



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL
FACULTAD DE INGENIERÍA EN MECÁNICA Y CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN

”Determinación de Parámetros Físico-Químicos en la Deshidratación de las
Hojas de *Ilex guayusa* para la formulación de una Bebida Energética”

TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN

TESIS DE GRADO

Previa a la obtención del Título de:

INGENIERAS DE ALIMENTOS

Presentada por:

CINTHIA ESTHER CAMACHO SÁNCHEZ

DAYSI GEOVANNA MARTÍNEZ GAGÑAY

GUAYAQUIL – ECUADOR

Año: 2015

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios, que me permite culminar un logro profesional en mi vida.

A mi querida familia, formada por: mi abuelito, mi madre, mi esposo mis hijos, seres que amo con todas mis fuerzas, quienes me brindan su amor y su apoyo incondicional.

A la ESPOL, por acogerme y ser parte de su seno intelectual.

Al Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador, CIBE, por las facilidades prestadas en el desarrollo del presente estudio.

Agradezco de corazón y de forma muy especial a nuestra directora Dra. Patricia Manzano, Dra. Migdalia Martínez quienes nos orientaron con sus conocimientos, reflexiones, centraron nuestras ideas y sobre todo por brindarnos su amistad para culminar la presente tesis.

Cinthia Camacho

AGRADECIMIENTO

A Dios por haberme dado la existencia y permitido culminar esta etapa de mi vida.

A mis Padres por estar siempre a mi lado, por su fuerza y apoyo incondicional brindado, pilares que me han ayudado y llevado hasta donde estoy ahora.

A mis hermanos, por su apoyo y por compartir conmigo buenos y malos momentos.

A la ESPOL por abrirme sus puertas y ser parte de ella para poder estudiar mi carrera.

Al Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador, CIBE, por el soporte institucional dado para la realización de este trabajo.

Agradezco también de manera especial a nuestra directora y vocal de tesis Dra. Patricia Manzano y Dra. Migdalia Martínez quienes con sus conocimientos y apoyo guiaron el desarrollo de la presente tesis.

Y a todas aquellas personas que de una u otra forma, colaboraron o participaron en la realización de esta investigación, hago extensivo mi más sincero agradecimiento.

Daysi Martínez

DEDICATORIA

Este trabajo lo dedico principalmente al ser Supremo que me dio la vida, por darme la oportunidad de cumplir una de mis metas.

A mi abuelito Baltazar Sánchez, quien me inculco sus valores, darme su amor y todos los buenos consejos para que sea una mujer de bien.

A mi madre Martha Sánchez mi negrita que tomó el papel de padre y lucho contra todo para darme lo que necesitara.

A mi querido esposo por su amor y su apoyo en todo momento y darme muchos días de felicidad.

A mis hermosos hijos que son mi fuerza mi esperanza mi motor, por quien me levanto cada día y seguir adelante.

A mi querida familia.

Cinthia Camacho

DEDICATORIA

Esta tesis es una parte de mi vida y comienzo de otras etapas por esto y más, la dedico primeramente a Dios creador del universo y dueño de mí, que me diste la oportunidad de vivir y de regalarme una familia maravillosa.

Y con todo mi amor a mis padres, Miguel y Mariana que me dieron la vida, han estado conmigo en todo momento, dándome ejemplos dignos de superación y entrega. Papi, mami son el pilar fundamental en mi vida, me han dado todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi

carácter, mi empeño, mi coraje para conseguir mis objetivos. A ustedes por siempre mi corazón y mi agradecimiento.

Daysi Martínez

TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN

Ing. Jorge Duque R.

DECANO DE LA FIMCP

PRESIDENTE

Q.F. Patricia Manzano S. PhD.

DIRECTORA DEL TFG

Ing. Haydeé Torres C. M.Sc.

VOCAL

DECLARACIÓN EXPRESA

“La responsabilidad del contenido de esta Tesis de Grado, me corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual del mismo a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL”

(Reglamento de Graduación de la ESPOL)

Cinthia Esther Camacho Sánchez

Daysi Geovanna Martínez Gagñay

RESUMEN

Las hojas de *Ilex guayusa*, además de cafeína, contiene teobromina y L-teanina, compuestos con actividad estimulante, atributo utilizado en el presente estudio para desarrollar una bebida energética a partir de este órgano vegetal. El secado al sol, al ambiente y en horno eléctrico fueron los procedimientos empleados para la deshidratación de las hojas de *Ilex guayusa*, considerándose como variables la temperatura y el tiempo de secado por triplicado. Se cuantificó la presencia de cafeína mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), y se evaluaron la calidad y características microbiológicas y propiedades físico - químicas de la bebida energética elaborada. Con vistas a conocer la aceptación de la bebida elaborada, se realizó el correspondiente análisis sensorial con la participación de 30 jueces de diferentes edades y sexos: y se realizó el estudio estadístico, mediante un análisis multivariado de correspondencia a través del programa InfoStat. Estos estudios se realizaron en el Laboratorio de Bioproductos del Centro de Investigación Biotecnológicas del Ecuador (CIBE) de la Escuela Superior Politécnica del Litoral.

Se pudo determinar que el mejor método de deshidratación observado fue en el secado en horno eléctrico, porque presentó el menor tiempo de secado, la mayor eliminación de agua y el menor porcentaje de humedad

residual. Las hojas secadas por este método presentaron características químicas similares a las secadas por los otros métodos empleados y se evidenció un porcentaje de cafeína superior. En el análisis fitoquímico en todas las muestras obtenidas en los tres tipos de secado se identificaron los siguientes grupos químicos: flavonoides, fenoles - taninos, azúcares, saponinas, triterpenos, quinonas, grasas, alcaloides y esteroides.

Las bebidas elaboradas a diferentes concentraciones presentaron características similares en cuanto al análisis sensorial, no existiendo diferencias significativas en su aceptación. El porcentaje de cafeína en las bebidas elaboradas, fueron de 330mg/L (bebida A) y 530mg/L (bebida B), de las cuales sólo fórmula A puede ser catalogada como una bebida energética ya que el contenido de cafeína estuvo dentro del rango establecido por la Norma NTE INEN 2411:2008. Este producto energético se mantuvo estable en todas sus características organolépticas y microbiológicas aún después de dos meses de elaborada.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
RESUMEN	ii
ÍNDICE GENERAL.....	iv
ABREVIATURAS	ix
SIMBOLOGÍA	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
ÍNDICE DE TABLAS	xiv
INTRODUCCIÓN	¡Error! Marcador no definido.1
CAPÍTULO 1	4
1. MARCO TEÓRICO.....	4
1.1. JUSTIFICACIÓN	4
1.2. Objetivos.....	6
1.2.1.Objetivo general	6
1.2.2.Objetivos específicos	6
1.3.Plantas medicinales en el Ecuador.....	7
1.3.1.Plantas medicinales de la Amazonía.....	7

1.4. Ilex Guayusa características botánicas	8
1.4.1. Requerimientos agroclimáticos	12
1.4.2. Zonas de cultivo en el Ecuador	13
1.4.3. Entorno cultural de Ilex Guayusa.	13
1.4.4. Calendario de producción y volumen de la oferta de hoja de Guayusa.....	15
1.5. Industrialización de la Ilex guayusa	16
1.6. Secado	17
1.6.1. Fundamentos del secado	17
1.6.2. Métodos Generales del secado.....	19
1.6.3. Influencia del secado en el producto	21
CAPÍTULO 2	23
2. MATERIALES Y MÉTODOS	23
2.1. Localización.....	23
2.2. Materiales y Equipos.....	24
2.2.1. Materia prima	24
2.2.2. Equipos de Laboratorio	24
2.2.3. Materiales de laboratorio.....	25
2.3. Métodos.....	27

2.3.1. Métodos de secado	27
2.3.1.1. Secado solar.	28
2.3.1.2. Secado al ambiente:.....	29
2.3.1.3 Secado en horno eléctrico:.....	31
2.3.2. Determinación de los parámetros físico-químico del material vegetal secado por los diferentes métodos	32
2.3.2.1. Pérdida en peso	35
2.3.2.2. Tiempo de secado.....	36
2.3.2.3. Humedad residual	36
2.3.2.4. Sustancias solubles.....	37
2.3.2.5. Tamizaje fitoquímico	37
2.3.2.6. Perfil cromatográfico	42
2.3.2.7. Determinación de cafeína	43
2.3.3. Análisis estadístico.....	44
2.4. Formulación de la bebida energética.....	45
2.5. Pruebas físico – químicas	46
2.5.1. Determinación del pH.....	46
2.5.2. Determinación de cafeína de la bebida	46
2.6. Pruebas microbiológicas (bebida)	46

2.6.1. Determinación de Coliformes, aerobios y mohos	47
2.7. Pruebas sensoriales	48
CAPÍTULO 3	51
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51
3.1. Análisis físico-químico	51
3.2. Análisis fitoquímico de la Ilex guayusa	70
3.3. Análisis microbiológico	79
3.4. Análisis sensorial	80
CAPÍTULO 4	84
4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	84
CONCLUSIONES	84
RECOMENDACIONES	86
ANEXOS	
BIBLIOGRAFÍA	

ABREVIATURAS

CIBE	Laboratorio de Bioproductos del Centro de Investigación de Biotecnología del Ecuador
CAF	Corporación Andina de Fomento
INEC	Instituto Nacional de Estadísticas y Censos
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución

SIMBOLOGÍA

%C_T	Porcentaje de cenizas totales en base hidratada.
%C_A	Porcentajes de cenizas solubles en agua en base hidratadas.
%H	Pérdida de peso por desecación (%)
B	Porcentaje de cenizas insolubles en ácido clorhídrico en base hidratada.
M	Masa del crisol con las cenizas (g).
M₁	Masa del crisol con la porción de ensayo (g).
M_v	Masa del crisol vacío (g).
H	Humedad de la muestra (%)
R	Residuo de la muestra (g)
M	Masa de la muestra (g)
500 y 100	Factores matemáticos para los cálculos
M_T	Masa de crisol con cenizas totales (g)
Ma	Masa del crisol con cenizas insolubles en agua (g)
Mi	Masa del crisol con las cenizas insolubles en HCl (g)
Md	Masa del crisol con la muestra de ensayo desecada (g)
Ss	Sustancias solubles.
Rf	Factor de retención
g	Gramo
°C	Grados Celsius

mg	Miligramo
ml	Mililitros
nm	nanómetro
H	Hora
mm	Milímetro
min	Minuto
psi	Libras por pulgada cuadrada
um	Micrómetro

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Contenido de cafeína por productos.....	7
Figura 1.2 Imagen de árbol de Ilex Guayusa.....	12
Figura 1.3 Calendario de Producción.....	15
Figura 2.1 Selección de hojas Ilex guayusa.....	28
Figura 2.2 Secador solar utilizado en proceso.....	29
Figura 2.3 Proceso de secado al ambiente de las hojas de <i>Ilex guayusa</i>	30
Figura 2.4 Secado en horno eléctrico.....	31
Figura 2.5 Extracción sucesiva del material vegetal.....	39
Figura 2.6 Ensayos realizados al extracto etéreo.....	40
Figura 2.7 Ensayos realizados al extracto alcohólico.....	41
Figura 2.8 Ensayos realizados al extracto acuoso.....	42
Figura 2.9 Laboratorio de análisis sensorial existente en licenciatura en nutrición de la ESPOL.....	50
Figura 2.10 Jueces evaluando las pruebas sensoriales realizadas a las diferentes formulaciones de bebida energética.....	50
Figura 3.1 Pérdida de peso en método de secado en horno solar de tres muestras de hoja de <i>Ilex guayusa</i> ($P \leq 0.05$).....	55
Figura 3.2 Pérdida de peso en método de secado al ambiente de hoja de Ilex guayusa ($P \leq 0.05$).....	58
Figura 3.3 Pérdida de peso en método de secado en horno eléctrico de tres muestras de hoja de <i>Ilex guayusa</i> ($P \leq 0.05$).....	61

Figura 3.4 Porcentaje de humedad relativa de la hoja de <i>Ilex guayusa</i> mediante los tres tipos de secado.....	64
Figura 3.5 Porcentaje de sustancias solubles de la hoja de <i>Ilex guayusa</i> mediante los tres tipos de secado.....	65
Figura 3.6 Placas TLC reveladas con reactivo de Dragendorff.....	67
Figura 3.7 Placas TLC reveladas con ácido sulfúrico	67
Figura 3.8 Porcentaje de cafeína de las hojas de <i>Ilex guayusa</i> , secadas por diferentes métodos de secado.	70
Figura 3.9 Cromatograma HPLC de la formulación A, bebida energética ...	76
Figura 3.10 Cromatograma HPLC de la formulación B, bebida ebergética .	77
Figura 3.11 Relación entre edad y sexo de los jueces con respecto a la bebida A.....	80
Figura 3.12 Relación entre edad y sexo de los jueces con respecto a la bebida B.....	81
Figura 3.13 Relación entre edad y sexo de los jueces con respecto a las bebidas A y B.....	82

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Taxonomía de <i>Ilex</i> Guayusa Error! Marcador no definido.	11
Tabla 2.1 Formulación de la bebida energética.....	45
Tabla 3.1 Análisis de cenizas en los diferentes tipos de secado.....	52
Tabla 3.2 Pérdida de peso en el método de secado en horno solar de hoja de <i>Ilex guayusa</i> ($P \leq 0.05$).....	54
Tabla 3.3 Pérdida de peso en el método de secado al ambiente de las hojas de <i>Ilex guayusa</i> ($P \leq 0.05$).....	57
Tabla 3.4 Pérdida de peso en método de secado en horno eléctrico de hoja de <i>Ilex guayusa</i> ($P \leq 0.05$).....	60
Tabla 3.5 Análisis de humedad residual de los diferentes metodos de secado de <i>illex guayusa</i>	63
Tabla 3.6 Análisis de las sustancias solubles en agua de <i>illex guayusa</i> en los diferetes tipos de secado.....	65
Tabla 3.7 Valores promedio de los Rf en el revelado con ácido sulfúrico y Dragendorff.....	68
Tabla 3.8 Resultados del porcentaje de cafeína en las hojas secas de <i>Ilex</i> <i>guayusa</i> por el método de HPLC.....	69
Tabla 3.9 Tamizaje fitoquímico de las hojas de <i>illex guayusa</i> secadas por diferentes métodos.....	72
Tabla 3.10 Determinación de pH.....	74

Tabla 3.11	Contenido de contaminantes en la bebida.....	¡Error! Marcador no definido.	78
Tabla 3.12	Resultados de análisis microbiológicos en las bebidas elaboradas.....		79
Tabla 3.13	Resultados del análisis estadístico de la evaluación sensorial realizado a las bebidas elaboradas.....		83

INTRODUCCIÓN

El TFG abarca principalmente lo siguiente:

A nivel mundial existen múltiples bebidas denominadas energizantes que son mezclas de extractos de plantas, endulzante y otras sustancias como la taurina, cafeína, guaraná, ginseng, glucuronolactona, vitaminas, minerales, inositol y carnitina. La mayoría de estas sustancias en especial la taurina, no solo tienen efectos estimulantes sino que producen dependencia física y social, se suma a esto los efectos colaterales indeseados.

En la actualidad, el desarrollo de bebidas energéticas de origen natural, se encuentra en auge. En este contexto, las hojas de *Ilex guayusa*, se potencializan como tal, ya que además de cafeína, contiene teobromina y L-teanina, compuestos con actividad estimulante, atributo utilizado en el presente estudio para desarrollar una bebida energética a partir de este órgano vegetal.

El secado al sol, al ambiente y en horno eléctrico fueron los procedimientos empleados para la deshidratación de las hojas de *Ilex guayusa*, considerándose como variables la temperatura y el tiempo de secado por triplicado. Se cuantificó la presencia de cafeína mediante cromatografía

liquida de alta resolución (HPLC), y se evaluaron la calidad y características microbiológicas y propiedades físico - químicas de la bebida energética elaborada. Con vistas a conocer la aceptación de la bebida elaborada, se realizó el análisis sensorial de la misma con 30 jueces de diferentes edades y sexos, mediante un análisis multivariado de correspondencia a través del programa InfoStat. Estos estudios se realizaron en el Laboratorio de Bioproductos del Centro de Investigación Biotecnológicas del Ecuador (CIBE) de la Escuela Superior Politécnica del Litoral.

En el capítulo uno se hace un estudio completo referente a la planta de *Ilex guayusa* sus beneficios y sus componentes.

En el capítulo dos, la metodología empleada es de carácter analítica por el componente, materiales que intervienen en la elaboración de la bebida y descriptiva por la captación existente en los procesos de calidad.

En el capítulo tres se da a conocer los resultados de los análisis físico-químicos, contenido de cafeína, microbiológicos y sensorial tanto a la hoja de *Ilex guayusa*, así como a la bebida energética realizada.

Se dará a conocer el mejor método de deshidratación o secado de las hojas de *Ilex guayusa*, teniendo como variables el tiempo y temperatura de secado.

La mejor formulación según su concentración de hoja, el contenido de cafeína, y los grupos químicos encontrados. Todas las evaluaciones se realizaron por triplicado.

