



FACULTAD DE POSGRADOS

INFLUENCIA DE LOS MÉTODOS DE MOLIENDA EN LA CONCENTRACIÓN
DE CAFEÍNA Y POLIFENOLES TOTALES EN LA GUAYUSA.

PROFESORES:

Lucía Toledo

Valeria Almeida

Iván Samaniego

AUTOR:

Paúl Rodrigo Cueva Mogrovejo

2022

RESUMEN

La guayusa es una planta amazónica cuyas propiedades han llamado la atención de la industria ecuatoriana, en la cual se buscan estrategias para disminuir el impacto del procesamiento sobre su contenido de compuestos bioactivos. Se analizó el efecto de la molienda sobre la cantidad de polifenoles totales y cafeína al aplicar tres tiempos de molienda: 5, 10 y 20 minutos, utilizando un molino de martillos industrial y un molino de discos simple. Se obtuvo un extracto acuoso el cual se sometió al análisis de polifenoles totales aplicando el método de Folin - Ciocalteu, mientras que el análisis del contenido de cafeína se lo realizó por cromatografía HPLC-UV-VIS. El resultado para polifenoles totales indicó que no hay diferencias significativas ($p > 0.05$) entre cada tiempo de molienda, pero si existen diferencias al aplicar diferentes tipos de molino ($p < 0.05$), siendo molino de martillos en donde se obtuvo la mayor concentración de polifenoles. En cuanto a cafeína, se apreciaron diferencias ($p < 0.05$) en el tiempo de molienda a los 20 minutos, siendo este efecto evidente al utilizar el molino de discos. La variación de la concentración de polifenoles totales entre molinos podría ser resultado de la velocidad empleada por cada uno, mientras que el tiempo de molienda podría influir en como se distribuye el tamaño de partícula acelerando la extracción de cafeína. La elección de las condiciones de molienda dependerá del compuesto al que se le dé prioridad.

Palabras Clave: Guayusa, Métodos de molienda, Polifenoles totales, Cafeína, Influencia.

ABSTRACT

Guayusa is an Amazonian plant whose properties have attracted the attention of the Ecuadorian industry, which is seeking strategies to reduce the impact of processing on its content of bioactive compounds. The effect of grinding on the amount of total polyphenols and caffeine was analyzed by applying three grinding times: 5, 10 and 20 minutes, using an industrial hammer mill and a simple disc mill. An aqueous extract was obtained and analyzed for total polyphenols using Folin-Ciocalteu method, while the caffeine content was analyzed by HPLC-UV-VIS chromatography. The result for total polyphenols indicated that there are no significant differences ($p>0.05$) between each grinding time, but there are differences when applying different types of mills ($p<0.05$), being hammer mill where the highest concentration of polyphenols was obtained. As for caffeine, differences were observed ($p<0.05$) in the grinding time at 20 minutes, this effect being evident when using the disc mill. The variation in total polyphenol concentration between mills could be a result of the speed employed by each mill, while the grinding time could influence how the particle size is distributed accelerating caffeine extraction. The choice of milling conditions will depend on the compound given priority.

Key words: Guayusa, Milling methods, Total polyphenols, Caffeine, Influence

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. LITERATURA RELACIONADA AL PROBLEMA	2
2.1. GUAYUSA.....	2
2.1.1. Generalidades	2
2.1.2. Composición	3
2.1.3. Proceso de producción	4
2.1.4. Producción en el Ecuador.....	4
2.2. CAFEINA.....	5
2.2.1. Generalidades	5
2.2.2. Actividad biológica	6
2.3. POLIFENOLES	7
2.3.1. Generalidades	7
2.3.2. Actividad biológica	8
2.4. MOLIENDA	9
2.4.1. Generalidades	9
2.4.2. Molino de discos	10
2.4.3. Molino de martillos.....	10
3. IDENTIFICACIÓN DEL OBJETO DE ESTUDIO	12
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	12
5. OBJETIVOS.....	13
5.1. OBJETIVO GENERAL:.....	13

5.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS:	13
6. JUSTIFICACIÓN Y APLICACIÓN DE LA METODOLOGÍA.....	14
6.1. JUSTIFICACIÓN	14
6.2. METODOLOGÍA.....	15
6.2.1. Tipo de investigación	15
6.2.2. Población y muestra	15
6.2.3. Diseño experimental	15
6.3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
7. RESULTADOS.....	19
7.1. Análisis de polifenoles totales.....	19
7.2. Análisis de cafeína	21
8. DISCUSIONES DE LOS RESULTADOS Y PROPUESTA DE LA SOLUCIÓN	23
9. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	25
9.1. CONCLUSIONES.....	25
9.2. RECOMENDACIONES	25
10.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
1. ANEXOS	35

1. INTRODUCCIÓN

La guayusa (*Ilex guayusa*) pertenece a la familia de las aquifoláceas que crece en el oriente ecuatoriano (Dueñas et al., 2016) conocida desde hace siglos por las etnias indígenas de la amazonía, atribuyéndole propiedades curativas y revitalizantes. El día de hoy la guayusa se cultiva y comercializa tanto para consumo local como para exportación, convirtiéndose en parte importante de la economía en la región amazónica del Ecuador (Villacís-Chiriboga, 2017). Entre sus características químicas destaca el contenido de cafeína, antioxidantes como los polifenoles y metilxantinas (Villacís-Chiriboga et al., 2018a), y otros fitoquímicos que en combinación producen efectos similares a los del café, aumentando la energía y mejorando la atención (Ganchozo Basurto et al., 2020), propiedades que han hecho de esta planta objeto de varios estudios, y de interés industrial en la cual se busca los métodos tecnológicos más apropiados para aprovechar al máximo dichas propiedades aplicándolas para la elaboración de productos alimenticios como bebidas (Crespo, 2013a), y diversas aplicaciones terapéuticas (Carvalho et al., 2021).

El cultivo por parte de las comunidades amazónicas en las llamadas “chakras”, permite que esta planta conviva en simbiosis junto a otras plantas nativas favoreciendo la agrobiodiversidad, disminuyendo el impacto negativo del monocultivo y beneficiando económicamente a estas poblaciones (Franco et al., 2020). Por sus propiedades y aporte a la comunidad, se han creado asociaciones de productores e industrias que producen productos con valor agregado como bebidas energizantes (Molestina, 2014) té de guayusa (Garrido Navarrete, 2021) o simplemente en sus preparaciones tradicionales, pero con enfoque en promover el turismo de las zonas locales (Sidali et al., 2016).

2. LITERATURA RELACIONADA AL PROBLEMA

2.1. GUAYUSA

2.1.1. Generalidades

La guayusa (*Ilex guayusa* Loes) corresponde a una planta amazónica perteneciente a la familia de las Aquifoliaceae, la cual es nativa de zonas pertenecientes a Ecuador, Colombia, y Perú, con hojas de la forma como se presenta en la Figura 1. Se lo utiliza como parte de bebidas en forma de infusión y su consumo es común entre los habitantes de comunidades amazónicas quienes la han domesticado y la utilizan con fines rituales. (Loizeau, y otros, 2005).



Figura 1. Hojas de guayusa recién cosechadas (Giménez, 2019)

En el Ecuador, su consumo como infusión es muy popular en las comunidades Kwichua, Shuar y Achuar los cuales la cultivan y la consumen casi a diario como una bebida de tipo social, pero así también tiene un valor espiritual y forma parte importante en los rituales de estos pueblos (Dueñas et al., 2016) y se le atribuyen diversas propiedades medicinales para tratar varias enfermedades como los dolores corporales (de la Torre et al., 2008), reumatismo, dolor muscular, asma, resfríos, gastritis, entre otros.

Se conoce también que brinda diversos beneficios a la salud gracias a que posee efectos antiinflamatorios, diuréticos, siendo así también que puede ser utilizado como expectorante, regulador de la presión arterial. Pero quizás uno de los que más resalta es su efecto estimulante por lo que aumenta la agilidad mental reduciendo la fatiga, y su actividad antioxidante (Sequeda-Castañeda et al., 2016).

Los efectos biológicos le han otorgado gran valor a la planta, por lo que en la actualidad está aumentando el interés por la comercialización de la guayusa a escala nacional e internacional (Wise & Negrin, 2020).

2.1.2. Composición

Según Wise y Santander (2018a), las hojas secas de guayusa presentan la siguiente composición proximal:

Tabla 1. Composición proximal de las hojas de guayusa (*Ilex guayusa*)

PARÁMETRO	CANTIDAD (g/100)
Humedad	5,4 ± 0,7
Ceniza	7,7 ± 0,9
Grasa total	8,0 ± 0,2
Proteína total	14,8 ± 0,3
Carbohidratos totales	64,1 ± 1,5
Fibra cruda	37,0 ± 1,7

Sin embargo, su valor proviene principalmente de aquellos fitoquímicos con actividad biológica. Se han evidenciado una cantidad significativa de fitoquímicos en las hojas secas entre las cuales se encuentra la teobromina, cafeína, polifenoles y otros antioxidantes (Wise & Negrin, 2020). En cuanto a su toxicidad, no se ha encontrado evidencia de casos clínicos de intoxicación relacionados por ingesta de guayusa por lo que aparentemente su consumo es seguro (Wise & Santander, 2018b). Los estudios toxicológicos en ratones también han demostrado que la ingesta del concentrado líquido de guayusa no presenta efectos nocivos (Kapp et al., 2016).

