



Elaboración de un preparado hidrosoluble en forma de sólido pulverulento a partir de *Ilex guayusa* Loes.

Preparation of a water-soluble preparation in the form of a powdery solid from *Ilex guayusa* Loes.

Autores

- ✉ ¹Sting Brayan Luna-Fox
- ✉ ¹Reinaldo Rigoberto Álvarez Castro
- ✉ ¹Nelly Jazmín Peñafiel-Bonilla
- ✉ ¹Matteo Radice
- ✉ ¹Laura Scalvenzi
- ✉ ¹Yasiel Arteaga-Crespo
- ✉ ²Orestes Darío López Hernández
- ✉ ¹Luis Ramón Bravo-Sánchez

¹Universidad Estatal Amazónica, Km 2½
Vía Puyo, Tena, Puyo, Ecuador.

²Universidad Técnica de Ambato, Avenida
Los Chasquis y Río Payamino, Ambato,
Ecuador.

*Autor de correspondencia.

Citacion sugerida: Luna-Fox, S. R., Álvarez Castro, R. R., Peñafiel-Bonilla, N. J., Radice, M., Scalvenzi, L., Arteaga-Crespo, Y., López Hernández, O. D. y Bravo-Sánchez, L. R. (2023). Elaboración de un preparado hidrosoluble en forma de sólido pulverulento a partir de *Ilex guayusa* Loes. *La Técnica*, 13(1), 47-56. DOI: <https://doi.org/10.33936/latecnica.v13i1.5725>

Recibido: Abril 29, 2023
Aceptado: Junio 24, 2023
Publicado: Junio 27, 2023

Resumen

La investigación consistió en elaborar un producto hidrosoluble en forma de sólido pulverulento a partir del extracto acuoso de las hojas de *Ilex guayusa* Loes., por lo que se consideró prioritario maximizar el contenido de cafeína y polifenoles. Se utilizó la decocción a reflujo como método de extracción sólido líquido; las mejores condiciones para extraer la mayor cantidad de cafeína y polifenoles fueron con 15 g de hojas de guayusa en 100 mL de agua destilada, a ebullición por 30 min. Mediante espectrofotometría ultravioleta-visible se cuantificó la cantidad de cafeína y de polifenoles totales, y se obtuvieron concentraciones de 71,7 y 55,76 mg·L⁻¹, respectivamente. Finalmente, se aplicó la tecnología de “*spray drying*” para obtener el sólido pulverulento hidrosoluble. Para la caracterización del producto se realizaron pruebas de solubilidad, las cuales dieron como resultado un tiempo de disolución en caliente (cercano a la temperatura de ebullición) menor a 30 segundos y en frío (16 °C ± 2 °C) menor a 3 min. Se determinó el pH, y el contenido de cenizas totales, los cuales fueron 5,50 y 13,87%, respectivamente. De la evaluación microbiológica resultó que el producto estaba libre de microorganismos aerobios mesófilos. El contenido de cobre, zinc y hierro, determinado mediante espectrofotometría de absorción atómica, fue de 12,35; 234,50 y 19,35 mg·kg⁻¹, correspondientemente; el plomo resultó no detectable. Los resultados obtenidos fueron coherentes con la normativa NTE INEN 1122:2013 relacionada a los requisitos de café soluble obtenido por “*spray drying*”. La presente investigación sienta las bases para el desarrollo industrial de un producto hidrosoluble a base de extracto acuoso de las hojas de *I. guayusa* rico en cafeína y polifenoles.

Palabras clave: *Ilex guayusa*; polifenoles; cafeína; *spray drying*.

Abstract

The research consisted of preparing a water-soluble product in the form of a pulverulent solid from the aqueous *Ilex guayusa* Loes., leaves extract, for which it was considered a priority to maximize the content of caffeine and polyphenols. Reflux decoction was used as the solid-liquid extraction method; the best conditions to extract the greatest amount of caffeine and polyphenols were with 15 g of guayusa leaves in 100 mL of distilled water, boiling for 30 min. Using ultraviolet-visible spectrophotometry, the amount of caffeine and total polyphenols was quantified, and concentrations of 71.7 and 55.76 mg·L⁻¹ were obtained, respectively. Finally, the *spray drying* technology was applied to obtain the water-soluble powdery solid. For the characterization of the product, solubility tests were carried out, which resulted in a dissolution time when hot (close to boiling temperature) of less than 30 seconds and when cold (16 °C ± 2 °C) of less than 3 min. The pH and the total ash content were determined, which were 5.50 and 13.87%, respectively. From the microbiological evaluation it was found that the product was free of mesophilic aerobic microorganisms. The copper, zinc and iron content, determined by atomic absorption spectrophotometry, was 12.35, 234.50 and 19.35 mg·kg⁻¹, correspondingly; lead was not detectable. The results obtained were consistent with the NTE INEN 1122:2013 regulation related to the requirements of soluble coffee obtained by *spray drying*. This research lays the foundations for the industrial development of a water-soluble product based on an aqueous extract of *I. guayusa* leaves, rich in caffeine and polyphenols.

Keywords: *Ilex guayusa*; polyphenols; caffeine; *spray drying*.

Introducción

La Amazonía ecuatoriana es considerada como una de las regiones con más biodiversidad del planeta (Cartay y Chaparro, 2020), la enorme variedad de plantas que allí se encuentran ha despertado gran interés por la investigación, tanto en la industria alimentaria como en la obtención de materias primas para las industrias cosmética y farmacéutica (Noriega et al., 2022). La mayoría de las especies que se encuentran en Ecuador son desconocidas para la ciencia contemporánea, sin embargo, debido a sus múltiples beneficios terapéuticos, históricamente diversas comunidades indígenas han empleado distintas plantas con estos fines, como en el caso de *I. guayusa* (Lozano et al., 2020).

Ilex guayusa es una planta oriunda de la región amazónica de Ecuador y ha despertado gran interés en todo el mundo debido a sus características antioxidantes, energéticas y estimulantes (Wise y Negrin, 2020). Algunos autores, tales como Patiño (1968); Bennett y Alarcón (2015); Wise y Santander (2018) han investigado los usos etnobotánicos de *I. guayusa* e identificado evidencias del uso medicinal y ritual de la misma desde la época colonial, así como informaciones relacionadas a su seguridad como ingrediente de bebidas tradicionales. Por ende, la especie se presenta como un producto promisorio para la economía del sector amazónico ecuatoriano, siendo al mismo tiempo un enlace con la tradición local y un vector de sistemas productivos que reducen la deforestación, los que han sido considerados amigables con el ambiente (Radice et al., 2015; Torres et al., 2017).

