



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERO EN
BIOTECNOLOGÍA

**Evaluación del carácter antioxidante, del contenido de compuestos
fenólicos y de las propiedades sensoriales presentes en cerveza
artesanal enriquecida con plantas ubicadas en la zona Andina del
Ecuador.**

Autor: Nelson Santiago Cubi Insuaste

Directora: Raluca Alexandra Mihai, Ph.D.

Sangolquí, 24 de agosto de 2023



- 1** **Introducción**
- 2** **Objetivos e Hipótesis**
- 3** **Materiales y Métodos**
- 4** **Resultados y Discusión**
- 5** **Conclusiones**
- 6** **Recomendaciones**
- 7** **Agradecimientos**



- 1** **Introducción**
- 2** **Objetivos e Hipótesis**
- 3** **Materiales y Métodos**
- 4** **Resultados y Discusión**
- 5** **Conclusiones**
- 6** **Recomendaciones**
- 7** **Agradecimientos**



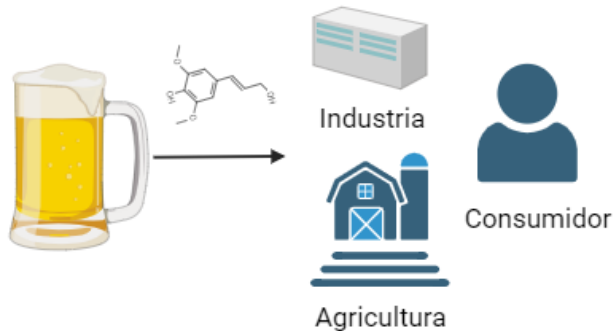
Cerveza Artesanal - plantas



1566- Primera Cervecería de América
 2023- - No bebidas con antioxidantes ni plantas