2.1.3. Proceso de producción

En la Figura 2 se describe el proceso de producción de guayusa para exportación producido por una de las empresas procesadora de la hoja:



Figura 2. Diagrama de proceso para la elaboración de guayusa para exportación.

2.1.4. Producción en el Ecuador

En la actualidad, Ecuador es el mayor productor de guayusa a nivel mundial acaparando el 98% de la producción de esta planta (Meléndez, 2022).

De acuerdo al Ministerio de Producción Comercio Exterior Inversiones y Pesca, (2022), desde el 2010 el mercado internacional ha ido en expansión de manera que desde el 2020 la guayusa se exporta a 25 países de América, Europa y Asia, lo que ha permitido generar hasta 3 millones de dólares en exportaciones, siendo las provincias de Pastaza y Napo los mayores territorios de producción de la hoja con una producción de 72 toneladas por año, lo que ha beneficiado a los productores locales y habitantes de las zonas, especialmente a comunidades indígenas. Actualmente se trabaja en un consorcio conformado por seis empresas para fomentar la exportación y el posicionamiento de la guayusa en otros mercados internacionales, así también el apoyo para obtener certificaciones que brindarán un valor agregado al producto.

Muchas de las empresas productoras en el oriente ecuatoriano se encuentran comprometidas con aportar beneficios a las comunidades indígenas y el medio ambiente por lo que algunas de ellas tienen bien establecidos principios de comercio justo y prácticas para el cuidado del medio ambiente, lo que hace aumentar el valor agregado del producto. (Crespo, 2013b)

2.2. CAFEINA

2.2.1. Generalidades

La cafeína es uno de los fitoquímicos con bioactividad más conocidos y ampliamente estudiados en el mundo. Corresponde a un compuesto de la familia de las metilxantinas, cuya fuente natural más conocida es el café (Tafalla et al., 2007) sin embargo también se conocen otras fuentes naturales muy comunes como el té (*Camellia sinensis*), el cacao (*Theobroma cacao*), las hojas de plantas de la familia *Ilex* como la guayusa o el mate, la guaraná (*Paullina cupana*) entre otros (Schuster & Mitchell, 2019). Su estructura molecular se representa en la Figura 3.

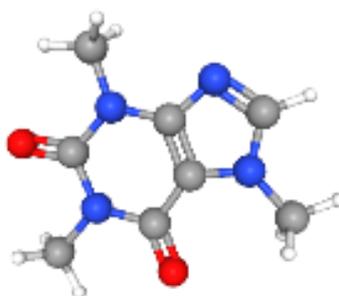


Figura 3. Estructura 3D de la molécula de cafeína
(National Center for Biotechnology Information, 2022)

La concentración de cafeína en cada una de las fuentes puede variar de acuerdo a la presentación. Por ejemplo, en el café tostado, la concentración promedio de cafeína es de 83 mg / 150 ml, mientras que en el café instantáneo se lo encuentra en un promedio de 53 mg/150 ml (Tafalla et al., 2007). En las hojas secas de guayusa, se ha identificado un contenido de cafeína de 19.08 ± 0.31 mg/g (1,91g/100g), sin embargo, otros estudios indican que dicha concentración

puede variar en rangos de 8.13 - 75.8 mg/g (0.81 – 7.58 g/100g) (Wise & Santander, 2018c).

2.2.2. Actividad biológica

La cafeína es conocida por ejercer un efecto psico estimulante sobre el sistema nervioso central humano (Nehlig et al., 1992) por lo que es considerado como un psico activo. Este fitoquímico actúa como antagonista de los receptores de adenosina de las neuronas generando el efecto contrario de la activación de estos receptores, afectando potencialmente a todas las áreas del cerebro; actúa como inhibidor de las fosfodiesterasas, interfiriendo en las funciones de los receptores GABA-A y además estimula la liberación de calcio de las reservas intracelulares (Ribeiro & Sebastio, 2010).

Como consecuencia de estos mecanismos, varias investigaciones han demostrado que la cafeína influencia en la actividad cerebral potenciando las funciones cognitivas (Johnson-Kozlow et al., 2002), el estado psicomotor (Khcharem et al., 2021), posiblemente en la memoria (R. C. Zhang & Madan, 2021), y además tiene un aparente efecto neuroprotector lo que podría convertirse en parte del tratamiento para ciertas enfermedades como la enfermedad de Parkinson (Karuppagounder et al., 2021), la esquizofrenia (Huang & Sperlággh, 2021) y el Alzheimer (Eskelinen & Kivipelto, 2010). También se ha demostrado que la cafeína tiene efectos antiinflamatorios y brinda antioxidantes con efectos beneficiosos en la salud (Barcelos et al., 2020).

Sin embargo, como resultado del efecto energizante y neuro estimulante, esta sustancia puede estimular el comportamiento ansiolítico especialmente en personas que sufren de ansiedad crónica y aumentar la posibilidad de tener ataques de pánico (Klein et al., 1991). La cafeína también puede alterar el estado de sueño y afectar la calidad del mismo (Reichert et al., 2021) sin embargo este efecto bien puede considerarse beneficioso dependiendo de la situación, como por ejemplo al momento de conducir, en donde se ha probado que la cafeína puede incrementar el estado de atención y reducir la fatiga durante esta actividad (Irwin et al., 2020).

2.3. POLIFENOLES

2.3.1. Generalidades

Los polifenoles corresponden a uno de los grupos de moléculas de mayor número y ampliamente distribuido en las plantas, conociéndose hasta más de 8000 estructuras, las cuales pueden estar formadas desde una estructura fenólica simple hasta otras moléculas con una estructura polimerizada compleja como los taninos, con diferentes características y propiedades de las cuales se ha destacado el beneficio en la salud humana y también su aplicación en la industria. (Bravo, 1998).

Los polifenoles se generan como producto del metabolismo secundario de las plantas vasculares cuya estructura química base es el fenol, un anillo aromático que contiene un grupo hidroxilo como sustituyente. A partir de este esqueleto se derivan moléculas más complejas con más sustituyentes hidroxilo o conjugado con otras moléculas como polisacáridos (Balasundram et al., 2006) cuyas variaciones permiten clasificar a este gran grupo de diversas maneras (B. Zhang et al., 2015). Una de estas clasificaciones es la descrita por Valencia-Avilés et al., (2017), la cual se describe de la siguiente manera:

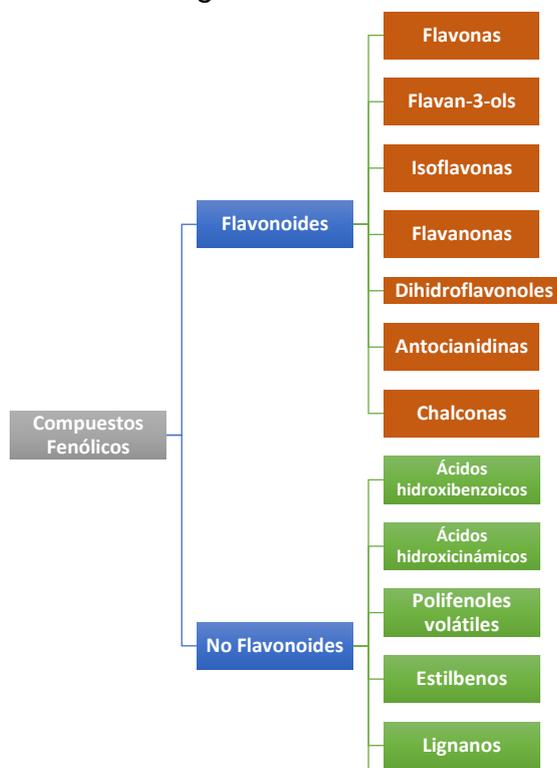


Figura 4. Clasificación de los polifenoles (Valencia-Avilés et al.,2017)

Estos compuestos se presentan mayormente en los alimentos de origen vegetal como frutas y verduras, y también en bebidas. Sin embargo, su concentración varía grandemente de un alimento a otro, inclusive entre la misma especie (Balasundram et al., 2006).

En la guayusa, de acuerdo a un estudio realizado por García-Ruiz et al., (2017) se identificaron 14 compuestos fenólicos en las hojas verdes y procesadas, siendo el ácido clorogénico, ácido isoclorogénico y neoclorogénico los que predominaban en cantidad, y la quercetin-3-O-hexosa por parte de los flavonols. En el mismo estudio se identificó una alta capacidad antioxidante, lo cual estaría relacionado con el contenido total de polifenoles, el cual es $54.86b \pm 3.09$ GAE /g para hojas verdes, y $106.62a \pm 4.41$ mg GAE /g para hojas blanqueadas. Otros autores se han encontrado contenidos totales de polifenoles de 33.44 ± 0.48 mg GAE/g (Villacís-Chiriboga et al., 2018b) en donde además se ha encontrado que la digestibilidad *in vitro* reduce el 59% del contenido total de polifenoles.

2.3.2. Actividad biológica

Unas de las principales características que han despertado interés en este grupo es la capacidad de actuar como antioxidante al neutralizar los efectos producidos por radicales libres y consecuentemente el estrés oxidativo, quelar iones metálicos potenciando su efecto antioxidante, y actuar sobre la inhibición de enzimas como la fosfolipasa A2, ciclooxigenasa y lipoxigenasa (Valencia et al., 2017), lo cual genera un impacto positivo en la salud humana.