Aunque esta planta se encuentra con poca frecuencia en las chacras, los cultivos comerciales están aumentando constantemente como resultado del enorme interés que ha generado. Sus hojas son utilizadas por los pueblos indígenas de la Amazonía ecuatoriana, en su mayoría de las provincias de Pastaza y Napo, para preparar decocciones antes de realizar ritos en los que participan los ciudadanos de cada localidad (Andrade et al., 2019). Esta especie es una de las pocas plantas que contienen cafeína y compuestos polifenólicos, que recientemente se ha empleado como planta estimulante y terapéutica (Intriago et al., 2022).

Con base a su biomasa seca, la cantidad de cafeína en *I. guayusa* puede variar de 2,90 a 3,28% (Villacís-Chiriboga, 2017) y, además, se ha señalado la presencia de una variedad de polifenoles como el ácido clorogénico y quercetina-3-O-hexosa, compuestos reconocidos por su actividad antioxidante (Castañeda et al., 2022). Aun cuando los compuestos polifenólicos y la cafeína han sido ampliamente estudiados como ingredientes activos para alimentos funcionales, medicamentos y cosméticos (Radice et al., 2017), y aunque existen muchos productos elaborados a partir de la especie *I. guayusa* (Mena, et al.,

2019), ninguno tiene un alto valor agregado obtenido mediante técnicas agroindustriales de vanguardia que aseguren una mayor estabilidad y aprovechamiento. En este sentido, el objetivo de la investigación fue elaborar un preparado hidrosoluble en forma de sólido pulverulento a partir de extractos acuosos de la especie *I. guayusa*, considerando que por su elevado contenido de cafeína y polifenoles lo convierte en un ingrediente importante para bebidas energizantes o alimentos funcionales.

Materiales y métodos

La investigación se realizó en la Universidad Estatal Amazónica (UEA) ubicada en el km 2½ vía al Tena, provincia Pastaza con una altitud de 940 msnm. Además, se contó con el apoyo del Laboratorio de Investigación de la Facultad de Alimentos, Universidad Técnica de Ambato, ubicada en el Campus Huachi, en la avenida los Chasquis y Río Payamino ciudad de Ambato, Tungurahua, Ecuador; donde se llevó a cabo el proceso de *spray drying*.

Material vegetal

Las hojas secas de *I. guayusa* se adquirieron en la Fundación Chankuap, ubicada en el barrio Simón Bolívar de la ciudad de Macas, Ecuador empacadas en sobres de 35 g.

Diseño experimental

La primera fase del trabajo se enmarcó en un diseño experimental factorial con dos variables independientes: tiempo y relación sólido líquido, y dos niveles con punto intermedio, para optimizar la operación de decocción donde se evaluó como variables de respuesta el contenido de cafeína y el de polifenoles totales, determinados mediante el método espectrofotométrico. Finalmente se estableció el mejor tratamiento en función de la concentración de cafeína y polifenoles totales. Se analizaron los datos mediante el software Design Expert (Melo y López, 2020). En la tabla 1 se plantea el diseño experimental realizado.

Tabla 1. Nivel de las variables seleccionadas en el diseño factorial y la metodología de superficie de respuesta.

Variable independiente	Nivel de variable codificada			
	Símbolo	Bajo	Central	Alto
		-1	0	1
Relación sólido líquido (g:100 mL ⁻¹)	A	5	10	15
Tiempo (min)	B	15	22,5	30

Obtención del extracto acuoso de las hojas de *I. guayusa*

Para la extracción se pesaron, de acuerdo con el diseño experimental: 5, 10 y 15 g de muestra de hoja seca de *I. guayusa*, con un error de $\pm 0,1$ mg, y se colocaron en un balón para calentamiento de 500 mL, seguidamente se agregaron 100 mL de

agua destilada dejando en reflujo por 15; 22,5 y 30 min, dependiendo del diseño experimental y de la muestra sometida a análisis. Luego se filtró en caliente y se dejó enfriar para realizar el análisis espectrofotométrico. El volumen final del extracto se completó a 100 mL con agua destilada.

Determinación espectrofotométrica de cafeína

Para el análisis se alcalinizaron los 100 mL del extracto acuoso con 1 mL de NaOH 0,1 M, después se extrajo la cafeína con dos porciones de cloroformo de 15 mL cada una. Finalmente, se mezclaron los extractos clorofórmicos y se evaporó en baño María. Luego se disolvió la cafeína añadiendo 50 mL de agua destilada caliente (60-90 °C), se enfrió, se colocó a un matraz aforado de 100 mL y se completó el volumen con agua destilada. De la disolución anterior, se tomaron 5 mL hacia un matraz aforado de 25 mL, se agregó 1 mL de HCl 0,01 M y se enrasó con agua destilada. Finalmente, la absorbancia de la muestra fue leída a una longitud de onda de 275 nm (Sanabria et al., 2017) y se calculó la concentración de cafeína en la muestra por el método del patrón externo a partir de la ecuación (1).

$$\frac{C_m}{A_m} = \frac{C_p}{A_p} \quad (1)$$

Donde, Cm: concentración de la muestra (cafeína), Am: absorbancia de la muestra, Cp: concentración del patrón (mg·L⁻¹) y Ap: absorbancia del patrón.

Determinación espectrofotométrica de compuestos polifenólicos totales

A partir de la disolución filtrada en caliente, se tomó 1 mL del extracto en un matraz aforado de 10 mL y se agregó 0,5 mL del reactivo Folin-Ciocalteu diluido a la mitad con agua destilada y se dejó en reposo por 5 min, posteriormente se adicionó 0,5 mL de carbonato de sodio al 20% y se enrasó con agua destilada; se agitó, se protegió de la luz por 30 min a temperatura ambiente. Finalmente, la absorbancia se midió a 765 nm en el espectrofotómetro (Muñoz-Bernal et al., 2017).

El contenido total de polifenoles se determinó utilizando una curva de calibración de ácido gálico y la concentración de polifenoles totales se expresó en miligramos equivalentes de ácido gálico, para ello se empleó la siguiente ecuación, obtenida a partir del modelo matemático de la recta de calibrado de la ecuación (2).

$$A = 0,0734C - 0,0028 \quad (2)$$

Donde, A: absorbancia de la muestra, C: concentración de la muestra (mg·L⁻¹).

Obtención y evaluación del extracto seco de *I. guayusa*

El extracto seco de *I. guayusa* se obtuvo aplicando la tecnología de *spray drying*, según procedimiento descrito en la figura 1 (Pereira et al., 2018). El producto obtenido se evaluó a través de los parámetros: pH, solubilidad en agua fría y caliente, metales pesados y análisis microbiológico de coliformes y *Escherichia coli*.