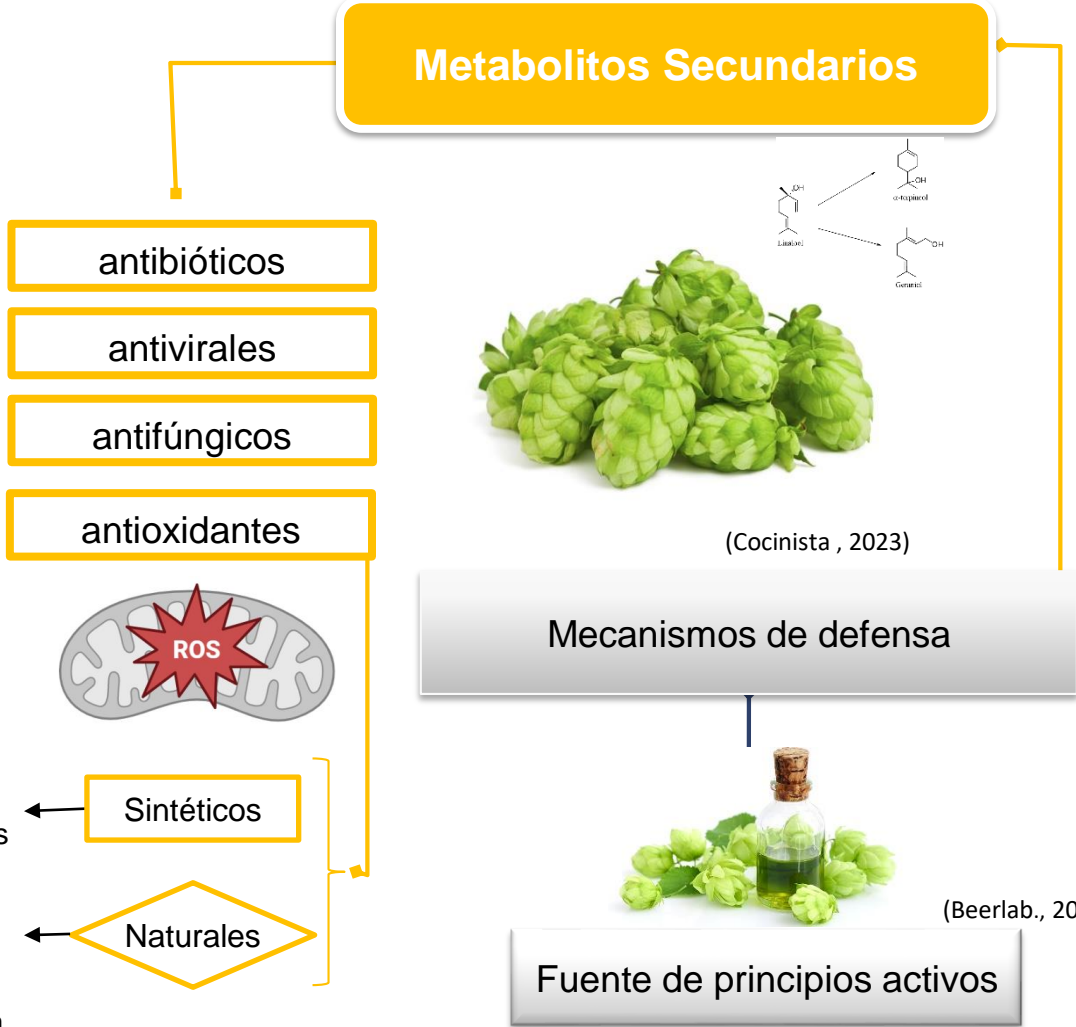


Descripciones y estudios deficientes



complejidad química

- ✗ toxicidad
- ✗ efectos secundarios
- ✓ accesibilidad
- ✓ ecológicos
- ✓ potencial bioactivo
- ✓ creciente demanda



Materias Primas Cerveza

Agua

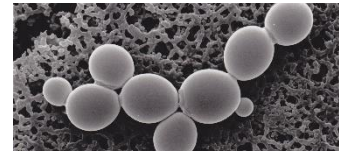
Malta

Aminoácidos
Sustancias
nitrogenadas

Lúpulo

Levadura

- *Saccharomyces cerevisiae* (fermentación alta)
 - *Saccharomyces uvarum* (fermentación baja)
- Forma esférica.
Diámetro: 2-8 μm
Longitud: 3- 15 μm



(Estrella Galicia, 2023)

- Maíz
- Trigo
- Arroz
- Cebada
- Centeno

ADJUNTOS

Moringáceas

Moringa oleífera L.
(Árbol del bien)

Conasi (2023)

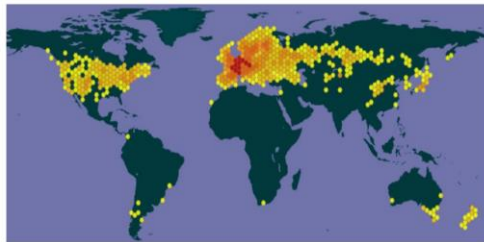
Suplemento alimentario
Estabilidad oxidativa
Obtención de Carbono (bajo costo – calidad) Universidad de Edimburgo
Producción de Zeatina (Agrodesierto, 2006)
Cicatrizante
Fertilizante
Antiparasitario
Biodiesel

- 12 m
- Flores zigomorfas, hermafroditas, pentámeras, pecioladas, bracteadas, blancas o color crema.
- Tallos poco ramificados.
- Hojas 25-60 cm, pecioladas.
- Fruto de 20-50 x 1-3 cm alargado, cápsula, toruloso.
- Semilla 8-15 mm diámetro, embrión recto con 2 o 3 cotiledones.
- Origen: India, Nepal. NW de Pakistán.



Macias et al. (2017)

Orden: Rosales
Familia: Cannabaceae.
- 11 géneros
Género: *Xanthoxylum* L.
Especie: *Xanthoxylum lucidum* L. – 100 variedades.
- Altura 12 m
- Hojas 15.5 – 18.5 cm
- Inflorescencias masculinas panículas axilares.
- Inflorescencias femeninas forma de cono.
- Flores bracteoladas.
Distribución : Silvestre, zonas húmedas, húmedas, frías, Chile y Argentina.



(Núñez, 2021)

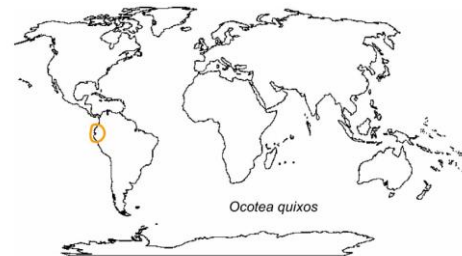


(Núñez, 2021)

Lauraceae

Ocotea quixos K.