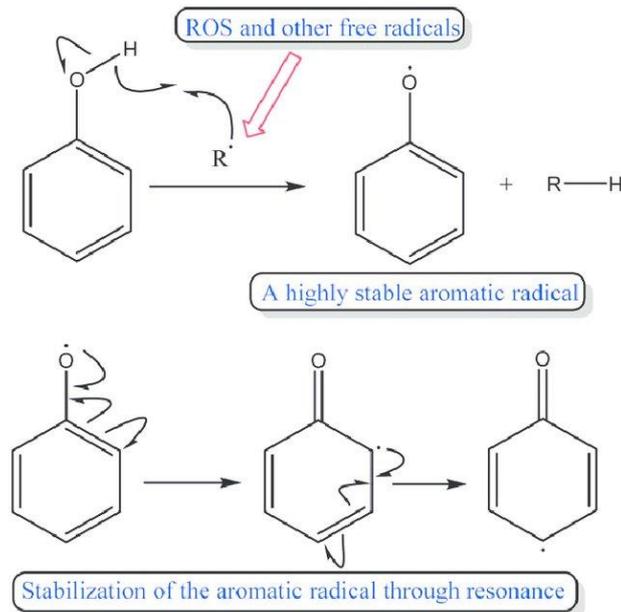


Figura 5. Mecanismo de eliminación de radicales libres en polifenoles (Zafar et al., 2016)

Otros efectos de los polifenoles que se han comprobado tanto *in vivo* como *in vitro* es que este grupo puede regular el sistema inmune, incrementar la resistencia capilar, actuar como antiinflamatorio, ralentizar el desarrollo de tumores al actuar como citostático, favorecer el cuidado del sistema cardiovascular, actuar como hepato protector, disminuir el desarrollo de microorganismos por sus propiedades antivirales y antimicóticas, entre otros (Munin & Edwards-Lévy, 2011).

Por sus propiedades, en la actualidad se investigan sus aplicaciones con fines tecnológicos en la industria ya sea como colorante natural, antimicrobiano o antioxidante (Baenas et al., 2018) y por sus propiedades medicinales también generan valor agregado en diversos productos como en las bebidas (Ivana & Marija, 2019).

2.4. MOLIENDA

2.4.1. Generalidades

La molienda es un paso importante durante el procesamiento de la guayusa para exportación o para la elaboración de té de guayusa. La finalidad de este procedimiento se enfoca en reducir el tamaño de partícula.

En plantas como el tabaco, se han encontrado que la molienda puede generar un impacto sobre las propiedades fisicoquímicas, estructurales y sobre todo en el contenido de compuestos bioactivos en donde se ha evidenciado una disminución de estos y de la capacidad antioxidante en polvos superfinos (Y. Zhang et al., 2021).

2.4.2. Molino de discos

El molino de disco, como se observa en la Figura 6, es un molino que comprende de un disco en donde la muestra pasa a través de un pequeño espacio entre un disco dentado que gira a gran velocidad y que está en contacto contra otro disco estacionario, produciendo de esta manera el efecto de cizalla sobre la muestra y reduciendo el tamaño de la misma (Bayram & Öner, 2007).



Figura 6. Molino de disco simple modelo GPX
(Modern Process Equipment Corporation, 2022)

2.4.3. Molino de martillos

El molino de martillos es muy usado debido a su versatilidad el cual permite llegar a tamaños de partículas diferentes. Este molino consiste de un rotor giratorio de alta velocidad que contiene varios martillos dispuestos de manera perpendicular al eje, cuyo esquema se presenta en la Figura 7. Cuando el eje gira, estos martillos se activan y colisionan con la muestra que ingresa desde la parte superior, generando un impacto que destroza la muestra y reduce su tamaño

hasta que estos puedan atravesar una criba en la parte inferior de la carcasa.
(Barbosa-Cánovas et al., 2005)

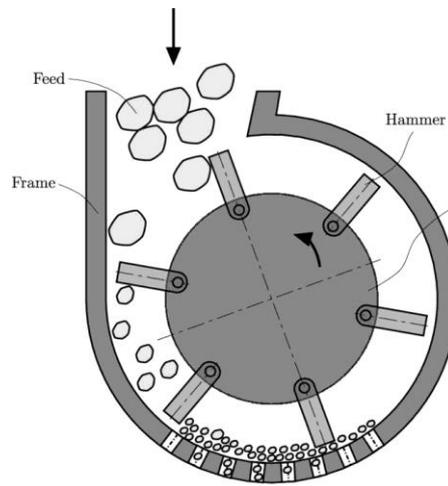


Figura 7. Esquema del funcionamiento de un molino de martillos
(Warzecha & Michalczyk, 2020)

3. IDENTIFICACIÓN DEL OBJETO DE ESTUDIO

El presente proyecto se enfoca en la evaluación del comportamiento del contenido de dos compuestos bioactivos propios de la guayusa, la cafeína y los polifenoles totales frente al proceso de molienda después de aplicar dos tipos de molinos y a diferentes tiempos de molienda.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A nivel mundial, los compuestos bioactivos de las plantas son altamente valorados en la industria debido a sus aplicaciones y efectos benéficos para la salud (Pai et al., 2022) sin embargo, el procesamiento industrial de estos productos provoca que el contenido y la actividad biológica de estos compuestos presente variaciones a lo largo de la cadena productiva disminuyendo la calidad y el valor del alimento (Mehta et al., 2022), por lo que actualmente se buscan alternativas para optimizar las condiciones en cada proceso y mantener lo más estable posible el contenido de estos compuestos (Cao et al., 2021).

En el Ecuador, la guayusa es una planta de consumo diario y de gran importancia para la población kiwcha, así también como para la creciente industria que procesa y comercializa productos a base de esta hoja, sin embargo, existen escasos estudios relacionados con la actividad biológica y composición fitoquímica (Radice et al., 2017) especialmente aquellos enfocados en la evaluación de estos parámetros durante el procesamiento industrial de la hoja. De los pocos estudios realizados, se conoce que los procesos industriales como el blanqueamiento o la fermentación tienen un impacto en la concentración de los compuestos bioactivos como los polifenoles (García-Ruiz et al., 2017), así también el proceso de secado (Santana et al., 2018), sin embargo aún no existe evidencia de estudios en los que se haya evaluado el proceso de la molienda sobre estos parámetros de la guayusa, por lo que el efecto de este proceso sobre los compuestos bioactivos es desconocido. De aquí radica la importancia de la investigación realizada en este proyecto.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL:

Evaluar la influencia de dos métodos de molienda sobre la concentración de cafeína y polifenoles en las hojas secas de guayusa (*Ilex guayusa*).

5.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS:

1. Analizar el comportamiento del contenido de polifenoles totales de las hojas secas de guayusa (*Ilex guayusa*) luego de pasar por los diferentes procesos de molienda, identificando la mejor condición para obtener mayor cantidad de este compuesto.
2. Evaluar el comportamiento del contenido de cafeína de acuerdo al proceso de molienda de las hojas secas de guayusa (*Ilex guayusa*), identificando el mejor tratamiento para obtener mayor cantidad de este compuesto.

6. JUSTIFICACIÓN Y APLICACIÓN DE LA METODOLOGÍA

6.1. JUSTIFICACIÓN

En el oriente ecuatoriano, existen varias empresas ecuatorianas y miles de productores de guayusa, de los cuales la mayoría corresponde a la comunidad indígena kwichua, cuyo sustento radica en el procesamiento y comercialización de la guayusa, de la cual la producción presenta un aumento en los últimos años, así como las exportaciones las cuales se han fortalecido (Franco et al., 2020). Dichos eventos han generado una búsqueda de estrategias por parte de varias organizaciones para mejorar la calidad y agregar valor al producto y a la cadena de valor (Ministerio de Producción Comercio Exterior Inversiones y Pesca, 2022)

Dentro de las estrategias se apuesta por la innovación (Sociedad Alemana para la Cooperación Internacional GIZ, 2020), entre las cuales está la mejora de los procesos productivos para obtener mejores rendimientos. El presente proyecto permite conocer el comportamiento de los polifenoles y la cafeína al atravesar diferentes métodos de trituración en condiciones controladas, de manera que permitirá obtener información importante para aplicar mejoras en este proceso y obtener mayores rendimientos de estos compuestos bioactivos que le dan valor y reconocimiento a esta planta amazónica, y mejorando la calidad del producto e incrementando el valor del mismo. Esto tiene el potencial de aumentar el valor en el mercado nacional e internacional y generar mayores ingresos económicos para los involucrados en la cadena productiva. Vale la pena mencionar que la presente investigación se encuentra dentro del marco del proyecto PPP-ADITMAQ-GIZ-UDLA de manera que se expresa los respectivos agradecimientos a la empresa ADITMAQ, y a la Sociedad Alemana para la Cooperación Internacional por su aporte para llevar a cabo el presente trabajo.

6.2. METODOLOGÍA

6.2.1. Tipo de investigación

El presente estudio se encuentra dentro de un nivel de investigación explicativo, ya que se investigó la relación causa – efecto entre las diferentes condiciones de molienda y la concentración de compuestos bioactivos de la guayusa. A partir de dicha premisa, esta investigación también está encasillada dentro del tipo de investigación básica o pura pues se generó conocimiento a partir de la información obtenida.

