.11 ± 0.40 – 4.35 ± 0.17	8.50 + 0.05 mg GAE / g de muestra fresca	Brasil	1era extracción: metanol-agua	De Souza, <i>et. al.</i> 2014
				2da extracción; acetona-agua	
		8.16 ± 0.63 mg GAE / g de muestra fresca zarzamora Xavante	Nativas de Brasil	Etanol 95%	Denardin, <i>et. al.</i> 2015
		7.19 ± 0.59 mg GAE / g de muestra fresca zarzamora Cherokee			
		3.64 ± 0.09 mg GAE / g muestra fresca	Croacia	Tres extracciones: 70% acetona, 28% agua y 2% ácido acético	Šamec y Piljac-Žegarac, 2011
4.6 ± 0.6 - 5.8 ± 0.2 mg GAE / g de muestra fresca	Costa Rica	70 % acetona, 2% ácido fórmico y agua	Acosta-Montoya, <i>et. al.</i> 2010		
Concentración de antocianinas monoméricas totales (mg de cianidina 3-glucósido/g de muestra fresca)	0.61 ± 0.27 – 0.64 ± 0.02	0.58 ± 0.02 mg de cianidina 3-glucósido/g de muestra fresca	Brasil	1era extracción: metanol-agua	De Souza, <i>et. al.</i> 2014
				2da extracción; acetona-agua	
		1.22 ± 0.02 mg de cianidina 3-glucósido/g de muestra fresca	Croacia	Tres extracciones: 70% acetona, 28% agua y 2% ácido acético	Šamec y Piljac-Žegarac, 2011
		0.09 ± 0.02 - 0.77 ± 0.11 mg de cianidina 3-glucósido/g de muestra fresca	Costa Rica	70 % acetona, 2% ácido fórmico y agua	Acosta-Montoya, <i>et. al.</i> 2010
Capacidad antioxidante (µmol Fe²⁺ /g de muestra fresca)	65.21 ± 2.68 – 69.05 ± 3.39	39 µmol Fe ²⁺ / g de muestra fresca	Croacia	Tres extracciones: 70% acetona, 28% agua y 2% ácido acético	Šamec y Piljac-Žegarac, 2011

Tabla 16. Determinación cuantitativa de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de extractos de *Ilex paraguariensis* (Yerba Mate)

Parámetro	Experimental	Valor de referencia	Región	Marca comercial	Disolvente utilizado	Referencia
Concentración de fenoles totales (mg de equivalentes de ácido gálico/g de muestra base seca)	69.28 ± 1.71	94.91 ± 4.18 mg GAE / g de muestra seca	Argentina	Romance	2.7 g de hojas secas en 250 mL de agua a 98°C por 10 min	Chandra y González de Mejía, 2004
		103 ± 3 mg GAE /g de muestra seca		La Silueta- Las Marías	5 g de muestra triturada con 100 mL de agua destilada a reflujo (95°C) durante 30 min	Ranilla, <i>et. al.</i> 2010
		Intervalo: 90.4 ± 9.9 – 176.1 ± 15.6 mg GAE /g de muestra seca Promedio: 136.8 ± 24.8 mg GAE /g de muestra seca	Argentina	Muestras comerciales no identificadas	2.7 g de hojas secas en 250 mL de agua a 98°C por 10 min Promedio de muestra de diferentes zonas	De Mejía, <i>et. al.</i> 2010
		Intervalo: 39.7 ± 1.7 – 107.7 ± 4.2 mg GAE /g de muestra seca Promedio: 85.9 ± 22.4 mg GAE /g de muestra seca.	Argentina y Estados Unidos		Promedio de muestras con otros ingredientes de aporte de sabor: tallos y otras flores	
Capacidad antioxidante (µmol Fe²⁺ /g de muestra seca)	772.03 ± 16.73	Sin referencia				

La Tabla 16 describe los resultados obtenidos del extracto de Yerba Mate junto con algunos valores de referencia, los cuales son distintos entre ellos y al ser comparados, los experimentales se encuentran por debajo.

- Esto puede deberse a distintas razones entre las que se incluye el origen geográfico y composición. Ejemplo de ello es el estudio realizado por De Mejía y colaboradores en 2010, en el cual obtuvieron el contenido fenólico tras el análisis de muestras comerciales de diferentes regiones en Argentina y Estados Unidos. Agrupándolas en tradicionales y no tradicionales, las primeras únicamente compuestas de hojas; las segundas con inclusión de tallos, otros frutos, cafeína, hierbas y azúcar. Los resultados del primer grupo muestran un intervalo de $90.4 \pm 9.9 - 176.1 \pm 15.6$ mg GAE / g de muestra seca mientras que el segundo de $39.7 \pm 1.7 - 107.7 \pm 4.2$ mg GAE / g de muestra seca siendo muy distantes. Debido a ello, es de esperar que el valor obtenido de la Yerba Mate del estudio presente una diferencia, ya que la muestra empleada además incluye palo (tallos), lo que resulta en menos hojas por volumen total.
- También, esta investigación y la de Chandra y González de Mejía en 2004, muestran la diferencia que puede presentarse entre marcas comerciales a pesar de emplear la misma metodología de extracción. Esto a razón del contenido fenólico reportado por De Mejía y colaboradores en 2010 en varias muestras de distintas marcas de una misma región de Argentina: Buenos Aires ($90.4 \pm 9.9 - 162.3 \pm 2.4$ mg GAE / g de hojas secas), Corrientes ($112.3 \pm 14.8 - 155.6 \pm 41.2$ mg GAE / g de hojas secas) y 94.91 ± 4.18 mg GAE / g de muestra seca por Chandra y González de Mejía en 2004. Lo que puede estar relacionado con el procesamiento industrial o la temporada en la que dichas muestras fueron recolectadas.
- El método de extracción es otro de los factores que tiene influencia sobre el contenido, debido a que los estudios de referencia utilizan agua como disolvente de extracción y temperatura superior a los 90°C , lo que sugiere que la extracción de compuesto fenólicos se favorece con agua y a temperaturas altas.

Debido a ello, se procedió a la obtención de la infusión de Yerba Mate mediante la extracción con agua a 65°C, en agitación constante durante 20 minutos, esto con el fin de proveer de un mayor contenido de compuestos fenólicos, dicha temperatura fue seleccionada por la preparación sugerida por fabricante en la etiqueta. El uso de agua como disolvente permite la incorporación de la infusión con mayor facilidad a los alimentos con la ventaja de ser un disolvente inocuo.

Tabla 17. Evaluación de capacidad antioxidante y fenoles totales de obtención de infusión (Yerba Mate).

Parámetro	Unidades	Primera extracción	Segunda extracción
Concentración de fenoles totales	mg de GAE / g de muestra	76.13 ± 2.67	11.73 ± 0.25
	mg de GAE/ g de infusión	10.12 ± 0.35	1.47 ± 0.031
Capacidad antioxidante	µmol Fe ²⁺ / g de muestra	735.32 ± 1.53	246.79 ± 2.02
	µmol Fe ²⁺ / g de infusión	99.11 ± 0.19	31.03 ± 0.25

A través de los resultados de la Tabla 17 es posible notar que el uso de agua caliente (65°C) favorece la extracción en comparación con los resultados obtenidos con etanol-agua. Para evaluar la eficiencia, se realizó una segunda extracción en la cual se obtuvo una cantidad considerablemente menor por lo que sólo se seleccionó una extracción, a pesar de ellos los resultados muestran un contenido distinto a los reportados en la Tabla 16.

Sin embargo, las diferencias pueden estar relacionadas con algunos de los factores indicados con anterioridad: la región, la época de cosecha y el tratamiento térmico utilizado durante su procesamiento.

6.3 Desarrollo de formulaciones

Se procedió a realizar la primera formulación, sin embargo, se descartó de inmediato debido a que presentó aspecto espeso, superior al observado en los néctares comerciales.

Por ello se realizó el resto de las formulaciones, para lo cual se caracterizó el lote de zarzamora, cuya fruta fue desinfectada con plata coloidal (Marca comercial Mycrodyn®), que presenta actividad para la reducción de la población de microorganismos patógenos (Mijnendonckx, *et. al.* 2013; Rangel-Vargas, *et. al.* 2016) y de algunos hongos (Monteiro, *et. al.* 2011).

Tabla 18. Caracterización de pulpa de zarzamora

	pH	°Bx	%Acidez (ácido málico)	
Formulación 2 (15% de pulpa)	3.53 ± 0.01	13.5 ± 0.01	1.04 ± 0.09	
Formulación 3 (10 % de pulpa)	3.37 ± 0.01	12.00 ± 0.01	1.37 ± 0.01	
Referencia	3.41 ± 0.08	9.00 ± 0.01	1.48 ± 0.02	Veliz, <i>et. al.</i> 2017

La Tabla 18 muestra los resultados obtenidos de la caracterización de la pulpa para la elaboración de las formulaciones 2 y 3, valores que son indicativos de frutos maduros en ambas pulpas; esto tras la cercanía o valores superiores a lo reportado por Veliz y colaboradores en 2017 cuyos datos corresponden al estudio de zarzamora silvestre de origen mexicano. Además, esto también se sustenta por el contenido de sólidos solubles totales (°Bx) obtenidos, ya que a medida que el fruto madura, ese valor tiende a aumentar y se acompaña de un decremento en la acidez titulable (Carvalho y Betancur, 2015).

De manera simultánea, con dichas pulpas se elaboraron las formulaciones sin infusión, como comparativo del deterioro del contenido de compuestos fenólicos, antocianinas y la actividad antioxidante.

Tras el procesamiento de las pulpas y, para garantizar la inocuidad de cada una de las formulaciones, se llevó a cabo un proceso de pasteurización, debido a que sigue siendo el método más rentable para asegurar la inocuidad (Rawson, *et. al.* 2011).

Dicha pasteurización se llevó a cabo a una temperatura media durante un periodo de tiempo corto (MTST): $<80^{\circ}\text{C}$ durante un tiempo ≤ 30 segundos (Petruzzi, *et. al.* 2017), la seleccionada fue de $72^{\circ}\text{C} \pm 1.0^{\circ}\text{C}$ durante 15 ± 2.0 segundos, realizado esto, se almacenaron en frascos de vidrio esterilizados y se realizó un choque térmico con agua fría.

Se seleccionaron dichas condiciones debido a que de acuerdo con Petruzzi, L. y colaboradores en 2017, existe una reducción significativa de los microorganismos patógenos en distintas bebidas de frutas sin tener en la mayoría de los casos un efecto significativo sobre las propiedades sensoriales. En contraste, una mayor temperatura puede tener un efecto sobre los compuestos antioxidantes reduciendo los efectos benéficos hacia la salud o cambios sensoriales en relación con la apariencia, textura y color.

Posteriormente, se caracterizaron las bebidas, como se observa en la Tabla 19. Donde cada uno de los productos cumple con lo establecido en la Tabla 14 de las propuestas de las bebidas a elaborar. A su vez, es posible notar que la bebida sin infusión, a pesar de contener el mismo porcentaje de acidez, el pH difiere ligeramente en aquellas bebidas que incorporan la infusión, esto posiblemente se deba a la naturaleza de la infusión, ya que se ha descrito que a partir de té listos para el consumo de Yerba Mate (*chimarrão*), el pH de la infusión es cercano a la neutralidad 7.10 ± 0.01 (Lunkes y Hashizume, 2014). Por lo que, al incorporarlo en una pequeña proporción, genera una modificación, pero no así en la acidez titulable.

Tabla 19. Caracterización de formulaciones iniciales.

		pH	°Bx	%Acidez (m/v)
Formulación 2	15% pulpa + infusión	3.22 ± 0.01	7.0 ± 0.1	0.40 ± 0.01
	15 % de pulpa sin infusión	3.11 ± 0.01	7.0 ± 0.1	0.40 ± 0.01
Formulación 3	10% pulpa + infusión	3.23 ± 0.01	5.0 ± 0.1	0.33 ± 0.01
	10 % de pulpa sin infusión	3.05 ± 0.01	5.0 ± 0.1	0.33 ± 0.01

Las formulaciones elaboradas cuentan con un pH ligeramente superior que las bebidas comerciales analizadas en la Tabla 13 (<1 unidad), sin embargo, esto se asocia a que las bebidas comerciales incorporan frutas en diferentes formas: néctar de manzana, extracto de granada y jugo de limón.

6.4 Efecto del almacenamiento sobre el contenido de compuestos fenólicos, antocianinas totales y capacidad antioxidante

Posterior a la caracterización cuantitativa y obtención de resultados de la materia prima, se procedió a realizar la estimación de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de las formulaciones 2 y 3 (Tabla 20); sólo con el uso de la primera extracción de la infusión de Yerba Mate (Tabla 17). A partir de la cual, es posible notar que en la formulación 2 el aporte de la pulpa de zarzamora corresponde al mayoritario en cuanto al contenido de compuesto fenólicos y de capacidad antioxidante. Por su parte, en la formulación 3 la proporción del aporte por ambos ingredientes es similar.

