



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA AGROPECUARIA DE MANABÍ
MANUEL FÉLIX LÓPEZ**

DIRECCIÓN DE POSGRADO Y FORMACIÓN CONTINUA

**INFORME DE INVESTIGACIÓN
PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE MAGISTER
EN AGROINDUSTRIA**

MODALIDAD:

TRABAJO DE TITULACIÓN

TEMA:

**EFFECTOS FÍSICOQUÍMICOS, MICROBIOLÓGICOS Y
ORGANOLÉPTICOS DEL KÉFIR Y BIOCOMPUESTOS DE
HIERBA LUISA (*CYMBOPOGON CITRATUS*) Y CHAYA
(*CNIDOSCULOS CHAYAMANSA*) EN UNA BEBIDA**

AUTORES:

**JHON WASHINGTON TIRADO VERA
MARÍA MERCEDES ZAMBRANO LOOR**

TUTOR:

Mg. RICARDO RAMÓN MONTESDEOCA PÁRRAGA

CALCETA, NOVIEMBRE 2021

DERECHOS DE AUTORÍA

JHON WASHINGTON TIRADO VERA y MARÍA MERCEDES ZAMBRANO LOOR declaramos bajo juramento que el trabajo aquí descrito es de nuestra autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional, que se han respetado los derechos de autor de terceros, por lo que asumimos la responsabilidad sobre el contenido del mismo, así como ante la reclamación de terceros, conforme a los artículos 4, 5 y 6 de la Ley de Propiedad Intelectual.

A través de la presente declaración cedemos los derechos de propiedad intelectual a la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, según lo establecido en el artículo 46 de la Ley de Propiedad Intelectual y su Reglamento.



JHON WASHINGTON TIRADO VERA



MARÍA MERCEDES ZAMBRANO LOOR

CERTIFICACIÓN DEL TUTOR

ING. RICARDO RAMÓN MONTESDEOCA PÁRRAGA, Mg, certifica haber tutelado el trabajo de titulación **EFFECTOS FÍSICOQUÍMICOS, MICROBIOLÓGICOS Y ORGANOLÉPTICOS DEL KÉFIR Y BIOCOMPUESTOS DE HIERBA LUISA (*Cymbopogon citratus*) Y CHAYA (*Cnidioscolus chayamansa*) EN UNA BEBIDA**, que ha sido desarrollado por JHON WASHINGTON TIRADO VERA y MARÍA MERCEDES ZAMBRANO LOOR, previo a la obtención del título de Magister en Agroindustria, de acuerdo al **REGLAMENTO PARA LA ELABORACIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN DE LA UNIDAD DE TITULACIÓN** de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López.

Mg. RICARDO RAMÓN MONTESDEOCA PÁRRAGA

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL

Los suscritos integrantes del tribunal correspondiente, declaramos que hemos APROBADO el trabajo de titulación **EFFECTOS FÍSICO QUÍMICOS, MICROBIOLÓGICOS Y ORGANOLÉPTICOS DEL KÉFIR Y BIOCOMPUESTOS DE HIERBA LUISA (*Cymbopogon citratus*) Y CHAYA (*Cnidioscolus chayamansa*) EN UNA BEBIDA**, que ha sido propuesto, desarrollado y sustentado por JHON WASHINGTON TIRADO VERA y MARÍA MERCEDES ZAMBRANO LOOR, previa a la obtención del título de Magister en Agroindustria, de acuerdo **al REGLAMENTO PARA LA ELABORACIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN** de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López.

Mg. FRANCISCO MANUEL DEMERA LUCAS
MIEMBRO

Mg. JOSÉ FERNANDO ZAMBRANO RUEDAS
MIEMBRO

PhD. JULIO VINICIO SALTOS SOLÓRZANO
PRESIDENTE

AGRADECIMIENTO

Los resultados obtenidos no se realizan con el esfuerzo de una sola persona, por ende, le agradecemos a quienes sin duda nos ayudaron a que este logro académico se ejecute de la mejor manera, nuestros agradecimientos van dirigidos a: La Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López que nos abrió una ventana llena de oportunidades, a una educación superior de calidad, donde hemos formado nuestros conocimientos profesionales día a día. Nuestros padres quienes fueron el pilar fundamental en el transcurso de nuestra etapa académica, y por darnos la mejor herencia como es el estudio. Nuestro tutor el Ing. Ricardo Montesdeoca Mg, que, gracias a sus conocimientos alcanzados durante su vida profesional, hizo que la ejecución de este proyecto académico sea de gran apoyo y muy exitoso.

JHON WASHINGTON TIRADO VERA

MARÍA MERCEDES ZAMBRANO LOOR

DEDICATORIA

“La educación es el gran motor del desarrollo personal. Es a través de la educación como la hija de un campesino puede convertirse en una gran doctora, el hijo de un minero puede convertirse en el jefe de la mina, o el hijo de trabajadores agrícolas puede llegar a ser presidente de una gran nación.” (Nelson Mandela).

Esta pequeña meta cumplida es en dedicatoria y al eterno agradecimiento que les debo a mis amados padres, Washington Tirado y Gemita Vera ya que con mucho esfuerzo, sacrificio y amor me dieron su apoyo incondicional para poder culminar esta maestría; a mis hermanas Jomaira y Karla Tirado que me brindaron siempre sus sabios consejos y ánimos de continuar; a mi hermano Aldair Tirado que no se encuentra con nosotros pero siempre lo recordamos y llevamos en nuestros corazones, porque “el día que dejemos de recordarlo, recién ese día habrá desaparecido de nuestros corazones”; a mis amadas hijas Johanne y Johys que fueron parte de mis pilares fundamentales para poder seguir con el camino emprendido, dándome siempre su apoyo hasta los últimos días de esta grandiosa carrera.

JHON WASHINGTON TIRADO VERA

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a quienes inspiraron mi espíritu para la conclusión de esta etapa de mi vida. A mis padres quienes me dieron vida, educación, apoyo y consejos. A mis compañeros de estudio, a mis maestros, amigos, y en especial a mi compañero de tesis Jhon Tirado, por ser el complemento perfecto para cumplir con esta meta propuesta, por último, pero no menos importante a mí misma por siempre creer en mí y no desmayar pese a muchas adversidades que encontré en el camino.

MARÍA MERCEDES ZAMBRANO LOOR

CONTENIDO GENERAL

DERECHOS DE AUTORÍA.....	.ii
CERTIFICACIÓN DE TUTOR.....	.iii
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL.....	.iv
AGRADECIMIENTO.....	.v
DEDICATORIA.....	.vi
CONTENIDO GENERAL.....	.viii
CONTENIDO DE CUADROS Y FIGURAS.....	.x
RESUMEN.....	.xi
ABSTRACT.....	.xii
CAPÍTULO I. ANTECEDENTES	1
1.1. PLANTEAMIENTO Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	1
1.2. JUSTIFICACIÓN	2
1.3. OBJETIVOS.....	4
1.3.1. OBJETIVO GENERAL.....	4
1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
1.4. HIPÓTESIS.....	4
1.5. VARIABLES.....	4
1.5.1. VARIABLE INDEPENDIENTE.....	4
1.5.2. VARIABLE DEPENDIENTE	4
CAPÍTULO II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1. BEBIDAS	5
2.1.1. LAS BEBIDAS FUNCIONALES	6
2.1.2. PROBIÓTICOS.....	8
2.2. MICROORGANISMOS TIBETANOS O KÉFIR	8
2.3. ELABORACIÓN DE LA BEBIDA BIOACTIVA	10
2.3.1. MATERIAS PRIMAS A UTILIZAR EN EL PROCESO.....	10
2.3.2. BIOACTIVOS.....	13
2.4. POLIFENOLES Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.....	15
2.4.1. POLIFENOLES.....	15
2.4.2. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.....	16
CAPÍTULO III. DESARROLLO METODOLÓGICO	19
3.1. UBICACIÓN.....	19
3.2. DURACIÓN.....	19
3.3. FACTORES EN ESTUDIO.....	19
3.4. NIVELES DEL FACTOR	19
3.5. TRATAMIENTOS	20
3.6. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	20

3.7.	UNIDAD EXPERIMENTAL.....	21
3.8.	MANEJO DEL EXPERIMENTO.....	21
	PROCESO.....	23
3.9.	VARIABLES A MEDIR Y MÉTODO DE EVALUACIÓN.....	24
3.9.1.	pH (INEN, 2002).....	24
3.9.2.	ACIDEZ TITULABLE (INEN, 2002).....	24
3.9.3.	GRADOS BRIX.....	25
3.9.4.	DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES [mg DE ÁCIDO GÁLICO Eq/100 g (mg EAG/100 g)].....	25
3.9.5.	DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE [mg TROLOX Eq/g MUESTRA (mg ET/100 g)].....	25
3.9.6.	ANÁLISIS SENSORIAL.....	26
3.9.7.	BACTERIAS PROBIÓTICAS UFC/g (INEN, 2011).	26
3.10.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	27
	CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
4.1.	CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS DE LA BEBIDA A PARTIR DE BIOCOMPUESTOS DE HIERBA LUISA Y CHAYA.....	28
4.2.	PRUEBAS NO PARAMÉTRICAS PARA LAS VARIABLES °BRUX Y pH.....	33
4.3.	DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE FENOLES TOTALES Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LA BEBIDA A PARTIR DE BIOCOPUESTOS DE HIERBA LUISA Y CHAYA.....	35
4.4.	CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DE LA BEBIDA A PARTIR DE BIOCOPUESTOS DE HIERBA LUISA Y CHAYA.....	39
4.5.	DETERMINACIÓN DE LA CARGA PROBIÓTICA TOTAL.....	39
	CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	41
5.1.	CONCLUSIONES.....	41
5.2.	RECOMENDACIONES.....	41
	BIBLIOGRAFÍA.....	43
	ANEXOS.....	50

Tablas

Tabla 1.	Clasificación general de bebidas funcionales.....	7
Tabla 2.	Bacterias y levaduras de los gránulos de kéfir de agua.....	9
Tabla 3.	Cepas microbianas de los gránulos de kéfir de agua.....	9
Tabla 4.	Niveles de los factores.....	19
Tabla 5.	Tratamientos.....	20
Tabla 6.	Esquema del ANOVA.....	20
Tabla 7.	Composición de la unidad experimental.....	21
Tabla 8.	Supuestos de ANOVA para las variables °brix, pH y acidez titulable.....	28
Tabla 9.	ANOVA para la variable acidez titulable del té de Hierba luisa y Chaya.....	29

Tabla 10. Medias de los niveles del factor B en función de la acidez aportada al té.....	31
Tabla 11. Prueba de Kruskal-Wallis para la variable °brix y pH en función de los niveles del factor A.....	33
Tabla 12. Prueba de Kruskal-Wallis para °brix y pH en función de los niveles del factor B.....	34
Tabla 13. Supuesto del ANOVA para polifenoles totales y actividad antioxidante del té.....	35

Figuras

Figura 1. Clasificación de las bebidas.	6
Figura 2. Diagrama del proceso de la obtención de extracto acuoso y elaboración de la bebida bioactiva.	22
Figura 3. Diferencias de los niveles del factor a en función de la acidez aportada al té	30
Figura 4. Interacción del factor A – B y su incidencia sobre la variable acidez	32
Figura 5. Prueba de Kruskal-Wallis para la variable °brix y pH en función de los niveles del factor A	33
Figura 6. Medias de °brix y pH aportados por cada uno de los niveles del factor A	33
Figura 7. Prueba de Kruskal-Wallis para °brix y pH en función de los niveles del factor B	34
Figura 8. Medias de °brix de los tratamientos en estudio	34
Figura 9. Medias de pH de los tratamientos en estudio	35
Figura 10. Prueba de Kruskal-Wallis para los polifenoles totales y la actividad antioxidante.	36
Figura 11. Medias de polifenoles totales de los tratamientos	36
Figura 12. Medias de la actividad antioxidante en los tratamientos	37
Figura 13. Prueba de Friedman para los datos de la percepción sensorial de la bebida.	38

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue evaluar los efectos fisicoquímicos, microbiológicos y organolépticos del kéfir y biocompuestos de hierba luisa y Chaya en una bebida. Se estableció como factor A al extracto acuoso de hierba luisa y chaya al 5% y como B, a tres porcentajes de kéfir de agua (4%, 5% y 6%). Se estableció un arreglo factorial A x B con 6 tratamientos y tres réplicas por cada uno. El análisis estadístico en relación a la acidez, indicó que los factores en estudio por separado y en interacción, incidieron sobre esta propiedad en el té, dejando como mejor tratamiento al T1 (5% de hierba luisa + 5 % de kéfir). En relación a las variables pH y °Brix, el factor A incidió sobre las medias de estas propiedades, no así el factor B. En este sentido el mejor tratamiento para la variable pH y °Brix fue el T1 (5% de hierba luisa + 5 % de kéfir). En cuanto a polifenoles el T3 (5% de hierba luisa + 6% de kéfir) fue el mejor con una media de 309,15 mg EAG/L, mientras que para la actividad antioxidante el mejor fue el T6 (5% de Chaya + 6% de kéfir) con una media de 44,53 ABTS ($\mu\text{mol EQ Trolox/mL}$). Finalmente, el T3 se posicionó como el mejor tratamiento de todos, llegando a obtener en relación a los probióticos totales una media de $1,7 \times 10^9$ UFC/mL. El análisis sensorial a los 6 tratamientos, los catadores no percibieron diferencia alguna.

Palabras clave: Actividad antioxidante, polifenoles, probióticos, chaya, hierba luisa

ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate the physicochemical, microbiological and organoleptic effects of kefir and Biocomposites of lemon verbena and chaya in a drink. The aqueous extract of lemon verbena and chaya at 5% was established as factor A and as B, at three percentages of water kefir (4%, 5% and 6%). A factorial arrangement A x B was established with 6 treatments and three replications for each one. The statistical analysis in relation to acidity, indicated that the factors studied separately and in interaction, influenced this property in tea, leaving T1 as the best treatment (5% lemon verbena + 5% kefir). In relation to the variable's pH and °Brix, factor A had an impact on the means of these properties, but not factor B. In this sense, the best treatment for the variable pH and °Brix was T1 (5% lemongrass + 5% kefir). Regarding polyphenols, T3 (5% lemon verbena + 6% kefir) was the best with an average of 309.15 mg EAG / L, while for antioxidant activity the best was T6 (5% Chaya + 6% kefir) with a mean of 44.53 ABTS ($\mu\text{mol EQ Trolox} / \text{mL}$). Finally, T3 was positioned as the best treatment of all, reaching an average of 1.7×10^9 CFU / mL in relation to total probiotics. Sensory analysis at 6 treatments, the tasters did not perceive any difference.