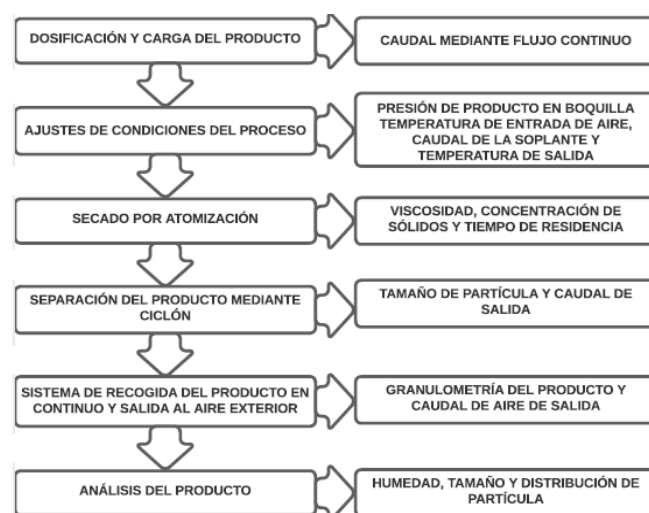


Figura 1. Etapas en los procesos de secado por *spray drying*.

Determinación de pH

Se determinó con la ayuda de un pH-metro, se pesó 1 gramo de la muestra pulverizada de *I. guayusa* obtenidas por *spray drying*, se disolvió en 15 mL de agua destilada y se midió el valor de pH.

Determinación de cenizas totales

Se pesó 1 g de muestra obtenida por *spray drying* por duplicado en un crisol, para luego colocarlas en una plancha de calentamiento a 500 °C para carbonizarla, seguidamente se situaron los crisoles en una mufla a una temperatura de 550 °C por un tiempo de 5 horas, después de haberse cumplido el tiempo, con ayuda de pinzas metálicas se procedió a retirar las muestras y se dejó enfriar en un desecador por una 1 hora. El cálculo de las cenizas totales se realizó utilizando la ecuación (3).

$$C = \frac{M1 - m}{M2 - m} \quad (3)$$

Donde, C: porcentaje de cenizas totales, M1: masa del crisol más la muestra incinerada (g), M2: masa del crisol más la muestra fresca (g), m: masa del crisol vacío (g).

Determinación de solubilidad en caliente y en frío

En caliente: se pesaron 2,5 g de muestra en un vaso de precipitación de 500 mL y se disolvieron en 250 mL de agua desmineralizada acabada de hervir. Se agitó moderadamente y se registró el tiempo hasta la total disolución, evidenciado visualmente.

En frío: Se realizó de la misma manera que en caliente, pero utilizando agua desmineralizada a 16 °C±2 °C.

Determinación de microorganismos mesófilos y coliformes totales

Para la determinación de mesófilos totales y coliformes se utilizó el método de las diluciones sucesivas y la siembra por extensión, utilizando como medios de cultivo respectivamente el Plate Count Agar (PCA) y el Chromocult.

Los análisis se realizaron a partir de una disolución madre preparada mezclando 1 g de sólido pulverulento de *I. guayusa*

con 9 mL de agua destilada estéril. A partir de esta disolución se realizaron las diluciones sucesivas hasta la dilución 10:4. De las diluciones 10:3 y 10:4 se tomaron 100 μL por repetición y se sembraron en cajas Petri, previamente preparadas. Por cada dilución se consideraron tres repeticiones. Para la determinación de coliformes totales se sembró directamente de la disolución madre ya que el objetivo no era cuantificar, sino determinar la presencia/ausencia de dichas bacterias. Las cajas se incubaron a una temperatura de 37 °C por un tiempo de 48 h, para los microorganismos mesófilos y a 25 °C por 48 h, para los coliformes. Transcurridas las 48 h se observaron las cajas para determinar si había crecimiento y se consideraron, para fines de conteo, exclusivamente las cajas Petri con número de colonias entre 30 y 300 $\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$. Para las bacterias coliformes se utilizó la tabla colorimétrica para interpretar los resultados, adjunta al medio de cultivo Chromocult. De hecho, en este medio de cultivo, las distintas especies de coliformes aparecen de diferentes colores, lo cual es un carácter taxonómico que permite reconocer de qué bacteria se trata.

Determinación de cobre, plomo, hierro y zinc mediante espectrofotometría de absorción atómica

Para el tratamiento por digestión se pesó 0,5 g de las muestras obtenidas por *spray drying*, luego se adicionó 1 mL de peróxido de hidrógeno y 7 mL de ácido nítrico (HNO_3) concentrado, seguidamente se colocaron los pocillos con las muestras en el equipo de sistema de digestión de muestras asistida por microondas por un tiempo de 1 hora y 30 minutos. Después se colocaron las muestras en matraces de 50 mL y se aforó con HNO_3 (1 M). Finalmente, se procedió a la respectiva lectura en el espectrofotómetro de absorción atómica para determinar la concentración de los metales Cu, Zn, Fe y Pb. Para la cuantificación se utilizó el método de la curva de calibración, a través de la expresión de cálculo (4).

$$m = \frac{\text{PPM} \cdot \text{DFI}}{M} \quad (4)$$

Donde, m: concentración del metal a determinar ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), PPM: concentración de la disolución de ensayo ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), DFI: factor de dilución, M: biomasa de la muestra (g).

Resultados y discusión

Evaluación del diseño de experimentos

Respecto a la variable de respuesta: concentración de cafeína, los resultados del efecto de los factores tiempo y relación sólido-líquido sobre la extracción de cafeína obtenida mediante de la decocción de las hojas de *I. guayusa*, variaron entre 62,98-71,70 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ y se calcularon en función de la biomasa seca. Los valores de cada combinación se presentan en la tabla 2.

Tabla 2. Valores de cafeína en los diferentes tratamientos.

Experimento	A	B	Cafeína
	Tiempo (min)	S/L ($\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Concentración ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)
1	15	5/100	65,96
2	15	5/100	64,47
3	15	5/100	65,30
4	15	15/100	67,87
5	15	15/100	68,30
6	15	15/100	66,81
7	22,5	10/100	68,94
8	22,5	10/100	66,81
9	22,5	10/100	67,66
10	30	5/100	62,98
11	30	5/100	64,68
12	30	5/100	64,04
13	30	15/100	71,49
14	30	15/100	71,70
15	30	15/100	68,72

S/L: relación sólido/líquido.

