



UNIVERSIDAD
PRIVADA
DEL NORTE

FACULTAD DE INGENIERÍA

Carrera de Ingeniería Agroindustrial

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE
EN BEBIDAS FUNCIONALES PARA UN
MERCADO DE CONSUMO: una revisión
sistemática entre 2009 y 2019.

Trabajo de investigación para optar al grado de:

Bachiller en Ingeniería Agroindustrial

Autor:

Gian Marco Bueno Chulluncuy

Asesor:

Mg. Ing. Marlon Walter Valderrama Puscan

Trujillo - Perú

2020



DEDICATORIA

Se la dedico al forjador de mi camino, a mi padre celestial, el que me acompaña y
siempre me levanta de mi continuo tropiezo.

A mis padres que siempre me han acompañado y motivado para seguir adelante,
por lo cual estoy profundamente agradecido y orgullo de ellos.



AGRADECIMIENTO

A Dios, por permitirme estar un día más con vida y ser el creador y forjador de mi camino.

A mis padres, por brindarme su amor y apoyo.

A Anita, una persona muy especial que siempre me apoyo cuando más lo necesitaba.

A mi asesor, Marlon Walter Valderrama Puscan, por su tiempo y dedicación al compartir sus conocimientos, para así poder culminar con éxito esta revisión sistemática.



Tabla de contenido

DEDICATORIA.....	2
AGRADECIMIENTO	3
ÍNDICE DE TABLAS.....	5
ÍNDICE DE FIGURAS	6
RESUMEN	7
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	8
CAPÍTULO II. METODOLOGÍA.....	11
CAPÍTULO III. RESULTADOS	18
CAPÍTULO IV. CONCLUSIONES	30
REFERENCIAS.....	32
ANEXOS	34



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Artículos incluidos en la revisión.....	13
Tabla 2: Publicaciones relacionadas con la capacidad antioxidante y bebida funcional según año y país.....	18
Tabla 3: Motor de búsqueda según el idioma.....	19
Tabla 4: Características normalizadas de los métodos de medida de la capacidad antioxidante.....	27
Tabla 5: Ventajas y desventajas de los métodos de medida de capacidad.....	29



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estructura química del radical libre metaestable DPPH.	20
Figura 2: Radical ABTS+.	22
Figura 3: Fundamento del método CRHF mostrando la reducción de 2,4,6-Tripiridil-Triazina Férrica (TPTZ).	24

RESUMEN

En los últimos años la industria alimentaria elabora productos que no solo tengan un sabor agradable, sino que también aporten nutrientes y sean favorables para la salud, por lo que la presencia de antioxidantes en las bebidas funcionales cada vez es más importante. La presente revisión sistemática tiene como objetivo el cómo determinar la capacidad antioxidante en bebidas funcionales en el mercado de consumo entre los años 2009 y 2019. Por lo que se revisó la literatura científica, se definieron descriptores las cuales fueron: “bebida funcional”, “capacidad antioxidante” en la búsqueda en español y términos similares como: “antioxidant capacity”, “functional drink” en inglés; luego se utilizó como motor de búsqueda a EBSCO, SciELO y Google Académico; las investigaciones obtenidas se guardaron en una matriz en Excel donde se revisó, organizó y se procedió a eliminar las fuentes que estaban repetidas y las que no se podía acceder, luego se especificó el motor de búsqueda, título, autor, año, país, idioma, tipo de método, palabras claves y motivo de descarte o inclusión. Como resultados de describieron los métodos: DPPH, ABTS, FRAP, ORAC, TRAP y Folin-Ciocalteu. Como conclusión se consideró que el método DPPH es más confiable y da resultados más precisos.

PALABRAS CLAVES: antioxidante, DPPH, ABTS, FRAP, ORAC, TRAP.

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

En los últimos años la industria alimentaria elabora productos que no solo tengan un sabor agradable, sino que también aporten nutrientes y sean favorables para la salud. “El incremento en el desarrollo de alimentos funcionales, los cuales son definidos como aquellos alimentos que se consumen en la dieta diaria y que además de cumplir con la característica básica de nutrir, son capaces de influir positivamente en alguna función biológica o de reducción del riesgo de padecer enfermedades. Entre esta nueva categoría de alimentos destacan las bebidas funcionales, cuyo consumo ha aumentado aproximadamente 30% en los últimos años y se prevé un aumento muy importante en los próximos 10 años” (Preciado, 2016)

Es por eso que actualmente los consumidores optan por buscar alimentos naturales y saludables como por ejemplo las frutas y verduras. “La preferencia de los consumidores es obtener dietas óptimas para mantener una buena salud y eso se refleja en la desconfianza hacia alimentos procesados y el aumento del mercado de alimentos naturales, las frutas contienen abundantes componentes bioactivos de bajo costo y estos componentes han demostrado actividad antimicrobiana, anticancerígena, antiinflamatoria, inmunoestimulante y actividad antioxidante” (Alfaro, 2019)

En los últimos años se ha descubierto evidencias que permiten confirmar que los radicales libres y el conjunto de especies reactivas que se les asocian juegan un papel central en nuestro equilibrio homeostático, en otras palabras, es el normal funcionamiento de los mecanismos de regulación que conservan el estado normal fisiológico de los organismos. En

los seres humanos son muchos los procesos fisiopatológicos causados por estas especies tales como los mecanismos patogénicos asociados a virus, bacterias, parásitos y células anormales, constituyendo un mecanismo de defensa del organismo frente a estos agresores. Cuando el aumento del contenido intracelular de ERO sobrepasa las defensas antioxidantes de la célula se produce el estrés oxidativo, a través del cual se induce daño a moléculas biológicas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. El estrés oxidativo se presenta en diversos estados patológicos en los cuales se altera la funcionalidad celular, contribuyendo o retroalimentando el desarrollo de enfermedades degenerativas como la aterosclerosis, cardiomiopatías, enfermedades neurológicas y cáncer; por lo que consumir alimentos ricos en antioxidantes permitirá a nuestras células a anular la reactividad y/o inhibir la generación de radicales libres (Suwalsky & Avello, 2016).