6.2.2. Población y muestra

La unidad experimental para este trabajo correspondió a una muestra de 5 kg de hojas secas de guayusa la cual fue tomada de los cultivos de guayusa pertenecientes a los socios de la Asociación Wiñak, del cantón Tena. Dichas muestras fueron posteriormente procesadas por la empresa YHÚLife hasta la etapa del secado, y posteriormente fue trasladada a la ciudad de Quito para su análisis.

6.2.3. Diseño experimental

Para esta investigación se aplicó un diseño factorial completamente al azar (DCA), con dos factores de dos y tres niveles respectivamente. Para cada tratamiento se aplicó tres repeticiones. Las variables con las que se trabajaron en la presente investigación se indican en las siguientes tablas:

Tabla 2. Cuadro de variables independientes

VARIABLES INDEPENDIENTES			
VARIABLE	NIVELES	UNIDADES	TIPO DE VARIABLE
Tipo de molino	1. Molino de martillos	N/A	Cualitativa
	2. Molino de discos		
Tiempo de molienda	3. 5	Minutos	Cuantitativa
	4. 10		
	5. 20		

Tabla 3. Cuadro de variables dependientes

VARIABLES DEPENDIENTES		
VARIABLE	UNIDADES	TIPO DE VARIABLE
Concentración de cafeína	mg / 100 mg	Cuantitativa
Concentración de polifenoles totales	mg AGE / g	Cuantitativa

AGE: Equivalente de ácido gálico.

6.3. MATERIALES Y MÉTODOS

6.3.1. Tratamiento de la muestra

La muestra fue molida aplicando los criterios descritos en el diseño experimental. Como resultado, se obtuvieron varias fracciones de hoja seca molida las cuales fueron tamizadas con tamices Tyler para obtener una fracción con un tamaño de partícula en el rango de 1 mm – 355 μ m, y con dicha fracción se procedió a realizar los análisis. Este procedimiento se lo realizó con el fin de asemejar las condiciones que se establecen en las empresas que procesan la hoja para exportación.

Previo a cada evaluación, se analizó la humedad de cada tratamiento por duplicado.

6.3.2. Extracción y eficiencia de extracción

La extracción se la realizó utilizando agua a 50,0°C como solvente. Para determinar los ciclos de extracción, se pesó en un tubo por triplicado aproximadamente 0,30 g de la fracción tamizada de la hoja y se le añadió 5 ml de agua a 50,0 °C para luego colocar los tubos en el baño maría durante 30 minutos, agitando de vez en cuando. Cumplido el tiempo, se separó el extracto como se observa en la Figura 15 del Anexo 1, y se procedió a analizar el contenido de polifenoles. Para el siguiente ciclo se colocaron nuevamente 5 ml

de agua en el mismo tubo y se repitió el procedimiento hasta obtener un contenido de polifenoles totales cercano a cero.

Una vez determinados los ciclos de extracción, estos se aplicaron para cada tratamiento previo al análisis de polifenoles totales.

6.3.3. Medición del contenido de polifenoles totales

Se aplicó un método modificado del método de Folin - Ciocalteu (Blainski et al., 2013) descrito por (Samaniego et al., 2020). Los análisis fueron realizados en los laboratorios de la empresa Aditmaq Cia. Ltda.

6.3.4. Medición de la concentración de cafeína

Se aplicó el método descrito por (Wise & Santander, 2018d) el cual corresponde a un análisis por HPLC en fase reversa. Los análisis fueron realizados en un laboratorio externo acreditado.

6.3.5. Materiales

Equipos:

- Molino de martillos marca WEG con motor 60 Hz. (Anexo 1, Figura 12)
- Molino de discos simple marca King adaptado. (Anexo 1, Figura 13)
- HPLC
- Espectrofotómetro UV marca Peak Instruments C7100
- Termómetro láser
- Termobalanza Mettler Toledo HC103
- Baño de agua

Reactivos:

- Reactivo de Folin – Ciocalteu
- Carbonato de sodio al 20%

- Acetonitrilo

6.4. Técnica de análisis estadístico de datos

Para el análisis de los datos de este trabajo se utilizó el análisis de varianza ANOVA de un solo factor para el análisis entre el tiempo de molienda y cada molino, y un ANOVA multifactorial para los diferentes tratamientos y se definió cuál factor tiene influencia sobre las variables respuesta aplicando una prueba LSD de Fisher. El procesamiento se realizó aplicando el programa Statgraphics Centurion XVI.II.

7. RESULTADOS

7.1. Análisis de polifenoles totales

El análisis de polifenoles de las hojas secas de guayusa que pasaron por los distintos tiempos de molienda y tipos de molino corresponde al primer objetivo de la presente investigación, debido a que estos compuestos presentan una capacidad para reaccionar con los radicales libres del medio demostrando la propiedad de actuar como un antioxidante, lo cual se relaciona con una mejor salud y una reducción del peligro de padecer enfermedades cardiovasculares, cáncer entre otras, (Quiñones et al., 2012) por lo que lograr conservar un contenido alto de estos compuestos en las hojas de guayusa después de ser molida puede brindar mayor valor al producto.

En la tabla 4 se expresan los valores promedio del contenido de polifenoles totales obtenidos después de aplicar los tratamientos, expresados en miligramos de ácido gálico equivalente por cada gramo de muestra (mg AGE/g):

Tabla 4. Contenido de polifenoles totales por gramo de hojas en base seca por cada tratamiento

Tipo de Molino	Tiempo de molienda (min)	Polifenoles Totales Promedio (mg AGE/g ^b)
DISCOS ^a	0	42.46 ± 8.89
	5	43.40 ± 4.83
	10	41.85 ± 6.84
	20	40.84 ± 4.56
MARTILLOS ^a	0	50.38 ± 6.45
	5	50.36 ± 6.85
	10	49.58 ± 7.23
	20	42.48 ± 10.79

a: Presentan diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$)

b: Resultado en base seca

En la tabla 4 se observa que las muestras que fueron molidas con el molino de discos presentaron valores para polifenoles en el rango de 40.84±4.56 a 43.40±4.83 mgAGE/g. El análisis estadístico presente en el Anexo 2 indica que no se aprecian diferencias significativas al 95% de confianza para el contenido

de polifenoles por cada tiempo de molienda ($p>0.05$), cuando se utiliza el molino de discos. En el gráfico 1 se puede observar que no hay una tendencia apreciable en el contenido de polifenoles con respecto al tiempo.

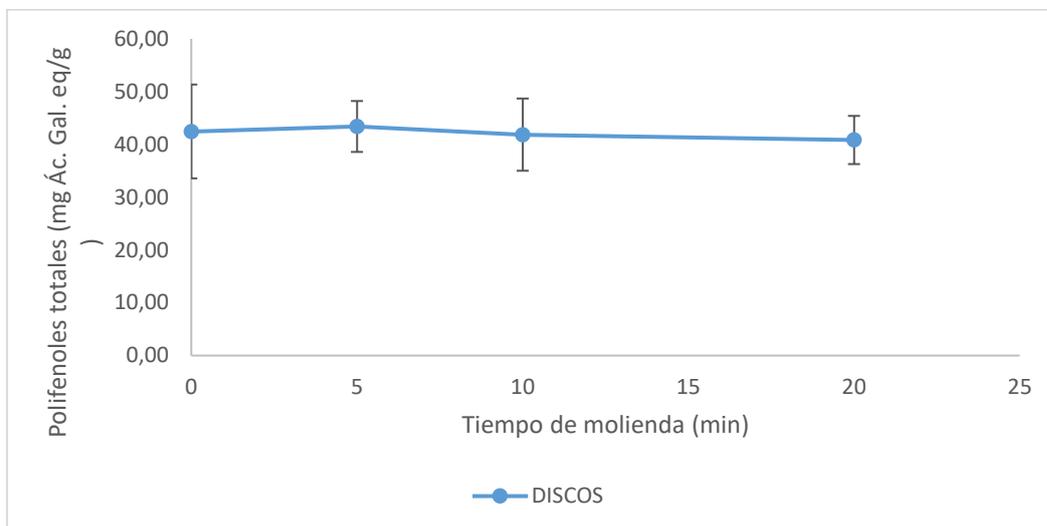


Figura 8. Contenido de polifenoles durante la molienda con el molino de discos ($p>0.05$)

En el gráfico 2, para la molienda realizada en el molino de martillos se puede apreciar que existe una tendencia ligeramente decreciente a medida que aumenta el tiempo de molienda, sin embargo, el análisis estadístico presentado en el Anexo 2 indica que esta diferencia no es significativa ($p>0.05$).

