



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA DEL MEDIO NATURAL

Optimización en la obtención de infusiones de guayusa (Ilex guayusa; Loes. 1901) con alto contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante.

TRABAJO FINAL DE GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS
ALIMENTOS

Curso académico 2019/2020

Autora: Zara Chillerón Herrera

Tutores: Purificación García Segovia, Javier Martínez Monzó

Directora experimental: Marta Igual Ramo

Valencia, junio 2020

Resumen

Optimización en la obtención de infusiones de guayusa (*Ilex guayusa*; Loes. 1901) con alto contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante.

Autora: Zara Chillerón Herrera

Tutores: Purificación García Segovia, Javier Martínez Monzó

Directora experimental: Marta Igual Ramo

Valencia, junio 2020

La guayusa (*Ilex guayusa* Loes) es una planta que destaca por sus propiedades energizantes y por su contenido en antioxidantes. Su consumo tradicional es en infusión, así es consumida desde hace miles de años. El objetivo del trabajo fue estudiar el efecto de la temperatura, la aplicación de vacío, la relación masa: agua y el tiempo en la obtención de infusión de guayusa sobre los compuestos fenólicos y la actividad antioxidante de las infusiones. Para ello se determinaron los compuestos fenólicos y la actividad antioxidante mediante espectrofotometría de las muestras obtenidas según un diseño experimental que contempló dichas variables. Los compuestos fenólicos de las infusiones de guayusa aumentaron al aumentar la masa de guayusa en la infusión, la temperatura de proceso y el tiempo de procesado. Sin embargo, la actividad antioxidante aumentó al aumentar la masa de guayusa pero la temperatura y el tiempo de procesado no presentaron una tendencia evidente en la misma. El uso de la aplicación de vacío en la elaboración de infusiones de guayusa propició una mayor actividad antioxidante. Sin embargo, los compuestos fenólicos fueron mayores en las infusiones obtenidas a presión atmosférica.

Palabras clave: Guayusa, infusión, fenoles totales, flavonoides totales, actividad antioxidante.

Abstract

Optimization in obtaining guayusa infusions (*Ilex guayusa*; Loes. 1901) with high phenolic compound content and antioxidant activity.

Author: Zara Chillerón Herrera

Tutors: Purificación García Segovia, Javier Martínez Monzó

Experimental director: Marta Igual Ramo

Valencia, June 2020

Guayusa (*Ilex guayusa* Loes) is a plant that stands out for its energizing properties and for its antioxidant content. Its traditional consumption is in infusion, so it has been consumed for thousands of years. That is why the objective of the work was to study the effect of temperature, vacuum application, mass ratio: water and time in obtaining guayusa infusion on phenolic compounds and antioxidant activity of infusions. For this purpose, phenolic compounds and antioxidant activity were determined by spectrophotometry of samples obtained according to an experimental design that looked at these variables. Phenolic compounds from guayusa infusions increased by increasing guayusa mass in infusion, process temperature and processing time. However, antioxidant activity increased as the mass of guayusa increased but the temperature and processing time did not present an obvious trend in it. The use of vacuum application in the production of guayusa infusions led to greater antioxidant activity. However, phenolic compounds were higher in infusions obtained at atmospheric pressure.

Keywords: Guayusa, total phenols, total flavonoids, antioxidant capacity.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer a Puri García Segovia por ser mi tutora del TFG y haber confiado en mí para desarrollar este trabajo.

A Marta Igual Ramo, directora experimental de mi proyecto final de grado, por guiarme en todas las etapas y dedicar todo el tiempo necesario para ayudarme, animarme y por mantener una supervisión continua.

A todos mis amigos de la carrera, por haber estado ahí apoyándome siempre que lo he necesitado.

Y por supuesto, a mi madre por animarme y ayudarme durante todos los años de universidad.

ÍNDICE

1.INTRODUCCIÓN	8
1.1 La Guayusa	8
1.1.1. Origen y producción.....	8
1.1.2. Composición	10
1.1.3. Usos	11
1.2 Infusiones	11
1.3 Procesado tradicional de la infusión	13
1.4 Aplicación de vacío: explicación y mejoras frente al tradicional	14
2.OBJETIVOS	15
2.1. Objetivo general	15
2.2. Objetivos específicos	15
3. PLAN DE TRABAJO	15
4. MATERIALES Y MÉTODOS	16
4.1. Diseño experimental.....	16
4.2. Materia prima	16
4.3. Elaboración de la infusión de guayusa	16
4.3.1. Cocción tradicional a presión atmosférica	17
4.3.2. Cocción a vacío	17
4.4. Determinación de fenoles y flavonoides totales.....	17
4.5. Determinación de la actividad antioxidante	18
4.6. Análisis estadísticos	19
5. Resultados y discusión	19
5.1 Fenoles y flavonoides totales	19
5.2 Actividad antioxidante.....	27
6. CONCLUSIÓN	32
7. BIBLIOGRAFÍA	33

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Factores y niveles estudiados en el diseño experimental	17
---	-----------

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilex guayusa	8
Figura 2. Distribución del cultivo de la guayusa	9
Figura 3. Elaboración de las hojas de té	13
Figura 4. Esquema del Gastrovac	15
Figura 5. Imagen de las materias primas empleadas.....	17
Figura 6. Imágenes descriptivas del proceso de elaboración de las infusiones	18
Figura 7. Imagen ejemplo de las infusiones de guayusa.....	18
Figura 8. Valores medios y desviación estándar del contenido en fenoles totales de las infusiones elaboradas con 4 g de guayusa a 40 y 90 °C en función del tiempo de procesado.....	22
Figura 9. Valores medios y desviación estándar del contenido de fenoles totales de las infusiones elaboradas a 65 °C con 2 y 6 g de guayusa y empleando 2 y 10 minutos de tratamiento..	23
Figura 10. Valores medios y desviación estándar del contenido de fenoles totales de las infusiones elaboradas durante 6 minutos a 40 y 90 °C y con 2 y 6 g de guayusa. ¡Error! Marcador no definido.	
Figura 11. Valores medios y desviación estándar del contenido de fenoles totales de las infusiones elaboradas con 4 g de guayusa a 65 °C durante 6 minutos. ¡Error! Marcador no definido.	
Figura 12. Valores medios y desviación estándar del contenido de flavonoides totales de las infusiones a través de una interacción entre temperatura (40 y 90°C) y tiempo (2 y 10 minutos) para una misma masa de 4g de guayusa.	26
Figura 13. Valores medios y desviación estándar del contenido de flavonoides totales de las infusiones a través de una interacción entre masa (2 y 6g) y tiempo (2 y 10 minutos) para una misma temperatura de 65°C.	27
Figura 14. Valores medios y desviación estándar del contenido de flavonoides totales de las infusiones a través de una interacción entre temperatura (40 y 90°C) y masa (2 y 6 g) para un mismo tiempo de 6 minutos.	28
Figura 15. Valores medios y desviación estándar del contenido de flavonoides totales de las infusiones elaboradas con 4g de guayusa, en unas mismas condiciones de temperatura (65°C) y tiempo (6 minutos) pero distintas presiones	29

Figura 16. Valores medios y desviación estándar de la actividad antioxidante de las infusiones a través de una interacción entre temperatura (40 y 90°C) y tiempo (2 y 10 minutos), para una misma masa de 4g de guayusa.....	31
Figura 17. Valores medios y desviación estándar de la actividad antioxidante de las infusiones a través de una interacción entre masa (2 y 6 g) y tiempo (2 y 10 min) para una misma temperatura (65°C)	32
Figura 18. Valores medios y desviación estándar de la actividad antioxidante de las infusiones a través de una interacción entre temperatura (40 y 90°C) y masa (2 y 6 g) para un mismo tiempo (6 minutos).	33
Figura 19. Valores medios y desviación estándar de la actividad antioxidante de las infusiones elaboradas con 4 g de guayusa, en unas mismas condiciones de temperatura (65°) y tiempo (6 minutos) pero distintas presiones.	34

1.INTRODUCCIÓN

1.1 La Guayusa

1.1.1. Origen y producción

Ilex guayusa (guayusa) es una especie vegetal que se distribuye en la región amazónica ecuatoriana y pertenece al género *Ilex*, el cual es el único género viviente de las 600 especies de la familia *Aquifoliaceae* (Villacís-Chiriboga, 2017) (Figura 1).

El primer informe sobre el conocimiento de la guayusa fue descrito por el sacerdote jesuita Juan Lorenzo Lucero en 1682, tras un viaje a la región amazónica, donde describe una decocción con hojas de guayusa. Después de la expulsión de los jesuitas, el uso de la guayusa fue olvidado y se limitó a grupos étnicos. En 1901 se realizó la primera clasificación botánica por Ludwig Eduard Boltzmann Loesener, pero se consideró incompleta por falta de material floral, ochenta años después, solo unos pocos estudios han descrito informes sobre la guayusa y actualmente, es conocida internacionalmente por sus propiedades saludables y especialmente por su contenido en cafeína, que proporciona efectos estimulantes y energizantes. (Cadena et al., 2019)



Figura 1. *Ilex guayusa* (Imagen con licencia Creative Commons)

Guayusa es un árbol perenne amazónico, el cual se encuentra de forma silvestre pero también en estado cultivado en algunos lugares subtropicales de la región andina. Esta especie puede llegar a una altura de 20 m y cataloga a la guayusa como un árbol de crecimiento lento. En cuanto el tronco, tiene una corteza blanca, lisa y sus hojas son coriáceas dentadas, es una planta dioica, su flor posee una corola de color blanco, con un número igual de estambres que de pétalos y el resultado de su fruto es una baya verde de 1 cm de ancho aproximadamente.

La floración tiene lugar desde el mes de marzo hasta noviembre (Melo, 2014). Por último, sus hojas son de color verde oscuro, enteras, simples, sin estípulas, 15-21 cm de largo, 5-7,5 cm de ancho y pecíolo corto de 1 cm de largo (Yesenia,2018).

Se distribuye en el continente subtropical y tropical de América y Oceanía, Asia, África y Europa, pero centrándose en los Trópicos, mayormente en Sudamérica desde el sur de Colombia hasta el norte de Perú (Figura 2) (Castro, 2017).

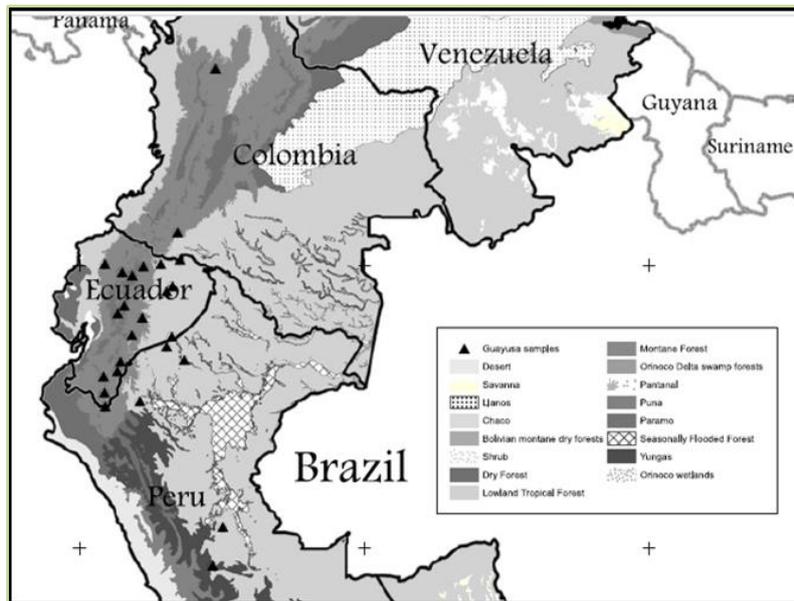


Figura 2. Distribución del cultivo de la guayusa (Castro, 2017)

Normalmente las especies de *Ilex* en el tropical americano se hallan en hábitats húmedos y en bosques de tierras bajas, hasta 4000 metros de altura en los Andes, concretamente en explotaciones familiares, corrales y huertos (Rocha, 2018). El 98% de su producción mundial se encuentra en Napo (Ecuador), debido a la localización geográfica, ya que los rayos del sol descienden de manera perpendicular sobre el suelo beneficiando así el desarrollo de la planta (Castro, 2017).