La presencia de antioxidantes tiene gran importancia en muchos alimentos porque incrementa el precio del producto y aporta muchos beneficios para la salud. Según (Rivera, Carrillo, Novillo, Peñafiel, & Landines, 2016) “Los antioxidantes son sustancias que previenen o retardan el daño oxidativo producido por los radicales libres. Para que una sustancia actúe como antioxidante debe ser capaz de reaccionar fácil y específicamente con un radical libre, neutralizándolo e impidiendo el daño oxidativo a las células”.

Por consiguiente, es necesario que el consumo de estos alimentos sea de una manera fácil y rápida para una sociedad con un ritmo de vida tan acelerado que cada vez tiene menos tiempo de alimentarse adecuadamente, por eso las bebidas funcionales cumplen un rol importante en satisfacer a ese tipo de consumidores. “La bebida funcional es un producto bebestible que satisface la sed, no alcohólico, listo para beber y que incluye en su formulación ingredientes no tradicionales como hierbas, vitaminas, minerales, aminoácidos



o un ingrediente adicional fruta/vegetal crudo, dependiendo del propósito para el cual fue diseñado” (Marroquín, 2015)

Por esta razón, teniendo en cuenta los elementos anteriores, el motivo del presente trabajo busca dar solución a este problema: ¿Cómo se determina la capacidad antioxidante en bebidas funcionales? Con el propósito de averiguar el mejor el mejor método y los procedimientos necesarios que se servirán como base para la investigación que se realizará posteriormente.

El objetivo de esta revisión sistemática es conocer como determinar la capacidad antioxidante en bebidas funcionales en el mercado de consumo, a partir del análisis de la literatura científica entre los años 2009 al 2019.

CAPÍTULO II. METODOLOGÍA

1. Tipo de estudio

Se realizó una revisión sistemática de la literatura científica con base en la adaptación de la metodología PRISMA (*Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses*). La pregunta de investigación establecida para conducir el proceso metodológico fue la siguiente: ¿Cómo determinar la capacidad antioxidante en bebidas funcionales para el mercado de consumo entre los años 2009 y 2019?

2. Fundamentación de la metodología

Lo que se espera con este trabajo es poder mostrar cómo se determina la capacidad antioxidante en bebidas funcionales, ya que una revisión sistemática da para encontrar una mayor información, y de mejor calidad, sobre trabajos realizados sobre el tema indicado. A través de la búsqueda de información se ha podido encontrar una gran variedad de tesis y artículos de diversos países lo que demuestra que existe actualmente un interés en el tema, por el incremento de personas que buscan cuidar su salud.

3. Proceso de recolección de información

Para garantizar la sensibilidad del proceso de búsqueda se definieron como descriptores los siguientes términos a partir de la pregunta de investigación: “bebida”, “funcional”, “saludable”, “capacidad”, “antioxidante”, “antioxidant”, “capacity”, “functional”, “drink”. Por especificidad de la búsqueda de la literatura científica, se diseñó un protocolo con la

combinación de los términos establecidos, las cuales fueron: “bebida funcional”, “capacidad antioxidante” en la búsqueda en español y términos similares como: “antioxidant capacity”, “functional drink” en inglés. Igualmente se utilizó como motor de búsqueda a EBSCO, SciELO y Google Académico. Las rutas específicas de búsqueda se describen a continuación:

EBSCO

“bebida funcional” y “capacidad antioxidante”

“antioxidant capacity” y “functional drink”

SciELO

“bebida funcional” y “capacidad antioxidante”

Google Académico

“bebida funcional”, “antioxidante”

“antioxidant capacity” y “functional drink”

4. Criterios de inclusión y de exclusión

Se incluyeron artículos y tesis publicados en bases de datos científicas indexadas, en idioma español e inglés, entre los años 2009 y 2019, que estuvieran relacionadas con el tema, las cuales se guardaron en una matriz en Excel donde se obtuvieron 40 fuentes, luego se revisó, organizó y se procedió a eliminar las fuentes que estaban repetidas y las que no se

podía acceder, luego se especificó el motor de búsqueda, título, autor, año, país, idioma, tipo de método, palabras claves y motivo de descarte o inclusión, en este último criterio se incluyeron aquellas tesis y artículos que estuvieron dentro del rango de los años descrito anteriormente y aportaran información relevante respecto al tema a desarrollar, por otra parte se excluyeron aquellas tesis y artículos que estuvieron fuera del rango de los años 2009-2019, y no aportaran información relevante del tema a desarrollar. A continuación, se presenta el formato de la matriz con dos artículos analizados como muestra.