(Noriega, 2008)



(Ocotea in trees and shrubs of the Andes of Ecuador @ efloras.org, 2000)

Metabolitos Secundarios en *Moringa oleífera* L.

- Ramnosa
- Isotiocianato
- Glucosinolatos

Flavonoides

- Kaempferitirina
- Isoquercetina
- Ramnetina
- Kaempferol
- Quercetina

- Altura 25 m Diámetro 80 cm
- Flore pequeñas – color blanco verdoso.
- Hojas 15 cm de largo y haz verde oscuro.
- Frutos 5 cm de largo y color verde amarillento.

- Uso en rituales.
- Colada Morada
- Infusión
- Analgésico
- Mejora la digestión.

Metabolitos Secundarios

- Cariofileno
- Humuleno
- Eremofileno
- α -pineno
- β -pineno
- Éucaliptol Ciclohexano
- Cariofileno
- α -cariofileno

- Cinamaldehído
- Metil cinamato
- Benzaldehído
- β -selineno
- Saponinas
- Cumarinas
- Óxido de cariofileno.



(Gastronomico.Org, 2018)

Myrtaceae

Luma apiculata B.
(Árrayan)

- Arbusto
- Altura 15 m
- Hojas en forma ovada, color verde oscuro.
- Flores medianas – color blanco
- Fruto baya redonda – 1,5 cm de diámetro.

Metabolitos
Secundarios

- Linolol
- Alcanfor
- Geraniol
- Citronelal
- Benzaldehido
- Borneol-terpineol

(Luma Apiculata (Arrayán -) | SIB, Parques Nacionales, Argentina, 2010)

Usos:

- Fabrica herramientas rusticas.
- Leña
- Ornamental

Rubiaceae

Coffea arabica L.



- Arbusto
- Altura 8-10m
- Hojas lustrosas – cortamente pecioladas.
- Flores en forma de copa - blancas
- Cáliz con 5 segmentos
- Fruto baya elipsoidal con 2 semillas

Usos:

- Bebida
- Bagazo usado como sustrato para hongos

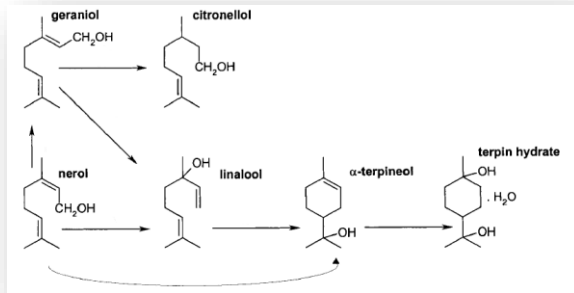
(International Coffee Organization - Aspectos Botánicos, s. f.)

Metabolitos
Secundarios

- Cafeína
- Teobromina
- Teofilina
- Antocianinas
- Catequina
- Quercetina
- Ácido p-curámico
- Ácido sináptico
- Polifenoles
- Alcaloides
- Ácidos fenólicos

(Distribución geográfica del café - NUESTROCAFE.COM, s. f.)

BIOTRANSFORMACIÓN “BIOFLAVORING”



- Convierte compuestos precursores
- Encuentran en material vegetal añadido
- β -glucosidasa

PRUEBAS HEDÓNICAS

Puntaje	Categoría	Puntaje	Categoría
1	Me disgusta extremadamente	6	Me gusta levemente
2	Me disgusta mucho	7	Me gusta moderadamente
3	Me disgusta moderadamente	8	Me gusta mucho
4	Me disgusta levemente	9	Me gusta extremadamente
5	No me gusta ni me disgusta		

Nombre: _____

Fecha: _____

INSTRUCCIONES

Frente a usted se presentan cuatro muestras de leche chocolatada. Por favor, observe y pruebe cada una de ellas, yendo de izquierda a derecha. Indique el grado en que le gusta o le disgusta cada atributo de cada muestra, de acuerdo al puntaje/categoría, escribiendo el número correspondiente en la línea del código de la muestra.