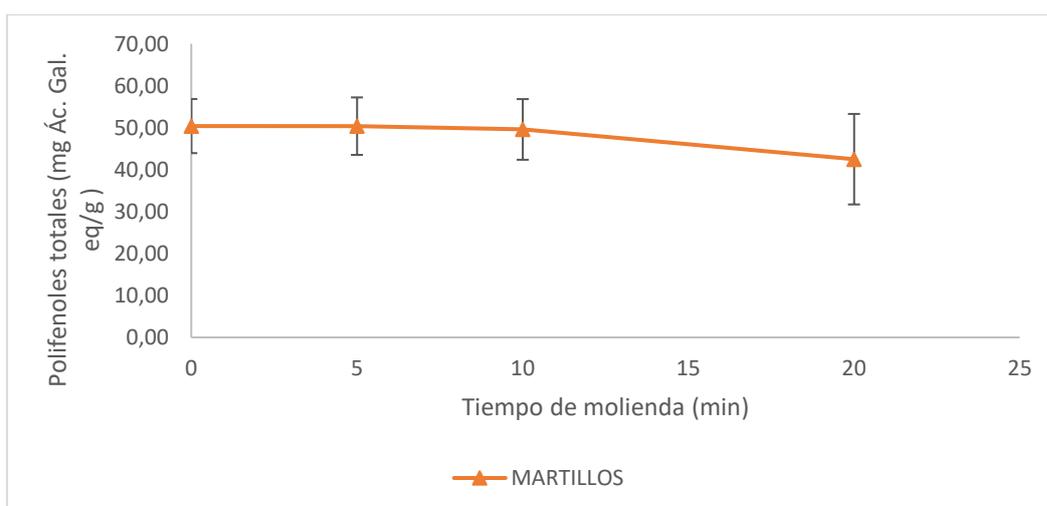


Figura 9. Contenido de polifenoles durante la molienda con el molino de martillos. ($p>0.05$).

En cuanto a la interacción entre los factores, se determinó diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los dos molinos, lo cual se confirmó aplicando una prueba de múltiples rangos con el método LSD para la concentración de polifenoles totales por tipo de molino. Se observa que los tratamientos con el molino de martillos obtuvieron una mayor cantidad de polifenoles totales en contraste con el molino de discos.

7.2. Análisis de cafeína

Los resultados para cafeína se indican en la tabla 5:

Tabla 5. Resultados del contenido de cafeína con respecto al tiempo de molienda y tipo de molino

Tipo de molino	Tiempo de molienda (min)	Contenido de cafeína (g/100g)
DISCOS	0	2,23 ± 0,05
	5	2,36 ± 0,08
	10	2,39 ± 0,07
	20 ^a	2,39 ± 0,05
MARTILLOS	0	2,37 ± 0,05
	5	2,31 ± 0,15
	10	2,30 ± 0,08
	20 ^a	2,52 ± 0,07

a: Presentan diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$)

De acuerdo al análisis estadístico que se encuentra en el Anexo 2, no se aprecia diferencias significativas ($p > 0.05$) entre un tipo de molino y otro. Sin embargo, se aprecian diferencias significativas ($p < 0.05$) en cuanto al tiempo de molienda y la interacción de los factores de estudio, siendo el tiempo de molienda el que presenta mayor influencia. La prueba de rangos múltiples LSD indica que el tratamiento que difiere del resto se encuentra a los 20 minutos de molienda.

En el gráfico 3 se puede observar que, en el molino de discos, existe un incremento de la concentración de cafeína conforme aumenta el tiempo de molienda, hasta llegar a una tendencia constante a los 20 minutos de molienda. Al realizar el análisis de varianza para un factor, se determinó que esta variación

es estadísticamente significativa al 95% de confianza, y mediante la prueba LSD se identificó que el tiempo inicial de molienda es diferente al resto de los valores para el tiempo de molienda, por lo que se confirma la variación de la concentración de cafeína durante el tiempo de molienda.

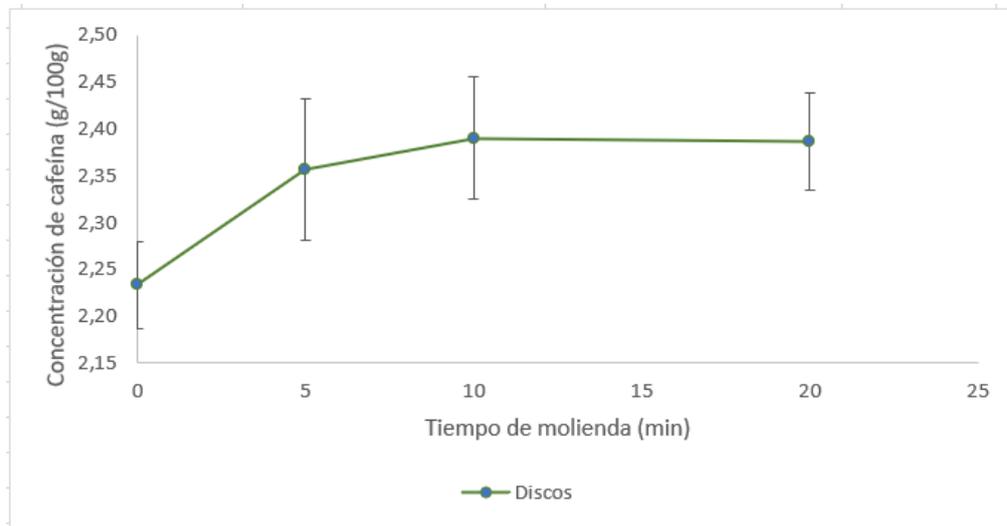


Figura 10. Contenido de cafeína durante la molienda utilizando molino de discos

En el gráfico 4 se puede apreciar que la concentración de cafeína en las hojas de guayusa luego de pasar por el molino de martillos prácticamente se mantiene constante, con pequeñas variaciones especialmente a los 20 minutos de molienda, sin embargo, según el análisis ANOVA para un solo factor al 95% de confianza, dichas variaciones no son estadísticamente significativas entre sí ($p > 0.05$).

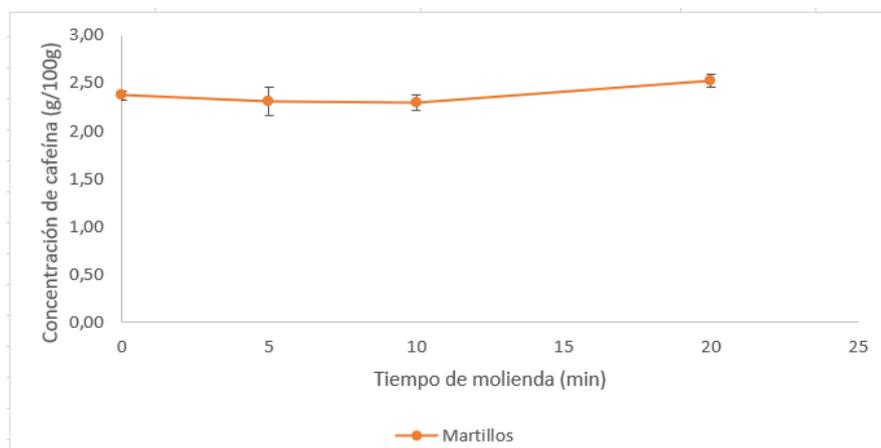


Figura 11. Contenido de cafeína durante la molienda utilizando molino de martillos

8. DISCUSIONES DE LOS RESULTADOS Y PROPUESTA DE LA SOLUCIÓN

8.1. Análisis de polifenoles totales

Se ha comprobado en estudios previos que la molienda produce un aumento en el contenido de polifenoles totales, generalmente por el aumento de la superficie de contacto de la muestra con el solvente (Kharobi & Soubh, 2019), sin embargo, en esta investigación al haberse estandarizado el tamaño de partícula se podría descartar este efecto, por lo que la diferencia de polifenoles totales en los dos tipos de molinos podría corresponder al efecto descrito por Poliński et al. (2022) el cual indica que la velocidad periférica del molino puede generar radicales libres que actúan como señales de estrés y como consecuencia, en la muestra se desencadenarían respuestas para contrarrestar este estrés, entre estas respuestas está el aumento en la síntesis de antioxidantes. Debido a que el molino de martillos utilizado produce una velocidad periférica de 3500 rpm y el molino de discos trabajó con 43.5 rpm, esto podría explicar el comportamiento del contenido de polifenoles totales en el molino de discos. Además, el aumento del tamaño de partícula aumenta el contacto con el oxígeno potenciando el efecto descrito anteriormente (Yeretzian et al., 2012).

Estos resultados indican que, en ambos molinos, hasta los 20 minutos de molienda no existiría un efecto significativo sobre el contenido de polifenoles totales, sin embargo, el tipo de molino empleado marcaría un punto importante a la hora de considerar que tipo de molienda emplear para obtener una mayor eficiencia para conservar el contenido de polifenoles durante el proceso.

8.2. Análisis de cafeína

Se conoce que la cafeína presenta estabilidad térmica por debajo de los 200 °C (Wang et al., 2019), por lo que se descarta un efecto de la temperatura de los molinos sobre el contenido de cafeína, los cuales llegaban máximo hasta 35°C.

El efecto que se presenta en el gráfico 3 puede estar relacionado con el tiempo de molienda y el tamaño de partícula que este produce luego de los 20 minutos de molienda. De acuerdo a la literatura, en investigaciones con el café se ha evidenciado que la reducción del tamaño de partícula presenta un efecto significativo sobre el contenido de cafeína al incrementar la superficie de contacto con el solvente lo cual mejora la eficiencia de la extracción, fenómeno que ha sido bien documentado por varios autores (de Vivo et al., 2019). Dicho efecto también se ha presenciado en la extracción de otros compuestos bioactivos en hojas de diversas plantas, en donde se ha demostrado que mientras más pequeño es el tamaño de partícula, más rápida es la extracción llegando incluso a extraerse la mayoría de los compuestos tan pronto la muestra entra en contacto con el solvente cuando el tamaño de partícula ha sido menor a 200 μm (Alsaud & Farid, 2020).