Key words: Antioxidant activity, polyphenols, probiotics, Chaya, Lemon grass

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

1.1. PLANTEAMIENTO Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

El consumo mundial de las bebidas naturales ha experimentado un crecimiento sostenible en las últimas décadas, debido al auge de la preocupación por la salud y el estilo de una vida más saludable (Miranda y Vilca, 2018). En la elaboración de jugos, néctares, bebidas y yogures, es necesario encontrar la mezcla óptima de ingredientes que permita generar un nuevo producto cuya formulación ofrezca características de producto funcional con alto valor nutricional, en las que se mantengan propiedades organolépticas de aroma y sabor deseables (Salamanca et al., 2010).

Bolaños (2014) indica que el kéfir son gránulos constituidos de bacterias lácticas, levaduras y bacterias ácido acéticas en una matriz de proteínas, lípidos y azúcares, estos gránulos de kéfir también nos permiten obtener bebidas fermentadas en agua, es una de las opciones para consumir esta clase de alimentos. El alcance de la presente investigación, es de dar a conocer las propiedades probióticas de las bebidas fermentadas con gránulos de kéfir de agua y hierbas aromáticas con propiedades curativas, mediante análisis fisicoquímicos y microbiológicos, para poder determinar si estas bebidas se las puede considerar como probióticas, al cumplir con los requisitos establecidos en las normas INEN 2395:2011 para bebidas fermentadas.

Un gran porcentaje de la población, en particular en países en desarrollo, emplean plantas para afrontar las necesidades primarias de asistencia médica. Asimismo, las plantas han jugado un papel fundamental en el desarrollo de las diferentes culturas, siendo utilizadas como fuente de alimentos (Paredes et al., 2015). Los compuestos fenólicos son productos del metabolismo secundario de las plantas, los cuales están estrechamente relacionados con efectos benéficos en el organismo de quien los consume, además son responsables de otras propiedades en el producto, como el color y el sabor (Trávez, 2015).

Los polifenoles se asocian con procesos de maduración de plantas y tejidos,

mecanismos de defensa, y características importantes de productos alimenticios de origen vegetal; se destacan por ser atractivos en el campo de la nutrición, la salud y la medicina, numerosos estudios en los últimos años, confirman los efectos fructuosos de la ingesta de polifenoles sobre la salud, especialmente sobre el sistema cardiovascular; tales efectos son consecuencia de sus propiedades antioxidantes que atenúan la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL, por sus siglas en inglés), efectos vasodilatadores y demás son capaces de mejorar el perfil lipídico (Quiñones et al., 2013).

Ante lo expuesto se plantea la siguiente interrogante:

¿Cómo influirá el kéfir y los biocompuestos de hierba luisa y chaya en las características fisicoquímicas, microbiológicas y organolépticas de una bebida bioactiva fermentada?

1.2. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad la alimentación del ser humano ha cambiado, pues el ritmo de vida acelerado dificulta balancear una dieta con todos los nutrientes esenciales que proveen energía, crecimiento, mantener los niveles óptimos de inmunidad, y combatir los efectos de la toxicidad (Miranda y Vilca, 2018). Los consumidores de alimentos están demandando productos innovadores, sanos, nutritivos y económicos, esto obliga a los innovadores a enfocarse en nuevas alternativas para realizar investigaciones de cultivos que son poco aprovechados y no han sido incluidos en la agroindustria para poder crear productos altamente nutritivos y que sean aceptados por el mercado (Cerritos y Villacorta, 2017).

Trávez (2015) menciona que los gránulos de kéfir, son un cultivo vivo de diferentes microorganismos benignos que viven en simbiosis, generando una estructura de polisacárido, se reproducen en una solución de azúcar y agua por lo que se lo conoce como kéfir de agua, estos microorganismos asociados darán como resultado una bebida fermentada denominada bioactiva, según la bibliografía, tales compuestos proporcionan beneficios a la salud.

Nabor (2020) indica que en estudio realizado por el Dpto. de Farmacología de la Facultad de Farmacia en Bangalore, se demostró que las personas que consumen regularmente té de hierba luisa presentan una reducción significativa de los niveles de triglicéridos, colesterol LDL en el cuerpo, previene enfermedades cardiovasculares gracias a su alto contenido en potasio que ayuda a calmar la tensión en los vasos sanguíneos, pues actúa como vasodilatador natural, también ayuda a aliviar el dolor de cabeza o migraña, pues la bebida concentra algunos compuestos que actúan como antiinflamatorios naturales.

Nabor (2020) menciona que la chaya tiene grandes beneficios para la salud, pues contiene más propiedades nutricionales que la espinaca, el amaranto o la lechuga, los nutrientes que más destacan de la chaya son el hierro, la proteína, la fibra, el calcio, potasio, vitaminas A y C y antioxidantes como los carotenoides. Castillo et al. (2012) indican que, al tener un gran contenido de hierro, esta hoja puede ayudar a combatir y prevenir la anemia, pues este mineral esencial se requiere para producir hemoglobina, una proteína de los glóbulos rojos que se encarga de transportar el oxígeno a los pulmones y a distintas partes del cuerpo, además, ayuda a contrarrestar los niveles elevados de glicemia, colesterol, triglicéridos e hipertensión arterial.

En Ecuador existen industrias que envasan bebidas carbonatadas y no carbonatadas, de marcas comerciales muy conocidas; sin embargo, la producción de infusiones comienza a tener mayor importancia en el consumidor, donde se toma como principal bebida las infusiones de té frío de distintos sabores. Durante los últimos años, se ha puntualizado y evaluado los beneficios de ingerir bebidas ricas en antioxidante como fenoles y flavonoides (Olmos et al., 2019).

La elección de las materias primas (hierba luisa y chaya), tiene como enfoque el aprovechamiento de plantas que se encuentran en Ecuador y son poco explotadas en la industria. Por ello la abundancia de materia prima hacen que la elaboración de dicha bebida no demande un costo de producción muy elevado en comparación con otras bebidas bioactivas.

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar los efectos fisicoquímicos, microbiológicos y organolépticos del kéfir y biocompuestos de hierba luisa (*C. citratus*) y chaya (*C. chayamansa*) en una bebida.

1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar las características fisicoquímicas de la bebida a partir de biocompuestos de hierba luisa y chaya.
- Determinar el contenido de polifenoles totales y actividad antioxidante de la bebida a partir de biocompuestos de hierba luisa y chaya.
- Evaluar las características organolépticas de la bebida a partir de biocompuestos de hierba luisa y chaya.
- Establecer la viabilidad probiótica en la bebida bioactiva a partir de biocompuestos de hierba luisa y chaya

1.4. HIPÓTESIS

El porcentaje de kéfir y biocompuestos de hierba luisa y chaya influyen en las características fisicoquímicas, microbiológicas y organolépticas de la bebida.

1.5. VARIABLES

1.5.1. VARIABLE INDEPENDIENTE

- Porcentaje del kéfir
- Biocompuestos de hierba luisa y chaya

1.5.2. VARIABLE DEPENDIENTE

- Características fisicoquímicas
- Características microbiológicas
- Características organolépticas

CAPÍTULO II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. BEBIDAS

Para Rivera et al. (2008) las bebidas se definen como todos aquellos líquidos que ingieren los seres humanos, en términos de saciedad y compensación dietética. Así mismo Marcillo y Naranjo (2012) mencionan que las bebidas se distinguen de otros alimentos por dos características principales: primero son líquidas o son consumidas en estado líquido y segundo son generalmente usados para calmar la sed. Los mayores grupos de bebidas que tienen estas características son los jugos de frutas, néctares y bebidas refrescantes que se pueden clasificar a su vez en:

- Bebidas refrescantes naturales
- Bebidas refrescantes de extractos
- Bebidas refrescantes gaseosas
- Infusiones

La tendencia de los consumidores que ven importante el tema de salud, fomenta el desarrollo de nuevos tipos de bebidas empleando ingredientes naturales que contribuyan a prevenir la obesidad, diabetes entre otras dolencias. Diversos estudios señalan propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y anticancerígenas (Flores y Flores, 2018). La industria de bebidas en el Ecuador posee un gran potencial, teniendo mucho que explotar en la elaboración de nuevos productos para atender diferentes segmentos de mercados, ya que permanentemente, aumenta el número de consumidores que buscan diferentes opciones amigables para la salud, además, nuestro país cuenta con una gran diversidad cultural y natural, lo que nos permite abrirnos paso en los nuevos mercados (Córdova et al., 2010).

- **Infusión**

Según Campo et al. (2020) el aprovechamiento de las propiedades medicinales de las plantas, a través de su consumo en forma de infusión, resulta de gran

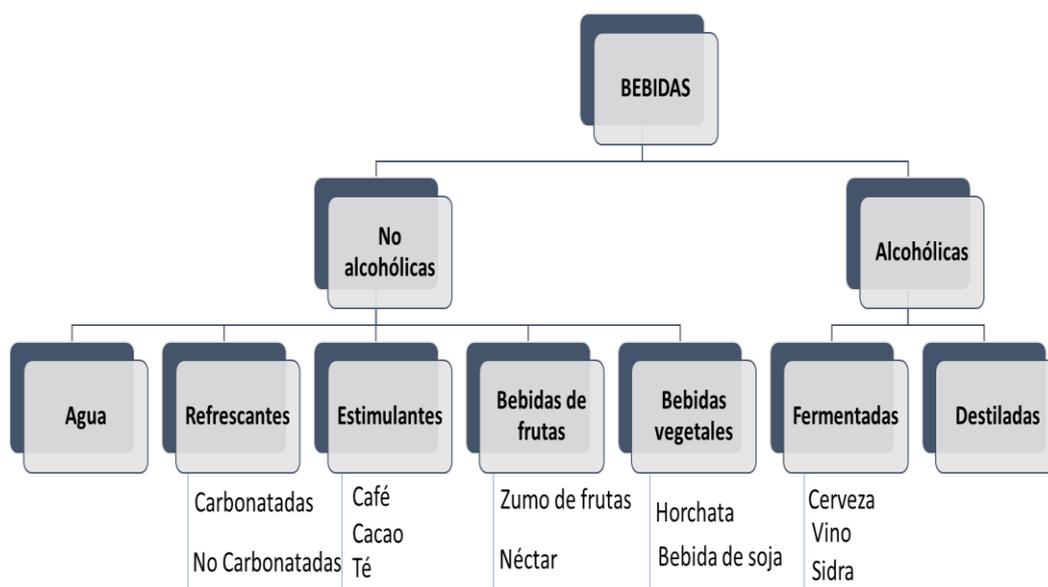
aceptación por la población. Una infusión es una bebida, generalmente, elaborada a partir de las partes aéreas de diversas plantas y de fácil preparación. Suelen ser de sabor agradable y, colateralmente, proporcionan beneficios a la salud como antiinflamatorio, antioxidante, antimicrobiano, entre otros.

- **Clasificación**

López (2016) indica que las bebidas son un componente importante de la dieta diaria, categorizadas en dos grandes grupos: no alcohólicas y alcohólicas, la clasificación de las bebidas se encuentra detallada esquemáticamente en la figura 1.

Figura 1.

CLASIFICACIÓN DE LAS BEBIDAS.



Fuente: López (2016).

2.1.1. LAS BEBIDAS FUNCIONALES

Las bebidas funcionales son aquellas que ofrecen beneficio para la salud y el autocuidado; pueden ser funcionales naturalmente como el té (contiene antioxidantes en 15 formas naturales) o pueden adicionarse nutracéuticos como el calcio de leche, omegas, proteína aislada de soja, fibras, prebióticos, probióticos, L-carnitina, polifenoles, vitaminas, minerales y otros ingredientes

que confieren beneficios específicos que pueden ser declarados en el producto, estas bebidas pueden desempeñar un importante rol en la protección de la salud y prevención de enfermedades (Fernández, 2018).

Tabla 1

CLASIFICACIÓN GENERAL DE BEBIDAS FUNCIONALES

PROPIEDAD FUNCIONAL	CARACTERÍSTICAS
Control de peso o apropiadas para diabéticos	Se sustituyen por edulcorantes artificiales (bebidas light). Contienen polisacáridos que tienen el efecto de provocar un índice glucémico bajo.
Orgánicas/naturales	Se elaboran de vegetales cultivados en ausencia de pesticidas o de abonos químicos y procesados sin conservadores o aditivos químicos, pero pueden tener aditivos naturales.
Energizantes/revitalizantes	Aceleran el sistema nervioso simpático. Se les añade cafeína o algún otro alcaloide estimulante. Puede añadirseles ginseng, equinácea o espinillo amarillo.
Reductoras de colesterol	Se les añade etanol o sus ésteres los fitoesteroles
Relajantes	Elaboradas a base de hierbas con opiáceos en bajas concentraciones
Reconstituyentes/hidratante	Aportan valor energético y un índice glucémico alto. Añadidas con hidrolizados de proteínas vegetales o animales, carbohidratos, vitaminas y minerales. Se formulan para grupos específicos: niños, ancianos, mujeres, deportistas, etc.
Curativas de úlcera	Se utilizan extractos de Aloe vera (sábila) y nopal. Proveen gomas y otros agentes químicos con propiedades antiinflamatorias, regeneradoras de tejido, antibióticos y que aceleran el metabolismo de los lípidos.
Mitigantes del envejecimiento	Se les adicionan ácidos grasos omega-3, omega-6 o compuestos fenólicos que actúan como antioxidantes.
Simbióticas	Contienen una o más especies de bacterias lácticas o actinomicetos con carácter prebiótico, además de contener oligosacáridos que funcionan como prebióticos y como fibra biológica.

Fuente: Fernández, (2018).

2.1.2. PROBIÓTICOS

Los probióticos son complementos alimenticios elaborados con microorganismos vivos que, al ser ingeridos en determinadas cantidades, benefician al huésped promoviendo el equilibrio de la microbiota intestinal. Para ser considerado probiótico, el microorganismo debe ser un habitante gastrointestinal habitual, sobrevivir en su paso por el estómago y mantener su viabilidad y actividad metabólica en el intestino (De Oliveira et al., 2020).

2.2. MICROORGANISMOS TIBETANOS O KÉFIR

Según Pauca (2016) el kéfir de agua o llamados hongos tibetanos es un conjunto microbiano multiespecífico que se encuentra estable con distintos microorganismos y se emplea para elaborar una bebida fermentada a base de sacarosa y agua, la bebida se considera como un probiótico y se compone de granos y un sobrenadante en el cual está contenido un grupo de microorganismos, polisacáridos, aminoácidos, vitaminas, ácidos, etanol y sustancias volátiles, el líquido que resulta del proceso es efervescente y nublado, con gas, de baja acidez, algo dulce y levemente alcohólica, dependiendo de acuerdo al tiempo de fermentación.

- **Composición física**

Los tibicos son gránulos similares a una coliflor, con un diámetro promedio de 5 a 20 mm, con una apariencia transparente y estructura elástica, los microorganismos se encuentran adheridos en los gránulos, en forma de hielo triturado (Monar y Dávalos, 2013).