CAPÍTULO 1

1. MARCO TEÓRICO

1.1. JUSTIFICACIÓN

A inicios del 2000, a partir de la difusión a nivel mundial sobre el sobrepeso y la obesidad en la población, ocasionado por el “estilo de vida urbana” y caracterizado por una dieta desequilibrada con abundancia ingesta de carbohidratos, bebidas carbonatadas y baja actividad física (U.S. Department of Health and Human Services, 2001), se generó cierta preocupación en la ciudadanía, actitud que fue aprovechada por el mercado consumista que se inclinó y promovió la oferta de productos “light”, saludables, orgánicos y naturales.

Fruto de esto, nace con alta aceptación por parte del mercado, una nueva familia de productos refrescantes, estos son las bebidas a base de té, helado, tanto natural como saborizado, las cuales, según un estudio efectuado por la consultora IPSA GROUP, en la que indica que cuatro de cada diez hogares de Guayaquil se consumen este producto, mientras que en Quito, tres de cada diez hogares compran esta bebida (El Universo, 2011).

Además de la bebida de té, existen dos tipos de bebidas no alcohólicas con demanda en crecimiento: las hidratantes y las Energizantes. Sobre éstas últimas, introducidas al mercado en el año 1997, (Zona Alimentaria, 2009), existe una gran polémica a partir de su contenido en un conjunto de elementos, tales como cafeína, taurina y glucosa, que elevan la sensación de alerta del cuerpo y que en comparación con otro tipo de bebidas contienen una cantidad superior de cafeína.

Es importante resaltar, que la cafeína se absorbe y pasa rápidamente hacia el cerebro. No se acumula en el torrente sanguíneo ni se almacena en el organismo, y se elimina en la orina

muchas horas después de haber sido consumida. (Revista MedlinePlus, 2014)

Según la empresa Zenith International (2007), durante el año 2006 se lanzaron 500 nuevas marcas en el mundo, con un incremento del consumo mundial del 17%; siendo Tailandia el país con mayor consumo per cápita y Estados Unidos el de mayor volumen de ventas con una media anual de consumo per cápita de 3 litros (Reissig, 2009).

Datos publicados por la Fundación Runa (2013) indican que una taza de infusión de guayusa contiene 90 mg de cafeína, esto es alrededor de 2% menos que la que contiene una taza de café instantáneo (93 mg), es superior a la contenida en un café expreso tipo Starbucks (75 mg), a una medida igual de té verde marca Tazo (47 mg), de Nestea (26 mg), de una Coca cola Dieta (47 mg) o de un Red Bull (80 mg) (figura 1.1). La misma entidad indicó que las hojas de Guayusa además de cafeína, contienen teobromina (un estimulante que generalmente se encuentra en el chocolate) y L-teanina (un análogo del ácido glutámico que se encuentra en el té

verde y que ha demostrado reducir la fatiga física y mental y combatir el estrés). La mezcla de cafeína, teobromina y teofilina hace especial y única a la guayusa, esto facilita la sensación de conciencia y presencia en todo el cuerpo como sensación para el consumidor (Fundación Runa, 2013).

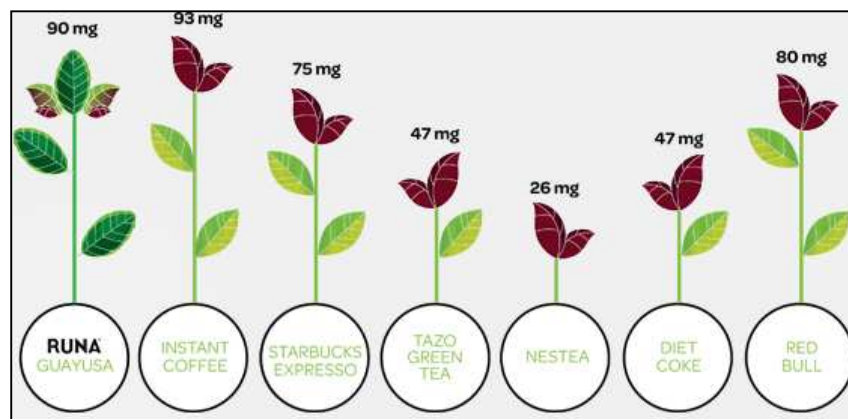


FIGURA 1.1 CONTENIDO DE CAFEÍNA POR PRODUCTOS

Fuente: www.runa.org

Adicionalmente, la guayusa tiene como diferenciador de mercado la característica que se comercializa internacionalmente con un enfoque de mercado justo, producto Orgánico y propio de la Amazonía; lo cual, en primer lugar, beneficia a grupos indígenas de la Amazonía, aportando a la preservación de su cultura; en segundo

lugar, se cultiva en condiciones de producto orgánico libre de agentes químicos y por tanto beneficioso al medio ambiente y en tercer lugar que es un cultivo propio de la selva lluviosa del Amazonas, por tanto, su cultivo no genera deforestación, sino que es complementario y parte del ecosistema Sudamericano (Fundación Runa, 2013).

En la presente investigación se trabaja en el desarrollo de una bebida energética a partir de las hojas *Ilex guayusa* sometidas a diferentes procesos de deshidratación, para establecer las condiciones óptimas de temperatura y tiempo de secado, apoyándose para ello en los resultados de las propiedades físicas, químicas, fitoquímicas, microbiológicas y sensoriales. Estos estudios se realizaron en el Laboratorio de Bioproductos del Centro de Investigación de Biotecnología del Ecuador (CIBE) de la Escuela Superior Politécnica del Litoral.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo general

Determinar los parámetros físico-químicos óptimos en la deshidratación de las hojas de *Ilex guayusa* para la formulación de una bebida energética.

1.2.2. Objetivos específicos

- Comprobar las medidas físicas y químicas de los imponderables en la deshidratación de las hojas de la planta conocida como *Ilex guayusa* Loes.
- Analizar e identificar el porcentaje exacto de cafeína en la bebida energética elaborada mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).
- Evaluar la calidad y características microbiológicas tanto físicas como químicas de la bebida energética a base de guayusa que se plantea elaborar.

1.3. Plantas medicinales en el Ecuador

1.3.1. Plantas medicinales de la Amazonía

Para (Alfredo Ara Roldán, 1994) “Las plantas medicinales han sido el método de curación natural más popular y utilizada por todas las culturas”.

La Amazonía, es una región compartida por ocho países (Brasil, Perú, Ecuador, Colombia, Bolivia, Guayana, Venezuela y Surinam) y es clasificada, según los criterios hidrográfico, ecológico y Político-Administrativo, en Amazonía Mayor y Amazonía Menor. Esta área contiene una de las mayores bio-diversidades del planeta, la cual aumenta de este a oeste, o sea, comprende ambas estribaciones de la cordillera andina (la cual es la zona de mayor endemismo).

Estimaciones de Geoamazonía del año 2009, indican que “Los pueblos amazónicos utilizan alrededor de 1600 plantas medicinales para curar diversas enfermedades y en el Ecuador, esta mega biodiversidad se dimensiona en 6249 especies vegetales identificadas” (UNEP, ACTO y Universidad del Pacífico, 2009).

1.4. *Ilex Guayusa* características botánicas

Su clasificación taxonómica se presenta en la tabla 1.1

TABLA 1.1 TAXONOMÍA DE ILEX GUAYUSA

Nombre científico:	<i>Ilex guayusa</i>
Reino:	Plantae
Phylum:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Celastrales
Familia:	Aquifolialeceae
Género:	<i>Ilex</i>
Epíteto específico:	Guayusa
Autor Epíteto específico:	Loes
Determinador:	Jiménez, L. C.
Fecha determinación:	2008

Fuente: Universidad Nacional de Colombia, Instituto de Ciencias Naturales.

El árbol de guayusa (Figura 1.2) alcanza alrededor de 10 m de altura. El tronco dividido desde la base, hojas simples alternas coriáceas, con bordes denticulado, cáliz persistente 4-5 lobulado, corola con los cuatro pétalos obtusos, fruto globoso y pequeño, cultivado en las chacras (Cerón, 1995).



FIGURA 1.2 IMAGEN DE ÁRBOL DE *ILEX GUAYUSA*

Fuente: www.guayusatea.com

1.4.1. Requerimientos agroclimáticos

La especie *Ilex guayusa* se distribuye desde el nivel del mar hasta los 1500 msnm (Radice, 2006), no existen mayores estudios sobre esta especie, por su ubicación en provincias de la Amazonía, se entiende que requiere de un alto nivel de pluviosidad

El impacto que presenta esta planta en su cultivación son de un alto aprovechamiento puesto que para la cosecha de estas hojas son a partir de los 4 años de edad donde el aprovechamiento del mismo viene siendo el 25% del área foliar llevando así al incremento del 50% del área foliar cuando alcanza los 6 años de edad.

La planta crece de manera silvestre y está presente en las fincas, sobre todo de los pueblos pertenecientes a kichwas, Shuar, Achuar y demás naciones amazónicas, para quienes constituye parte de su consumo diario y elemento cultural (Radice, 2006).

1.4.2. Zonas de cultivo en el Ecuador

Según (Gupta, 1995) “La guayusa fue conocida, no solamente en el sector ecuatoriano-peruano del oriente de las regiones montañosas andinas, sino también en la franja Putumayo-Caquetá de Colombia”. En el Ecuador, la guayusa está presente en todas las provincias de la Amazonía, inclusive en los flancos orientales de las provincias de Pichincha y Tungurahua, su hábitat se ubica desde el nivel del mar hasta los 1500 msnm.

1.4.3. Entorno cultural de *Ilex Guayusa*

Según (Patiño, 2005) “La guayusa es un árbol originario del piedemonte andino en la zona ecuatorial, y su uso entre las tribus indígenas es bastante antiguo, pues hojas suyas se han extraído de tumbas datadas en el año 500 A.C”.

La especie *Ilex guayusa*, que en idioma Shuar es Waisi, es de amplia utilización por los pueblos que habitan la Amazonía, especialmente los Shuar, una de las naciones de mayor representación en la Amazonía, ellos utilizan esta planta, para la limpieza del estómago, para ello la toman en la madrugada; así como también para las mujeres luego del parto, quienes son bañadas con una infusión de la planta a los tres días del alumbramiento; también refieren que tiene propiedades afrodisiacas y mejora la fertilidad. Los quichuas amazónicos la utilizan como una bebida social, al ofrecerla a visitantes y en ceremonias y festividades (Cosmovisión Andina, 2006).

1.4.4. Calendario de producción y volumen de la oferta de hoja de Guayusa

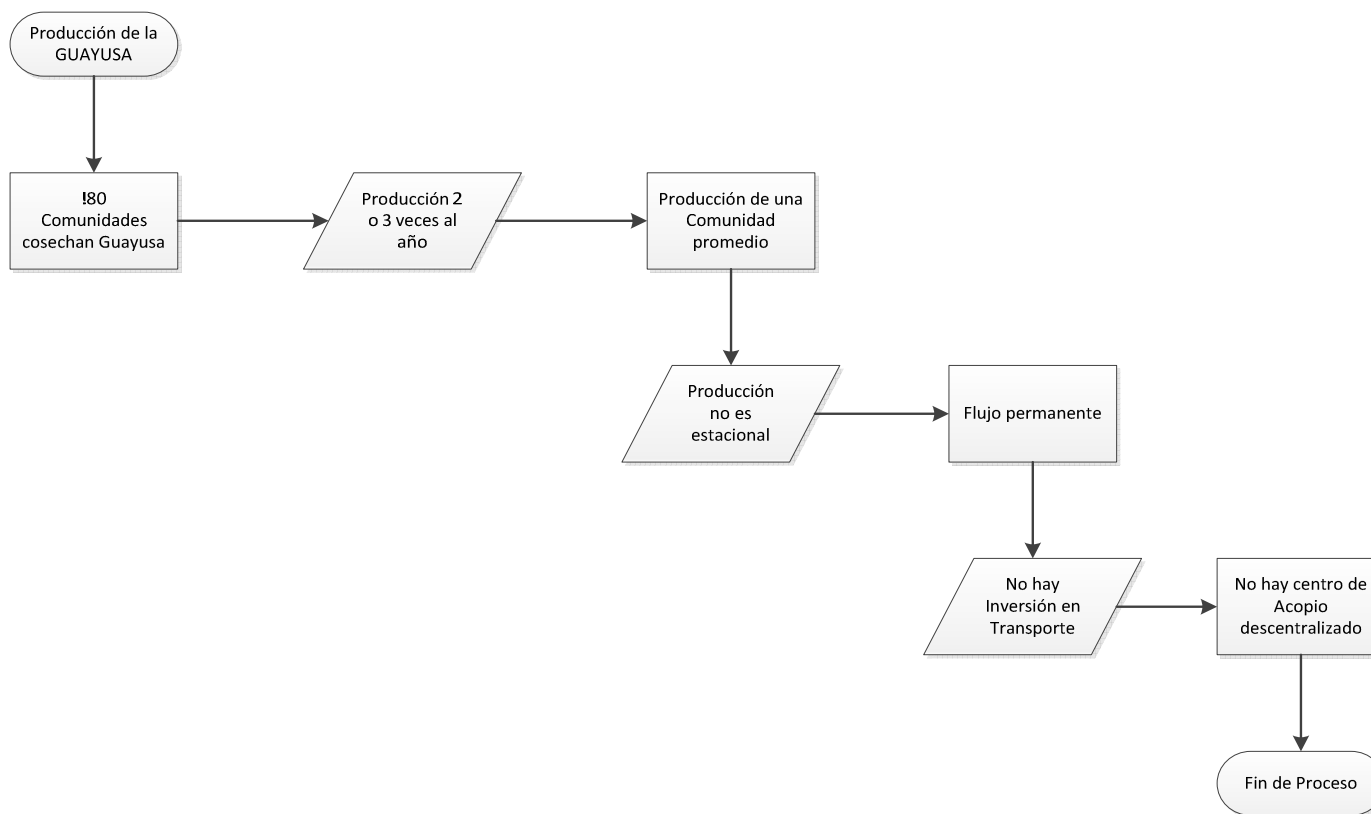


FIGURA 1.3 CALENDARIO DE PRODUCCIÓN

Elaborado por: Daysi Martínez – Cinthia Camacho.

La guayusa es una hoja que florece a en toda época del año se la recolecta en todas las comunidades durante el año; las estimaciones indican que una hectárea produce 3000 kg de hojas según manifiesta la Fundación RUNA.

En su publicación, (Crespo Coello, 2013) da a conocer que la realidad de la producción es responsable un promedio de 180 comunidades, además afirma que se produce 2 0 3 veces al año, en diferentes épocas (Figura 1.3)

La producción y comercialización de la Guayusa no existe gestión adecuada en su proceso debido a que solo se la produce y son poca la demanda que busca la hoja en determinadas comunidades, existiendo un esquema centralizado de recolección.

1.5. Industrialización de la *Ilex guayusa*

En los últimos años, y como parte de la búsqueda de materia prima alternativa, la guayusa está siendo objeto de interés comercial para procesos de industrialización; desde el año 2009, la Fundación Runatajarpa, exporta a Estados Unidos alrededor de 2000 libras

mensuales de hojas de guayusa, la cual es procesada en el país del norte para la elaboración de una bebida energizante con el nombre de Runa. Cabe destacar que es parte de un proyecto financiado por la Corporación Andina de Fomento -CAF- (Vasquez, 2011).

1.6. Secado

1.6.1. Fundamentos del secado

El secado es el proceso que consiste en la eliminación de gran parte del agua inicialmente incluida en el producto, hasta un nivel de contenido de humedad aceptable para ser almacenados por largos períodos sin pérdidas significativas y sin reducir el valor comercial del producto. Este fenómeno tiene como finalidad la reducción del agua disponible y por lo tanto de la actividad de agua y la velocidad de las reacciones en el producto y en el desarrollo de los microorganismos (Otazu, 2010).

Según (Muñoz, 1996); las hojas tienen una cantidad de agua entre el 60 al 90%, al ser secadas, se disminuyen los fenómenos enzimáticos que deterioran los principios activos y propiedades organolépticas, para los cuales requieren del agua; los cuales cesan prácticamente cuando el contenido es inferior al 10%.

El proceso de secado se puede dividir en tres etapas, basándose desde el punto de vista de la transferencia de calor y masa; usando el parámetro de temperatura y velocidad del aire de secado, la humedad relativa dentro y exterior del sistema de secado, la temperatura y presión estática de material de acuerdo a la altura de la capa de producto (Otazu, 2010).

El inicio del secado es la primera etapa, en la cual ocurre una elevación gradual de la temperatura del producto y la presión interna de vapor de agua. Esta etapa finaliza cuando la transferencia de calor es equivalente a la transferencia de masa. En la segunda etapa el agua es el agua libre, y se caracteriza por la tasa constante de secado. Esta tasa será constante, mientras haya la cantidad de agua suficiente en la superficie del producto para acompañar la evaporación. Y por último, la tercera etapa, donde la tasa de secado es decreciente. La reducción de la migración de la humedad de la superficie interior para la superficie del producto hace que la transferencia de calor no sea compensada con la transferencia de masa. Esto se debe a que la cantidad de agua presente en la superficie del producto es menor, reduciendo la transferencia de masa. El proceso finaliza cuando el

producto llegue al punto de equilibrio del contenido de humedad en relación con el aire de secado (Otazu, 2010).