La figura 2 muestra el diagrama de Pareto donde se incluyeron dos líneas horizontales de corte estadístico, la primera fue la línea t-value, la cual indicó que los factores que se encontraron por encima de esta fueron significativos, la segunda fue la línea de Bonferroni, donde aquellos factores que superaron este límite fueron considerados altamente significativos ($P < 0,05$).

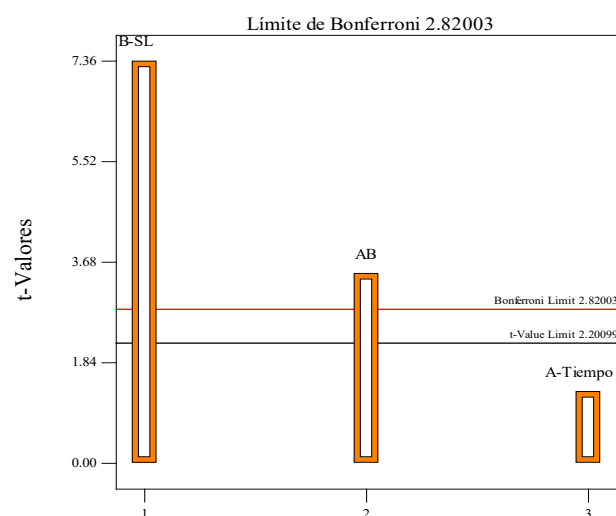


Figura 2. Diagrama de Pareto para el valor t de los efectos para la extracción de cafeína.

En el caso del factor B (relación sólido-líquido) se encontró por encima del límite de Bonferroni mostrando su efecto altamente significativo en la extracción de cafeína; sin embargo, el factor A (tiempo), no presentó influencia significativa en la extracción de cafeína ubicándose por debajo de la línea t-value. La interacción entre los dos factores fue significativa, lo cual mostró que el factor tiempo por sí solo no afectó el rendimiento de extracción, pero potenció el efecto de la relación sólido-líquido.

La interacción entre los factores de estudio y la variable dependiente cafeína, se aprecia en la figura 3. En (A), se observó el efecto positivo del factor relación sólido-líquido sobre la extracción de cafeína, y se evidenció que al aumentar los niveles de este factor se incrementó la concentración de cafeína; no

obstante, (B) reveló que al incrementar el tiempo no se mostró un aumento significativo en el rendimiento de cafeína.

De acuerdo con Anderson y Whitcomb, (2016), la diferencia entre el R^2 predicho y el ajustado debe ser menor a 0,2 para que el modelo factorial utilizado en una investigación sea adecuado. Con valores de $R^2 = 0,8987$, R^2 -ajustado = 0,8380 y R^2 -predicho = 0,6797 en el presente estudio, el modelo desarrollado tuvo un buen ajuste y cumple la condición de tener una diferencia menor a 0,2. A continuación se muestra la figura 4 sobre la interacción de los valores predichos y experimentales de cafeína. A partir de los valores experimentales que se mostraron en la figura 4, se ha generado el siguiente modelo matemático.

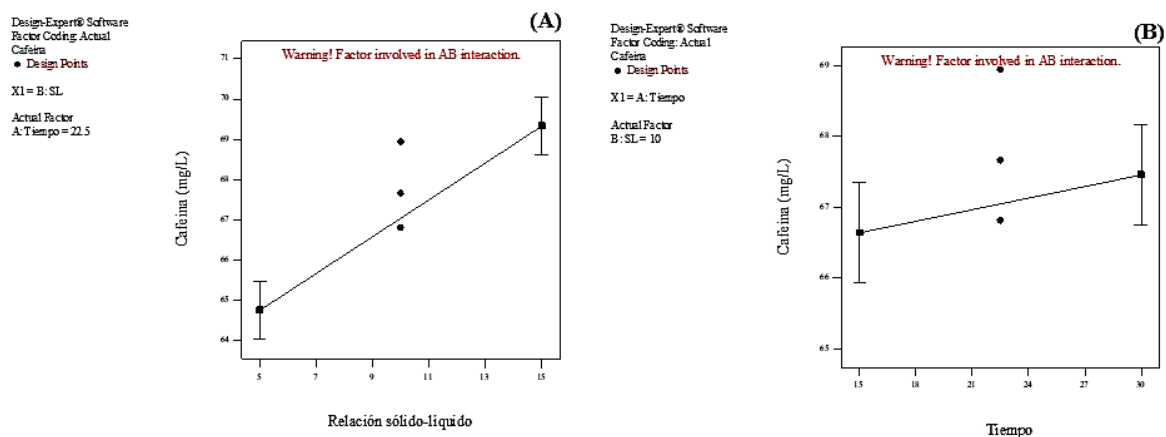


Figura 3. Interacción de los factores relación sólido-líquido y concentración de cafeína (A); interacción de los factores tiempo y concentración de cafeína (B).

$$\text{Cafeína} = 67,73 - 0,2 \text{ Tiempo} + 0,19 \text{ Relación sólido-líquido} + 0,03 \text{ Tiempo/Relación sólido-líquido}.$$

La ecuación, en términos de factores experimentales, se puede usar para hacer predicciones sobre la respuesta para los niveles de cada factor.

En la tabla 3 se pueden apreciar los resultados del modelo factorial seleccionado.

Tabla 3. ANOVA para el modelo factorial seleccionado.

Fuente	Suma de cuadrados	gl	Cuadrados medios	Valor F	p-valor Prob > F)	
Modelo	78,84	3	26,28	21,05	< 0,0001	Significativo
A-Tiempo	2,00	1	2,00	160	0,2317	
B-SL	62,84	1	62,84	50,33	< 0,0001	
AB	14,00	1	14,00	11,21	0,0065	
Residual	13,73	11	1,25			
Falta de ajuste	2,14	1	2,14	1,84	0,2046	No significativo
Error puro	11,60	10	1,16			
Total corregido	92,57	14				

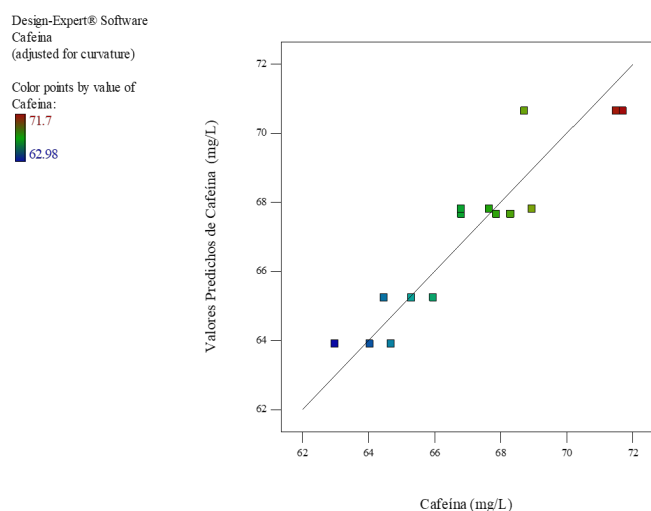


Figura 4. Relación entre los valores experimentales y predichos de la extracción de cafeína de hojas de *I. guayusa*.