- **Composición química**

Los tibicos producen diversos líquidos azucarados, alimentándose de los azúcares para producir ácido láctico, etanol y dióxido de carbono que hace que la bebida quede carbonatada. Estos microorganismos generan un tipo de fermentación hidroalcohólica en agua y en leche (Monar y Dávalos, 2013).

- **Composición microbiológica**

Según Teixeira *et al.* (2011) al aislar un total de 289 bacterias y 129 levaduras, durante el proceso fermentativo, el 57,65% fueron bacterias ácido lácticas, seguidas de levaduras que representaban el 30,86% y finalmente las bacterias acéticas con el 11,48%, mediante microscopía electrónica de barrido se mostró que la microbiota presente predominan los bacilos células (cortas y curvas de largo) que crecen en estrecha asociación con las células de levaduras en forma de limón, los microorganismos presentes en los gránulos de kéfir se detallan a continuación:

Tabla 2

BACTERIAS Y LEVADURAS DE LOS GRÁNULOS DE KÉFIR DE AGUA

BACTERIAS	%
<i>Lactobacillus paracasei</i>	23
<i>Acetobacter lovaniensis</i>	16,61
<i>Lactobacillus parabuchneri</i>	11,76
<i>Lactobacillus kefir</i>	10,03
<i>Lactococcus lactis</i>	10,03
<i>Lactobacillus casei</i>	8,6
<i>Lactobacillus paracasei subsp. Paracasei</i>	7,96
<i>Leuconostoc citreum</i>	5,54
<i>Lactobacillus paracasei subsp. Tolerans</i>	3,11
<i>Lactobacillus buchneri</i>	2,42
LEVADURAS	%
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	54,26
<i>Kluyveromyces lactis</i>	20,15
<i>Lachancea meyersii</i>	10,85
<i>Kazachstania aerobia</i>	14,73

Fuente: Teixeira et al. (2011).

Tabla 3

CEPAS MICROBIANAS DE LOS GRÁNULOS DE KÉFIR DE AGUA

BACTERIAS	
<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Lactobacillus hilgardii</i>
<i>Lactobacillus lactis cremoris</i>	<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>Casei</i>
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i>	<i>Acetobacter aceti</i>
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>Pseudopiantarum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
<i>Lactobacillus buchneri</i>	<i>Lactobacillus fructiovorans</i>
<i>Lactobacillus keranofaciens</i>	<i>Lactobacillus kefir</i>
<i>Lactobacillus collinoides</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i>
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Cremoris</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>Dextranicum</i>	subsp. <i>Mesenteroides</i>
<i>Gluconobacter frateuri</i>	<i>Enterobacter hormachei</i>
	<i>Chryseomonas luteola</i>
BIFIDOBACTERIA	
	<i>B. psychraerophilum</i>
LEVADURAS	
<i>Saccharomyces bayanus</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Saccharomyces florentinus</i>	<i>Saccharomyces pretoriensis</i>
<i>Zygosaccharomyces florentinus</i>	<i>Candida valida</i>
<i>Hanseniaspora viniae</i>	<i>Hanseniaspora yalbensis</i>
<i>Kloeckera apiculata</i>	<i>Candida lambica</i>
<i>Candida colliculosa</i>	<i>Toruspola delbruechii</i>
<i>Candida inconspicua</i>	<i>Candida magnoliae</i>
<i>Candida famata</i>	<i>Candida kefir</i>
<i>Kluyveromices lactis</i>	<i>Kluyveromices marxianus</i>

Fuente: Teixeira et al. (2011).

2.3. ELABORACIÓN DE LA BEBIDA BIOACTIVA

2.3.1. MATERIAS PRIMAS A UTILIZAR EN EL PROCESO

HIERBA LUISA

- **Generalidades**

La hierba luisa es una planta medicinal aromática que posee grandes propiedades medicinales, su aroma penetrante a limón tiene su origen en el citral, ya que, es el principal componente de su aceite esencial, las principales características de la hierba luisa y su valor han venido tomando fuerza a través

de la historia, es una muy buena opción para la elaboración de bebidas naturales, su sabor a limón, olor y color son agradables (Burbano, 2016).

Las hojas frescas se utilizan también como aliño en la cocina tradicional, la infusión de las hojas de la hierba luisa por su contenido de aceites esenciales que puede alcanzar 0,66-0,90 g 100 g⁻¹ de hojas frescas, compuestos de aldehído citral, furfural, citronenal, mirceno, metil-heptenona, se usa como estimulante del sistema nervioso, las hojas mezclada con limón y raspadura se toma para combatir el frío y tratar el escalofrío, también ayuda a la digestión y es efectiva para tratar el dolor de cabeza, pecho, estómago, diarreas fuertes, gastritis, úlceras, se conoce también por sus propiedades anti-inflamatorias (Llerena et al., 2017).

- **Usos**

Según Torres et al. (2008), la hierba luisa tiene amplios usos, entre ellos:

Alimenticio: Las hojas se usan para preparar aguas aromáticas, refrescos y dulces, se suele tomar después de las comidas.

Aditivos de los alimentos: Las hojas se usan como especería en la chicha de maíz y la colada morada.

Materiales: En algunas etnias de la región costa, interandina y el trópico las hojas se usan como dentífrico, ya que frotadas directamente sobre los dientes ayudan a mantenerlos blancos, las hojas son usadas como ornamento corporal por la etnia Secoya en Sucumbíos, se usa comercialmente en la región interandina y el trópico para perfumar y ahuyentar los mosquitos y el jején, se emplea también para extraer aceite y fabricar jabón y medicinas en la región costa.

Social: La infusión de las hojas se toma por placer o para alejar el miedo en las etnias mestiza (Pichincha) y Kichwa (Orellana), además se aplican en baños energéticos, la infusión de hojas se usa como estimulante del sistema nervioso, los Cofanes en Sucumbíos se amarran las hojas en el hombro o en la muñeca cuando se va a beber yaje (bebida preparada a base de ayahuasca).

Medicinal: La infusión de las hojas mezclada con limón y raspadura se toma para sacar el frío y tratar el escalofrío, también ayuda a la digestión y es efectiva para tratar el dolor de cabeza, pecho, estómago, diarreas fuertes, gastritis, úlceras, presión baja, afecciones de los nervios, corazón, cáncer, reumatismo, se usan también como diurético, diaforético y para regular el ciclo menstrual.

CHAYA

- **Generalidades**

La chaya (*C. chayamansa*) es un arbusto semiperenne y semileñoso de hasta 5 m de altura perteneciente a la familia Euphorbiaceae, el cual es cultivado en climas cálidos subhúmedos ubicados de 0 a 1 000 msnm. Esta planta requiere de suelos bien drenados para su adecuado desarrollo, además que es tolerante a condiciones ambientales adversas incluyendo lluvias fuertes y sequía intraestival, la parte más aprovechada de la chaya son sus hojas, cuya calidad nutricional es mayor que la de las hojas de espinaca, destacando el alto contenido de proteína, fibra, minerales como calcio y potasio, y vitamina C en hojas, además, se ha recomendado que las hojas de chaya sean cocidas preferentemente antes de su consumo, debido a su contenido de ácido cianhídrico (Valenzuela et al., 2015).

- **Usos**

Para Valenzuela et al. (2015) los principales usos de la chaya se encuentran su consumo como verdura y como agente medicinal para el tratamiento de la diabetes mellitus, la diabetes mellitus es una alteración del metabolismo de los carbohidratos caracterizada por niveles elevados de glucosa sanguínea o hiperglicemia.

Por otra parte, Aguilar et al. (2011) concuerda, que su uso más común es como verdura, forraje y medicina; siendo sus hojas la parte más aprovechada; sin embargo, no se tienen datos precisos de producción, debido a que es una especie de traspatio (solar), que se encuentra asociada con otras en sistemas agroforestales, raras veces produce semillas, por lo que es mejor propagar la planta por estacas herbáceas y semileñosas de 10 a 40 cm de longitud, las

cuales se cortan y entierran en la época seca del año, para evitar pudriciones por exceso de humedad.

Sánchez et al. (2015) señalan que a la chaya se le atribuyen innumerables propiedades que favorecen la cura o mejoría de enfermedades como son la perturbación en la presión arterial, circulación sanguínea, colesterol y ácido úrico altos, diabetes y cáncer, la planta motivó interés científico y existe una detallada compilación realizada por científicos, de diferentes especialidades, que ponen de manifiesto el potencial de la planta con fines antidietético y medicinal en la prevención, el tratamiento y el control de la diabetes y de las patologías que la acompañan.

En Reino Unido, se comprobó que el extracto acuoso, suministrado intraperitonealmente a ratas masculinas Wistar con diabetes dependiente de insulina, provocó cambios favorables en el peso corporal, glucosa en sangre y sueros lipídicos, propuesta por sus autores como planta eficaz para el tratamiento de esta enfermedad, del mismo modo se aisló del extracto ceroso de sus hojas triterpenoides, en Nigeria se determinaron constituyentes fitoquímicos en el extracto de las hojas y no encontraron efectos tóxicos sobre las células del hígado, en Cuba se considera, popularmente, como una planta medicinal (Sánchez et al., 2015).

2.3.2. BIOACTIVOS

Herrera et al. (2014) consideran componente o compuesto bioactivo de un alimento a aquel que aporta un beneficio para la salud más allá de las consideraciones propias de la nutrición básica, como por ejemplo mejoría de funciones fisiológicas o reducción de riesgo de padecer enfermedades, estos componentes se encuentran en general en pequeñas cantidades en los productos de origen vegetal, como es el caso de algunas vitaminas, minerales y otros compuestos no nutritivos presentes fundamentalmente en plantas (fitoquímicos).

Por otra parte, Morales et al. (2015) manifiestan que dentro de los compuestos

bioactivos o fitoquímicos beneficiosos para la salud humana se podrían destacar a las vitaminas C, E, K, vitaminas del grupo B, el ácido fólico; minerales, como el hierro, zinc, calcio, selenio; carotenoides (tanto los que poseen actividad provitamínica A como los que no la poseen); compuestos fenólicos, glucosinolatos y fitoesteroles, etc.

- **IMPORTANCIA DE LA PRESENCIA DE COMPUESTOS BIOACTIVOS EN LOS VEGETALES**

La calidad nutritiva de los productos vegetales depende de la cantidad y calidad de los macro y micronutrientes que proporcionan, además de la presencia de determinados compuestos bioactivos (compuestos con acción beneficiosa para la salud) que pueden tener un mecanismo de acción complementario y/o superpuesto. Por ello es conveniente incluir en nuestra dieta frutas y verduras lo más diversas posibles para poder obtener así todos los nutrientes y compuestos bioactivos necesarios para nuestro organismo, en cantidades suficientes (Morales et al., 2015).

- **CLASIFICACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS**

Collantes (2018) explica que existen una gran gama de alimentos funcionales que fueron investigados de acuerdo a sus propiedades dentro de ellas están las verduras en las que encontramos grandes cantidades de componentes bioactivos y que les caracterizan como alimentos funcionales, en el campo de la alimentación, un componente bioactivo especialmente en alimentos funcionales se definen a los compuestos químicos que ejercen un efecto benéfico, para alguna función de nuestro organismo, también nos ayuda a disminuir el riesgo de contraer otras enfermedades.

Los compuestos que tienen propiedades farmacológicas en el caso específico de los vegetales comestibles se los denominan fitoquímicos, divididos en grupos de acuerdo a las funciones de protección biológica que nos brindan o que ejercen características físicas y químicas, la cantidad de componentes bioactivos que encontramos en las verduras pueden ser causadas por diversos factores físicos

y químicos como: temperaturas elevadas, exposición a la luz, al oxígeno y a pH extremos (Collantes, 2018).

2.4. POLIFENOLES Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

2.4.1. POLIFENOLES

Los compuestos fenólicos son un amplio grupo de sustancias con diferentes estructuras químicas y actividad, son constituyentes importantes de las plantas y que a su vez otorga múltiples efectos benéficos. Están presentes generalmente en forma de glucósidos en los extractos de las frutas, hierbas, vegetales, cereales y otros materiales de plantas ricos en polifenoles lo que ha permitido su utilización por la industria alimentaria no solo por las características organolépticas que les confieren a las frutas y verduras, sino que retardan la oxidación de los lípidos y mejoran la calidad nutricional de los alimentos (Muñoz y Ramos, 2007).

Más de 8000 estructuras fenólicas se encuentran actualmente conocidas, y entre ellos se han identificado más de 4000 flavonoides (Tsao, 2010). Las propiedades antioxidantes de los compuestos fenólicos en los alimentos han despertado el interés desde el punto de vista productivo y medicinal porque intervienen como antioxidantes naturales significando una reducción en la utilización de aditivos obteniéndose alimentos más saludables con efectos benéficos para la salud, un antioxidante es una molécula capaz de retardar o prevenir el daño oxidativo de los lípidos, las proteínas y los ácidos nucleicos por especies reactivas del oxígeno, las cuales se generan por causas ambientales o por la ingesta de algún contaminante (Luque, 2016).

- **MÉTODO PARA DETERMINAR LA COMPOSICIÓN FENÓLICA TOTAL**

Los compuestos fenólicos son productos del metabolismo secundario de las plantas, los cuales están estrechamente relacionados con efectos benéficos en el organismo de quien los consume, además son responsables de otras propiedades en el producto, como el color y el sabor, la familia de polifenoles es

el grupo más extenso de sustancias no energéticas presentes en alimentos de origen vegetal como las nueces, bayas, uvas, vinos, granos de café, cacao, té (*Camellia sinensis*), entre otros, así, durante los últimos años, se ha puntualizado y evaluado los beneficios de ingerir bebidas a base de café y té gracias a la presencia de los fenoles y flavonoides (Olmos et al., 2019).

- **CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES-ENSAYO FOLIN-CIOCALTEU**

Gil (2012) describe el método Folin-Ciocalteu que consiste en: preparar una curva de calibración de ácido gálico cuyo rango de concentración sea de 0 a 16 ppm y una mezcla de agua bidestilada, con la muestra tratada con fluoruro de sodio para inhibir la degradación de los polifenoles, una solución de carbonato de sodio al 20% p/v y reactivo de Folin-Ciocalteu 2 M, la mezcla se incuba 120 minutos a temperatura ambiente y protegida de la luz, transcurrido el tiempo se registra la absorbancia a 765 nm en un espectrofotómetro; la oxidación de los polifenoles presentes en la muestra causa la coloración azulada que se cuantifica en base a la recta patrón de ácido gálico con el fin de expresar los resultados en términos de mg de ácido gálico Eq/100 g de muestra (mg EAG/100 g).