1.6.2. Métodos Generales del secado

El factor común de los procesos de deshidratación es la pérdida de agua, para ello existen diversas formas, entre las cuales se citan:

- Secado solar
- Secado al Ambiente
- Secado en horno eléctrico

Para una mejor comprensión se describen cada una de ellas:

Secado por arrastre: La eliminación de agua se realiza colocando el elemento en contacto con un medio –normalmente aire- relativamente seco, el cual renueva constantemente para que el secado alcance el grado de deshidratación deseado (ITESCAM, 2010).

Según la Guía de (ITESCAM,2010), en el secado por arrastre existen algunas técnicas cuya diferencia es el tipo de energía utilizada, tales como: secado al aire libre, en horno eléctrico y en horno solar.

Secado al aire libre o sol: Es un método económico en climas cálidos y secos que consiste en colocar sobre lienzos o bandejas los elementos a deshidratar, si se trata de cortezas y raíces directamente al sol, en caso de elementos más frágiles no se utiliza esta técnica.

Secado a la sombra o bajo abrigo: Se realiza en un lugar cubierto que no reciba directamente los rayos solares, al igual que el anterior se extienden los elementos sobre una superficie cubierta con lienzos de ojo ancho, bandejas o preferible telas metálicas que permiten una mayor aireación. Esta técnica se aplica a elementos frágiles tales como flores que se decoloran con los rayos directos del sol y hojas de plantas que pierden sus aceites esenciales mediante exposición directa.

Secado al aire caliente mediante hornos con energía eléctrica, solar. A diferencia de los dos anteriores este procedimiento es más rápido acelera el proceso de días a horas al estar expuesto el elemento a una temperatura constante.

Secado por vaporización: Consiste en calentar la planta ó alimento lo suficiente como para que el agua que contiene, alcance el punto de ebullición y abandone el producto al transformarse en vapor, para ello requiere someterse el elemento a temperaturas superiores al punto de ebullición, es un tipo de secado agresivo y es simultaneo al cocinado del elemento y no siempre adecuado para todas las necesidades (ITESCAM, 2010).

Liofilización: La retirada del agua tiene lugar por sublimación, sometiendo el elemento a condiciones de temperatura inferiores a las del punto triple, este proceso es lento y de elevado costo, a cambio es la alta calidad del resultado (ITESCAM, 2010).

1.6.3. Influencia del secado en el producto

El secado de los elementos vegetales presenta algunas ventajas como las que se describen a continuación:

Eliminación de procesos enzimáticos: Aunque lo importante para una buena conservación es una baja actividad del agua, puede decirse en general que una humedad por debajo del 10% hace inactivos a microorganismos y enzimas, aunque es necesario bajar la humedad

por debajo del 5% para conservar las cualidades nutricionales y organolépticas de los alimentos sin alterar los principios activos (ITESCAM, 2010).

Disminución de costos de transporte: Al perder humedad, los elementos vegetales disminuyen significativamente su peso, lo que también disminuye su volumen por lo que en estas condiciones es más eficiente su transporte y almacenamiento.

Dilatación de la vida útil: Como resultado de la eliminación de los procesos enzimáticos que deterioran los elementos vegetales, el proceso de secado o deshidratación amplía significativamente la vida útil o periodo de consumo de los elementos vegetales.

CAPÍTULO 2

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Localización

El proceso de secado, se realizó en los laboratorios de La Facultad de Ingeniería Mecánica y Ciencias de la Producción de la Escuela Superior Politécnica del Ecuador.

Los análisis físico-químicos y microbiológicos se realizaron en las instalaciones del Centro de Investigación de Biotecnología del Ecuador (CIBE), en el laboratorio de Bioproductos, ubicado en ESPOL, Campus Prosperina, de la ciudad de Guayaquil. Materiales y equipos.

2.2 Materiales y Equipos

En esta sección se enlistarán los materiales y equipos utilizados dentro de la tesis.

2.2.1 Materia prima

La materia prima utilizada fueron las hojas frescas de *Ilex guayusa* nativa de la selva amazónica ecuatoriana, proveniente del Cantón Lago Agrio de la Provincia de Sucumbíos, recolectada en estado fenológico vegetativo.

2.2.2 Equipos de laboratorio

Para las pruebas físico-químicas y microbiológicas realizadas se utilizaron los siguientes equipos:

- Secador Solar indirecto de cabinas de elaboración artesanal
- Secador Eléctrico de bandejas
- mufla marca MLW - electro LM 212.11.
- Estufa
- Baño María
- Desecador
- Balanza analítica.
- Cronómetro.
- Cámara fotográfica
- Luz Ultravioleta
- Molino
- Agitador Compacto
- Cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC)
- Zaranda
- Incubadora
- Molino
- pH-metro

2.2.3 Materiales de laboratorio

El material de laboratorio utilizado en cada uno de los tres procesos de secado, en la determinación de los parámetros físico-químicos y en la elaboración de la bebida, se presenta en el siguiente listado:

- Guantes.
- Mandil.
- Embudo
- Papel filtro
- Pipetas
- Tubos de ensayo
- Matraces 250ml
- Crisoles
- Papel aluminio
- Tubos capilares
- Jeringas 10ml
- Placas petrifilm
- Placas TLC silica gel 60 F254
- Sorbato de potasio
- Ácido cítrico
- Azúcar
- Saborizante de durazno
- Buffer pH 4.01
- Buffer pH 7
- Agua destilada
- Éter etílico
- Etanol
- Ácido clorhídrico al 1% en agua
- Ácido clorhídrico concentrado
- Cloruro de sodio en polvo
- Cloroformo
- Hidróxido de sodio
- Anhídrido acético
- Ácido sulfúrico
- Carbonato de sodio
- Tricloruro Férrico al 5%
- Acetato de sodio
- Solución al 2% de ninhidrina
- Cinta de magnesio
- Alcohol amílico
- Ácido clorhídrico
- Acetato de etilo

- Metanol
- Reactivo de Sudan IV
- Reactivo de Dragendorff
- Reactivo de Mayer
- Reactivo de Wagner
- Reactivo de Baljet
- Reactivo de Fehling

2.3 Métodos

Los métodos utilizados en la presente investigación fueron tomados de los protocolos existentes dentro del Laboratorio de Bioproductos del CIBE-ESPOL, los cuales se describe a continuación.

2.3.1 Métodos de secado

La parte experimental se realizó por tres tipos de secado: Secado al ambiente, secado con secador solar y secado con horno eléctrico.

Previo a ser sometidas a los diferentes tipos de secado se realizaron las siguientes actividades:

1. Se seleccionaron las hojas que tuvieron mejor apariencia y presentaron iguales características, tales como color y tamaño entre ellas (figura 2.1).

2. Se limpiaron las hojas, para eliminar todo tipo de suciedad, tierra, insectos, etc.

3. Se pesaron las hojas, 150 gramos para cada proceso de secado y se dividieron en tres partes, haciendo tres replicas en cada caso.



FIGURA 2.1 SELECCIÓN DE HOJAS *ILEX GUAYUSA*

Elaborado por Cinthia Camacho- Daysi Martínez. 2013

2.3.1.1 Secado solar

Para el secado de las hojas se colocaron las muestras en bandejas metálicas 50x50 cm perforados, en posición favorable al viento (Figura 2.2).

Posteriormente las bandejas con el producto a secar se colocaron dentro de las cabinas que están unidas, mediante policarbonato ondulado, a un colector solar de aire. Las temperaturas se registraron cada cuatro horas hasta que el peso de las muestras se mantuvo constante.



FIGURA 2.2 SECADOR SOLAR UTILIZADO EN PROCESO

Elaborado por: Cinthia Camacho- Daysi Martínez. 2013

2.3.1.2 Secado al ambiente:

En este proceso, las hojas frescas se deshidrataron bajo sombra, ambiente cerrado, sin luz natural directa, expuestas directamente

a condiciones ambientales en un área determinada; para ello se colocaron las muestras en papel Kraft sobre un mesón (Figura 2.3).

Por 13 días cada 24 horas se realizaron determinaciones de pérdidas de peso, por triplicado hasta obtener una masa constante. La temperatura mínima promedio registrada fue de 21,94°C y la máxima de 31,83°C.



**FIGURA 2.3 PROCESO DE SECADO AL AMBIENTE DE LAS
HOJAS DE *ILEX GUAYUSA***

Elaborado por: Cinthia Camacho- Daysi Martínez. 2013

2.3.1.3 Secado en horno eléctrico

Las muestras se deshidrataron en una estufa eléctrica marca Memmert modelo SFB-400 a 46,11°C (Figura 2.4). El peso se registró cada hora hasta que el peso de las hojas fuera constante.



FIGURA 2.4 SECADO EN HORNO ELÉCTRICO

Elaborado por: Cinthia Camacho- Daysi Martínez. 2013

Todas las muestras deshidratadas en los diferentes tipos de secado fueron molinadas por separado, en un molino manual marca corona. El producto obtenido se pasó por un tamiz con orificios de 0,8 mm de diámetro y se almacenó en una funda de papel kraft a temperatura ambiente.

2.3.2 Determinación de los parámetros físico-químico del material vegetal secado por los diferentes métodos

Para la determinación de los parámetros físicos-químicos de las muestras vegetales deshidratadas en los diferentes tipos de secado tomamos como referencia las Normas Técnicas Ecuatorianas para Té, utilizando las metodologías descritas por (Miranda & Cuéllar, 2001). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado, calculando el valor medio y la desviación estándar.

Determinación de Cenizas Totales

Para este análisis se empleó la mufla marca MLW - electro LM 212.11.

Se pesó 2,0 g de la muestra de ensayo con desviación permisible de 0,5 mg, en un crisol de porcelana previamente tarado. Se calentó la porción de ensayo aumentando la temperatura hasta carbonizar y luego incinerar en un horno mufla a temperatura de 700 - 750 ° C durante 2 h.

Los crisoles se colocaron en una desecadora donde se deja enfriar luego se pesó, repitiéndose el proceso hasta que dos pesadas sucesivas no difieran en más de 0,5 mg por g (masa constante).

Para obtener la masa constante los intervalos entre calentamiento y pesada fueron de 30 min. Si el residuo presenta trazas de carbón, se le añaden unas gotas de solución de H₂O₂ concentrado, ácido nítrico o solución de nitrato de amonio al 10% y se calienta hasta evaporar. Al enfriar el crisol el residuo debe ser color blanco (Miranda & Cuéllar, 2001), los resultados se compararon con la NORMA TECNICA ECUATORIANA para TÉ NTN INEN 2381:2005.

La cantidad de cenizas totales se calculó por la fórmula siguiente:

$$\% C_T = \frac{M_2 - M_v}{M_1 - M_v} * 100$$

Determinación de Cenizas Solubles en Agua

A las cenizas totales obtenidas según el apartado anterior, se le añade de 15 a 20 ml de agua. El crisol se tapa y se hierva suavemente a la llama del mechero durante 5 min. La solución se

filtra con papel filtro libre de cenizas. El papel filtro con el residuo se transfiere al crisol inicial, se carboniza en un mechero y luego se incinera en un horno mufla a 700 – 750°C; durante 2h. Posteriormente se coloca en una desecadora y cuando alcanza la temperatura ambiente se pesa. Repitiendo el procedimiento hasta alcanzar una masa constante (Miranda & Cuéllar, 2001). Los resultados se compararon con el contenido máximo de contaminantes en la NORMA TECNICA ECUATORIANA para TÉ NTN INEN 2381:2005.

$$\%C_A = \frac{M_T - M_a}{M_1 - M_v} * 100$$

Determinación de cenizas insolubles en ácido

Tomando en cuenta lo publicado por (Miranda & Cuéllar, 2001) a las cenizas totales obtenidas según la técnica se le añaden de 2-3 ml de ácido clorhídrico al 10%. El crisol se tapa con un vidrio reloj y se calienta sobre un baño de agua hirviente durante 10 min. Se lava el vidrio reloj con 5 ml de agua caliente y se une al contenido del crisol. La solución se filtra a través de un papel filtro libre de cenizas; se lava el residuo con agua caliente hasta que el filtrado acidulado con

ácido nítrico al cual se le añade una o dos gotas de solución de nitrato de plata 0,1M, no muestre presencia de cloruros.

El filtrado con el residuo se deseca a 100 - 105°C; se transfiere al crisol inicial y se incinera en un horno mufla a una temperatura de 700-750°C durante 2h. Posteriormente se coloca en una desecadora y cuando alcanza la temperatura ambiente se pesa. Se repite el procedimiento hasta obtener masa constante. Los resultados se compararon con la NORMA TECNICA ECUATORIANA para TÉ NTN INEN 2381:2005.

Expresión de los resultados:

$$B = \frac{M_i - M_v}{M_1 - M_v} * 100$$

2.3.2.1 Pérdida en peso

Para evaluar este parámetro se utilizó una balanza analítica, en el que se pesaron las muestras. La pérdida de peso para cada muestra en los tres tipos de secado, corresponde al disipamiento de la humedad, la cual se pesa durante cierto tiempo hasta alcanzar una masa constante.

2.3.2.2 Tiempo de secado

Se utilizó un cronómetro digital, con lo cual se midió el tiempo transcurrido desde que las muestras ingresaron al secador hasta conseguir un peso constante de las mismas.

2.3.2.3 Humedad residual

Se utilizaron 2 g. de cada muestra deshidratada con desviación permisible de 0,5 mg con tres repeticiones, éstas se trasladaron a una cápsula de porcelana previamente tarada y desecada a 105 °C hasta masa constante; continuamente se lleva a la estufa y se deseca a 105 °C durante 3 h. La cápsula se coloca en la desecadora donde se deja enfriar a temperatura ambiente y se pesa, colocándose nuevamente en la estufa durante 1 h, repitiendo el procedimiento hasta obtener una masa constante (Miranda & Cuéllar, 2001). Los resultados se compararon con la NORMA TECNICA ECUATORIANA para TÉ NTN INEN 2381:2005.

Expresión de los resultados

$$\%H = \frac{M_1 - M_d}{M_1 - M_v} * 100$$

2.3.2.4 Sustancias solubles

Siguiendo lo establecido por (Miranda & Cuéllar, 2001), se utilizaron 5g de muestra previamente pulverizada y tamizada la cual se transfiere a un matraz con capacidad de 250 ml. se adiciona 100 ml. de agua destilada como disolvente y se agita asiduamente durante 6 h. Se deja en reposo durante 24 h, posteriormente se agita 30 minutos y se filtra con papel filtro. Se toma una alícuota de 20 ml. se transfiere a una cápsula de porcelana anteriormente tarada, se lleva a baño de agua hasta evaporar, subsiguiente se deseca en estufa a 105°C, durante 3 h, se enfría en un desecador y se pesa.

Expresión de los resultados

$$S_s = \frac{R \times 500 \times 100}{M (100 - H)}$$

2.3.2.5 Tamizaje fitoquímico

Se realizó el tamizaje fitoquímico a cada una de las muestras deshidratadas, las cuales fueron sometidas a tres extracciones sucesivas con los disolventes de polaridad creciente: éter diétilico,

etanol y agua (Figura 2.5), según técnicas establecidas por (Miranda & Cuéllar, 2001). Posteriormente, se realizó la identificación de los metabolitos secundarios haciendo uso de reactivos de ensayo. El extracto etéreo, se dividió en fracciones para efectuar los ensayos de aceites y grasas, lactonas, alcaloides y triterpenos – esteroides (Figura 2.6). De la misma manera se procedió con el extracto alcohólico y acuoso para efectuar los ensayos de la identificación cualitativa de los grupos químicos: catequinas, resinas, azúcares, lactonas , triterpenos y esteroides, saponinas, fenoles y taninos, aminoácidos, quinonas, flavonoides, antocianidina y alcaloides (Figura 2.7), taninos, flavonoides, azúcares, saponinas, mucílagos y principios amargos (Figura 2.8), respectivamente (Miranda & Cuéllar, 2001).

