



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN
ALIMENTOS
Y BIOTECNOLOGÍA
CARRERA DE ALIMENTOS



Desarrollo de una bebida con sabor a jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) y hierbaluisa (*Cymbopogon citratus* DC.) empleando stevia como edulcorante

Informe Final de Integración Curricular, modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera en Alimentos, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

AUTORA: Jamileth Geomara Carrasco Toapanta

TUTORA: Dra. Dayana Cristina Morales Acosta

Ambato – Ecuador

MARZO 2023

APROBACIÓN DEL TUTOR

Dra. Dayana Cristina Morales Acosta

CERTIFICA:

Que el presente Informe Final de Integración Curricular ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Informe Final de Integración Curricular, Modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 13 de febrero 2023

Dra. Dayana Cristina Morales Acosta

C.I: 1804135570

TUTORA

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Jamileth Geomara Carrasco Toapanta, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Informe Final de Titulación, previo a la obtención del título de Ingeniero en Alimentos, son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.



Jamileth Geomara Carrasco Toapanta

C.I: 1600745614

AUTOR

APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Informe Final de Integración Curricular, modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para consistencia firman:

Presidente de tribunal

Dr. Santiago Casado

Mg. Yoel Hernández Navarro

C.I: 1754821989

Dra. Liliana Alexandra Cerda Mejía

C.I: 1804148086

Ambato, 07 de marzo de 2023

DERECHOS DEL AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Informe Final de Integración Curricular o parte de él, como documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Informe Final de Integración Curricular, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



Jamileth Geomara Carrasco Toapanta

C.I: 1600745614

AUTOR

DEDICATORIA

*A Dios,
a mis padres, Ramiro y Mélida
a mi hermano,
a mis ángeles Pedro y Rosario,
que siempre me han motivado a perseguir
mis sueños y nunca darme por vencida*

Jamileth Geomara

AGRADECIMIENTO

A Dios por darme sabiduría para culminar mis estudios con éxito y nunca soltarme, porque de su mano todo es posible.

A mis padres por su apoyo incondicional para lograr cumplir esta meta.

A mi hermano por sus ocurrencias y alegrarme en mis días nublados

A Maluve Montaña y Marjorie Galora por ser esas amigas incondicionales y que siempre me han brindado una palabra de aliento.

A los del Team con los que hemos compartido buenos y malos momentos en esta última etapa

A la Ing. Anabell Medina por ser esa personita de luz en medio de la oscuridad

A la Dra. Dayana Morales por su apoyo y paciencia durante el desarrollo de este proyecto,

Y a todas esas personitas que de una u otra forma me han brindado su apoyo.

¡Gracias a todos! ¡Bendiciones!

Con amor Jamileth Geomara

ÍNDICE

APROBACIÓN DEL TUTOR	ii
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD	iii
APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO	iv
DERECHOS DEL AUTOR	v
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTO	vii
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
CAPÍTULO 1	1
MARCO TEÓRICO	1
1.1. Antecedentes investigativos	1
1.1.1. Bebidas azucaradas y su consumo	1
1.1.2. Consecuencias del consumo excesivo de bebidas azucaradas	2
1.1.3. Producción de bebidas a base de plantas medicinales	2
1.1.4. Bebidas sin gas y el uso de edulcorantes	5
1.1.4.1. Edulcorantes artificiales	5
1.1.4.2. Edulcorantes naturales	6
1.1.5. Importancia del análisis sensorial, fisicoquímico y microbiológico en la fabricación de bebidas.....	6
1.1.6. Importancia del análisis del tiempo de vida útil en bebidas.....	8
1.2. Objetivos	9
1.2.1. Objetivo General	9
1.2.2. Objetivos Específicos.....	9
CAPÍTULO 2	10
METODOLOGÍA	10
2.1. Materiales.....	10
2.2. Métodos.....	11
2.2.1. Proceso de elaboración de la bebida natural	11
2.2.2. Diseño experimental.....	13
2.2.3. Determinación del mejor tratamiento.....	14
2.2.4. Determinación de las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas del mejor tratamiento	14
2.2.4.1. Parámetros fisicoquímicos	14
2.2.4.1.1. Sólidos solubles.....	14

2.2.4.1.2.	pH.....	14
2.2.4.1.3.	Acidez titulable	15
2.2.4.2.	Análisis microbiológicos.....	15
2.2.4.2.1.	Mohos y levaduras	16
2.2.4.2.2.	Coliformes totales y coliformes fecales (Escherichia coli).....	16
2.2.5.	Vida útil del producto.....	16
2.2.6.	Hipótesis.....	17
CAPÍTULO 3.....		18
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		18
3. 1.	Análisis y discusión de los resultados.....	18
3.1.1.	Análisis sensorial	18
3.1.2.	Análisis fisicoquímicos	21
3.1.3.	Análisis microbiológicos.....	25
3. 2.	Verificación de la hipótesis.....	29
CAPÍTULO 4.....		30
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....		30
4. 1.	Conclusiones	30
4. 2.	Recomendaciones.....	31
MATERIALES DE REFERENCIA		32
Referencias Bibliográficas		32
ANEXOS		40

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Clasificación taxonómica de la jamaica.....	3
Tabla 2	Clasificación taxonómica de la hierbaluisa.....	4
Tabla 3	Edulcorantes artificiales más usados.....	5
Tabla 4	Edulcorantes naturales	6
Tabla 5	Requisitos fisicoquímicos para refrescos	7
Tabla 6	Requisitos microbiológicos para refrescos	7
Tabla 7	Equipos de laboratorio	10
Tabla 8	Reactivos	10
Tabla 9	Materiales de laboratorio.....	11

Tabla 10	Factores y niveles de los tratamientos.....	13
Tabla 11	Combinación de factores.....	13
Tabla 12	Promedio del análisis sensorial de los tratamientos.....	18
Tabla 13	Recuento de coliformes totales, Escherichia coli, mohos y levaduras a 20 y 38 °C	26
Tabla 14	Recuento de levaduras a 20 y 38 °C	26

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Diagrama de flujo del proceso de elaboración de la bebida	12
Figura 2	Perfil sensorial de los diferentes tratamientos de la bebida elaborada	21
Figura 3	pH de la bebida en función del tiempo (días).....	23
Figura 4	Porcentaje de acidez en la bebida en función del tiempo (días).....	24
Figura 5	Sólidos solubles en la bebida en función del tiempo (días).....	25
Figura 6	Recuento de levaduras en función del tiempo (días).....	28

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1	Hoja de Catación	40
Anexo 2	Análisis Sensorial.....	41
Anexo 3	Análisis fisicoquímico.....	43
Anexo 4	Cálculo representativo del número de unidades propagadas de levaduras por mL	43
Anexo 5	Cálculos del tiempo de vida útil.....	44
Anexo 6	Evidencias	45

RESUMEN

El presente proyecto de investigación tuvo como finalidad generar una bebida natural y refrescante para el consumo de la población ecuatoriana, que a la vez aporte beneficios a su salud al ser elaborada a partir de jamaica y hierbaluisa, usando stevia como edulcorante natural en reemplazo del azúcar. Esta combinación podría generar beneficios al consumidor por sus efectos terapéuticos. Se realizaron 6 tratamientos y para seleccionar el mejor se empleó un análisis sensorial que evaluó los parámetros de olor, sabor, color y aceptabilidad. Una vez obtenido el mejor tratamiento se procedió a realizar los análisis fisicoquímicos y microbiológicos a temperaturas de 20 grados centígrados y 38 grados centígrados. Respecto al pH, sólidos solubles y acidez titulable; así como, al recuento de coliformes totales, coliformes fecales y mohos se obtuvieron valores que cumplen con los requisitos de la norma NTE INEN 2304 para refrescos no carbonatados. Por otro lado, respecto al recuento de levaduras se observó crecimiento de estas a partir del día 14 de almacenamiento, siendo este el tiempo promedio de vida útil de las bebidas elaboradas. Es importante mencionar que la bebida fue producida sin el empleo de ningún tipo de conservante siendo considerada como un producto natural. Se prevé que el producto sea económico debido al bajo costo de la materia prima y se convierta en una alternativa al consumo de bebidas azucaradas.

Palabras claves: bebida natural, bebidas no alcohólicas, edulcorantes, jamaica, hierbaluisa.

ABSTRACT

The purpose of this research was to generate a natural and refreshing drink for the consumption of the Ecuadorian population, which at the same time provides benefits to their health by being made from hibiscus and lemongrass, using stevia as a natural sweetener in sugar replacement. This combination could generate benefits for the consumer due to its therapeutic effects. Six treatments were carried out and to select the best one, a sensory analysis was used that evaluated the parameters of smell, taste, colour and acceptability. Once the best treatment was obtained, physicochemical and microbiological analyses were carried out at temperatures of 20 degrees Celsius and 38 degrees Celsius. Regarding the pH, soluble solids, and titratable acidity; as well as the count of total coliforms, faecal coliforms and moulds, values that meet the requirements of the NTE INEN 2304 standard for non-carbonated soft drinks were obtained. On the other hand, regarding the yeast count, their growth was observed from day 14, this being the average self-life of the elaborated beverages. It is important to mention that the drink was produced without the use of any type of preservative, being considered a natural product. The beverage is expected to be economical due to the low cost of the raw material and become an alternative to the consumption of sugary drinks.

Keywords: natural drink, non-alcoholic beverages, sweeteners, hibiscus, lemongrass

CAPÍTULO 1

MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes investigativos

1.1.1. Bebidas azucaradas y su consumo

La OMS define como bebida azucarada a toda bebida que posee azúcares libres, como es el caso de las aguas saborizadas, jugos, bebidas (vegetales/frutas), refrescos no carbonatados o carbonatados, concentrados líquidos, bebidas lácteas saborizadas, bebidas deportivas y energéticas (**Sousa et al., 2020**). Sin embargo, en investigaciones se define como bebida azucarada a la bebida que es añadida edulcorante calórico (sacarosa, jarabe de maíz o concentrados de jugo) por parte de los fabricantes en el producto (**Malik & Hu, 2022**).

Las bebidas azucaradas tuvieron su origen a finales del siglo XVIII, como tratamiento para solucionar enfermedades leves; sin embargo, se llegó a popularizar su consumo como una bebida de ocio por su elevado contenido de azúcares (**Cruz et al., 2020**). Según el estudio realizado por **Euromonitor Internacional (2016)**, entre los países latinoamericanos y del Caribe que consumen mayor cantidad de bebidas azucaradas en términos per cápita se encuentran Argentina, México y Chile; sin embargo, se ubica al Ecuador en décimo puesto con 67 litros al año por persona (**Rosado & Castillo, 2020**).

En el Ecuador existe un mayor consumo per cápita de bebidas azucaradas en relación con el consumo de agua natural, donde, de los 67 litros anuales de bebidas azucaradas de consumo promedio se subdividen en 51 litros que corresponden a las gaseosas, mientras que los 16 litros aproximadamente pertenecen a refrescos, jugos, bebidas energizantes y concentrados (**Segovia et al., 2020**). Existiendo un consumo masivo de bebidas sin alcohol, entre no carbonatadas y carbonatadas con edulcorantes calóricos y saborizantes sintéticos, formando éstos parte de la dieta cotidiana tanto de los niños como de los adultos (**Busto et al., 2019**).

1.1.2. Consecuencias del consumo excesivo de bebidas azucaradas

El consumo de bebidas con azúcares añadidos se lo asocia con un riesgo en la salud, ya que puede producir diferentes afecciones tanto metabólicas como fisiológicas, desencadenando enfermedades que van desde hiperactividad, tendencia a tener caries dental, obesidad, sobrepeso, enfermedades cardiovasculares, diabetes, e incluso se relaciona con el desarrollo de distintos tipos de cáncer (**Busto et al., 2019; Jiménez & Ordoñez, 2021**). Si embargo las afecciones que ocasionan principalmente las bebidas azucaradas son la obesidad, el sobrepeso y la diabetes tipo II; donde 6 de cada 10 adultos tienen sobrepeso (40%) u obesidad (22%) en Ecuador, y la diabetes es el ocasionaste principal de muerte (**Segovia et al., 2020**).