Ha llegado a ser uno de los métodos más empleados en alimentos que consiste en que los compuestos fenólicos de las muestras se oxidan por el reactivo Folin-Ciocalteu, el cual está formado por mezcla de ácido fosfotúngstico ($H_3HW_{12}O_{40}$) y ácido fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$) que se reduce, por acción de los fenoles, en una mezcla de óxidos azules de tungsteno (W_8O_{23}) y de molibdeno (Mo_8O_{23}). Los fenoles contenidos en la muestra se oxidan ocasionando la aparición de una coloración azul que presenta un máximo de absorción a 730 nm, y se cuantifica por espectrofotometría con base a una curva patrón de ácido gálico y se expresa en mg Eq de ácido gálico/100 g de muestra (Leyva, 2009).

2.4.2. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

Los antioxidantes son sustancias, que a bajas concentraciones reducen, retrasan o previenen la oxidación de un sustrato significativamente, prolongan la vida útil de los alimentos, protegiendo contra el deterioro causado por la

oxidación, inhiben la propagación de radicales libres por eso son utilizados para prevenir el deterioro de los alimentos, evitando la rancidez de las grasas y los cambios de color (Condezo, 2012).

Los antioxidantes son capaces de retardar o prevenir el daño oxidativo de los lípidos, las proteínas y los ácidos nucleicos por especies reactivas del oxígeno, las cuales se generan por causas ambientales o por la ingesta de algún contaminante (Santander et al., 2016).

Según Quiñones et al. (2013) la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos está basada en su capacidad para donar átomos de hidrógeno a radicales libres, muchos compuestos polifenólicos, particularmente flavonoides, exhiben un amplio rango de efectos biológicos, estudios verifican que algunos de esos compuestos son potentes asimiladores de radicales libres y como tales, útiles en la prevención de arterioesclerosis, cáncer, diabetes, enfermedades neurodegenerativas y artritis. El secuestro de radicales libres por polifenoles es un indicador importante para conocer las bondades de los antioxidantes (Ordoñez et al., 2018).

Para Cárdenas et al. (2016) los compuestos bioactivos pueden proteger contra las enfermedades a través de varios mecanismos, pero se cree que la actividad antioxidante es extremadamente importante para la protección contra las enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, la capacidad antioxidante de los alimentos está determinada por una mezcla de compuestos antioxidantes con diferentes mecanismos de acción como tal pueden unirse a polímeros biológicos, como enzimas, transportadores de hormonas, y ADN; quelar iones metálicos transitorios, tales como hierro, cobre, zinc; catalizar el transporte de electrones, y depurar radicales libres.

Debido a esto, se ha argumentado que la actividad antioxidante de los extractos no se puede validar razonablemente por un solo método debido a la naturaleza compleja de fitoquímicos y sus interacciones, de ahí la importancia de la utilización de múltiples sistemas de ensayo con diferentes índices (Moo et al., 2015).

- **MÉTODO ABTS PARA DETERMINAR CAPACIDAD ANTIOXIDANTE**

Como la actividad antioxidante es muy compleja, un solo método no es suficiente para tener una idea de la capacidad antioxidante de un producto, en este estudio, Folin-Ciocalteu (basado en la capacidad de reducción), ABTS (ácido 2,2'-azinobis- (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)), que es un ensayo de inhibición basado en la capacidad de los antioxidantes para abducir radicales libres ; FRAP (capacidad reductora férrica del plasma) y CUPRAC (capacidad antioxidante reductora cúprica), siendo ambas transferencia de electrones, se han seleccionado reacciones basadas en metales, que exhiben diferente reactividad hacia diferentes moléculas (Maieves et al., 2015).

Según Chuquimia et al. (2008) la metodología radical ABTS se obtiene tras la reacción de ABTS (7 mM) con persulfato potásico (2,42 mM, concentración final) incubados a temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$) y en la oscuridad durante 16 h. Este reactivo se mantiene estable por 2 a 3 días si se guarda en la oscuridad, una vez formado el radical ABTS se diluye con etanol hasta obtener un valor de absorbancia comprendido entre 0,70 ($\pm 0,02$) a 734 nm y 25 °C. La absorbancia se mide cada 30 s después de la adición de 1,0 mL de la solución ABTS a 100 μL de muestra, homogenizada durante 30 s en forma continua durante 6 minutos, la disminución de la coloración es expresada como el porcentaje desinhibición de ABTS, la cual es comparada con una curva estándar del antioxidante sintético de referencia, trolox (20-200 $\mu\text{mol/L}$), los resultados se expresan como μmol de trolox equivalente por gramo de muestra fresca.

Las ventajas de este método está que los valores de equivalentes de Trolox, de una amplia gama de alimentos están reportados, lo que permite establecer comparaciones; adicionalmente puede ser usado en un amplio rango de pH y fuerza iónica, además de que el ABTS es soluble tanto en medio acuoso como orgánico y permite la evaluación de antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos. También el ABTS no es un radical fisiológico, por ende, el punto final de medición de la reacción no se fija arbitrariamente y en función de la cinética de reacción de algunos antioxidantes como otros métodos (Londoño, 2012).

CAPÍTULO III. DESARROLLO METODOLÓGICO

3.1. UBICACIÓN

Esta investigación se llevó a cabo en los talleres de frutas y vegetales, así mismo, los análisis fisicoquímicos y microbiológicos, se realizaron en el laboratorio de bromatología de la Carrera de Agroindustria de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, ubicada en la provincia de Manabí, cantón Bolívar, ciudad de Calceta, sitio El Limón, con coordenadas geográficas de Latitud 49°35.25´S y Longitud de 80°11´10.54´W (Google Earth, 2021).

El contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante se realizó en los laboratorios de alimentos de la Facultad de Agronomía de la Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí, ubicado en la ciudad de Manta en el suroeste de la provincia de Manabí con coordenadas geográficas de Latitud 0°57'9.86" S y Longitud de 80°44'42.64" W (Google Earth, 2021).

3.2. DURACIÓN

La presente investigación tuvo una duración de 6 meses, desde noviembre del 2020 hasta mayo del 2021.

3.3. FACTORES EN ESTUDIO

- **Factor A:** Extractos acuosos (hierba luisa y chaya)
- **Factor B:** Porcentajes de kéfir de agua

3.4. NIVELES DEL FACTOR

Tabla 4
NIVELES DE LOS FACTORES

Factor A	Factor B
	b₁: 4%
a₁: Hierba luisa 5%	b₂: 5%
a₂: Chaya 5%	b₃: 6%

Fuente: Los autores

3.5. TRATAMIENTOS

Las combinaciones de los factores y niveles en estudio dan como resultado los tratamientos que se muestran en la tabla 5.

Tabla 5.

TRATAMIENTOS.

TRATAMIENTOS	DESCRIPCIÓN		
	Cód:	Extracto acuoso	% kéfir
T1	a ₁ b ₁	Hierba luisa	4
T2	a ₁ b ₂	Hierba luisa	5
T3	a ₁ b ₃	Hierba luisa	6
T4	a ₂ b ₁	Chaya	4
T5	a ₂ b ₂	Chaya	5
T6	a ₂ b ₃	Chaya	6

Fuente: Los autores

3.6. DISEÑO EXPERIMENTAL

En esta investigación se aplicó un diseño experimental completamente al azar (DCA) con dos factores A*B, con un total de seis tratamientos que se ajustan al siguiente modelo matemático:

$$y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + AB_{ij} + \varepsilon_{ijk} \quad [3.1]$$

Dónde:

- μ = Fuente de variación total.
- A_i = Fuente de variación del factor A
- B_j = Fuente de variación del factor B.
- AB_{ij} = Fuente de variación de la interacción.
- ε_{ijk} = Fuente de variación del error experimental.

Los datos serán sometidos previamente a análisis de normalidad y homogeneidad.

Tabla 6.

ESQUEMA DEL ANOVA

Fuente de variación	g libertad
Total	17
Factor A	1
Factor B	2
Interacción A*B	2
Error	12

Fuente: Los autores

3.7. UNIDAD EXPERIMENTAL

Cada unidad experimental consta de 1000 g de extracto acuoso de formulación, se efectuarán 6 tratamientos con 3 réplicas, totalizando 18 unidades experimentales (Tabla 7).

Tabla 7

COMPOSICIÓN DE LA UNIDAD EXPERIMENTAL.

Ingredientes	Tratamientos											
	T1		T2		T3		T4		T5		T6	
	%	g	%	g	%	g	%	g	%	g	%	g
Extracto acuoso de Hierba luisa	91	1000	90	1000	89	1000	—	—	—	—	—	—
Extracto acuoso de Chaya	—	—	—	—	—	—	91	1000	90	1000	89	1000
Kéfir	4	40	5	50	6	60	4	40	5	50	6	60
Azúcar	5	50	5	50	5	50	5	50	5	50	5	50
Total	100	1090	100	1100	100	1110	100	1090	100	1100	100	1110

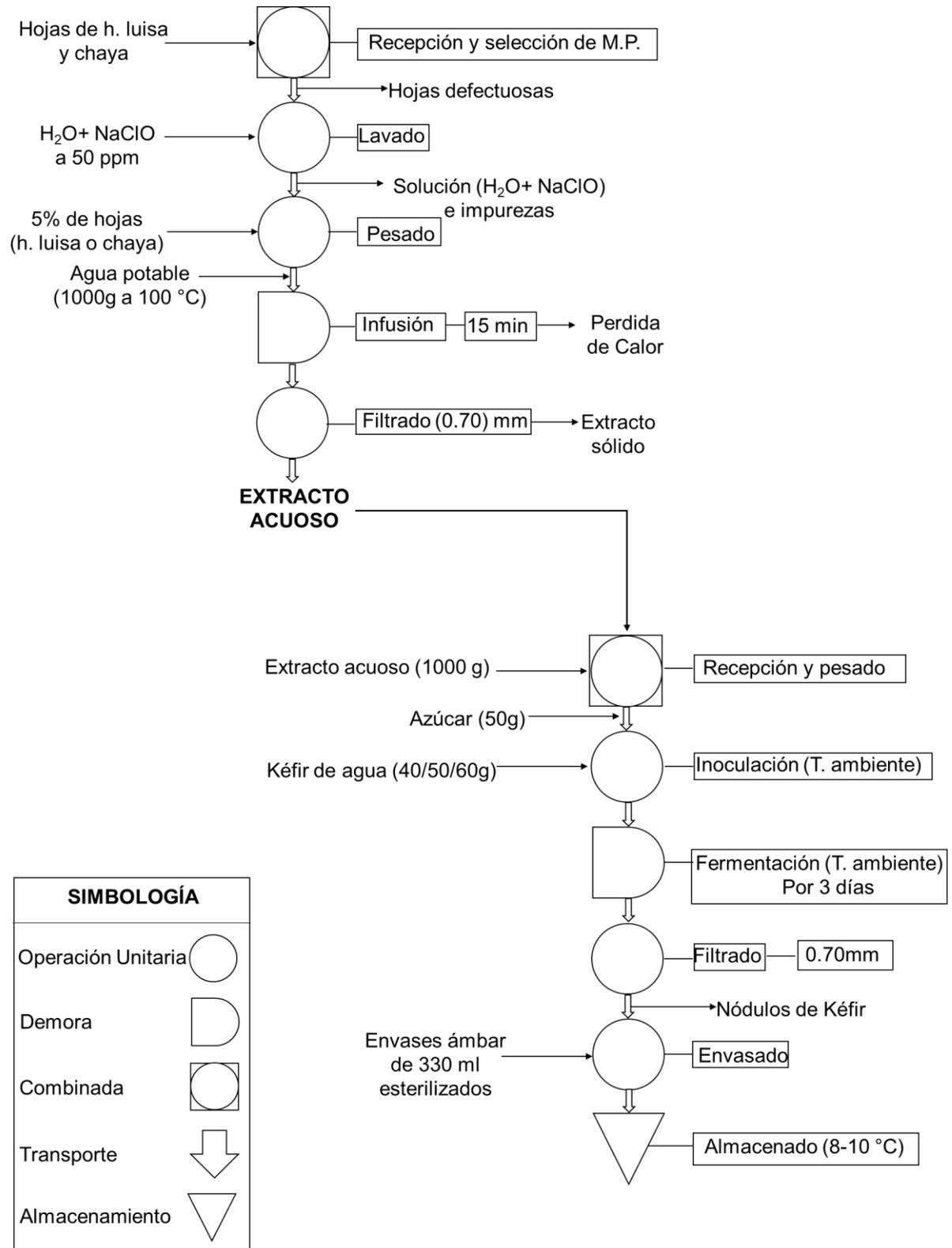
Fuente: Los autores

3.8. MANEJO DEL EXPERIMENTO

Se obtuvo el extracto acuoso, mediante la técnica de infusión siguiendo el diagrama de proceso que se muestra en la figura 2.

Figura 2

DIAGRAMA DEL PROCESO DE LA OBTENCIÓN DE EXTRACTO ACUOSO Y ELABORACIÓN DE LA BEBIDA BIOACTIVA.



Fuente: Los autores

PROCESO

Recepción y selección de la materia prima: Como materias primas se usaron hojas de hierba luisa y chaya, que posteriormente fueron seleccionadas, retirando las hojas que tengan algún defecto como lo indica la (Instituto Ecuatoriano de Normalización [INEN] 2017).

Infusión: En una olla de acero inoxidable de 20 cm 18/10 formada por una aleación de 18% de cromo y 10% de níquel, con una capacidad de 2 L, se colocó 50 g de hojas de hierba luisa o chaya previamente lavadas y pesadas en una balanza pesa gramera digital de 5 kg modelo KTS, luego se añadió 1000 g de agua a 100 °C y se lo deja en reposo por 15 minutos.

Filtrado: Esta operación se realizó en un tamiz ASTM N° 18 acero inoxidable 8"x2", malla acero inoxidable de 0,70 mm de diámetro con el fin de separar el extracto sólido, para así, obtener el extracto acuoso.

Para la elaboración de la bebida (Té), se llevó a cabo mediante el diagrama de proceso que se detalla en la figura 2.

Recepción y pesado de la M.P: El extracto acuoso que ingresó fue pesado (1000 g por tratamiento).

Inoculación: Previo a la inoculación se agregó 50 g de azúcar al extracto acuoso, que servirá como sustrato (alimento del kéfir), luego se inocula el kéfir de agua en los distintos porcentajes (4, 5 y 6%) a cada tratamiento a temperatura ambiente (25 °C).

Fermentación: Tuvo una duración de 3 días, este proceso se efectuó a temperatura ambiente (25 °C).

Filtrado: Una vez que se terminó la etapa de fermentación se procedió a filtrar la bebida bioactiva, para esta operación se utilizó un tamiz ASTM N° 18 acero inoxidable 8"x2", malla acero inoxidable de 0,70 mm, de tal manera que no quede presencia de nódulos de kéfir en el líquido.