Tabla 1: Artículos incluidos en la revisión

BASE DE DATOS	TÍTULO DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN	AUTOR	AÑO	PAÍS	IDIOMA	TIPO DE MÉTODO	PALABRAS CLAVES	CRITERIO S/N	MOTIVO DE DESCARTE O INCLUSIÓN
SCIELO	Estabilidad de Antocianinas, Fenoles totales y Capacidad Antioxidante de Bebidas de Maíz Morado (Zea mays L.) y Uña de Gato (<i>Uncaria tomentosa</i> sp)	Edilberto Flores & Emille del P. Flores	2017	Perú	Español	ABTS	bebida funcional, capacidad antioxidante	S	Aporta información relevante
EBSCO	Contenido de polifenoles y capacidad antioxidante de bebidas elaboradas con panela	Jhoana Colina, Marisa Guerra, Doralys Guilarte & Carlos Alvarado	2012	Venezuela	Español	DPPH ORAC	bebida funcional, capacidad antioxidante	S	Aporta información relevante
EBSCO	Análisis de la actividad antioxidante en la flor de jamaica (<i>hibiscus sabdariffa</i> L.) mediante las técnicas frap y dpph	Jessica Batalla-Mayoral, Miriam Vega-Hernández, Angel Silveti-Loeza	2019	México	Español	DPPH FRAP	capacidad antioxidante	S	Aporta información relevante
EBSCO	Actividad antioxidante en cinco variedades de <i>Psidium guajava</i> L.	Cortes-Penagos, C. & Cazares-Romero, A.	2016	México	Español	DPPH ABTS	bebida funcional, capacidad antioxidante	S	Aporta información relevante

EBSCO	Análisis de ácidos fenólicos y actividad antioxidante de extractos acuosos de variedades de jamaica (hibiscus sabdariffa l.) con cálices de colores diversos.	Reyes Luengas, Alberto – Salinas Moreno, Yolanda - Manuel E. Ovando Cruz - Ramón I. Arteaga Garibay & Marcos D. Martínez Peña	2015	México	Español	DPPH	bebida funcional, capacidad antioxidante	S	Aporta información relevante
EBSCO	Assessment of Antioxidant Properties of Classic Energy Drinks in Comparison with Fruit Energy Drinks	Dariusz Nowak , Michał Gosliński	2019	Polonia	Inglés	DPPH ABTS	antioxidant capacity, functional drink	S	Aporta información relevante
SCIELO	Evaluación de propiedades antioxidantes y fisicoquímicas de una bebida mixta durante almacenamiento refrigerado	Margareth Santander-M.; Oswaldo Osorio M.; Diego Mejía-España	2016	Colombia	Español	DPPH	bebida funcional, capacidad antioxidante	S	Aporta información relevante
EBSCO	Procesamiento del Té Verde, enriquecido con Vitamina C y Superóxido Dismutasa para la obtención de una bebida funcional antioxidante	Rivera, C., Carrillo, M., Novillo, N., Peñafiel, R., & Landines, F	2016	Ecuador	Español		bebida funcional, capacidad antioxidante	S	Aporta información relevante
EBSCO	Diseño de una bebida funcional con capacidad antioxidante a base de pulpa de mango (mangifera indica l.), noni (morinda citrifolia) y aguaymanto (physalis peruviana l.)	Sarela Alfaro	2019	Perú	Español	DPPH	bebida funcional, capacidad antioxidante	S	Aporta información relevante
EBSCO	Compuestos bioactivos y actividad antioxidante de frutos rojos y bebidas elaboradas a partir de ellos	María de los Ángeles Varo Santos	2018	España	Español	DPPH	bebida funcional, capacidad antioxidante	S	Aporta información relevante

EBSCO	Caracterización y capacidad antioxidante de bebidas vegetales a base de Horchata y pulpas de fresa, guayaba y mango	Evelyn Tatiana Córdova Fuentes	2018	España	Español	DPPH	bebida funcional, capacidad antioxidante	S	Aporta información relevante
EBSCO	Efecto de la germinación de tres variedades de quinua: Roja (INIA-415 Pasankalla), Negra (INIA 420-Negra Collana) y Blanca (Salcedo INIA) en la formulación y elaboración de una bebida funcional con capacidad antioxidante	Jessica Yvonne Bendezú Ccanto	2018	Perú	Español	ABTS	bebida funcional, capacidad antioxidante	S	Aporta información relevante
EBSCO	Efecto de las condiciones de almacenamiento sobre el color, contenido de polifenoles y capacidad antioxidante de una bebida de Borojoa patinoi Cuatrecasas	Gustavo Adolfo CAMELO-MÉNDEZ & Luz Indira SOTELO DÍAZ	2012	Colombia	Español	DPPH	bebida funcional, capacidad antioxidante	S	Aporta información relevante
EBSCO	Estudio de actividad antioxidante de la bebida funcional obtenido con diferentes tiempos de infusión de hojas de alfalfa (Medicago sativa) secados a diferentes temperaturas	Cueva Fabian, Thalia y Martinez Carrasco, Segundo Amancio	2016	Perú	Español	DPPH ABTS	bebida funcional, capacidad antioxidante	S	Aporta información relevante
EBSCO	Evaluación de la actividad antioxidante de una bebida refrescante a base de lactosuero adicionada con pulpa de curuba (Passiflora Mollissima Bailey), durante su almacenamiento	Angélica Julieth Morales Fernández - Yurany Andrea Vivas Rojas	2015	Colombia	Español	DPPH	bebida funcional, capacidad antioxidante	S	Aporta información relevante
EBSCO	Determinación del contenido de polifenoles y actividad antioxidante de una bebida láctea	Franco Agurto, Gianella Lisbeth	2014	Ecuador	Español	DPPH	bebida funcional, capacidad antioxidante	S	Aporta información relevante