En cuanto a las condiciones climáticas, se desarrolla en un clima tropical o subtropical, a unas temperaturas de 18 a 26°C, siendo su temperatura óptima 20°C, con precipitaciones anuales de 1000 a 3000 mm y una humedad relativa de 80-90%. Es muy importante que el suelo tenga un buen drenaje ya que el clima tropical presenta constantes lluvias y se aprovecha el suelo arenoso-arcilloso con un pH ácido entre 4,34 y 5,01 (Rocha 2018).

Para la producción de plantas de guayusa se utiliza el método de enraizamiento de estacas, la cual consiste básicamente en la clonación de la planta madre, es un método sencillo que permite multiplicar y obtener en un tiempo relativamente corto. En primer lugar, hay que seleccionar los árboles de los cuales se les realiza la extracción de estacas, éstos han de tener unas buenas características agronómicas, así como una gran cantidad de follaje, resistencia a plagas y enfermedades, una buena calidad de las hojas y, por último, una buena formación.

La recolección de las estacas se debe realizar entre las 6 y 9 de la mañana, o 4 y 6 de la tarde para evitar su deshidratación debido a la exposición al sol. Las estacas se agrupan y se envuelven en papel húmedo, son almacenadas en lugares frescos y transportadas a las instalaciones agronómicas en el menor tiempo posible para conservar así unas buenas condiciones de humedad hasta que se siembren. Para su siembra se necesitan un espacio entre cada una de aproximadamente de 1 m x 1m, además necesitan abonos ricos en materia orgánica y se deben realizar deshierbas de manera esporádica. Es importante que crezcan bajo la sombra, ya que el suelo rico y fértil proporciona finalmente unas hojas grandes y frescas. Una vez haya pasado el tiempo estimado, 3-4 años cuando la planta suele alcanzar los 8 metros de altura, se procede a la recolección, normalmente, artesanal ya que la guayusa no se produce en grandes masas

puesto que es un producto principalmente para usos rituales. Para llevar a cabo la recolección se seleccionan las hojas por categoría, siendo la hoja más grande, color brillante y sin impurezas, la de mejor calidad. Tras la recolección, se pesan, esta acción es muy importante tanto para el productor como para el recolector a la hora de realizar el pago. Se seleccionan las hojas nuevamente según su tamaño y calidad para llevar a cabo el proceso artesanalmente ya que la guayusa se comercializa principalmente para infusión, licor u otro consumo. Una vez seleccionadas, se procede al atado y secado. Según las costumbres amazónicas, las hojas frescas se atan mediante un hilo hasta elaborar un collar y así proceder al secado mediante los rayos del sol (Torres, 2013).

1.1.2. Composición

En un estudio comparativo de las hojas de guayusa realizado por Graham Wise y Demetrio Santander, se pudo observar que en las hojas secas de Guayusa predomina el contenido de carbohidratos y fibra cruda (Wise y Santander, 2018). Del mismo estudio destacaba su gran contenido en K, P, Mg y Zn comparado con *Ilex paraguariensis* (yerba mate).

Las hojas de la guayusa contienen una variedad de alcaloides como la teobromina y la cafeína, además de saponinas, cumarinas, esteroides, terpenos, fenoles, azúcares reductores, flavonoides, quinonas y aporta los 15 aminoácidos esenciales, siendo interesante destacar el contenido de leucina. Presentan un contenido en antioxidantes vegetales y cafeína, similar a las que se han encontrado en el té verde (Rocha, 2018).

El contenido en cafeína es muy elevado, aproximadamente un 3% respecto al té de guayusa. Se trata de un alcaloide que pertenece al grupo de las xantinas y actúa como estimulante en el sistema nervioso, dando así una sensación de energía. Junto a los polifenoles secundarios, la cafeína otorga suavidad y dulzura (Castro, 2017).

Además de ser una fuente de energía por su contenido en cafeína, también aporta beneficios para la salud humana que es proporcionada por una serie de compuestos bioactivos. Entre los compuestos bioactivos más destacados se encuentran: la teobromina, polifenoles, saponinas, vitamina C y D, ácido clorogénico y L-teanina. La guayusa se considera un potente antioxidante por su contenido en compuestos fenólicos y por su contenido en saponinas, se le atribuye un efecto estimulante del sistema inmunológico y antiinflamatorio (Barriga, 2017; Castro, 2017; Cerdeño, 2017).

El **ácido clorogénico**, que forma parte de un grupo de compuestos fenólicos, ácidos hidroxicinámicos, actúa como reductor de la grasa corporal, y controlando así los niveles de insulina, triglicéridos y colesterol en sangre.

Además, tiene **teobromina**, que forma parte del grupo de las xantinas, como la cafeína, así pues, los beneficios que conlleva el contenido de teobromina son, principalmente, un efecto estimulante en el sistema nervioso, diurético, vasodilatador, antiinflamatorio y reduce el ritmo cardiaco (Barriga, 2017).

Otros de los componentes de gran interés que contiene la guayusa es la **L-teanina**, que es un aminoácido específico que se encuentra en el té verde. Es capaz de reducir la fatiga física y

mental, el estrés, el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares, ansiedad, actúa como neuroprotector y ayuda a mejorar la memoria (Castro,2017).

Por último, es rica en **vitaminas** y **minerales**, ya que contiene magnesio, calcio, potasio, vitaminas D y C, muy beneficiosos para la salud cardiovascular (Cedeño, 2017).

1.1.3. Usos

La guayusa ha sido utilizada históricamente en la selva amazónica ecuatoriana por las tribus indígenas de la zona en forma de té o infusión, como bebida refrescante y tonificante y por último como enema, con altas cantidades para lograr un efecto alucinatorio, emético y también como rapé, el cual consiste en un preparado a partir de las hojas de la guayusa y se consume vía nasal.

Se le atribuye propiedades digestivas e hipoglucémicas, aunque esta última está investigándose actualmente.

Se utilizan plantas tradicionales como es el caso de la guayusa para tratar infecciones bacterianas, principalmente en el norte de Perú y por sus propiedades fitoquímicas, como antioxidante (Carpintero et al., 2014).

Las tribus amazónicas tienen la costumbre de consumir la bebida de guayusa en ayunas, antes de que amanezca con la creencia que los espíritus, animales venenosos y la energía negativa serán ahuyentados. Por otro lado, también realizan rituales mientras consumen la infusión para establecer una conexión con la familia y amigos, donde se relatan historias de los más mayores, programan asuntos importantes y debaten pacíficamente (Maldonado, 2017)

Por lo general, es una infusión ligada a tradiciones culturales de las tribus amazónicas, y se considera una planta sagrada ya que sus hojas contienen una diversidad de propiedades curativas y energéticas.

1.2 Infusiones

La infusión se define según el Real Decreto 3176/1983 («BOE-A-1983-33964») como “el producto líquido obtenido por la acción del agua, a temperatura de ebullición, sobre la especie vegetal, con el objetivo de extraer las sustancias solubles de la misma”. Las especies vegetales para uso alimenticio son aquellas que por su sabor y aroma, características de las especias a las que pertenecen, se utilizan por su acción fisiológica u organoléptica en alimentación. Real Decreto 3176/1983 («BOE-A-1983-33964»).

La elaboración de una infusión consiste en añadir una serie de flores, hojas, frutos o semillas de diversas plantas y/o hierbas en agua cercana al punto de ebullición con el fin de extraer los nutrientes de las plantas, dejando reposar 5-10 minutos, dependiendo de la sustancia, e ingerirlos. Mediante la infusión obtenemos, gracias a su extracción, una gran cantidad de sustancias activas, cuyas estructuras químicas apenas sufren alteración y por lo tanto, conservan adecuadamente sus propiedades nutritivas. El color y aspecto serán característicos del propio producto, el olor será aromático y agradable y el sabor ligeramente amargo, pero no rancio, por

lo que se debe realizar un buen proceso de deshidratación o secado para que la materia prima mantenga sus características organolépticas (Guevara,2019).

En cuanto a la comercialización de las hierbas para infusión, se pueden hallar de diferentes maneras:

· *A granel*: Consiste en hojas secas y molidas. El tamaño de las hojas es de 3mm aproximadamente y los envases para guardarlas han de ser herméticos para evitar que se humedezcan y pierdan calidad.

· *En bolsas filtrantes*: Son hojas molidas con un tamaño menor que las de venta a granel y se envasan en bolsas filtrantes. Son los envases donde se colocan las hojas secas y se obtiene la infusión de uso inmediato, los cuales no deben de contener más del 2% de materias extrañas, ni parásitos y/o insectos vivos o muertos, no pueden ser aromatizadas ni coloreadas artificialmente, no deben de contener ningún tipo de almidón diferente del propio de las mismas hojas. El envase debe resistir 15 minutos mínimo en agua hirviendo y estar libre de colorantes, cada uno ha de contener una etiqueta e hilo identificando el producto, los cuales deben de permanecer intactos (Sánchez, 2016).

· *Instantáneo*: Consiste en una infusión en la que se ha liofilizado o secado con aire caliente obteniendo polvo. La preparación es sencilla, ya que bastaría con añadir la cantidad de agua o leche independiente de su temperatura.

· *Bebidas de té o infusiones "helado"*: Se trata de una infusión refrescante que se distribuye en botellas con tal de facilitar su consumo y se le añade conservantes y azúcares o edulcorante (Tamayo, 2010).

Industrialmente, el proceso de preparación de las hojas de guayusa se detalla a continuación (Figura 2):

- a) Recepción de las hojas de guayusa: En estado fresco se recibe la materia prima y se inspecciona brevemente.
- b) Selección: Se realiza una segunda selección, en la que se eliminan las impurezas adheridas en las hojas como: insectos o tierra.
- c) Limpieza: Se realiza mediante un paño o un cepillo suave de forma manual para no causar daños o las hojas pasan por bandas transportadoras de forma automatizada, sumergiéndolas en agua.
- d) Aireación: Se realiza previamente una ventilación para facilitar el secado.
- e) Secado: Se colocan las hojas en el horno de secado con una temperatura de 45°C durante 48 horas, hasta lograr un secado uniforme.
- f) Cribado de hojas: Se seleccionan las hojas y en función de su tamaño. Las hojas más grandes se utilizan para el granel y las más pequeñas para bolsitas.
- g) Molido: Se trituran las hojas para obtener un tamaño adecuado para cada tipo.
- h) Pesado: Se pesan para introducir la cantidad exacta en el envase.
- i) Empacado: Se coloca la guayusa molida en las bolsas filtrantes.
- j) Almacenado: Las bolsas filtrantes son almacenadas en un lugar sin olores y secos para evitar que absorban humedad.



Figura 3. Elaboración de las hojas para infusión (Escobar y Zeledón 2017), (Coro y López 2020)

1.3 Procesado tradicional de la infusión

La infusión se puede elaborar de diferentes maneras, como la maceración, ebullición y procesos químicos, de los cuales cocinan partes de las plantas, como las hojas, flores frescas o secas. La preparación más común y tradicional es la cocción de las hojas en medio acuoso.

En cuanto a la elaboración de la infusión mediante la cocción, consiste básicamente en agregar la planta (hojas o bolsitas filtrantes) en el agua que esté a punto de hervir y se deja reposar aproximadamente 10 minutos, una vez transcurrido el tiempo de reposo, se retira o bien las hojas filtrando la bolsita filtrante. El tiempo que deben permanecer en reposo dependerá del producto de materia prima y su propósito. Hay plantas que con tan solo 40 segundos de reposo basta, ya que son ricas en nutrientes y éstos se pierden si se alarga su reposo, convirtiéndose en una infusión amarga. En la elaboración de la infusión se puede utilizar hojas secas y frescas, pero éstas últimas tienen mayor cantidad de agua por lo que son menos concentradas que las secas (Burgos et al., 2018).