1.1.3. Producción de bebidas a base de plantas medicinales

Ecuador es un país megadiverso en el que se han documentado más de 17 000 especies de plantas. Dentro de esta gran variedad contiene alrededor de 3 118 especies que poseen propiedades medicinales (Caballero-Serrano et al., 2019). Forma parte de los 17 países megadiversos del mundo, considerando que tiene la menor superficie (258 000 km²) en comparación con los demás (**Armijos et al., 2022**)

Las bebidas a base de plantas medicinales surgieron como una solución para prevenir enfermedades, por lo que su consumo se popularizó principalmente entre las personas que cuidan su salud, ya que se preparan con ingredientes naturales provenientes de la parte morfológica de la planta pudiendo ser de sus raíces, hojas, flores, tallos, frutos y capullos. Además, este tipo de bebidas se caracterizan por tener compuestos bioactivos naturales como flavonoides, carotenoides, ácidos fenólicos, alcaloides, saponinas, poliacetilenos y terpenoides, los cuales según investigaciones demuestran tener diversos efectos como: antioxidante, antiviral, antibacteriano, antiinflamatorio, antitrombótico, anticancerígeno, entre otros (**Chandrasekara & Shahidi, 2018**).

Las plantas medicinales generalmente usadas en la elaboración de las bebidas son manzanilla, menta, toronjil, romero, hierbaluisa y jamaica, las mismas que poseen moléculas bioactivas que otorgan sabor, aroma o color a la bebida; tal es el caso de las antocianinas, las cuales son pigmentos vegetales solubles en agua y que presentan tonalidades entre rojo y morado (**Males et al., 2022**).

1.1.3.1. Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.)

La *Hibiscus sabdariffa* L. es conocida como rosa o flor de jamaica que corresponde a la familia Malvaceae, además se deduce que es nativa de África, pero actualmente se cultiva en la mayor parte del mundo (Gutiérrez, 2020). Anualmente en el mundo se produce 100 000 toneladas, siendo China, Tailandia y Sudán los principales productores; en el continente americano el principal productor es México con 7 889,66 toneladas (Fosado et al., 2021). En Ecuador, su producción se da principalmente en la región Amazónica, en las provincias de Napo, Morona Santiago y Pastaza, específicamente en Tena, Macas, Pomona, Puyo, Teniente Hugo Ortiz y Sucúa; y en menor cantidad en las provincias del Guayas (Isidro Ayora) y el Oro (Pasaje) (Chafra & Macías, 2021; Moposa, 2019).

La jamaica es un arbusto herbáceo que alcanza hasta 2 metros de altura, se desarrolla en climas trópicos y subtropicales a una temperatura promedio de 22 °C, en regiones de 0 a 1 200 metros de altura sobre el nivel del mar y a su vez con una precipitación pluvial (anual) de 500 a 1 000 mm (Hidalgo, 2013). La clasificación botánica de la jamaica se detalla en la **Tabla 1**.

Tabla 1

Clasificación taxonómica de la jamaica

Reino	Plantae
Clase	Magnoliopsida
Orden	Malvales
Familia	Malvaceae
Género	<i>Hibiscus</i>
Especie	<i>sabdariffa</i> L.

Fuente: (Cid & Guerrero, 2012)

Tiene efectos terapéuticos como antiobesidad, hipocolestémico, hipoglucémico, antiarterosclerótico, antiinflamatorio, antioxidante, diurético, antihipertensivo, hepatoprotector, anticancerígeno, hiperlipidámico (De Oliveira et al., 2023; Dimofte et al., 2022). Esto se debe a los compuestos bioactivos que posee: ácidos orgánicos, polisacáridos, flavonoides y antocianinas (Dimofte et al., 2022); siendo el principal bioactivo las antocianinas (Ngoc Nhon et al., 2022). En el 2016 Duarte, Montalvo,

Sáyago y Zamora realizaron una investigación para determinar la composición química (compuestos bioactivos) y la actividad antioxidante de las flores de jamaica, mismas que variaron de acuerdo al color de las flores y sus diferencias genéticas (Fosado et al., 2021).

El valor nutricional de la flor de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L) se encuentra relacionado con los carbohidratos, proteínas, betacaroteno, fibras dietéticas solubles e insolubles, hierro, antocianinas, polifenoles, flavonoides fenólicos, minerales (Ca, Fe, Mg), vitamina (ácido ascórbico) y, ácidos orgánicos (ácido cítrico) (Meftahizadeh et al., 2022; Salem et al., 2022). La industria alimentaria usa las flores o cálices de esta planta para elaborar salsas, vinagres, refrescos, mermeladas, vinos, incluso su pigmento se usa para elaborar gelatinas y dulces (Fosado et al., 2021).

1.1.3.2. Hierbaluisa (*Cymbopogon citratus* DC.)

La Hierbaluisa (*Cymbopogon citratus* DC.) es conocida como limoncillo y corresponde a la familia de las Poaceae, esta planta perenne alcanza hasta 1 metro de altura y sus hojas de 30 a 100 centímetros (Soto et al., 2017). Las condiciones óptimas para el desarrollo de la hierbaluisa es un clima húmedo y calor, con una exposición solar y lluvia manteniendo una temperatura de 24 a 26 °C, por lo que se desarrolla en regiones tropicales y subtropicales; sin embargo, esta planta también crece en regiones semiáridas y, tolera una precipitación pluvial (anual) de 2 500 a 2 800 mm (Laaz, 2022). Su clasificación taxonómica se puede observar en la **Tabla 2**.

Tabla 2

Clasificación taxonómica de la hierbaluisa

Reino	Plantae
Clase	Liliopsida (Monoxotyledoneae)
Orden	Cyperales
Familia	Poaceae
Género	<i>Cymbopogon</i>
Especie	<i>Citratus</i>

Fuente: (Fundación Charles Darwin, 2022)

Esta planta es usada para tratamientos nerviosos y gastrointestinales, también se usa como sedante, analgésico, antiinflamatorio, antipirético, antioxidante, antiespasmódico y diurético (Kieltyka et al., 2021; R. Sousa et al., 2021). Sousa et al., (2021) indica que sus hojas tienen propiedades antimicrobianas, anti protozoarias, antitumorales, antirreumáticas, cardio protectoras y gastro protectoras; esto se debe a los compuestos fenólicos, entre ellos se destacan los ácidos hidroxicinámicos, flavonas, taninos, triterpenos, electrolitos y minerales. Vélez et al. (2018) en su investigación para determinar la composición química de las hojas de la hierbaluisa, determinaron que son los metabolitos secundarios como: triterpenos, fenilpropanoides, catequinas y esteroides insaturados los que generan las acciones terapéuticas.

1.1.4. Bebidas sin gas y el uso de edulcorantes

Gran parte de las bebidas no carbonatadas tienen edulcorantes artificiales y su consumo ha aumentado drásticamente en las últimas décadas (Basílio et al., 2020). El consumo de tales edulcorantes puede provocar enfermedades cardiovasculares, obesidad, sobrepeso, síndrome metabólico y diabetes tipo II (Basílio et al., 2020).

1.1.4.1. Edulcorantes artificiales

Se caracterizan principalmente por no poseer un efecto glucémico, pero sí una alta intensidad edulcorante; por lo que despiertan especial interés en los investigadores con el fin de demostrar su inocuidad, seguridad y efectos terapéuticos en personas con afecciones en su salud (Sánchez, 2019). En la *Tabla 3* se puede observar los edulcorantes artificiales más utilizados y su poder edulcorante, el mismo que está en función de la sacarosa

Tabla 3

Edulcorantes artificiales más usados

Edulcorante	Poder edulcorante	Ingesta diaria recomendada
Sacarina	300 veces	0 – 15 mg/kg día
Aspartame	150 – 200 veces	40 mg/kg día
Sucralosa	600 – 700 veces	0 – 15 mg/kg día

Fuente: (Stephens et al., 2018)

1.1.4.2. Edulcorantes naturales

Entre los edulcorantes naturales se encuentran principalmente la stevia la taumatina y los compuestos mogrósidos. Se caracterizan por ser extraídos de manera natural de las hojas, el fruto o la pulpa de la planta (Stephens et al., 2018). Son usados como alternativa al azúcar, debido a que poseen muy pocas o no poseen calorías (Liauchonak et al., 2019). En la *Tabla 4* se reportan algunos edulcorantes naturales y su correspondiente poder edulcorante.

Tabla 4

Edulcorantes naturales

Edulcorante	Poder edulcorante
Stevia	300 veces
Compuestos mogrósidos	300 veces
Taumatina	2 500 veces

Fuente: (Stephens et al., 2018)

La stevia constituye el edulcorante natural más utilizado en la industria de confitería y bebidas, debido a su versatilidad y beneficios (Bravo et al., 2020). La stevia posee un poder edulcorante de hasta 300 veces más que la sacarosa, además tiene efectos anti – hipoglucémicos, antihipertensivos, antioxidantes, diuréticos y ayuda con el control de la obesidad (Laborde, 2019; Stephens et al., 2018). Así mismo, su consumo beneficia la alimentación de personas hipertensas, diabéticas o que simplemente están perdiendo peso, debido a que endulza los alimentos sin aportar calorías (Laborde, 2019).

1.1.5. Importancia del análisis sensorial, fisicoquímico y microbiológico en la fabricación de bebidas

El análisis sensorial está ligado al desarrollo de nuevos productos ya que se utiliza para evaluar la calidad de estos en términos de sus atributos sensoriales. Además, permite conocer, las expectativas de los consumidores y su grado de preferencia ante diferentes tratamientos de un mismo producto (Swiader & Marczevska, 2021). Para evaluar las características sensoriales se considera principalmente la apariencia, el olor y el sabor del producto. Y en el caso de aplicar pruebas afectivas se considera la preferencia o aceptación del producto por parte del consumidor (Swiader &

Marczewska, 2021). Dichas pruebas son aplicadas mediante una escala hedónica que va desde me disgusta muchísimo hasta me gusta muchísimo, además la cantidad de puntos empleados depende del tipo de producto al que se aplique el análisis sensorial (**Jara, 2018**).

Los análisis fisicoquímicos y microbiológicos deben realizarse para controlar la calidad de un producto. Las bebidas pueden considerarse como medios listos para el crecimiento microbiano, principalmente de mohos y levaduras que alteran la estabilidad de esta. La temperatura correcta de almacenamiento juega a la vez un papel predominante para conseguir la estabilidad de los parámetros fisicoquímicos (**Hiko & Muktar, 2020**). En la **Tabla 5** y **Tabla 6** se detallan requisitos fisicoquímicos y microbiológicos según la norma NTE INEN 2304, para que un refresco sea considerado como seguro para el consumo humano.

Tabla 5

Requisitos fisicoquímicos para refrescos

Requisito	Unidad	Mínimo	Máximo	Método de ensayo
Sólidos solubles a 20 °C (no se aplica a productos edulcorados)	Grados Brix	0	15	NTE INEN – ISO 2173
pH a 20 °C	-	2,0	4,5	NTE INEN – ISO 1842
Acidez titulable, como ácido cítrico a 20 °C	g/100 mL	0,1	-	NTE INEN – ISO 750

Fuente: (INEN, 2017)

Tabla 6

Requisitos microbiológicos para refrescos

	n	m	M	c	Método de ensayo
Coliformes NMP/cm ³	3	< 3	-	0	NTE – INEN 1529-6
Coliformes fecales NMP/cm ³	3	< 3	-	0	NTE – INEN 1529-8
Recuento estándar en placa REP UFC/cm ³	3	1,0 x 10 ²	1,0 x 10 ³	1	NTE – INEN 1529-5
Recuento de mohos y levaduras UP/cm ³	3	5,0 x 10 ¹	-	0	NTE – INEN 1529-10

Fuente: (INEN, 2008)

1.1.6. Importancia del análisis del tiempo de vida útil en bebidas

La vida útil de un producto consiste en el período de tiempo en el cual se puede almacenar y vender, sin que exista presencia de cambios en su calidad (físicoquímica, organoléptica y microbiológica). A partir de ello se puede establecer la fecha de caducidad, la misma que indica el momento hasta el cual puede ser consumido un producto de manera segura. Sin embargo, este dato no puede significar necesariamente deterioro biológico en el producto, pero si un incumplimiento con los indicadores de calidad (**Khasanov & Matveeva, 2020**). Por lo tanto, para garantizar la calidad y estabilidad de un producto, es importante identificar y controlar los factores de riesgo que pueden perjudicarlo como por ejemplo: exposición a la luz, cambios de temperatura, daños microbiológicos, cambios químicos o cambios en las propiedades organolépticas (aroma, aspecto, sabor) (**Khasanov & Matveeva, 2020**).

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo General

Desarrollar una bebida con sabor a jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) y hierbaluisa (*Cymbopogon citratus* DC.) empleando stevia como edulcorante.

1.2.2. Objetivos Específicos

- Formular diferentes tratamientos de la bebida con sabor a jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) y hierbaluisa (*Cymbopogon citratus* DC.) empleando stevia como edulcorante para la determinación del mejor tratamiento mediante análisis sensorial.
- Determinar las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas del mejor tratamiento.
- Establecer el tiempo de vida útil del mejor tratamiento.