Puntaje	Categoría	Puntaje	Categoría
1	me disgusta extremadamente	6	me gusta levemente
2	me disgusta mucho	7	me gusta moderadamente
3	me disgusta moderadamente	8	me gusta mucho
4	me disgusta levemente	9	me gusta extremadamente
5	no me gusta ni me disgusta		

CÓDIGO	Calificación para cada atributo			
	OLOR	COLOR	SABOR	TEXTURA



CAPACIDAD ANTIOXIDANTE



- T extremas
- Metales pesados
- Sequías
- Salinidad
- Def. nutrientes



Radicales Libres

ANTIOXIDANTES
enzimáticos y no enzimáticos

- Afectan: Moléculas
- Proteínas de tejidos
- Carbohidratos
- Fosfolípidos membrana
- ADN



Métodos Determinación

Transferencia de átomos de hidrogeno

Miden la capacidad de estabilizar RL

Transferencia de un solo electrón

Miden la disminución porcentual

- DPPH
- ABTS
- FRAP
- CUPRAC



- 1 **Introducción**
- 2 **Objetivos e Hipótesis**
- 3 **Materiales y Métodos**
- 4 **Resultados y Discusión**
- 5 **Conclusiones**
- 6 **Recomendaciones**
- 7 **Agradecimientos**



Objetivo General



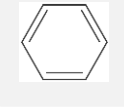
Evaluar el carácter antioxidante, el contenido de compuestos fenólicos y las propiedades sensoriales presentes en cerveza artesanal enriquecida con plantas ubicadas en la zona Andina del Ecuador.



Objetivos Específicos



Elaborar una cerveza artesanal de moringa, una cerveza artesanal de café, una cerveza artesanal de ishpingo, una cerveza artesanal de arrayán y una cerveza artesanal convencional que no requiera adición alguna de estas plantas.



Cuantificar el carácter antioxidante de cada cerveza artesanal empleando los siguientes métodos: FRAP (capacidad de reducción férrica del plasma), DPPH (capacidad reductora del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) y ABTS (capacidad antioxidante mediante la reacción del radical ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico).



Cuantificar los compuestos fenólicos de cada cerveza artesanal con el método colorimétrico de $AlCl_3$ y el ensayo Folin-Ciocalteu respectivamente.



Comparar las propiedades sensoriales de las cinco cervezas artesanales mediante pruebas hedónicas.



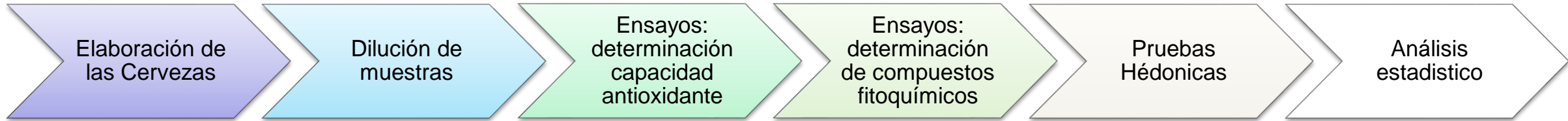


Las cervezas artesanales enriquecidas con plantas ubicadas en la zona Andina del Ecuador presentaran capacidad antioxidante, contenido total de fenoles y valores de las propiedades sensoriales significativamente mayores que la cerveza artesanal sin plantas.



- 1 **Introducción**
- 2 **Objetivos**
- 3 **Materiales y Métodos**
- 4 **Resultados y Discusión**
- 5 **Conclusiones**
- 6 **Recomendaciones**
- 7 **Agradecimientos**





1 Elaboración de cervezas

2 Dilución de muestras.

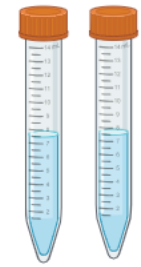


Chimborazo - Ecuador

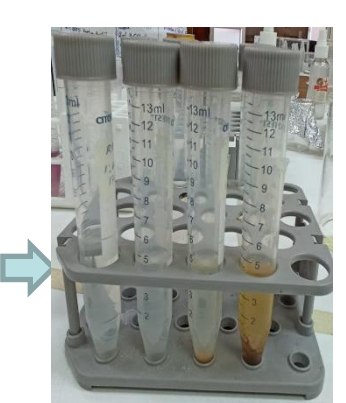
(CÓMO HACER CERVEZA ARTESANAL CASERA → Guía completa, 2021)