La figura 5 representa correspondientemente un gráfico tridimensional (A) y un gráfico bidimensional (B) donde se relacionan los factores de la investigación y la cantidad de cafeína, demostrando una vez más la significancia de la relación sólido-líquido y la falta de influencia del tiempo sobre el rendimiento de extracción.

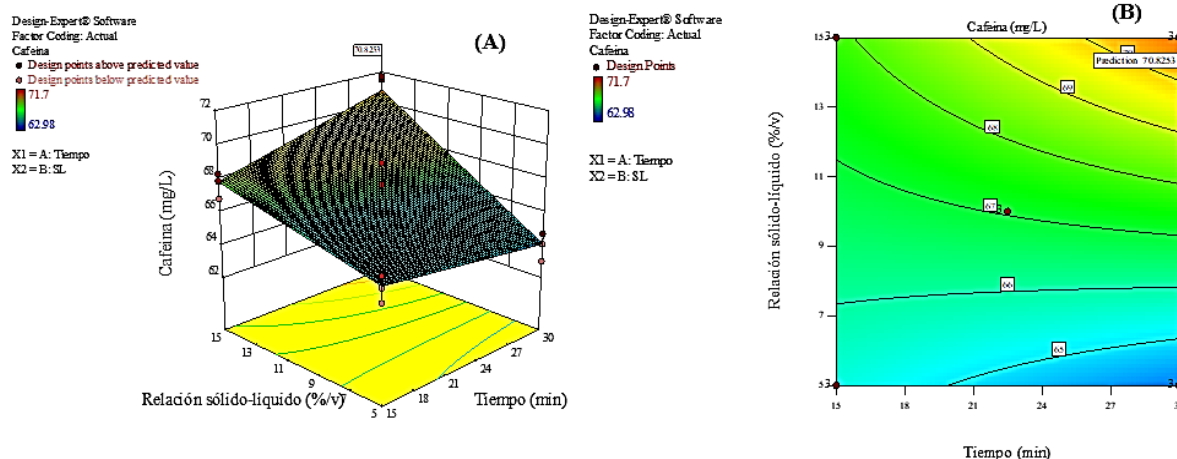


Figura 5. Interacción de los factores tiempo y relación sólido-líquido frente a la concentración de cafeína (A y B).

Factores que afectan la extracción de los polifenoles totales

La concentración de los compuestos polifenólicos totales fluctuó entre 33,0-55,76 mg·L⁻¹ expresado sobre la base del ácido gálico. A continuación, se presenta la tabla 4 con los resultados obtenidos en cada combinación de los factores de estudio.

Tabla 4. Tratamientos realizados para la determinación de polifenoles totales.

Experimento	A	D	PT
	Tiempo (min)	S/L (g·mL ⁻¹)	Concentración (mg·L ⁻¹)
1	15	5/100	33,0
2	15	5/100	33,3
3	15	5/100	34,4
4	15	15/100	40,5
5	15	15/100	41,5
6	15	15/100	39,3
7	22,5	10/100	39,1
8	22,5	10/100	39,6
9	22,5	10/100	39,9
10	30	5/100	28,2
11	30	5/100	31,2
12	30	5/100	30,9
13	30	15/100	50,9
14	30	15/100	55,8
15	30	15/100	52,5

S/L: relación sólido/líquido; PT: polifenoles totales.

En la figura 6 se puede visualizar el diagrama de Pareto, en el cual se mostró que, por lo que se refirió a la extracción de polifenoles totales, el efecto de los factores relación sólido-líquido, tiempo y la interacción entre ambos se encontraron por encima del límite de Bonferroni, lo que demostró que todos los factores fueron altamente significativos para P<0,05.

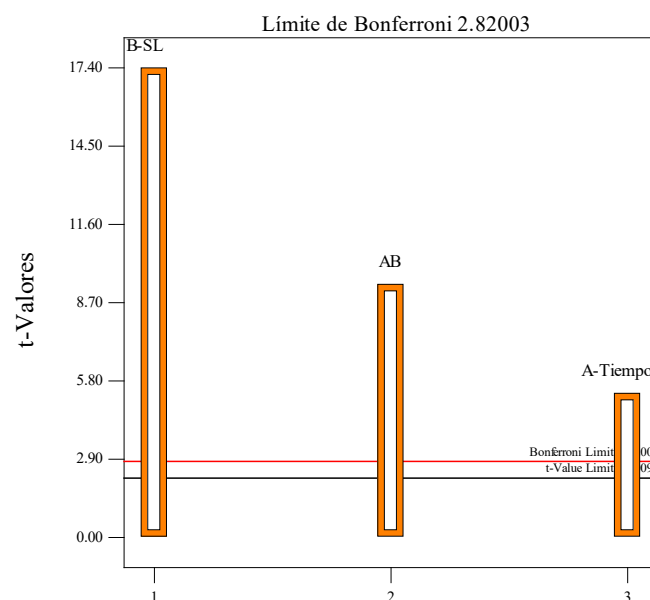


Figura 6. Diagrama de Pareto para el valor t de los efectos para la extracción de los polifenoles totales.

La figura 7 muestra el efecto positivo que tuvieron los factores relación sólido-líquido y tiempo sobre el rendimiento de la concentración de polifenoles totales; se puede observar que la

variable dependiente aumentó cada vez que los niveles de cada factor se incrementaron y esto se puede apreciar en las rectas con pendiente positiva que se mostraron en cada sección de la figura (A) y (B).

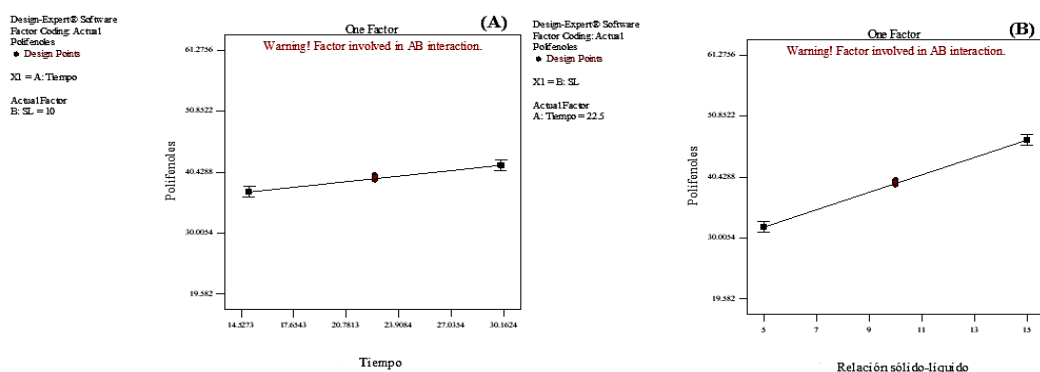


Figura 7. Relación entre los factores concentración de polifenoles tiempo (A); relación entre los factores concentración de polifenoles y relación sólido-líquido (B).