Tabla 20. Estimado de composición en determinaciones cuantitativas

	Parámetro	Unidades	Pulpa de <i>Rubus spp.</i>	Infusión de <i>Ilex Paraguariensis</i>	Total
Formulación 2	Folin-Ciocalteu	mg de GAE / g de bebida	0.617 – 0.653	0.506	1.122 – 1.158
	FRAP	µmol Fe ²⁺ / g de bebida	9.782 – 10.358	4.956	14.737 – 15.213
Formulación 3	Folin-Ciocalteu	mg de GAE / g de bebida	0.411 – 0.435	0.506	0.917 – 0.941
	FRAP	µmol Fe ²⁺ / g de bebida	6.521 – 6.905	4.956	11.477 – 11.861

Comparando los resultados de la estimación de la Tabla 20 con lo obtenido de manera experimental en las Tablas 21 y 22, al día uno ambas formulaciones cuentan con un contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante superior al estimado. La formulación 2 muestra una diferencia respecto al estimado de 0.280- 0.316 mg de GAE / g de bebida (contenido fenólico) y de 4.090 -4.566 µmol Fe²⁺ / g de bebida con relación a la actividad antioxidante.

Por su parte, la formulación 3 muestra una diferencia en el contenido de compuesto fenólicos y actividad antioxidante de 0.020 -0.044 mg de GAE / g de bebida y 2.330- 2.714 µmol Fe²⁺ / g de bebida respectivamente. A partir de lo cual sugiere que las formulaciones no muestran un efecto de decremento sustancial relacionado con el tratamiento térmico empleado.

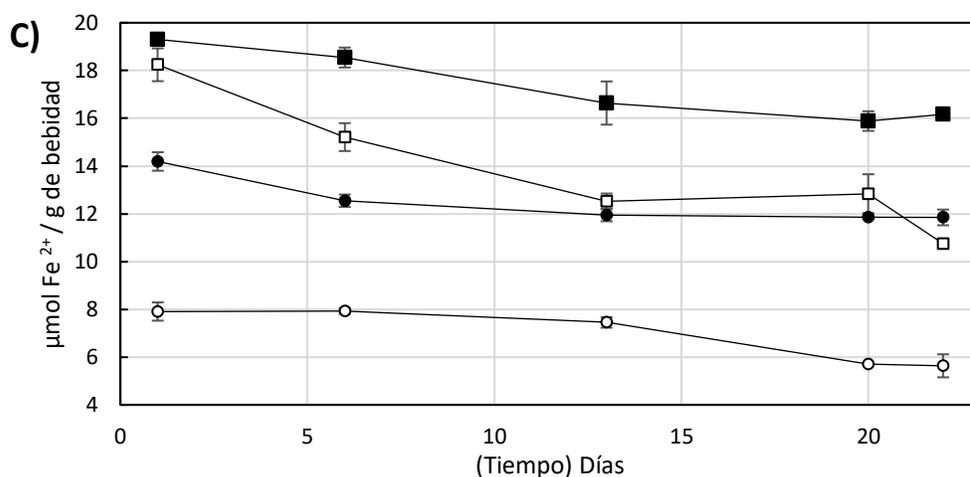
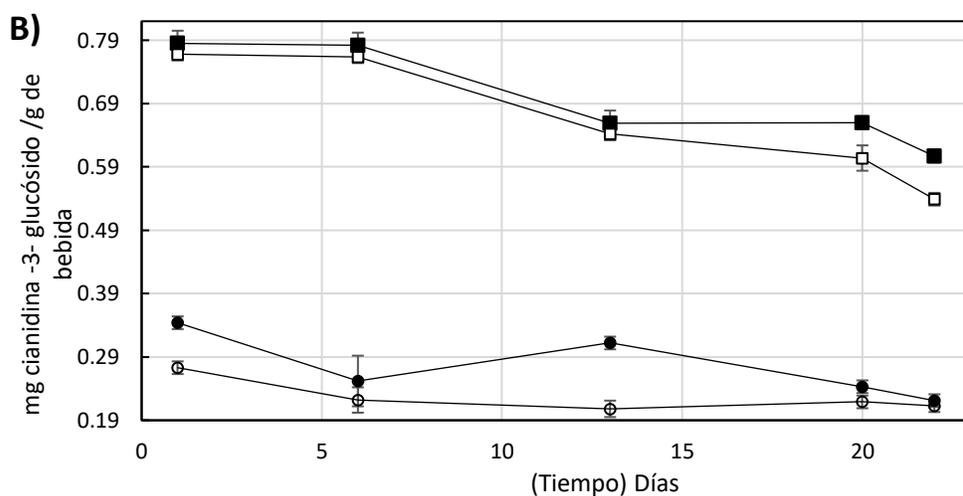
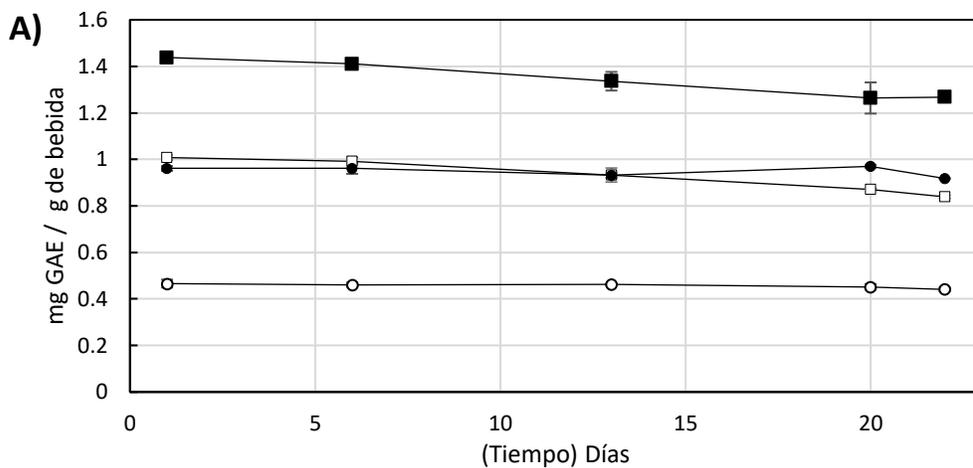


Figura 15. Valores del efecto del almacenamiento en: A) contenido de fenoles totales; B) contenido de antocianinas monoméricas totales; C) capacidad antioxidante.

Simbología: ■ Formulación 2: con infusión □ Formulación 2: sin infusión ● Formulación 3: con infusión ○ Formulación 3: sin infusión.

Las barras de error representan la desviación estándar, el corte de escala indica el último valor obtenido de cada una de las determinaciones.

Se realizó la determinación cuantitativa de antocianinas totales, capacidad antioxidante y contenido fenólico en cada formulación almacenada en refrigeración, durante un periodo de 22 días, para evaluar el efecto de la adición de la infusión de Yerba Mate.

La Figura 15 representa el comportamiento observado de las formulaciones 2 y 3 a lo largo del tiempo. En términos generales, es posible observar que, a mayor contenido de pulpa, mayor cantidad de antocianinas totales, mayor capacidad antioxidante y mayor contenido fenólico. Comparando las formulaciones con y sin infusión también se observa una mayor capacidad antioxidante y contenido fenólico en aquellas que se incorpora la infusión.

Todas las formulaciones evaluadas (con y sin infusión) muestran una degradación en torno a las determinaciones cuantitativas durante los 22 días de evaluación, lo cual se asocia a que las antocianinas tienden a verse afectadas con gran facilidad por las condiciones ambientales (luz, temperatura y pH). Sin embargo, la degradación puede ser distinta en función de la cantidad y estructura de las antocianinas presentes, así como de la presencia de otros compuestos acomplejantes como otros flavonoides, ácidos fenólicos y metales (Eiro y Heinonen, 2002). Cabe destacar que la zarzamora mayoritariamente contiene antocianinas monoméricas: cianidina-3-glucósido y cianidina-3-arabinosa (Beattie, *et. al.* 2005) las cuales durante el procesamiento tienden a ser menos estables a sus análogos acilados (Zhao, *et. al.* 2017). Adicionalmente, la infusión de Yerba Mate se caracteriza por un alto contenido de ácidos cafeoilquínicos, compuestos asociados a función acomplejante (Cardozo y Morand, 2016).

Además, se realizó un análisis de varianza (ANOVA por sus siglas en inglés) de un factor para cada una de las formulaciones obteniendo los resultados de la Tabla 21 y 22. Las letras distintas denotan diferencia significativa de cada una de las determinaciones en el curso temporal de almacenamiento formulación (vertical).

Tabla 21. Determinación cuantitativa de formulación 2 con y sin infusión

Días	Formulación 2: 15 % pulpa + infusión			Formulación 2: 15 % pulpa sin infusión		
	Contenido de fenoles totales	Contenido de antocianinas monoméricas	Capacidad antioxidante	Contenido de fenoles totales	Contenido de antocianinas monoméricas	Capacidad antioxidante
	mg de GAE / g de bebida	mg de cianidina-3-glucósido / g de bebida	$\mu\text{mol Fe}^{2+}$ / g de bebida	mg de GAE / g de bebida	mg de cianidina-3-glucósido / g de bebida	$\mu\text{mol Fe}^{2+}$ / g de bebida
1	1.438 + 0.015 ^a	0.785 + 0.008 ^a	19.303 + 0.052 ^a	1.008 + 0.011 ^a	0.768 + 0.016 ^a	18.242 + 0.688 ^a
6	1.411 + 0.019 ^{ac}	0.782 + 0.003 ^a	18.545 + 0.417 ^a	0.992 + 0.016 ^a	0.764 + 0.023 ^a	15.212 + 0.584 ^{bc}
13	1.336 + 0.040 ^{bc}	0.659 + 0.013 ^{bc}	16.638 + 0.905 ^b	0.933 + 0.030 ^{bc}	0.642 + 0.024 ^{bc}	15.522 + 1.170 ^{bd}
20	1.264 + 0.067 ^{bd}	0.660 + 0.019 ^{bc}	15.884 + 0.411 ^b	0.871 + 0.005 ^{bd}	0.604 + 0.017 ^{bc}	12.841 + 1.749 ^{bd}
22	1.268 + 0.012 ^{bd}	0.607 + 0.01 ^{bd}	16.159 + 0.110 ^b	0.839 + 0.007 ^{bd}	0.539 + 0.009 ^{bd}	10.794 + 0.145 ^{bde}

Letras distintas muestran la diferencia significativa presentada por formulación (manera vertical): de cada parámetro durante los distintos días evaluados. (Vertical). Tukey significancia 0.05

Tabla 22. Determinación cuantitativa de formulación 3 con infusión y sin infusión.

Días	Formulación 3: 10 % pulpa + infusión			Formulación 3: 10 % pulpa sin infusión		
	Contenido de fenoles totales	Contenido de antocianinas monoméricas	Capacidad antioxidante	Contenido de fenoles totales	Contenido de antocianinas monoméricas	Capacidad antioxidante
	mg de GAE / g de bebida	mg de cianidina-3-glucósido / g de bebida	$\mu\text{mol Fe}^{2+}$ / g de bebida	mg de GAE / g de bebida	mg de cianidina-3-glucósido / g de bebida	$\mu\text{mol Fe}^{2+}$ / g de bebida
1	0.961 + 0.010 ^{ac}	0.273 + 0.01 ^a	14.191 + 0.387 ^a	0.466 + 0.017 ^a	0.344 + 0.010 ^a	7.907 + 0.383 ^a
6	0.961 + 0.023 ^{ac}	0.222 + 0.02 ^b	12.549 + 0.275 ^b	0.461 + 0.009 ^a	0.322 + 0.037 ^a	7.926 + 0.116 ^a
13	0.932 + 0.011 ^{ace}	0.208 + 0.013 ^b	11.951 + 0.263 ^b	0.463 + 0.004 ^a	0.312 + 0.010 ^a	7.452 + 0.219 ^a
20	0.970 + 0.006 ^{acf}	0.219 + 0.01 ^b	11.855 + 0.073 ^b	0.452 + 0.0120 ^a	0.243 + 0.012 ^b	5.697 + 0.042 ^b
22	0.918 + 0.000 ^{bde}	0.213 + 0.01 ^b	11.849 + 0.329 ^b	0.441 + 0.008 ^a	0.221 + 0.010 ^b	5.635 + 0.482 ^b

Letras distintas muestran la diferencia significativa presentada por formulación ((manera vertical): de cada parámetro durante los distintos días evaluados. (Vertical). Tukey significancia 0.05

Mediante las Tablas 21 y 22 se observa un decremento estadísticamente significativo a lo largo del tiempo en las distintas determinaciones en todas las formulaciones: 15% y 10% de pulpa, con y sin infusión. Lo cual puede estar asociado a que básicamente se componen de agua, pulpa de zarzamora y sacarosa.