	elaborada a base de residuos agro industriales de cacao, café y naranja								
EBSCO	Actividad antioxidante y biodisponibilidad mineral de zumos de frutas adicionados de minerales y/o leche	Antonio Cilla Tatay	2009	España	Español	DPPH ABTS ORAC FRAP TRAP Folin-Ciocalteu	bebida funcional, capacidad antioxidante	S	Aporta información relevante
EBSCO	Elaboración de Una Bebida con Extracto de Zanahoria (Daucus Carota) Combinado con Zumo de Mandarina (Citrus Reticulata) y Naranja Agria (Citrus Aurantium) y Evaluación de su Capacidad Antioxidante	Coronado Mayta, Ricardo	2019	Perú	Español	ABTS	bebida funcional, capacidad antioxidante	S	Aporta información relevante
EBSCO	Evaluación fisicoquímica y capacidad antioxidante de Moringa (Moringa oleífera) Y Maracuyá (Passiflora edulis)	Nubia-Lisbeth Matute; Angie Lisbeth López & Ana-Paola Echavarría	2017	Ecuador	Español	DPPH	bebida funcional, capacidad antioxidante	S	Aporta información relevante
EBSCO	Formulación de una bebida funcional a partir de extracto de equisetum arvense "Cola de caballo" y Zea mays l. "Maíz morado" edulcorado con Stevia rebaudiana bertonii "Estevia"	Romero Chuquiyaui, Brenda	2019	Perú	Español	DPPH	bebida funcional, capacidad antioxidante	S	Aporta información relevante
GOOGLE ACADEMICO	Desarrollo, caracterización y evaluación in vitro de una bebida funcional a base de extractos optimizados de jamaica y té verde	Alejandra Montserrat Preciado Saldaña	2016	México	Español		bebida funcional, capacidad antioxidante	S	Aporta información relevante
GOOGLE ACADEMICO	Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad	Londoño Londoño, Julián	2012	Colombia	Español	DPPH ABTS ORAC FRAP TRAP Folin-Ciocalteu	bebida funcional, capacidad antioxidante	S	Aporta información relevante

GOOGLE ACADEMICO	Optimización de la cadena de abastecimiento para una industria de bebidas funcionales	Héctor Francisco Marroquín Calderón	2015	Guatemala	Español		bebida funcional, capacidad antioxidante	S	Aporta información relevante
GOOGLE ACADEMICO	Control and comparison of the antioxidant capacity of beers	Paula Alexandra Ribeiro Tafulo, Raquel Barbosa Queirós, Cristina Maria Delerue-Matos, Maria Goreti Ferreira Sales	2010	Portugal	Inglés	DPPH ABTS ORAC FRAP TRAP	antioxidant capacity, functional drink	S	Aporta información relevante

CAPÍTULO III. RESULTADOS

5. Año y país de la publicación

Se seleccionaron 24 documentos que cumplieron con los criterios de selección establecidos, se evidencia mayor número de publicaciones en los años 2016 y 2019 con un total de 5 investigaciones cada año, donde el país que predomina es Perú en el 2019 y México en el 2016. Los años que registran un menor número de publicaciones son el 2011 y 2013 en las que no se encontraron ninguna investigación realizada. A nivel general, Perú es el país que presenta un mayor número de publicaciones, seguido por México y Colombia. Las publicaciones seleccionadas relacionadas con el tema han sido de diferentes partes del mundo, como se presenta en la tabla 1.

Tabla 2: Publicaciones relacionadas con la capacidad antioxidante y bebida funcional según año y país

AÑO / PAÍS	COLOMBIA	ECUADOR	ESPAÑA	GUATEMALA	MÉXICO	PERÚ	PORTUGAL	POLONIA	VENEZUELA	TOTAL GENERAL
2009			1							1
2010							1			1
2012	2								1	3
2014		1								1
2015	1			1	1					3
2016	1	1			2	1				5
2017		1				1				2
2018			2			1				3
2019					1	3		1	1	5
TOTAL GENERAL	4	3	3	1	4	6	1	1	1	24

6. Idioma de las publicaciones y motores de búsqueda

La gran mayoría de las publicaciones seleccionadas están en el idioma español, seguidos de inglés. Se identifica 3 motores de búsqueda, donde destaca EBSCO con 18 publicaciones, seguido por Google Académico con 4 y SCIELO con 2, como se presenta en la tabla 2.

Tabla 3: Motor de búsqueda según el idioma

IDIOMA/MOTOR DE BÚSQUEDA	EBSCO	GOOGLE ACADÉMICO	SCIELO	TOTAL GENERAL
ESPAÑOL	17	3	2	22
INGLÉS	1	1		2
TOTAL GENERAL	18	4	2	24

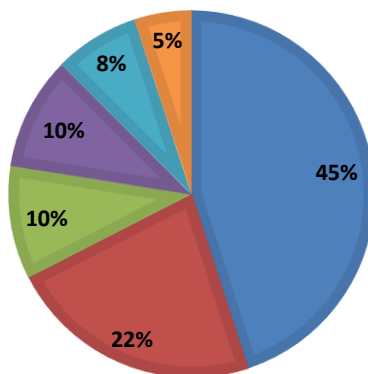
7. Tipos de métodos empleados

De los artículos seleccionados se determinó cual era el tipo de método empleado para determinar la capacidad antioxidante, por lo que se organizó en un gráfico circular para poder analizar cual era el método más empleado; en los resultados se evidencia que el método DPPH fue usado un 45% de las veces, siendo este método el más empleado, seguido del método ABTS con un 22%, el método ORAC y FRAP con un 10% en ambos casos, el método TRAP con un 8% y finalmente el método menos utilizado fue el Folin-Ciocalteu con un 5%.