Como en el caso de la cafeína, se consideró nuevamente el modelo de Anderson y Whitcomb (2016), en el que se afirmó que el modelo experimental fue adecuado porque la diferencia entre los valores de R-predicho y R-ajustado fue inferior a 0,2. En este caso, con un valor de $R^2 = 0,9766$, la extracción de los polifenoles totales mostró un excelente ajuste, además, se cumplió con los criterios de tener una diferencia inferior a 0,2 con R-predicho 0,9503 y R-ajustado 0,9702. En la figura 8 se observa la interacción entre los valores predichos y experimentales de polifenoles totales.

de cada factor. En la tabla 5 se puede apreciar el modelo factorial seleccionado.

Tabla 5. ANOVA para el modelo factorial seleccionado.

Fuente	Suma de cuadrados	gl	Cuadrados medios	Valor F	p-valor (Prob > F)	
Modelo	921,92	3	307,31	152,71	< 0,0001	Significativo
A-Tiempo	62,75	1	62,75	31,18	0,0002	
B-SL	665,73	1	665,73	330,82	< 0,0001	
AB	193,44	1	193,44	96,13	0,0001	
Residual	22,14	11	2,01			
Falta de ajuste	0,15	1	0,15	0,066	0,8019	No significativo
Error puro	21,99	10	2,20			
Total corregido	944,06	14				

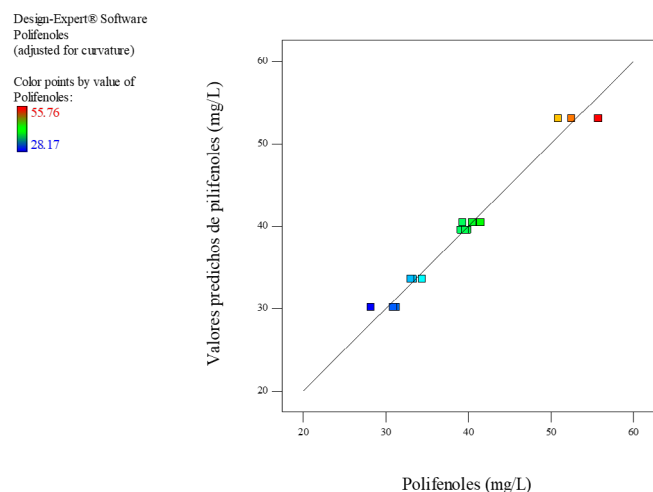


Figura 8. Relación entre los valores experimentales y predichos de la extracción de polifenoles totales de hojas de *I. guayusa*.

A partir de los valores experimentales que se mostraron en la figura 8, se ha generado el siguiente modelo matemático:

$$\text{Polifenoles totales} = 39,34 + 2,29 \text{ Tiempo} + 7,45 \text{ Relación sólido-líquido} + 4,02 \text{ Tiempo/Relación sólido-líquido}$$

La ecuación, en términos de factores experimentales, se puede usar para hacer predicciones sobre la respuesta para los niveles

La figura 9 representa correspondientemente un gráfico tridimensional (A) y un gráfico bidimensional (B) donde se relacionó la cantidad de polifenoles totales y los factores de investigación, se demostró una vez más la significancia de estos sobre el rendimiento de extracción de los polifenoles totales.

En resumen, las mejores condiciones para obtener un extracto acuoso rico en cafeína y polifenoles totales fueron las que prevén 15 g de hojas secas de *I. guayusa* en 100 mL de agua desmineralizada llevadas a decocción por 30 min.

Obtención y evaluación del extracto sólido de *I. guayusa* mediante *spray drying*

La obtención del sólido pulverulento por *spray drying* arrojó un rendimiento de 7,99%; este resultado pudiera mejorarse en el futuro en la medida en que se sometían a secado extractos previamente concentrados que pudieran poseer mayores concentraciones de sólidos disueltos.

Parámetros físico-químicos y microbiológicos basados en la NTE INEN 1122:2013

Una vez realizados los extractos a partir de los sólidos pulverulentos fue posible determinar algunos parámetros físico-químicos y microbiológicos basados en la normativa NTE INEN 1122:2013, relacionada al café soluble, el cual representó el producto existente en el mercado nacional e internacional más similar al objeto de la presente investigación.

A continuación, se puede apreciar en la tabla 6 la comparación de los parámetros físico-químicos obtenidos analizando los sólidos pulverulentos del presente trabajo y los intervalos permitidos por el café soluble.

Tabla 6. Comparación entre algunos datos físico-químicos de los extractos de guayusa y del café soluble.

Parámetro	Guayusa	Café	
		Mínima	Máxima
pH	5,5	4,7	5,5
Cenizas totales	13,87%	-	14%
Solubilidad en agua caliente	30 s	-	30 s
Solubilidad en agua fría	3 min	-	3 min

En la tabla 6, se observan los parámetros físico-químicos de las muestras del preparado hidrosoluble de *I. guayusa* obtenida por la técnica de *spray drying*, los cuales se encontraron dentro de los requisitos establecidos por la normativa NTE INEN 1122:2013 del café soluble.

En la tabla 7 se aprecian los valores de metales obtenidos al analizar las muestras del extracto sólido. Los valores relacionados al cobre se hallaron dentro de los parámetros aceptados por la normativa NTE INEN 1122:2013 del café soluble. El plomo presentó valores inferiores al límite de detección bajo las condiciones de análisis por espectrofotometría de absorción atómica; sin embargo, el zinc superó el límite máximo permisible por la normativa anteriormente mencionada.

Posiblemente los altos valores de zinc se debieron a características específicas de los suelos donde se recolectaron las hojas, por lo que se deberían realizar nuevas investigaciones con el objetivo de profundizar este tema. El contenido de hierro en las muestras de extracto seco de *I. guayusa* fue de 19,35 mg.kg⁻¹. Este

metal, no contemplado en la tabla 7, pues no se establecieron límites para el café soluble, al contrario de cobre, plomo y zinc, beneficioso para el buen funcionamiento del organismo humano, y se requieren diferentes cantidades diarias en dependencia de la edad, el sexo y determinadas condiciones fisiológicas (Salinas, 2004).