En un estudio realizado por Türkyılmaz y colaboradores en 2018, muestran los efectos de la adición de sacarosa y agentes copigmentantes en concentrados de antocianinas derivadas de jugo de cereza, donde encontraron que tanto con antocianinas diglicosiladas y monoglicosiladas, la adición de azúcar favorece el deterioro reduciendo el contenido de antocianinas monoméricas y aumentando el contenido de pigmentos poliméricos (copigmentación), lo que proporciona estabilidad y realza el color. El deterioro también puede estar dado por las antocianinas que no forman parte de los compuestos copigmentados y/o el cambio de estructura de los compuestos formados (Kopjar, *et. al.* 2012).

Por otro lado, partiendo del día uno en ambas formulaciones se observa una mayor actividad antioxidante y contenido fenólico en aquellas que incorporan la infusión, esto debido a que la Yerba Mate se caracteriza por poseer una gran variedad de compuestos fenólicos (Cardozo y Morand, 2016).

En la Tabla 21 con la formulación 2 se observa un comportamiento similar en la formulación con y sin infusión en el contenido de antocianinas monoméricas. Sin embargo, en el caso del contenido fenólico, en la formulación con infusión en el intervalo de los 6 a 13 días no se observa un decremento considerable contrario a lo observado en la formulación sin infusión. También se destaca la capacidad antioxidante de la formulación con infusión debido a que a partir de la segunda semana el deterioro no muestra diferencia significativa durante los 22 días de evaluación, contrario a lo observado en aquella sin infusión donde hay un deterioro significativo prácticamente desde el primer día de evaluación.

En la Tabla 22 se observa un comportamiento estable en ambas formulaciones (con y sin infusión). En el caso de aquella con infusión resalta que, a partir de los 6 días de almacenamiento, el contenido de antocianinas monoméricas, capacidad antioxidante y contenido de fenoles totales no muestra un deterioro significativo. Por su parte, en aquella sin infusión el deterioro solo es significativo los días 20 y 22.

De manera comparativa se realizó un análisis *t-student* con 95% de confianza de cada formulación con y sin infusión durante el periodo de almacenamiento. Dichos resultados se encuentran en el Anexo 9.3.3 para la formulación 2 y Anexo 9.3.6 para la formulación 3.

En los cuales la formulación 2 con infusión denota diferencia significativa con aquella sin infusión en el contenido fenólico y capacidad antioxidante durante todo el periodo de almacenamiento.

En contraste, en el contenido de antocianinas la diferencia sólo es significativa desde los días 20 y 22, lo cual puede estar asociado a que el contenido de pulpa es uno de los componentes mayoritarios de la bebida, lo que implica que, aunque no se agrega ninguna sustancia adicional con la funcionalidad copigmentante, las antocianinas pueden presentar un efecto de auto asociación el cual se da entre el catión flavilo y la base quinoidal. Pero, este efecto es menos estable que la interacción de antocianinas con compuestos fenólicos o metales quelantes esto principalmente en las antocianinas comunes no aciladas (Trouillas, *et. al.* 2016).

En el caso de la formulación 3 con infusión presenta diferencia significativa durante todo el almacenamiento con su contraparte sin infusión en los distintos parámetros desde el primer día. Sin embargo, con relación al contenido de antocianinas, al día 22 no existe diferencia significativa, a pesar de ello esto no representa un porcentaje de pérdida equivalente debido a que se inicia de un contenido distinto de antocianinas.

Debido a ello, se realizaron dos tablas con el porcentaje de pérdida (Tabla 23 y 24) y se realizó un análisis *t-student* a fin de demostrar si la pérdida es estadísticamente significativa (Anexo 9.3.7 y 9.3.8).

Tabla 23. Comparación del porcentaje de pérdida en determinaciones cuantitativas de la formulación 2.

Formulación 2	Porcentaje de pérdida		
	Fenoles totales (%)	Antocianinas monoméricas totales (%)	Capacidad antioxidante (%)
Bebida 15 % pulpa + infusión	11.80 + 0.84 ^a	22.69 + 0.86 ^a	16.29 + 0.57 ^a
Bebida 15 % pulpa sin infusión	16.69 + 0.69 ^b	29.73 + 1.21 ^b	40.83 + 0.80 ^b

Letras distintas muestran la diferencia significativa entre formulación con y sin infusión (manera vertical): de cada uno de los parámetros. *t-student* significancia 0.05

Tabla 24. Comparación del porcentaje de pérdida en determinaciones cuantitativas de la formulación 3.

Formulación 3	Porcentaje de pérdida		
	Fenoles totales (%)	Antocianinas monoméricas totales (%)	Capacidad antioxidante (%)
Bebida 10 % pulpa + infusión	4.45 + 0.16 ^a	21.99 + 2.31 ^a	16.50 + 2.32 ^a
Bebida 10 % pulpa sin infusión	5.46 + 1.79 ^a	35.76 + 0.74 ^b	28.74 + 6.09 ^b

Letras distintas muestran la diferencia significativa entre formulación con y sin infusión (manera vertical); de cada uno de los parámetros. *t-student* significancia 0.05

Como se observa en las tablas 23 y 24, las formulaciones con infusión presentan una pérdida significativamente menor a aquellas que no la incorporan. Esto puede deberse al efecto de copigmentación, ya que los compuestos fenólicos son conocidos por tener dicho efecto protegiendo a las antocianinas del ataque al catión flavilo, dando como resultado la elución a la formación de la pseudobase, evitando la pérdida de color (Trouillas, *et. al.* 2016).

Uno de los principales componentes del contenido fenólico observado en las infusiones de Yerba Mate corresponde al ácido clorogénico (Marques y Farah, 2009; Bravo, *et. al.* 2007; Peres, *et. al.* 2013). Cuya incorporación en un estudio realizado con jugo de zarzamora demostró tener un efecto de copigmentación, reflejando un mayor contenido de antocianinas, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante (Kopjar, *et. al.* 2012).

Cabe resaltar que el efecto de copigmentación puede verse afectado por la proporción en función de la antocianina presente, ya que en algunos estudios se indican proporciones molares de antocianina:copigmento 1:1, 1:10, 1:50 y 1:100 (Mazza y Brouillard, 1990; Wilska-Jeszka y Korzuchowska, 1996; Eiro y Heinonen, 2002) observándose un mejor efecto con un excedente de copigmento por lo que, ante la incorporación de un mayor porcentaje de infusión en la bebida, el efecto de protección podría ser más notorio.

Asimismo, se presentó una diferencia con relación a la coloración de la bebida adicionada con infusión (Figura 16), lo que puede estar relacionado con el efecto

batocrómico e hipercrómico ocasionado por la copigmentación, reflejando así un cambio en la intensidad y tonalidad del color (Morata, *et. al.* 2019).

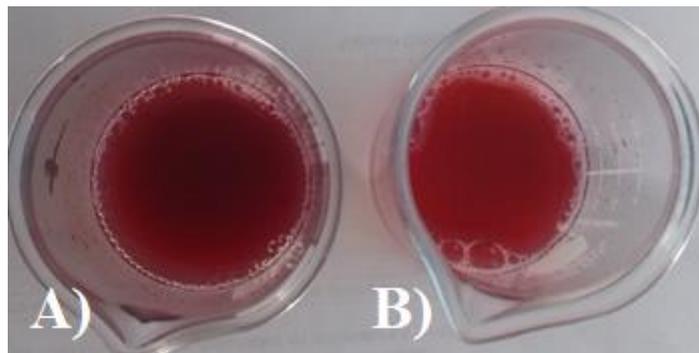


Figura 16. Fotografía de formulación 2. A) 15% pulpa + infusión; B) 15% pulpa sin infusión

En lo que respecta a la formulación 3, el contenido fenólico no muestra diferencia significativa a pesar de que la tendencia es similar al resto de los parámetros evaluados, es decir existe un porcentaje de pérdida superior en aquella que no incorpora la infusión. Esto puede estar relacionado con el tiempo de almacenamiento puesto que la diferencia tiende a verse mucho más evidente en periodos prolongados de almacenamiento (Kopjar, *et. al.* 2012).

6.4 Caracterización final del desarrollo de bebidas

Transcurridos los 22 días de almacenamiento, nuevamente se realizó la caracterización de cada una de las formulaciones (Tabla 25).

Tabla 25. Caracterización final de formulaciones (22 días)

		pH	°Bx	%Acidez (m/v)
Formulación 2	15% pulpa + infusión	3.25 ± 0.01	7.0 ± 0.1	0.40 ± 0.01
	15 % de pulpa sin infusión	3.16 ± 0.01	7.0 ± 0.1	0.40 ± 0.01
Formulación 3	10% pulpa + infusión	3.27 ± 0.01	5.0 ± 0.1	0.33 ± 0.01
	10 % de pulpa sin infusión	3.17 ± 0.01	5.0 ± 0.1	0.33 ± 0.01

Al igual que en la caracterización inicial, se observa un pH ligeramente mayor en las formulaciones con infusión. Los resultados obtenidos en la Tabla 25 no muestran una diferencia notoria con respecto a los valores iniciales de las formulaciones (Tabla 19).

6.5 Análisis microbiológico

Se realizó un análisis microbiológico un día después de la elaboración de la bebida y transcurridos 22 días de almacenamiento en refrigeración. Las especificaciones microbiológicas (Tabla 26) para este tipo de bebidas se encuentran en la NOM-218-SSA1-2011 Productos y servicios. Bebidas saborizadas no alcohólicas, sus congelados, productos concentrados para prepararlas y bebidas adicionadas con cafeína. Especificaciones y disposiciones sanitarias. Métodos de prueba.

Tabla 26. Especificaciones microbiológicas de bebidas saborizadas no alcohólicas y bebidas adicionadas con cafeína

Microorganismos	Límite máximo
Mesófilos aerobios UFC / g o mL	50
Coliformes totales NMP / mL o g	10

Los resultados obtenidos se encuentran detallados en el Anexo 9.4, sin embargo, se resumen en la Tabla 27. A partir de lo cual, es posible afirmar que ambas bebidas cumplen con la normatividad aplicable, lo que es un indicativo de BPM con relación al proceso de elaboración y a la efectividad del proceso térmico para la reducción microbiana, apta para el consumo y el cumplimiento de la NOM-218-SSA1-2011.

Tabla 27. Resultados microbiológicos de bebidas

		Mesófilos aerobios UFC/ g o mL		Coliformes totales NMP/ mL	
		Límite máximo:		Límite máximo:	
		50		10	
Formulación 2: 15 % pulpa + infusión	Día 1	< 3 UFC /mL	CUMPLE	< 2 /mL	CUMPLE
	Día 22	< 3 UFC /mL	CUMPLE	< 2 /mL	CUMPLE
Formulación 3: 10 % pulpa + infusión	Día 1	< 3 UFC /mL	CUMPLE	< 2 /mL	CUMPLE
	Día 22	< 3 UFC /mL	CUMPLE	< 2 /mL	CUMPLE

6.6 Evaluación sensorial

Cumplido el requisito microbiológico, se realizó la evaluación sensorial con 60 consumidores potenciales, a fin de identificar el nivel de agrado de distintos atributos y si existía una preferencia significativa por alguna de las formulaciones. Para el análisis estadístico, se realizó *t-student* con significancia de 0.05 (Anexo 9.5.1), para cada uno de los atributos se empleó una escala de valor numérico entre 1 a 5 siendo el valor más bajo aquel con la evaluación menos favorable. Con lo cual se identificó el nivel de agrado en apariencia: color y espesor; así como de sabor: acidez, dulzor y la nota herbal.

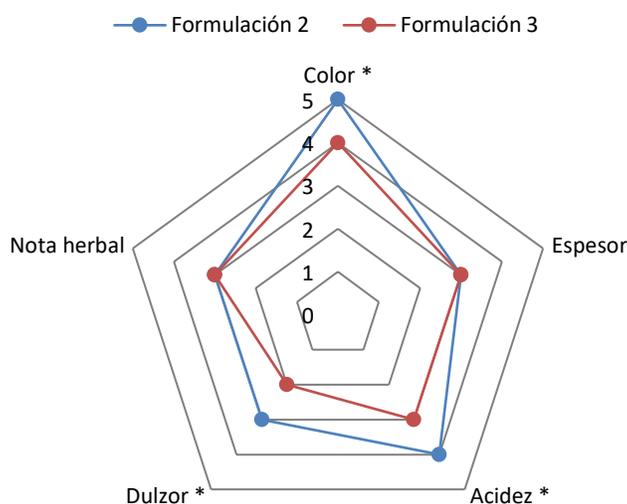


Figura 17. Evaluación sensorial de formulaciones (datos de moda). Datos con asterisco representan diferencias estadísticamente significativas

A través de la Figura 17. se observa que no existe diferencia significativa entre las formulaciones en el atributo de espesor debido a que ambas son evaluadas como aceptable (ni agradable, ni desagradable). Mientras que en la nota herbal son percibidas “justo como me gusta”.

Sin embargo, en el atributo de color la diferencia hallada fue significativa siendo la formulación con el mayor contenido de pulpa la de mayor preferencia.

A su vez, se observa una diferencia notable en los gustos de dulzor y la acidez, lo cual es de esperarse debido a un mayor contenido de sólidos solubles totales (°Bx), cantidad de pulpa y acidez definida en la formulación 2.