Envasado: Obtenida la bebida se envasó en botellas de vidrio tipo ámbar de

(330 mL) previamente limpio y esterilizado. Las botellas se esterilizaron sumergiéndolas en agua con hipoclorito de sodio a 50 ppm, luego fueron sometidas a vapor de agua para eliminar restos de microorganismos y residuos de hipoclorito de sodio a temperaturas superiores de 100 °C durante 3 minutos y finalmente fueron selladas manualmente.

Almacenado: Una vez envasada la bebida bioactiva, se almacenó a una temperatura entre los 8 y 10 °C en una refrigeradora Indurama 14 pies RI-425 CR.

3.9. VARIABLES A MEDIR Y MÉTODO DE EVALUACIÓN

Los análisis fisicoquímicos se realizaron una vez obtenida la bebida bioactiva (cuarto día de su elaboración):

3.9.1. pH (INEN, 2002).

El valor de pH se obtuvo introduciendo en la bebida el electrodo de un potenciómetro Martini, modelo Mi 105.

3.9.2. ACIDEZ TITULABLE (INEN, 2002).

La determinación de la acidez titulable se desarrolló tomando 9 mL de la bebida, luego se adicionó 4 gotas de fenolftaleína, posteriormente se tituló con hidróxido de sodio (N= 0,1). Al ser el ácido láctico el predominante en la bebida con un Meqq de 0,09. Se aplicó la siguiente ecuación:

$$[1] \%Acidez = \frac{Cons\ de\ NaOH * M\ eqq * Conc\ (NaOH)}{Pmuestra} x 100$$

Donde:

Cons de NaOH = Gasto de bureta (se mide en mL).

M eqq = Normalidad del agente titulante.

Conc (NaOH) = u.m.a. del ácido de muestra

Pmuestra = Alícuota en mL de muestra (titulada)

3.9.3. GRADOS BRIX

Haciendo uso de un refractómetro digital marca BOECO, modelo 32195, se colocaron 3 gotas de muestras en la superficie del prisma, se debe esperar unos segundos hasta que el valor se estabilice para realizar la respectiva lectura.

Se determinó análisis de polifenoles totales de la bebida, según lo escrito por García et al. (2015) y capacidad antioxidante como lo indica Kukoski et al. (2005). Este análisis se realizará al octavo día de su elaboración.

3.9.4. DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES [mg DE ÁCIDO GÁLICO Eq/100 g (mg EAG/100 g)]

De la muestra de los compuestos polifenólicos se tomaron 3 mL y se coloca en matraces aforados de 25 mL.

- Se añade 15 mL de agua destilada y 1,25 mL de reactivo de FolinCiocalteu.
- Homogenizado el contenido de los matraces se dejaron reposar 8 minutos en oscuridad.
- Transcurrido este tiempo, se adicionaron a cada matraz 3,75 mL de la disolución de carbonato sódico al 7,5% y se lleva a un volumen de 25 mL con agua destilada.
- Se homogeniza los matraces y mantienen en oscuridad a temperatura ambiente durante 2 horas y se mide la absorbancia a 765 nm.

3.9.5. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE [mg TROLOX Eq/g MUESTRA (mg ET/100 g)]

- En una cubeta de poliestireno se adiciona 10 μ L de la solución concentrada de polifenoles y 990 μ L del radical ABTS.
- Se mantiene en ambiente oscuro y luego se registra su absorbancia a 734 nm (Espectrofotómetro UV/VIS Genesys10, USA).
- Se registra la capacidad antioxidante después de 8 minutos en la que se observa el valor de absorbancia constante.

- El porcentaje de inhibición del radical se calcula con la ecuación:

[2]

$$\%Inhibición\ ABTS = \frac{(Ac - Am)}{Ac} \times 100$$

Donde:

Ac: Absorbancia de control

Am: Absorbancia de muestra (8 min)

La actividad antioxidante se calcula en IC₅₀ que indica la concentración de muestra necesaria para inhibir el 50% del radical ABTS y se expresa en mg Trolox Eq/g muestra (mg ET/100 g).

3.9.6. ANÁLISIS SENSORIAL

Las formulaciones de los diferentes téis (hierba luisa y chaya) se analizaron mediante un análisis sensorial, aplicando un método efectivo con escala hedónica pictográfica con 5 puntos, donde: 5= me gusta mucho; 4= me gusta moderadamente; 3= no me gusta ni me disgusta; 2= me disgusta moderadamente; 1= me disgusta mucho. En dicho análisis se midieron como atributo el color, olor y sabor. La prueba se llevó a cabo con 80 jueces no entrenados. Estas formulaciones fueron presentados a los jueces en vasos desechables codificados con números aleatorios, se distribuyeron de manera aleatoria para disminuir el error sistemático y otros tipos de errores que pueden influir en la respuesta de los jurados. Entre las formulaciones, cada juez debía engerir agua purificada manca CIELO para enjuagar su paladar, con la finalidad de seleccionar la formación con mayor agrado Gaytán et al. (2019).

3.9.7. BACTERIAS PROBIÓTICAS UFC/g (INEN, 2011).

La viabilidad microbiana de la bebida se evaluó a los 8 días de su elaboración, siguiendo la metodología aplicada por Molero et al. (2017), para determinar que una bebida es probiótica debe tener mínimo 10⁶ UFC/g según lo indicado por la NTE INEN 2395 y CODEX STAN 243-2003:

3.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos fueron sometidos a prueba de normalidad (Test Shapiro Wilk) y prueba de homogeneidad de varianza y homocedasticidad (Test Levene). Los que cumplan con los supuestos de ANOVA, se analizarán con:

3. Análisis de varianza (ANOVA) para identificar los factores de estudio que influyan sobre las variables de respuestas.
4. Prueba de Tukey con un nivel de significancia de $\alpha < 5\%$, para encontrar diferencia significativa entre las medias.

En las variables que no cumplan con los supuestos de ANOVA, se aplicará la prueba de Kruskal Wallis.

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el software libre IBM SPSS Statistics Versión 25 (IBM, 2021).

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. CARACTERÍSTICAS FISCOQUÍMICAS DE LA BEBIDA A PARTIR DE BIOCOMPUESTOS DE HIERBA LUISA Y CHAYA

Con el propósito de comprobar la distribución de los datos obtenidos a raíz de la caracterización fisicoquímica de los tratamientos en estudio (anexo 4) se procedió a realizar los supuestos del ANOVA, normalidad y homogeneidad. Análisis estadístico que se presenta en la tabla 8, mismo que indicó que los datos para las variables °brix y pH no se distribuyeron de manera normal al presentar diferencias estadísticas significativas ($p. <0,05$), por lo tanto se procedió analizar estos datos mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis; por otra parte, la variable acidez titulable, la cual obtuvo una significancia mayor a 0,05 en la prueba estadística anterior, se le procedió a realizar el supuesto de homogeneidad, el cual indicó que no existen diferencias estadísticas ($p. <0,05$) entre las medias de esta variable por lo cual se procedió a realizar el análisis de varianza.

Tabla 8.

SUPUESTOS DE ANOVA PARA LAS VARIABLES °BRIX, PH Y ACIDEZ TITULABLE

VARIABLES FISCOQUÍMICAS	PRUEBA DE NORMALIDAD			PRUEBA DE HOMOGENEIDAD	
	Test de Shapiro - Wilk			Test de Levene	
	Estadístico	gl	Sig	Estadístico	Sig.
°brix (%)	0,851	18	0,003	5,048	-
pH	0,969	18	0,006	0,464	-
Acidez titulable (%)	0,831	18	0,319	0,686	0,464

Fuente: Los autores

En la tabla 9 se presentan los efectos principales del modelo estadístico en relación a la variable dependiente acidez titulable, donde se puede apreciar que existe diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$) para el factor A (extractos acuosos de Hierba luisa al 5% y Chaya 5%), lo que indica que los niveles de éste factor incidieron sobre la variable en estudio (acidez titulable), mientras que el

factor B (porcentajes de kéfir de agua 4, 5 y 6%), también presentó diferencias estadísticas significancias ($p < 0,05$), lo que muestra que los diferentes porcentajes de kéfir (4, 5 y 6%) influyeron de manera directa sobre esta variable. En cuanto a la interacción de ambos factores en relación a la acidez titulable, el análisis de varianza indicó que ambos inciden sobre sobre esta variable en la bebida ($p < 0,05$), tal y como lo muestra la tabla 9.

Tabla 9.

ANOVA PARA LA VARIABLE ACIDEZ TITULABLE DEL TÉ DE HIERBA LUISA Y CHAYA

Variable dependiente: Acidez titulable (% de ácido cítrico)					
Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	0,106 ^a	5	0,021	348,091	0,000
Intersección	1,954	1	1,954	31968,091	0,000
Factor_A:	0,076	1	0,076	1244,455	0,000
Factor_B	0,029	2	0,015	240,364	0,000
Factor_A * Factor_B	0,001	2	0,000	7,636	0,007
Error	0,001	12	6,111E-005		
Total	2,061	18			
Total corregida	0,107	17			

Nota: a. R cuadrado = 0,993 (R cuadrado corregida = 0,990)

Fuente: Los autores

En la figura 3 se puede apreciar las diferencias entre los niveles del factor A (extractos acuosos de hierba luisa y chaya al 5%), y como estos incidieron sobre la variable respuesta acidez titulable. Se comprobó que el extracto de chaya otorgó mayor acidez al té, en relación al de hierba luisa y esta diferencia se pudo deber a las características inherentes de los extractos, debido a que según Naula (2016) el extracto acuoso de hierba luisa y las infusiones de hojas de esta planta, presentan un sabor y aroma agradable, que se asocia a una baja astringencia en relación al extracto de chaya.

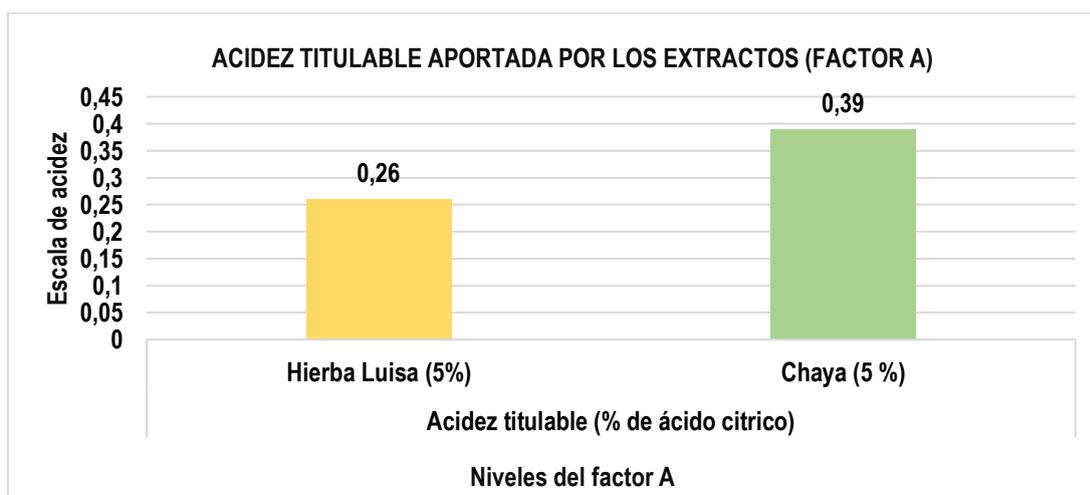
Por otra parte, el extracto de Chaya presentó una mayor acidez, lo cual, según Luna (2014) pudiera estar relacionado con la presencia de compuestos de

naturaleza fenólica, además de esto, se ha reportado un alto contenido de vitamina C (350 mg) en las hojas de esta planta, lo cual también pudo incidir sobre la acidez que éste extracto otorgó al té (Brush, 2006). De la misma manera Waizel y Waizel (2019) ratifican que estas diferencias de acidez establecidas por los extractos, se debió a la composición de los metabolitos presentes en cada uno de estos, debido a que en su *investigación “Las plantas con principios amargos y su uso medicinal”* mencionan que, de los dos tipos de metabolitos presentes en los extractos, los secundarios son los que otorgan estas características amargas y ácidas, indicando además, que estos principios tienen diversa naturaleza química de acuerdo con su estructura molecular, núcleo o función y algunos de estos son típicos de determinadas familias e incluso pueden variar de acuerdo con la especie, variedad y condición del hábitat en el que se encuentran.

En este sentido, los metabolitos secundarios presentes en el extracto de Chaya como los alcaloides, ácidos grasos, cumarinas, resinas, flavonoides, fenoles, quinonas, taninos etc, ejercieron un mayor efecto ácido y aunque algunos de estos compuestos también son parte de la Hierba Luisa, lo que determina las diferencias, es el porcentaje en el que se encuentran disponibles dichos compuestos.

Figura 3.

DIFERENCIAS DE LOS NIVELES DEL FACTOR A EN FUNCIÓN DE LA ACIDEZ APORTADA AL TÉ



Fuente: Los autores

Por otra parte, la prueba estadística de Tukey al 5% de error categorizó a los niveles del factor B (porcentajes de kéfir de agua 4, 5 y 6%), posicionando a la relación de 4% de kéfir con la menor media de acidez otorgada al té (0,2750 %), mientras que la de 6% proporcionó mayor acidificación (0,3717 %), teniendo así la mayor media, lo cual está relacionado a la naturaleza misma de este producto que se deriva de la fermentación y precisamente, esto alude López, et al. (2017), quien en su investigación relacionada a la fermentación del kéfir de agua, indica que de acuerdo a la composición de éste, llega a tener pH de hasta 4, lo cual se asocia a una alta acidez, con tendencia a seguir bajando, esto pudo incidir a que se presente una mayor astringencia en la bebida cuando se usó 6% de kéfir, tal y como se muestra en la tabla 10.

Tabla 10.