Tabla 7. Comparación de la presencia de algunos metales entre los extractos de guayusa y el café soluble.

Parámetro	Guayusa (mg·kg ⁻¹)	Café (mg·kg ⁻¹)	
		Mínimo	Máximo
Cobre	12,35	-	20
Plomo	N/D	-	1
Zinc	234,5	-	50

Análisis microbiológicos

Los resultados de los análisis microbiológicos mostraron que los extractos obtenidos, por *spray drying*, no tuvieron presencia de coliformes ni microorganismos mesófilos, ya que no fueron observadas colonias en los cultivos de control.

Es importante destacar que los metabolitos secundarios de *I. guayusa* pueden contribuir a los efectos favorables de las bebidas y comidas que contienen metilxantina de dos maneras: primero, al trabajar en sinergia con la cafeína y la teobromina para producir efectos positivos, y segundo, al reducir los efectos negativos de la cafeína. Aunque hay poca información sobre estudios en humanos, los primeros estudios en ratas indicaron que el uso de cafeína retardaron los efectos del envejecimiento en la función cognitiva (Schuster y Mitchell, 2019).

Teniendo en cuenta los diferentes tratamientos, en la presente investigación se lograron niveles de extracción de cafeína que resultaron en un valor de concentración máxima de 71,70 mg·L⁻¹ (1,43 mg·g⁻¹). Una investigación desarrollada por Wise y Santander (2018) señaló valores de cafeína de 19,08 mg·g⁻¹ en hojas secas de *I. guayusa*; el mismo estudio señaló que las investigaciones realizadas por otros autores mostraron una amplia gama de valores de concentración de cafeína (8,13-75,8 mg·g⁻¹), lo que sugirió que se necesita más investigación para comprender completamente la variabilidad del contenido de cafeína en las hojas de *I. guayusa*. La cantidad de cafeína en las hojas puede variar según la edad de la planta, su ubicación, el clima, el suelo y cómo se cosecha (por un solo corte o por cosechas posteriores) (Montaño et al., 2019).

Según una investigación de Chianese et al. (2019), los triterpenoides pentacíclicos contenidos en *I. guayusa* tuvieron

una amplia variedad de modos de acción, así como una gran cantidad de componentes activos. Según García-Ruiz et al. (2017), las hojas de *I. guayusa* contuvieron alrededor de 14 compuestos fenólicos, así mismo, demostraron que tuvo una fuerte capacidad antioxidante utilizando las técnicas analíticas DPPH y ORAC. Según Gan et al. (2018) los extractos de hojas de *I. guayusa* elaborados con etanol presentaron una alta concentración de flavonoides y fenoles. La técnica DPPH fue utilizada por Villacís-Chiriboga et al. (2018) para cuantificar 14 compuestos fenólicos diferentes y siete carotenoides diferentes, siendo la luteína la más representativa de este último grupo. La cantidad total de polifenoles de la *I. guayusa*, según un estudio de Pardau et al. (2017) varió entre 54,39 y 67,23 mg·g⁻¹. Los autores descubrieron que las sustancias principales contenidas en esta especie fueron derivados del ácido cafeoil-quinico mediante el uso de una técnica espectrofotométrica. La actividad antioxidante de los extractos de *I. guayusa* estuvo directamente correlacionada con la presencia de los compuestos antes mencionados.

Conclusiones

Se obtuvo un preparado hidrosoluble en forma de extracto seco a partir de extractos acuosos de la especie *I. guayusa*, aplicando la técnica *spray drying*. El preparado representó un ingrediente basado en una especie amazónica para nuevas bebidas funcionales. Las mejores condiciones para obtener un extracto acuoso rico en cafeína y polifenoles totales son las que prevén 15 g de hojas secas de *I. guayusa* en 100 mL de agua desmineralizada llevadas a decocción por 30 min.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de interés en la presente publicación en ninguna de sus fases.

Referencias bibliográficas

- Anderson, M. J. and Whitcomb, P. J. (2016). *Rsm simplified: Optimizing processes using response surface methods for design of experiments*. Second Edition, 1-295. <https://doi.org/10.1201/9781315382326/RSM-Simplified-mark-anderson-patrick-whitcomb>
- Andrade, S., Vargas-Burgos, J., González, V., Romero, M. y Andrade, V. (2019). Uso de plantas medicinales en comunidades indígenas asentadas en un bosque siempreverde piemontano del cantón Santa Clara, Amazonía Ecuatoriana. *Revista Amazónica Ciencia y Tecnología*, 8(2), 235-243. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7153092&info=resumen&idioma=ENG>
- Bennett, B. and Alarcón, R. (2015). Hunting and hallucinogens: The use psychoactive and other plants to improve the hunting ability of dogs. *Journal of Ethnopharmacology*, 171, 171-183. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.05.035>
- Cartay, R. y Chaparro-Martínez, E. (2020). Usos turísticos de la biodiversidad en la Región Amazónica Ecuatoriana. *Universidade de Caxias Do Sul*, 12(3), 14. <https://doi.org/10.18226/21789061.v12i3p484>
- Castañeda, S., Hernandez, A., Portela, L., Rangel, A., Vanegas, M., Costa, G. y Alba, A. (2022). Evaluación de la actividad antimicrobiana y caracterización química de fracciones y compuestos de *Ilex guayusa* Loes. frente a *Helicobacter pylori*. *Revista Productos Naturales*, 5(2), 29-30. <https://doi.org/10.3407/RPN.V5I2.6767>
- Chianese, G., Golin-Pacheco, S. D., Tagliatalata-Scafati, O., Collado, J. A., Munoz, E., Appendino, G. and Pollastro, F. (2019). Bioactive triterpenoids from the caffeine-rich plants guayusa and maté. *Food Research International*, 115, 504-510. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2018.10.005>
- Gan, R., Zhang, D., Wang, M. and Corke, H. (2018). Health benefits of bioactive compounds from the genus *Ilex*, a source of traditional caffeinated beverages. *Nutrients*, 10(11), 1-17. <https://doi.org/10.3390/NU10111682>
- García-Ruiz, A., Baenas, N., Benítez-González, A. M., Stinco, C. M., Meléndez-Martínez, A. J., Moreno, D. A. and Ruales, J. (2017). Guayusa (*Ilex guayusa* L.) new tea: phenolic and carotenoid composition and antioxidant capacity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(12), 3929-3936. <https://doi.org/10.1002/JSFA.8255>
- Intriago, A., Oleas, A., Yáñez, D., Carvajal, D. and Proaño, M. (2022). Optical aptasensor for in situ detection and quantification of methylxanthines in *Ilex guayusa*. *ACI Avances En Ciencias e Ingenierías*, 14(1), 1-20. <https://doi.org/10.18272/ACI.V14I1.2301>
- Lozano, P., Bussmann, R., Peyre, G. y Grefa, F. (2020). Regeneración vegetal en la caldera del volcán Reventador en la cordillera subandina del norte de la Amazonía Ecuatoriana. *Revista Ciencia y Tecnología*, 13(1), 27-37. <https://doi.org/10.18779/cyt.v13i1.345>
- Melo, O. y López, L. (2020). Diseño de experimentos. Métodos y aplicaciones.
- Mena Silva, P. A., Linarez González, Y. C., Camaño Carballo, L. y Medina Vargas, E. F. (2019). La pigmentación de las resinas microhíbridas Z250 al estar en contacto con bebidas energizantes naturales a base de cafeína. *Dilemas Contemporáneos: Educación, Política y Valores*. <https://doi.org/10.46377/DILEMAS.V3I1I.1234>
- Montaño, J., Rosillo, E., Zhinín, H. y Pucha-Cofrep, D. (2019). Características anatómicas y propiedades físicas de la madera de *Ilex guayusa* Loes. *Bosques Latitud Cero*, 9(1), 31-45. <https://revistas.unl.edu.ec/index.php/bosques/article/view/583>
- Muñoz-Bernal, Ó., Torres-Aguirre, G., Núñez-Gastélum, J., Rodrigo-García, J., Ayala-Zavala, F. y Álvarez-Parrilla, E. (2017). Nuevo acercamiento a la interacción del reactivo de Folin-Ciocalteu con azúcares durante la cuantificación de polifenoles totales. *TIP*, 20(2), 23-28. <https://doi.org/10.1016/j.recqb.2017.04.003>
- Noriega, P., Larenas, C., Nadal, A., Fonseca, R., Silva, M., Calderón, L. and Mosquera, T. (2022). Valuation study on the extracts of *Ilex guayusa* Loes. as an antioxidant