La acidez de la formulación 2 es evaluada mayoritariamente como “me gusta” y la formulación 3 como “no me gusta ni me disgusta”. Respecto al dulzor mediante la escala JAR (Just about right), la formulación 2 es indicada “justo como me gusta”, en contraste, la formulación 3 como “un poco menos de los que me gusta”.

Además, se cuestionó sobre la elección por alguno de los productos, donde el 80% (48 personas) indicó preferir la formulación 2. Lo que indica una diferencia significativa, tomando en cuenta el número de respuestas mínimo que es de 39 (Anexo 9.5.2) según la norma ISO 5495.

Posterior a ello, se solicitó indicar la intención de compra hacia cada uno de los productos, obteniéndose los resultados de la Figura 18 donde se observa un porcentaje mayor para la formulación 2 (94%) que para la formulación 3 (83%).

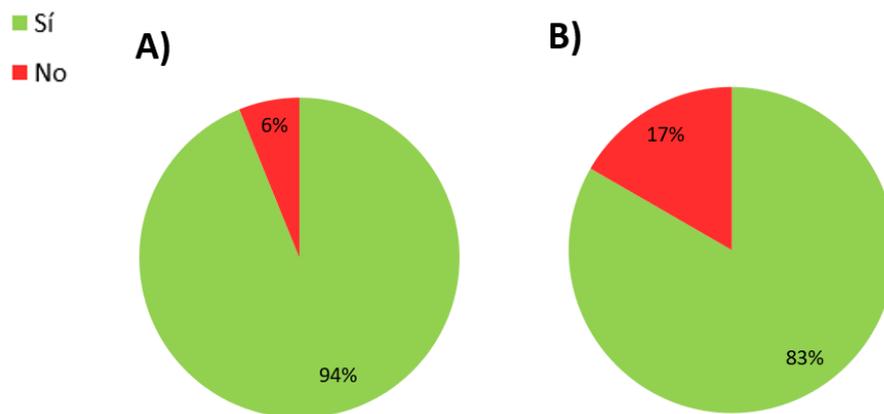


Figura 18. Intención de compra de bebidas por presentación de 200 mL. A) Formulación 2; B) Formulación 3

Finalmente, se solicitó indicar la disposición del precio a pagar como se presenta en la Figura 19. Para la formulación 2, el 63% muestra una disponibilidad de un precio entre los \$14.00 a \$16.00 MXN por presentación de 200 mL, en tanto que para la formulación 3 con el mismo precio y presentación es del 60%. Cuyo dato puede ser usado como referencia para el sector poblacional al que el producto puede estar dirigido.

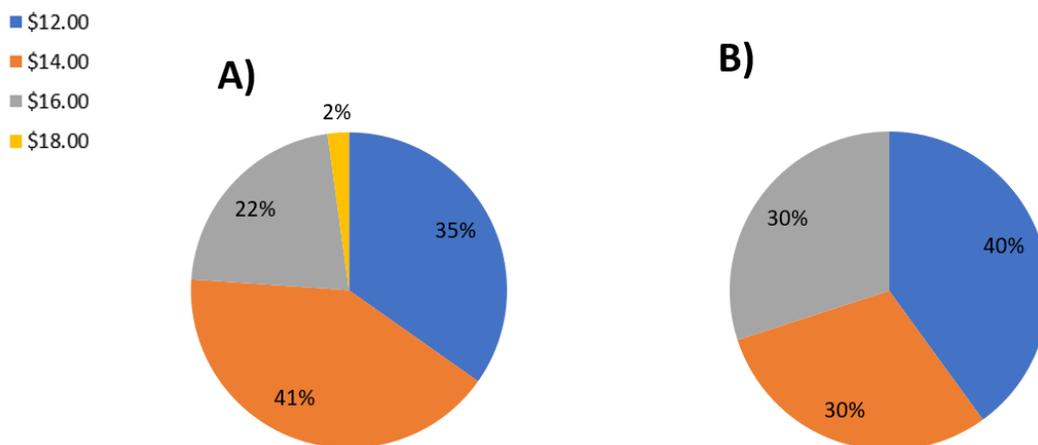


Figura 19. Disposición de precio a pagar por presentación de 200 mL. A) Formulación 2; B) Formulación 3

A través del análisis sensorial, se muestra una preferencia notable por la formulación 2, debido a que la evaluación individual indica que fue de mayor agrado, además de ser la preferida y presentar un porcentaje superior al 90% en intención de compra, parámetros superiores a los de la formulación 3.

7. Conclusiones

- El método de extracción de fenoles de *Ilex paraguariensis* (Yerba Mate) se ve favorecido con el uso de agua a 65°C en comparación con la extracción con etanol.
- La adición de infusión de Yerba Mate a las formulaciones provee de una preservación significativa transcurridos 22 días de evaluación con relación al: contenido fenólico, capacidad antioxidante y contenido de antocianinas monoméricas, en comparación con la formulación sin infusión.
- El tratamiento térmico muestra ser un proceso efectivo para la reducción microbiana logrando el cumplimiento de la NOM-218-SSA1-2011, “Productos y servicios. Bebidas saborizadas no alcohólicas, sus congelados, productos concentrados para prepararlas y bebidas adicionadas con cafeína. Especificaciones y disposiciones sanitarias. Métodos de prueba”.
- Tras la evaluación sensorial, la formulación 2 muestra ser de mayor agrado para el potencial consumidor debido a la preferencia e intención de compra por una presentación de 200 mL.

8. Perspectivas

- Optimizar el proceso de extracción de la infusión de *Ilex paraguariensis* con el fin de obtener un mayor contenido fenólico y actividad antioxidante.
- Emplear distintos edulcorantes en la formulación con el fin de evaluar el efecto sobre el contenido de antocianinas monoméricas.
- Evaluar el efecto de adicionar una mayor cantidad de infusión a la formulación, sobre el contenido fenólico, antocianinas monoméricas y capacidad antioxidante.
- Prolongar el tiempo de evaluación con el objetivo de evaluar el deterioro de la bebida.
- Evaluar si la infusión de *Ilex paraguariensis* provee de un efecto protector contra el desarrollo microbiano.

9. Anexos

Anexo 9.1 Fundamentos y equipos utilizados

Determinación de acidez

Consiste en determinar la acidez por medio de una titulación ácido-base. En la cual la disolución ácida se titula con una disolución de concentración conocida exactamente (alcalí). El punto final puede detectarse mediante indicadores (cambio de color) o electrométricamente (potenciómetro) (Petrucci, *et. al.* 2011).

Determinación de sólidos solubles totales (grados °Bx)

Cuando la radiación electromagnética pasa de un medio a otro, cambia de dirección, se dobla o se refracta. La relación entre el ángulo de incidencia al seno del ángulo de refracción se llama índice de refracción (IR). El IR varía con la naturaleza del compuesto, la temperatura, la longitud de onda de la luz y la concentración del compuesto. Si las tres primeras variables se hacen constantes, la concentración del compuesto se puede determinar midiendo el IR, de tal forma que el IR se utiliza para determinar sólidos totales en disolución (Nielsen, 1998).

Medición de pH

La determinación se fundamenta en la existencia de una diferencia de potencial entre las dos caras de una membrana de vidrio. La magnitud de esta diferencia de potencial es directamente proporcional a la diferencia de pH entre dichas disoluciones (Petrucci, *et. al.* 2011).

Determinación del contenido de fenoles totales: por método de Folin-Ciocalteu

Se basa en una reacción oxido-reducción, los polifenoles reaccionan con los reactivos redox específicos (Folin-Ciocalteu) para formar un complejo azul que se puede cuantificar por espectrofotometría de la luz visible.

La reacción se favorece con un pH alcalino en el cual se presenta la reducción del Mo^{6+} (complejo amarillo) a Mo^{5+} (complejo azul) de reactivo constituido por

fosfomolibdato y fosfotungstato (Folin Ciocalteu), la máxima absorción depende de la solución alcalina y la concentración de compuestos fenólicos (Singleton y Rossi, 1965; Singleton, *et. al.* 1999).

Determinación del contenido de antocianinas monoméricas totales.

Se empleó la metodología de pH diferencial descrita por Giusti y Wrolstad (2001), utilizando los buffers de cloruros 0.025 M, pH 1.0 y de acetatos 0.4 M, pH 4.5. La reacción se basa en la conformación que adquieren las antocianinas monoméricas, pues a pH 1.0 se presenta el catión flavilio (color rojo intenso), mientras que la formación hemiacetal (incolora) se presenta a pH de 4.5.

Determinación de capacidad antioxidante: Método de FRAP

El método de FRAP denominado así por sus siglas en inglés (Ferric Reducing Antioxidant Power), determina la capacidad antioxidante.

A través de la reducción del complejo formado por el ión férrico (Fe^{3+}) (agente oxidante) con la 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ), a su forma (Fe^{2+}), el cual forma un complejo que da como resultado un color azul intenso, por acción de las moléculas donadoras de electrones (compuestos fenólicos, entre otros). El valor se obtiene mediante una curva de calibración por espectrofotómetro UV/VIS a 593 nm (Benzie y Strain, 1996).

Equipos utilizados

- ✓ Balanza analítica: Denver instruments
Tp- 214 No. Serie: 24850587
- ✓ Parrilla de agitación
- ✓ Potenciómetro: OAKTON ion 510 series
No. Serie: 330323
- ✓ Refractómetro: Master-53M ATAGO
No. serie. 0270258
- ✓ Termómetro: TEL-TRU
- ✓ Balanza granataria: Triple Beam OHAUS
- ✓ Espectro: Genesys 10 S UV/VIS Thermo Scientific
No. serie: 24P038005

Anexo 9.2. Cuestionario de evaluación sensorial



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA



Nombre: _____ Edad: _____ Género: _____

INSTRUCCIONES: A continuación, se te presentan dos bebidas elaboradas a partir de pulpa de zarzamora y yerba mate, rica en antioxidantes. Por favor lee con atención, prueba y contesta las siguientes preguntas en función de la clave asignada:

Recuerda: Entre cada muestra limpiar el paladar con agua.

Evaluación visual

1. Atributos de apariencia: marca con una **X** el nivel de agrado

Color

Me disgusta Me disgusta No me Me gusta Me gusta
muchísimo moderadamente gusta ni me moderadamente muchísimo
disgusta

Clave

Espeso: Evalúa agitando con movimientos circulares en función de la presencia de pulpa y otras partículas.

Me disgusta Me disgusta No me Me gusta Me gusta
muchísimo moderadamente gusta ni me moderadamente muchísimo
disgusta

Clave

Prueba la muestra

2. Atributos de sabor: marca con una **X** como percibes cada muestra.

NOTA: Es necesario beber agua entre cada una de ellas.

Acidez

Me disgusta Me disgusta No me Me gusta Me gusta
muchísimo moderadamente gusta ni me moderadamente muchísimo
disgusta

Clave

Dulzor

Mucho Menos dulce de Justo como Más dulce de lo Mucho más
menos dulce lo que me gusta me gusta que me gusta dulce de lo
de lo que me que me que me
gusta gusta gusta

Clave



Nota herbal

Clave	Mucho menos herbal de lo que me gusta	Menos herbal de lo que me gusta	Justo como me gusta	Más herbal de lo que me gusta	Mucho más herbal de lo que me gusta

3. En términos generales, ¿cuál de las bebidas prefieres? Anota la clave en el siguiente espacio:

Clave: _____

4. De la bebida indicada en la pregunta 3, marca con una **X** su nivel de agrado respecto a la bebida NO preferida.

Me disgusta muchísimo	Me disgusta moderadamente	No me gusta ni me disgusta	Me gusta moderadamente	Me gusta muchísimo

5. Finalmente, ¿Lo comprarías?

a) Sí b) No

6. En caso de ser afirmativo, ¿cuál sería el precio que pagarías por la bebida rica en antioxidantes elaborada a partir de zarzamora y yerba mate en una presentación de 200 mL?

a) \$ 12 b) \$ 14 c) \$ 16 d) \$ 18

GRACIAS POR TU PARTICIPACIÓN



Anexo 9.3. Análisis estadístico de los datos experimentales.

9.3.1 Análisis de varianza de Formulación 2 con infusión de Yerba Mate

ANOVA^a

		Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
FRAP	Entre grupos	27.928	4	6.982	29.674	0
	Dentro de grupos	2.353	10	0.235		
	Total	30.28	14			
FENOLES	Entre grupos	0.077	4	0.019	14.132	0
	Dentro de grupos	0.014	10	0.001		
	Total	0.09	14			
ANTOCIANINAS	Entre grupos	0.078	4	0.019	144.978	0
	Dentro de grupos	0.001	10	0		
	Total	0.079	14			

a. TIPO = Pulpa 15% + infusión

FRAP^a

		N	Subconjunto para alfa = .05	
			1	2
HSD Tukey ^b	Tiempo			
	Día:20	3	15.8841	
	Día: 22	3	16.1587	
	Día: 13	3	16.6377	
	Día: 6	3		18.5455
	Día :1	3		19.303
	Sig.		0.375	0.37

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

- a. TIPO = Pulpa 15% + infusión
- b. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3.000.