A pesar de que en esta investigación el tamaño de partícula se lo estandarizó en el rango entre 1 mm y 355 μm , existe la posibilidad de que la distribución de las partículas en la fracción obtenida en tiempo “cero” contenga una mayor cantidad de partículas con tamaños cercanos a 1 mm, mientras que luego de 20 minutos de molienda, estas partículas se orienten en su mayoría a tamaños cercanos a 355 μm . Esta relación entre tamaño de partícula y tiempos de molienda ha sido confirmada en estudios anteriores como por ejemplo en maní de origen asiático aplicando una molienda ultra rápida (Mohd Rozalli et al., 2015), o incluso en rocas (Yang et al., 2021) en donde se observa una tendencia en disminuir el tamaño de la partícula a medida que aumenta el tiempo de molienda. Pese a estas evidencias, se debe realizar un análisis para comprobar la distribución entre el rango de tamaño antes mencionado.

Los efectos antes descritos explicarían el ligero aumento del contenido de cafeína con respecto al tiempo de molienda cuando se utiliza el molino de discos, lo que indicaría un punto a tomar en cuenta para seleccionar las mejores condiciones y obtener el mejor rendimiento de cafeína de las hojas de guayusa.

9. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

9.1. CONCLUSIONES

- El contenido de polifenoles totales de las hojas secas de guayusa se ve afectado dependiendo del tipo de molino que se utilice, en donde se aprecia un mayor aumento en la concentración de estos bioactivos al aplicar el molino de martillos en contraste con el molino de discos, independiente del tiempo de molienda que se use, de manera que se considera la aplicación del molino de martillos independiente del tiempo de molienda para poder obtener una mayor cantidad de polifenoles totales.
- El contenido de cafeína en las hojas de guayusa seca presenta una relación con el tiempo de molienda cuando se aplica el molino de discos provocando un aumento del contenido de este compuesto bioactivo conforme aumenta el tiempo de molienda, esto como posible resultado de la disminución del tamaño de partícula facilitando la extracción de la cafeína, de manera que se considera como mejor condición el uso del molino de discos con tiempos mayores de molienda.

9.2. RECOMENDACIONES

- Comprobar mediante otros estudios si la velocidad cuenta como factor que influye en el contenido de polifenoles y cafeína de la guayusa debido a la posible influencia registrada en la literatura.
- Se recomienda realizar el análisis del comportamiento de la capacidad antioxidante y otros compuestos bioactivos como triterpenoides aplicando las condiciones descritas en esta investigación.
- Realizar el análisis de compuestos bioactivos aplicando otro tipo de molinos como el molino de bolas y molino de rodillos.
- Realizar pruebas aplicando distintos tamaños de partícula con un rango mucho más cerrado para comprobar el efecto del tamaño sobre el contenido de polifenoles totales y cafeína.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alsaud, N., & Farid, M. (2020). Insight into the Influence of Grinding on the Extraction Efficiency of Selected Bioactive Compounds from Various Plant Leaves. *Applied Sciences* 2020, Vol. 10, Page 6362, 10(18), 6362. <https://doi.org/10.3390/APP10186362>
2. Baenas, N., Abellán, Á., Rivera, S., Moreno, D. A., García-Viguera, C., & Domínguez-Perles, R. (2018). Foods and supplements. *Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications*, 327–362. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813572-3.00010-5>
3. Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99(1), 191–203. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2005.07.042>
4. Barbosa-Cánovas, G., Ortega-Rivas, E., Juliano, P., & Yan, hong. (2005). Cap. 6. Size Reduction. En *Food Powders. Physical Properties, Processing, and Functionality*. (Vol. 1, pp. 157–173). Kluwer Academic / Plenum Publishers. <http://154.68.126.6/library/Food%20Science%20books/batch1/Food%20Powders.pdf>
5. Barcelos, R. P., Lima, F. D., Carvalho, N. R., Bresciani, G., & Royes, L. F. (2020). Caffeine effects on systemic metabolism, oxidative-inflammatory pathways, and exercise performance. *Nutrition Research*, 80, 1–17. <https://doi.org/10.1016/J.NUTRES.2020.05.005>
6. Bayram, M., & Öner, M. D. (2007). Bulgur milling using roller, double disc and vertical disc mills. *Journal of Food Engineering*, 79(1), 181–187. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2006.01.042>
7. Blainski, A., Lopes, G. C., & de Mello, J. C. P. (2013). Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from *Limonium Brasiliense* L. *Molecules*, 18(6), 6852. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES18066852>
8. Bravo, L. (1998). Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutrition Reviews*, 56(11), 317–333. <https://doi.org/10.1111/J.1753-4887.1998.TB01670.X>

9. Cao, H., Saroglu, O., Karadag, A., Diaconeasa, Z., Zoccatelli, G., Conte-Junior, C. A., Gonzalez-Aguilar, G. A., Ou, J., Bai, W., Zamarioli, C. M., de Freitas, L. A. P., Shpigelman, A., Campelo, P. H., Capanoglu, E., Hii, C. L., Jafari, S. M., Qi, Y., Liao, P., Wang, M., ... Xiao, J. (2021). Available technologies on improving the stability of polyphenols in food processing. *Food Frontiers*, 2(2), 109–139. <https://doi.org/10.1002/FFT2.65>
10. Carvalho, S. D., Ortega, M., Orellana, M., Rodríguez, M., Folta, K. M., & Torres, M. de L. (2021). In vitro propagation of the Amazonian medicinal plant guayusa (*Ilex guayusa*) and effects of light in the growth and development of this shade tolerant plant. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 2021 147:3, 147(3), 503–517. <https://doi.org/10.1007/S11240-021-02142-Y>
11. Crespo, P. (2013a). La guayusa trayectoria y sentido . *Programa de Manejo Forestal Sostenible En La Región Andina*. <http://repiica.iica.int/docs/B3414e/B3414e.pdf>
12. Crespo, P. (2013b). La guayusa: trayectoria y sentido. Sistematización de la experiencia de la cadena de valor de la guayusa. *Programa de Manejo Forestal Sostebible En La Region Andina IICA*.
13. de la Torre, L., Navarrete, H., Muriel, P., Macía, M. J., & Balslev, H. (2008). *Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador*. Herbario QCA y Herbario AAU.
14. de Vivo, A., Tricarico, M. C., & Sarghini, F. (2019). Espresso coffee design based on non-monotonic granulometric distribution of aromatic profile. *Food Research International*, 123, 650–661. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2019.05.027>
15. Dueñas, J. F., Jarrett, C., Cummins, I., & Logan–Hines, E. (2016). Amazonian Guayusa (*Ilex guayusa* Loes.): A Historical and Ethnobotanical Overview. *Economic Botany*, 70(1), 85–91. <https://doi.org/10.1007/s12231-016-9334-2>
16. Eskelinen, M. H., & Kivipelto, M. (2010). Caffeine as a protective factor in dementia and Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 20(SUPPL.1). <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-1404>
17. Franco, W., Bazantes, K., Vicente, K., & Villegas, L. (2020). Guayusa en Napo - actualidad y perspectivas. *Producción En Chakras e*

- Industrialización de La Wayusa En Napo, Amazonía Ecuatoriana.*
https://www.researchgate.net/publication/339585484_Guayusa_en_Napo_-_actualidad_y_perspectivas
18. Ganchozo Basurto, R., Romero Mejía, C. S., Sánchez Prado, M. P., Pérez Meza, A. A., & Ríos, M. (2020). *Etnobotánica y etnofarmacología de Ilex guayusa en Ecuador: uso potencial de “wayusa” en Amazonía.* http://repositorio.ikiam.edu.ec/jspui/handle/RD_IKIAM/368
 19. García-Ruiz, A., Baenas, N., Benítez-González, A. M., Stinco, C. M., Meléndez-Martínez, A. J., Moreno, D. A., & 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>
 20. Garrido Navarrete, W. B. (2021). *Diseño de una empresa productora de té de Guayusa en la Ciudad de Tena* [Universidad de Guayaquil]. <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/57726>
 21. Giménez, J. (2019). *Guayusa, la hoja sagrada de la Amazonía | Planeta Futuro* | El País. https://elpais.com/elpais/2018/12/27/album/1545922481_265516.html#foto_gal_2
 22. Huang, L., & Sperlágh, B. (2021). Caffeine consumption and schizophrenia: A highlight on adenosine receptor-independent mechanisms. *Current Opinion in Pharmacology*, 61, 106–113. <https://doi.org/10.1016/J.COPH.2021.09.003>
 23. Irwin, C., Khalesi, S., Desbrow, B., & McCartney, D. (2020). Effects of acute caffeine consumption following sleep loss on cognitive, physical, occupational and driving performance: A systematic review and meta-analysis. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 108, 877–888. <https://doi.org/10.1016/J.NEUBIOREV.2019.12.008>
 24. Ivana, B., & Marija, L. (2019). Role of Phenols in Energy and Functional Beverages. *Sports and Energy Drinks: Volume 10: The Science of Beverages*, 229–268. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815851-7.00008-5>
 25. Johnson-Kozlow, M., Kritz-Silverstein, D., Barrett-Connor, E., & Morton, D. (2002). Coffee consumption and cognitive function among older