6 mL EtOH (96%)



Chimborazo - Ecuador

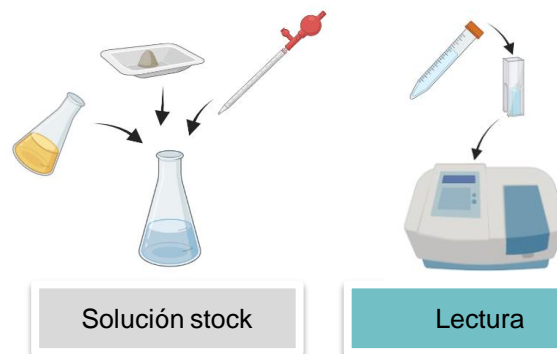


Chimborazo - Ecuador



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

3 Determinación de capacidad antioxidante

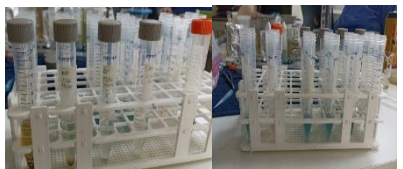
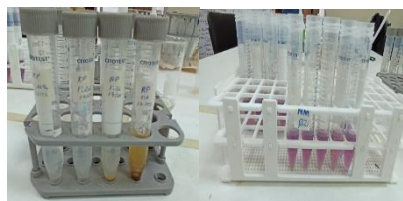


- Blanco: EtOH
- Rep: 3

Curvas calibración:

Trolox

Trolox

FeSO₄·7H₂O

DPPH

DPPH (0.15 mM)
+ muestra

517 nm

ABTS

K₂S₂O₈ (2.45
mM)+sol. ABTS
(7 mM)
1:1 + muestra

734 nm

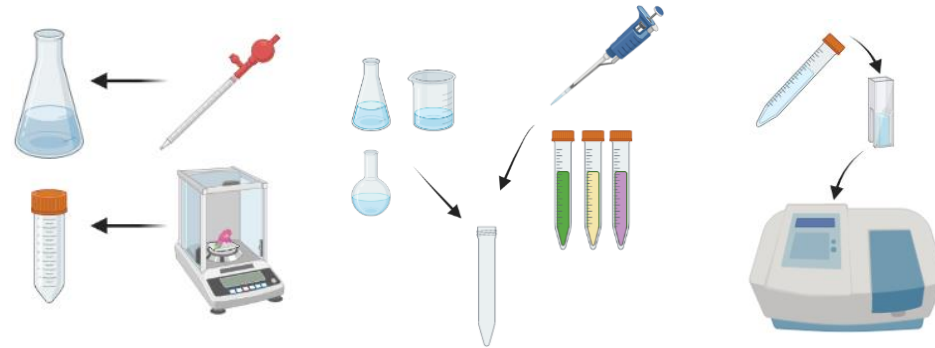
FRAP

tampón acetato
(300 mM) +
TPTZ (40 mM) +
FeCl₃ (20 mM)
10:1:1 + muestra

593 nm

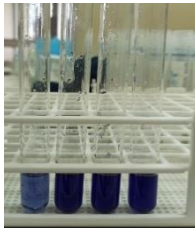


4 Determinación de compuestos fitoquímicos



- Blanco: EtOH
- Rep: 3

Curvas calibración:



Contenido de fenoles totales (TPC)

Folin-Ciocalteu (1 N)

F-C + Muestra + Na_2CO_3 (20%) + agua

765 nm

Ac. gálico



Contenido de flavonoides totales (TFC)

Muestra + EtOH + CH_3COONa (1 M)