FENOLES^a

		N	Subconjunto para alfa = .05		
			1	2	3
HSD Tukey ^b	Tiempo				
	Día:20	3	1.2636		
	Día: 22	3	1.2682		
	Día: 13	3	1.3364	1.3364	
	Día: 6	3		1.4106	1.4106
	Día :1	3			1.4379
	Sig.		0.187	0.174	0.888

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

- a. TIPO = Pulpa 15% + infusión
- b. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3.000.

ANTOCIANINAS^a

		N	Subconjunto para alfa = .05		
			1	2	3
HSD Tukey ^b	Tiempo				
	Día: 22	3	0.6067		
	Día: 13	3		0.659	
	Día:20	3		0.6596	
	Día: 6	3			0.7815
	Día :1	3			0.7848
	Sig.		1	1	0.996

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

- a. TIPO = Pulpa 15% + infusión
- b. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3.000.

9.3.2 Análisis de varianza de Formulación 2 sin infusión

ANOVA^a

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
FRAP	Entre grupos	99.742	4	24.935	77.421	0
	Dentro de grupos	3.221	10	0.322		
	Total	102.962	14			
FENOLES	Entre grupos	0.065	4	0.016	58.762	0
	Dentro de grupos	0.003	10	0		
	Total	0.068	14			
ANTOCIANINAS	Entre grupos	0.121	4	0.03	86.811	0
	Dentro de grupos	0.003	10	0		
	Total	0.125	14			

- a. TIPO = Pulpa 15% (control)

FRAP^a

		N	Subconjunto para alfa = .05			
			1	2	3	4
HSD Tukey ^b	Tiempo					
	Día: 22	3	10.7937			
	Día: 13	3		12.5217		
	Día:20	3		12.8406		
	Día: 6	3			15.2121	
	Día :1	3				18.2424
	Sig.			1	0.955	1

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. TIPO = Pulpa 15% (control)

b. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3.000.

FENOLES^a

		N	Subconjunto para alfa = .05		
			1	2	3
HSD Tukey ^b	Tiempo				
	Día: 22	3	0.8394		
	Día:20	3	0.8712		
	Día: 13	3		0.9333	
	Día: 6	3			0.9924
	Día :1	3			1.0076
	Sig.			0.207	1

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. TIPO = Pulpa 15% (control)

b. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3.000.

ANTOCIANINAS^a

		N	Subconjunto para alfa = .05		
			1	2	3
HSD Tukey ^b	Tiempo				
	Día: 22	3	0.5394		
	Día:20	3		0.6045	
	Día: 13	3		0.6418	
	Día: 6	3			0.7643
	Día :1	3			0.7676
	Sig.			1	0.18

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. TIPO = Pulpa 15% (control)

b. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3.000.

Anexo 9.3.3 Análisis T-student de Formulación 2 con infusión vs Formulación 2 sin infusión.

Prueba de muestras independientes^a

prueba t para la igualdad de medias								
	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia		
						Inferior	Superior	
FRAP	2.661	4	0.056	1.06061	0.39857	-0.04601	2.16723	
FENOLES	40.164	4	0.000	0.4303	0.01071	0.40056	0.46005	
ANTOCIANINAS	1.696	4	0.165	0.01726	0.01017	-0.01099	0.0455	

a. Tiempo = Día 1

Prueba de muestras independientes^a

prueba t para la igualdad de medias								
	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia		
						Inferior	Superior	
FRAP	8.044	4	0.001	3.33333	0.41439	2.18281	4.48386	
FENOLES	29.256	4	0.000	0.41818	0.01429	0.3785	0.45787	
ANTOCIANINAS	1.311	4	0.260	0.01726	0.01316	-0.01928	0.05379	

a. Tiempo = Día 6

Prueba de muestras independientes^a

prueba t para la igualdad de medias								
	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia		
						Inferior	Superior	
FRAP	7.405	4	0.002	4.11594	0.55585	2.57266	5.65923	
FENOLES	14	4	0.000	0.40303	0.02879	0.3231	0.48296	
ANTOCIANINAS	1.074	4	0.343	0.01726	0.01607	-0.02735	0.06186	

a. Tiempo = Día 13

Prueba de muestras independientes^a

prueba t para la igualdad de medias								
	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia		
						Inferior	Superior	
FRAP	5.769	4	0.004	3.04348	0.52754	1.57878	4.50818	
FENOLES	10.12	4	0.001	0.39242	0.03878	0.28476	0.50009	
ANTOCIANINAS	3.674	4	0.021	0.05511	0.015	0.01347	0.09675	

a. Tiempo = Día 20

Prueba de muestras independientes^a

prueba t para la igualdad de medias								
	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia		
						Inferior	Superior	
FRAP	50.955	4	0.000	5.36508	0.10529	5.07275	5.65741	
FENOLES	53.482	4	0.000	0.42879	0.00802	0.40653	0.45105	
ANTOCIANINAS	10.154	4	0.001	0.06735	0.00663	0. Koo	0.08577	

a. Tiempo = Día 22

9.3.4 Análisis de varianza de Formulación 3 con infusión de Yerba Mate

ANOVA^a

		Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
FRAP	Entre grupos	12.007	4	3.002	36.8	0
	Dentro de grupos	0.816	10	0.082		
	Total	12.823	14			
FENOLES	Entre grupos	0.006	4	0.001	9.478	0.002
	Dentro de grupos	0.002	10	0		
	Total	0.007	14			
ANTOCIANINAS	Entre grupos	0.008	4	0.002	15.762	0
	Dentro de grupos	0.001	10	0		
	Total	0.01	14			

a. TIPO = Pulpa 10% + infusión

FRAP

		N	Subconjunto para alfa = .05	
			1	2
HSD Tukey ^b	Tiempo			
	22	3	11.84928	
	20	3	11.85455	
	13	3	11.95071	
	6	3	12.54857	
	1	3		14.1913
	Sig.		0.079	1

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. TIPO = Pulpa 10% + infusión

b. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3.000.

FENOLES^a

		N	Subconjunto para alfa = .05		
			1	2	3
HSD Tukey ^b	Tiempo				
	22	3	0.91818		
	13	3	0.93182	0.93182	
	6	3		0.96091	0.96091
	1	3		0.96091	0.96091
	20	3			0.97
	Sig.		0.676	0.098	0.893

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. TIPO = Pulpa 10% + infusión

b. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3.000.

ANTOCIANINAS^a

		N	Subconjunto para alfa = .05	
			1	2
HSD Tukey ^b	Tiempo			
	13	3	0.20762	
	22	3	0.21319	
	20	3	0.21931	
	6	3	0.2221	
	1	3		0.27331
	Sig.		0.564	1

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. TIPO = Pulpa 10% + infusión

b. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3.000.

9.3.5 Análisis de varianza de Formulación 3 sin infusión

ANOVA^a

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
FRAP	Entre grupos	16.252	4	4.063	45.931	0
	Dentro de grupos	0.885	10	0.088		
	Total	17.137	14			
FENOLES	Entre grupos	0.001	4	0	2.554	0.104
	Dentro de grupos	0.001	10	0		
	Total	0.002	14			
ANTOCIANINAS	Entre grupos	0.034	4	0.009	27.054	0
	Dentro de grupos	0.003	10	0		
	Total	0.037	14			

a. TIPO = Pulpa 10% (control)

FRAP^a

		Subconjunto para alfa = .05	
HSD Tukey ^b	Tiempo	N	
	22	3	5.63478
	20	3	5.69697
	13	3	7.4515
	1	3	7.90725
	6	3	7.92635
	Sig.		0.999

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. TIPO = Pulpa 10% (control)

b. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3.000.

FENOLES^a

		Subconjunto para alfa = .05	
HSD Tukey ^b	Tiempo	N	1
	22	3	0.44091
	20	3	0.45182
	6	3	0.46091
	13	3	0.46273
	1	3	0.46636
	Sig.		0.106

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. TIPO = Pulpa 10% (control)

b. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3.000.

ANTOCIANINAS^a

		Subconjunto para alfa = .05	
HSD Tukey ^b	Tiempo	N	1
	22	3	0.22098
	20	3	0.24325
	13	3	0.31171
	6	3	0.32218
	1	3	0.344
	Sig.		0.564

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. TIPO = Pulpa 10% (control)

b. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3.000.

Anexo 9.3.6 Análisis T-student de Formulación 3 con infusión vs Formulación 3 sin infusión.

Prueba de muestras independientes^a

	prueba t para la igualdad de medias						95% de intervalo de confianza de la diferencia	
	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	Inferior	Superior	
FRAP	19.978	4	0.000	6.284058	0.314543	5.410747	7.157369	
FENOLES	43.837	4	0.000	0.494545	0.011282	0.463223	0.525868	
ANTOCIANINAS	-10.658	4	0.000	-0.070692	0.006633	-0.089108	-0.052276	

a. Tiempo = Día 1

Prueba de muestras independientes^a

	prueba t para la igualdad de medias						95% de intervalo de confianza de la diferencia	
	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	Inferior	Superior	
FRAP	26.834	4	0.000	4.622222	0.17225	4.143981	5.100464	
FENOLES	34.996	4	0.000	0.5	0.014287	0.460332	0.539668	
ANTOCIANINAS	-4.211	4	0.014	-0.100088	0.023766	-0.166074	-0.034103	

a. Tiempo = Día 6

Prueba de muestras independientes^a

	prueba t para la igualdad de medias						95% de intervalo de confianza de la diferencia	
	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	Inferior	Superior	
FRAP	22.791	4	0.000	4.49921	0.197415	3.951097	5.047323	
FENOLES	67.177	4	0.000	0.469091	0.006983	0.449703	0.488478	
ANTOCIANINAS	-12.935	4	0.000	-0.10409	0.008047	-0.126432	-0.081747	

a. Tiempo = Día 13

Prueba de muestras independientes^a

	prueba t para la igualdad de medias						95% de intervalo de confianza de la diferencia	
	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	Inferior	Superior	
FRAP	127	4	0.000	6.157576	0.048485	6.02296	6.292191	
FENOLES	66.261	4	0.000	0.518182	0.00782	0.496469	0.539894	
ANTOCIANINAS	-3.161	4	0.034	-0.023935	0.007571	-0.044955	-0.002915	

a. Tiempo = Día 20

Prueba de muestras independientes^a

	prueba t para la igualdad de medias						95% de intervalo de confianza de la diferencia	
	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	Inferior	Superior	
FRAP	18.45	4	0.000	6.214493	0.336831	5.2793	7.149686	
FENOLES	97.49	4	0.000	0.477273	0.004896	0.46368	0.490865	
ANTOCIANINAS	-1.98	4	0.119	-0.007793	0.003936	-0.018721	0.003135	

a. Tiempo = Día 22

Anexo 9.3.7 Porcentaje de pérdida: Formulación 2 (pulpa 15% + infusión) vs. Formulación 2 sin infusión

Estadísticas de grupo					
	Bebida	N	Media	Desv. Desviación	Desv. Error promedio
Capacidad antioxidante	Pulpa15% + infusión	3	16.2892	.56971	.32892
	Pulpa15% (control)	3	40.8321	.79747	.46042
Contenido de fenoles totales	Pulpa15% + infusión	3	11.8019	.83638	.48288
	Pulpa15% (control)	3	16.6917	.68911	.39786
Contenido de antocianinas monoméricas totales	Pulpa15% + infusión	3	22.6950	.85988	.49645
	Pulpa15% (control)	3	29.7317	1.21126	.69932

	Prueba de muestras independientes						
	prueba t para la igualdad de medias						
	t	Gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
					Inferior	Superior	
Capacidad antioxidante	-3.25	4	0.031	-12.23573	3.76466	-22.6881	-1.78337
Contenido de fenoles totales	-0.977	4	0.384	-1.01154	1.03581	-3.88742	1.86433
Contenido de antocianinas monoméricas totales	-9.815	4	0.001	-13.76459	1.40247	-17.65847	-9.87072

Anexo 9.3.8 Porcentaje de pérdida: Análisis estadístico Formulación 3 (pulpa 10% + infusión) vs. Formulación 3 sin infusión

Estadísticas de grupo					
	Bebida	N	Media	Desv. Desviación	Desv. Error promedio
Capacidad antioxidante	Pulpa10% + infusión	3	16.5033	2.31658	1.33748
	Pulpa 10 % (control)	3	28.7390	6.09519	3.51906
Contenido de fenoles totales	Pulpa10% + infusión	3	4.4465	.16386	.09461
	Pulpa 10 % (control)	3	5.4581	1.78658	1.03148
Contenido de antocianinas monoméricas totales	Pulpa10% + infusión	3	21.9959	2.31320	1.33553
	Pulpa 10 % (control)	3	35.7605	.74152	.42812

	Prueba de muestras independientes						
	prueba t para la igualdad de medias						
	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
					Inferior	Superior	
Capacidad antioxidante	-43.374	4	0	-24.54299	0.56584	-26.11403	-22.97196
Contenido de fenoles totales	-7.815	4	0.001	-4.88983	0.62567	-6.62698	-3.15268
Contenido de antocianinas monoméricas totales	-8.205	4	0.001	-7.03665	0.85762	-9.4178	-4.65551

Anexo 9.4 Resultados de análisis microbiológicos
9.4.1 Análisis microbiológico inicial: formulación 2, bebida 15% pulpa + infusión

FS3-MEI-MV-005



FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA
Av. Universidad No. 3000, Coyoacán, 04510, México, D.F. Tel. 56 22 59 00/01/03
56 22 59 96/ 97, Fax 56 22 59 71



CONSTANCIA DE RESULTADOS
BACTERIOLOGÍA
INFORME DE RESULTADOS: ANÁLISIS DE MATERIA PRIMA Y ALIMENTOS

Núm. de caso: RM- 18 / 1008

Núm. Interno: B- 18 - 513

MVZ. Responsable: MELISSA ROSAS ROSAS

Fecha: 04_06_2018

Propietario: Melissa Rosas Rosas

Núm. Externo: 2

Muestra: Bebida 2

Examen solicitado: Análisis de materia prima y alimento orientado a:

- ✓ Determinación de bacterias mesófilas aeróbicas por mililitro/gramo
- ✓ Determinación de coliformes (NMP) totales/fecales por mililitro/gramo.