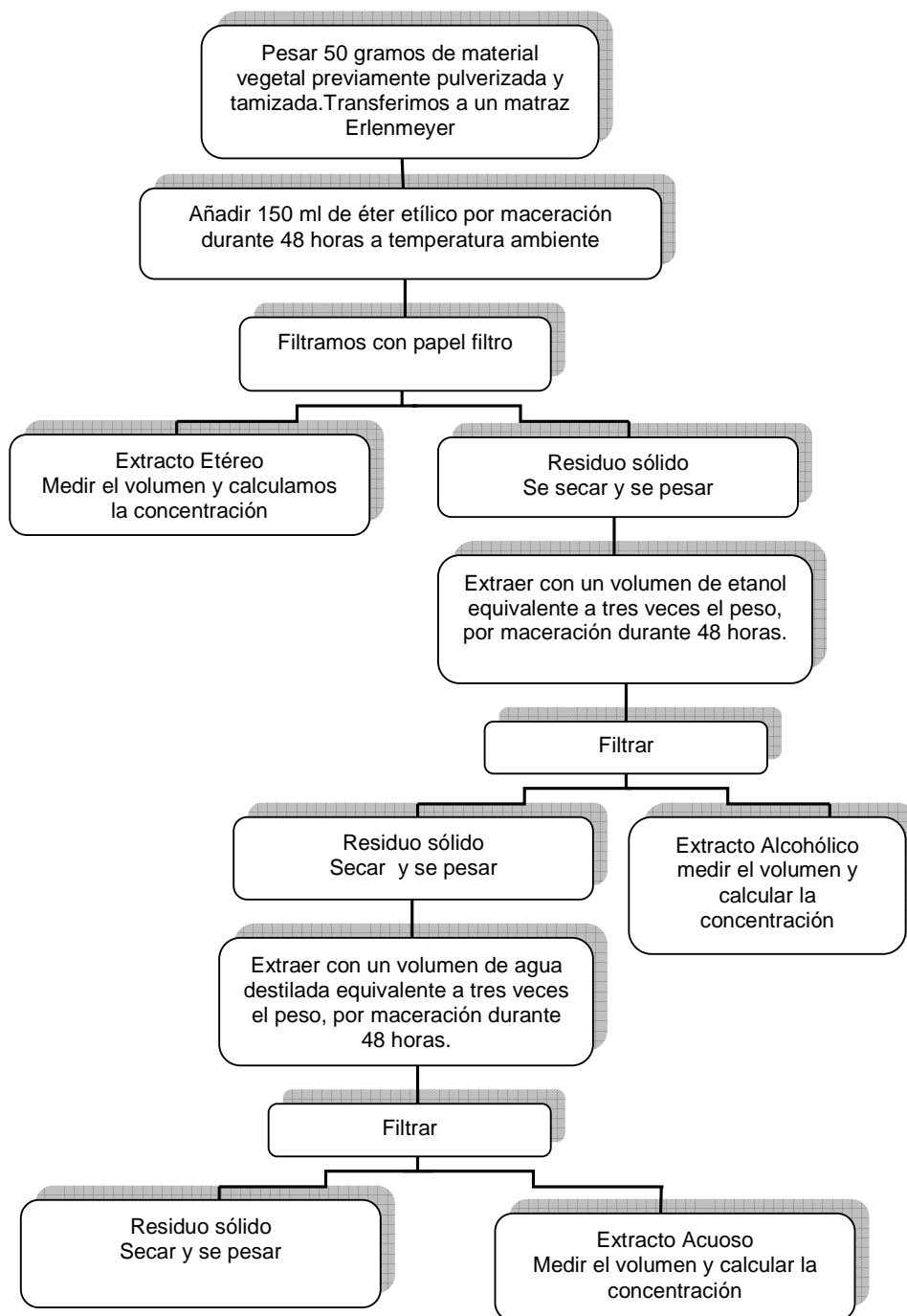


FIGURA 2.5 EXTRACCIÓN SUCESIVA DEL MATERIAL VEGETAL

Fuente: (Miranda & Cuéllar, 2001)

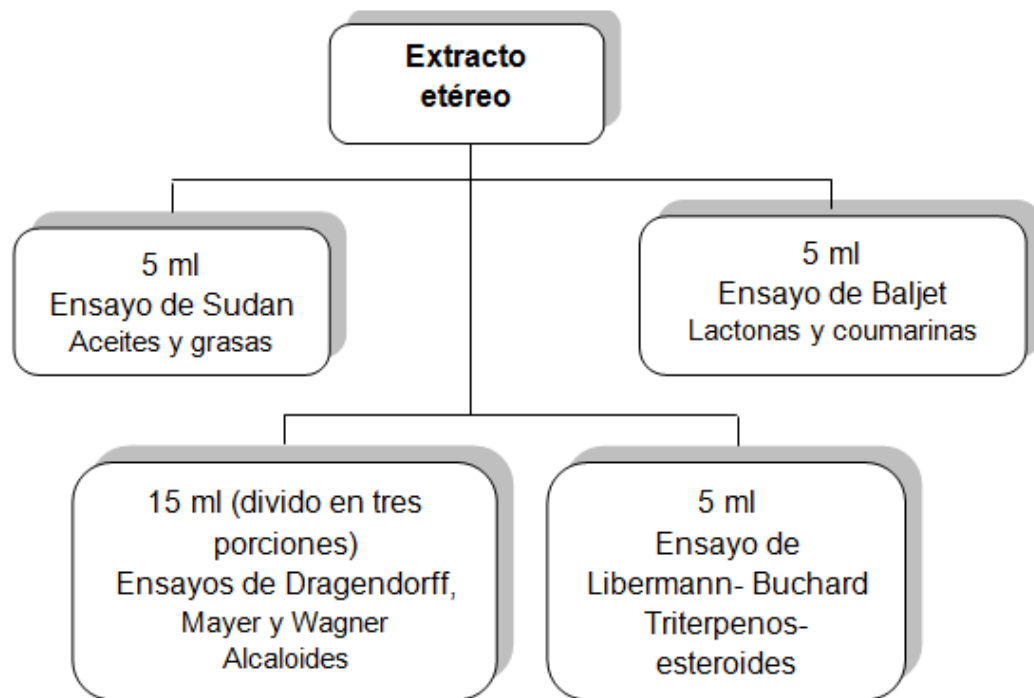


FIGURA 2.6 ENSAYOS REALIZADOS AL EXTRACTO ETÉREO

Fuente: (Miranda & Cuéllar, 2001)

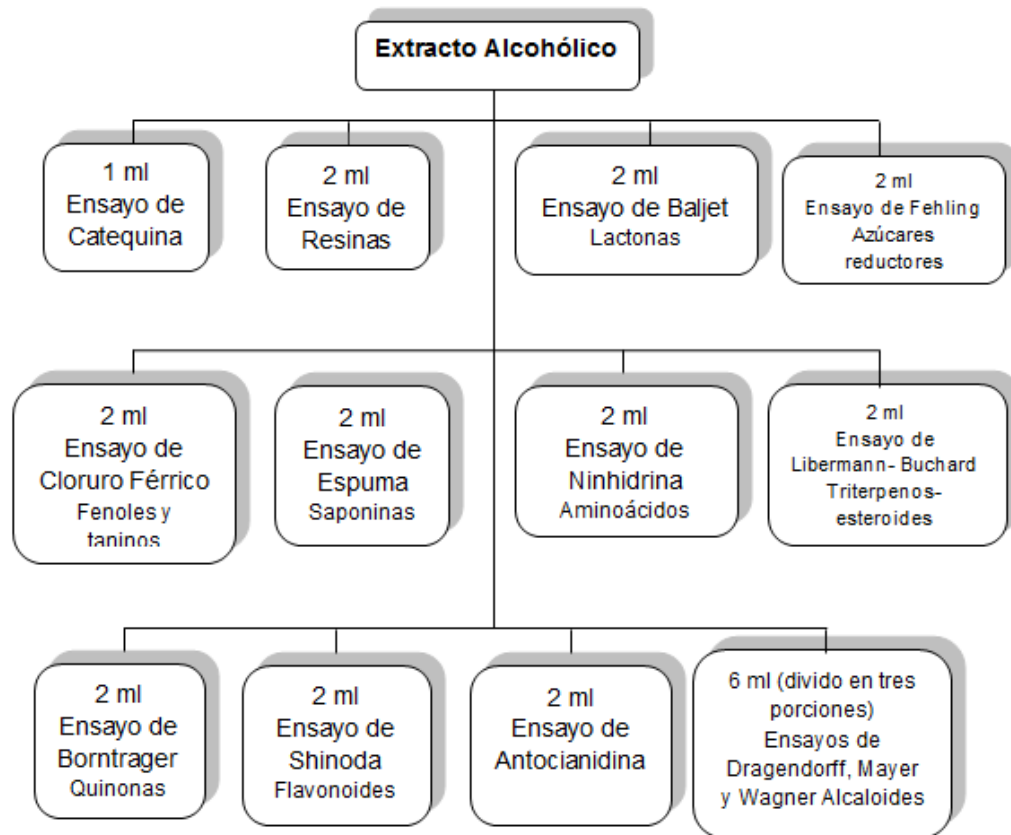


FIGURA 2.7 ENSAYOS REALIZADOS AL EXTRACTO ALCOHÓLICO

Fuente: (Miranda & Cuéllar, 2001)

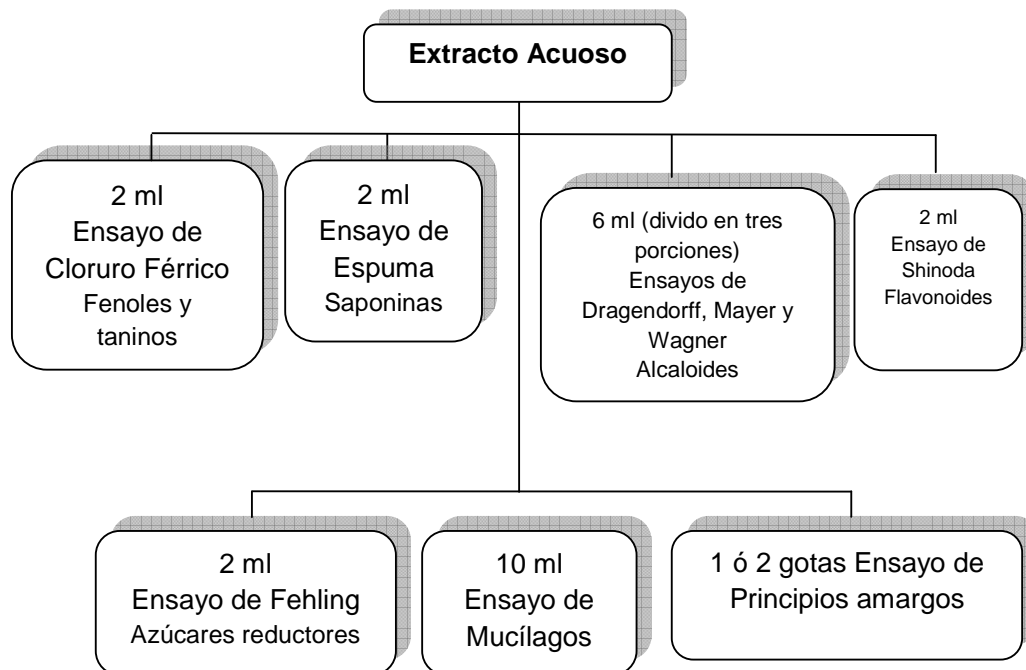


FIGURA 2.8 ENSAYOS REALIZADOS AL EXTRACTO ACUOSO

Fuente: (Miranda & Cuéllar, 2001)

2.3.2.6. Perfil cromatográfico

Para realizar el perfil cromatográfico se utilizó como muestra el extracto etéreo de la hoja, para ello se pesó 5g de la hoja de *Ilex guayusa* previamente secada, pulverizada y tamizada, se transfirió a un matraz, se añadió 15ml de éter de petróleo y se dejó en maceración por 48 horas. Posteriormente, se filtró obteniendo así la muestra a evaluar.

Por medio de un capilar se depositó una gota de la muestra en los cromatofolios TLC sílica gel 60 F254, a 1 cm de distancia del borde inferior de la placa y se introdujo en una cámara cromatográfica que contenía el eluyente adecuado para esto se probaron varios disolventes de los cuales el mejor fue, acetato de etilo, metanol, agua, en proporción (100: 13,5: 10), este asciende por capilaridad a través de la placa. Durante la elución permaneció tapado para evitar la evaporación del disolvente, hasta que la fase móvil llegó hasta alrededor de 1 cm del borde superior de la placa. Finalmente, se reveló con Dragendorff y ácido sulfúrico al 5%. Las marcas de colores que aparecieron en la cromatoplaaca se señalaron con lápiz y se calcularon los correspondientes los valores Rf de acuerdo a la fórmula.

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por el soluto}}{\text{Distancia recorrida por el disolvente}}$$

2.3.2.7 Determinación de cafeína

En la determinación de la cafeína se utilizó la cromatografía líquida de alta resolución en equipo HPLC marca Perkin Elmer Series 200. Se realizaron las lecturas de los cromatogramas a 254 nm utilizando una columna de fase reversa 80A de 150 x 0.46mm 4micron con

1 μL de cada una de las muestras purificadas, el patrón de cafeína y el blanco, usando como fase móvil una mezcla de disolventes de Agua: Acetonitrilo 90:10 con una velocidad de flujo de 0,6 ml/min. Se efectuaron varias pruebas en las que se modificaron las proporciones de cada uno de los disolventes y el tiempo de inyección, pero se mantuvo constante el flujo volumétrico, la temperatura y la presión.

Las condiciones del de quipo: Temperatura 40°C en la columna, 30°C en el sample manager, degasser 0.3 psi. Delta máximo de presión 12 psi. Columna utilizada Acquity UPLC BEH C18 2.1 x 50 mm de 1,7 μm , tiempo de retención 1.5 minutos.

2.3.3. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de resultados se utilizó estadística descriptiva por medio de medidas de tendencia central, tales como media, mediana y moda; también mediante medidas de dispersión tales como desviación estándar y coeficiente de variación, según aplique. La evaluación sensorial se realizará mediante un análisis multivariado de correspondencia a través del programa InfoStat. Los análisis se presentan en tablas y figuras.

2.4 Formulación de la bebida energética

Considerando la norma INEN 2411:2008 sobre bebidas energéticas y la NTE INEN 2304:2008, la cual establece que los requisitos que deben cumplir los refrescos no carbonatados para consumo directo. Para la obtención de la bebida energética a base de guayusa se realizaron varias formulaciones, obteniendo dos formulaciones preliminares con una concentración de 1.5 g denominada Formula A, 2g Formula B de hojas secas y molidas en 100 ml de agua; a cada uno se le añadió dosis de azúcar de 4g , sorbato de potasio de 0.05g, ácido cítrico 0.1gr y saborizante de durazno 2 gotas, se las denominaron con las dos primeras letras del abecedario A para la fórmula de 1.5 g de hojas de guayusa y B para la fórmula de 2g de hojas de guayusa.

TABLA 2.1 FORMULACIÓN DE LA BEBIDA ENERGÉTICA

Formula	Hoja seca (g)	Azúcar	Sorbato de Potasio (g)	Ácido Cítrico (g)	Saborizante permitido (gotas)
A	1.5	4	0.05	0.1	2
B	2.0	4	0.05	0.1	2

Elaborado por: Cinthia Camacho - Daysi Martínez. 2014

2.5 Pruebas físico – químicas

Las pruebas FISICO-QUIMICAS se las realizaron a la bebida.

2.5.1 Determinación del pH

La medición de pH se realizó a las dos fórmulas de la bebida, tomando como referencia NTE INEN 2304:2008 sobre refrescos. Para esto se usó un pH-metro modelo Basic 20. Crisol, que fue previamente calibrado con buffer de pH 7.00 y pH 4.01 ya que es una muestra ácida. Posteriormente se sumergieron los electrodos del medidor electrométrico de pH en un vaso de precipitación con la muestra y se anotó la lectura.

2.5.2 Determinación de cafeína de la bebida

La técnica utilizada en esta evaluación, siguió el mismo procedimiento descrito en el acápite 2.3.2.7.

Las concentraciones del estándar fueron de 2% y 3% para obtener la curva de calibración.

2.6 Pruebas microbiológicas

Para este ensayo que fue llevado a cabo en el Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador, se tuvo como marco

normativo la Norma NTE INEN 2411:2008 que establece los requisitos que deben cumplir las bebidas energéticas.

A las dos formulaciones de la bebida se realizaron dos siembras la cual tuvieron una diferencia de tiempo de dos meses, con el fin de observar si hay presencia de microorganismos alterantes, que degrade el producto haciéndolo no comestible.

2.6.1. Determinación de Coliformes, aerobios y mohos

Para este ensayo se tomó como referencia la Norma NTE INEN 2411:2008 que establece requisitos microbiológicos que deben cumplir las bebidas energéticas realizaron tres replicas y se utilizaron placas 3M Petrifilm las cuales se codificaron. En la cabina de flujo laminar ya esterilizada se procedió a sembrar, para ello con ayuda de una pipeta en posición perpendicular a la placa Petrifilm se colocó 1ml. De muestra en el centro del film inferior y se dejó caer el film superior con cuidado así evitamos introducir burbujas de aire. Con un diseminador se ejerció presión sobre la placa Petrifilm para proporcionar uniformidad. Posteriormente para Coliformes se incubó por un tiempo de 24 horas a 36 °C, aerobios totales 48 horas a 36 °C y para mohos y levaduras por un periodo de 72 horas a 25 °C. Subsiguiente se realizó el conteo.