CAPÍTULO 2

METODOLOGÍA

2.1. Materiales

A continuación, se detallan en las Tablas 7, 8 y 9 los equipos, reactivos y materiales de laboratorio que se utilizaron, respectivamente.

Tabla 7

Equipos de laboratorio

Equipos	Cantidad
Incubadora	1
Autoclave	1
Cámara de flujo	1
Balanza Analítica	1
Cocineta	1
Brixómetro	1
pH – metro	1

Tabla 8

Reactivos

Reactivos	Cantidad
Agua peptonada	10 g
Hipoclorito de sodio	5 ml
Hidróxido de sodio	300 ml
Fenolftaleína	20 ml

Tabla 9*Materiales de laboratorio*

Materiales	Cantidad
Compact Dry EC	14
Compact Dry YMR	22
Gradilla	1
Puntas de micropipeta	15
Tubos de ensayo con tapa	10
Bureta	1
Probeta	3
Vasos de precipitación	10
Frasco tapa rosca azul de 500ml	2

2.2. Métodos

Para formular los diferentes tratamientos de la bebida con sabor a jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) y hierbaluisa (*Cymbopogon citratus* DC.) empleando stevia como edulcorante se planteó un diseño experimental A x B (cantidad de stevia y de jamaica, respectivamente), que finalmente permitió la determinación del mejor tratamiento a través del análisis sensorial de las bebidas.

2.2.1. Proceso de elaboración de la bebida natural

Las flores de jamaica frescas y la hierbaluisa se compraron en el mercado “La Merced” ubicado en la ciudad del Puyo, Pastaza. Se realizó una limpieza en seco que consiste en seleccionar de forma manual las flores y hojas en buen estado y retirar las partículas extrañas, concluyendo con un lavado en agua potable (**Henríquez & Sánchez, 2017**).

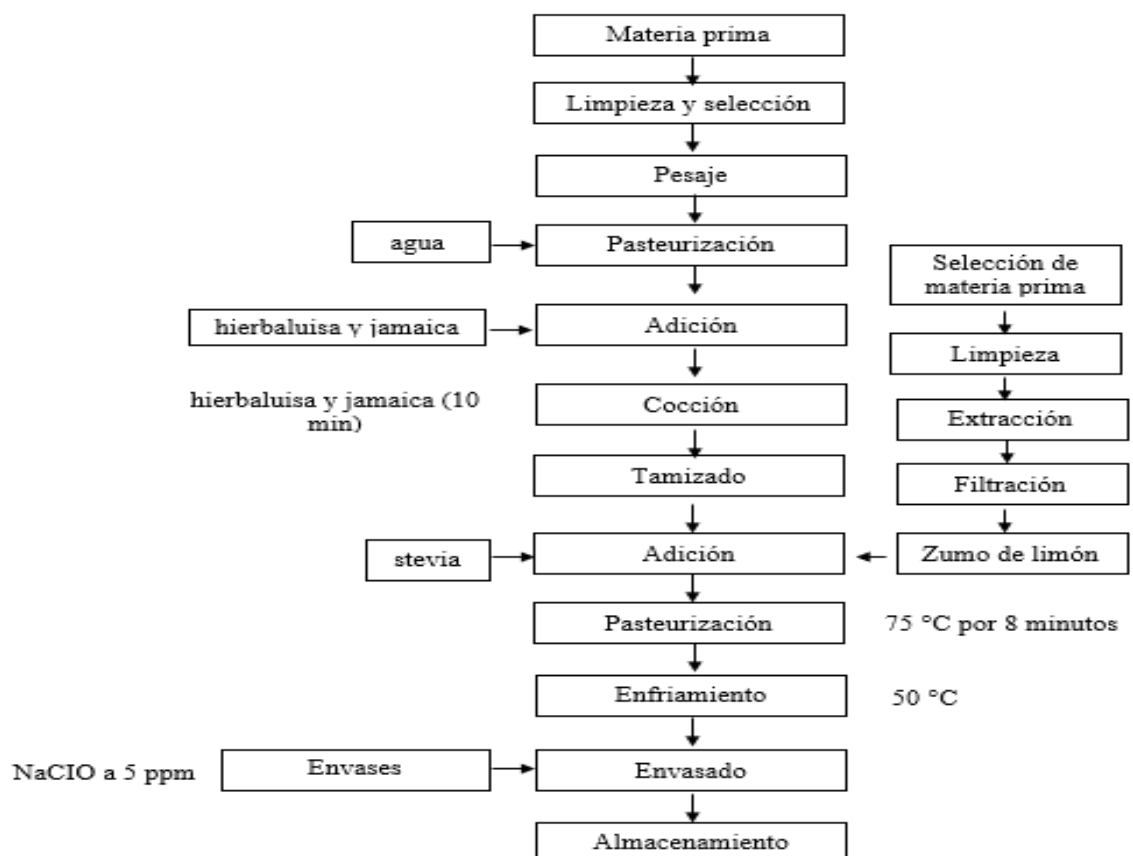
Los limones (*Citrus x limonia*) se compraron en el mercado “La Merced” seleccionando aquellos con una tonalidad verde – amarillo. Se lavaron en agua potable, se cortaron por la mitad y se extrajo el zumo justo antes de su incorporación en la bebida, con el fin de evitar su oxidación. También se usó un tamiz para separar las semillas del zumo. La stevia en polvo se compró a la empresa SteviaLife,

Teniendo la materia prima en buenas condiciones se realizó una cocción de las hierbas en agua (previamente hervida) utilizando un recipiente de acero inoxidable, se mantuvo en ebullición (94 °C) por 10 minutos, con el fin de obtener todos los aromas y sabores tanto de la jamaica como de la hierbaluisa (Henríquez & Sánchez, 2017). Una vez obtenida la bebida se tamizó y se añadió la stevia y el zumo de limón, éste último cumple la función de preservante natural permitiendo conservar el sabor original y la apariencia de la bebida; además un sabor refrescante (Saavedra, 2019).

El envasado se realizó en botellas de tereftalato de polietileno (PET) de 600 mL con su respectivo etiquetado. Las botellas PET tienen un brillo y transparencia igual a las botellas de vidrio, son resistentes a las grasas, a los aceites, a los impactos y a la presión interna (Domínguez, 2017). Estas botellas fueron previamente desinfectadas con una solución de hipoclorito de sodio a una concentración de 5 ppm (Henríquez & Sánchez, 2017). El proceso de elaboración de la bebida y la formulación base para preparar 1 litro de esta se encuentra detallado en la Figura 1.

Figura 1

Diagrama de flujo del proceso de elaboración de la bebida



2.2.2. Diseño experimental

Para la elaboración de los tratamientos se empleó un diseño experimental A x B, en donde el factor A corresponde a la cantidad de stevia y el factor B a la cantidad de jamaica empleada (Tabla 10). La cantidad de hierbaluisa no varió en los tratamientos debido a que, esta planta al ser sometida a cocción en proporciones incorrectas genera un sabor desagradable (amargo); por su parte, el limón se usó con el fin de brindar un sabor refrescante a la bebida (Vera & Zambrano, 2021).

Tabla 10

Factores y niveles de los tratamientos

	Factor A (stevia)	Factor B (jamaica)
	0,24 %	6,5 %
Niveles	0,12 %	4,7 %
		3 %

De lo cual se obtuvo un total de 6 tratamientos como se detalla en la Tabla 11

Tabla 11

Combinación de factores

	A	B
Tratamientos	Edulcorante	Cantidad de jamaica
T1	0,24 %	6,5 %
T2	0,12 %	6,5 %
T3	0,24 %	4,7 %
T4	0,12 %	4,7 %
T5	0,24 %	3 %
T6	0,12 %	3 %

Para la selección del mejor tratamiento se empleó parámetros sensoriales de control y se desarrolló un análisis estadístico aplicando la prueba de Fisher, considerando un nivel de $P \leq 0,05$ respecto a la comparación del grado de significancia entre los 6 tratamientos (Caiza, 2022).

2.2.3. Determinación del mejor tratamiento

Para determinar la calidad sensorial, se analizaron los parámetros de color, olor, sabor y aceptabilidad por medio de una prueba de preferencia, usando una hoja de cata (Anexo 1) en el que se detalla una escala hedónica dividida en cinco puntos; se aplicaron a 30 jueces no entrenados, con el fin de determinar la mejor formulación (Castillo & Villena, 2020). Además, se utilizó el programa STATGRAPHICS Centurion 18 bajo su versión de prueba, para obtener el análisis estadístico respecto a los parámetros sensoriales, obteniendo la respectiva ANOVA; y el programa Microsoft Excel 2016 fue usado con el fin de tabular los datos.

2.2.4. Determinación de las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas del mejor tratamiento

Para realizar la determinación de los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos del mejor tratamiento obtenido a través del análisis sensorial se emplearon los siguientes métodos.

2.2.4.1. Parámetros fisicoquímicos

Para la determinación de las propiedades fisicoquímicas de la bebida a base de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) y hierbaluisa (*Cymbopogon citratus* DC.), se consideraron los parámetros establecidos en la norma NTE INEN 2304 (2017), la misma que indica los requisitos fisicoquímicos para refrescos o bebidas no carbonatadas.

2.2.4.1.1. Sólidos solubles

Para la determinación de los sólidos solubles se aplicó la norma NTE INEN-ISO 2173, para ello se usó un refractómetro ATAGO. Se calibró el equipo con unas gotas de agua destilada, luego se colocó 3 gotas de la bebida sobre el refractómetro y se procedió a leer el valor. Se trabajó por triplicado y se consideró la media de los datos obtenidos (INEN, 2013c).

2.2.4.1.2. pH

Para la determinación del pH se aplicó la norma NTE INEN-ISO 1842, utilizando un pH-metro METTLER TOLEDO. Para ello se calibró el pH-metro y en un vaso de

precipitación de 50 mL se puso 20 mL de la muestra. Se colocó el electrodo en el centro del vaso de precipitación manteniendo el contacto con la muestra, pero impidiendo que el electrodo toque el fondo del vaso y se observó el valor que devuelve el pH-metro. Después de cada medición se enjuagó el electrodo con agua destilada. Se realizó por triplicado las mediciones y se consideró la media de los datos obtenidos (Henríquez & Sánchez, 2017).

2.2.4.1.3. Acidez titulable

Para la determinación de la acidez titulable se aplicó la norma NTE INEN-ISO 750. Se tomó 10 mL de la muestra y se disolvió en 90 mL de agua destilada en un matraz Erlenmeyer. Para la valoración se agregó 2 gotas de fenolftaleína y se tituló con NaOH 0,1 N hasta lograr un pH de 8,1 – 8,4 y se registró el volumen gastado de la base. Finalmente, se calculó el valor de la acidez por medio de la Ecuación 1. Se realizó por triplicado y se consideró la media de los datos obtenidos (INEN, 2013)

Ecuación 1.

Fórmula para el cálculo del valor de la acidez

$$\text{ácido cítrico} \left(\% \frac{m}{v} \right) = \frac{V_{\text{NaOH}} * N_{\text{NaOH}} * 0,064}{V_{\text{ml}}} * 100$$

Considerando que: V_{NaOH} , es el volumen de NaOH consumido; N_{NaOH} , es la normalidad del NaOH; V_{ml} , es el volumen de concentrado (luego de diluirlo); y 0,064 es el valor (gramos) de ácido cítrico anhidro / miliequivalente. El valor obtenido de la ecuación anterior se debe multiplicar por su factor de dilución. Obtenido de: (Henríquez & Sánchez, 2017).

2.2.4.2. Análisis microbiológicos

Se trabajó en base a la norma NTE INEN 2304 del 2017, misma que reemplaza a la norma NTE INEN 2304:2008. Requisitos de los refrescos. En esta última no se detalla el control microbiológico; por lo que se planteó el uso de la norma NTE INEN 1108 sobre agua para consumo humano, siendo el principal componente de la bebida. Por lo indicado anteriormente se cuantificó coliformes totales, coliformes fecales, mohos y levaduras.

2.2.4.2.1. Mohos y levaduras

Para determinar mohos y levaduras se usó Compact Dry YMR como medio de cultivo, para lo cual se realizó las diluciones a partir de 10^{-1} hasta 10^{-3} en sus respectivos tubos de ensayo y se tomó con la pipeta estéril 1 ml de las diferentes diluciones. Se colocó en las placas Compact Dry YMR, respectivamente y se incubó a 25 ± 1 °C por 48 – 72 horas. Al término de la incubación se registró el número de colonias; siendo las colonias blancas y azules las levaduras y para los mohos de diferentes colores con aspecto algodonoso (**CompactDry, 2022**).