La adecuada elección de las condiciones de preparación de una infusión como la temperatura, la calidad del agua, el tiempo de infusión y proporción de hojas en el agua son fundamentales para obtener una agradable bebida herbal. Todas estas variables intervienen en la cinética de extracción y por tanto en la concentración de los compuestos extraídos de las hojas (Rocha et al, 2019).

En el proceso de infusión a presión atmosférica, se utilizan altas temperaturas que pueden afectar el valor nutricional y a la biodisponibilidad de ciertos compuestos. Con el fin de paliar estos efectos del método tradicional se han desarrollado técnicas de cocción a baja temperatura y con ausencia de oxígeno: sous-vide y cook-vide (Iborra, 2013).

1.4 Aplicación de vacío: explicación y mejoras frente al tradicional

Como alternativa al proceso de cocción tradicional a presión atmosférica, surge a finales de los '70 del pasado siglo, un sistema de cocción, desarrollado en Francia por el chef George Pralus, con el objetivo de reducir las mermas de peso y calidad que sufrían algunos de sus productos durante el cocinado convencional. Este proceso se denominó *Sous-vide*. Las líneas básicas de este sistema de cocción, muy extendido en la cocina y en la industria de platos preparados, se basa en cuatro puntos: 1º Envasado del producto en cuestión en una bolsa de plástico resistente a la temperatura, se aplica el vacío y se sella; 2º se cocina a temperatura controlada, mediante inmersión en agua o en horno de vapor; 3º el producto cocinado se enfría rápidamente mediante un sistema de abatimiento de la temperatura y 4º se almacena en condiciones de refrigeración (Roca y Brugués, 2008). En este tipo de cocina a vacío, el producto embolsado se mantiene en condiciones de vacío, pero el medio de cocción (sea agua o en el horno) está a presión atmosférica. En este caso, las condiciones de ebullición del agua se mantienen igual que en la cocción tradicional. La temperatura de ebullición del agua sigue siendo 100°C.

Como alternativa surge la cocción en vacío continuo (cook-vide). En este caso se trabajará a baja presión usando un equipo desarrollado para mantener la presión subatmosférica durante el proceso de cocción (figura 3). Con este sistema al trabajar a menor presión se consigue reducir el punto de ebullición tanto del medio de cocción como del agua de constitución del producto, lo que permite deshidrataciones y cocciones a menor temperatura con los beneficios que ellos representa para las características nutricionales del producto, pero quizás el fenómeno más interesante que se puede analizar es el de la impregnación del producto con el medio de cocción, en el caso que resulte de interés. En general, durante el proceso de cocinado a vacío, se produce una expansión y liberación del gas retenido en la estructura porosa de los alimentos, posteriormente tras la ruptura de vacío, se produce una impregnación del alimento con el medio de cocción debido al efecto de compresión del gas residual (Andrés et al., 2009). Este fenómeno puede presentar algunas ventajas con respecto a la cocción tradicional y *sous-vide* desde el punto de vista de calidad nutricional y sensorial, y en el caso de este trabajo, en la mejora de la extracción de compuestos de interés.

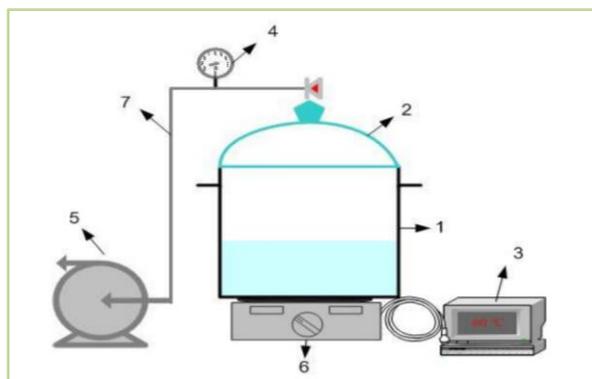


Figura 4. Esquema de *Gastrovac*®. 1) Olla, 2) Tapa de metacrilato, 3) Monitor de temperatura y tiempo, 4) Manómetro, 5) Bomba de vacío, 6) Placa calefactora, 7) Manguito de extracción de vapor. (Gómez, 2013)

Por último, la falta de oxígeno puede reducir la oxidación de los antioxidantes termolábiles como el ácido ascórbico o los b-carotenos (Iborra 2013).

2.OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

En este trabajo se pretende estudiar el efecto de la temperatura, la aplicación de vacío, la relación masa: agua y el tiempo en la obtención de infusión de guayusa sobre los compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de las infusiones.

2.2. Objetivos específicos

- Recopilar información acerca de la elaboración de infusión de guayusa, la aplicación de vacío y el contenido de compuestos bioactivos en la guayusa y sus metodologías de determinación.
- Determinar el contenido en fenoles totales de las infusiones obtenidas.
- Determinar el contenido de flavonoides totales de las infusiones obtenidas.
- Determina la capacidad antioxidante de las infusiones obtenidas.
- Evaluar el efecto de la temperatura, la aplicación de vacío, la relación masa: agua y el tiempo en la obtención de infusión de guayusa sobre los compuestos medidos y la capacidad antioxidante de las infusiones

3. PLAN DE TRABAJO

El plan de trabajo y tareas específicas para conseguir los objetivos planteados son:

- Revisión bibliográfica.
- Diseño y realización de las infusiones a presión atmosférica y bajo condiciones de vacío de acuerdo las variables a estudiar.
- Determinación del contenido en fenoles y flavonoides totales de las infusiones.
- Determinación de la capacidad antioxidante de las infusiones.
- Desarrollo de los resultados y discusión.
- Propuesta de conclusiones y recomendaciones.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Diseño experimental

En el diseño experimental se incluyeron 3 factores: tiempo de procesado, temperatura de elaboración y masa de guayusa en la infusión, así como el uso de vacío o presión atmosférica. Cada uno de los factores con tres niveles como indica la tabla 3.

Tabla 3. Factores y niveles estudiados en el diseño experimental

Factores	Niveles
Temperatura (° C)	40, 65 y 90
Masa (g)	2, 4 y 6
Tiempo (minutos)	2, 6 y 10

Se elaboraron 30 muestras de infusiones de acuerdo con los factores y niveles presentados en la Tabla 3 y aplicación de vacío o presión atmosférica. Las muestras se realizaron por triplicado.

4.2. Materia prima

La materia prima que se utilizó para la elaboración de las infusiones consistió en hojas de guayusa deshidratadas (Guayusa T, Reino Unido) empaquetadas en atmósfera protectora y agua mineral (Bezoya, España) como se indican en la Figura 5.



Figura 5. Imagen de las materias primas empleadas

4.3. Elaboración de la infusión de guayusa

Para la elaboración de infusiones se emplearon dos métodos diferentes: cocción tradicional y cocción con uso de vacío. En ambas se emplearon los mismos factores y niveles del diseño experimental.

4.3.1. Cocción tradicional a presión atmosférica

En primer lugar, se pesó la cantidad de guayusa según el tipo de tratamiento (2, 4 y 6 g) y se colocó en el filtro, dentro de un vaso de precipitados de 500 ml (Figura 5). Se agregó 300 mL de agua calentada previamente a la temperatura correspondiente (40, 65 y 90°C) en el Gastrovac. Después se cubrió y se agitó suavemente. EL reposo de la infusión se realizó dentro del Gastrovac durante el tiempo que correspondido (2, 6 y 10 min). Una vez transcurrido el tiempo, se sacó el vaso de precipitados, se agitó 3 veces y se desechó la hierba mojada. La infusión se dejó enfriar a temperatura ambiente, posteriormente se filtró la infusión utilizando papel de filtro. En la Figura 6 se puede observar la infusión de guayusa recién elaborada.



Figura 6. Imágenes descriptivas del proceso de elaboración de las infusiones



Figura 7. Imagen ejemplo de las infusiones de guayusa

4.3.2. Cocción a vacío

Se repitió el mismo procedimiento que el método tradicional. La única diferencia que se estableció fue en la etapa de reposo de infusión, en la que se aplica un pulso de vacío de 2 minutos, se rompe el vacío y se continúa el reposo a presión atmosférica durante el tiempo correspondiente. En el caso de los tratamientos con 2 minutos de reposo, se realizó todo el proceso a vacío.

4.4. Determinación de fenoles y flavonoides totales

La determinación de los fenoles totales presentes en las infusiones de guayusa se llevó a cabo utilizando el ensayo Folin- Ciocalteu según Benzie y Strain (1999) y adaptado por Selvendran et al. (1990). El contenido total de flavonoides fue medido mediante espectrofotometría siguiendo

la metodología propuesta por Djeridane et al. (2006) basada en la formación del complejo flavonoide-aluminio.

Para la extracción de los fenoles y flavonoides totales se siguió la metodología descrita por Tomás-Barberán et al. (2001). Para ello se pesaron 35 g de muestra y se le añadió 20 mL de metanol puro, 5 mL de HCl 6N y 4,2 mg de NaF 2mM. La mezcla se homogeneizó con un Ultraturrax (T25) durante 5 minutos y se centrifugó a 10000 rpm durante 10 minutos a 4°C. A continuación, para la determinación de los fenoles totales, se tomaron 250 µL del sobrenadante, se añadieron 15 mL de agua bidestilada y 1,25 mL de reactivo Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich) y se dejó reposar 8 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, se adicionaron 3,75 mL de una disolución de carbonato de sodio 7,5% (p/v) y se llevó a un volumen de 25 mL con agua bidestilada. Se mantuvo en oscuridad a temperatura ambiente durante 2 horas y se midió la absorbancia a 765 nm con un espectrofotómetro UV- visible (Termo Electrón Corporation). Para cuantificar los fenoles totales se prepararon disoluciones de diferentes concentraciones de ácido gálico (Sigma-Aldrich) que se utilizó como patrón. A partir de la recta de calibrado elaborada con dichas concentraciones y las absorbancias obtenidas de las disoluciones del patrón se obtuvo la concentración de ácido gálico (AG) que tenían las muestras analizadas. Los resultados se expresaron como mg AG/ 100 mL.

En el caso de los flavonoides totales, se tomó 2mL del extracto y se mezcló con 2 mL de 20 g/L $AlCl_3$ disuelto en metanol. Después de mantener 30 min en oscuridad a temperatura ambiente, una vez finalizada la reacción se determinó la absorbancia a 430 nm en el espectrofotómetro nombrado anteriormente. El contenido total de flavonoides fue expresado en mg de rutin equivalentes (RE)/L, empleando un curva estándar de 0-50 mg rutin (Sigma-Aldrich, Germany)/L.

4.5. Determinación de la actividad antioxidante

El potencial antioxidante total de las infusiones de guayusa se midió usando el método del DPPH (Punpponen et al., 2000) basado en la capacidad de los antioxidantes para captar radicales libres. El DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) es un radical libre que puede reaccionar directamente con los antioxidantes (Smith et al., 1987; Jiménez et al., 1998; Koleca et al., 2002). Para evaluar la actividad antioxidante de compuestos específicos o extractos, éstos deberán reaccionar con el radical estable en disolución de metanol. La reducción a DPPH-H es controlada gracias a la disminución de su absorbancia a la longitud de onda característica en un tiempo determinado de reacción. En la forma radical, el DPPH absorbe a 515 nm, pero al ser reducido con un antioxidante o especies radicales, la absorbancia desaparece.

La muestra fue diluida en la proporción muestra: metanol adecuada en cada caso y se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Para el análisis de las muestras se tomó 0,1mL del sobrenadante y se introdujo en una cubeta a la que se añadieron 3,9 mL de DPPH (0,0030 g/L). Se midió la absorbancia a 515 nm en un espectrofotómetro UV-visible (Termo Electrón Corporation) a intervalos de 0,15 minutos hasta que la reacción se estabilizó.