2.7 Pruebas sensoriales

Con el propósito de testear la acogida que podría tener la bebida en potenciales consumidores se realizaron dos tipos de evaluaciones sensoriales correspondientes a la clasificación “afectiva”: **i)** prueba de preferencia; y, **ii)** prueba de medición del grado de satisfacción, para ello se conformó paneles de degustación de seis jueces cada uno con cinco réplicas, ambas pruebas fueron realizadas el 17 de mayo del 2014 en el laboratorio de análisis sensorial de licenciatura en nutrición de la ESPOL, en el horario de 11h00 a 13h00 (figura 2.9 y 2.10).

Prueba de preferencia: consiste en pedirle al juez que elija cuál de las dos muestras prefiere (Andalzua, 1994), con los siguientes detalles:

- 30 jueces
- Los jueces tuvieron edades comprendidas entre 18 a 45 años
- La distribución por sexo fue equilibrada
- La cantidad de muestra para la prueba fue de 50 ml. por juez
- La temperatura de la muestra estuvo entre 5 y 10°C
- Cada una de las muestras fueron codificadas con números aleatorios

Se incorpora como anexo 2 el formato del test de prueba preferencia.

Prueba de medición de grado de satisfacción mediante test de escalas hedónicas verbales

Es aquella que se aplica cuando se deben evaluar más de dos muestras o cuando se desea obtener mayor información acerca de un producto; para las escalas hedónicas verbales se describe una escala de las sensaciones producidas (Andalzua, 1994), la prueba tuvo las siguientes características:

- Se utilizó un test de escalas hedónicas verbales en siete niveles
- 30 jueces
- Los jueces tuvieron edades comprendidas entre 18 a 45 años
- La distribución por sexo fue equilibrada
- La cantidad de muestra para la prueba fue de 50 ml. por juez
- La temperatura de la muestra estuvo entre 5 y 10°C.
- Cada una de las muestras fueron codificadas con números aleatorios.

Se incorpora como anexo 3 el formato de test de prueba de medición de grado de satisfacción mediante escalas hedónicas. Para el

procesamiento de resultados de esta prueba se utilizó el programa InfoStat, previa hipótesis donde H_1 no es igual a H_2 .



FIGURA 2.9 LABORATORIO DE ANÁLISIS SENSORIAL EXISTENTE EN LICENCIATURA EN NUTRICIÓN DE LA ESPOL

Elaborado por: Cinthia Camacho- Daysi Martínez. 2014



FIGURA 2.10 JUECES EVALUANDO LAS PRUEBAS SENSORIALES REALIZADAS A LAS DIFERENTES FORMULACIONES DE LA BEBIDA ENERGÉTICA

Elaborado por: Cinthia Camacho - Daysi Martínez. 2014

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para garantizar la calidad de la materia prima y la del producto elaborado, se realizaron diferentes evaluaciones y los resultados se presentan a continuación:

3.1. Análisis físico-químico

Determinación de cenizas

La determinación de cenizas es otro de los parámetros físico-químicos importantes a determinar en un material vegetal, ya que las plantas absorben del suelo el agua y las sales minerales para su crecimiento y desarrollo, el suelo puede estar contaminado con metales pesados por desechos de industrias y/o condiciones medio

ambientales que hacen que el material vegetal no pueda ser utilizado (Valdivia, 2015).

Al material objeto de estudio se le realizó la determinación de las cenizas totales, cenizas solubles en agua y cenizas insolubles en ácido clorhídrico cuyos resultados se presentan en la tabla 3.1

TABLA 3.1 ANÁLISIS DE CENIZAS EN LOS DIFERENTES TIPOS DE SECADO

MÉTODO DE SECADO	CENIZAS TOTALES			CENIZAS INSOLUBLES EN ÁCIDO			CENIZAS SOLUBLES EN AGUA		
	X	S	CV	X	S	CV	X	S	CV
AMBIENTE	6,87a	0,115	0,02	0,87b	0,07	0,11	3,10c	2,12	6,11
HORNO ELÉCTRICO	6,85a	0,110	0,02	0,86b	0,06	0,10	3,11c	2,12	5,98
HORNO SOLAR	6,86a	0,109	0,02	0,87b	0,06	0,10	3,09c	2,10	6,00

Leyenda: X = valor medio; S = desviación estándar de la media; CV= coeficiente de variación. Letras iguales indican que no existen diferencias significativas para una misma determinación ($p \geq 0,05$)

Elaborado por: Cinthia Camacho - Daysi Martínez 2014

Como se observa, no se encontraron diferencias significativas en los valores de cenizas totales determinados a las hojas de guayusa secadas por los diferentes métodos, lo cual era de esperar ya que fueron recolectada de un mismo lugar. Las Farmacopeas plantean un

índice de cenizas totales de hasta un 5% (Lou-Zhi-cen, 1980; WHO 1998), los valores encontrados fueron algo superiores, pero esto puede estar en dependencia de la riqueza en minerales del suelo.

Análisis de pérdida en peso

Este análisis se realizó a los diferentes métodos de secado; al horno solar, al ambiente y en horno eléctrico, los resultados se analizaron de acuerdo al método empleado.

Secado en horno solar

El proceso de secado se realizó durante dos días, desde las 06:00 h de la mañana del primer día hasta las 19:00 h del segundo día, se hicieron tres replicas. En la tabla 3.2 se exponen los resultados obtenidos.

TABLA 3.2 PÉRDIDA DE PESO EN MÉTODO DE SECADO EN HORNO SOLAR DE HOJA DE *ILEX GUAAYUSA* P \leq 0.05

Día		Hora	Temperatura	PROMEDIO (*)	DE	% perdida
Día 1	P. I	08:00 h	27,38	50,52	0,38	
		12:10 h	42,08	31,29	0,78	38,06
		16:00 h	38,59	20,55	1,27	59,32
		19:00 h	27,73	16,56	1,33	67,22
Día 2		08:00 h	28,02	15,97	1,12	68,39
		12:00 h	41,05	14,8	0,8	70,70
		16:00 h	36,03	13,86	0,97	72,57
	P. F	19:00 h	27,5	13,09	0,82	74,09

Leyenda: DE= desviación estándar; (*) = promedio de las tres replicas;

% = porcentaje de perdida en peso respecto al peso inicial

Elaborado por: Cinthia Camacho - Daysi Martínez 2014.

El peso se registró en intervalos variados; según la tabla 3.2, el mayor porcentaje de pérdida de peso se logró en el primer intervalo de cuatro horas, con una pérdida de 19,23 g para un 38,06 %. En el segundo intervalo (8 horas) también se logró un porcentaje importante de pérdida de peso, alcanzándose un valor de 59,32 % respecto al peso inicial y a las 11 horas de secado la pérdida fue de 67,22 %.

Durante el proceso de secado por este método las hojas perdieron un 74,09 % de peso y hasta alcanzar el peso constante.

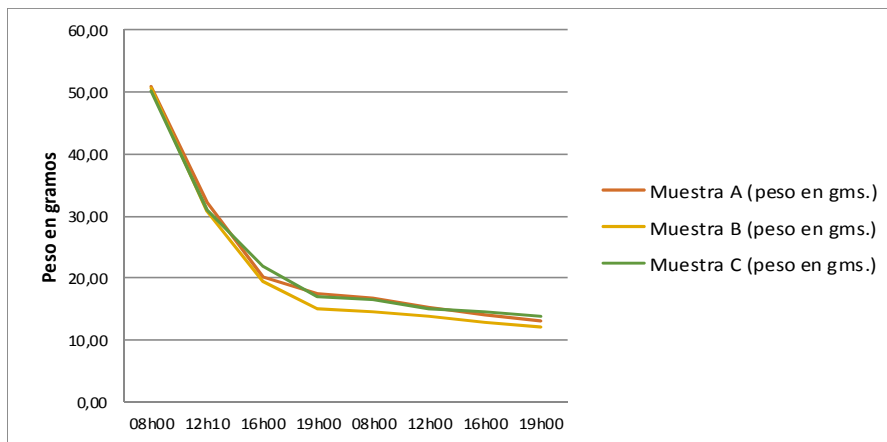


FIGURA 3.1 PÉRDIDA DE PESO EN MÉTODO DE SECADO EN HORNO SOLAR DE TRES MUESTRAS DE HOJA DE *ILEX GUAYUSA* ($P \leq 0.05$).

Elaborado por: Daysi Martínez – Cinthia Camacho. 2014.

Como se observa en la figura 3.1 el comportamiento de las tres muestras analizadas fue similar; sin observarse diferencia significativa entre ellas.

Secado al ambiente

Para alcanzar un peso constante se emplearon 13 días para el proceso de secado al ambiente, (del 15 al 27 de noviembre del 2013), la temperatura promedio mínima durante los días de secado fue de 21,94° C. y la máxima de 31,84° C.

En la tabla 3.3 se presenta los pesos promedios de la pérdida de peso de las muestras en el método de secado al ambiente.

**TABLA 3.3 PÉRDIDA DE PESO EN EL MÉTODO DE SECADO
AL AMBIENTE DE LAS HOJAS DE *ILEX GUAYUSA* (P≤0.05)**

Día		Temperatura		PROMEDIO (*)	DE	% perdida
		Temp. Mínima	Temp. máxima			
1 día	P.I	21,5	32	50,09	0,04	
2do. día		21,5	32	26,62	0,1	46,86
3er. día		22	32	25,56	0,12	48,97
4to. día		21,5	32	24,9	0,02	50,29
5to. día		21	29	24,87	0,01	50,35
6to. día		22,5	33	24,69	0,02	50,71
7mo. día		21,5	33	25,01	0,01	50,07
8vo. día		21,8	31,5	24,45	0,15	51,19
9no. día		22,9	32	24,25	0,11	51,59
10mo. día		22	31,5	23,88	0,14	52,33
11er. día		22	33,9	23,6	0,13	52,88
12do. día	P.F	22	35	23,54	0,15	53,00

Leyenda: DE= desviación estándar
% perdida= porcentaje de pérdida de peso con respecto al peso inicial.
(*) = promedio de las tres replicas

Elaborado por: Daysi Martínez – Cinthia Camacho. 2014.

En el secado al ambiente, a pesar de que el tiempo de secado fue mayor, la pérdida de peso en agua, tuvo un comportamiento más lento

y solo se alcanzó al cabo de 12 días de secado (hasta peso constante), un 53,00 % de pérdida total.

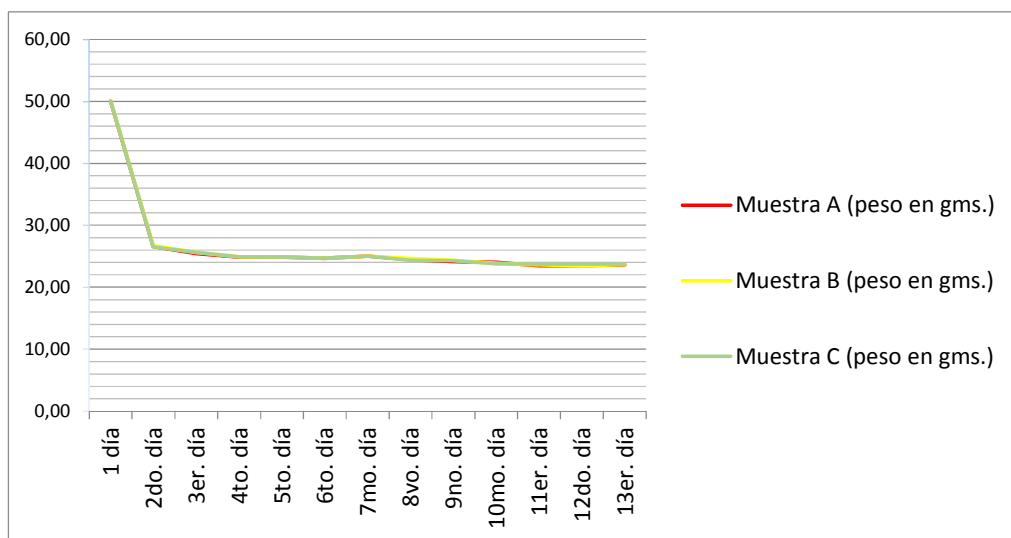


FIGURA 3.2 PÉRDIDA DE PESO EN MÉTODO DE SECADO AL AMBIENTE DE HOJA DE *ILEX GUA YUSA* ($P \leq 0.05$)

Elaborado por: Cinthia Camacho- Daysi Martínez. 2014.

Como lo muestra en la figura 3.2, por este método no se presentaron diferencia significativa entre las muestras estudiadas. Se observó que durante el primer día se logró el mayor porcentaje de disminución de peso por efectos de la pérdida de agua, y a partir del décimo segundo día se alcanzó el peso constante.

Secado en horno eléctrico

El proceso de secado se realizó por triplicado en el periodo de un día durante 13 horas continuas, los resultados se presentan en la tabla 3.4 Como se observa, se tuvo una pérdida considerable a las 6 horas de un 62,57 % y a las 13 horas se logró alcanzar el peso constante con una pérdida de agua del 79,11 %, lo que denota un proceso muy rápido.

TABLA 3.4 PÉRDIDA DE PESO EN MÉTODO DE SECADO EN HORNO ELÉCTRICO DE HOJA DE *ILEX GUAYUSA* ($P \leq 0.05$)

Día	Hora		T	Promedio pesos	DE	% PERDIDA
Día 1	0	P.I	46.11	50.6	0.31	
Día 1	1		46.11	45.01	0.3	11.05
Día 1	2		46.11	33.77	2.5	33.26
Día 1	3		46.11	28.35	2.34	43.97
Día 1	4		46.11	24.64	2.27	51.30
Día 1	5		46.11	21.63	2.31	57.25
Día 1	6		46.11	18.94	1.8	62.57
Día 1	7		46.11	17.41	2.19	65.59
Día 1	8		46.11	15.32	1.65	69.72
Día 1	9		46.11	13.79	1.8	72.75
Día 1	10		46.11	12.19	1.49	75.91
Día 1	11		46.11	11.63	1.13	77.02
Día 1	12		46.11	11.3	0.92	77.67
Día 1	13	P.F	46.11	10.57	0.53	79.11

Leyenda: DE= desviación estándar; T= temperatura del horno; P.I= peso inicial de las hojas

P.F = peso final de las hojas; %promedio= porcentaje de la pérdida de agua de las hojas con respecto al peso inicial; (*)= promedio de pérdida de peso en agua de la hojas

Elaborado por: Cinthia Camacho - Daysi Martínez 2014.

En la figura 3.3 se observa que al igual que en los casos anteriores, se muestra un comportamiento similar para las tres muestras analizadas

sin diferencias significativas. La pérdida de peso fue estable siendo menor en la última fase.

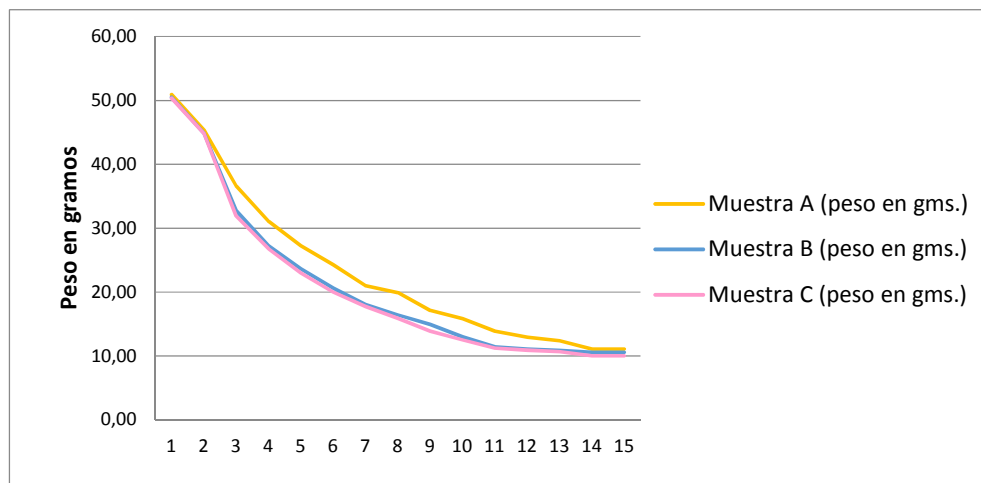


FIGURA 3.3 PÉRDIDA DE PESO EN MÉTODO DE SECADO EN HORNO ELÉCTRICO DE TRES MUESTRAS DE HOJA DE *ILEX GUAYUSA* ($P \leq 0.05$).

Elaborado por: Cinthia Camacho - Daysi Martínez 2014.

Análisis comparativo de pérdida de peso por métodos

Si realizamos una comparación entre los porcentajes de pérdida de peso en agua por los tres métodos estudiados se aprecia que el método de secado en horno eléctrico fue el más eficiente ya que se logró eliminar la mayor cantidad de agua en un tiempo menor.

Es evidente que en este método influye de forma determinante la temperatura constante que se aplica durante todo el proceso, pero a su vez tiene la desventaja de un consumo elevado de energía eléctrica, El secado al ambiente no logra una pérdida de agua elevada (sólo 53,0 %), presenta además el inconveniente de un elevado tiempo de secado por las fluctuaciones de temperatura ambiente y el riesgo de posibles contaminación microbiana. En el secado en horno solar, se logra una pérdida de humedad del 74,09 %, no se puede controlar las temperaturas hay posible contaminación microbiana y cuando desaparece la luz solar las hojas absorben humedad nuevamente.