Gráfico 1: Gráfico circular tipos de métodos empleados

TIPOS DE MÉTODOS EMPLEADOS

■ DPPH ■ ABTS ■ ORAC ■ FRAP ■ TRAP ■ Folin-Ciocalteu



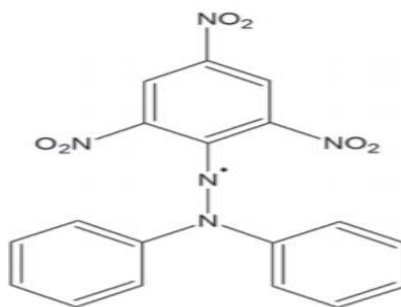
8. Métodos para determinar la capacidad antioxidante en bebidas funcionales

8.1. Método DPPH

Para la medida de la actividad antioxidante de los zumos y vinos se utiliza el ensayo DPPH (2,2-difenilpicrilhidrazilo) de acuerdo al método usado por (Varo, 2018).

Figura 1: Estructura química del radical libre metaestable DPPH. (Londoño, 2012)

Para ello se prepara diariamente una disolución de DPPH de concentración



45 mg/L en metanol, almacenándola en un frasco opaco durante su utilización y se utiliza como estándar una disolución de 80 mg/L de Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-carboxílico), un análogo de la vitamina E.



Las muestras se diluyen 10 veces previamente a su análisis, con una disolución de etanol 12% en agua, de las cuales se toman alícuotas de 200 μ L que se añaden en cubetas de 1cm de paso óptico, que contienen 3 mL de la disolución de DPPH 45 mg/L en metanol. Paralelamente se prepara un blanco (200 μ L de muestra diluida en 3 mL de metanol), un control (200 μ L de etanol 12% en agua en 3 mL de la disolución de DPPH) y un estándar (200 μ L de la disolución de Trolox en 3 mL de la disolución de DPPH). Se mide la absorbancia a 517 nm, del control y del blanco a temperatura ambiente, y tras 10 minutos de incubación, se mide la absorbancia a la misma longitud de onda del estándar y de la muestra.

Los resultados, expresados en mmoles de Trolox equivalentes (mmol TE) por litro, se calculan de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$A_{\text{muestra}} = A_{\text{muestra}} (t=120 \text{ min}) - A_{\text{blanco}}$$

$$A_1 = A_{\text{control}} (t=0) - A_{\text{muestra}}$$

$$A_2 = A_{\text{control}} (t=0) - A_{\text{estándar}} (t=120 \text{ min})$$

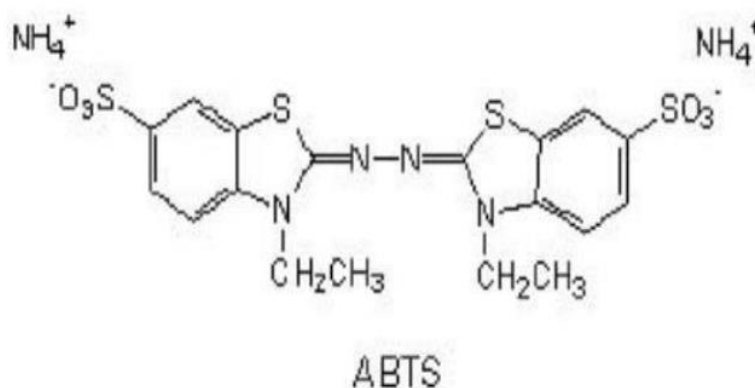
$$AA \text{ (mmol TE/L)} = (0.32 \times A_2 \times \text{factor de dilución}) / A_1$$

8.2. Método TEAC o ABTS

En este método (Bendezú, 2018), el producto de la oxidación del ABTS (Acido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6- sulfónico), el catión-radical de larga vida $ABTS^{\cdot+}$, se presenta como un excelente instrumento para determinar la actividad antioxidante de moléculas donadores de hidrógeno. Dicho método originalmente estaba basado en la activación de la metilmioglobina con peróxido de hidrógeno en presencia de ABTS para producir un radical catión, en presencia o

ausencia de antioxidantes. Un formato más apropiado para el ensayo consiste en la técnica de decoloración, en la cual el radical es generado directamente en una forma estable antes de la reacción con los antioxidantes. La técnica mejorada para la generación del radical catión ABTS⁺ (Ilustración 1), implica la producción directa del cromóforo ABTS⁺ verde-azul a través de la reacción entre ABTS y el persulfato de potasio (K₂S₂O₈)

Figura 2: Radical ABTS⁺. Obtenido de (Bendezú, 2018)



La determinación de la capacidad antioxidante equivalente en Trolox (TEAC) se evaluó utilizando el método del ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS, por sus siglas en inglés) descrito por Floegel et al., (2011) 50. El método se modificó para ser adaptado usando un espectrofotómetro de marca Zuzi 4255- HJD004, se pesó 15.52 mg del reactivo ABTS y se disolvió en 4mL de agua destilada, a la solución se le agregó 2.64 mg de persulfato de potasio (K₂S₂O₈) dejando reaccionar por 16 horas a temperatura ambiente y en un frasco ámbar.



La solución de trabajo final se preparó con etanol absoluto a una absorbancia de 0.700 ± 0.02 y longitud de onda de 754 nm.