El porcentaje de DPPH fue calculado según la ecuación 1. Los resultados finales fueron expresados como mg de trolox equivalentes (TE), empleando una curva de calibración de trolox en el intervalo de 10 - 100 mg TE/L.

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

Donde:

$A_{control}$ = absorbancia de control (absorbancia de la muestra a tiempo 0).

$A_{muestra}$ = absorbancia de la muestra cuando el tiempo se ha estabilizado.

4.6. Análisis estadísticos

Para el estudio estadístico de los resultados obtenidos se realizó un análisis estadístico mediante ANOVA simple o multifactorial para evaluar la significación de los factores en estudio. Para ello, se utilizó el paquete estadístico Statgraphics Centurión XVII (StatisticalGraphics Corp., Orkville, USA). Se utilizó el nivel de confianza del 95% y cuando se observaron diferencias significativas, se analizaron las diferencias entre los niveles mediante el análisis de contraste múltiple de rango LSD.

5. Resultados y discusión

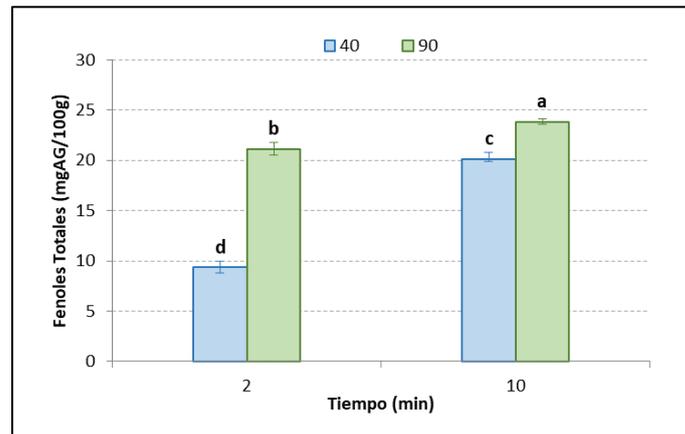
5.1 Fenoles y flavonoides totales

Los compuestos fenólicos son sustancias de origen vegetal cuyas propiedades antioxidantes podemos encontrar en la fruta y verdura. Se trata de metabolitos secundarios, cuya composición puede verse afectada por diferentes factores como la temperatura, luz, procesamiento, etc. Poseen actividad antioxidante, anticancerígena, antimutagénica, antibacteriana, antiviral y antiinflamatoria. (Castro, 2017). Además, en los alimentos, influyen en la aceptabilidad, estabilidad de los alimentos, calidad, sabor y en su pigmentación (Gimeno, 2004).

En la **Figura 8** se muestra el contenido en fenoles totales de las infusiones elaboradas con 4 g de guayusa tanto a presión atmosférica como a vacío y a diferentes temperaturas y tiempos de elaboración. En general, se puede observar que los valores obtenidos bajo condiciones de vacío (Figura 8a) fueron mayores respecto a los obtenidos a presión atmosférica (Figura 8b). Respecto a las infusiones obtenidas a vacío (Figura 7a), el contenido de fenoles totales varió en función del tiempo de manera diferente a 40 y 90 °C. Es decir que existió una interacción significativa ($p < 0,05$) entre la temperatura empleada y el tiempo de procesado. Mientras que a 40 °C un incremento del tiempo de procesado aumentó drásticamente y significativamente ($p < 0,05$) el contenido de fenoles totales, a 90 °C ese aumento fue marcadamente menor. Sin embargo, cuando a ambas temperaturas se trató la muestra durante 2 minutos el contenido en fenoles totales de la infusión fue significativamente ($p < 0,05$) mayor si se empleó 90 °C en comparación con el uso de 40 °C. Cuando las infusiones fueron obtenidas a presión atmosférica (Figura 8b) únicamente se observaron efectos significativos ($p < 0,05$) individuales de la temperatura y el tiempo. A mayor tiempo empleado en el procesado el contenido en fenoles totales de las infusiones fue significativamente ($p < 0,05$) mayor en ambas temperaturas. Por otro lado, cuanto mayor era la temperatura de procesado se obtuvieron valores de fenoles totales significativamente ($p < 0,05$) mayores a ambos tiempos estudiados. Estos resultados se pueden

comparar con un estudio de Vergara-Salinas et al., (2012) en el que se determinó el efecto de la temperatura y el tiempo de los compuestos fenólicos y la actividad antioxidante sobre el tomillo *Thymus vulgaris* y la temperatura de extracción resultó el único efecto significativo ($p < 0,05$) sobre el contenido de polifenoles, los cuales fueron mayores cuando la temperatura se aumentó de 50 a 200°C.

a)



b)

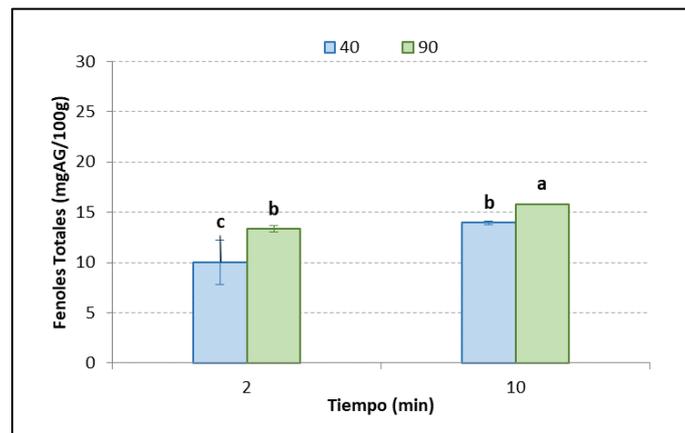
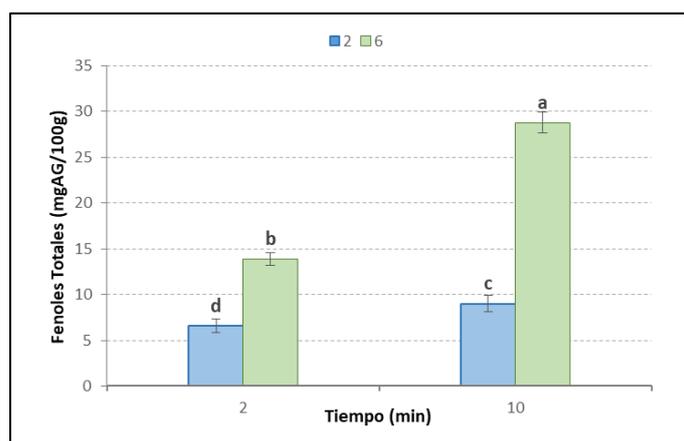


Figura 8. Valores medios y desviación estándar del contenido en **fenoles totales** de las infusiones elaboradas con 4 g de guayusa a 40 y 90 °C en función del tiempo de procesado, bajo condiciones de vacío (a) y a presión atmosférica (b) Las letras sobre las columnas indican grupos homogéneos según la ANOVA ($p < 0,05$).

La **Figura 9** presenta el contenido en fenoles totales de las infusiones elaboradas a 65°C tanto a presión atmosférica (Figura 9a) como a vacío (Figura 9b) y con diferentes masas (2 y 6 g) y tiempos de procesado (2 y 10 min). Los valores obtenidos bajo condiciones de vacío (Figura 9a) fueron ligeramente superiores a los obtenidos a presión atmosférica (Figura 9b). Tanto para la infusión obtenida con aplicación de vacío como la obtenida a presión atmosférica, el contenido en fenoles de la infusión se vio afectado por una interacción entre la masa de guayusa empleada y el tiempo de procesado. Cuando se empleó 6 g de guayusa en la infusión, el contenido de fenoles totales aumentó drástica y significativamente ($p < 0,05$) al aumentar el tiempo de procesado. Sin embargo, si se usaba 2 g en la infusión no se observaban diferencias significativas

($p > 0,05$) al prolongar el tiempo de procesado de 2 a 10 minutos. A través de los resultados obtenidos, cuanto mayor sea el tiempo de cocción mayor contenido de polifenoles, esto se puede deber a la solubilidad, grado de polimerización e interacción la muestra como ocurría en un estudio donde se analizaban los compuestos bioactivos de las hojas deshidratadas de la guayusa, y como en nuestro caso, un tiempo prolongado de extracción supuso un mayor contenido de compuestos fenólicos (Castro, 2017).

a)



b)

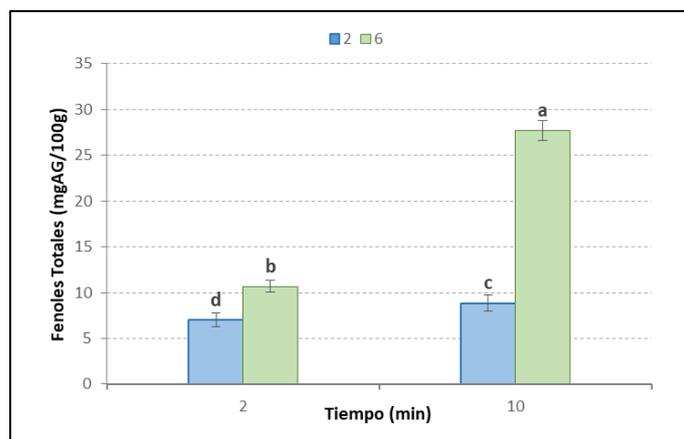
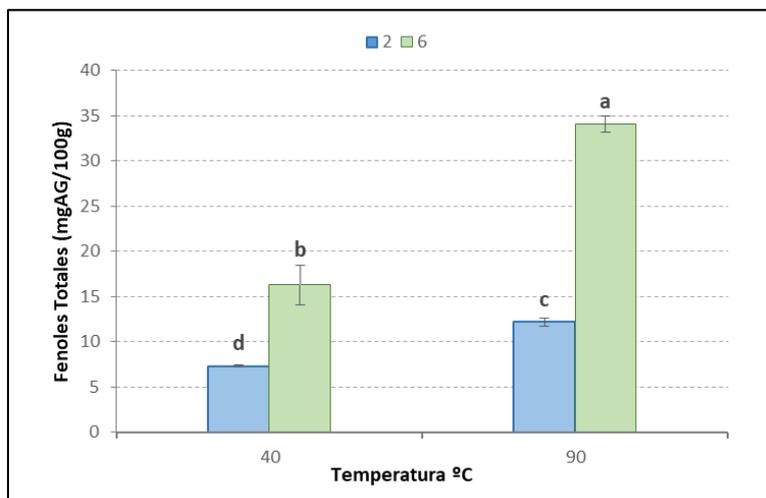


Figura 9. Valores medios y desviación estándar del contenido de **fenoles totales** de las infusiones elaboradas a 65 °C con 2 y 6 g de guayusa y empleando 2 y 10 minutos de tratamiento, bajo condiciones de vacío (a) y a presión atmosférica (b). Las letras sobre las columnas indican grupos homogéneos según la ANOVA ($p < 0,05$).