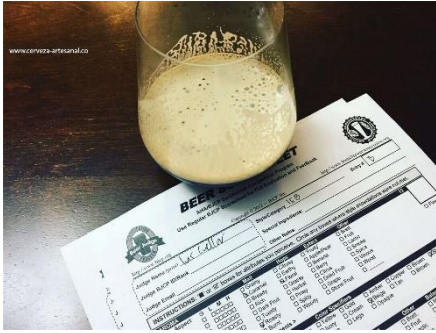
+ AlCl_3 (10%) + agua

435 nm

Quercetina



4 Pruebas Hedónicas



5 Análisis estadístico

Tratamientos

Diseño factorial mixto
2x3 y 3²

Análisis de varianza

Prueba de comparación
múltiple

Correlación Pearson

Puntaje	Categoría	Puntaje	Categoría
1	Me disgusta extremadamente	6	Me gusta levemente
2	Me disgusta mucho	7	Me gusta moderadamente
3	Me disgusta moderadamente	8	Me gusta mucho
4	Me disgusta levemente	9	Me gusta extremadamente
5	No me gusta ni me disgusta		

Software estadístico



InfoStat

v. 2017.1.2



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

- 1 **Introducción**
- 2 **Objetivos**
- 3 **Materiales y Métodos**
- 4 **Resultados y Discusión**
- 5 **Conclusiones**
- 6 **Recomendaciones**
- 7 **Agradecimientos**

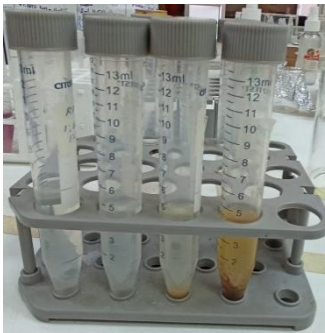


Dilución de las cervezas

Figura 1. Cervezas



Figura 2. Diluciones de las cervezas



Borges et al. (2020),
MeOH – 7.2 %
EtOH – 4.1%

Determinación de capacidad antioxidante

Método DPPH

Figura 3. Reducción de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo

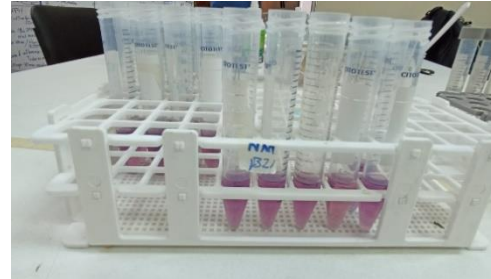
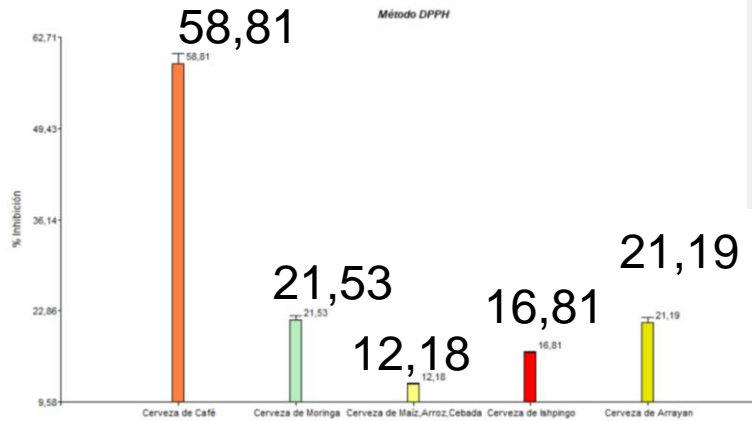


Figura 4. Porcentaje de inhibición



$$y = - 0.9979x + 0.7211 \quad (R^2 = 0.993)$$

Figura 5. Comparación Tukey

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,57975

Error: 0,0465 gl: 10

Muestra	Medias n	E.E.
Cerveza de Café	15,93	3 0,12 A
Cerveza de Moringa	5,62	3 0,12 B
Cerveza de Arrayan	5,52	3 0,12 B
Cerveza de Ishpingo	4,31	3 0,12 C
Cerveza de Maiz, Arroz, Ce..	3,03	3 0,12 D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Café

Milek et al. (2021)

46,15 % extracto etanol – café especial

35 % extracto etanol – café local

Moringa

Desaaegn et al., (2022)

46,55 – 67,18 % extracto etanol

Arrayán

Rivera et al. (2018)

314,39 µg Trolox/mg

Ishpingo

Rivera et al. (2018)

11,291 ul/ml

Cerveza comercial.