Análisis de resultados de humedad residual

La humedad residual es un parámetro físico-químico determinante en la calidad de una materia prima vegetal, ya que un exceso de agua puede provocar transformaciones enzimáticas y contaminación microbiana.

Los resultados obtenidos para este parámetro en las hojas de guayusa sometidas a proceso de secado por diferentes métodos, se presenta en la tabla 3.5

TABLA 3.5 ANÁLISIS DE HUMEDAD RESIDUAL DE LOS DIFERENTES MÉTODOS DE SECADO DE *ILEX GUAYUSA*

Determinación de humedad residual				
Método de secado	X	DE	EE	CV
Ambiente	7,82	0,41	0,24	5,26
Horno eléctrico	7,33	0,44	0,25	5,96
Solar	7,65	0,08	0,04	0,99

Leyenda. X= valor medio DE=desviación estándar
 CV=Coeficiente de Variación EE=error estándar

Elaborado por: Cinthia Camacho-Daysi Martínez 2014.

Como se observa los menores porcentajes de humedad residual se obtuvieron para las hojas secadas en horno eléctrico con un 7,33 %, seguido del horno solar 7,65; lo cual está en correspondencia con perdida en peso de agua que se obtuvo por estos métodos de secado. El porcentaje de humedad de secado al ambiente fue superior.

Entre los tres métodos se presentaron diferencias significativas y los resultados se muestran en la figura 3.4

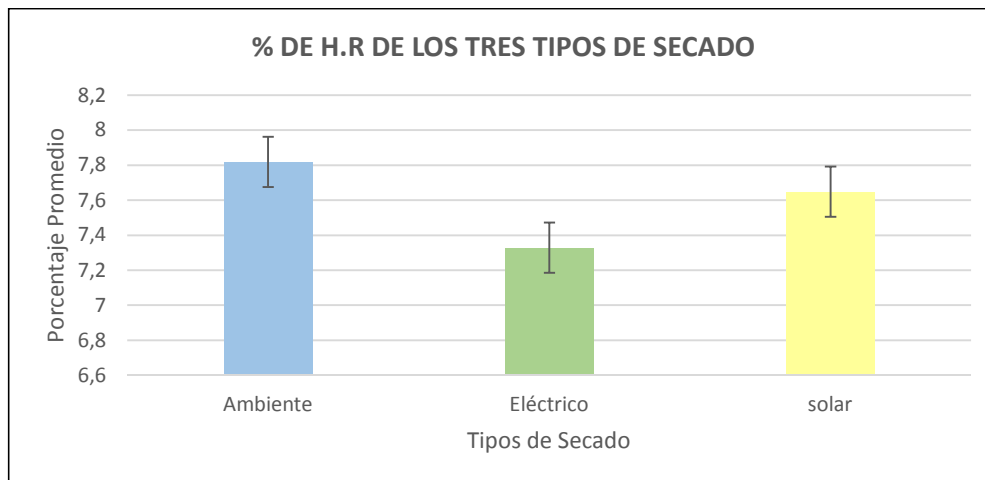


FIGURA 3.4 PORCENTAJE DE HUMEDAD RELATIVA DE LA HOJA DE *ILEX GUAYUSA* MEDIANTE LOS TRES TIPOS DE SECADO.

Elaborado por: Cinthia Camacho - Daysi Martínez 2014

Análisis de resultados de sustancias solubles en agua

Las sustancias solubles en agua como parámetros físico-químicos permiten conocer la solubilidad de los compuestos presentes en las hojas de guayusa y valorar la posible influencia de los métodos de secado sobre este parámetro. Las normas por las que se rigen el análisis de los componentes químicos *Ilex guayusa* toman como referencia parámetros bromatológicos NTN INEN 2381: 2005

TABLA 3.6 ANÁLISIS DE SUSTANCIAS SOLUBLES EN AGUA DE *ILEX GUAYUSA* EN LOS DIFERENTES TIPOS DE SECADO

Determinación de Sustancias solubles en agua				
Método de secado	X	DE	EE	CV
Ambiente	7,38	1,24	0,72	16,84
Horno eléctrico	7,13	1,18	0,68	16,54
Solar	8,04	0,03	0,02	0,34

Leyenda: X=media; DE= desviación estándar; E.E= Error estándar, CV=Coeficiente de Variación, ($P \leq 0.05$).

Elaborado por: Daysi Martínez – Cinthia Camacho. 2014

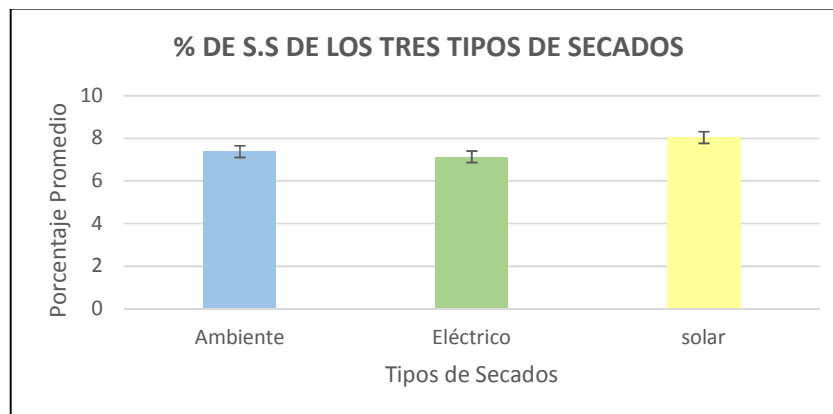


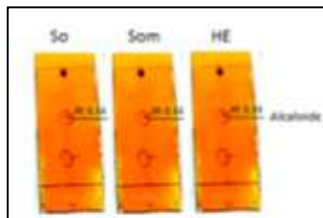
FIGURA 3.5 PORCENTAJE DE SUSTANCIAS SOLUBLES DE LA HOJA DE *ILEX GUAYUSA* MEDIANTE LOS TRES TIPOS DE SECADO

Elaborado por: Cinthia Camacho - Daysi Martínez 2014.

Perfil cromatográfico

Con la finalidad de comprobar la presencia de alcaloides evidenciados en el tamizaje, se realizaron a todas las muestras obtenidas en los diferentes tipos de secado, un perfil cromatográfico con mezclas de disolventes: acetato de etilo, metanol, agua (100: 13,5: 10) y dos tipos de revelado: con reactivo de Dragendorff y con ácido sulfúrico al 5 %. En el revelado con Dragendorff se observaron en las placas cromatográfica dos manchas cuyos promedios de Rf fueron de 0,22 y 0,55; y, en el revelado con ácido sulfúrico al 5 %, la presencia de cinco manchas cuyos Rf estuvieron entre 0,11 y 0,63. De éstas, se seleccionaron aquellas manchas que presentaron un Rf alrededor de 0,5, por ser un referente de la presencia de alcaloides, según Miranda y Cuellar, 2001, por ser las que se revelaron con el reactivo específico para alcaloides (Dragendorff). En la figura 3.6 y 3.7 se presentan las placas cromatográficas con los dos tipos de revelados utilizados, y, en la tabla 3.7 los promedios de los Rf obtenidos en las muestras.

El valor de Rf observados en las muestras coinciden con lo informado por Miranda y Cuéllar, 2001, para cafeína, lo cual corrobora la presencia de alcaloides en todas las muestras sometidas a los diferentes tipos de secado, no existiendo diferencias significativas entre ellas y lo reportado ($P \leq 0.05$).



Leyenda: So = sol; Som = sombra; HE = horno eléctrico

FIGURA 3.6 PLACAS TLC REVELADAS CON REACTIVO DE DRAGENDORFF

Elaborado por: Cinthia Camacho - Daysi Martínez. 2014



Leyenda: So = sol; Som = sombra; HE = horno eléctrico

FIGURA 3.7 PLACAS TLC REVELADAS CON ÁCIDO SULFÚRICO

Elaborado por: Cinthia Camacho - Daysi Martínez. 2014

TABLA 3.7 VALORES PROMEDIO DE LOS Rf EN EL REVELADO CON ÁCIDO SULFÚRICO Y DRAGENDORFF

Rf	Revelado con Ácido Sulfúrico		Revelado con Dragendorff	
	Promedio	DE	Promedio	DE
Rf1	0,11	0	0,22	0,012
Rf2	0,24	0,015	0,55	0,045
Rf3	0,33	0,010		
Rf4	0,53	0,025		
Rf5	0,63	0,046		

Leyenda: DE= desviación estándar

Elaborado por: Cinthia Camacho - Daysi Martínez. 2014

Determinación de cafeína por HPLC

Se cuantificó la presencia del alcaloide cafeína en todas las muestras de hojas secas utilizando la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y el patrón de cafeína. Los resultados se muestran en la tabla 3.8

**TABLA 3.8 RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE CAFEÍNA
EN LAS HOJAS SECAS DE *ILEX GUAYUSA* POR EL MÉTODO
DE HPLC**

Método de secado	% Cafeína	DE
Horno Eléctrico	3,71	0,11
Ambiente	3,02	0,07
Horno Solar	2,98	0,15

Elaborado por: Cinthia Camacho- Daysi Martínez. 2014

Como se observa en la figura 3.8, el porcentaje de cafeína obtenido fue mayor para las hojas de guayusa secadas en horno eléctrico, el cual difiere significativamente de los porcentajes obtenidos por los otros métodos, el menor porcentaje se obtuvo para las hojas secadas en horno solar, aunque entre ésta y las secadas en ambiente no se encontraron diferencias significativas.

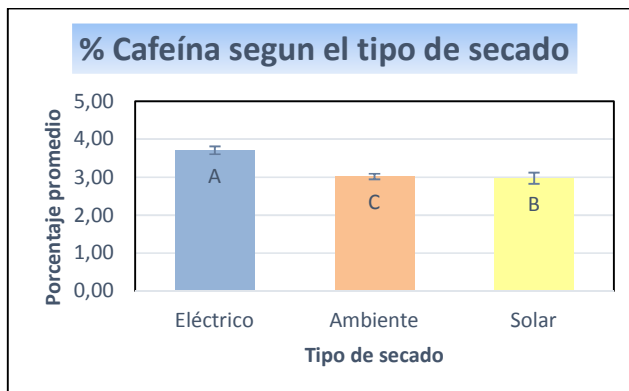


FIGURA 3.8 PORCENTAJE DE CAFEÍNA DE LAS HOJAS DE *ILEX GUAYUSA*, SECADAS POR DIFERENTES MÉTODOS DE SECADO.

Elaborado por: Cinthia Camacho - Daysi Martínez 2014.

3.2. Análisis fitoquímico de la *Ilex guayusa*

Los ensayos cualitativos o tamizaje fotoquímico, no pueden ser considerados como absolutos en cuanto a la presencia o ausencia de un metabolito determinado, puesto que un resultado falso positivo puede darse por la presencia de compuestos de estructura diferente, que interfieran con el ensayo que se realiza. Y se puede obtener también un resultado falso negativo en el cual influyan, entre otros, la selección errónea del disolvente empleado para la extracción; la presencia de sustancias extrañas que interfieran, o una concentración en el orden de trazas del compuesto

ensayado. Amén de estas consideraciones, el tamizaje fitoquímico permite tener una idea de los grupos químicos presentes en la especie. En los resultados obtenidos para las hojas de guayusa, se evidenció la presencia de los siguientes grupos químicos (tabla 3.9): alcaloides, flavonoides, catequinas, fenoles, azúcares reductores, saponinas, triterpenos, aceites y grasas y taninos, en todas las muestras obtenidas en los tres tipos de secado.

**TABLA 3.9 TAMIZAJE FITOQUÍMICO DE LAS HOJAS DE *ILEX*
GUA YUSA SECADAS POR DIFERENTES MÉTODOS**

Metabolito	Método	Extracto Etéreo			Extracto Alcohólico			Extracto acuoso		
		SS	SA	SH	SS	SA	SH	SS	SA	SH
Alcaloides	Dragendorff	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++
	Wagner	-	-	-	+	+	+	+++	++	++
	Mayer	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Flavonoides	Shinoda				-	-	-	+	+	+
	Antocianidinas				-	-	-			
	Catequinas				+	+	+			
Fenoles y Taninos	Cloruro Férrico				+	+	+	+	+	+
Azúcar reductores	Fehling				+	+	+	+	+	+
Mucilagos	Mucilagos							-	-	-
Principios Amargo	Organoléptico							-	-	-
Saponinas	Espuma				-	-	-	+	+	+
Tripterpenos Esteroides	LiebermanBuchard	+	+	+	+	+	+			
Aminoácidos	Ninhidrina				-					
Quinonas	Borntranger				++	++	++			
Aceites y Grasas	Sudan	+	+	+						
Lactonas	Baljet	-	-	-	-	-	-			
Resinas	Resinas				-	-	-			

S.S = Secado solar; S.A = Secado al ambiente; S.H = Secado en horno eléctrico

Elaborado por: Cinthia Camacho - Daysi Martínez 2014

Obtención y Análisis Físico-Químico (Bebida)

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los parámetros físicos químicos del secado, se seleccionó como método el que utiliza el Horno eléctrico, por ser el que empleaba menor tiempo, las hojas presentaban menor porcentaje de humedad y no se presentaban diferencias en los parámetros físico químicos, respecto a los otros métodos de secado.

A partir de éstas se prepararon dos bebidas (té de guayusa), las cuales se diferenciaban en la concentración de hojas para formular el té, la formulación **A** que contenía 1,5 g de hojas secas y molidas en 100 ml de agua y la formulación **B** que contenía 2 g de hojas secas y molidas en 100ml de agua, siendo el resto de los componentes de la formulación iguales para ambas como el azúcar, sorbato de potasio, ácido cítrico y saborizante de durazno.

Análisis físico-químico (Bebida)

A las bebidas obtenidas, se les determinaron algunos parámetros físico-químicos y microbiológicos, así como se les determinó el porcentaje de cafeína, empleando como método de análisis la cromatografía líquida de alta resolución HPLC.

Determinación del pH

La acidez o la alcalinidad de las soluciones acuosas se caracterizan por el valor del índice de hidrógeno, pH. El pH es por tanto un índice numérico que se utiliza para expresar la mayor o menor acidez de una solución en función de los iones hidrógeno.

A las bebidas obtenidas se les determinó el valor de pH y los resultados se presentan en la tabla 3.10.

TABLA 3.10 DETERMINACIÓN DE PH

Fórmula	pH1	pH2	pH3	Promedio
Fórmula A	3,36	3,4	3,25	3,33
Fórmula B	3,54	3,48	3,32	3,44

Elaborado por: Daysi Martínez – Cinthia Camacho. 2014

A cada formulación se le realizó tres mediciones de pH y el promedio de éstas se encuentra en el rango de pH ácido, muy similar para ambas bebidas estos resultados se comparó con el procedimiento para la conservación de una bebida que contiene té (Anslow, 16 marzo 2003) y con la Norma.

Determinación de Cafeína en las bebidas

Teniendo en cuenta que la guayusa es utilizada tradicionalmente como una bebida energizante y conociendo que el porcentaje de cafeína encontrado en las hojas secas en horno solar fue de 3,71 %, se realizó un ensayo con la finalidad de conocer el la presencia y concentración de la cafeína en las bebidas elaboradas.

Las pruebas se realizaron empleando el método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), para la cual se utilizó un estándar de cafeína en una concentración de 1mg/ml.

En las figuras 3.9 y 3.10, se exponen los cromatogramas de las bebidas analizadas.

La formulación A (figura 3.9), presentó un cromatograma donde se observa un pico cromatográfico mayoritario coincidente en tiempo de retención con el de la cafeína utilizada como patrón, con un valor de 0,72 minutos.

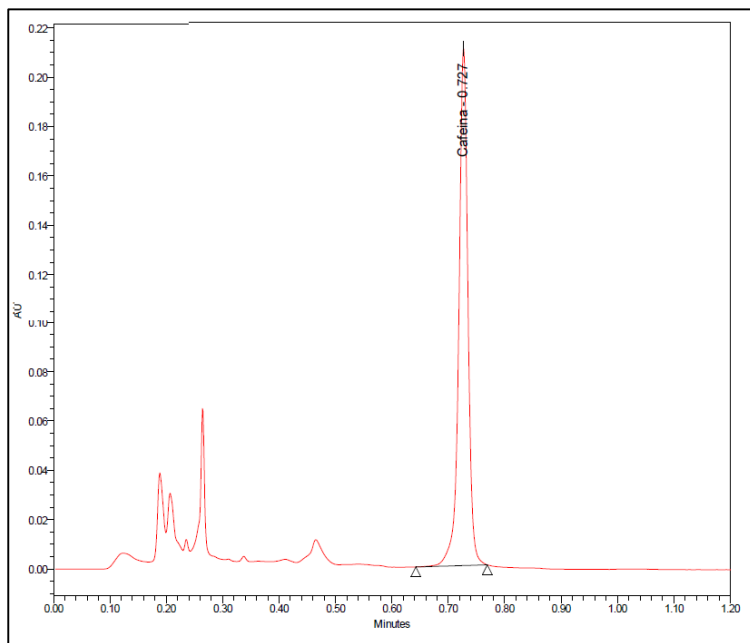


FIGURA 3.9 CROMATOGRAMA HPLC DE LA FORMULACIÓN A, BEBIDA ENERGÉTICA

Elaborado por: Cinthia Camacho - Daysi Martínez 2014.