MEDIAS DE LOS NIVELES DEL FACTOR B EN FUNCIÓN DE LA ACIDEZ APORTADA AL TÉ

Acidez titulable (% de ácido cítrico)				
DHS de Tukey ^{a,b}				
Factor B	N	Subconjunto		
		1	2	3
4% de Kéfir	6	,2750		
5% de Kéfir	6		,3417	
6% de Kéfir	6			,3717
Sig.		1,000	1,000	1,000

Fuente: Los autores

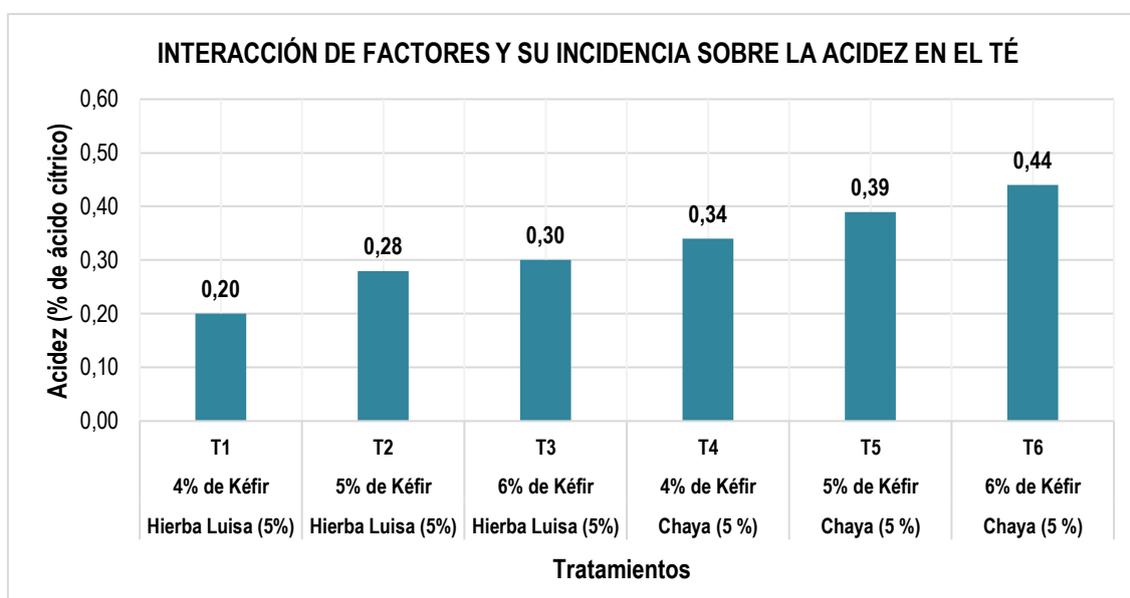
De acuerdo a Monar et al. (2014) en el kéfir de agua, conforme aumenta el tiempo de fermentación, de la misma forma aumenta la acidez y se reduce el pH, debido a que las bacterias presentes utilizan glucosa y fructosa como fuente de energía. En este sentido, el kéfir y los porcentajes adicionados al té, influyeron de manera significativa en las propiedades fisicoquímicas finales de la bebida (pH y acidez titulable), debido a que aun cuando se adicionaron los extractos, esta fermentación pudo continuar y ser más progresiva en mezcla con el extracto de chaya que con el de Hierba luisa, lo que indica los porcentajes de acidez más elevados en aquellos los tratamientos T4, T5 y T6 (tratamientos con chaya).

La fermentación lenta en los tratamientos que poseían Hierba luisa, se pudo deber a los diferentes metabolitos secundarios presentes en este extracto, que, aunque no ejercen un efecto ácido – amargo, si tiene efecto antimicrobiano debido a que, según Mendoza (2018) se han identificado principalmente diterpenos y triterpenos, lo que pudo incidir en los tratamientos que poseían Hierba luisa (T1, T2 y T3).

En la figura 4 se puede apreciar las medias del porcentaje de acidez de cada uno de los tratamientos resultantes de la combinación de los niveles de los factores A y B, donde el T6 (5% de Chaya + 6% de kéfir) presentó el mayor porcentaje de acidez titulable (0,44%), indicando que el nivel de 5% de Chaya (factor A) y 6% de kéfir (factor B) en combinación, son los que otorgaron los mayores promedios en relación esta variable en el té; sin embargo, en esta investigación se requiere un tratamiento con menor astringencia de modo que posiciona al T1 (5% Hierba luisa + 4% de kéfir) como el mejor tratamiento en esta característica fisicoquímica con el menor promedio de acidez, expresado como ácido cítrico.

Figura 4.

INTERACCIÓN DEL FACTOR A – B Y SU INCIDENCIA SOBRE LA VARIABLE ACIDEZ



Fuente: Los autores

4.2. PRUEBAS NO PARAMÉTRICAS PARA LAS VARIABLES °BRIX Y pH

La prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, en contraste con las variables °brix y pH en función de los niveles del factor A (extractos acuosos de Hierba luisa y Chaya al 5%), indicó un rechazo de la hipótesis de igualdad, revelando que los porcentajes de Hierba luisa y Chaya al 5% incidieron sobre estas características fisicoquímicas del té (Tabla 11).

Tabla 11.

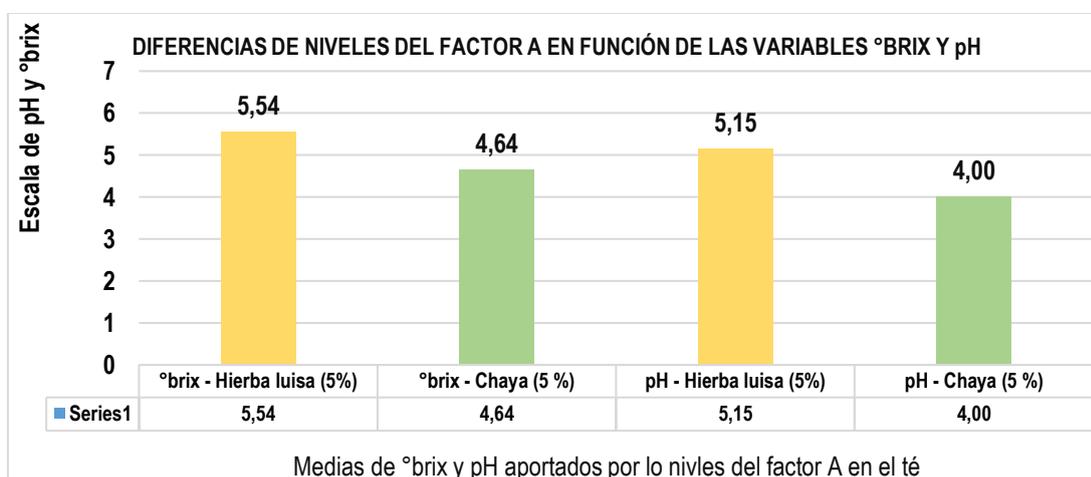
PRUEBA DE KRUSKAL-WALLIS PARA LA VARIABLE °BRIX Y PH EN FUNCIÓN DE LOS NIVELES DEL FACTOR A

Resumen de prueba de hipótesis				
	Hipótesis nula	Test	Sig.	Decisión
1	La distribución de Brix es la misma entre las categorías del factor_A.	Prueba Kruskal-Wallis de muestras independientes	,000	Rechazar la hipótesis nula.
2	La distribución de pH es la misma entre las categorías del factor_A.	Prueba Kruskal-Wallis de muestras independientes	,000	Rechazar la hipótesis nula.
Se muestran las significancias asintóticas. El nivel de significancia es ,05.				

Fuente: Los autores

En la figura 5 se presentan las medias de °brix y pH aportados por los extractos, donde en primera instancia se puede apreciar que el extracto de Hierba luisa (5%) otorgó las mayores ponderaciones de sólidos solubles (°brix) y de pH al té, mientras que el extracto de Chaya al 5% presentó las menores ponderaciones para estas variables, indicando que los tratamientos que poseían Chaya (T4, T5 y T6), presentaron mayor astringencia (Ver anexo 4)

Figura 5.

MEDIAS DE °BRIX Y pH APORTADOS POR CADA UNO DE LOS NIVELES DEL FACTOR A

Fuente: Los autores

Por otra parte, en la tabla 12 se presenta el contraste entre las variables °brix y pH con los niveles del factor B, donde se demostró que los porcentajes de kékfir al 4, 5 y 6% no incidieron sobre las medias de estas variables en estudio por lo que se retuvo la hipótesis de igualdad.

Tabla 12.

PRUEBA DE KRUSKAL-WALLIS PARA °BRIX Y PH EN FUNCIÓN DE LOS NIVELES DEL FACTOR B

Resumen de prueba de hipótesis				
	Hipótesis nula	Test	Sig.	Decisión
1	La distribución de Brix es la misma entre las categorías del factor_B.	Prueba Kruskal-Wallis de muestras independientes	0	Retener la hipótesis nula.
2	La distribución de pH es la misma entre las categorías de factor_B.	Prueba Kruskal-Wallis de muestras independientes	0	Retener la hipótesis nula.

Se muestran las significancias asintóticas. El nivel de significancia es ,05.

Fuente: Los autores

A pesar de lo antes expuesto, es importante mencionar que, el porcentaje de kékfir al 6% proporcionó las menores medias de pH al té (T6), conjetura que se hace a raíz de la naturaleza misma de este producto el que se deriva de la fermentación de acuerdo a López et al. (2017) quien además manifiesta que esta

característica tiende a bajar aún más.

Es importante mencionar, que esto no solo se debió al kéfir, sino también a los extractos utilizados, debido a que Mena et al. (2016), en su investigación sobre el estudio fitoquímico de extractos de hojas de chaya, reportó valores de pH por debajo de 6 (5,98), indicando que esta propiedad, podría ser incluso menor si consideran ciertas características de la planta como: procedencia, época de cosecha, edad de la planta etc. Esto además tiene sentido, considerando lo manifestado por Zambrano (2015), quien, en su investigación relacionada al estudio farmacognóstico de varios extractos, entre estos el de hierba luisa (Zambrano, 2015), reportó valores de pH de 6, indicando que este valor podría ser más elevado considerando varias condiciones como las mencionadas anteriormente para la chaya.

4.3. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE FENOLES TOTALES Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LA BEBIDA A PARTIR DE BIOCMPUESTOS DE HIERBA LUISA Y CHAYA

Con el propósito de comprobar la distribución normal de los datos obtenidos para los polifenoles totales y la actividad antioxidante de los tratamientos, se procedió a realizar los supuestos de ANOVA, normalidad y homogeneidad, mismo que se presenta en la tabla 11 donde se observó que las variables en estudio presentaron diferencias estadísticas significativas ($p.<0,05$) por lo que estos datos se analizaron mediante pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis.

Tabla 13.

SUPUESTO DEL ANOVA PARA POLIFENOLES TOTALES Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL TÉ

VARIABLES	PRUEBA DE NORMALIDAD		
	Test de Shapiro - Wilk		
	Estadístico	gl	Sig
(mg EAG/L)	0,275	54	0,000
(μ mol EQ Trolox/mL)	0,446	54	0,00

Fuente: Los autores

En la tabla 14 muestra el análisis de los datos de las variables polifenoles totales y actividad antioxidante mediante la prueba estadística no paramétrica de Kruskal-Wallis, la cual, mediante el resumen de hipótesis, indicó que existen diferencias significativas entre las medias de estas variables en los tratamientos.

Tabla 14.

PRUEBA DE KRUSKAL-WALLIS PARA LOS POLIFENOLES TOTALES Y LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.

Resumen de prueba de hipótesis				
	Hipótesis nula	Test	Sig.	Decisión
1	La distribución de polifenoles mg EAG/L es la misma entre las categorías de los tratamientos.	Prueba Kruskal-Wallis de muestras independientes	,000	Rechazar la hipótesis nula.
2	La distribución de actividad antioxidante (mg EAG/L) (μ mol EQ Trolox/mL) es la misma entre las categorías de los tratamientos.	Prueba Kruskal-Wallis de muestras independientes	,000	Rechazar la hipótesis nula.
Se muestran las significancias asintóticas. El nivel de significancia es ,05.				

Fuente: Los autores

En la tabla 15 se puede apreciar que, el extracto acuoso de Hierba luisa al 5% y kéfir al 6% proporcionaron la mayor media de polifenoles totales en el té, en comparación con el extracto acuoso de Chaya, siendo el tratamiento 3 quien presentó la mayor media respecto a esta variable.

Tabla 15.

SUBCONJUNTOS HOMOGÉNEOS BASADOS EN LAS MEDIAS DE POLIFENOLES TOTALES DE LOS TRATAMIENTOS

Subconjuntos homogéneos basados en las medias de polifenoles totales mg EAG/L							
Variable en estudio	Tratamientos	Subconjunto					
		1	2	3	4	5	6
Polifenoles totales (mg EAG/L)	T4: Chaya (5)% + Kéfir (4%)	134,92					
	T5: Chaya (5)% + Kéfir (5%)		141,18				
	T6: Chaya (5)% + Kéfir (6%)			151,37			
	T1: Hierba luisa (5)% + Kéfir (4%)				272,95		
	T2: Hierba luisa (5)% + Kéfir (5%)					285,67	
	T3: Hierba luisa (5)% + Kéfir (6%)						309,15
Probar estadística		,2	,2	,2	,2	,2	,2
Sig. (prueba de 2 caras)	
Sig. ajustada (prueba de 2 caras)	
Los subconjuntos homogéneos se basan en significancias asintóticas. El nivel de significancia es ,05.							
¹Cada casilla muestra el rango de media de muestras de (mg EAG/L).							

Fuente: Los autores

Jumbo y Guevara (2016), en su investigación relacionada a la capacidad antioxidante y compuestos biocativos en un filtrante de cinco hierbas, mencionaron que las plantas aromáticas poseen un alto contenido fenólico y precisamente estas características se le atribuyen a la Hierba luisa (Burbano, 2016); sin embargo, los fenoles totales del tratamiento 3, no solo se le pueden atribuir al extracto (Hierba luisa) sino también al kéfir, debido a que este producto procede de la fermentación de diferentes materias primas (frutas) con un alto contenido de fenoles, mismo que fueron atribuidos al té cuando fue adicionado, lo que ciertamente se comprueba, al ver que a mayor porcentaje de kéfir (6%), mayor es la cantidad de polifenoles totales (Monar et al., 2014).

Por otra parte, Feria (2011) en su investigación relacionada a la obtención de té de *Camellia sinensis*, encontró que, el contenido de polifenoles totales en muestras de té negro varió de entre 880,7 y 1822,5 mg EAG/L, mientras que en muestras de té verde esta propiedad fluctuó entre 947,6 y 1678 mg EAG/L. Aunque estos valores no concuerdan con los encontrados en esta investigación,

este mismo autor señaló que el nivel de polifenoles totales según el tipo de té es muy variable, además, la comparación con otros estudios no es suficiente para concluir que cierto tipo de té en general es alto o bajo en contenido de polifenoles debido a que, hay que considerar la naturaleza de las plantas utilizadas y la época del año en que son cosechadas porque esto determina en gran medida, el contenido de estos compuestos.

Por otra parte, en la tabla 16 se presentan las medias de los tratamientos en función de la actividad antioxidante donde el T6 (5% de chay + 6% de kéfir) se posicionó como el tratamiento con la mayor media para esta variable. La tabla también muestra que el extracto de Hierba luisa no presenta una actividad antioxidante elevada, debido a que la diferencia entre los tratamientos que poseen Chaya (T4, T5 y T6), no son significativas. Esto ciertamente concuerda con lo manifestado por Brush, (2006) quien dice que la Chaya posee un alto contenido de vitaminas, especialmente A y C, lo que incrementa su valor como poderoso antioxidante natural.

Tabla 16.