Posteriormente para cada tratamiento se pesaron 2.5 g de muestra y 12.5 mL de etanol absoluto y se centrifugó por 20 minutos a 5000 rpm, pasado el tiempo se midió la absorbancia en el espectrofotómetro a 754 nm. Las absorbancias se registraron a los 10 min de reacción y por triplicado. El porcentaje de inhibición de la absorbancia se calculó de acuerdo con la ecuación

$$\text{Inhibición (\%)} = 100 \times (1 - \frac{A_{\text{muestra}}}{A_{\text{control}}})$$

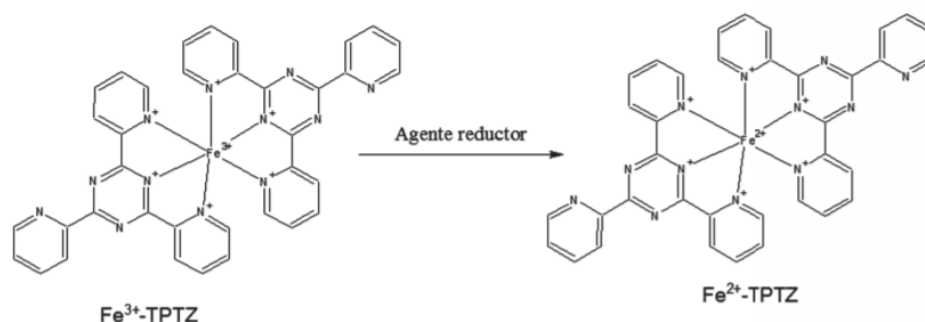
8.3. Método FRAP o CRHF

El método FRAP mide la capacidad de los antioxidantes para reducir el complejo férrico 2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina $[\text{Fe}^{3+}-(\text{TPTZ})_2]^{3+}$ al complejo ferroso de color azul intenso $[\text{Fe}^{2+}-(\text{TPTZ})_2]^{2+}$ en medio ácido. Este método mide la potencia reductora en plasma, pero actualmente ha sido adaptado y usado para ensayo de antioxidantes en alimentos. (Batalla, Vega, & Silveti, 2019)

La capacidad antioxidante por método FRAP se determinó según la metodología de (Batalla, Vega, & Silveti, 2019). Se realiza una curva de calibración de Trolox (ácido 6- hidroxil-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) con soluciones estándar de 25-1000 μM , partiendo de una solución madre de 1000 μM . Se preparan las siguientes soluciones: a) Solución de buffer acetato (pH cercano a 3.6), b) Solución TPTZ (2,4,6- Tris(2-piridil)-s-triazina) (10 μM), c) Solución de cloruro férrico hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) y d) Solución FRAP. Se toma una alícuota de 150 μL de extracto diluido (1000 ppm) y a cada estándar se les agregan 2850 μL de

la solución FRAP. Las mezclas se agitan por unos segundos y se incuban a temperatura ambiente y en oscuridad por 30 min. Posteriormente, se lee la absorbancia de la muestra y de los estándares en un espectrofotómetro a 593 nm de longitud de onda.

Figura 3: Fundamento del método CRHF mostrando la reducción de 2,4,6-Tripiridil-Triazina Férrica (TPTZ). (Londoño, 2012)



8.4. Método ORAC o CARO

El método ORAC ha sido utilizado en la determinación de la capacidad antioxidante total de diversos zumos de frutas tales como: uva, pomelo, tomate, naranja, manzana, limón, lima y en bebidas a base de zumo de frutas con leche únicamente en zumos de grosella negra y zumo de naranja. (Cilla, 2009)

Para este método según (Colina, Guerra, Guilarte, & Alvarado, 2012) como solución estándar se utilizó Trolox (ácido 6-hidroxi-2, 5, 7,8-tetrametilcromo-2-carboxílico, de Sigma–Aldrich, Steinheim, Germany), un análogo de la vitamina E soluble en agua. La reacción se llevó a cabo en 75 mM tampón fosfato (PBS) pH 7,4 y el volumen de reacción final fue de 200 μL . Se preparó un blanco usando tampón fosfato en lugar del antioxidante y se prepararon ocho soluciones de Trolox (0,2-1,6 nmoles, contenido final en mezcla de reacción). Los blancos, las soluciones estándares, las diluciones de la bebida (20 μL) y la fluoresceína (de Sigma–Aldrich,

Steinheim, Alemania; 120 μL de 70 nM de concentración final) fueron colocadas, por triplicado, en una microplaca negra de 96 pozos fondo plano y preincubadas por 10 minutos a 37 °C. Rápidamente con una pipeta multicanal se dosificaron, en cada pozo, 60 μL de una solución, 12 mM de concentración final, de AAPH (2,2'-Azobis (2-amidinopropano) dihidrocloruro; Sigma–Aldrich, Steinheim, Alemania). Inmediatamente la microplaca fue introducida en un fluorómetro TECAN GENIOS (Tecan Trading AG, Suiza) con filtros de 485 nm excitación y 520 nm emisión, programado para registrar la fluorescencia cada minuto después de la adición del AAPH, durante 137 minutos (104 ciclos), con 10 seg de agitación antes de cada lectura por ciclo. Todas las medidas se expresaron en relación a la lectura inicial. El resultado fue calculado usando la diferencia de áreas bajo las curvas de decaimiento de la fluoresceína entre el blanco y la muestra, estos fueron expresados como micromoles equivalentes de Trolox por 100 mL ($\mu\text{mol ET}/100\text{ mL}$).

8.5. Método TRAP

El método TRAP según (Ribeiro, Barbosa, Delerue, & Ferreira, 2010). Se basa en la generación de radicales peróxidos por el ataque de un compuesto azoico a un sustrato. Típicamente, estos radicales tienen suficiente energía para extraer hidrógeno de un sustrato. Cuando el ácido 2,2-azinobis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS) se agrega al compuesto azoico 2,20 -azobis (2-amidinopropano) dihidrocloruro (AAPH), se produce la formación del catión radical ABTS. El radical formado da a la solución un color azul que en presencia de AO (cualquier sustancia que, cuando está presente en bajas concentraciones en

comparación con las de un sustrato oxidable, retrasa significativamente o previene la oxidación de ese sustrato) que actúan como agentes reductores se vuelve incoloro por la reducción del radical ABTS. Esta reacción se puede controlar por espectrofotometría a 734 nm.