Para la formulación B se obtuvo un cromatograma muy similar, observándose un pico cromatográfico mayoritario a un tiempo de retención de 0,73 (figura 3.10), la cual coincidió igualmente con el determinado para la cafeína.

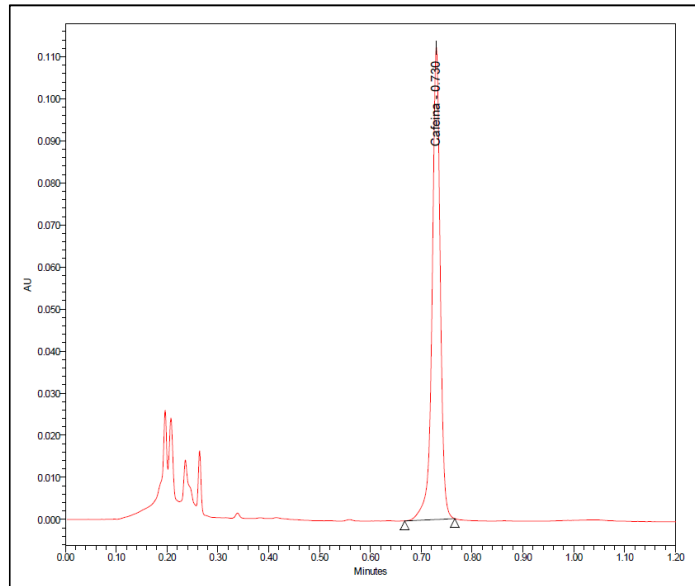


FIGURA 3.10 CROMATOGRAMA HPLC DE LA FORMULACIÓN B, BEBIDA ENERGÉTICA

Elaborado por: Cinthia Camacho - Daysi Martínez 2014.

La concentración de cafeína en las formulaciones, fue calculada a través de la ecuación de la curva de calibración:

$$Y = 4.92e+006 X - 1.54e+003$$

Donde X representa la concentración Y = área bajo la curva.

De esta forma se determinó la concentración de cafeína que resultó ser de 0.033 ppm para la formulación A y 0,053 ppm para la formulación B.

La única diferencia entre estas formulaciones es la cantidad de hojas de guayusa empleadas para la elaboración del té y el comportamiento de la concentración de cafeína responde a la cantidad de hojas empleadas en su elaboración; así para la formula A que contiene 1,5 g de hojas secas en 100 ml dio una concentración de 0,033ppm que equivale a 330 mg de cafeína en un litro de agua y la formula B que contiene 2.0 g de hojas secas en 100 ml dio una concentración de 0,053ppm de cafeína que equivale a 530mg de cafeína en un litro de agua el cual cumple con la Norma NTN INEN 2411:2008 de Bebidas Energéticas.

Análisis de contaminantes de la bebida

De acuerdo a la Norma Técnica Ecuatoriana de té (NTE INEN 2381:2005) el contenido máximo de contaminantes en el té son: Arsénico, As 1,0 mg/g, Plomo, Pb 0,5 mg/g. En la bebida elaborada se obtuvo los siguientes resultados

TABLA 3.11 CONTENIDO DE CONTAMINANTES EN LA BEBIDA

Parámetros	Mg/g
Arsénico, As	No detectable
Plomo, Pb	No detectable

Elaborado por: Daysi Martínez – Cinthia Camacho. 2014

Como se observa en la tabla 3.11 no se detectó la presencia de contaminantes, cumpliendo los parámetros de la norma.

3.3 Análisis microbiológico

Este ensayo se realizó a las dos formulaciones de la bebida energética, se tomó como referencia la norma NTE INEN 2 411:2008, donde se llevó a cabo la determinación del recuento de coliformes, aerobios y el recuento de mohos y levaduras con la finalidad de garantizar que el producto sea inocuo y evitar el deterioro microbiológico del mismo.

**TABLA 3.12 RESULTADOS DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS
EN LAS BEBIDAS ELABORADAS**

MICROORGANISMOS	n	FORMULA A	FORMULA B
E. COLI/Coliformes NMP/100cm ³	3	ausencia	Ausencia
Aerobios ufc/cm ³	3	ausencia	Ausencia
Moho up/cm ³	3	ausencia	Ausencia
Levadura up/cm ³	3	ausencia	Ausencia

n= número de réplicas en la siembra

Elaborado por: Cinthia Camacho - Daysi Martínez 2014.

Como se indica en la tabla 3.12, los resultados revelaron ausencia de contaminación microbiana en las dos formulaciones tanto en la primera siembra como en la segunda siembra realizada después de dos meses de elaborado y almacenado en refrigeración a 4° C.

3.4. Análisis sensorial

Con vistas a conocer la aceptación de la bebida elaborada, se realizó el análisis sensorial de la misma con 30 jueces de diferentes edades y sexos.

Los resultados de este estudio se realizaron mediante un análisis multivariado de correspondencia a través del programa InfoStat.

En la figura 3.11 se presenta la relación entre edad y sexo de los jueces con respecto a la bebida A.

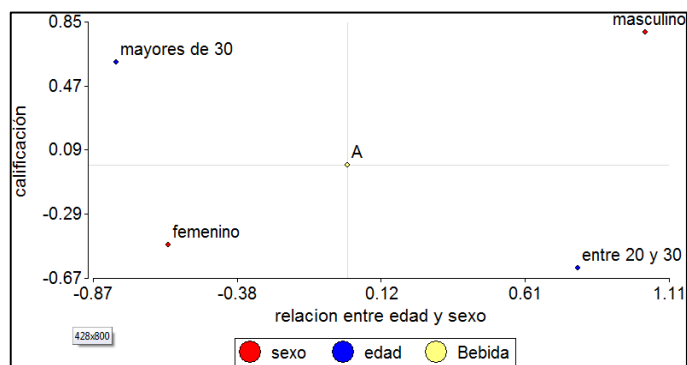


FIGURA 3.11 RELACIÓN ENTRE EDAD Y SEXO DE LOS JUECES CON RESPECTO A LA BEBIDA A

Elaborado por: Cinthia Camacho - Daysi Martínez 2014

Con respecto al grafico se demuestra que no hay relación entre la edad y el sexo de los jueces con respecto a la bebida A que tiene una concentración de 330 mg/L de cafeína.

Igual análisis se realizó para la bebida B (figura 3.12), donde se demostró igualmente, que no había relación entre edad y sexo de los jueces con respecto a esta bebida B que tiene una concentración de 530mg/L de cafeína.

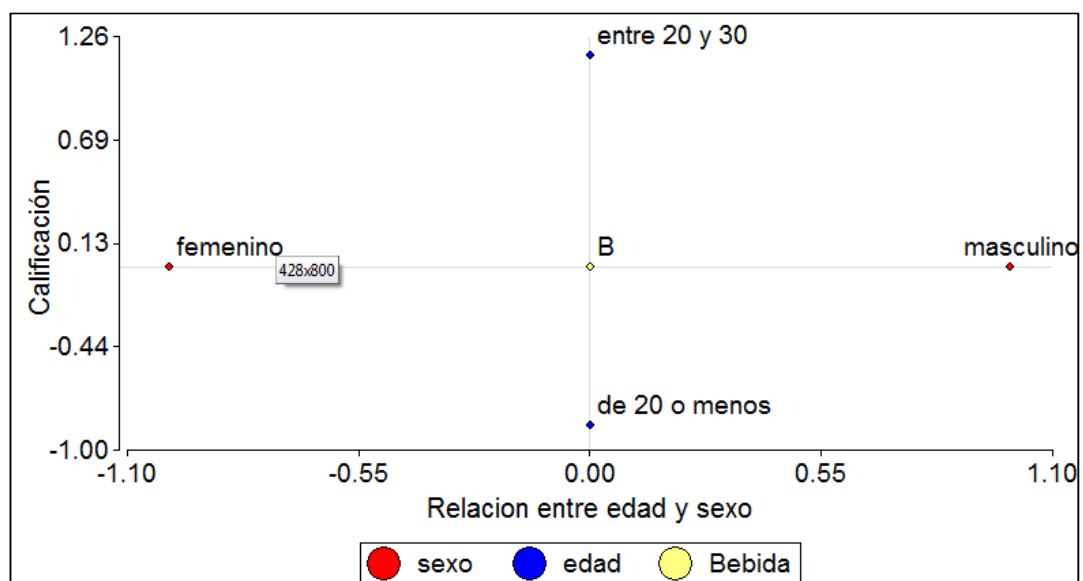


FIGURA 3.12 RELACIÓN ENTRE EDAD Y SEXO DE LOS JUECES CON RESPECTO A LA BEBIDA B

Elaborado por: Cinthia Camacho - Daysi Martínez 2014.

Un análisis conjunto entre las dos bebidas respecto al criterio de los jueces, se muestra en la figura 3.13.

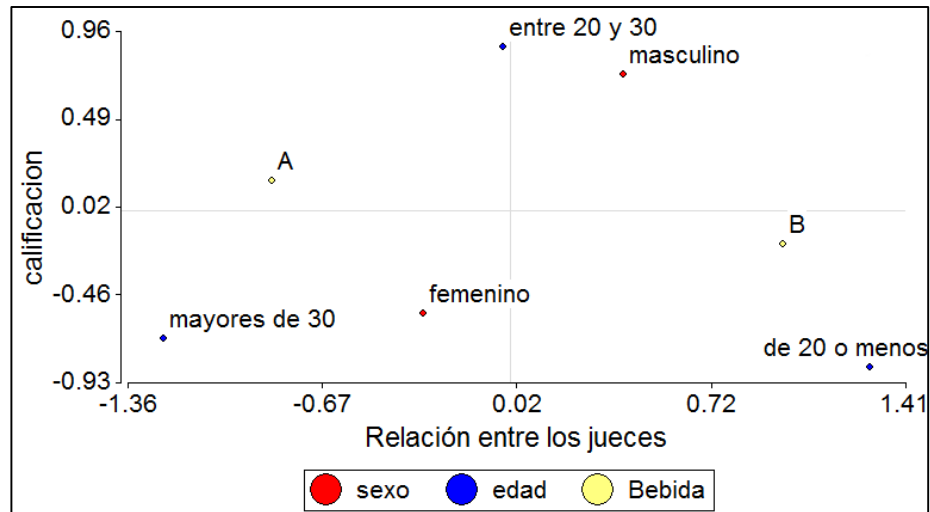


FIGURA 3.13 RELACIÓN ENTRE EDAD Y SEXO DE LOS JUECES CON RESPECTO A LAS BEBIDAS A Y B

Elaborado por: Cinthia Camacho - Daysi Martínez 2014.

De acuerdo a este gráfico podemos concluir que no hay relación entre las bebidas A y B, por lo cual las mismas son independientes ya que según nuestra hipótesis A_1 y B_1 son independientes, si $p > 0,05$.

TABLA 3.13 RESULTADOS DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DE LA EVALUACIÓN SENSORIAL REALIZADO A LAS BEBIDAS ELABORADAS.

<i>Contribuciones por celda al estadístico chi-cuadrado</i>								
<i>En columnas: sexo:edad:Bebida</i>								
<i>En filas: sexo:edad:Bebida</i>								
	masculino	femenino	entre 20 y 30	mayores de 30	de 20 o menos	A	B	Total
masculino	9.63	7.37	0.14	0.62	0.08	0.13	0.14	18.12
femenino	7.37	5.63	0.11	0.47	0.06	0.10	0.11	13.85
entre 20 y 30	0.14	0.11	8.53	3.73	3.73	0.04	0.04	16.34
mayores de 30	0.62	0.47	3.73	16.13	2.13	3.27	3.73	30.10
de 20 o menos	0.08	0.06	3.73	2.13	16.13	4.27	4.88	31.29
A	0.13	0.10	0.04	3.27	4.27	6.53	7.47	21.79
B	0.14	0.11	0.04	3.73	4.88	7.47	8.53	24.91
Total	18.12	13.85	16.34	30.10	31.29	21.79	24.91	156.39

<i>Contribución a La Chi cuadrado</i>					
	Autovalor	Inercias	Chi-Cuadrado	(%)	% acumulado
1	0.77	0.60	70.10	44.82	44.82
2	0.61	0.37	43.50	27.81	72.64

Elaborado por: Cinthia Camacho - Daysi Martínez 2014.

En la tabla 3.13 los resultados demostraron que no existe suficiente evidencia estadística para decir que las formula A y B con diferentes concentraciones de cafeína tenga relación entre sí, por lo tanto quiere decir que las dos bebida tienen buena aceptación entre las personas de diferente edad y diferente sexo.

CAPÍTULO 4

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos nos permiten arribar a las siguientes conclusiones:

1. El mejor método de deshidratación o secado de las hojas de *Ilex guayusa*, resultó el secado en horno eléctrico, ya que presentó el menor tiempo de secado, la mayor eliminación de agua y el menor porcentaje de humedad residual.
2. Las hojas secadas en horno eléctrico presentaron características químicas similares a las secadas por los otros métodos empleados y el porcentaje de cafeína en la misma fue superior.

3. Los grupos químicos encontrados en todas muestras obtenidas en los tres tipos de secado fueron los flavonoides, fenoles- taninos, azúcares, saponinas, triterpenos, quinonas, grasas, alcaloides y esteroides. Estos dos últimos son estructuras reportadas en la literatura como estimulantes.
4. Se elaboraron dos bebidas con diferentes concentraciones de hojas, las cuales presentaron características similares en cuanto al análisis sensorial, no existiendo diferencias significativas en su aceptación
5. El porcentaje de cafeína en las bebidas elaboradas, fueron de 330mg/L y 530mg/L para la bebida A y B respectivamente.
6. De las dos bebidas elaboradas sólo la fórmula A puede ser catalogada como una bebida energética ya que el contenido de cafeína estuvo dentro del rango establecido por la Norma NTE INEN 2411:2008.

7. La fórmula elaborada se mantuvo estable en todas sus características organolépticas y microbiológicas aún después de dos meses de elaboración.

RECOMENDACIONES

1. Realizar un estudio a mayor escala para proponer los parámetros a tener en cuenta a nivel industrial.
2. Realizar un estudio de tiempo de vida útil en condiciones ambientales.

ANEXOS

ANEXO 1: CARACTERÍSTICAS DEL SECADOR SOLAR

SECADOR SOLAR El secador solar utilizado, es artesanal, fue construido por Ingenieros de la facultad de Mecánica y Ciencias de la Producción en el proyecto Elaboración Artesanal Ecológica de Harina de Banano para Consumo Humano PIN-08-000015. ESPOL

Este secador consiste en tres colectores de calor y una cámara de secado.

La cámara de secado, es un cajón cerrado sin que presente superficies transparentes, este gabinete tiene una abertura a un costado para lograr la circulación del aire caliente que reseca los materiales, y la humedad debe retirarse circulando el aire con un compresor, donde se colocan bandejas con el fondo de malla suspendiendo el producto a secar

Los colectores solares están separados de la cámara de secado, este colector es de forma rectangular de metal color negro, forrado por dentro de papel aluminio, con cobertura de vidrio, por un lado tiene entrada de aire, por el otro lado consta de policarbonato ondulado el cual une los colectores con la cámara de secado por la que circula el aire calentado por el sol; los colectores recogen energía radiada por el sol y la convierten en energía térmica.

En estos gabinetes el tiempo de secado depende de la abundancia de la energía solar y debe evitarse la condensación de vapor de agua dentro del gabinete.

El sol no da luz directa al material que se va a secar, en vez de esto el colector solar calentado por el aire dirige el calor a la cámara de secado. Debido a que las temperaturas en este secador solar, el producto es de mejor calidad.

Recomendaciones. Se recomienda mantenerlo limpio y seco el secador solar, para que el calor y la luz puedan ser absorbidos correctamente.

ANEXO 2. FORMATO DEL TEST DE PRUEBA DE PREFERENCIA

PRUEBA DE PREFERENCIA PAREADA

NOMBRE: _____ FECHA _____

Producto: **Bebida energética**

Frente a usted hay dos muestras de Bebidas de té, usted debe probar primero la muestra 7361 y luego la muestra 5770

¿Cuál de las dos muestras prefiere?. Marque con una X la muestra elegida.