RESULTADO:

Mesófilas aeróbicas: Menor a 3 UFC/ ml
Coliformes totales NMP: Menor a 2/ ml

COMENTARIOS:

UFC = Unidades Formadoras de Colonia
NMP = Número Más Probable

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Vo. Bo.

MVZ. Cristina Rodríguez Sánchez
Responsable del Diagnóstico Bacteriológico.

Vo. Bo.

Dra. Laura Gobos Marín
Jefa del Departamento

ESTE RESULTADO SOLO TIENE VALIDEZ EN FORMATO Y CON FIRMAS ORIGINALES

Rev. 1

9.4.2 Análisis microbiológico final: formulación 2, bebida 15% pulpa + infusión

FS3-MEI-MV-005



FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA

Av. Universidad No. 3000, Coyoacán, 04510, México, D.F. Tel. 56 22 59 00/01/03
56 22 58 96/97, Fax 56 22 59 71



CONSTANCIA DE RESULTADOS BACTERIOLOGÍA INFORME DE RESULTADOS: ANÁLISIS DE MATERIA PRIMA Y ALIMENTOS

Núm. de caso: RM- 18 / 1187

Núm. Interno: B- 18 - 598

MVZ. Responsable: MELISSA ROSAS ROSAS Fecha: 07 08 2018

Propietario: Melissa Rosas Rosas Núm. Externo: F2

Muestra: Formulación 2

Examen solicitado: Análisis de materia prima y alimento orientado a:

- ✓ Determinación de bacterias mesófilas aeróbicas por mililitro/gramo
- ✓ Determinación de coliformes (NMP) totales/fecales por mililitro/gramo.

RESULTADO:

Mesófilas aeróbicas: Menor a 3 UFC/ ml
Coliformes totales NMP: Menor a 3/ ml

COMENTARIOS:

UFC = Unidades Formadoras de Colonia
NMP = Número Más Probable

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Vo. Bo.

MVZ. Crístina Rodríguez Sánchez
Responsable del Diagnóstico Bacteriológico.

Vo. Bo.

Dra. Laura Cobos Marín
Jefa del Departamento

ESTE RESULTADO SOLO TIENE VALIDEZ EN FORMATO Y CON FIRMAS ORIGINALES

Rev. 1

9.4.3 Análisis microbiológico inicial: Formulación 3, bebida 10% pulpa + infusión

FS3-MEI-MV-005



FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA
Av. Universidad No. 3000, Coyoacán, 04510, México, D.F. Tel. 56 22 59 00/01/03
56 22 58 96/ 97, Fax 56 22 59 71



CONSTANCIA DE RESULTADOS BACTERIOLOGÍA INFORME DE RESULTADOS: ANÁLISIS DE MATERIA PRIMA Y ALIMENTOS

Núm. de caso: RM- 18 / 1009

Núm. Interno: B- 18 - 514

MVZ. Responsable: MELISSA ROSAS ROSAS

Fecha: 04 06 2018

Propietario: Melissa Rosas Rosas

Núm. Externo: 3

Muestra: Bebida 3

Examen solicitado: Análisis de materia prima y alimento orientado a:

- ✓ Determinación de bacterias mesófilas aeróbicas por mililitro/gramo
- ✓ Determinación de coliformes (NMP) totales/fecales por mililitro/gramo.

RESULTADO:

Mesófilas aeróbicas: Menor a 3 UFC/ ml
Coliformes totales NMP: Menor a 2/ ml

COMENTARIOS:

UFC = Unidades Formadoras de Colonia
NMP = Número Más Probable

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Vo. Bo.

MVZ. Cristina Rodríguez Sánchez
Responsable del Diagnóstico Bacteriológico.

Vo. Bo.

Dra. Laura Gobos Marín
Jefa del Departamento

ESTE RESULTADO SOLO TIENE VALIDEZ EN FORMATO Y CON FIRMAS ORIGINALES

Rev. 1

9.4.4 Análisis microbiológico final: Formulación 3, bebida 10% pulpa + infusión

FS3-MEI-MV-005



FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA
Av. Universidad No. 3000, Coyoacán, 04510, México, D.F. Tel. 56 22 59 00/01/03
56 22 58 96/ 97, Fax. 56 22 59 71



CONSTANCIA DE RESULTADOS

BACTERIOLOGÍA INFORME DE RESULTADOS: ANÁLISIS DE MATERIA PRIMA Y ALIMENTOS

Núm. de caso: RM- 18 / 1188

Núm. Interno: B- 18 - 599

MVZ. Responsable: MELISSA ROSAS ROSAS Fecha: 07 08 2018

Propietario: Melissa Rosas Rosas Núm. Externo: F3

Muestra: Formulación 3

Examen solicitado: Análisis de materia prima y alimento orientado a:

- ✓ Determinación de bacterias mesófilas aeróbicas por mililitro/gramo
- ✓ Determinación de coliformes (NMP) totales/fecales por mililitro/gramo.

RESULTADO:

Mesófilas aeróbicas: Menor a 3 UFC/ ml
Coliformes totales NMP: Menor a 3 / ml

COMENTARIOS:

UFC = Unidades Formadoras de Colonia
NMP = Número Más Probable

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Vo. Bo.

MVZ. Cristina Rodríguez Sánchez
Responsable del Diagnóstico Bacteriológico.

Vo. Bo.

Dra. Laura Cobos Marín
Jefa del Departamento

ESTE RESULTADO SOLO TIENE VALIDEZ EN FORMATO Y CON FIRMAS ORIGINALES

Rev. 1

Anexo 9.5 Análisis estadístico de evaluación sensorial

Anexo 9.5.1 Análisis estadístico T-student de distintos atributos

Estadísticas de grupo					
Tipo		N	Media	Desv. Desviación	Desv. Error promedio
Color	Formulación 2: Bebida 15% + infusión	60	4.1000	0.85767	0.11072
	Formulación 3: Bebida 10% + infusión	60	3.7500	0.79458	0.10258
Espesor	Formulación 2: Bebida 15% + infusión	60	3.8167	0.83345	0.1076
	Formulación 3: Bebida 10% + infusión	60	3.7167	0.80447	0.10386
Acidez	Formulación 2: Bebida 15% + infusión	60	3.9333	0.79972	0.10324
	Formulación 3: Bebida 10% + infusión	60	3.1167	1.12131	0.14476
Dulzor	Formulación 2: Bebida 15% + infusión	60	2.7333	0.63424	0.08188
	Formulación 3: Bebida 10% + infusión	60	2.1333	0.81233	0.10487
Nota herbal	Formulación 2: Bebida 15% + infusión	60	2.8167	0.74769	0.09653
	Formulación 3: Bebida 10% + infusión	60	2.6000	0.96023	0.12396

Prueba de muestras independientes							
	prueba t para la igualdad de medias						
	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
						Inferior	Superior
Color	2.319	118	0.022	0.35	0.15094	0.0511	0.6489
Espesor	0.669	118	0.505	0.1	0.14954	-0.19614	0.39614
Acidez	4.593	118	0.000	0.81667	0.17781	0.46456	1.16877
Dulzor	4.51	118	0.000	0.6	0.13305	0.33652	0.86348
Nota herbal	1.379	118	0.170	0.21667	0.15711	-0.09446	0.52779

Anexo 9.5.2 Número de respuesta mínimas para concluir diferencias significativas en una prueba pareada de dos colas.

n	α					n	α				
	0,20	0,10	0,05	0,01	0,001		0,20	0,10	0,05	0,01	0,001
10	8	9	9	10	10	36	23	24	25	27	29
11	9	9	10	11	11	37	23	24	25	27	29
12	9	10	10	11	12	38	24	25	26	28	30
13	10	10	11	12	13	39	24	26	27	28	31
14	10	11	12	13	14	40	25	26	27	29	31
15	11	12	12	13	14						
16	12	12	13	14	15	44	27	28	29	31	34
17	12	13	13	15	16	48	29	31	32	34	36
18	13	13	14	15	17	52	32	33	34	36	39
19	13	14	15	16	17	56	34	35	36	39	41
20	14	15	15	17	18	60	36	37	39	41	44
21	14	15	16	17	19						
22	15	16	17	18	19	64	38	40	41	43	46
23	16	16	17	19	20	68	40	42	43	46	48
24	16	17	18	19	21	72	42	44	45	48	51
25	17	18	18	20	21	76	45	46	48	50	53
26	17	18	19	20	22	80	47	48	50	52	56
27	18	19	20	21	23						
28	18	19	20	22	23	84	49	51	52	55	58
29	19	20	21	22	24	88	51	53	54	57	60
30	20	20	21	23	25	92	53	55	56	59	63
31	20	21	22	24	25	96	55	57	59	62	65
32	21	22	23	24	26	100	57	59	61	64	67
33	21	22	23	25	27						
34	22	23	24	25	27	104	60	61	63	66	70
35	22	23	24	26	28	108	62	64	65	68	72
						112	64	66	67	71	74
						116	66	68	70	73	77
						120	68	70	72	75	79

NOTE 1 The values in the table are exact because they are based on the binomial distribution. For values of n not included in the table, an approximation of the missing entries may be obtained in the following manner: Minimum number of responses (x) is the nearest whole number greater than $x = (n + 1) / 2 + z \sqrt{0,25 n}$, where z varies as a function of the significance level as follows: 1,28 for α = 0,20; 1,64 for α = 0,10; 1,96 for α = 0,05; 2,58 for α = 0,01; 3,29 for α = 0,001.

NOTE 2 The values of n < 18 are usually not recommended for paired difference tests.

10. Referencias

- Aadil, R. M., Roobab, U., Sahar, A., Rahman, U. y Khalil, A. A. 2019. Functionality of Bioactive Nutrients in Beverages. *Nutrients in Beverages*, 237–276.
- Acosta-Montoya, O., Vaillant, F., Cozzano, S., Mertz, C., Pérez, A. M. y Castro, M. V. 2010. Phenolic content and antioxidant capacity of tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichus Schldl.*) during three edible maturity stages. *Food Chemistry*, 119(4), 1497–1501.
- Andersen, O. y Jordheim, M. 2014. *Basic Anthocyanin Chemistry and Dietary Sources*. En: Wallace, C. T., Monica Giusti, M.M., eds. *Anthocyanins in Health and Disease*. Nueva York: CRC Press. 14-65.
- Arçari, D. P., Porto, V. B., Rodrigues, E. R. V., Martins, F., de Lima, R. J., Sawaya, A. C. H. F., Ribeiro, M. L. y Carvalho, P. O. 2011. Effect of mate tea (*Ilex paraguariensis*) supplementation on oxidative stress biomarkers and LDL oxidisability in normoand hyperlipidaemic humans. *Journal of Functional Foods*, 3; 190–197.
- Arnold, L., Lofthouse, N. y Hurt, E. 2012. Artificial Food Colors and Attention-Deficit/Hyperactivity Symptoms: Conclusions to Dye for. *Neurotherapeutics*, 9; 599 - 609.
- Bakhtiari, M., Panahi, J., Ameli, J. y Darvishi, B. 2017. Protective effects of flavonoids against Alzheimer's disease-related neural dysfunctions. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 93; 218-229.
- Bakowska, A., Kucharska, A. y Oszmianski, J. 2003. The effects of heating, UV irradiation, and storage on stability of the anthocyanin-polyphenol copigment complex. *Food Chemistry*. 81: 349-355.
- Baptista, F. I., Henriques, A. G., Silva, A. M. S., Wiltfang, J. y da Cruz e Silva, O. A. B. 2014. Flavonoids as Therapeutic Compounds Targeting Key Proteins Involved in Alzheimer's Disease. *ACS Chemical Neuroscience*, 5; 83–92.
- Beattie, J., Crozier, A. y Duthie, G. 2005. Potential health benefits of berries. *Current Nutrition & Food Science*. 1; 71–86.
- Benzie, I. y Strain, J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant Power": the FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*. 239; 70-76.
- Bernabé, J., Mulero, J., Marhuenda, J., Cerdá, B., Avilé, F., Abellán, J. y Zafrilla, P. 2015. Changes in antioxidant enzymes in metabolic syndrome patients after consumption a citrusbased juice enriched with Aronia Melanocarpa. *Journal of Nutritional Disorders & Therapy*. 5, 178–180.
- Boaventura, B.C.B., Di Pietro, P.F., Stefanuto, A., Klein, G.A., de Moraes, E.C., de Andrade, F., Wazlawik, E. y da Silva, E.L. 2012. Association of mate tea (*Ilex paraguariensis*) intake and dietary intervention and effects on oxidative stress biomarkers of dyslipidemic subjects. *Nutrition* 28, 657–664.
- Boeing, J. S., Barizão, É. O., e Silva, B. C., Montanher, P. F., de Cinque Almeida, V. y Visentainer, J. V. 2014. Evaluation of solvent effect on the

- extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities from the berries: application of principal component analysis. *Chemistry Central Journal*, 8(1).
- Bracesco, N., Sánchez, G., Contreras, V., Meinini, T. y Gugliucci, A. 2011. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. *Journal of Ethnopharmacology*.136, 378-384.
 - Bravo, L., Goya, L. y Lecumberri, E. 2007. LC/MS characterization of phenolic constituents of mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hill) and its antioxidant activity compared to commonly consumed beverages. *Food Research International*. 40; 393–405.
 - Brouillard, R., Wigand, M., Dangles, O. y Cheminat, A. 1991. The pH and solvent effects on the copigmentation reaction of malvin with polyphenols, purine and pyrimidine derivatives. *Journal Chemical Society*. 2;1235-1241.
 - Brownmiller, C., Howard, L. R. y Prior, R. L. 2008. Processing and storage effects on monomeric anthocyanins, percent polymeric colour, and antioxidant capacity of processed blueberry products. *Journal of Food Science*, 5(73), H72-H79.
 - Burdock, G. A., Carabin, I. G. y Griffiths, J. C. 2006. The importance of GRAS to the functional food and nutraceutical industries. *Toxicology*. 221, 17–27.
 - Cardozo, E. L. y Morand, C. 2016. Interest of mate (*Ilex paraguariensis* A. St.Hill) as a new natural functional food to preserve human cardiovascular health – A review . *Journal of functional foods*. 21; 440–454.
 - Carvalho, C. P. y Betancur, J. A. 2015. Quality characterization of Andean blackberry fruits (*Rubus glaucus Benth*) in different maturity stages in Antioquia, Colombia. *Agronomía Colombiana*, 33(1), 74-83.
 - Castillo, R., M. 2012. *La nutrición en el marco de la educación para la salud, un instrumento para incidir en el aumento de resiliencia en el proyecto del educando*. Tesis de maestría. Universidad Nacional de Colombia.
 - Cavalcanti, R. N., Santos, D. T. y Meireles, M. A. A. 2011. Non-thermal Stabilization Mechanisms of Anthocyanins in Model and Food Systems—An Overview. *Food Research International*, 44, 409–509.
 - Chandra, S. y González de Mejía, E. 2004. Polyphenolic Compounds, Antioxidant Capacity, and Quinone Reductase Activity of an Aqueous Extract of *Ardisia compressa* Comparison to Mate (*Ilex paraguariensis*) and Green (*Camellia sinensis*) Teas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(11), 3583–3589.
 - Charalampopoulos, D., Pandiella, S. S. y Webb, C. 2003. Evaluation of the effect of malt, wheat and barley extracts on the viability of potentially probiotic lactic acid bacteria under acidic conditions. *International Journal of Food Microbiology*. 82, 133–141.
 - Cho, A. S., Jeon, S. M., Kim, M. J., Yeo, J., Seo, K. I., Choi, M. S. y Lee, M. K. 2010. Chlorogenic acid exhibits anti-obesity property and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced-obese mice. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*. 48; 937–943.
 - Chung, C., Rojanasasithara, T., Mutilangi, W. y McClements, D. J. 2016. Stabilization of natural colors and nutraceuticals: Inhibition of anthocyanin

- degradation in model beverages using polyphenols. *Food Chemistry*, 212, 596–603.
- Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticas. 2017. *Las Isoflavonas*. [En línea]. Disponible en: <https://www.portalfarma.com/Profesionales/campanaspf/categorias/Paginas/articulo03.aspx> (Último acceso el 10 de febrero de 2021).
 - Creus, E. G. 2004. Compuestos fenólicos. Un análisis de sus beneficios para la salud. *Offarm*. 23:80-4.
 - De Mejía, E. G., Song, Y. S., Heck, C. I. y Ramírez-Mares, M. 2010. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): Phenolics, antioxidant capacity and in vitro inhibition of colon cancer cell proliferation. *Journal of Functional Foods*, 2(1), 23–34.
 - De Souza, V. R., Pereira, P. A. P., da Silva, T. L. T., de Oliveira Lima, L. C., Pio, R. y Queiroz, F. 2014. Determination of the bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Brazilian blackberry, red raspberry, strawberry, blueberry and sweet cherry fruits. *Food Chemistry*, 156, 362–368. 2014.01.125.
 - Denardin, C. C., Hirsch, G. E., da Rocha, R. F., Vizzotto, M., Henriques, A. T., Moreira, J. C. F. y Emanuelli, T. 2015. Antioxidant capacity and bioactive compounds of four Brazilian native fruits. *Journal of Food and Drug Analysis*, 23(3), 387–398.
 - DIARIO OFICIAL. *ACUERDO por el que se determinan los aditivos y coadyuvantes en alimentos, bebidas y suplementos alimenticios, su uso y disposiciones sanitarias*. 2012. [En línea]. Disponible en; https://www.dof.gob.mx/nota_detalle_popup.php?codigo=5259470 (Último acceso el 10 de febrero de 2021).
 - Domínguez, J.A., Wall, A., Ruíz, C.A., Montalvo, E. y González, G.A. 2017. Use of nonthermal technologies in the production of functional beverages from vegetable ingredients to preserve heat-labile phytochemicals. *Journal of Food Processing and Preservation*. 42, 12.
 - Durst, R. y Wrolstad R, E. 2001. Separation and Characterization of Anthocyanins by HPLC. En: Wrolstand R, E. *Handbook of Food Analytical Chemistry*. New Jersey: John Wiley & Sons. 33-45.
 - Eiro, M. J. y Heinonen, M. 2002. Anthocyanin Color Behavior and Stability during Storage: Effect of Intermolecular Copigmentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(25), 7461–7466.
 - Filannino, P., Azzi, L., Cavoski, I., Vincentini, O., Rizzello, C.G., Gobbetti, M. y Di Cagno, R. 2013. Exploitation of the health-promoting and sensory properties of organic pomegranate (*Punica granatum* L.) juice through lactic acid fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 163, 184–192.
 - Galaffu, N., Bortlik, M. y Michel, M. 2015. An industry perspective on natural food colour stability. En: Scotter, J, M, *Colour Additives for Food and Beverages*. Inglaterra: Elsevier. 91-124.
 - Giusti, M. y Wrolstad, R. E. 2001. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. F:F1:F1.2.

- Gradinaru, G., Biliaderis, C., Kallithraka, S., Kefalas, P. y García-Viguera, C. 2003. Thermal stability of *Hibiscus sabdariffa* L. anthocyanins in solution and in solid state: Effects of copigmentation and glass transition. *Food Chemistry*, 83:423.
- Gras, C., Bause, K., Leptihn, S., Carle, R. y Schweiggert, R. M. 2018. Effect of chlorogenic acid on spectral properties and stability of acylated and non-acylated cyanidin-3- O -glycosides. *Food Chemistry*, 240, 940–950.
- Gras, C., Bogner, H., Carle, R. y Schweiggert, R. M. 2016. Effect of genuine non-anthocyanin phenolics and chlorogenic acid on color and stability of black carrot (*Daucus carota* ssp. *sativus* var. *atrorubens* Alef.) anthocyanins. *Food Research International*, 85, 291–300.
- Grishina, A., Kulikova, I., Alieva, L., Dodson, A., Rowland, I., y Jin, J. 2011. Antigenotoxic Effect of Kefir and Ayran Supernatants on Fecal Water-Induced DNA Damage in Human Colon Cells. *Nutrition and Cancer*, 63, 73–79.
- Harborne, J. y Simmonds, B. 1989. General procedures and measurements of total phenolics. En: Harborne J .B. Ed. *Plant Phenolics, vol 1, from "Methods in Plant Biochemistry Series"*. Londres: Academic Press. 1-28.
- Heck, C. I. y de Mejía, E. G. 2007. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): A comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. *Journal of Food Science*, 72; R138–R151.
- Heinzen, C. 2002. Microencapsulation solves time-dependent problems of foodmakers. *European Food and Drink Review*. 3; 27-3.
- Hemetoreca Natural. 2017. *Cumarinas*. [En línea]. Disponible en: http://hemerotecanatural.com/content-page.php?menu=1&submenu=4&texto_id=242 (Último acceso el 10 de febrero de 2021).
- Herradón, B. 2013. *Efectos beneficiosos de componentes químicos en el café: prevención y tratamiento de la diabetes*. [En línea]. Disponible en: <http://www.losavancesdelaquimica.com> (Último acceso el 10 de febrero de 2021).
- Herrera, C. F., Betancur, A. D. y Segura, C. M. 2014. Compuestos bioactivos de la dieta con potencial en la prevención de patologías relacionadas con sobrepeso y obesidad: péptidos biológicamente activos. *Nutrición Hospitalaria*, 29(1), 10-20.
- Hoshino, T., Matsumoto, U., Goto, T. y Harada, N. 1982. Evidence for the selfassociation of anthocyanins IV: PMR spectroscopic evidence for the vertical stacking of anthocyanin molecules. *Tetrahedron Letters*, 23, 433–436.
- Jensen, G. S., Wu, X., Patterson, K. M., Barnes, J., Carter, S. G., Scherwitz, L., Beaman, R., Endres, J. R. y Schauss, A. G. 2008. *In vitro* and *in vivo* antioxidant and anti-inflammatory capacities of an antioxidant rich fruit and berry juice blend. Results of a pilot and randomized, double-blinded, placebo-controlled, crossover study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56, 8326–8333.
- Kammerer, D. R. 2016. Anthocyanins. *Handbook on Natural Pigments in Food and Beverages*, 61–80.

- Kano, M., Masuoka, N., Kaga, C., Sugimoto, S., Iizuka, R., Manabe, K., Sone, T., Oeda, K., Nonaka, C., Miyazaki, K. y Ishikawa, F. 2013. Consecutive intake of fermented milk containing *Bifidobacterium breve* strain Yakult and galactooligosaccharides benefits skin condition in healthy adult women. *Bioscience of Microbiota Food Health* 32, 33–39.
- Kaume, L., Howard, L. y Devareddy, L. 2012. The Blackberry Fruit: A Review on Its Composition and Chemistry, Metabolism and Bioavailability, and Health Benefits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 60; 5716–5727.
- Kaur, N. y Singh, D. P. 2017. *Deciphering the consumer behaviour facets of functional foods: A literature review. Appetite*, 112, 167–187.
- Kaur, S. y Das, M. 2011. *Functional foods: An overview. Food Science and Biotechnology*, 20(4), 861–875.
- Khanbabaee, K. y Van Ree, T. 2001. Tannins: Classification and definition. *Natural product reports*. 18; 641-649.
- Kopjar, M., Jakšić, K. y Piližota, V. 2012. Influence of sugars and chlorogenic acid addition on anthocyanin content, antioxidant activity and color of blackberry juice during storage. *Journal of Food Processing and Preservation*, 36(6), 545–552.
- Kotilainen, L., Rajalahti, R., Ragasa, C., y Pehu, E. 2006. Health enhancing foods: Opportunities for strengthening the sector in developing countries. *Agriculture and Rural Development Discussion Paper* 30.
- Krikorian, R., Shidler, M. D., Nash, T. A., Kalt, W., Vinqvist-Tymchuk, M. R., Shukitt-Hale, B. y Joseph, J. A. 2010. Blueberry supplementation improves memory in older adults. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58; 3996–4000.
- Kwak, N. S. y Jukes, D. J. 2001. Functional foods. Part 1. The development of a regulatory concept. *Food Control*. 12, 99–107.
- Lunkes, I. B. F. y Hashizume, I. N. 2014. Evaluation of the pH and titratable acidity of teas commercially available in Brazilian market. *RGO - Revista Gaúcha de Odontologia*, 62(1), 59–64.
- Maite T. Escribano-Bailon y Celestino Santos-Buelga. 2012. Anthocyanin Copigmentation - Evaluation, Mechanisms and Implications for the Colour of Red Wines. *Current Organic Chemistry*, 16(6), 715–723.
- Marques, V. y Farah, A. 2009. Chlorogenic acids and related compounds in medicinal plants and infusions. *Food Chemistry*, 113; 1370–1376.
- Martínez, R. C. y Carbajal, A. A. 2012. *Componentes bioactivos de los alimentos*. [En línea]. Disponible en: https://www.kelloggs.es/content/dam/europe/kelloggs_es/images/nutritio/n/PDF/Manual_Nutricion_Kelloggs_Capitulo_02.2.pdf (Último acceso el 10 de febrero de 2021).
- Mazza, G. y Brouillard, R. 1990. The mechanism of co-pigmentation of anthocyanins in aqueous solutions. *Phytochemistry*, 29(4), 1097–1102.
- Meléndez-Mier, G. 2008. Factores asociados a sobrepeso y obesidad en el entorno escolar. En: Glosario de términos. México: *Medica panamericana*. 193.