- and anti-aging raw material. *Journal of Medicinal Plants*, 17(1), 28-36. <https://doi.org/10.5897/JMPR2022.7265>
- Pardau, M. D., P Pereira, A. S., Apostolides, Z., Serem, J. C. and Bester, M. J. (2017). Antioxidant and anti-inflammatory properties of *Ilex guayusa* tea preparations: a comparison to *Camellia sinensis* teas. *Food & Function*, 4601-4610.
- Pereira, K., Mota-Ferreira, D., Alvarenga, G., Salvador-Pereira, M., Souto-Barcelos, M. and Gomes da Costa, J. (2018). Microencapsulation and release controlled by the diffusion of food ingredients produced by spray drying: A review. *Brazilian Journal of Food Technology*, 21(20), 1-9. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.08317>
- Radice, M., Bravo, L., Perez, M., Cerda, J., Tapuy, A., Riofrío, A., Neill, D. y Chiurato, M. (2017). Determinación de polifenoles en cinco especies amazónicas con potencial antioxidante. *Revista Amazónica Ciencia y Tecnología*, 6(1), 55-64. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6145606&info=resumen&idioma=SPA>
- Radice, M., Murillo, M., Fuentes, N. y Cosio, N. (2015). Biocomercio y biodiversidad en el Ecuador. Oportunidades. *ECOCIENCIA*, 3(6), 1-27.
- Salinas, P. G. Á. (2004). El hieno en la alimentación. *Farmacia Profesional*, 18(2), 54-56.
- Sanabria, L. M., Martínez, J. A. y Baena, Y. (2017). Validación de una metodología analítica por HPLC-DAD para la cuantificación de cafeína en un ensayo de permeación in vitro empleando mucosa oral porcina. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 46(2), 202-219. <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v46n2.67956>
- Schuster, J. and Mitchell, E. S. (2019). More than just caffeine: psychopharmacology of methylxanthine interactions with plant-derived phytochemicals. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 89, 263-274. <https://doi.org/10.1016/J.PNPBP.2018.09.005>
- Torres, B., Radice, M., Ochoa-Moreno, S. y Cueva, K. (2017). *Economía de recursos naturales y biocomercio-oportunidades y desafíos*.
- Villacís-Chiriboga, J., García-Ruiz, A., Baenas, N., Moreno, D. A., Meléndez-Martínez, A. J., Stinco, C. M., Jerves-Andrade, L., León-Tamariz, F., Ortiz-Ulloa, J. and Ruales, J. (2018). Changes in phytochemical composition, bioactivity and in vitro digestibility of guayusa leaves (*Ilex guayusa* Loes.) in different ripening stages. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(5), 1927-1934. <https://doi.org/10.1002/JSFA.8675>
- Villacís Chiriboga, J. (2017). Etnobotánica y Sistemas Tradicionales de Salud en Ecuador. Enfoque en la Guayusa (*Ilex guayusa* Loes). *Etnobiología*, 15(3), 79-88. <https://revistaetnobiologia.mx/index.php/etno/article/view/129>
- Wise, G. and E. Santander, D. (2018). Comparative composition analysis of the dried leaves of *Ilex guayusa* (Loes.). *Journal of Food and Nutrition Research*, 6(10), 638-644. <https://doi.org/10.12691/jfnr-6-10-4>
- Wise, G. and Negrin, A. (2020). A critical review of the composition and history of safe use of guayusa: a stimulant and antioxidant novel food. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(14), 2393-2404. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1643286>

Contribución de los autores

Autor	Contribución
Sting Brayan Luna-Fox	Revisión bibliográfica, parte experimental de la investigación, análisis e interpretación de los datos, preparación y redacción y edición del manuscrito.
Reinaldo Rigoberto Álvarez Castro	Revisión bibliográfica, parte experimental de la investigación, análisis e interpretación de los datos.
Nelly Jazmín Peñafiel-Bonilla	Revisión bibliográfica, participación en la redacción del manuscrito.
Matteo Radice	Revisión bibliográfica, diseño de la investigación, análisis de datos y corrección de estilo.
Laura Scalvenzi	Análisis microbiológicos, experimentación y redacción de dicha sección.
Yasiel Artega-Crespo	Análisis estadísticos y edición del manuscrito.
Orestes Darío López Hernández	Obtención del producto mediante <i>spray drying</i> .
Luis Ramón Bravo-Sánchez	Diseño de la investigación, colaboración en análisis químicos, análisis e interpretación de los datos, preparación y redacción y edición del manuscrito.