2.2.4.2.2. Coliformes totales y coliformes fecales (*Escherichia coli*)

Para la determinación de coliformes totales y coliformes fecales se usó Compact Dry EC como medio de cultivo, para lo cual se realizó las diluciones a partir de 10^{-1} hasta 10^{-3} en sus respectivos tubos de ensayo y se tomó con la pipeta estéril 1 ml de las diferentes diluciones. Se colocó en las placas Compact Dry EC, respectivamente y se incubó a 37 ± 1 °C por 24 horas. Al término de la incubación se registró el número de colonias; siendo las colonias rojas/rojas-violetas los coliformes totales y para coliformes fecales (*E.coli*) de color azul (**CompactDry, 2022**).

2.2.5. Vida útil del producto

Para establecer el tiempo de vida útil del producto se usó la bebida del mejor tratamiento, obtenido a partir del análisis sensorial. Se mantuvo una bebida a condiciones aceleradas (38°C) y otra a temperatura ambiente (aprox. 20 °C) y se realizaron periódicamente análisis fisicoquímicos (pH, acidez titulable y sólidos solubles) y microbiológicos (coliformes totales, coliformes fecales, mohos y levaduras) (**Castillo & Villena, 2020**). Los análisis de control se llevaron a cabo durante un periodo total de 18 días con intervalos de tiempo entre 2 y 3 días (fines de semana).

Para determinar el tiempo de vida útil se aplicó un modelo matemático del crecimiento microbiano, el cual se obtuvo de la gráfica del logaritmo natural de la concentración de microorganismos vs el tiempo. Siempre que el contenido de microorganismos reportado lo permitió.

2.2.6. Hipótesis

Hipótesis nula (H₀)

El porcentaje de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) y edulcorante, usados en la elaboración de la bebida no influirán en las características sensoriales del producto final.

Hipótesis alternativa (H_a)

El porcentaje de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) y edulcorante, usados en la elaboración de la bebida influirán en las características sensoriales del producto final.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3. 1. Análisis y discusión de los resultados

3.1.1. Análisis sensorial

Las propiedades sensoriales de un producto alimenticio juegan un papel colectivo en la formación de expectativas positivas tanto antes como durante el consumo. En esta investigación, para conocer el efecto de las variables independientes sobre el resultado en cada uno de los tratamientos se sometieron a un análisis sensorial en el cual se evaluó el color, olor, sabor y aceptabilidad de las bebidas elaboradas. Para determinar el mejor tratamiento, el análisis fue aplicado a 30 catadores no entrenados utilizando una escala hedónica de 5 puntos. Este tipo de prueba se encarga de dar información esencial del producto e identifica el disgusto o gusto hacia el producto, permitiendo mejorar el mismo (Liria, 2007).

Tabla 12

Promedio del análisis sensorial de los tratamientos

Tratamientos	Color	Olor	Sabor	Aceptabilidad
T ₁	4,111 ^b	3,258 ^d	3,883 ^c	3,869 ^c
T ₂	3,653 ^a	2,432 ^{b,c}	2,786 ^{a,b}	3,085 ^a
T ₃	3,993 ^{a,b}	2,647 ^c	4,363 ^d	4,425 ^d
T ₄	4,153 ^b	1,869 ^a	2,543 ^a	2,807 ^a
T ₅	3,632 ^a	2,515 ^{b,c}	4,14 ^{c,d}	3,661 ^{b,c}
T ₆	3,583 ^a	2,203 ^{a,b}	3,085 ^b	3,203 ^{a,b}

T₁ (0,24% edulcorante y 6,5% jamaica), T₂ (0,12% edulcorante y 6,5% jamaica), T₃ (0,24% edulcorante y 4,7% jamaica), T₄ (0,12% edulcorante y 4,7% jamaica), T₅ (0,24% edulcorante y 3% jamaica), T₆ (0,12% edulcorante y 3% jamaica). Los superíndices (a, b, c y d) muestran la significancia estadística ($p < 0.05$) de cada uno de los tratamientos tras aplicar la prueba de Fisher para identificar grupos homogéneos.

En la Tabla 12 se muestran los distintos grupos homogéneos en función de los resultados obtenidos de cada tratamiento para los atributos de color, olor, sabor, aceptabilidad. Se observa que existen diferencias estadísticamente significativas entre

los tratamientos 1-2, 1-5, 1-6, 2-4, 4-5 y 4-6 en el atributo de color, mientras que para el atributo de olor las diferencias significativas existen entre los tratamientos 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 2-4, 3-4, 3-6 y 4-5. Respecto al sabor se observan que los tratamientos 1-2, 1-3, 1-4, 1-6, 2-3, 2-5, 3-4 y 3-6 poseen diferencias estadísticamente significativas, de igual forma, se muestran estas diferencias en el atributo de aceptabilidad entre los tratamientos 1-2, 1-3, 1-4, 1-6, 2-3 y 2-5.

El color juega un papel importante en la apariencia de los producto, ya que puede influir en la aceptación por parte de los consumidores; especialmente en el caso de una bebida la cual debe ser envasada en materiales transparentes (**Bechoff et al., 2014**). Respecto a este parámetro, todos los tratamientos analizados presentaron una tonalidad roja característica de la flor de Jamaica y fueron percibidos por los catadores como “ligeramente rosa y rojo pálido” según las medidas reportadas entre 3 y 4, respectivamente.

La tonalidad de las bebidas está dada principalmente por las antocianinas presentes en la planta que son pigmentos hidrosolubles pertenecientes al grupo más grande de compuestos fenólicos, los flavonoides (**Yuniati et al., 2021**). Estos compuestos cumplen varias funciones biológicas entre las que se puede destacar su actividad antioxidante (**Salem et al., 2022**). Esto ha sido estudiado en múltiples investigaciones como la de **Wu et al., (2018)** donde evalúa la actividad antioxidante de extractos de *H. sabdariffa* antes y después de someterlos a tratamientos térmicos y ajustes de pH.

Los resultados obtenidos en cuanto al olor variaron ampliamente agrupando a los tratamientos en cuatro grupos con diferencia estadísticamente significativa. Es importante indicar que el aroma de las bebidas obtenidas fue dado principalmente por la hierbaluisa y el limón presente en la formulación. *C. citratus* cuenta con más de 35 compuestos aromáticos que le dan su característico aroma, entre los cuales se destacan los aldehídos, terpenos y terpenoides (**Muala et al., 2021**). Asimismo, de acuerdo a **Ramírez-Rodriguez et al., (2012)** el aroma de *I. sabdariffa* está determinado por cuatro grupos: derivados de ácidos grasos, derivados de azúcar, derivados fenólicos y terpenos, dando como perfil de aroma general de las infusiones de jamaica una combinación de notas de olor terroso, verde, floral y afrutado.

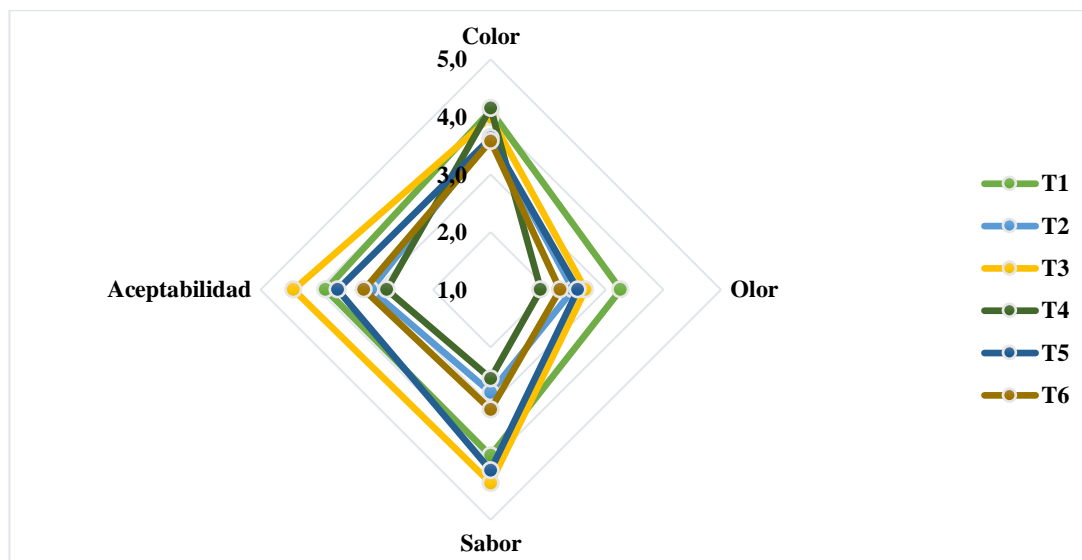
Se debe considerar que el aroma de las bebidas puede variar en función del proceso de elaboración, el tiempo de almacenamiento, así como la temperatura y la luz. Esto debido a que el incremento de temperatura y el paso de los días conducen a pérdidas de compuestos volátiles (**Zannou et al., 2020**). De acuerdo a lo mencionado, **Mendonça et al., (2021)** indica que durante el almacenamiento los compuestos aromáticos naturales son gradualmente sintetizados, transferidos y degradados, incluso derivados de sus sabores originales, causando cambios que son percibidos por los consumidores al final del almacenamiento.

El sabor es un sentido multimodal resultante de múltiples estímulos provocados por los diversos compuestos volátiles y no volátiles de los alimentos; es una de las características más importantes al momento de determinar la aceptabilidad de un producto. Existe una estrecha conexión entre el sabor y el aroma, ya que la sensación de sabor, en realidad está dada por una combinación de lo que se percibe a través del gusto y el olfato (**Spence, 2015**). Es por ello por lo que ambas características dependen en gran medida de los compuestos presentes en la materia prima empleada para la elaboración de la bebida.

La aceptabilidad de un producto por parte de los consumidores depende de varios factores. En función de los parámetros evaluados en esta investigación el sabor tuvo un rol importante en la aceptabilidad de los tratamientos. Se destaca que aquellos con el 0.12 % de edulcorante (T2, T4 y T6) no fueron aceptados por parte de los catadores lo cual puede correlacionarse con el bajo dulzor de estas bebidas. Según **Temussi, (2007)** esto influye negativamente dado que la mayoría de las personas responden de forma positiva a la sensación de dulzura.

Figura 2

Perfil sensorial de los diferentes tratamientos de la bebida elaborada



T₁ (0.24% edulcorante y 6.5% jamaica), T₂ (0.12% edulcorante y 6.5% jamaica), T₃ (0.24% edulcorante y 4.7% jamaica), T₄ (0.12% edulcorante y 4.7% jamaica), T₅ (0.24% edulcorante y 3% jamaica), T₆ (0.12% edulcorante y 3% jamaica).

Como se aprecia en la Figura 2 el tratamiento más aceptado por los catadores fue el tratamiento 3 (0.24 % de edulcorante, 4.7 % de jamaica), en el cual el sabor destacó por ser más dulce que amargo de acuerdo con las opciones de evaluación. De acuerdo con la composición de este tratamiento al poseer el nivel medio de cantidad jamaica y el nivel más alto de edulcorante el sabor alcanzaba un equilibrio más agradable al gusto del consumidor que los otros tratamientos. Las formulaciones con cantidades de jamaica más altas y menores porcentajes de edulcorante fueron las menos aceptadas por los consumidores, y fueron puntuados con valores más cercanos al amargor. **Barajas-Ramírez et al., (2021)** en su estudio donde analiza la concentración de *I. sabdariffa* y sacarosa en bebidas, indica que los consumidores prefirieron una concentración del 16 % de edulcorante sobre un 11 %. De la misma forma, tuvieron mayor aceptación las bebidas con el nivel medio (5.0 %) y bajo (2.5 %) de cantidad de cálices de jamaica.

3.1.2. Análisis fisicoquímicos

Tras determinarse que el tratamiento 3 posee el contenido de jamaica y edulcorante más aceptable se procedió a realizar los análisis fisicoquímicos de sólidos solubles, pH

y acidez titulable (Anexo 3) por 18 días. Estos análisis se realizaron con el fin de conocer la vida útil de la bebida elaborada; para ello, se almacenó la bebida a dos temperaturas diferentes (20 °C y 38 °C).