8.6. Método Polifenoles solubles totales (Folin-Ciocalteu)

La determinación del contenido total de compuestos fenólicos, descrito por (Londoño, 2012) , no es considerada en sí misma una metodología para medir actividad antioxidante, a pesar de que su principio se basa en la capacidad redox de los polifenoles. Sin embargo, la alta correlación de los resultados con otros métodos como CARO y DPPH ha hecho que este método se popularice como una herramienta simple y rápida para predecir actividad antioxidante, principalmente en matrices complejas, donde la cantidad de compuestos fenólicos más que la composición específica de estas sustancias determina la actividad antioxidante. El método se fundamenta en la oxidación de los compuestos fenólicos presentes en una muestra, por la acción del polianión molibdotungstosfosfórico para generar un producto coloreado con un máximo de absorción a 765 nm. Una de las modificaciones al método implica el uso de ácido gálico como compuesto fenólico de referencia, de tal manera que los resultados se expresan en equivalentes de ácido gálico (EGA). Sin embargo, múltiples trabajos han utilizado igual variedad de estándares, entre los que se cuentan: catequina, ácido tánico, ácido clorogénico, ácido caféico, ácido protocatecúico y ácido ferúlico, lo cual imposibilita la comparación entre muestras, además de las variaciones que implica la no

estandarización del método en cuanto a condiciones críticas como proporciones de reactivos, temperatura y tiempo de lectura. Pese a esto, actualmente el método de Folin-Ciocalteu es ampliamente utilizado, principalmente en complemento con otros métodos para medición de actividad antioxidante, puesto que ya se conoce el valor de EGA para una amplia cantidad de frutas, vegetales, bebidas; por lo tanto, es posible la comparación de una muestra con estos datos, siempre y cuando se sigan los procedimientos reportados.

9. Comparación de métodos para determinar la capacidad antioxidante

Tabla 4: Características normalizadas de los métodos de medida de la capacidad antioxidante (Cilla, 2009)

MÉTODO	RADICAL	PARÁMETRO DE MEDIDA Y TÉCNICA	MECANISMO	EXPRESIÓN DE RESULTADOS
TEAC	ABTS.+	- Descenso de ABTS.+ - Espectrofotometría	ET/HA T	Equivalentes Trolox
ORAC	AAPH	- Inhibición descenso fluorescencia PE/FL - Fluorimetría	HAT	Equivalentes Trolox
POLIFENOLE S SOLUBLES TOTALES (FOLIN CIOCALTEU)	--	- Reducción reactivo fosfomolibdotúngstico - Espectrofotometría	ET	Equivalentes Ácido gálico
TRAP	AAPH	- Consumo de oxígeno - Electrodo de oxígeno	HAT	Equivalentes Trolox
DPPH	DPPH.	- Descenso de DPPH. - Espectrofotometría	ET/HA T	EC50 (cantidad de muestra que reduce DPPH. al 50%)
FRAP	--	- Reducción TPTZ-Fe3+	ET	μmol Fe2+/L



a TPTZ- Fe²⁺
- Espectrofotometría

Tabla 5: Ventajas y desventajas de los métodos de medida de capacidad (Cilla, 2009)

	VENTAJAS	DESVENTAJAS
TEAC	<ol style="list-style-type: none"> 1. Económico y fácil de usar. 2. pH estable (permite estudiar el efecto del pH sobre la CAT). 3. Tiempo de reacción rápido. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Etapa extra necesaria para generar el radical libre a partir del ABTS 2. El radical libre generado no es estable 3. No estandarizado. Dificultad al comparar valores entre laboratorios
ORAC	<ol style="list-style-type: none"> 1. Usa radicales libres de relevancia biológica 2. Estandarizado. Permite comparar valores entre laboratorios 3. Los resultados integran el grado y el tiempo de reacción del antioxidante 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Equipo de medida caro 2. Variabilidad de datos según el equipo de medida utilizado 3. pH sensible 4. Tiempos largos para cuantificar resultados
POLIFENOLES SOLUBLES TOTALES	<ol style="list-style-type: none"> 1. Económico y fácil de usar 2. Excelente correlación con métodos de medida CAT 	<ol style="list-style-type: none"> 1. No estandarizado. Dificultad al comparar valores entre laboratorios 2. Interferencias (sustancias reductoras no fenólicas) 3. No aplicable para antioxidantes lipófilos

CAPÍTULO IV. CONCLUSIONES

La capacidad antioxidante presente en las bebidas funcionales es importante porque le da un valor añadido al producto y reduce el riesgo de padecer enfermedades, es por eso que un buen análisis para determinar la mejor forma de hallar la capacidad antioxidante es fundamental. Existen varios métodos para la determinación de la capacidad antioxidante, dentro de los más utilizados son DPPH y ABTS+ (Cortes, Cazares, Flores, Yahuaca, & Padilla, 2016), frente a esta postura, de acuerdo a los resultados obtenidos, el método ABTS presenta unas desventajas el cual no es estandarizado, existe una dificultad de comparar valores entre laboratorios, el radical libre generado no es estable y existe una etapa extra necesaria para generar el radical libre a partir del ABTS.