- Mijndonckx, K., Leys, N., Mahillon, J., Silver, S. y Van Houdt, R. 2013. *Antimicrobial silver: uses, toxicity and potential for resistance*. *BioMetals*, 26(4), 609–621.
- Monteiro, D. R., Gorup, L. F., Silva, S., Negri, M., de Camargo, E. R., Oliveira, R., Barbosa, D. B. y Henriques, M. 2011. *Silver colloidal nanoparticles: antifungal effect against adhered cells and biofilms of Candida albicans and Candida glabrata*. *Biofouling*, 27(7), 711–719.
- Morata, A., López, C., Tesfaye, W., González, C. y Escott, C. 2019. Anthocyanins as Natural Pigments in Beverages. *Value-Added Ingredients and Enrichments of Beverages*, 383–428.
- Nicholson, R. y Vermerris, W. 2009. Phenolic compound biochemistry. Indiana: *Springer*. 1-34.
- Nielsen, S. 1998. *Food Analysis*. 2da edición. Estados Unidos: Aspen Publication.
- Ong, K. W., Hsu, A., Song, L., Huang, D. y Tan, B. K. H. 2011. Polyphenols-rich *Vernonia amygdalina* shows anti-diabetic effects in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 133; 598–607.
- Ozkan, G., Franco, P., De Marco, I., Xiao, J. y Capanoglu, E. 2018. A Review of Microencapsulation Methods for Food Antioxidants Principles, Advantages, Drawbacks and Applications. *Food Chemistry*. 494 – 506.
- Pan, M. H., Chiou, Y. S., Chen, L. H. y Ho, C. T. 2015. Breast cancer chemoprevention by dietary natural phenolic compounds: Specific epigenetic related molecular targets. *Molecular Nutrition. and Food Research*, 59; 21–35.
- Peñarrieta, J. M., Tejada, L., Mollinedo, P., Vila, J. L. y Bravo, A. J. 2014. Compuestos fenólicos y su presencia en alimentos. *Revista Boliviana de Química*. 31, 68-81.
- Pereira, A. L. F., Feitosa, W. S. C., Abreu, V. K. G., Lemos, T. de O., Gomes, W. F., Narain, N. y Rodrigues, S. 2017. Impact of fermentation conditions on the quality and sensory properties of a probiotic cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) beverage. *Food Research International*, 100, 603–611.
- Peres, R., Tonin, F., Tavares, M. y Rodriguez-Amaya, D. 2013. HPLC-DAD-ESI/MS Identification and Quantification of Phenolic Compounds in *Ilex paraguariensis* Beverages and On-Line Evaluation of Individual Antioxidant Activity. *Molecules*, 18(4), 3859–3871.
- Petrucci, R., Herring, F., Madura, J. y Bissonnette, C. 2011. Química General. 10ma edición. España: *Pearson Educación*.
- Petruzzi, L., Campaniello, D., Speranza, B., Corbo, M. R., Sinigaglia, M. y Bevilacqua, A. 2017. Thermal Treatments for Fruit and Vegetable Juices and Beverages: A Literature Overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(4), 668–691.
- Potera, C. 2010. DIET AND NUTRITION: The Artificial Food Dye Blues. *Environmental Health Perspectives*, 10: 4-28.
- Raman, M., Ambalam, P. y Doble, M. 2019. Probiotics, Prebiotics, and Fibers in Nutritive and Functional Beverages. *Nutrients in Beverages*, 315–367.

- Rangel-Vargas, E., Gutiérrez-Alcántara, E. J., Gómez-Aldapa, C. A., Falfán-Cortés, R. N., Segovia-Cruz, J. A., Salas-Rangel, L. P. y Castro-Rosas, J. 2016. Antibacterial activity of roselle calyx extracts, sodium hypochlorite, colloidal silver and acetic acid against multidrug-resistant salmonella serotypes isolated from coriander. *Journal of Food Safety*, 37(2), e12320.
- Ranilla, L. G., Kwon, Y. I., Apostolidis, E. y Shetty, K. 2010. Phenolic compounds, antioxidant activity and in vitro inhibitory potential against key enzymes relevant for hyperglycemia and hypertension of commonly used medicinal plants, herbs and spices in Latin America. *Bioresource Technology*, 101(12), 4676–4689.
- Rawson, A., Patras, A., Tiwari, B. K., Noci, F., Koutchma, T. y Brunton, N. 2011. Effect of thermal and non thermal processing technologies on the bioactive content of exotic fruits and their products: Review of recent advances. *Food Research International*, 44(7), 1875–1887.
- Rein, M. 2005. Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins. *University of Helsinki, Department of Applied Chemistry and Microbiology*. 88; 9- 87.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N. J. y Paganga G. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine* 20; 933-956.
- Rincón-León, F. 2003. *FUNCTIONAL FOODS. Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, 2827–2832.
- Rodríguez-Saona, L. E. y Wrolstad, R. E. 2001. *Extraction, Isolation, and Purification of Anthocyanins. Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 00(1), F1.1.1–F1.1.11.
- Rustioni, L., Bedgood, D. R., Failla, O., Prenzler, P. D. y Robards, K. 2012. Copigmentation and anti-copigmentation in grape extracts studied by spectrophotometry and post-column-reaction HPLC. *Food Chemistry*, 132, 2194- 2201.
- Sadilova, E., Stintzing, F. C. y Carle, R. 2006. Thermal Degradation of Acylated and Nonacylated Anthocyanins. *Journal of Food Science*, 71; C504-C512.
- Salinas, M. Y., García, S. C., Coutiño, E. B. y Vidal, M. V. A. 2013. Variabilidad en contenido y tipos de antocianinas en granos de color azul/morado de poblaciones mexicanas de maíz. *Revista fitotecnia mexicana*, 36;285-294.
- Šamec, D. y Piljac-Žegarac, J. 2011. Postharvest stability of antioxidant compounds in hawthorn and cornelian cherries at room and refrigerator temperatures—Comparison with blackberries, white and red grapes. *Scientia Horticulturae*, 131, 15–21.
- Santos-Buelga, C. y Scalbert, A. 2000. Proanthocyanidins and tannin-like compounds - nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 80, 1094-1117.
- Sato, Y., Itagaki, S., Kurokawa, T., Ogura, J., Kobayashi, M., Hirano, T., Sugawara, M. y Iseki, K. 2011. In vitro and in vivo antioxidant properties of

- chlorogenic acid and caffeic acid. *International Journal of Pharmaceutics*, 403; 136–138.
- Schmalko, M. y Alzamora, S. 2001. Color, chlorophyll, caffeine, and water content variation during Yerba Mate processing. *Drying Technology* 19; 599–610.
 - Schuster, B. y Herrmann, K. 1985. Hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acid derivatives in soft fruits. *Phytochemistry*. 24; 2761–2764
 - Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER). 2021. *Atlas Agroalimentario*. [En línea]. Disponible en: https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2020/Atlas-Agroalimentario-2020 (Último acceso el 10 de febrero de 2021).
 - Sigurdson, G. T., Tang, P. y Giusti, M. M. 2017. Natural Colorants: Food Colorants from Natural Sources. *Annual Review of Food Science and Technology*, 8(1), 261–280.
 - Silva, E. L., Neiva, T. J. C., Shirai, M., Terao, J. y Abdalla, D. S. P. 2008. Acute ingestion of yerba mate infusion (*Ilex paraguariensis*) inhibits plasma and lipoprotein oxidation. *Food Research International*. 41; 973–979.
 - Singleton, V. L. y Rossi, J. A. 1965. Restricted access Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*. 16; 144-1584.
 - Singleton, V. L., Orthofer, R. y Lamuela-Raventós, R. M. 1999. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods in enzymology*. 299; 152-178.
 - Stanton, C., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F. y Van Sinderen, D. 2005. Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. *Current Opinion in Biotechnology*. 16, 198–203.
 - Stea, M. 2019. Ácido fenilacético: estructura, propiedades, usos, efectos. Lifereder. [En línea]. Disponible en: <https://www.lifereder.com/acido-fenilacetico/> (Último acceso el 10 de febrero de 2021).
 - Tachibana, N., Kimura, Y. y Ohno T. 2014. Examination of molecular mechanism for the enhanced thermal stability of anthocyanins by metal cations and polysaccharides. *Food Chemistry*. 143:452–8.
 - Tajik, N., Tajik, M., Mack, I. y Enck, P. 2017. The potential effects of chlorogenic acid, the main phenolic components in coffee, on health: a comprehensive review of the literature. *European Journal of Nutrition*. 56, 2215–2244.
 - Tarko, T., Duda-Chodak, A. y Zajac, N. 2013. Digestion and absorption of phenolic compounds assessed by in vitro simulation methods. A review. *Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny*, 64(2), 79–84.
 - Technavio, 2020. Functional Foods and Beverages Market by Product and Geography-Forecast and Analysis 2020-2024. [En línea]. Disponible en: <https://www.technavio.com/report/functional-foods-and-beverages-market-industry-analysis> (Último acceso el 10 de febrero de 2021).
 - Trouillas, P., Sancho-García, J. C., De Freitas, V., Gierschner, J., Otyepka, M. y Dangles, O. 2016. Stabilizing and Modulating Color by Copigmentation:

- Insights from Theory and Experiment. *Chemical Reviews*, 116(9), 4937–4982.
- Türkyılmaz, M., Hamzaoğlu, F. y Özkan, M. 2018. Effects of sucrose and copigment sources on the major anthocyanins isolated from sour cherries. *Food Chemistry*, (281) 242 - 250.
 - Unidad de Informática del Instituto de Química. 2017. *Glosario*. [En línea]. Disponible en: <https://uniiquim.iquimica.unam.mx/compuesto-item/acido-cinamico-1181/>; <https://uniiquim.iquimica.unam.mx/glossary/chalcona/> (Último acceso el 10 de febrero de 2021).
 - Upadhyay, R. y Mohan, J. 2013. An outlook on chlorogenic acids – Occurrence, chemistry, technology, and biological activities. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53; 968–984.
 - Urushisaki, T., Takemura, T., Tazawa, S., Fukuoka, M., Hosokawa-Muto, J., Araki, Y. y Kuwata, K. 2011. Caffeoylquinic Acids Are Major Constituents with Potent Anti-Influenza Effects in Brazilian Green Propolis Water Extract. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011, 1–7.
 - Veliz, S. N., Espinosa, S. C. y Quispe S. M. 2017. Formulación y cinética de la degradación de antocianinas del néctar de zarzamora silvestre sp. por tratamiento. *Prospectiva Universitaria*. 69-76.
 - Welch, C. R., Wu, Q. y Simon, J. E. 2008. Recent Advances in Anthocyanin Analysis and Characterization. *Current Analytical Chemistry*, 4; 75–101.
 - Wilska-Jeszka, J. y Korzuchowska, A. 1996. Anthocyanins and chlorogenic acid copigmentation. Influence on the color of strawberry and chokeberry juices. *Food Research Technology* 203: 38-42.
 - Wu, X., Beecher, G. R., Holden, J. M., Haytowitz, D. B., Gebhardt, S. E. y Prior, R. L. 2006. Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54; 4069–4075.
 - Yikrazuul. 2008. *Isocumarina*. [En línea]. Disponible en: <https://es.wikipedia.org/wiki/Isocumarina> (Último acceso el 10 de febrero de 2021).
 - Yilmaz-Akyuz, E., Ustun-Aytekin, O., Bayram, B. y Tutar, Y. 2019. *Nutrients, Bioactive Compounds, and Health Benefits of Functional and Medicinal Beverages*. *Nutrients in Beverages*, 175–235.
 - Zhao, C. L., Yu, Y. Q., Chen, Z. J., Wen, G. S., Wei, F. G., Zheng, Q. y Xiao, X. L. 2017. *Stability-increasing effects of anthocyanin glycosyl acylation*. *Food Chemistry*, 214, 119–128.
 - ZooFari. 2010. *Aurone*. [En línea]. Disponible en: <https://en.wikipedia.org/wiki/Aurone> (Último acceso el 10 de febrero de 2021).