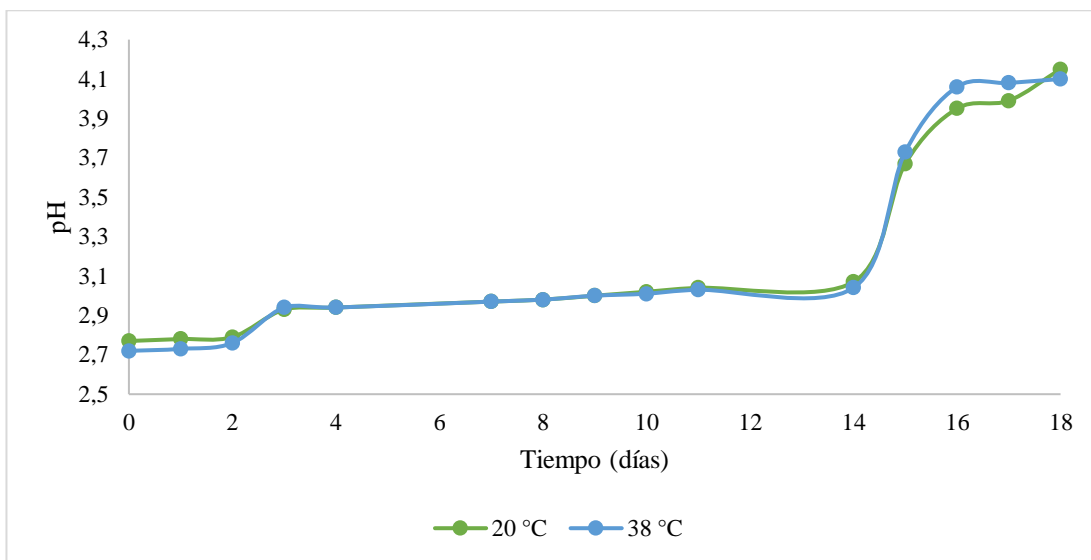
pH

El pH (Figura 3) se mantuvo prácticamente constante hasta el día 14 y sin diferencias entre las bebidas almacenadas a 20 y 38 °C. En un inicio se registró valores de alrededor de 2.72, lo cual es bastante normal en las bebidas de flor de jamaica debido al alto contenido de ácidos orgánicos, entre los que se encuentran principalmente el ácido cítrico, ácido hidroxícítrico, ácido de hibisco, ácido málico y ácido tartárico, y en menor proporción se los ácidos oxálico y ascórbico (**Da-Costa-Rocha et al., 2014**). El porcentaje de estos ácidos orgánicos es similar en las diversas especies de *H. sabdariffa* L., siendo el ácido de hibisco el más representativo (13-24 %), seguido del ácido cítrico (12-20%), málico (2-9 %), tartárico (8 %) y ascórbico (0.02 – 0.05 %) (**Yuniati et al., 2021**).

A partir del día 14 se observó cambios importantes de pH, que para el caso de las bebidas almacenadas a 20°C aumentó de 3.07 a 4.15 y en las bebidas almacenadas a 38°C el aumento fue de 3.04 a 4.1; variación que puede relacionarse con una posible contaminación de la bebida por levaduras. Como se observa en la **Tabla 14** de la sección de análisis microbiológico, existe una proliferación importante de estos microorganismos en el día 14, tanto en las bebidas almacenadas a 20 °C como 38 °C. en el estudio realizado por **Mendonça et al., (2021)**, se puede ver un aumento similar en el pH, tanto en el extracto como en la infusión de *H. sabdariffa*. En dicho estudio se menciona que esta variación puede deberse al uso de los ácidos como catalizadores para la hidrólisis de polisacáridos, la stevia para producir monosacáridos útiles para la fermentación, aumentando de esta manera el pH de la bebida.

Figura 3

pH de la bebida en función del tiempo (días)



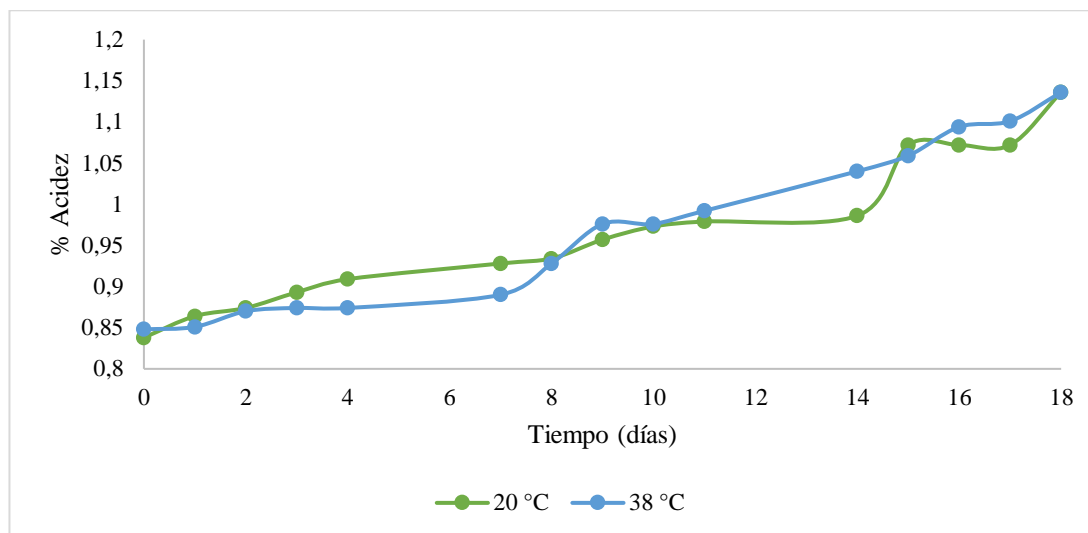
Según las normas INEN 1842 el pH de las bebidas no carbonatadas tiene un límite mínimo de 2.0 y un máximo de 4.5. Para el caso de este estudio, el pH durante los 18 días de almacenamiento de la bebida tuvo valores dentro de los límites establecidos según normativa, sin embargo el incremento brusco de pH a partir del día 14 es un indicativo de una pérdida de calidad y por tanto es necesario contrastar con el resto de análisis para conocer la seguridad del producto durante los últimos 4 días de almacenamiento (INEN, 2017).

Acidez titulable

Se considera que la acidez titulable es una medida directamente proporcional a la vida útil del producto y protege contra el ataque de microorganismos (Majumdar et al., 2010). En la Figura 4 se observa el porcentaje de acidez titulable expresado como porcentaje de ácido anhidro cítrico durante los 18 días de análisis. Se aprecia que la acidez aumentó de 0.8 % a 1.1 % en ambas temperaturas de almacenamiento. Este aumento en la acidez puede deberse a la formación de ácido acético por la fermentación realizada por levaduras (Maicas, 2020). Cabe mencionar que, otro motivo para el aumento de acidez puede ser la formación de ácidos por descomposición de sustancias pépticas (Hariharan & Mahendran, 2016).

Figura 4

Porcentaje de acidez en la bebida en función del tiempo (días)



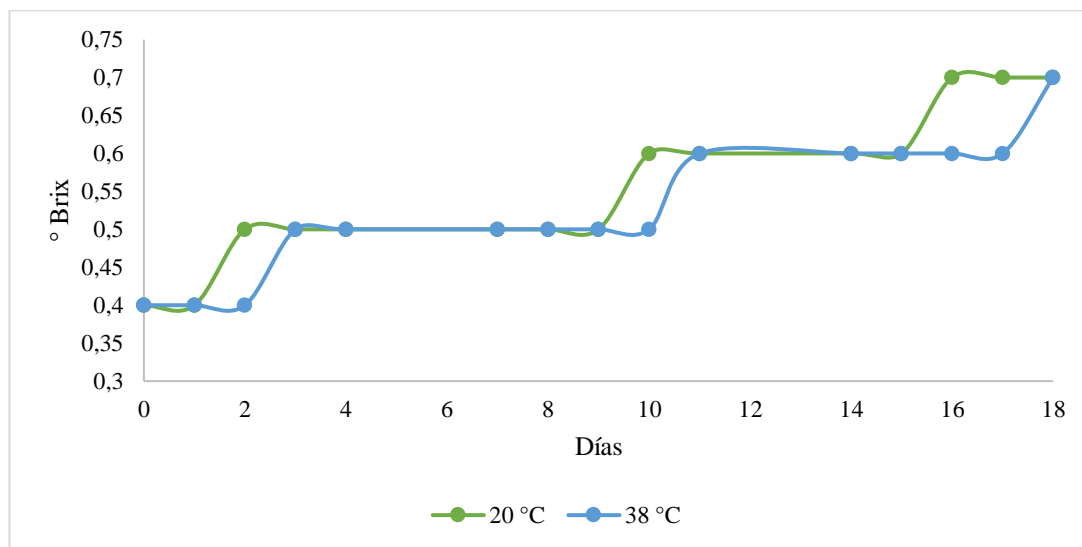
De acuerdo con las especificaciones de las normas INEN el límite mínimo de acidez para la preparación de refrescos no carbonatados es de 0.1 %, mientras que no establece un límite máximo (INEN, 2017). Por lo que, la acidez titulable obtenidos para la bebida elaborada si cumple con los requisitos fisicoquímicos para refrescos del Ecuador. La acidez obtenida es ligeramente baja al comparar con otras investigaciones realizadas en bebidas de flor de jamaica, dado que en su mayoría los valores de acidez titulable permanecen en un rango de 1.90 % a 2.30 % (Fasoyiro et al., 2005).

Sólidos solubles

En la Figura 5 se reportó la cantidad de sólidos solubles presentes en la bebida de jamaica. A lo largo de los 18 días se observó un crecimiento gradual de los °Brix para las dos temperaturas evaluadas, pasando de 0.4 °Brix en el día 0 a 0.7 °Brix en el día 18. Durante este proceso existieron ciertas diferencias entre ambas temperaturas de almacenamiento, los valores de sólidos solubles a 38 °C aumentaron al día 2, 10 y 17; mientras que, a 20 °C aumentaron los días 1, 9 y 15. Estos cambios en el valor de los °Brix podrían depender de factores como la proporción de agua que se utilizó para la bebida, la variedad de jamaica utilizada, la presencia de azúcares y ácidos orgánicos (Salinas-Moreno et al., 2012).

Figura 5

Sólidos solubles en la bebida en función del tiempo (días)



En la norma INEN 2173 se establece 15 °Brix como valor máximo de sólidos solubles en refrescos no carbonatados y 0 como valor mínimo, no obstante, especifican que estos límites no son aplicables en bebidas endulzadas con edulcorantes (INEN, 2017); De esta forma se puede decir que la bebida elaborada se encuentra dentro de los límites establecidos por las normas INEN.

3.1.3. Análisis microbiológicos

Los resultados microbiológicos correspondiente al recuento de coliformes totales, fecales (*Escherichia coli*), mohos y levaduras durante 18 días trabajando en cuatro concentraciones (0, -1, -2, -3), se muestran en la **Tabla 13**. Para la bebida de jamaica se reporta ausencia de mohos, coliformes totales y *E. coli* en las bebidas almacenada a 20 y 38 °C; no obstante, en el recuento de levaduras se observa la presencia de estas tras el periodo y temperatura de incubación que excede a los establecido en la normativa. La presencia de levaduras empieza a cuantificarse desde el día 14 (**Tabla 14**) en las dos bebidas; y el día 18 el desarrollo de colonias excede rango de 15 a 150 unidades formadoras de colonias por placa (UFC/placa) establecido según normativa INEN 1529-10:2013.

Tabla 13

Recuento de coliformes totales, Escherichia coli, mohos y levaduras a 20 y 38 °C

Normativa (INEN 2304:2008)		20 °C	38 °C
Coliformes totales NMP/mL	< 3	Ausencia	Ausencia
<i>Escherichia coli</i> NMP/mL	< 3	Ausencia	Ausencia
Mohos y Levaduras UP/mL	5.0×10 ¹	Ausencia mohos Presencia levaduras	Ausencia mohos Presencia levaduras

NMP/mL: número más probable por mL

UP/mL: unidades propagadas por mL

Tabla 14

Recuento de levaduras a 20 y 38 °C

Temperatura	Tiempo (días)		
	14	16	18
20 °C	1.6×10 ¹	1.41×10 ²	INC
38 °C	3.4×10 ¹	1.39×10 ²	1.50×10 ²

Los resultados se encuentran expresados en Unidades propagadas de levaduras por mL

La ausencia de microorganismos patógenos (coliformes totales y fecales) se da gracias al proceso de pasteurización en la etapa de formulación y a la esterilización realizada de los envases. El objetivo principal de la pasteurización es extender la vida útil del producto a través de la inactivación de todas las bacterias patógenas que no forman esporas y la mayoría de los microorganismos de deterioro vegetativo, así como inhibir o detener la actividad microbiana y enzimática (Deak, 2014). Por otro lado, los resultados indicaron que las condiciones de procesamiento y almacenamiento fueron adecuadas para evitar la contaminación por microorganismos patógenos. Cabe destacar que las principales fuentes de contaminación pueden darse a través de la materia prima, los equipos y materiales usados durante el procesamiento o durante la etapa de envasado (Lawlor et al., 2009). Esto se ha observado en bebidas elaboradas con extracto de *Hibiscus sabdariffa* con nula inocuidad del agua y la materia prima en donde se registra la presencia de *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* y especies de *Shigella* que podrían sobrevivir y multiplicarse hasta alcanzar dosis que causarían ETAs a los consumidores (Aboagye et al., 2020).