En un artículo en el que se utilizaron los métodos DPPH y ABTS los autores (Nowak & Goslinski, 2019) concluyeron que se observaron resultados más altos para el ensayo ABTS que el ensayo DPPH. Ambos radicales también podrían tener varias afinidades con otros compuestos presentes en las muestras, el radical ABTS podría reaccionar con los flavonoides, dando resultados ligeramente exagerados. Por consiguiente, considero que el método DPPH es más confiable y da resultados más precisos, además fue el método más utilizado de los artículos investigados.

Conclusiones

En la presente investigación se logró precisar cómo se determina la capacidad antioxidante en bebidas funcionales mediante el análisis de diversos artículos y tesis encontrados en diferentes motores de búsqueda, idioma y periodos de tiempo. Los métodos frutos de esta investigación fueron: DPPH, TEAC o ABTS, FRAP o CRHF, ORAC y TRAP.



Sin embargo, al ser un tema de interés es necesario reconocer la necesidad de continuar los estudios en relación a los métodos para determinar la capacidad antioxidante, por lo que se invita a futuros investigadores a profundizar más en el tema.



REFERENCIAS

- Alfaro, S. (2019). DISEÑO DE UNA BEBIDA FUNCIONAL CON CAPACIDAD ANTIOXIDANTE A BASE DE PULPA DE MANGO (*Mangifera indica* L.), NONI (*Morinda citrifolia*) Y AGUAYMANTO (*Physalis peruviana* L.). Lima, Perú: Universidad Nacional Federico Villarreal.
- Batalla, J., Vega, M., & Silveti, A. (2019). ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN LA FLOR DE JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa* L.) MEDIANTE LAS TÉCNICAS FRAP Y DPPH. Puebla, México: Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Bendezú, J. (4 de Setiembre de 2018). Efecto de la germinación de tres variedades de quinua: Roja (INIA-415 Pasankalla), Negra (INIA 420-Negra Collana) y Blanca (Salcedo INIA) en la formulación y elaboración de una bebida funcional con capacidad antioxidante. Lima, Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Cilla, A. (Setiembre de 2009). ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y BIODISPONIBILIDAD MINERAL DE ZUMOS DE FRUTAS ADICIONADOS DE MINERALES Y/O LECHE. Valencia, España: UNIVERSITAT DE VALÈNCIA.
- Colina, J., Guerra, M., Guilarte, D., & Alvarado, C. (2012). Contenido de polifenoles y capacidad antioxidante de bebidas elaboradas con panela. Venezuela: Universidad Central de Venezuela.
- Cortes, C., Cazares, A., Flores, L., Yahuaca, L., & Padilla, J. (2016). ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN CINCO VARIEDADES DE *Psidium guajava* L. México: Agroproductividad.
- Londoño, J. (2012). Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad. Colombia: Corporación Universitaria Lasallista.
- Marroquín, H. (2015). OPTIMIZACIÓN DE LA CADENA DE ABASTECIMIENTO PARA UNA INDUSTRIA DE BEBIDAS FUNCIONALES. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Nowak, D., & Goslinski, M. (2019). Assessment of Antioxidant Properties of Classic Energy Drinks in Comparison with Fruit Energy Drinks. Polonia: Universidad Nicolás Copérnico de Toruń.
- Preciado, A. (2016). DESARROLLO, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN *in vitro* DE UNA BEBIDA FUNCIONAL A BASE DE EXTRACTOS OPTIMIZADOS DE JAMAICA Y TÉ VERDE. Hermosillo, Mexico: Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.



- Ribeiro, P., Barbosa, R., Delerue, C., & Ferreira, M. (2010). Control and comparison of the antioxidant capacity of beers. Portugal: Universidade do Porto.
- Rivera, C., Carrillo, M., Novillo, N., Peñafiel, R., & Landines, F. (2016). Procesamiento del Té Verde, enriquecido con Vitamina C y Superóxido Dismutasa para la obtención de una bebida funcional antioxidante. Guayaquil, Ecuador: Revista Ciencia UNEMI.
- Suwalsky, M., & Avello, M. (2016). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. Chile: Universidad de Concepción.
- Varo, M. d. (15 de Noviembre de 2018). Compuestos bioactivos y actividad antioxidante de frutos rojos y bebidas elaboradas a partir de ellos. Cordoba, España: UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA.



ANEXOS

FINAL

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN BEBIDAS FUNCIONALES
PARA UN MERCADO DE CONSUMO: una revisión sistemática entre 2009 y 2019

TITULO RS (1/0.5/0) 1, OK

TITULO VARIABLES (1/0.5/0) 1, OK

REALIDAD PROBLEMATICA (1/0.5/0) 1, OK

USO DE ARTICULOS CIENTIFICOS (1/0.5/0) 1, OK

PREGUNTA Y OBJETIVO (1/0.5/0) 1, OK

--

BASE Y RESULTADOS (1/0.5/0) 1, OK

ESTRATEGIAS DE BÚSQUEDA(1/0.5/0) 1, OK

CRITERIOS DE INCLUSIÓN/EXCLUSIÓN (1/0.5/0) 1, OK

TRATAMIENTO DE LOS DATOS (1/0.5/0) 1, OK

--

RESULTADOS GENERALES (2/1/0) 2, OK

RESULTADOS A OBJETIVO(2/1/0) 2, OK

TENDENCIAS QUE RESPONDEN LA PREGUNTA (2/1/0) 2, OK

DISCUSIONES. (2/1/0) 2, OK

CONCLUSIONES(2/1/0) 2, OK

REFERENCIAS(1/0.5/0) 1, OK