Mitic et al. (2014)

0,56 – 1,66 66 µMol (DPPH/ml)

Determinación de capacidad antioxidante

Método ABTS

$$y = -0.2489x + 0.7533 \quad (R^2 = 0.969)$$

Figura 7. Reducción de ABTS⁺

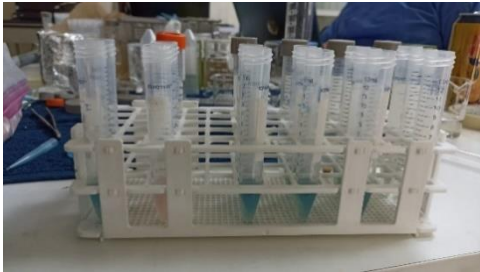


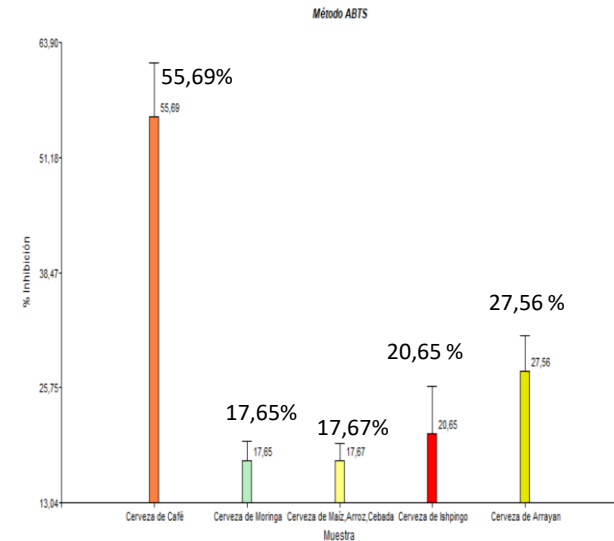
Figura 9. Comparación Kruskal Wallis

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=1,71206
Error: 0,4059 gl: 10

Muestra	Medias	n	F	F	
Cerveza de Café	6,80	3	0,37	A	}
Cerveza de Arrayan	2,80	3	0,37	B	
Cerveza de Ishpingo	1,67	3	0,37	B	
Cerveza de Maíz, Arroz, Ce..	1,23	3	0,37	B	
Cerveza de Moringa	1,23	3	0,37	B	

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Figura 8. Porcentaje de inhibición



Coffea arabica L.
Aleman (2019)
91,49 μmol Trolox/g café

Moringa oleifera L.
Marcela (2020)
12,03 μmol ET/g DM

Luma apiculata B.
Yuliana (2020)
351,31 μg Trolox/mg

Ocotea quixos K.
Rivera et al. (2018)
7,877 μ/ml

Método FRAP

$$y = 0.7056x + 0.028 \quad (R^2 = 0.999)$$

Figura 11. Reducción de Fe³⁺-TPTZ

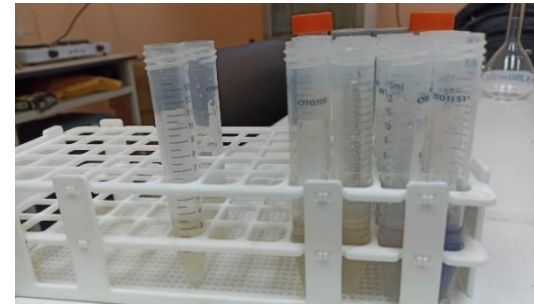


Figura 12. Potencial reductor

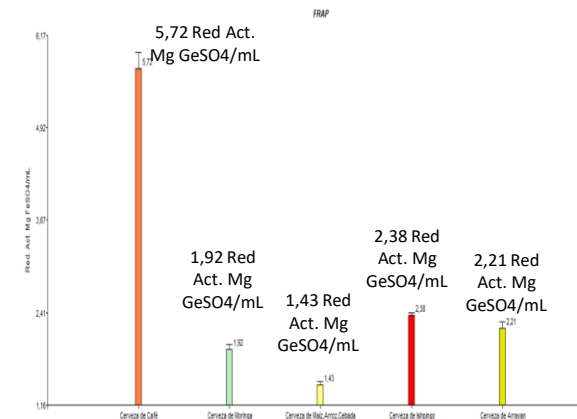


Figura 13. Comparación Kruskal Wallis

Trat.	Medias	Ranks	
Cerveza de Maíz, Arroz, Ce..	1,43	2,00	A
Cerveza de Moringa	1,92	5,00	A } B
Cerveza de Arrayan	2,21	8,00	A } B } C
Cerveza de Ishpingo	2,38	11,00	B } C
Cerveza de Café	5,72	14,00	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Coffea arabica L.
Salazar (2019)
3,55 g Fe2+/g de extracto.