En la **Figura 10** se muestra el contenido en fenoles totales de las infusiones elaboradas mediante la aplicación de vacío (Figura 10a) y a presión atmosférica (Figura 10b) durante 6 minutos a diferentes temperaturas y masa de guayusa en la infusión. Como se puede observar en la figura 10a, el contenido en fenoles totales de la infusión elaborada mediante aplicación de vacío presentó un alto incremento al aumentar la temperatura de procesado cuando se empleó 6 g de guayusa en la infusión. Sin embargo, si se introducía 2 g de guayusa en el agua para la obtención de la infusión el contenido de fenoles totales presentó un aumento significativamente menor que en el caso anterior. Al observar la Figura 10b (presión atmosférica), se parecía que el

uso de una mayor cantidad de guayusa en la infusión propicia un mayor contenido de fenoles totales para ambas temperaturas. Independientemente de las masas de guayusa empleada en la infusión, incrementar la temperatura de 40 a 90 °C provoca un aumento similar del valor de fenoles totales. Los valores obtenidos de fenoles totales en los dos métodos estudiados fueron mayores cuando se empleaba una temperatura y masa mayor, como ocurrió en un estudio de compuestos bioactivos de hojas deshidratadas de guayusa en el que se demostró que a temperaturas más elevadas (50°C) se obtenía mayor contenido de fenoles totales que a una temperatura ambiente (20°C) (Castro, 2017). También otros autores indican para un estudio de *Aloysia citrodora* (verbena de limón) que los compuestos fenólicos eran mayores cuando había un aumento de temperatura y tiempo prolongado. Un aumento de la temperatura según este estudio incrementa tanto los coeficientes de difusión de compuestos fenólicos como la solubilidad, produciendo así un aumento de la disponibilidad y cantidad de polifenoles en las infusiones (Rocha et al., 2019).

a)



b)

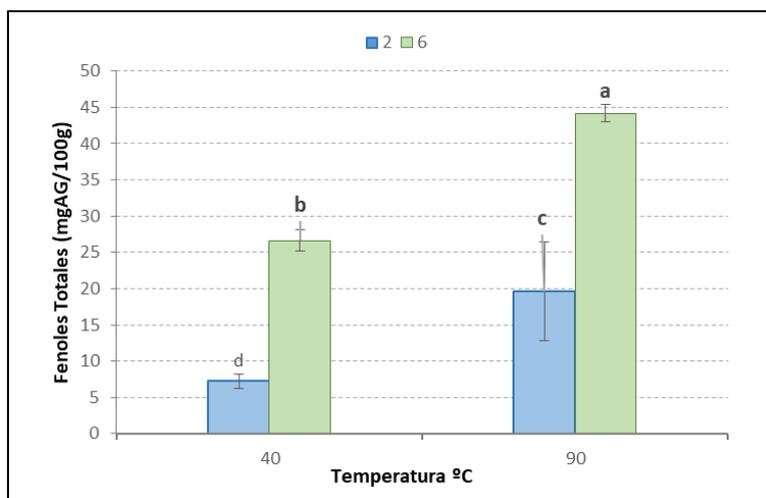


Figura 10. Valores medios y desviación estándar del contenido de **fenoles totales** de las infusiones elaboradas durante 6 minutos a 40 y 90 °C y con 2 y 6 g de guayusa. Las letras sobre las columnas indican grupos homogéneos según la ANOVA ($p < 0,05$).

En la **Figura 11** se muestra el contenido en fenoles totales de las infusiones elaboradas con 4 g de guayusa a 65 °C y durante 6 minutos bajo vacío y a presión atmosférica. Los valores de fenoles totales obtenidos bajo condiciones de vacío son significativamente ($p < 0,05$) menores respecto a los obtenidos a presión atmosférica.

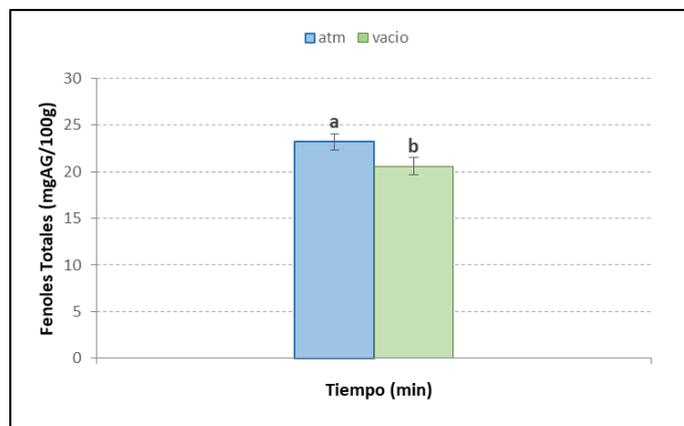


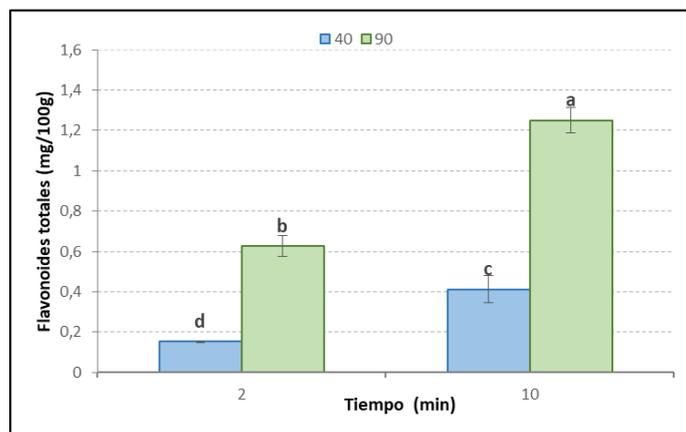
Figura 11. Valores medios y desviación estándar del contenido de **fenoles totales** de las infusiones elaboradas con 4 g de guayusa a 65 °C durante 6 minutos. Las letras sobre las columnas indican grupos homogéneos según la ANOVA ($p < 0,05$).

Los flavonoides representan el grupo más grande de fenoles y se dividen en seis grupos: flavonoles, flavonas, flavanonas, isoflavonas, antocianinas y flavones. En cuanto a la estructura química, los flavonoides están formados por 3 anillos (dos anillos de benceno unidos a través de un anillo pirona) y un grupo hidroxilo. La presencia y posición del grupo hidroxilo le confiere a la molécula una gran capacidad antioxidante. Además de la capacidad antioxidante que presentan estos compuestos, cabe destacar sus efectos antivirales y antimutagénicos, reducción del riesgo de enfermedades cardiovasculares, acción antiproliferativa de células tumorales, protección contra la aterosclerosis y propiedades antimicrobianas (Castro, 2017).

En la **Figura 12** se muestra el contenido en flavonoides totales de las infusiones elaboradas con 4 g de guayusa tanto presión atmosférica como a vacío y a diferentes temperaturas y tiempos de elaboración. En general, se puede observar que los valores obtenidos bajo condiciones de vacío (Figura 12a) fueron mayores respecto a los obtenidos a presión atmosférica (Figura 12b). Cuando las infusiones se obtuvieron bajo condiciones de vacío (Figura 12a) el contenido de flavonoides se vio afectado por una interacción significativa ($p < 0,05$) entre la temperatura empleada y el tiempo de procesado. Con una temperatura de 90°C, el tiempo de procesado aumentó significativamente ($p < 0,05$) el contenido de flavonoides totales, mientras que con una temperatura de 40°C el aumento fue marcadamente menor. Mediante la elaboración de las infusiones de guayusa con presión atmosférica (figura 12b), también se observó una interacción entre la temperatura empleada y el tiempo de procesado. Mientras que el tratamiento se realiza a 40 °C, el contenido de flavonoides totales aumentó significativamente ($p < 0,05$) y de manera muy acusada al incrementar el tiempo de procesado. Sin embargo, a 90 °C no se observó efecto del tiempo de procesado. El contenido de flavonoides totales analizados en las infusiones procesadas a 90°C durante los dos tiempos estudiados fue mayor que los obtenidos a 40 °C. Por

lo que cuanto mayor era la temperatura empleada para la elaboración de la infusión en ambos tiempos, los resultados del contenido de flavonoides totales fueron significativamente ($p < 0,05$) mayores. Similares resultados se obtuvieron en un estudio sobre el efecto de la temperatura y el tiempo sobre las hojas de guayusa, en la que a medida que se prolongaba el tiempo, mayor contenido de compuestos bioactivos se obtenían (Castro, 2017).

a)



b)

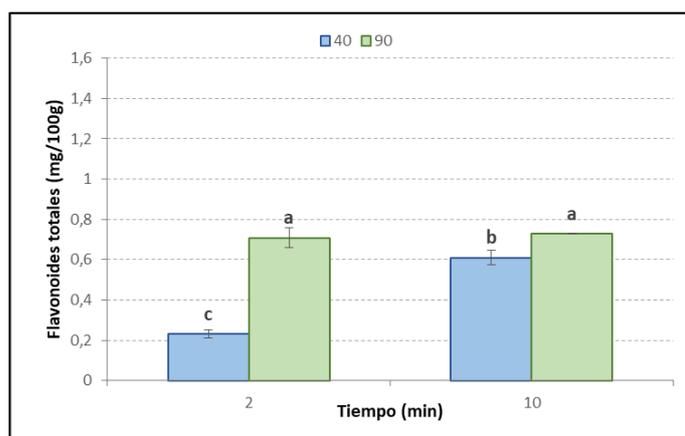
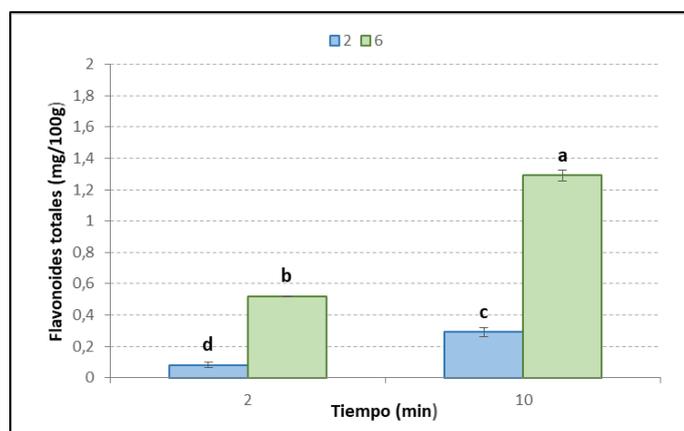


Figura 12. Valores medios y desviación estándar del contenido en **flavonoides totales** de las infusiones elaboradas con 4 g de guayusa a 40 y 90 °C en función del tiempo de procesado, bajo condiciones de vacío (a) y a presión atmosférica (b) Las letras sobre las columnas indican grupos homogéneos según la ANOVA ($p < 0,05$).

En la **Figura 13** se muestra el contenido en flavonoides de las infusiones elaboradas a una misma temperatura (65°C), en condiciones bajo vacío (Figura 13a) como a presión atmosférica (Figura 13b) y con diferentes masas (2 y 6 g) y tiempos de procesado (2 y 10 min). En general, se puede observar que los valores obtenidos bajo condiciones de vacío (Figura 13a) son menores respecto a los obtenidos a presión atmosférica (Figura 13b). Sin embargo, la tendencia de los factores estudiados es similar. En ambos casos, el contenido de flavonoides totales aumentó de manera significativa ($p < 0,05$) y muy acusada al prolongar el tiempo de procesado de 2 a 10 minutos cuando se empleó 6 gramos de guayusa. Este incremento del valor de flavonoides totales en las infusiones al prolongar el tiempo de procesado fue significativamente ($p < 0,05$) menor al usar 2 g de guayusa. Estos resultados son acordes a los presentados por el estudio de Castro (2017),

en los que las muestras con mayor contenido de guayusa obtuvieron un valor mayor de compuestos bioactivos.

a)



b)

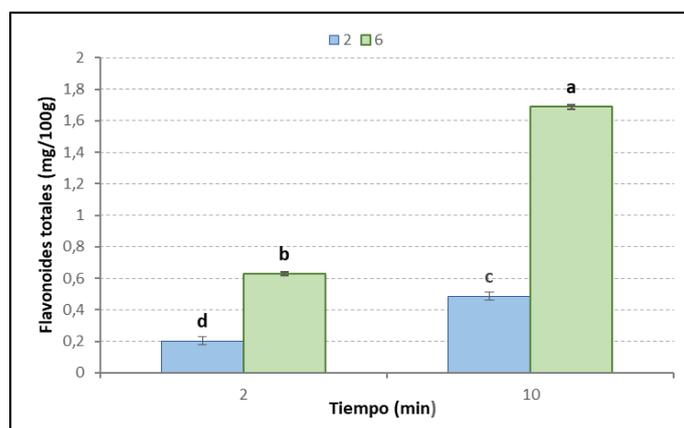
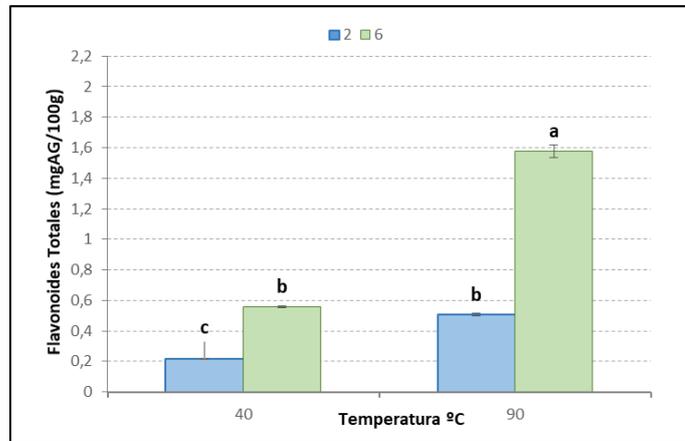


Figura 13. Valores medios y desviación estándar del contenido de **flavonoides totales** de las infusiones elaboradas a 65 °C con 2 y 6 g de guayusa y empleando 2 y 10 minutos de tratamiento, bajo condiciones de vacío (a) y a presión atmosférica (b). Las letras sobre las columnas indican grupos homogéneos según la ANOVA ($p < 0,05$).