SUBCONJUNTOS BASADOS EN LAS MEDIAS DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN LOS TRATAMIENTOS

Subconjuntos homogéneos basados en la actividad antioxidante ($\mu\text{mol EQ Trolox/mL}$)				
Variable en estudio	Tratamientos	Subconjunto		
		1	2	3
Actividad antioxidante ($\mu\text{mol EQ Trolox/mL}$)	T1: Hierba luisa (5)% + Kéfir (4%)	13,14		
	T2: Hierba luisa (5)% + Kéfir (5%)	14,21		
	T3: Hierba luisa (5)% + Kéfir (6%)	13,94		
	T4: Chaya (5)% + Kéfir (4%)		39,22	
	T5: Chaya (5)% + Kéfir (5%)		41	
	T6: Chaya (5)% + Kéfir (6%)			44,53
	Probar estadística	1,176	1,423	. ²
	Sig. (prueba de 2 caras)	0,555	0,233	.
	Sig. ajustada (prueba de 2 caras)	0,802	0,549	.
Los subconjuntos homogéneos se basan en significancias asintóticas. El nivel de significancia es 0,05.				
¹ Cada casilla muestra el rango de media de muestras de la actividad antioxidante ($\mu\text{mol EQ Trolox/mL}$).				

Fuente: Los autores

4.4. CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DE LA BEBIDA A PARTIR DE BIOCMPUESTOS DE HIERBA LUISA Y CHAYA

Los datos obtenidos de la evaluación sensorial mediante una prueba afectiva por preferencias, evaluado los atributos, color, olor y sabor, fueron analizados mediante la prueba no paramétrica de Friedman (tabla 17), análisis estadístico indicó que todas las distribuciones de los factores en estudio son las mismas, es decir, los catadores no demostraron preferencia por alguno de los tratamientos. Por lo cual, se retiene la hipótesis de igualdad y se afirma que los factores en estudio relacionados a los extractos acuosos de Hierba luisa y Chaya más los porcentajes de Kéfir, no influyeron en las características organolépticas de la bebida.

Tabla 17.

PRUEBA DE FRIEDMAN PARA LOS DATOS DE LA PERCEPCIÓN SENSORIAL DE LA BEBIDA.

Resumen de prueba de hipótesis				
	Hipótesis nula	Test	Sig.	Decisión
1	La distribución de Color, Olor and Sabor son las mismas	Análisis de dos vías de Friedman de varianza por rangos de muestras relacionadas	,277	Retener la hipótesis nula.

Se muestran las significancias asintóticas. El nivel de significancia es 0,05

Fuente: Los autores

4.5. DETERMINACIÓN DE LA CARGA PROBIÓTICA TOTAL

En esta investigación se estableció al T3 (5% de Hierba luisa + 6% de kéfir) como el mejor tratamiento, de acuerdo a las características fisicoquímicas de: pH (5), acidez titulable (0,3%), °brix (5,5) y cantidad de fenoles totales (309,15 mg EAG/L). Este tratamiento fue elegido por la baja astringencia que presentó de acuerdo a las características de la bebida (té); sin embargo, el contenido de polifenoles totales permitió posicionarlo como el mejor. La actividad antioxidante no se consideró debido a que las mayores ponderaciones para esta variable, se

dieron para los tratamientos con mayor astringencia ($>$ acidez titulable y $<$ pH), y por los bajos sólidos solubles.

En este sentido, a este tratamiento se le determinó la carga microbiana probiótica total, dando como resultado un recuento de $1,7 \times 10^9$ UFC/mL (ver anexo 7). Es importante recalcar, que esta microbiota fue otorgada en gran parte por el kéfir, en específico, por la concentración de 6%, debido a que en investigaciones aisladas sobre este producto se pudo determinar carga probiótica como bacterias acidolácticas y levaduras (Monar et al., 2014). Estos mismos autores, en su investigación sobre kéfir, indicaron que la cantidad mínima establecida para considerar una bebida probiótica es de 10^6 UFC/mL. De igual forma Bolaños (2014) en su investigación de similares índoles, menciona exactamente lo mismo (10^6 UFC/mL), incluso, se respalda en la norma INEN 2395-2011, en la cual se indica que para considerar que una bebida sea probiótica, debe de tener un mínimo de 10^6 UFC/g. En este sentido y de acuerdo a los resultados obtenidos para el tratamiento 3 ($1,7 \times 10^9$ UFC/mL), se puede decir que es una bebida probiótica.

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

- El extracto acuoso de Chaya al 5% otorgó una mayor astringencia al té, mientras que el extracto de hierba luisa al mismo porcentaje (5%) proporcionó mayores sólidos solubles al té haciéndolo más agradable al gusto.
- A los ocho días de almacenamiento del té, se determinó que el extracto de Hierba luisa al 5% en combinación con kéfir al 6% otorgaron el mayor contenido de polifenoles totales (T3), mientras que la Chaya al 5% y Kéfir 6% presentaron la mayor actividad antioxidante (T6).
- En la percepción sensorial de los tratamientos en estudio, mediante pruebas afectivas por preferencias y análisis estadístico no paramétrico de Friedman se determinó que los catadores no demostraron preferencia alguna por los tratamientos.
- El tratamiento 3 se posicionó como el mejor en relación a sus características fisicoquímicas, por lo cual se le determinó la carga probiótica total con un contenido de $1,7 \times 10^9$ UFC/mL estando dentro de los rangos establecidos para considerar una bebida como tal.

5.2. RECOMENDACIONES

- Utilizar extracto acuoso de chaya y hierba luisa a diferentes concentraciones en investigaciones de similares índoles, con la intención de encontrar mejores características fisicoquímicas en el producto final.
- El extracto de chaya y hierbaluisa presentó una alta actividad antioxidante y un alto contenido de polifenoles totales, su uso en bebidas funcionales tendría un gran impacto.

- Es importante controlar la fermentación del kéfir antes de adicionarlo en una bebida con la intención de evitar contaminación cruzada.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, J. Macario, P. Huerta, E. Hernández, S. de Alba, R. y García, E. (2011). Crecimiento y productividad de chaya (*Cnidoscolus chayamansa* mcvaugh, euphobiaceae) con densidad de plantación variable. *Cultivos tropicales*, 31(4), 1-11. <http://scielo.sld.cu/pdf/ctr/v31n4/ctr02410.pdf>
- Bolaños, V. (2014). *Elaboración de dos bebidas, fermentadas con gránulos de kéfir en agua y leche, para corroborar si son bebidas probióticas según la norma INEN 2395- 2011* [Tesis de grado, Universidad de Guayaquil]. <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/7976>
- Brush, C. (2006). Pregrado. *Estudio del procesamiento tecnológico para la elaboración de un té a partir de la cnidoscolus aconitifolius (chaya)*. Universidad de Guayaquil, Guayaquil, Ecuador.
- Burbano, V. y Garrido, P. (2016). *Aceite esencial de la hierba luisa al 100% y su efectividad de inhibición en bloques de resina acrílica contaminados con *Cándida albicans*; estudio in vitro*. [Tesis de grado, Universidad Central del Ecuador]. <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/7804>
- Campo Fernández, M. Cruz Alvia, C. Cunalata Cueva, G. y Matute Castro, N. (2020). Infusiones de *Moringa oleífera* (moringa) combinada con *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) y *Lippia alba* (mastrato). *Revista Científica UNEMI*, 13(34), 114-126. <https://doi.org/10.29076/issn.2528-7737vol13iss34.2020pp114-126p>
- Cárdenas, G. Arrazola, G. y Villalba, M. (2016). Frutas tropicales: fuente de compuestos bioactivos naturales en la industria de alimentos. *Revista de la Facultad de Ingeniería*, 17(33), 29-40. <https://doi.org/10.21500/01247492.2152>
- Castillo, R. Soberanis, V. Rodríguez, J. y Serralta L. (2012). Cultivo de chaya (*Cnidoscolus chayamansa*) en traspatio. [Tesis de grado, Universidad de Quintana Roo]. <http://192.100.164.54/S/SB300.B67.2012-%2064979.pdf>
- Cerritos. O. y Villacorta, J. (2017). *Elaboración de un snack a base de harina de Sorgo (*Sorghum bicolor*) fortificado con chaya (*Cnidoscolus aconitifolius chayamansa*) como alternativa nutritiva en la agroindustria de El Salvador*. [Tesis de grado, Universidad Dr. Matías Delgado]. <http://hdl.handle.net/10972/3699>
- Chuquimia, F. Alvarado, J. Peñarrieta, J. Bergenstahl, B. y Kesson, B. (2008). Determinación de la capacidad antioxidante y la cuantificación de compuestos fenólicos y flavonoidicos de cuatro especies vegetales de la Región andina de Bolivia. *Revista Boliviana de Química*, 25(1), 75-83.

<http://www.scielo.org.bo/pdf/rbq/v25n1/v25n1a13.pdf>

- Collantes, A. (2018). Compuestos bioactivos en alimentos fermentados a partir de sustratos naturales. [Tesis de grado, Universidad Nacional de la Amazonia Peruana]. <http://repositorio.unapiquitos.edu.pe/handle/20.500.12737/5869>
- Condezo, O. (2012). Polifenoles totales, antocianinas y capacidad antioxidante (DPPH y Peroxilo) en granos de cacao (*Theobroma cacao*) Comercial de Tingo María y Tocache. [Tesis pregrado, Universidad Nacional Agraria de la Selva]. <http://repositorio.unas.edu.pe/handle/UNAS/276>
- Córdova, K. Navia, T. y Villón, D. (2010). Proyecto de elaboración y comercialización artesanal de cocteles sin alcohol a base de frutas tropicales en san marino shopping center. [Tesis de grado, Escuela Superior Politécnica del Litoral]. <http://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/10682>
- De Oliveira, R. Pereira, M. Oliveira, S. Schneedorf, J. Silva, N. y Fiorini, J. (2020). Perfil microbiano de preparaciones de una muestra de kéfir - granos in natura y suspensión liofilizada y fermentada. *Revista Ciencia y Tecnología de los Alimentos*, 30(4), 1022-1026.
- Feria, F. (2011). Pregrado. *Caracterización de la composición fenólica y capacidad antioxidante del té (Camellia sinensis) en productos de diferentes marcas comercializadas en Chile*. Universidad de Chile facultad de ciencias agronómicas, Santiago.
- Feria, F. (2011). Pregrado. *Caracterización de la composición fenólica y capacidad antioxidante del té (Camellia sinensis) en productos de diferentes marcas comercializadas en Chile*. universidad de Chile facultad de ciencias agronómicas, Santiago.
- Fernández, F. (2018). Formulación de una bebida funcional a base de *Beta vulgaris L.* y *Equisetum arvense L.* para su evaluación de la capacidad antioxidante y polifenoles totales. [Tesis de doctorado, Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrión]. <http://repositorio.unjfsc.edu.pe/>
- Flores, E. y Flores, E. (2018). Estabilidad de antocianinas, fenoles totales y capacidad antioxidante de bebidas de maíz morado (*Zea mays L.*) y uña de gato (*Uncaria tomentosa sp.*). *Revista Información Tecnológica*, 29(2) 175-184. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642018000200175>
- García, E. Fernández, I. y Fuentes, A. (2015). *Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu*. Obtenido de: Riunet.upv.es. <https://riunet.upv.es/handle/10251/52056>
- Gaytán, J. Solín, L. López, L. Cobos, L. Silva, S. (2019). Desarrollo y Evaluación

Sensorial De Un Postre de Gelatina Funcional Del Fruto Rojo de *Stenocereus queretaroensis* (F.A.C. Weber) Buxbaum. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 4(82), 576-580. <http://www.fcb.uanl.mx/IDCyTA/files/volume4/4/6/82.pdf>

Gil, J. (2012). Estabilidad y actividad antioxidante de catequinas presentes en cacao colombiano durante los procesos de pre industrialización. [Tesis pregrado, Universidad de Antioquia] <http://hdl.handle.net/10495/1621>

Herrera, F. Betancur, D. Segura, M. (2014). Compuestos bioactivos de la dieta con potencial en la prevención de patologías relacionadas con sobrepeso y obesidad; péptidos biológicamente activos. *Revistas Nutrición Hospitalaria*, 29(1), 10-20. <https://dx.doi.org/10.3305/nh.2014.29.1.6990>

IBM. (2021). IBM SPSS software. Obtenido de: <https://www.ibm.com/analytics/spss-statistics-software>

Instituto Ecuatoriano de Normalización. (2002). Bebidas alcohólicas. Cerveza. Determinación de pH. (2325). <https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/2325.pdf>

Instituto Ecuatoriano de Normalización. (2002). Bebidas alcohólicas. Cerveza. Determinación de la acidez total. (2323). <https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/2323.pdf>

Instituto Ecuatoriano de Normalización. (2011). Leches fermentadas. (2395) <https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/n-te-inen-2395-2r.pdf>

Instituto Ecuatoriano de Normalización. (2017). Hierbas aromáticas. (2392) https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/n-te_inen_2392-2.pdf

Jumbo, N., & Guevara, A. (2016). Capacidad antioxidante y compuestos bioactivos de un filtrante de cinco hierbas aromáticas y esteviosido (*Stevia rebaudina* B). *Revista de Ciencias de la Vida*, 1 - 23. Obtenido de DOI: <http://dx.doi.org/10.17163/lgr.n24.2016.07>

Jumbo, N., & Guevara, A. (2016). Capacidad antioxidante y compuestos bioactivos de un filtrante de cinco hierbas aromáticas y esteviosido (*Stevia rebaudina* B). *Revista de Ciencias de la Vida*, 1 - 23. Obtenido de DOI: <http://dx.doi.org/10.17163/lgr.n24.2016.07>

Kuskoski, E. Asuero, A. Troncoso, A. Mancini, J. y Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Food Science and Technology*, 25(4), 726-732. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612005000400016>