Es importante mencionar que la naturaleza ácida de la bebida durante los primeros días de almacenamiento es una de las causas para que los microorganismos contaminantes no sean capaces de sobrevivir en el medio (**Musah et al., 2014**); a pesar de ello, muchas de estas pueden ser termófilas, osmotolerantes y tolerantes a los ácidos, y ser capaces de desarrollarse en ambientes ácidos con altas concentraciones de azúcar (máximo 40–70%) (**Hernández et al., 2018**). Las levaduras son consideradas contaminantes comunes en los refrescos, generalmente, se encuentran en las materias primas o en el entorno de procesamiento de las bebidas y dada su capacidad para tolerar rangos de carbonatación de más de 3 volúmenes; se considera como un microorganismo esencial que deteriora las bebidas. Estas pueden desarrollarse a pH entre 1.5 y 8.5 (**Sperber, 2009**).

Una de las causas principales del deterioro en refrescos sometidos a pasteurización es la producción de ascosporas que dan origen a cuatro diferentes grupos de levaduras, las cuales pueden ser resistentes a aditivos y conservantes del tipo fermentativo y levadura asociadas a la contaminación por mala higiene en la etapa de producción (**Shankar et al., 2021**). A medida que las levaduras crecen en alimentos y bebidas, utilizan sustratos de carbono y nitrógeno y generan una amplia gama de metabolitos volátiles y no volátiles que determinan las propiedades quimiosensoriales del producto y su atractivo para el consumidor, algunas levaduras producen proteasas, lipasas, amilasas y pectinasas extracelulares que también afectan el sabor y la textura del producto, sin embargo, a diferencia de las bacterias y los virus, las levaduras rara vez se asocian con brotes de gastroenteritis, intoxicaciones u otras infecciones transmitidas por los alimentos (**Fleet, 2007**).

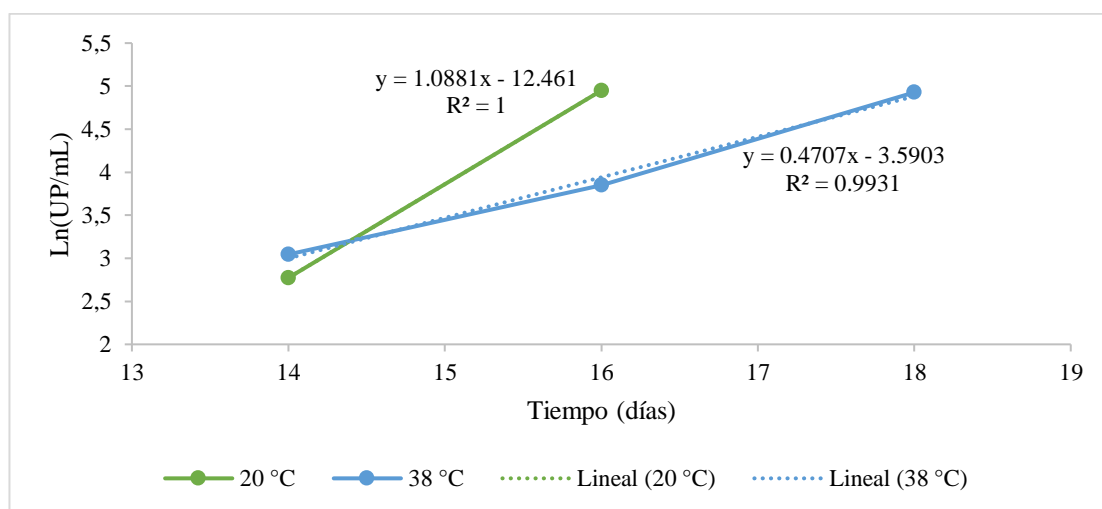
Tiempo de vida útil

La determinación del tiempo de vida útil de las bebidas se ha convertido en una parte importante en el desarrollo de estos productos y para asegurar su calidad y estabilidad, normalmente se contemplan varias temperaturas de almacenamiento. Temperaturas de refrigeración, ayudan a conservar los productos, mientras que a altas temperaturas se acelera el proceso de crecimiento y desarrollo de microorganismos, a este último proceso se lo conoce como pruebas de vida útil en condiciones aceleradas (**Khasanov & Matveeva, 2020**). En un estudio sobre la estabilidad de extractos concentrados de

jamaica a diferentes temperaturas de almacenamiento se concluyó que los extractos mantienen la mayoría de sus características estables durante tres meses a una temperatura de 4 °C, mientras que a temperaturas de 30 y 45 ° C, se observan cambios notables en la acidez titulable, el pH y el contenido de antocianinas (Moussa et al., 2018). Nychas & Panagou (2011) indica que las bebidas sin preservantes almacenadas a temperatura ambiente tienen una vida útil menor a las seis semanas dependiendo de sus características.

Figura 6

Recuento de levaduras en función del tiempo (días)



En el presente estudio, para determinar el tiempo de vida útil de la bebida se utilizaron las ecuaciones de regresión lineal obtenidas a partir de los datos del recuento de levaduras (Figura 6). El tiempo de vida útil fue de 16 días para las bebidas almacenadas a 38 °C y 15 días para aquellas mantenidas a 20 °C. Es importante mencionar que no se usaron conservantes, por lo que el tiempo de conservación de la bebida obedece únicamente a las condiciones higiénicas mantenidas durante el proceso de elaboración del producto. En un estudio realizado en bebidas a base de piña se mostró que después de 60 días de almacenamiento, la bebida aún se mantiene en buenas condiciones aunque su mejor estado estuvo en los primeros 20 días, siendo mayor a la reportada en el presente estudio (Baba et al., 2016). Por otra parte, al comparar con el trabajo de Zhao et al. (2009) el tiempo de vida útil del presente trabajo resulta ser ligeramente mayor, dado que las infusiones de té verde procesadas por campos eléctricos pulsados es consumible únicamente en un periodo de 7 días a

temperatura ambiente, aunque a una temperatura de 4 °C la duración de la bebida se extiende hasta los 180 días.

De esta manera se puede proponer como tiempo de vida útil para las dos bebidas 14 días. Periodo en el cual no se observó cambios fisicoquímicos o microbiológicos, esto bajo la justificación de que la calidad de una bebida puede verse afectada no solo por el crecimiento microbiano sino también por un cambio en el sabor, aroma, etc.

3. 2. Verificación de la hipótesis

Se rechaza la hipótesis nula dado que el porcentaje de jamaica (*Hibiscus sabdariffa L.*) y edulcorante, usados en la elaboración de la bebida influyeron en las características sensoriales del producto final.

CAPÍTULO 4

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

- Se formularon seis diferentes tratamientos de la bebida, considerando como factores el contenido de jamaica (3 %, 4.7 % y 6.5 %) y de stevia (0.12 % y 0.24 %). Cada uno de los tratamientos fue sometido a una prueba sensorial en donde se evaluaron los parámetros de color, olor, sabor y aceptabilidad. Se consideró el factor aceptabilidad para escoger el mejor tratamiento; además, se aplicó una prueba de Fisher para conocer la existencia de diferencias significativas entre los diferentes tratamientos y la presencia o ausencia de grupos homogéneos, es así, que el tratamiento 3 fue escogido como el mejor.
- El tercer tratamiento fue evaluado por 18 días, almacenándolo a temperaturas de 20 °C y 38 °C, con el fin de determinar sus propiedades fisicoquímicas y microbiológicas. En primer lugar, el pH presentó valores bajos que se mantuvieron relativamente constante en los primeros 14 días y subieron en los siguientes días; de manera simultánea se da la aparición de levaduras. El aumento del pH es explicado por la degradación de los ácidos propios de la bebida. En segundo lugar, la acidez titulable mostró un aumento a lo largo del tiempo, que puede estar influido principalmente por la producción de ácido acético en la fermentación. Y, en tercer lugar, los sólidos solubles tuvieron un crecimiento variado, manteniéndose constante en ciertas secciones, influenciado por el contenido de azúcares y los polisacáridos, como la stevia.
- Se estableció que el tiempo de vida útil de la bebida corresponde a 16 y 15 días a las temperaturas de almacenamiento de 38 °C y 20 °C, respectivamente; esta determinación se hizo a partir del recuento de levaduras. El tiempo de vida útil de un producto está ligado al uso de conservantes que ayudan a mantener estable un alimento por más tiempo, en el caso de la bebida analizada no se usó ningún aditivo considerándola natural. Es importante mencionar que a los 14 días no existió presencia de levaduras en las bebidas almacenadas; por lo cual, se considera que la vida útil de ambas bebidas es de 14 días.

4. 2. Recomendaciones

- Desarrollar las bebidas a partir de extractos de jamaica y hierbaluisa empleando otros edulcorantes naturales y adicionando conservantes con el objetivo mejorar el grado de aceptabilidad y tiempo de conservación del producto.
- Realizar un análisis de la actividad antioxidante de la bebida a diferentes temperaturas de almacenamiento para conocer el efecto de esta variable sobre la capacidad antioxidante.
- Realizar un cultivo de levaduras e identificarlas mediante pruebas bioquímicas para conocer su origen y lograr establecer protocolos que permitan eliminarlas durante los procesos de producción.

MATERIALES DE REFERENCIA

Referencias Bibliográficas

- Aboagye, G., Gbolonyo-Cass, S., Kortei, N. K., & Annan, T. (2020). Microbial evaluation and some proposed good manufacturing practices of locally prepared malted corn drink (“asaana”) and Hibiscus sabdarifa calyxes extract (“sobolo”) beverages sold at a university cafeteria in Ghana. *Scientific African*, 8, e00330. <https://doi.org/10.1016/J.SCIAF.2020.E00330>
- Armijos, C., Ramírez, J., & Vidari, G. (2022). Poorly Investigated Ecuadorian Medicinal Plants. *Plants*, 11(12), 1–33. <https://doi.org/10.3390/plants11121590>
- Baba, W. N., Din, S., Punoo, H. A., Wani, T. A., Ahmad, M., & Masoodi, F. A. (2016). Comparison of cheese and paneer whey for production of a functional pineapple beverage: Nutraceutical properties and Shelf life. *Journal of Food Science and Technology*, 53(6), 2558–2568. <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2218-8>
- Barajas-Ramírez, J. A., Gutiérrez-Salomón, A. L., & Sáyago-Ayerdi, S. G. (2021). Concentration of roselle (Hibiscus sabdariffa L) and sucrose in beverages: Effects on physicochemical characteristics and acceptance. *Food Science and Technology International*, 27(6), 563–571. <https://doi.org/10.1177/1082013220973796>
- Basílio, M., Silva, L. J. G., Pereira, A. M. P. T., Pena, A., Lino, C. M., Basílio, M., & Silva, L. J. G. (2020). Food Additives & Contaminants: Part A Artificial sweeteners in non-alcoholic beverages: Occurrence and exposure estimation of the Portuguese population Artificial sweeteners in non-alcoholic beverages: Occurrence and exposure estimation of the Portuguese. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 00(00), 1–11. <https://doi.org/10.1080/19440049.2020.1812734>
- Bechhoff, A., Cissé, M., Fliedel, G., Declémy, A. L., Ayessou, N., Akissoe, N., Touré, C., Bennett, B., Pintado, M., Pallet, D., & Tomlins, K. I. (2014). Relationships between anthocyanins and other compounds and sensory acceptability of Hibiscus drinks. *Food Chemistry*, 148, 112–119. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.132>
- Bravo, M., Barazarte, H., & Cesar, C. (2020). Evaluación físico-química y sensorial de una golosina tipo gomita a base de pulpa de parchita (*Passiflora edulis*)