En la **Figura 14** se muestra el contenido en flavonoides totales de las infusiones elaboradas durante 6 minutos tanto presión atmosférica (Figura 14b) como a vacío (Figura 14a) y a diferentes temperaturas (40 y 90°C) y masas (2 y 6 g). Se puede observar que los valores obtenidos bajo condiciones de vacío (Figura 14a) son menores respecto a los obtenidos a presión atmosférica (Figura 14b). En ambos métodos de infusión, existe una interacción entre la masa de guayusa y la temperatura empleada en el tratamiento que condiciona el contenido de flavonoides totales, siendo este mayor empleando 6 g de guayusa en la infusión elaborada a 90°C, independientemente del método empleado. El incremento de flavonoides totales en las infusiones como efecto de una mayor temperatura fue más acusado al usar mayor masa en la elaboración de la infusión. Este comportamiento también fue observado en el caso ya descrito anteriormente en la figura 10 para el contenido de fenoles totales. Además, en ambos casos se aprecia un evidente efecto de la temperatura de la misma manera que otros autores mostraron en un estudio de comparación de contenido fenólico de infusiones calientes y frías de P.

lentiscus, *L. viridis* y *M communis* donde los niveles fenólicos más altos se obtuvieron en las infusiones calientes. (Gonçalves et al., 2014).

a)



b)

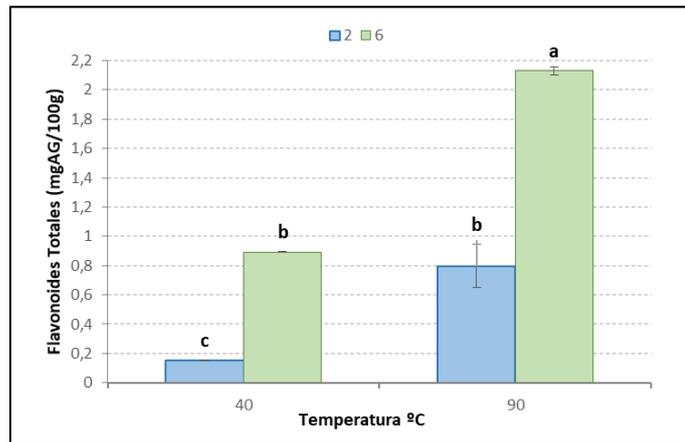


Figura 14. Valores medios y desviación estándar del contenido de **flavonoides totales** de las infusiones elaboradas durante 6 minutos a 40 y 90 °C y con 2 y 6 g de guayusa. Las letras sobre las columnas indican grupos homogéneos según la ANOVA ($p < 0,05$).

En la **Figura 15** se muestra el contenido en flavonoides totales de las infusiones elaboradas con 4 g de guayusa a 65 °C durante 6 minutos a presión atmosférica y bajo vacío. Se puede observar que los valores obtenidos bajo condiciones de vacío son significativamente ($p < 0,05$) menores respecto a los obtenidos a presión atmosférica, al igual que en el caso del contenido en fenoles totales de las infusiones (Figura 11). Probablemente la extracción de los compuestos fenólicos de la matriz de las hojas de guayusa es mayor cuando se trabaja a presión atmosférica. Otros estudios muestran que el uso de vacío en la cocción preserva en mayor medida los compuestos nutritivos en el alimento, por lo tanto, su efecto de salida al agua de cocción es menor bajo vacío (Iborra-Bernard et al., 2015). En este caso, el alimento objeto de estudio es la infusión que corresponde con el agua de cocción de la guayusa por lo tanto los resultados obtenidos se comportan de la misma manera que otros autores (Iborra-Bernard et al., 2015).

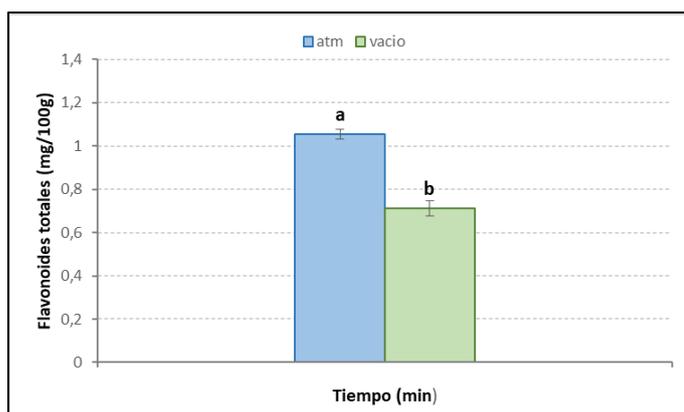


Figura 15. Valores medios y desviación estándar del contenido de **flavonoides totales** de las infusiones elaboradas con 4 g de guayusa, a 65°C y durante 6 minutos, pero distintas presiones. Las letras sobre las columnas indican grupos homogéneos según la ANOVA ($p < 0,05$).

Respecto a los compuestos fenólicos estudiados en este trabajo, el contenido en fenoles y flavonoides totales de las infusiones fue mayor cuando se elaboraron con mayor cantidad de guayusa a mayor temperatura, durante mayor tiempo y a presión atmosférica.

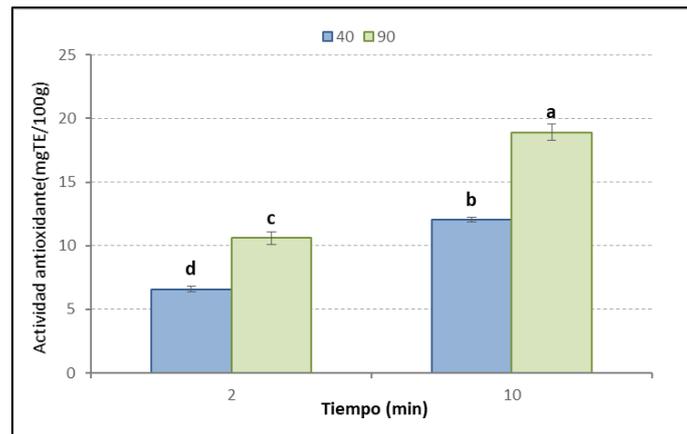
5.2 Actividad antioxidante

Los antioxidantes son sustancias que forman parte de los alimentos y su función está relacionada con el proceso de oxidación-reducción. Son capaces de reducir la velocidad de la oxidación y prevenirla a través de la eliminación de radicales libres, ya que actúan como aceptadores de radicales libres o donadores de hidrógenos. Un radical libre es considerado un átomo o una molécula que contiene un electrón no apareado reactivo, el cual participa en una reacción en la que se produce un rápido cambio que desestabiliza a otras moléculas y se generan más radicales libres. (Melo, 2014). Así pues, la actividad antioxidante es la capacidad que tiene una sustancia para inhibir la degradación oxidativa y está determinada por diferentes condiciones, como la glicosilación y el número y posición de los grupos hidroxilo (Valko et al., 2007).

En la **Figura 16** se muestra la actividad antioxidante de las infusiones elaboradas con 4 g de guayusa tanto en condiciones bajo vacío y a presión atmosférica y a diferentes temperaturas y tiempos de elaboración. En general, se puede observar que los valores obtenidos bajo condiciones de vacío (Figura 16a) son similares respecto a los obtenidos a presión atmosférica (Figura 16b), el mayor valor de actividad antioxidante en el caso de la aplicación a vacío fue en las infusiones obtenidas a 90 °C durante 10 minutos. Sin embargo, en las infusiones obtenidas a presión atmosférica la mayor actividad antioxidante fue obtenida en las muestras tratadas a 40 °C durante 10 minutos. Tanto a presión atmosférica como bajo condiciones de vacío la actividad antioxidante de la infusión se vio afectada significativamente ($p < 0,05$) por la interacción de la temperatura empleada y el tiempo de procesado. El incremento de la actividad antioxidante al prolongar el tiempo de procesado de 2 a 10 minutos fue significativamente ($p < 0,05$) mayor en el caso de trabajar a 90 °C en

comparación con la elaboración de la infusión a 40 °C. No obstante, las infusiones que fueron sometidas a vacío durante su elaboración presentaron mayor actividad antioxidante a 90 °C, mientras que las sometidas a presión atmosférica los valores mayores se presentaron a 40 °C. Este diferente comportamiento en función de la presión de proceso puede ser debido a que bajo condiciones de vacío los compuestos que en mayor medida contribuyen a la actividad antioxidante son los compuestos fenólicos y por ello siguen la misma tendencia y en el caso del uso de presión atmosférica existen otros compuestos que contribuyen a la actividad antioxidante que se preservan en mayor medida a 40 °C.

a)



b)

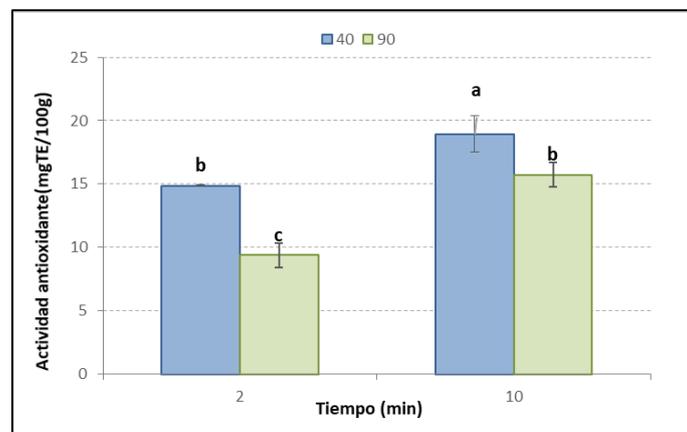
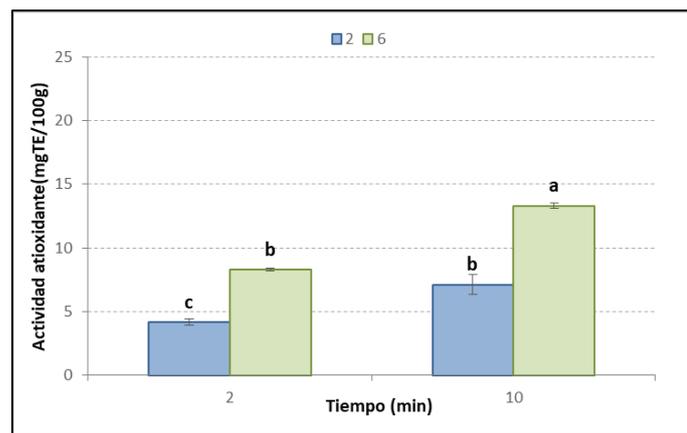


Figura 16. Valores medios y desviación estándar de la **actividad antioxidante** de las infusiones elaboradas con 4 g de guayusa a 40 y 90 °C en función del tiempo de procesado, bajo condiciones de vacío (a) y a presión atmosférica (b) Las letras sobre las columnas indican grupos homogéneos según la ANOVA ($p < 0,05$).