- adults. *American Journal of Epidemiology*, 156(9), 842–850.
<https://doi.org/10.1093/AJE/KWF119>
26. Kapp, R. W., Mendes, O., Roy, S., McQuate, R. S., & Kraska, R. (2016). General and Genetic Toxicology of Guayusa Concentrate (*Ilex guayusa*). *Http://Dx.Doi.Org/10.1177/1091581815625594*, 35(2), 222–242.
<https://doi.org/10.1177/1091581815625594>
27. Karuppagounder, S. S., Uthaythas, S., Govindarajulu, M., Ramesh, S., Parameshwaran, K., & Dhanasekaran, M. (2021). Caffeine, a natural methylxanthine nutraceutical, exerts dopaminergic neuroprotection. *Neurochemistry International*, 148, 105066.
<https://doi.org/10.1016/J.NEUINT.2021.105066>
28. Kharobi, K., & Soubh, L. (2019). Effect of Grinding the Herb and Boiling the Infusion on Total Phenolic Content and Antioxidant Capacity of Herbal Infusions. *Journal of Pharmacy and Nutrition Sciences*, 9(2), 66–70. <https://doi.org/10.29169/1927-5951.2019.09.02.2>
29. Khcharem, A., Souissi, M., Atheymen, R., Souissi, W., & Sahnoun, Z. (2021). Acute caffeine ingestion improves 3-km run performance, cognitive function, and psychological state of young recreational runners. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 207, 173219.
<https://doi.org/10.1016/J.PBB.2021.173219>
30. Klein, E., Zohar, J., Geraci, M. F., Murphy, D. L., & Uhde, T. W. (1991). Anxiogenic effects of m-CPP in patients with panic disorder: Comparison to caffeine's anxiogenic effects. *Biological Psychiatry*, 30(10), 973–984.
[https://doi.org/10.1016/0006-3223\(91\)90119-7](https://doi.org/10.1016/0006-3223(91)90119-7)
31. Mehta, N., Kumar, P., Verma, A. K., Umaraw, P., Kumar, Y., Malav, O. P., Sazili, A. Q., Domínguez, R., & Lorenzo, J. M. (2022). Microencapsulation as a Noble Technique for the Application of Bioactive Compounds in the Food Industry: A Comprehensive Review. *Applied Sciences* 2022, Vol. 12, Page 1424, 12(3), 1424.
<https://doi.org/10.3390/APP12031424>
32. Meléndez, Á. (2022, agosto). Casi toda la guayusa del mundo está en Ecuador, que hoy busca exportarla más y mejor. *Bloomberg Línea*. <https://www.bloomberglinea.com/2022/08/20/casi-toda-la-guayusa-del-mundo-esta-en-ecuador-que-hoy-busca-exportarla-mas-y-mejor/>

33. Ministerio de Producción Comercio Exterior Inversiones y Pesca. (2022, agosto). *La guayusa ecuatoriana contará con un consorcio de promoción de exportaciones – Ministerio de Producción Comercio Exterior Inversiones y Pesca*. <https://www.produccion.gob.ec/la-guayusa-ecuatoriana-contara-con-un-consorcio-de-promocion-de-exportaciones/>
34. Modern Process Equipment Corporation. (2022). *GPX - Modern Process Equipment*. <https://www.mpechicago.com/product/gpx/>
35. Mohd Rozalli, N. H., Chin, N. L., & Yusof, Y. A. (2015). Grinding characteristics of Asian originated peanuts (*Arachis hypogaea* L.) and specific energy consumption during ultra-high speed grinding for natural peanut butter production. *Journal of Food Engineering*, 152, 1–7. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2014.11.027>
36. Molestina, R. (2014). *Factibilidad para la creación de una empresa comercializadora de la bebida energizante a base de Guayusa “Runa” en el mercado de Guayaquil*. [Universidad Católica de Santiago de Guayaquil]. <http://repositorio.ucsg.edu.ec/handle/3317/2227>
37. Munin, A., & Edwards-Lévy, F. (2011). Encapsulation of Natural Polyphenolic Compounds; a Review. *Pharmaceutics*, 3(4), 793. <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS3040793>
38. National Center for Biotechnology Information. (2022). *PubChem Compound Summary for CID 2519, Caffeine*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2519>
39. Nehlig, A., Daval, J. L., & Debry, G. (1992). Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. *Brain Research. Brain Research Reviews*, 17(2), 139–170. [https://doi.org/10.1016/0165-0173\(92\)90012-B](https://doi.org/10.1016/0165-0173(92)90012-B)
40. Pai, S., Hebbar, A., & Selvaraj, S. (2022). A critical look at challenges and future scopes of bioactive compounds and their incorporations in the food, energy, and pharmaceutical sector. *Environmental Science and Pollution Research* 2022 29:24, 29(24), 35518–35541. <https://doi.org/10.1007/S11356-022-19423-4>
41. Poliński, S., Topka, P., Tańska, M., Kowalska, S., Czaplicki, S., & Szydłowska-Czerniak, A. (2022). Effect of Grinding Process Parameters and Storage Time on Extraction of Antioxidants from Ginger and Nutmeg.

- Molecules* (Basel, Switzerland), 27(21), 7395.
<https://doi.org/10.3390/MOLECULES27217395>
42. Quiñones, M., Miguel, M., & Aleixandre, A. (2012). Revisión Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutr Hosp*, 27(1), 76–89.
<https://doi.org/10.3305/nh.2012.27.1.5418>
43. Radice, M., Scalvenzi, L., & Sablón Cossio, N. (2017). Ilex guayusa: A systematic review of its Traditional Uses, Chemical Constituents, Biological Activities and Biotrade Opportunities. *International Conference on Multidisciplinary Sciences*, 3868. <https://doi.org/10.3390/MOL2NET-02-03868>
44. Reichert, C. F., Veitz, S., Bühler, M., Gruber, G., Deuring, G., Rehm, S. S., Rentsch, K., Garbazza, C., Meyer, M., Slawik, H., Lin, Y. S., & Weibel, J. (2021). Wide awake at bedtime? Effects of caffeine on sleep and circadian timing in male adolescents – A randomized crossover trial. *Biochemical Pharmacology*, 191, 114283.
<https://doi.org/10.1016/J.BCP.2020.114283>
45. Ribeiro, J. A., & Sebastio, A. M. (2010). Caffeine and adenosine. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 20 Suppl 1(SUPPL.1).
<https://doi.org/10.3233/JAD-2010-1379>
46. Samaniego, I., Brito, B., Viera, W., Cabrera, A., Llerena, W., Kannangara, T., Vilcacundo, R., Angós, I., & Carrillo, W. (2020). Influence of the Maturity Stage on the Phytochemical Composition and the Antioxidant Activity of Four Andean Blackberry Cultivars (*Rubus glaucus* Benth) from Ecuador. *Plants* 2020, Vol. 9, Page 1027, 9(8), 1027.
<https://doi.org/10.3390/PLANTS9081027>
47. Santana, P. M., Quijano-Avilés, M., Chóez-Guaranda, I., Lucas, A. B., Espinoza, R. V., Martínez, D., Camacho, C., & Martínez, M. M. (2018). Effect of drying methods on physical and chemical properties of Ilex guayusa leaves. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 71(3), 8617–8622. <https://doi.org/10.15446/rfnam.v71n3.71667>
48. Schuster, J., & 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>
49. Sequeda-Castañeda, L. G., Modesti Costa, G., Celis, C., Gamboa, F., Gutiérrez, S., & Luengas, P. (2016). Ilex guayusa loes (Aquifoliaceae): Amazon and andean native plant. *Pharmacologyonline*, 3, 193–202.
50. Sidali, K. L., Morocho, P. Y., & Garrido-Pérez, E. I. (2016). Food Tourism in Indigenous Settings as a Strategy of Sustainable Development: The Case of Ilex guayusa Loes. in the Ecuadorian Amazon. *Sustainability* 2016, Vol. 8, Page 967, 8(10), 967. <https://doi.org/10.3390/SU8100967>
51. Sociedad Alemana para la Cooperación Internacional GIZ. (2020). Cadena de valor de la guayusa. En *Programa Bioeconomía*. https://www.bivica.org/files/5669_2020.08.05_CdV_Guayusa_final.pdf
52. Tafalla, D. B., Lozano, R. P., Albaladejo, M. F., & García, Y. A. (2007). Cafeína: un nutriente, un fármaco, o una droga de abuso. *Adicciones*, 19(3), 225–238. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=289122084002>
53. Valencia, E., Ignacio, I., Sosa, E., Bartolomé-Camacho, M. C., Martínez, E., & García, M. E. (2017). Polifenoles: propiedades antioxidantes y toxicológicas. *Revista de La Facultad de Ciencias Químicas*, 16, 15–29. <https://publicaciones.ucuenca.edu.ec/ojs/index.php/quimica/article/view/1583/1238>
54. Valencia-Avilés, E., Ignacio-Figueroa, I., Sosa-Martínez, E., Bartolomé-Camacho, M. C., Martínez-Flores, H. E., & García-Pérez, M.-E. (2017). Polifenoles: propiedades antioxidantes y toxicológicas. *Revista de La Facultad de Ciencias Químicas*, 16, 15–29. <https://publicaciones.ucuenca.edu.ec/ojs/index.php/quimica/article/view/1583>
55. Villacís-Chiriboga, J. (2017). Etnobotánica y sistemas tradicionales de salud en Ecuador. Enfoque en la Guayusa (Ilex guayusa Loes.). *Revista Etnobiología*, 15, 79–88.
56. 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., & Ruales, J. (2018a). 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>
57. 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., & Ruales, J. (2018b). 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>
58. Wang, R., Xue, J., Meng, L., Lee, J. W., Zhao, Z., Sun, P., Cai, L., Huang, T., Wang, Z., Wang, Z. K., Duan, Y., Yang, J. L., Tan, S., Yuan, Y., Huang, Y., & Yang, Y. (2019). Caffeine Improves the Performance and Thermal Stability of Perovskite Solar Cells. *Joule*, 3(6), 1464–1477.
<https://doi.org/10.1016/J.JOULE.2019.04.005>
59. Warzecha, M., & Michalczyk, J. (2020). Calculation of maximal collision force in kinematic chains based on collision force impulse. *Journal of Theoretical and Applied Mechanics (Poland)*, 58(2), 339–349.
<https://doi.org/10.15632/JTAM-PL/116580>
60. Wise, G., & 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>
61. Wise, G., & Santander, D. (2018a). *Novel Food Notification for Authorisation of a Traditional Food From a Third Country Under Regulation (EU) 2015/2283 Dried Leaves of Guayusa (Ilex guayusa Loes.)*. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.18400.53762>
62. Wise, G., & Santander, D. E. (2018b). Assessing the History of Safe Use of Guayusa. *Article in Journal of Food and Nutrition Research*, 6(7), 471–475. <https://doi.org/10.12691/jfnr-6-7-8>
63. Wise, G., & Santander, D. E. (2018c). 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>