- endulzada con estevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni). *Programa de Ingeniería Industrial*, 4, 1–38.
- Caballero-Serrano, V., McLaren, B., Carrasco, J. C., Alday, J. G., Fiallos, L., Amigo, J., & Onaindia, M. (2019). Traditional ecological knowledge and medicinal plant diversity in Ecuadorian Amazon home gardens. *Global Ecology and Conservation*, 17, e00524. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2019.e00524>
- Caiza, K. (2022). *Elaboración de una barra energética a base de Macleania rupestris (Kunth) A.C. Sm. como suplemento alimenticio*. Universidad Técnica de Ambato.
- Castillo, S., & Villena, C. (2020). *Elaboración de bebidas enriquecidas con trozos de sábila (Aloe vera) deshidratados por ósmosis, saborizadas a naranja y limón*. Universidad Politécnica Estatal del Carchi.
- Chandrasekara, A., & Shahidi, F. (2018). Herbal beverages: Bioactive compounds and their role in disease risk reduction - A review. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 8(4), 451–458. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2017.08.006>
- Cid, S., & Guerrero, J. A. (2012). Propiedades Funcionales De La Jamaica. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 2(2), 47–63.
- CompactDry. (2022). Compact Dry. There is always a better way. In *Compact Dry*.
- Cruz, V., Urquizu, M., Valls, V., Manresa, J. M., Ruiz, G., Urquizu, M., & Toran, P. (2020). Consumption of soft, sports, and energy drinks in adolescents. The BEENIS study. *Anales de Pediatría*, 93(4), 242–250. <https://doi.org/10.1016/j.anpedi.2020.01.004>
- Da-Costa-Rocha, I., Bonnlaender, B., Sievers, H., Pischel, I., & Heinrich, M. (2014). *Hibiscus sabdariffa* L. - a phytochemical and pharmacological review. *Food Chemistry*, 165, 424–443. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2014.05.002>
- De Oliveira, D., Cunha, G., Giandoni, M., Carvalho, P., Bonfim, G., Leopoldo, A., Leopoldo, A., & Sugizaki, M. (2023). HIBISCUS INCREASES FUNCTIONAL CAPACITY AND THE ANTI-OBESITY EFFECT IN TRAINED OBESE RATS. *Revista Brasileira de Medicina Del Deporte*, 29, 1–6. https://doi.org/10.1590/1517-8692202329012022_0119
- Deak, T. (2014). Thermal Treatment. *Food Safety Management: A Practical Guide for the Food Industry*, 423–442. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381504-0.00017-2>

- Dimofte, A., Simionescu, N., Petrovici, A. R., & Spiridon, I. (2022). Probiotic Properties of *Weissella confusa* PP29 on *Hibiscus sabdariffa* L. *Media Fermentation*, 8(10). <https://doi.org/10.3390/fermentation8100553>
- Domínguez, A. (2017). *Formulación y métodos de conservación de una bebida a partir de la hoja de Teberinto (Moringa oleifera)*. Universidad de El Salvador.
- Fleet, G. H. (2007). Yeasts in foods and beverages: impact on product quality and safety. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(2), 170–175. <https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2007.01.010>
- Fosado, R., Castro, J., & Gómez, C. (2021). Producción, composición y usos de la jamaica. *Universitarios Potosinos*, 20–25.
- Fundación Charles Darwin. (2022). *Lista de especies de Galápagos*.
- Gutiérrez, M. (2020). Vino de mora (*Rubus ulmifolius*) y flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) con propiedades antioxidantes y nutricionales como un producto innovador. *Revista Caribeña de Ciencias Sociales*, 2020–06, 2–8.
- Hariharan, G., & Mahendran, T. (2016). Physico-Chemical, Sensory and Microbial Evaluation of Ginger-Lime Ready-To-Serve (RTS) Functional Beverage, Sweetened by Palmyra Sugar Candy. *Imperial Journal of Interdisciplinary Research (IJIR)*, 2(5), 1545–1552.
- Henríquez, A., & Sánchez, M. (2017). *Propuesta de diseño y estandarización del proceso de producción de concentrado y refresco de rosa de jamaica (Hibiscus sabdariffa)*. Universidad de El Salvador.
- Hernández, A., Pérez-Nevado, F., Ruiz-Moyano, S., Serradilla, M. J., Villalobos, M. C., Martín, A., & Córdoba, M. G. (2018). Spoilage yeasts: What are the sources of contamination of foods and beverages? *International Journal of Food Microbiology*, 286, 98–110. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2018.07.031>
- Hidalgo, S. G. (2013). Manual técnico del cultivo de rosa de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) “Rosicta.” *Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícola*, 27.
- Hiko, A., & Muktar, Y. (2020). Levels of microbial contamination in non-alcoholic beverages from selected eastern Ethiopian towns markets. *Scientific African*, 7. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2019.e00223>
- INEN. (2008). *Refrescos, requisitos*.
- INEN. (2013). *Productos vegetales y de frutas - Determinación de la acidez titulable*

(IDT). 1–5.

INEN. (2017). Refrescos o bebidas no carbonatadas. Requisitos - NTE INEN 2304. *Inen*, 1–7.

Jara, F. (2018). Comparación del análisis tradicional de la escala hedónica de 9 puntos, que da resultados sesgados, con un nuevo tipo de análisis basado en la teoría de detección de señales llamado el índice R para ordenamiento. In *Universidad De Costa Rica*. Universidad Costa Rica.

Khasanov, A., & Matveeva, N. (2020). Determination of the shelf life of a functional beverage by accelerated testing. *E3S*, 0–4. <https://doi.org/https://doi.org/10.1051/e3sconf/202016401003>

Kiełtyka, A., Ludwiczuk, A., Tarasevičienė, Ž., Michalak, M., Głowacka, A., Baj, T., Kręcis, B., & Krochmal-Marczak, B. (2021). Chemical and nutritional compounds of different parts of lemongrass (*Cymbopogon citratus* (DC) stapf.) cultivated in temperate climate of Poland. *Journal of Oleo Science*, 70(1), 125–133. <https://doi.org/10.5650/jos.ess20171>

Laaz, A. del R. (2022). *Fertilización orgánica del cultivo de hierbaluisa (Cymbopogon citratus) en la provincia de Los Ríos, Ecuador Proyecto*. Universidad Técnica de Cotopaxi.

Laborde, M. (2019). *Mermeladas de bajo contenido calórico a partir de uva osmodeshidratada: Efecto de la sustitución de azúcares naturales por steviósidos y maltodextrina en las propiedades físicas, antioxidantes y atributos sensoriales*. 36–37.

Lawlor, K., Schuman, J., Simpson, P., & Taormina, P. (2009). Microbiological Spoilage of Beverages. In W. Sperber & M. Doyle (Eds.), *Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages* (pp. 245–285). Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0826-1>

Liauchonak, I., Qorri, B., Dawoud, F., Riat, Y., & Szewczuk, M. (2019). Non-Nutritive Sweeteners and Their Implications on the Development of Metabolic Syndrome. *Nutrients*, 11(3), 1–19. <https://doi.org/10.3390/nu11030644>

Liria, M. (2007). Guía para la Evaluación Sensorial de Alimentos. *Instituto de Investigación Nutricional–IIN Consultora-AgroSalud*, 2–45.

Maicas, S. (2020). The Role of Yeasts in Fermentation Processes. *Microorganisms*, 8(8), 1–8. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS8081142>

- Majumdar, T., Vasudish, C. R., Premavalli, K. S., & Bawa, A. S. (2010). Studies on processing and storage stability of ashgourd-mint leaves juice. *Journal of Food Processing and Preservation*, 34(SUPPL. 2), 549–556. <https://doi.org/10.1111/J.1745-4549.2009.00370.X>
- Males, I., Pedistic, S., Zoric, Z., Elez, I., Repajic, M., You, L., Vladimir, S., Butorac, D., & Dragovic, V. (2022). The medicinal and aromatic plants as ingredients in functional beverage production. *Journal of Functional Foods*, 96. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2022.105210>
- Malik, V., & Hu, F. (2022). The role of sugar-sweetened beverages in the global epidemics of obesity and chronic diseases. *Nature Reviews Endocrinology*, 18(4), 205–218. <https://doi.org/10.1038/s41574-021-00627-6>
- Meftahizadeh, H., Ebadi, M. T., Baath, G. S., & Ghorbanpour, M. (2022). Variation of morphological and phytochemical traits in Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) genotypes under different planting dates. *Acta Ecologica Sinica*, xxx. <https://doi.org/10.1016/j.chnaes.2021.04.011>
- Mendonça, G. R., de Sousa Campos, R., Abreu, V. K. G., de Oliveira Lemos, T., & Pereira, A. L. F. (2021). Effect of extract or infusion of leaves of the *Hibiscus sabdariffa* L. in the production and storage of the beverage blends with cupuassu: physico-chemical and sensory acceptance. *Journal of Food Science and Technology*, 58(6), 2395–2405. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04752-4>
- Moussa, N., Ndeye, S. F., Joseph, B., & Mady, C. (2018). Stability of concentrated extracts of *Hibiscus sabdariffa* L. calyx during storage at different temperatures. *African Journal of Food Science*, 12(12), 347–352. <https://doi.org/10.5897/ajfs2018.1694>
- Muala, W. C. B., Desobgo, Z. S. C., & Jong, N. E. (2021). Optimization of extraction conditions of phenolic compounds from *Cymbopogon citratus* and evaluation of phenolics and aroma profiles of extract. *Heliyon*, 7(4), e06744. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06744>
- Musah, B. O., Nii-Trebi, N. I., Nwabugo, M. A., & Asmah, R. H. (2014). Microbial Quality of Locally Prepared Hibiscus Tea in Accra Metropolis, Ghana. *IOSR Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology*, 8(11), 23–27. <https://doi.org/10.9790/2402-081122327>
- Ngoc Nhon, H. T., Diem My, N. T., Tuong Vi, V. N., Kim Lien, P. T., Thao Minh, N.

- T., Doan Duy, L. N., Hong Anh, L. T., & Anh Dao, D. T. (2022). Enhancement of extraction effectiveness and stability of anthocyanin from *Hibiscus sabdariffa* L. *Journal of Agriculture and Food Research*, 10(July), 100408. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2022.100408>
- Nychas, G.-J. E., & Panagou, E. (2011). Microbiological spoilage of foods and beverages. *Food and Beverage Stability and Shelf Life*, 3–28. <https://doi.org/10.1533/9780857092540.1.3>
- Ramírez-Rodrigues, M. M., Plaza, M. L., Azeredo, A., Balaban, M. O., & Marshall, M. R. (2012). Phytochemical, sensory attributes and aroma stability of dense phase carbon dioxide processed *Hibiscus sabdariffa* beverage during storage. *Food Chemistry*, 134(3), 1425–1431. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.03.042>
- Saavedra, J. (2019). *Cuantificación de la acidez total en una bebida refrescante sabor a limón que se expende en la ciudad de Machala*. Universidad Técnica de Machala.
- Salem, M. A., Zayed, A., Beshay, M. E., Abdel Mesih, M. M., Ben Khayal, R. F., George, F. A., & Ezzat, S. M. (2022). *Hibiscus sabdariffa* L.: phytoconstituents, nutritive, and pharmacological applications. In *Advances in Traditional Medicine* (Vol. 22, Issue 3, pp. 497–507). Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/s13596-020-00542-7>
- Salinas-Moreno, Y., Zúñiga-Hernández, A. R. E., Jiménez De La Torre, L. B., Serrano-Altamirano, V., & Sánchez-Feria, C. (2012). Color en cálices de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) y su relación con características fisicoquímicas de sus extractos acuosos. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 18(3), 395–407. <https://doi.org/10.5154/R.RCHSH.2011.08.038>
- Segovia, J., Orellana, M., Sarmiento, J. P., & Carchi, D. (2020). The effects of taxing sugar-sweetened beverages in Ecuador: An analysis across different income and consumption groups. *PLoS ONE*, 15(10 October), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240546>
- Shankar, V., Mahboob, S., Al-Ghanim, K. A., Ahmed, Z., Al-Mulhm, N., & Govindarajan, M. (2021). A review on microbial degradation of drinks and infectious diseases: A perspective of human well-being and capabilities. *Journal of King Saud University - Science*, 33(2), 101293.