MUESTRAS

5770

7361

Prefiero la muestra _____

Comentarios:

MUCHAS GRACIAS

Elaborado por: Cinthya Camacho - Daysi Martínez

**ANEXO 3. FORMATO DE TEST DE PRUEBA DE MEDICIÓN
DE GRADO DE SATISFACCIÓN MEDIANTE ESCALAS
HEDÓNICAS**

ESCALA HEDÓNICA		
NOMBRE: _____ FECHA _____		
Producto: Bebida energética		
Pruebe las muestras que se presenta a continuación. Por favor marque con una X el reglón que está junto a la frase que mejor describa su opinión sobre las muestras que acaba de probar.		
MUESTRAS		
ESCALA	5770	7361
Me gusta mucho	_____	_____
Me gusta	_____	_____
Me gusta ligeramente	_____	_____
Ni me gusta ni me disgusta	_____	_____
Me disgusta ligeramente	_____	_____
Me disgusta	_____	_____
Me disgusta mucho	_____	_____
COMENTARIOS.		

MUCHAS GRACIAS		

Elaborado por: Cinthya Camacho - Daysi Martínez

ANEXO 4

Humedad residual método gravimétrico



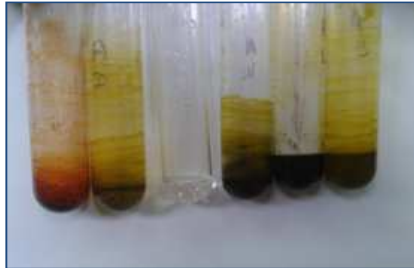
ANEXO 5

Sustancias solubles



Secado al ambiente

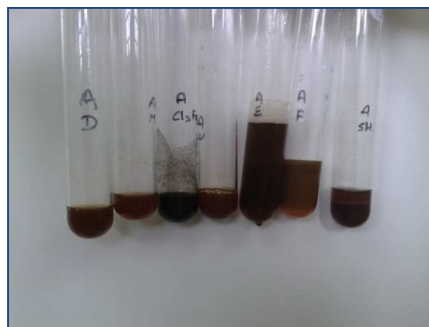
Extracto etéreo



Extracto alcohólico



Extracto acuoso

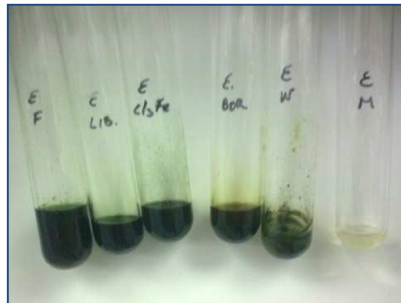


Secado en horno eléctrico

Extracto etéreo



Extracto alcohólico

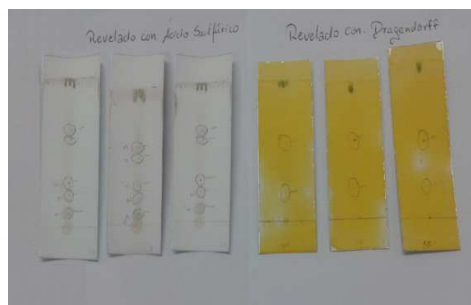
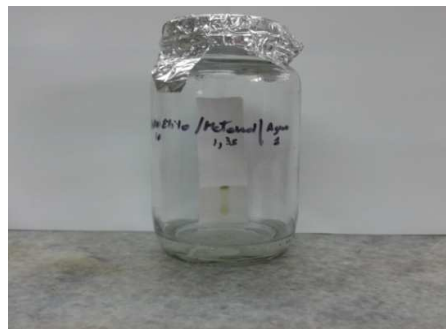


Extracto acuoso



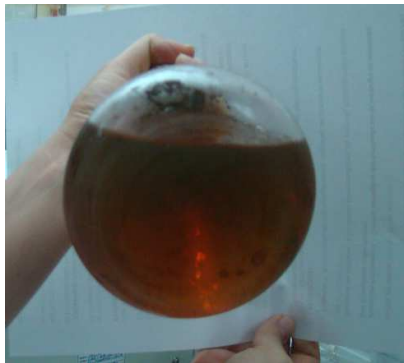
ANEXO 7

Perfil cromatográfico



ANEXO 8

Formulación de la bebida energética



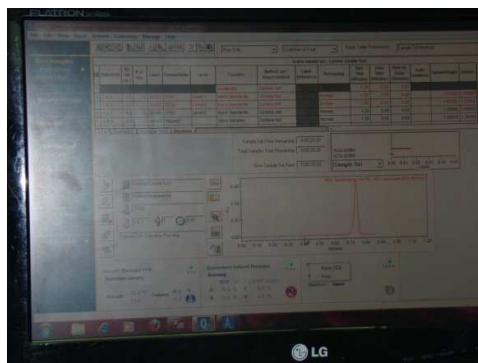
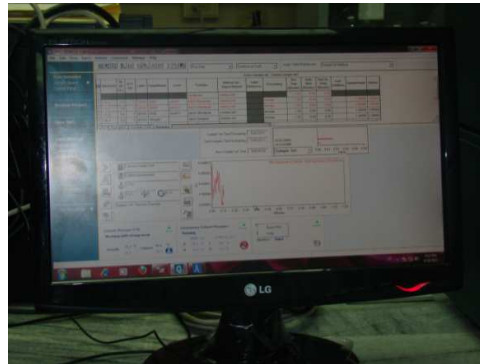
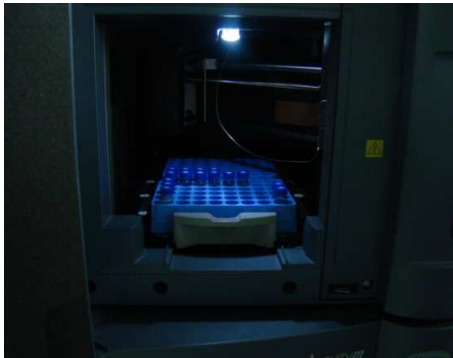
ANEXO 9

Determinación del pH de la bebida energética



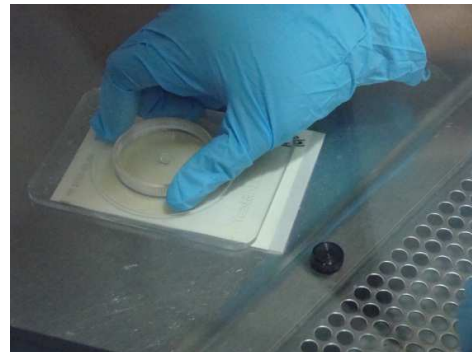
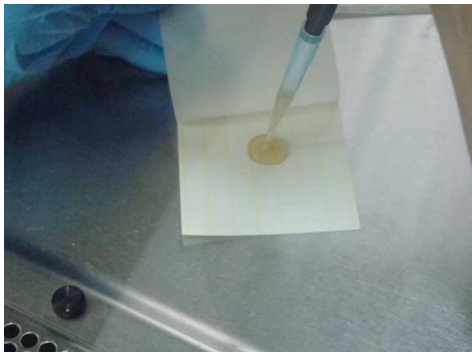
ANEXO 10









Determinación de cafeína



ANEXO 11









Pruebas microbiológicas





Réplica	Coliformes	Aerobios	Moho	Levadura
No. 1	 <p>E. COLI/COLIFORM 100827EC 1309E A 21/03</p>	 <p>AEROBIC COUNT 090713TC 1108E A 21/03</p>	 <p>A 21/03</p>	 <p>A 21/03</p>
No. 2	 <p>E. COLI/COLIFORM 100827EC 1309E B 21/03</p>	 <p>AEROBIC COUNT 090713TC 1108E B 21/03</p>	 <p>B 21/03</p>	 <p>B 21/03</p>









Réplica	Coliformes	Aerobios	Moho	Levadura
No. 3	 <p>E-COL/MCOLIFORM 0907437C 1108E C 11/07</p>	 <p>AEROBIC COUNT 0907437C 1108E C 11/07</p>	 <p>C 11/07</p>	 <p>C 11/07</p>



Elaborado por: Daysi Martínez y Cinthia Camacho

Réplica	Coliformes	Aerobios	Moho	Levadura
No. 1	 <p>E. COLI/COLIFORM 100827EC 1309E D 21/03</p>	 <p>AEROBIC COUNT 0907137C 1108E D 21/03</p>	 <p>D 21/03</p>	 <p>D 21/03</p>
No. 2	 <p>E. COLI/COLIFORM 100827EC 1309E E 21/03</p>	 <p>AEROBIC COUNT 0907137C 1108E E 21/03</p>	 <p>E 21/03</p>	 <p>E 21/03</p>




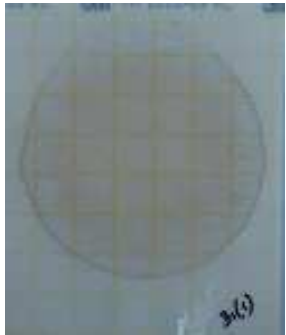




Réplica	Coliformes	Aerobios	Moho	Levadura
No. 3	 <p data-bbox="428 699 716 753">E. COLI/COLIFORM 100827EC 1309E F 21/03</p>	 <p data-bbox="793 683 1052 737">AEROBIC COUNT 090713TC 1108E F 21/03</p>	 <p data-bbox="1346 695 1394 748">F 21/03</p>	 <p data-bbox="1724 699 1772 753">F 21/03</p>

Elaborado por: Daysi Martínez y Cinthia Camacho

Réplica	Coliformes	Aerobios	Moho	Levadura
No. 1	 <p>E. COLI/COLIFORM 100827EC 1309E A(1)</p>	 <p>AEROBIC COUNT 090713TC 1108E A(1)</p>	 <p>A(1)</p>	 <p>A(1)</p>
No. 2	 <p>E. COLI/COLIFORM 100827EC 1309E A(1)</p>	 <p>AEROBIC COUNT 090713TC 1309E A(1)</p>	 <p>YH 2010-09 FC 3M YH 2010-09 R A(1)</p>	 <p>YH 2010-09 FC 3M YH 2010-09 R A(1)</p>

Réplica	Coliformes	Aerobios	Moho	Levadura
No. 3	 <p>E COLI/COLIFORM 100827EC 1309E</p> <p>A(3)</p>	 <p>AEROBIC COUNT 090713TC 1108E</p> <p>A(3)</p>	 <p>A(3)</p>	 <p>A(3)</p>

Elaborado por: Daysi Martínez y Cinthia Camacho


Réplica	Coliformes	Aerobios	Moho	Levadura
No. 1	 <p>E. COLI/COLIFORM 100827EC 1309E B1(1)</p>	 <p>AEROBIC COUNT 090713TC 1108E B1(1)</p>	 <p>B1(1)</p>	 <p>B1(1)</p>
No. 2	 <p>E. COLI/COLIFORM 100827EC 1309E B1(2)</p>	 <p>AEROBIC COUNT 090713TC 1108E B1(2)</p>	 <p>B1(2)</p>	 <p>B1(2)</p>

Réplica	Coliformes	Aerobios	Moho	Levadura
No. 3	<p>E. COLI/COLIFORM D90271C 1109E</p>	<p>AEROBIC COUNT D90713TC 1106E</p>	<p>3(2)</p>	<p>3(2)</p>

Elaborado por: Daysi Martínez y Cinthia Camacho

ANEXO 12

Resultados de análisis de contaminantes en la bebida



INFORME DE ENSAYOS

Fecha de Informe:	28/Mar/2014	Orden:	2449	Nº de Informe:	1796-13	Página:	1/1
-------------------	-------------	--------	------	----------------	---------	---------	-----

INFORMACION DEL CLIENTE:							
Nombre:	EMPRESA PUBLICA DE SERVICIOS ESPOL - TECH E.P.						
Dirección:	KM 30 1/2 VIA PERIMETRAL						
Teléfono:	2269733	Fax:	--	E. Mail:	--		

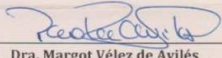
DATOS DE LA MUESTRA:							
Tipo de Muestra: Café, Te, Cacao							
Nombre: TÉ GUAYUSA BEBIBLE							
Descripción: Té							
Lote:	--	Fecha de Elab.:	--	Fecha de Exp.:	--		
Contenido Declarado:	--	Encontrado:	1 de 400 ml apróx.	Condición:	Normales, envase plástico		
				Forma de conservación:	Ambiente		
Fecha de Recepción:	21/Mar/2014	Cód. Laboratorio:	CT-C-411-21-03-13	Muestreo:	Realizado por el cliente		

RESULTADOS


ANÁLISIS QUÍMICO					
Fecha de Análisis	25/Mar/14	Página R 38-5.10:			AAS-434
Parámetros	Unidad	Resultados	Requisitos	Método de Referencia	Límite de detección
Arsenico	mg/L	No Detectable	--	MMQ-AAS-23 (AOAC 18TH 986.15)	0,005 mg/L
Piomo	µg%	No Detectable	--	MMQ-AAS-25 (AOAC 18TH 999.11)	0,09 mg/L

OBSERVACION

Se podrán solicitar modificaciones de documentos hasta 6 meses después de su emisión.
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




Dra. Margot Vélez de Avilés
Gerente Técnico & Calidad



REV 08/09-11

Datos de Contacto:
 Dirección Laboratorio Matriz: Parque Industrial California 1, Calle Anq, Modesto Lucue Rivadeneira,
 Edificio Comercial N-3 Local 4 A Pto. 11 1/2 vía a Daule
 PBX. Matriz: (5934) 2103206. Teléfonos Parque California 1: 2103011 / 2103206. ext. 205 Cel. 099878518
 Dirección Sucursal Laboratorio de Microbiología: Parque Industrial California 2, Local D-44
 Km.11 1/2 vía a Daule
 Teléfono Sucursal: (5934) 2 103365 ext. 101. Teléfonos Parque California 2: 2 103199 ext. 443

E-mail: labavve@gym.sabnet.net
 colizaciones.compras@laboratoriosavve.com
 paola.aviles@laboratoriosavve.com
 lorena.aviles@laboratoriosavve.com
 www.laboratoriosavve.com

 Laboratorios AVVE

BIBLIOGRAFÍA

1. Alfredo Ara Roldán. (1994). *Las plantas medicinales han sido el método de curación natural más popular y utilizado por todas las culturas*. EDAF. Página de créditos. .
2. Andalzua, A. (1994). *La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y la práctica*. Zaragoza: ACRIBIA.
3. Anslow, Patricia Ann y Stratford, Malcolm. España, Procedimiento para conservar bebidas que contienen té mediante ácido cinámico o derivados del mismo. Patente española 2 183 421 pág. # 16
4. Cerón. (1995). *Etnobiología de los cofanes de Dureno*, Museo Ecuatoriano de Ciencias Naturales, Quito. Quito: AbyaYala.
5. Cosmovisión Andina. (diciembre de 2006). *Los dones y usos de la guayusa remontan la selva*. Obtenido de http://www.cosmovisionandina.org/archivos/news/120206_1327.htm
6. Crespo Coello, P. (2013). *La Guayusa: Trayectoria y Sentido*. Ministerio de Asuntos Exteriores de Finlandia.

7. El Universo. (26 de agosto de 2011). El "te" helado se toma un mercado en crecimiento. pág. Economía.
8. Fundación Runa. (junio de 2013). *Fundación Runa*. (Runa) Recuperado el 15 de 06 de 2013, de www.runa.org
9. Gupta, M. P. (1995). *270 plantas medicinales*. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo.
10. ITESCAM. (2010). *Deshidratación, secado y liofilización*. México: ITESCAM.
11. Miranda, M., & Cuéllar, A. (2001). *Manual de prácticas de laboratorio. Farmacognosia y productos Naturales*. La Habana, Cuba: Félix Varela.
12. Muñoz, F. (1996). *Plantas medicinales y aromáticas: Estudio, cultivo y procesado*. Madrid: MundiPrensa.
13. Otazu, I. (2010). *Influencia de la temperatura y tiempo de secado en la calidad de las hojas de Cymbopogon Citratus D.C. STAF*. Tesis , Universidade Federal de Viçosa , Departamento de engenharia Agrícola, Vicososa – BRASIL.
14. Patiño, V. M. (2005). *La alimentación en Colombia y en los países vecinos*.
15. Radice, M. V. (octubre de 2006). (L. Alvarez, Ed.) *La Granja*(6), 3-11.

16. Reissig, C. (marzo de 2009). Abusar de las bebidas energéticas es peligroso para la salud. (A. Muro, Ed.) *Discovery DSalud*(114).
17. U.S. Department of Health and Human Services. (2001). *Disease prevention and Health promotion, U.S. Department of Health and Human Services*. Rockville: U.S. Department of Health and Human Services.
18. UNEP, ACTO y Universidad del Pacífico. (2009). *Geoamazonía: Environment outlook in Amazonía*. Lima: UNEP.
19. Valdivia, M. (2015). *monografias.com*. Recuperado el 11 de marzo de 2015, de monografias.com:
<http://www.monografias.com/trabajos96/fitoextraccion-metales-pesados-suelos-contaminados/fitoextraccion-metales-pesados-suelos-contaminados.shtml>
20. Vasquez, S. (26 de junio de 2011). El Telégrafo. La guayusa compite con otras marcas en *Estados Unidos*, pág. Economía.
21. Zhi-cen, Lou. *Estudios farmacognósticos y de la composición de ácidos grasos libres*. Instituto de Farmacia y Alimentos. La Habana: s.n., 1998.
22. Zona Alimentaria. (2009). *Bebidas energizantes*. Quito: Alimentos Ecuador.