64. Wise, G., & Santander, D. E. (2018d). 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>
65. Yang, X., Tamm, K., Piir, I., Kuusik, R., Trikkel, A., & Tõnsuaadu, K. (2021). Evaluation of Estonian phosphate rock by flotation. *Minerals Engineering*, 171. <https://doi.org/10.1016/J.MINENG.2021.107127>
66. Yeretizian, C., Pascual, E. C., & Goodman, B. A. (2012). Effect of roasting conditions and grinding on free radical contents of coffee beans stored in air. *Food Chemistry*, 131(3), 811–816. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2011.09.048>
67. Zafar, S., Ahmed, R., & Khan, R. (2016). Biotransformation: a green and efficient way of antioxidant synthesis. *Free Radical Research*, 50(9), 939–948. <https://doi.org/10.1080/10715762.2016.1209745>
68. Zhang, B., Cai, J., Duan, C. Q., Reeves, M. J., & He, F. (2015). A Review of Polyphenolics in Oak Woods. *International Journal of Molecular Sciences* 2015, Vol. 16, Pages 6978-7014, 16(4), 6978–7014. <https://doi.org/10.3390/IJMS16046978>
69. Zhang, R. C., & Madan, C. R. (2021). How does caffeine influence memory? Drug, experimental, and demographic factors. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 131, 525–538. <https://doi.org/10.1016/J.NEUBIOREV.2021.09.033>
70. Zhang, Y., Li, R., Shang, G., Zhu, H., Mahmood, N., & Liu, Y. (2021). Mechanical grinding alters physicochemical, structural, and functional properties of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) leaf powders. *Industrial Crops and Products*, 173, 114149. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2021.114149>

11. ANEXOS

Anexo 1. Imágenes



Figura 12. Molino de martillos



Figura 13. Molino de discos

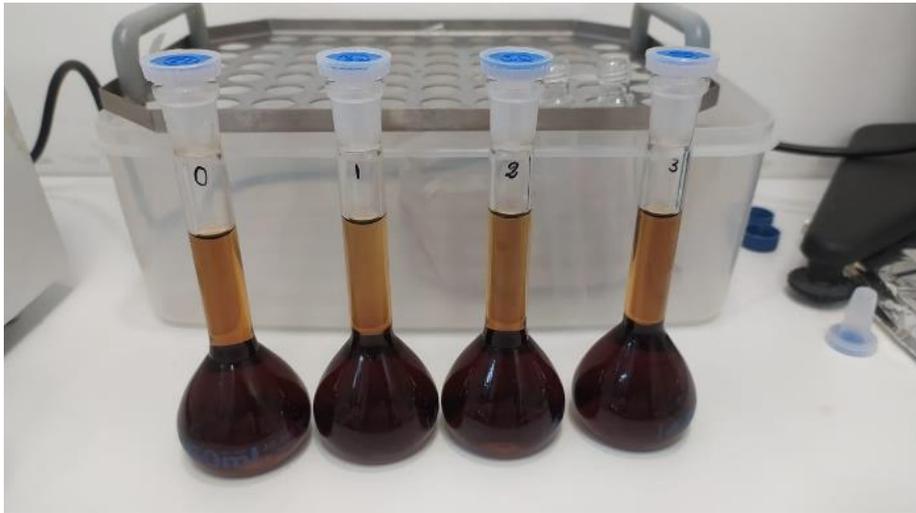


Figura 14. Extractos de guayusa obtenido luego de seis ciclos de extracción

Anexo 2. Tablas resumen del análisis estadístico de polifenoles totales.

Tabla 6. ANOVA multifactorial al 95% de confianza para el análisis de polifenoles totales

Fuente EFECTOS PRINCIPALES	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Tipo de molino	440,865	1	440,865	8,76	0,0052*
B:Tiempo molienda	205,097	3	68,3656	1,36	0,2692
AB	79,5812	3	26,5271	0,53	0,6662
RESIDUOS	2012,81	40	50,3204		
TOTAL (CORREGIDO)	2738,36	47			

* Presenta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$)

Tabla 7. Pruebas de Múltiple Rangos para Polif.Totales por tipo de molino, método LSD Fisher al 95% de confianza.

Tipo de molino	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Discos	24	42,1379	1,44799	X
Martillos	24	48,1992	1,44799	X
Contraste	Sig.	Diferencia +/-	Límites	
Discos - Martillos	*	-6,06125	4,13871	

* Indica una diferencia significativa.

Tabla 8. Análisis ANOVA 95% de confianza para polifenoles totales por tiempo de molienda en el molino de discos.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	20,7869	3	6,9289	0,16	0,9200
Intra grupos	849,7830	20	42,4891		
Total (Corr.)	870,569	23			

Tabla 9. Análisis ANOVA 95% de confianza para polifenoles totales por tiempo de molienda en el molino de martillos.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	263,891	3	87,9637	1,51	0,2418
Intra grupos	1163,03	20	58,1516		
Total (Corr.)	1426,92	23			

Anexo 3. Tablas resumen del análisis estadístico para el análisis de cafeína.

Tabla 10. ANOVA multifactorial al 95% de confianza para el análisis de cafeína

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Tiempo de molienda	0,0798333	3	0,0266111	4,25	0,0217*
B: Tipo de molino	0,00666667	1	0,00666667	1,07	0,3172
AB	0,0675667	3	0,0225222	3,6	0,0368*
RESIDUOS	0,100067	16	0,00625417		
TOTAL (CORREGIDO)	0,254133	23			

* Presenta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$)

Tabla 11. Pruebas de Múltiple Rangos para cafeína por tiempo de molienda, método LSD Fisher al 95% de confianza.

Tiempo de molienda	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
0	6	2,30333	0,0322856	X
5	6	2,33167	0,0322856	X
10	6	2,34333	0,0322856	X
20	6	2,455	0,0322856	X
Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites	
		-		
0 - 5		0,0283333	0,0967925	
0 - 10		-0,04	0,0967925	
0 - 20	*	-0,151667	0,0967925	
		-		
5 - 0		0,0116667	0,0967925	
5 - 20	*	-0,123333	0,0967925	
10 - 20	*	-0,111667	0,0967925	

* Indica una diferencia significativa.

Tabla 12. Análisis ANOVA 95% de confianza para cafeína por tiempo de molienda en el molino de discos.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,0489	3	0,01632	4,44	0,0407*
Intra grupos	0,0294	8	0,0036		
Total (Corr.)	0,0783	11			

* Presenta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$)

Tabla 13. Pruebas de Múltiple Rangos para cafeína por tiempo de molienda al aplicar el molino de discos, método LSD Fisher al 95% de confianza.

Tiempo de molienda	Casos	Media	Grupos Homogéneos
0	3	2,2333	X
5	3	2,3567	X
20	3	2,3867	X
10	3	2,3900	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 5	*	-0,1233	0,114142
0 - 10	*	-0,1567	0,114142
0 - 20	*	-0,1533	0,114142
5 - 10		-0,0333	0,114142
5 - 20		-0,0300	0,114142
10 - 20		0,0033	0,114142

* indica una diferencia significativa.

Tabla 14. Análisis ANOVA 95% de confianza para cafeína por tiempo de molienda en el molino de discos.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,0984	3	0,0328	3,71	0,0612
Intra grupos	0,0707	8	0,0088		
Total (Corr.)	0,1691	11			