<https://doi.org/10.1016/J.JKSUS.2020.101293>

- Soto, M. R., Alvarado, P. A. A., Rosales, L. E., & Cerna, J. (2017). Effect of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (dc.) Stapf “hierba luisa” on anxiety levels of high school students. *In Crescendo*, 8(1), 22.
- Sousa, A., Sych, J., Rohrmann, S., & Faeh, D. (2020). The importance of sweet beverage definitions when targeting health policies—the case of Switzerland. *Nutrients*, 12(7), 1–18. <https://doi.org/10.3390/nu12071976>
- Sousa, R., Figueirinha, A., Batista, M. T., & Pina, M. E. (2021). Formulation effects in the antioxidant activity of extract from the leaves of *cymbopogon citratus* (Dc) stapf. *Molecules*, 26(15). <https://doi.org/10.3390/molecules26154518>
- Spence, C. (2015). Just how much of what we taste derives from the sense of smell? *Flavour*, 4(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13411-015-0040-2>
- Sperber, W. H. (2009). Introduction to the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages. In *Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages* (pp. 1–40). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0826-1_1
- Stephens Camacho, N. A., Valdez Hurtado, S., Lastra Zavala, G., & Félix Ibarra, L. I. (2018). Consumo de edulcorantes no nutritivos: efectos a nivel celular y metabólico. *Perspectivas En Nutrición Humana*, 20(2), 185–202. <https://doi.org/10.17533/udea.penh.v20n2a06>
- Swiader, K., & Marczevska, M. (2021). Trends of Using Sensory Evaluation in New Product Development in the Food Industry in Countries That Belong to the EIT Regional Innovation Scheme. *Foods*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/foods10020446>
- Temussi, P. (2007). The Sweet Taste Receptor: A Single Receptor with Multiple Sites and Modes of Interaction. *Advances in Food and Nutrition Research*, 53, 199–239. [https://doi.org/10.1016/S1043-4526\(07\)53006-8](https://doi.org/10.1016/S1043-4526(07)53006-8)
- Vélez, R., D’Armas, H., Jaramillo, C., & Vélez, E. (2018). Metabolitos secundarios, actividad antimicrobiana y letalidad de las hojas de *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) y *Melissa officinalis* (toronjil). *Facsalud-Unemi*, 2(2), 31–39. <https://doi.org/10.29076/issn.2602-8360vol2iss2.2018pp31-39p>
- Vera, J., & Zambrano, M. (2021). *Efectos fisicoquímicos, microbiológicos y organolépticos del kéfir y biocompuestos de hierba luisa (Cymbopogon citratus) y chaya (Cnidoscuculos chayamansa) en una bebida*. Escuela Superior Politécnica

Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López.

- Wu, H. Y., Yang, K. M., & Chiang, P. Y. (2018). Roselle anthocyanins: Antioxidant properties and stability to heat and pH. *Molecules*, 23(6), 1357. <https://doi.org/10.3390/molecules23061357>
- Yuniati, Y., Elim, P. E., Alfanaar, R., Kusuma, H. S., & Mahfud. (2021). Extraction of anthocyanin pigment from hibiscus sabdariffa l. by ultrasonic-assisted extraction. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 1010(1), 012032. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/1010/1/012032>
- Zannou, O., Kelebek, H., & Selli, S. (2020). Elucidation of key odorants in Beninese Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) infusions prepared by hot and cold brewing. *Food Research International*, 133, 109133. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109133>
- Zhao, W., Yang, R., & Wang, M. (2009). Cold storage temperature following pulsed electric fields treatment to inactivate sublethally injured microorganisms and extend the shelf life of green tea infusions. *International Journal of Food Microbiology*, 129(2), 204–208. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.12.006>

ANEXOS

Anexo 1 Hoja de Catación



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS
CARRERA DE INGENIERÍA ALIMENTOS



FICHA DE EVALUACION SENSORIAL DE UNA BEBIDA A BASE DE JAMAICA Y HIERBALUISA ENDULZADO CON STEVIA

Nombre: **Fecha:**

Frente a usted se encuentran 6 muestras de bebidas refrescantes y un vaso con agua. Se le solicita de la manera más comedida que observe y pruebe cada muestra; e indique con un ✓ según su criterio en cada atributo. Antes de evaluar cada muestra debe tomar un sorbo de agua.

Atributo	Opciones	Muestra					
		193	603	165	231	216	483
Color	1. Morado intenso						
	2. Morado pálido						
	3. Ligeramente rosa						
	4. Rojo pálido						
	5. Rojo intenso						
Olor	1. No perceptible						
	2. Débilmente perceptible						
	3. Distinguible						
	4. Fuerte						
	5. Muy fuerte						
Sabor	1. Muy amargo						
	2. Poco amargo						
	3. Ni dulce, ni amargo						
	4. Poco dulce						
	5. Muy dulce						
Aceptación	1. Me disgusta demasiado						
	2. Me disgusta poco						
	3. No me gusta, ni me disgusta						

	4. Me gusta						
	5. Me gusta demasiado						

Anexo 2 Análisis Sensorial

Análisis de varianza para Color – Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón – F	Valor – P
Tratamientos	6.07986	5	1.21597	2.80	0.0216
Catadores	29.2549	29	1.00879	2.33	0.0015
Residuos	36.8576	85	0.433619		
Total (Corregido)	71.6979	119			

Pruebas múltiples rangos para el Color

Método: 95,0 porcentaje LSD

Tratamiento	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos homogéneos
6	20	3.583	0.153911	X
5	20	3.632	0.153911	X
2	20	3.653	0.153911	X
3	20	3.993	0.153911	XX
1	20	4.111	0.153911	X
4	20	4.153	0.153911	X

Análisis de varianza para Olor – Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón – F	Valor – P
Tratamientos	19.559	5	3.91181	9.60	0.0000
Catadores	24.009	29	0.827898	2.03	0.0064
Residuos	34.6285	85	0.407394		
Total (Corregido)	80.2313	119			

Pruebas múltiples rangos para el Olor

Método: 95,0 porcentaje LSD

Tratamiento	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos homogéneos
4	20	1.869	0.149184	X
6	20	2.203	0.149184	XX
2	20	2.432	0.149184	XX

5	20	2.515	0.149184	XX
3	20	2.647	0.149184	X
1	20	3.258	0.149184	X

Análisis de varianza para Sabor – Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón – F	Valor – P
Tratamientos	52.0556	5	10.4111	31.11	0.0000
Catadores	18.9556	29	0.65364	1.95	0.0094
Residuos	28.4444	85	0.334641		
Total (Corregido)	100.367	119			

Pruebas múltiples rangos para el Sabor

Método: 95,0 porcentaje LSD

Tratamiento	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos homogéneos
4	20	2.543	0.135208	X
2	20	2.786	0.135208	XX
6	20	3.085	0.135208	X
1	20	3.883	0.135208	X
5	20	4.140	0.135208	XX
3	20	4.363	0.135208	X

Análisis de varianza para Aceptabilidad – Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón – F	Valor – P
Tratamientos	31.658	5	6.3316	13.06	0.0000
Catadores	14.133	29	0.487344	1.01	0.4735
Residuos	41.217	85	0.484906		
Total (Corregido)	87.4917	119			

Pruebas múltiples rangos para Aceptabilidad

Método: 95,0 porcentaje LSD

Tratamiento	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos homogéneos
4	20	2.807	0.162758	X
2	20	3.085	0.162758	X
6	20	3.203	0.162758	XX

5	20	3.661	0.162758	XX
1	20	3.869	0.162758	X
3	20	4.425	0.162758	X

Anexo 3 Análisis fisicoquímico

Tiempo (días)	Parámetros fisicoquímicos					
	20 °C			38 °C		
	Sólidos	Acidez	pH	Sólidos	Acidez	pH
	solubles (% Brix)	titulable (%)		solubles (% Brix)	titulable (%)	
Día 0	0.4±0.00	0.838±0.009	2.77±0.01	0.4±0.10	0.848±0.023	2.72±0.01
Día 1	0.4±0.00	0.864±0.009	2.78±0.00	0.4±0.00	0.851±0.009	2.73±0.01
Día 2	0.5±0.00	0.874±0.005	2.79±0.01	0.4±0.00	0.870±0.036	2.76±0.01
Día 3	0.5±0.10	0.893±0.041	2.93±0.00	0.5±0.10	0.874±0.014	2.94±0.06
Día 4	0.5±0.00	0.909±0.027	2.94±0.01	0.5±0.10	0.874±0.014	2.94±0.02
Día 7	0.5±0.00	0.928±0.045	2.97±0.10	0.5±0.10	0.890±0.036	2.97±0.01
Día 8	0.5±0.00	0.934±0.036	2.98±0.01	0.5±0.00	0.928±0.045	2.98±0.02
Día 9	0.5±0.10	0.957±0.059	3.00±0.01	0.5±0.10	0.976±0.023	3.00±0.01
Día 10	0.6±0.10	0.973±0.018	3.02±0.01	0.5±0.10	0.976±0.023	3.01±0.01
Día 11	0.6±0.10	0.979±0.009	3.04±0.01	0.6±0.10	0.992±0.045	3.03±0.01
Día 14	0.6±0.10	0.986±0.018	3.07±0.01	0.6±0.10	1.040±0.023	3.04±0.01
Día 15	0.6±0.10	1.072±0.023	3.67±0.02	0.6±0.10	1.059±0.050	3.73±0.01
Día 16	0.7±0.10	1.072±0.023	3.95±0.05	0.6±0.10	1.094±0.009	4.06±0.07
Día 17	0.7±0.10	1.072±0.023	3.99±0.08	0.6±0.10	1.101±0.018	4.08±0.03
Día 18	0.7±0.10	1.136±0.023	4.15±0.01	0.7±0.10	1.136±0.023	4.10±0.01

Anexo 4 Cálculo representativo del número de unidades propagadas de levaduras por mL

$$N = \frac{\sum C}{V(n_1 + dn_2)}$$

Donde:

$\sum C$ = suma de las colonias contadas o calculadas en todas las placas elegida

n_1 = número de placas contadas de la primera dilución seleccionada

n_2 = número de placas contadas de la segunda dilución seleccionada

d = dilución de la cual se obtuvieron los primeros recuentos (0, -1, -2, -3)

V = volumen del inóculo sembrado en cada placa

$$N = \frac{145 + 147}{1(2 + 0.001 \times 2)}$$

$$N = 140.859 \cong 141$$

$$N = 1.41 \times 10^2$$

Anexo 5 Cálculos del tiempo de vida útil

Tiempo de vida útil para la bebida almacenada a 38 °C

$$\ln C = kt + \ln C_0$$

$$\ln C = 0.4707t - 3.5903$$

$$\ln 50 = 0.4707t - 3.5903$$

$$t = \frac{\ln 50 + 3.5903}{0.47047}$$

$$t = 15.94 \approx \mathbf{16 \text{ días}}$$

Tiempo de vida útil para la bebida almacenada a 20 °C

$$\ln C = kt + \ln C_0$$

$$\ln C = 1.0881t - 12.461$$

$$\ln 50 = 1.0881t - 12.461$$

$$t = \frac{\ln 50 + 12.461}{1.0881}$$

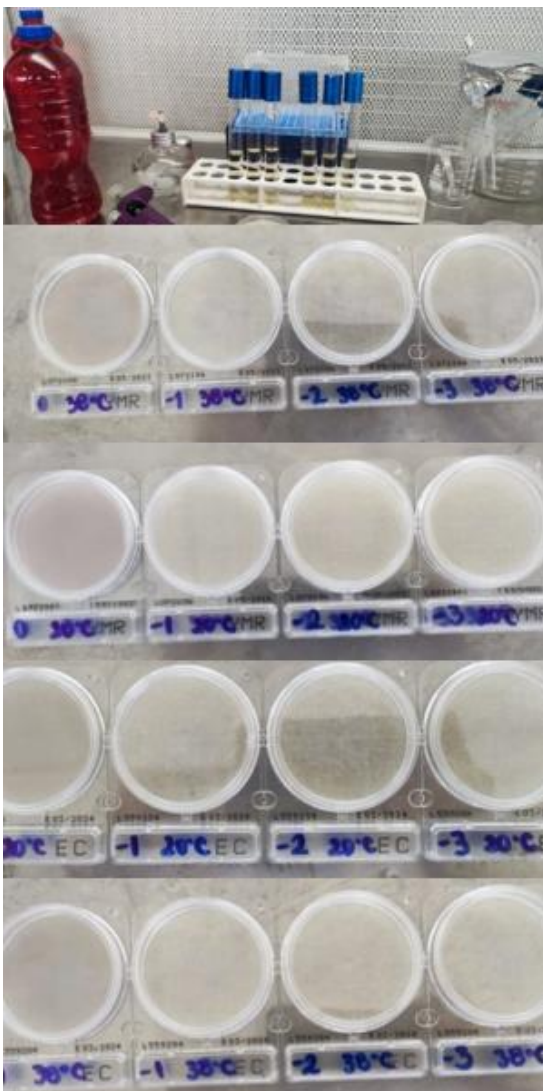
$$t = 15.05 \approx \mathbf{15 \text{ días}}$$

Anexo 6 Evidencias

- Análisis sensorial



- Análisis microbiológico



- Análisis fisicoquímico