En la **Figura 17** se muestra la actividad antioxidante de las infusiones elaboradas a 65 °C, tanto presión atmosférica como a vacío, con diferentes masas de guayusa y tiempos de elaboración. Los valores obtenidos bajo condiciones de vacío (Figura 17a) fueron menores respecto a los obtenidos a presión atmosférica (Figura 17b). La actividad antioxidante se vio afectada en ambos casos por una interacción entre la masa de guayusa y el tiempo de procesado. En condiciones bajo vacío, cuando se empleó una masa de 6 g de guayusa, la

actividad antioxidante aumentó significativamente ($p < 0,05$) y de manera más acusada al incrementar el tiempo de procesado que cuando se usó 2 g de guayusa. Sin embargo, cuando las infusiones se obtuvieron mediante presión atmosférica, se mantuvo un incremento acusado y significativo ($p < 0,05$) de la actividad antioxidante pero cuando se empleó 2 g de guayusa al prolongar el tiempo no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$). Al igual que en el contenido de fenoles y flavonoides totales, los mayores valores de actividad antioxidante se obtuvieron cuando se empleó mayor masa de guayusa en la infusión tanto a presión atmosférica como bajo vacío.

a)



b)

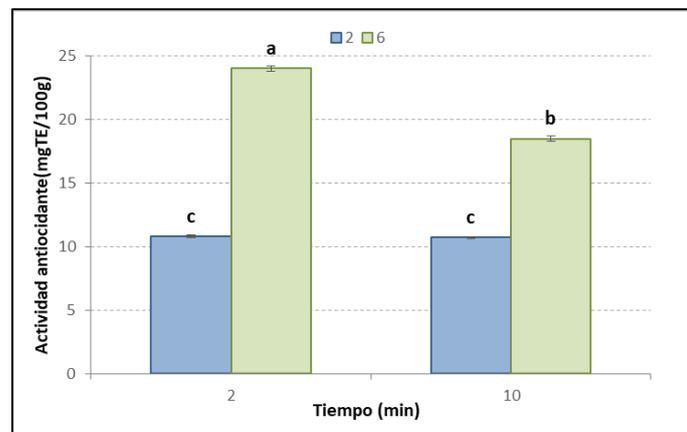
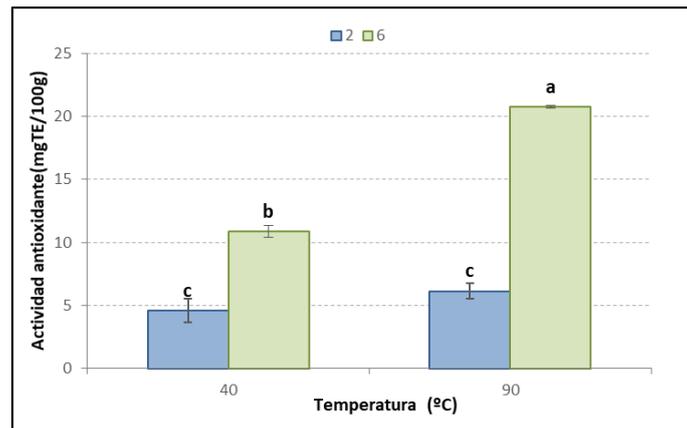


Figura 17. Valores medios y desviación estándar de la **actividad antioxidante** de las infusiones elaboradas a 65 °C con 2 y 6 g de guayusa y empleando 2 y 10 minutos de tratamiento, bajo condiciones de vacío (a) y a presión atmosférica (b). Las letras sobre las columnas indican grupos homogéneos según la ANOVA ($p < 0,05$).

En la **Figura 18** se muestra la actividad antioxidante de las infusiones elaboradas a un mismo durante 6 minutos tanto a presión atmosférica como a vacío y a diferentes temperaturas (40 y 90°C) y masas (2 y 6 g). En general, se puede observar que los valores obtenidos bajo condiciones de vacío (Figura 18a) son mayores respecto a los obtenidos a presión atmosférica (Figura 18b). En ambos casos se observó una interacción significativa en el valor de la actividad antioxidante entre la masa de guayusa empleada en la infusión y la temperatura empleada. Cuando se usaron 2 g de guayusa en la infusión a penas se observaron diferencias

al incrementar la temperatura de proceso, sin embargo, cuando se usaron 6 g la actividad antioxidante aumentó drástica y significativamente al aumentar la temperatura de 40 a 90 °C. Esta tendencia fue observada en los compuestos fenólicos estudiados en este trabajo y también por otros autores que indican que un aumento de la temperatura incrementa tanto los coeficientes de difusión de compuestos fenólicos como la solubilidad, produciendo así un aumento de la disponibilidad y cantidad de polifenoles en las infusiones (Rocha et al., 2019).

a)



b)

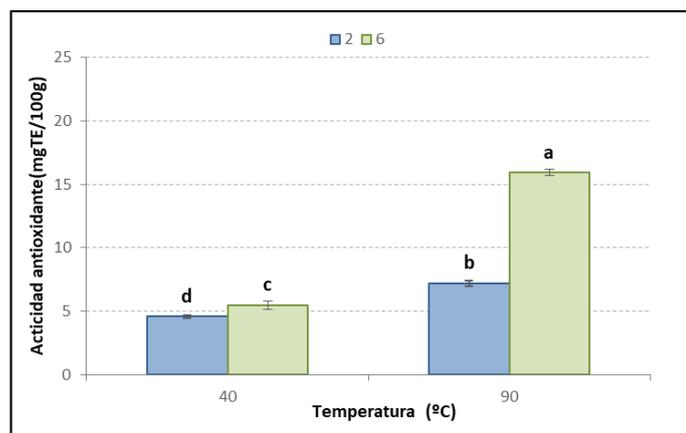


Figura 18. Valores medios y desviación estándar de la **actividad antioxidante** de las infusiones elaboradas durante 6 minutos a 40 y 90 °C y con 2 y 6 g de guayusa. Las letras sobre las columnas indican grupos homogéneos según la ANOVA ($p < 0,05$).

En la **Figura 19** se muestra la actividad antioxidante de las infusiones elaboradas con 4 g de guayusa, a 65 °C y durante 6 minutos, a diferentes presiones. Se puede observar que los valores obtenidos bajo condiciones de vacío son significativamente ($p < 0,05$) mayores respecto a los obtenidos a presión atmosférica. De esta manera el comportamiento de la actividad antioxidante es contrario al observado por el contenido de compuestos fenólicos que presentaron mayores valores para el caso de las infusiones elaboradas a presión atmosférica.

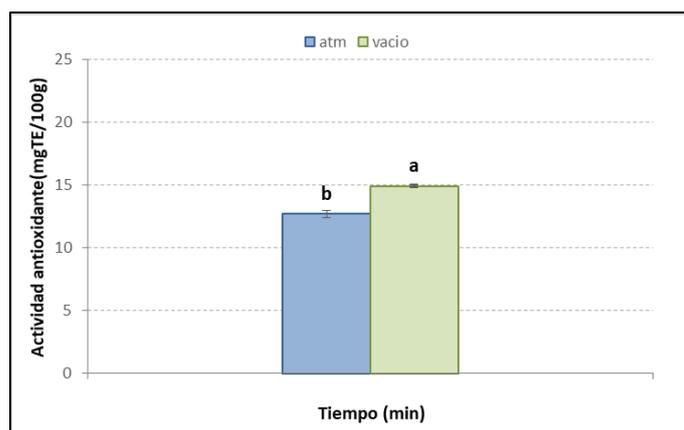


Figura 19. Valores medios y desviación estándar del contenido de **actividad antioxidante** de las infusiones elaboradas con 4 g de guayusa, a 65°C y durante 6 minutos, pero distintas presiones. Las letras sobre las columnas indican grupos homogéneos según la ANOVA ($p < 0,05$).

Para explicar la posible relación entre los compuestos fenólicos analizados y la actividad antioxidante se realizaron análisis estadísticos de correlación entre cada par de variables. Los coeficientes de Pearson establecen la relación lineal estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre las variables analizadas y oscilan entre -1 a 1. De acuerdo con las diferentes respuestas obtenidas con el uso de la presión en el proceso de elaboración de infusión de guayusa se trabajó con los datos separados. Es decir, se realizaron correlaciones de Pearson para el conjunto de los datos obtenidos para los tratamientos bajo vacío por un lado y por otro los obtenidos a presión atmosférica. En el caso del uso de vacío, se pudo observar correlaciones significativas entre la actividad antioxidante y el contenido en fenoles totales ($r=0,83$) y también con el contenido en flavonoides totales ($r=0,82$). A su vez, se observó una correlación significativa entre el contenido en fenoles totales y el contenido en flavonoides totales ($r=0,92$). Otros autores también observaron una alta relación entre los compuestos fenólicos y la actividad antioxidante en otras matrices (Igual et al., 2010). Sin embargo, cuando el tratamiento se realizó a presión atmosférica no se observaron correlaciones significativas de los compuestos fenólicos analizados y la actividad antioxidante. Por lo tanto, la guayusa presenta gran cantidad de sustancias antioxidantes que no se han analizado en este estudio y pueden estar contribuyendo en mayor medida a la actividad antioxidante de las infusiones obtenidas a presión atmosférica. Los resultados obtenidos del análisis de correlaciones de Pearson corroboran la discusión realizada de la Figura 16 de este apartado.

6. CONCLUSIONES

- La temperatura de procesado, la masa de guayusa en la infusión, el tiempo de tratamiento y la aplicación de vacío afectó al contenido en fenoles totales, flavonoides totales y actividad antioxidante de las infusiones obtenidas.
- Los compuestos fenólicos de las infusiones de guayusa aumentaron al aumentar la masa de guayusa en la infusión, la temperatura de proceso y el tiempo de procesado. Sin embargo, la actividad antioxidante aumentó al aumentar la masa de guayusa pero la temperatura y el tiempo de procesado no presentaron una tendencia evidente en la misma.
- El uso de la aplicación de vacío en la elaboración de infusiones de guayusa propició una mayor actividad antioxidante. Sin embargo, los compuestos fenólicos fueron mayores en las infusiones obtenidas a presión atmosférica.
- Para las infusiones obtenidas con la aplicación de vacío, los compuestos fenólicos contribuyen en mayor medida en la actividad antioxidante de las muestras. Sin embargo, el contenido en fenoles totales de las infusiones obtenidas a presión atmosférica no presentó la mayor contribución a la actividad antioxidante, por lo tanto, existen otras sustancias antioxidantes que no se han analizado en este estudio y pueden estar contribuyendo en mayor medida a la actividad antioxidante de dichas infusiones.

LIMITACIONES

Este estudio presenta el efecto de distintas variables de proceso en la obtención de infusiones de guayusa sobre los compuestos fenólicos y actividad antioxidante de las mismas. Ante la imposibilidad de realizar todas las actividades planificadas inicialmente debido a la pandemia sufrida durante los meses de marzo a junio, este trabajo ha quedado incompleto. La principal sugerencia sería continuar analizando otros compuestos bioactivos que puedan contribuir a la actividad antioxidante y la optimización final del proceso de elaboración de infusiones de guayusa.