- Leyva, D. (2009). Determinación de antocianinas, fenoles totales y actividad antioxidante en licores y fruto de mora. [Tesis de pregrado, Universidad Tecnológica de la Mixteca] http://jupiter.utm.mx/~tesis_dig/10876.pdf
- Llerena, T. Hen, A. y Mondaca, L. (2017). Caracterización de una infusión de cascarilla de cacao (*Theobroma cacao* L., Var. Arriba) con hierbas aromáticas. *Revista Agrosur*, 43(3), 47-55. <https://doi.org/10.4206/agrosur.2017.v45n3-07>
- Londoño, J. (2012). Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad. Obtenido de: <http://hdl.handle.net/10567/133>
- López, J., García, S., Hernández, H., & Cornejo, M. (2017). Estudio de la fermentación de kéfir de agua de piña con tibicos. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 405-414. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/>
- López, J., García, S., Hernández, H., & Cornejo, M. (2017). Estudio de la fermentación de kéfir de agua de piña con tibicos. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 405-414. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/620/62052087007.pdf>
- López, R. (2016). Compuestos bioactivos en bebidas con capacidad antioxidante. [Tesis doctoral, Universidad Complutense Madrid]. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=126683>
- Luna, V. (2014). Pregrado. *Evaluación de la actividad antioxidante e hipoglucemiante de un jarabe de extracto acuoso de hojas de chaya (cnidoscolus aconitifolius) libre de glucósidos cianogénicos*. Universidad técnica de Machala, Machala, Ecuador.
- Luque, C. (2016). Determinación de polifenoles totales y aceptabilidad sensorial de una infusión a base de muña (*Cinhostachys mollis (kunth) griseb.*), cola de caballo (*Equisetum arvense*), hierba luisa (*Cymbopogon citratus*) y saborizada con maracuyá (*Passiflora edulis*) [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann-Tacna]. <http://repositorio.unjbg.edu.pe/handle/UNJBG/1881>
- Maieves, H. López, R. Morales, P. Pérez, M. Ribani, R. Cámara, M. y Sánchez, M. (2015). Antioxidant phytochemicals of *Hovenia dulcis* Thunb. peduncles in different maturity stages. *Journal of functional foods*, 18, 1117-1124. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.044>
- Mao, J. Aguilar, L. Macario, P. Huerta, E. Hernández, S. de Alba. R. y García, E. (2011). Crecimiento y productividad de chaya (*Cnidoscolus chayamansa*)

mcvaugh, euphorbiaceae) con densidad de plantación variable. *Revista Cultivos Tropicales*, 32(1), 42-48.
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193222352005>

- Marcillo, E. y Naranjo, D. (2015). Diseño de la línea de producción de una bebida de hierbas denominada horchata. [Tesis de grado, Escuela Superior del Litoral] <http://www.dspace.espol.edu.ec/xmlui/handle/123456789/31171>
- Mena, Y., Gonzáles, D., Valido, A., Pizarro, A., Castillo, O., & Escobar, R. (2016). Estudio fitoquímico de extractos de hojas de *Cnidocolus chayamansa* Mc Vaugh (Chaya). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 21(4), 1 -13.
- Mendoza, A. (2018). Magister. *Evaluación de la actividad antimicrobiana de cymbopogon citratus frente a cepas de staphylococcus aureus y escherichia coli*. Facultad de ciencias médicas, Ambato, Ecuador.
- Miranda, V. y Vilca, K. (2018). Determinación de los parámetros óptimos para la elaboración de una bebida funcional de cebada (*Hordeum vulgare*), hierba luisa (*Cymbopogon citratus*) y cola de caballo (*Equisetum arvense*), con adición de mucílago de semilla de lino (*Linum usitatissimum*) y su evaluación reológica. [Tesis de grado, Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa] <http://repositorio.unsa.edu.pe/handle/UNSA/9698>
- Molero, M. Aiello, C. Araujo, J. y Briñez, W. (2017). Calidad físico-química, microbiológica y vida útil de bebidas probióticas fermentadas a base de lactosuero. *Revista Científica*, 17(5), 265-269.
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=95953315002>
- Monar, M. y Dávalos, I. (2013). Caracterización microbiológica del kéfir de agua artesanal de origen ecuatoriano.
<http://repositorio.usfq.edu.ec/handle/23000/2582>
- Monar, M., Dávalos, I., Zapata, S., Caviedes, M., & Ramírez, L. (2014). Caracterización química y microbiológica del kéfir de agua artesanal de origen ecuatoriano. *Revista Avances en Ciencias e Ingenierías*, 6(1), 60 - 66.
- Morales, P. Sánchez, M. y Cámara, M. (2015). *Importancia de la presencia de compuestos bioactivos en los vegetales*. Obtenido de:
<https://www.interempresas.net/>
- Muñoz, A. y Ramos, F. (2007). Componentes fenólicos de la dieta y sus propiedades biomedicinales. *Revista Horizonte Médico*, 7(1), 23-31.
<https://www.horizontemedico.usmp.edu.pe/index.php/horizontemed/article/view/208>
- Nabor, A. (Enero de 2020). *Qué es té limón y sus beneficios*. *El universal*.

- Recuperado el 10 de noviembre del 2020 de: <https://www.eluniversal.com>.
- Nabor, A. (Febrero de 2020). *Qué es la chaya y sus beneficios. El universal*. Recuperado el 10 de noviembre del 2020 de: <https://www.eluniversal.com>.
- Naula, M. (2016). Pregrado. *Aplicación de la técnica de deshidratación en hierbas, flores y frutas, para la elaboración de blends con té negro, té verde y té blanco*. Universidad de Cuenca, Cuenca, Ecuador.
- Olmos, M. Ozuna, C. Rodríguez, G. y Cerón, A. (2019). Estimación de compuestos bioactivos en bebidas a base de café soluble y té. *Revista Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 4, 782-790. <http://www.fcb.uanl.mx/IDCyTA/files/volume4/4/9/110.pdf>
- Ordoñez, E. Reátegui, D. y Villanueva, J. (2018). Polifenoles totales y capacidad antioxidante en cáscara y hojas de doce cítricos. *Revista Ciencia Agropecuaria*, 9(1), 113-121. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2018.01.13>
- Paredes, D. Buenaño, M. y Mancera, N. (2015). Usos de plantas medicinales en la comunidad San Jacinto del cantón Ventanas, Los Ríos-Ecuador. *Revista U.D.C.A Actualidad y Divulgación Científica*, 18(1), 39-50. <https://doi.org/10.31910/rudca.v18.n1.2015.452>
- Pauca, C. (2016). Caracterización de una bebida y biomasa para alimentación animal mediante fermentación sumergida con microorganismos tibetanos. [Tesis de grado, Escuela Superior Politécnica del Chimborazo] <http://dspace.espech.edu.ec/handle/123456789/6295>
- Quiñones, J. Trujillo, R. Capdesuñer, Y. Quirós, Y. y Hernández, M. (2013). Potencial de actividad antioxidante de extractos fenólicos de *Theobroma cacao*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 18(2), 201-215. <http://scielo.sld.cu/pdf/pla/v18n2/pla04213.pdf>
- Rivera, J. Muñoz, O. Rosas, M. Aguilar, C. Popkin, B. y Willett, W. (2008). Consumo de bebidas para una vida saludable: recomendaciones para la población mexicana. *Revista Bol Med Hosp Infant Mex*, 65(5), 208–237. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342008000200011
- Salamanca, G. Osorio, M. y Montoya, L. (2010). Elaboración de una bebida funcional de alto valor biológico a base de borojó (*Boroja patinoi cuatrec*). *Revista Chilena de Nutrición*, 37(1), 87-96. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182010000100009>.

- Sánchez, A. Quiñones, M. Piñol, B. y Fernández, B. (2015). Primer informe de Typhlocybae como vectores potenciales de fitoplasmas en *Cnidocolus chayamansa* (Miller) I.M. Johnst. (chaya) en Cuba. *Rev. Protección Veg*, 30(2), 148-157. <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v30n2/rpv09215.pdf>
- Santander, M. Osorio, O. y Mejía, D. (2016). Evaluación de propiedades antioxidantes y fisicoquímicas de una bebida mixta durante almacenamiento refrigerado. *Revista Ciencias Agrarias*, 34(1), 84-97. <http://dx.doi.org/10.22267/rcia.173401.65>
- Teixeira, K. de Melo, G. Campos, C. Dragone, G. y Freitas, R. (2011). Brazilian kéfir: structure, microbial communities and chemical composition. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42(2), 693-702. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822011000200034>
- Torre, L. Navarrete, H. Muriel, P. Macía, M. y Balslev, B. (2008). *Enciclopedia de las plantas útiles en el Ecuador*. Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador
- Trávez, M. (2015). *Estudio del efecto fermentativo del hongo kéfir y la levadura (Saccharomyces cerevisiae) en tres variedades de banano (Cavendish), (Valéry), (Williams) para la elaboración de una bebida alcohólica en un centro de acopio de la ciudad de Latacunga en el período 2013*. [Tesis de grado, Universidad Técnica de Cotopaxi]. <http://repositorio.utc.edu.ec/handle/27000/2637>
- Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2(12), 1231- 1246. <https://doi.org/10.3390/nu2121231>
- Valenzuela, R. Morales, M. Verde, M. Oranday, A. Preciado, P. González, A. y Esparza, J. (2015). *Cnidocolus chayamansa* hidropónica orgánica y su capacidad hipoglucemiante, calidad nutraceutica y toxicidad. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 6(4), 815-825. <https://doi.org/10.29312/remexca.v6i4.621>
- Waizel, J., & Waizel, S. (2019). Las plantas con principios amargos y su uso medicinal. ¿Un futuro dulce? *Revisión sistemática*, 64(4), 202 - 228.

ANEXOS

Anexo 1. M.P. Hoja de chaya



Anexo 2. M.P. Hoja hierba luisa



Anexo 3. Nódulos de kéfir



Anexo 4. Análisis fisicoquímicos de los tratamientos

Tratamientos	ANÁLISIS fisicoquímicos		
	pH	acidez titulable (% de ácido cítrico)	°Brix
T1R1	5,35	0,21	5,74
T1R2	5,36	0,20	5,72
T1R3	5,37	0,20	5,73
T2R1	5,12	0,28	5,4
T2R2	5,10	0,29	5,41
T2R3	5,11	0,29	5,4
T3R1	5	0,3	5,51
T3R2	4,99	0,31	5,5
T3R3	5,01	0,3	5,5
T4R1	4,20	0,35	4,8
T4R2	4,20	0,35	4,6
T4R3	4,22	0,34	4,8
T5R1	4	0,39	4,6
T5R2	4	0,39	4,7
T5R3	3,99	0,41	4,6
T6R1	3,79	0,45	4,5
T6R2	3,8	0,43	4,6
T6R3	3,81	0,44	4,6

Anexo 5. Análisis de polifenoles totales

Análisis efectuado al octavo día de almacenamiento			
Resultados de Polifenoles TOTALES (mg EAG/L)			
TRATAMIENTOS	R1	R3	R4
T1: Hierba luisa (5%) + Kéfir (4%)	272,03	276,81	270,03
T2: Hierba luisa (5%) + Kéfir (5%)	287,50	280,33	289,19
T3: Hierba luisa (5%) + Kéfir (6%)	301,55	291,80	334,11
T4: Chaya (5%) + Kéfir (4%)	139,67	130,11	135,00
T5: Chaya (5%)+ Kéfir (5%)	139,18	144,35	140,01
T6: Chaya (5%)+ Kéfir (6%)	147,83	149,20	157,09

Anexo 6. Análisis de actividad antioxidante

Análisis efectuado al octavo día de almacenamiento			
Resultados de Capacidad Antioxidante ABTS ($\mu\text{mol EQ Trolox/mL}$)			
TRATAMIENTOS	R1	R2	R33
T1: Hierba luisa (5)% + Kéfir (4%)	13,44	11,97	14,02
T2: Hierba luisa (5)% + Kéfir (5%)	13,11	12,48	17,05
T3: Hierba luisa (5)% + Kéfir (6%)	13,88	13,99	13,97
T4: Chaya (5)% + Kéfir (4%)	40,11	42,37	35,18
T5: Chaya (5)% + Kéfir (5%)	39,07	40,28	43,65
T6: Chaya (5)% + Kéfir (6%)	44,87	45,74	43,00

Anexo 7. Determinación de carga probiótica total en el T3



INFORME DE ENSAYOS

Fecha de Informe:	15/06/2021	Orden:	3084	Informe:	2620-21	Página:	1/1
-------------------	------------	--------	------	----------	---------	---------	-----

INFORMACION DEL CLIENTE:

Nombre:	TIRADO VERA JHON		
Dirección:	QUININDE		
Teléfono:	0990332293	Persona de Contacto:	SR. JOHN TIRADO
E. Mail:	jhonw.tiradovera@gmail.com		

DATOS DE LA MUESTRA

Tipo de Alimento:	BEBIDAS NO ALCOHOLICAS	Fecha de Recepción:	11/06/2021
Tipo de Producto:	BEBIDA DE TE	Cód. de Laboratorio:	BA-C-11-11-06-21
Cantidad Recibida:	1 de 500 ml	Muestreo:	Realizado por el cliente
Condición:	Normales, Envase plástico		

INFORMACION PROPORCIONADA POR EL CLIENTE

Nombre:	BEBIDA DE TE T3 (HIERBA LUISA 5% MAS KEFIR 6%) 09/06/2021		
Fecha de Elab.:	--	Fecha de Exp.:	--
Contenido Declarado:	--	Lote:	--
Presentaciones:	Forma de conservación: Ambiente		
Material de envase:	--		

RESULTADOS

ANALISIS MICROBIOLÓGICOS

Fecha de Análisis	11/06/2021		Libro/Página R 37-5.10:	318/1298	
Condiciones Ambientales:	Temperatura:		17°C - 25°C	Humedad relativa:	36%-57 %
Parámetros	Unidad	Resultados	Requisitos	Técnica	Método de Referencia
Bacterias Probióticas	UFC/ml	1,7 x 10 ⁹	--	Vertido en Placa	MME M30 (METODO INTERNO)

OBSERVACIÓN

Se podrán realizar modificaciones a este documento, hasta 6 meses después de su emisión, las mismas que deberán ser respaldadas, por un requerimiento de las autoridades de salud o por un sustento técnico válido, de acuerdo al criterio del laboratorio.

Estos resultados corresponden exclusivamente a la muestra analizada.

La contra muestra se almacena en el laboratorio por 1 mes

Prohibida su reproducción total o parcial, sin previa autorización de LABORATORIOS AVVE S.A.

Las observaciones y opiniones no se encuentran dentro del Alcance de Acreditación

Los registros generados por el análisis de la(s) muestra(s) son mantenidas en los archivos del laboratorio por 5 años

Válido solo Informe Original

Los resultados se aplican a la muestra tal cual como fue recibida.

Q.F. Paola Avilés
Jefe Dpto. Físico Químico

REV 08/09-11

Datos de Contacto:
Dirección Laboratorio Matriz: Parque Industrial California 1, Calle Arq. Modesto Luque Rivadeneira,
Edificio Comercial 3 Local 4 A Km. 11 1/2 vía a Daule.
PBX. Matriz: (5934) 2103206, Teléfonos Parque California 1: 2103017 / 2103026 ext. 235 Cel.: 0998078518

Dirección Laboratorio de Microbiología: Parque Industrial California 2, Bodega D44
Km. 11 1/2 vía a Daule,
Teléfono: (5934) 2 103365 ext. 101, Teléfonos Parque California 2: 2 103199 ext. 443

E-mail: margot.aviles@laboratoriosavve.com
colaboraciones.compras@laboratoriosavve.com
paola.aviles@laboratoriosavve.com
lorena.aviles@laboratoriosavve.com

www.laboratoriosavve.com

Laboratorios AVVE