7. BIBLIOGRAFÍA

- ANDRÉS, A.; GARCÍA-SEGOVIA, P.; MARTÍNEZ-MONZÓ, J. (2009). Effects of Vacuum Cooking (Cook-Vide) on the Physical-Chemical Properties of Sea Bream Fillets (*Sparus aurata*). *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 18:1-2, 79-89.
DOI: [10.1080/10498850802581773](https://doi.org/10.1080/10498850802581773)
- BARRIGA, G. (2017). *Determinación del contenido de cafeína en infusiones de hoja de guayusa (Ilex guayusa) bajo dos condiciones de secado*. Tesis de pregrado en Ingeniería Agroindustrial y de Alimentos. Universidad de las Américas, visto el 4 de junio de 2020. Disponible en: <http://dspace.udla.edu.ec/handle/33000/8381>
- BURGOS, J.; CALDERÓN, Y.; CERVANTES, G.; CUELLO, C.; GALVES, N.; HERNÁNDEZ, N.; PETUZ, I.; TORREGOZA, E.; (2018). Uso de plantas para la elaboración de bebidas aromáticas mediante las TIC. *Cultura Educación y Sociedad* 9(3), 433-442
Doi: [http:// dx.doi.org/10.17981/cultedusoc.9.3.2018.50](http://dx.doi.org/10.17981/cultedusoc.9.3.2018.50).
- CADENA, S.; TRAMONTIN, D.; BELLA, R.; MÜLLER, J.; HENSE, H. (2019). Biological activity of extracts from guayusa leaves (*Ilex guayusa* Loes.) obtained by supercritical CO₂ and ethanol as cosolvent. *The Journal of Supercritical Fluids*, 152, 104543.
Doi: [10.1016/j.supflu.2019.104543](https://doi.org/10.1016/j.supflu.2019.104543)
- CARPINTERO, N. & SALAZAR, M. (2014). *Evaluación del efecto anticelulítico de una formulación cosmética a base de extracto alcohólico foliar de Guayusa Ilex guayusa Loes (Aquifoliaceae)* Licenciatura en Magister en Ciencias y Tecnologías Cosméticas. Univ. Politécnica Salesiana Sede Quito, visto el 3 de junio de 2020. Disponible en: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/7358/1/QT06124.pdf>
- CASTRO, L. (2017). *Capacidad antioxidante y contenido de polifenoles de la extracción etanólica de hojas de guayusa (Ilex guayusa Loes) deshidratadas trituradas*. Trabajo previo a la obtención del título de Ingeniería de Alimentos. Univ. Tecnológica equinoccial, visto el 3 de junio de 2020. Disponible en: <http://repositorio.ute.edu.ec/xmlui/handle/123456789/16684>
- CEDEÑO, J. (2017). *Estudio de mercado comparativo entre Alemania y Reino unido para la exportación de una bebida energizante a base de guayusa desde el ecuador en el periodo de 2010-2017. Caso empresa Waykana Guayusa*. Trabajo previo a la obtención del título en Multilingüe en Negocios y Relaciones Internacionales. Univ. Católica del Ecuador, visto el 4 de junio de 2020. Disponible en: <http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/13866/ESTUDIO%20DE%20MERCADO%20COMPARATIVO%20ENTRE%20ALEMANIA%20Y%20REINO%20UNIDO%20PARA%20LA%20EXPORTACION%20DE%20UNA%20BEBIDA%20ENE.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- CORO, L. & LÓPEZ, E. (2020). *Proyecto de factibilidad para la producción y comercialización de infusiones de guayusa en la parroquia Bomboiza del Cantón Gualaquiza, provincia Morona Santiago*. Tesis previa para la obtención del título de Ingeniero Comercial. Univ. Politécnica Salesiana Ecuador, visto el 4 de junio de 2020.

Disponible en: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/5562/1/UPS-CT002782.pdf>

- ESCOBAR, I. ZELEDÓN, L. (2017). *Elaboración de una infusión a base de flor de pito (Erythrina berteroana), su análisis sensorial y bromatológico*. Tesis previa para la obtención del título de Ingeniero en Alimentos. Univ. Dr. José Matías Delgado, visto el 4 de junio de 2020.

Disponible en:

<http://www.redicces.org.sv/jspui/bitstream/10972/3703/1/0002685-ADTESEE.pdf>

- GIMENO, E. (2004). Compuestos fenólicos. Un análisis de sus beneficios para la salud. *Offarm*, 23(6), 80-84.

- GUEVARA, A. (2019). *Elaboración de una infusión filtrante a base de hojas de "mango" (Mangifera indica L.), "cola de caballo" (Equisetum bogotense L.) y "estevia" (Stevia rebaudiana Bert.) para evaluar su aceptabilidad sensorial*. Tesis previa para la obtención del título de Ingeniero en Industrias Alimentarias. Univ. Nacional de Cajamarca, visto el 4 de junio de 2020.

Disponible

en

:

[http://repositorio.unc.edu.pe/bitstream/handle/UNC/3250/ELABORACION%20DE%20UNA%20INFUSION%20FILTRANTE%20A%20BASE%20DE%20HOJAS%20DE%20MANGO%20\(Mangifera%20indica%20L.\),%20%20COLA%20DE%20.pdf?sequence=1](http://repositorio.unc.edu.pe/bitstream/handle/UNC/3250/ELABORACION%20DE%20UNA%20INFUSION%20FILTRANTE%20A%20BASE%20DE%20HOJAS%20DE%20MANGO%20(Mangifera%20indica%20L.),%20%20COLA%20DE%20.pdf?sequence=1)

- GÓMEZ, S. (2013). *Efecto de las condiciones de fritura a vacío en el procesado de chips de kiwi (Actinidia chinensis)*. Trabajo Final de Máster en Ciencia e Ingeniería de Alimentos. Univ. Politècnica de València, visto el 4 de junio de 2020.

Disponible

en

:

<https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/28119/EFFECTOS%20DE%20LAS%20CONDICIONES%20DE%20FRITURA%20A%20VACUO%20EN%20EL%20PROCESADO%20DE%20CHIPS%20DE%20KIWI.pdf?sequence=1>

- GRAHAM, W. SANTANDER, D. Comparative Composition Analysis of the Dried Leaves of *Ilex guayusa* (Loes.). (2018). *Journal of Food and Nutrition Research*, vol. 6, no. 10 (2018): 638-644. Doi: 10.12691/jfnr-6-10-4.

- GONÇALVES, S., GOMES, D., COSTA, P., & ROMANO, A. (2013). The phenolic content and antioxidant activity of infusions from Mediterranean medicinal plants. *Industrial Crops and Products*, 43, 465-471. Doi: 10.1016/j.indcrop.2012.07.066

- IBORRA, M. (2013). *Comparison of vacuum treatments and traditional cooking in vegetables using instrumental and sensory analysis*. Tesis Doctoral. Univ. Politècnica de València, visto el 4 de junio de 2020.

Disponible en:

<https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/32953/Iborra%20-%20COMPARISON%20OF%20VACUUM%20TREATMENTS%20AND%20TRADITIONAL%20COOKING%20IN%20VEGETABLES%20USING%20INSTRUMENTAL....pdf?sequence=1>

- IBORRA-BERNARND, M.; GARCÍA-SEGOVIA, P.; MARTÍNEZ-MONZÓ, J. (2015). Physico-Chemical and Structural Characteristics of Vegetables Cooked Under Sous-Vide, Cook-Vide, and Conventional Boiling. *Journal of Food Science*. 80(8): E1725-E1734.

DOI:10.1111/1750- 3841.12950.

- IGUAL, M.; GARCÍA, E.; CAMACHO, M.; MARTÍNEZ, N. (2010). Effect of thermal treatment and storage on the stability of organic acids and the functional value of grapefruit juice. *Food Chemistry*, 118(2), 291-299.
Doi: 10.1016/j.foodchem.2009.04.118
- MALDONADO, K. (2017). *Investigación sobre el impacto de una dieta compuesta por productos endémicos del ecuador (quinua, chocho, maíz, cacao y guayusa) en el desarrollo integral del ser humano*. Tesis la licenciatura en Gastronomía. Universidad de las Américas, visto el 4 de junio de 2020.
Disponible en:
<https://pdfs.semanticscholar.org/4a4e/4f77aa39304c45f09d773e2eb2af8e0bb77b.pdf>
- MELO, V. (2014). *Composición y Análisis Químico de la Especie Ilex guayusa Loes*. Licenciatura. Univ. San Francisco de Quito, visto el 4 de junio de 2020.
Disponible en:
<http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/3269/1/000110421.pdf>
- REAL DECRETO, 3176/1983, de 16 de noviembre, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la Elaboración, Circulación y Comercio de Especies Vegetales para Infusiones de uso en Alimentación (1983), visto el 1 de mayo de 2020.
Disponible en:
<https://www.boe.es/buscar/pdf/1983/BOE-A-1983-33964-consolidado.pdf>
- ROCA, J., BURGUÉS, S (2008). *Libro de la cocina a vacío*. Montagud editores. Barcelona.
- ROCHA, M. (2018). *Determinación del contenido de cafeína en un cultivo comercial de guayusa (Ilex guayusa)*. Licenciatura. Univ. Central del Ecuador, visto el 3 de junio de 2020.
Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/14259/1/T-UCE-0004-A60-2018.pdf>
- ROCHA, C.; COELHO, M.; LIMA, R.; CAMPOS, F.; PINTADO, M.; CUNHA, L. (2019). Increasing phenolic and aromatic compounds extraction and maximizing liking of lemon verbena (*Aloysia triphylla*) infusions through the optimization of steeping temperature and time. *Food Science And Technology International*, 25(8), 701-710.
Doi: 10.1177/1082013219860352
- SÁNCHEZ, D. (2016). *Calidad físico, química y microbiológica de infusión (nibs, cascarilla y almendra) de cacao (Theobroma cacao L.) nacional en la Asociación La Cruz, Cantón Mocache*. Tesis de pregrado; T-UTEQ-0017, visto el 4 de junio de 2020.
Disponible en: <http://repositorio.uteq.edu.ec/handle/43000/1840>
- SÁNCHEZ, F. (2020). *Estudio y evaluación del potencial alimentario del alga verde Ulva spp. de los esteros gaditanos*. Tesis Doctoral. Universidad de Cádiz, visto el 4 de junio de 2020.
Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=259921>

- TAMAYO, D. (2010). Investigación de mercados para la creación de un punto de venta de consumo de productos elaborados a partir de base de té, en la ciudad de Bogotá. Licenciatura. Univ. Pontificia Javeriana, visto el 4 de junio de 2020.
Disponible en:
<https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/9346/tesis432.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- TORRES, G. (2013). El aprovechamiento de la Guayusa. Manual de buenas prácticas de recolección para la cosecha de hojas. *Fundación Chankuap*, 23, visto el 4 de junio de 2020.
Disponible en:
<http://chankuap.org/wp-content/uploads/2014/03/Manual-de-buenas-practicas-de-la-Guayusa.pdf>
- VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.; MAZUR, M.; TELSER, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1), 44-84. Doi: 10.1016/j.biocel.2006.07.001
- VERGARA-SALINAS, J.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J., TORRES, J., AGOSIN, E., PÉREZ, J. (2012). Effects of Temperature and Time on Polyphenolic Content and Antioxidant Activity in the Pressurized Hot Water Extraction of Deodorized Thyme (*Thymus vulgaris*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(44), 10920-10929. Doi: 10.1021/jf3027759.
- VILLACÍS-CHIRIBOGA, J. (2017). Etnobotánica y sistemas tradicionales de salud en Ecuador. Enfoque en la guayusa (*Ilex guayusa Loes*). *Etnobiología*, 15, 79-88.
- YESENIA, E. (2018). Caracterización anatómica de *Ilex Guayusa*, *Dacryodes peruviana*, *Terminalia amazonia*, *Triplaris americana*, mediante tinciones, procedentes del parque botánico Sucua, ubicado en la provincia de Morona Santiago. Licenciatura. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo Facultad de Recursos Naturales Escuela de Ingeniería Forestal, visto el 4 de junio de 2020.
Disponible en:
<http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/8735/1/33T0186.pdf>