Moringa oleifera L.
Marcela (2022)
39,51 μmol Fe2+/g

Luma apiculata B.
Carrasco - Sandoval (2022)
1349,53 μg Trolox/mg

Ocotea quixos K.
No existen datos en esta prueba.

Determinación de compuestos fitoquímicos

Determinación TPC

$$y = 0.0112x - 0.1759 \quad (R^2 = 0.979)$$

Figura 17. Comparación Kruskal Wallis

Trat.	Medias Ranks
Cerveza de Maiz, Arroz, Ce..	0,33 2,00 A
Cerveza de Ishpingo	0,46 6,00 A B
Cerveza de Moringa	0,59 7,00 A B C
Cerveza de Arrayan	0,75 11,00 B C
Cerveza de Café	1,03 14,00 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Coffea arabica L.

Salazar (2019)

52,27 - 1094 mg GAE / g
café

Moringa oleifera L.

Fejér et al. (2019)

635,6 mg GAE/L

Luma apiculata B.

Carrasco - Sandoval (2022)

128,16 – 593,64 mg GAE/g
fw

Ocotea quixos K.

Ibrahim et al. (2021)

733,33 µg GAE/mg

Determinación TFC

$$y = 1.4566x - 0.0265 \quad (R^2 = 0.994)$$

Figura 21. Comparación Kruskal Wallis

Trat.	Medias Ranks
Cerveza de Maiz, Arroz, Ce..	2,8E-03 2,00 A
Cerveza de Arrayan	0,03 5,00 A B
Cerveza de Ishpingo	0,04 8,00 A B C
Cerveza de Moringa	0,07 11,00 B C
Cerveza de Café	0,15 14,00 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Coffea arabica L.

Vega (2017)

33.71 mg /g

Moringa oleifera L.

Quispe. (2022)

216,37 mg/g

Luma apiculata B.

No existen estudios

Ocotea quixos K.

Martínez (2014)

0,40 µg Kaempferol
/mg Extracto

Figura 15. Reducción de FCR

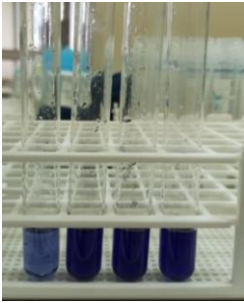


Figura 16. Contenido de fenoles totales

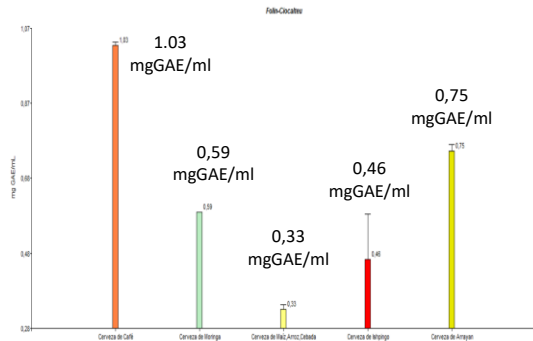
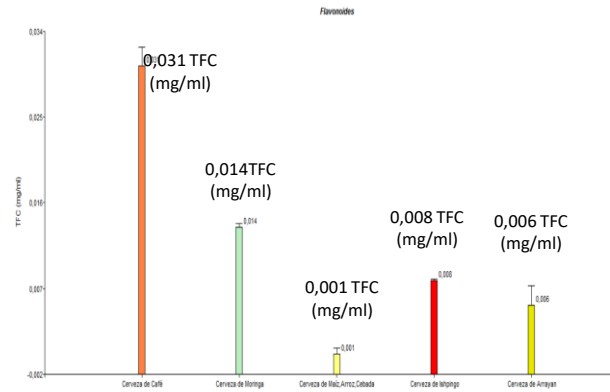


Figura 19. Formación quelatos



Figura 20. Contenido de flavonoides totales



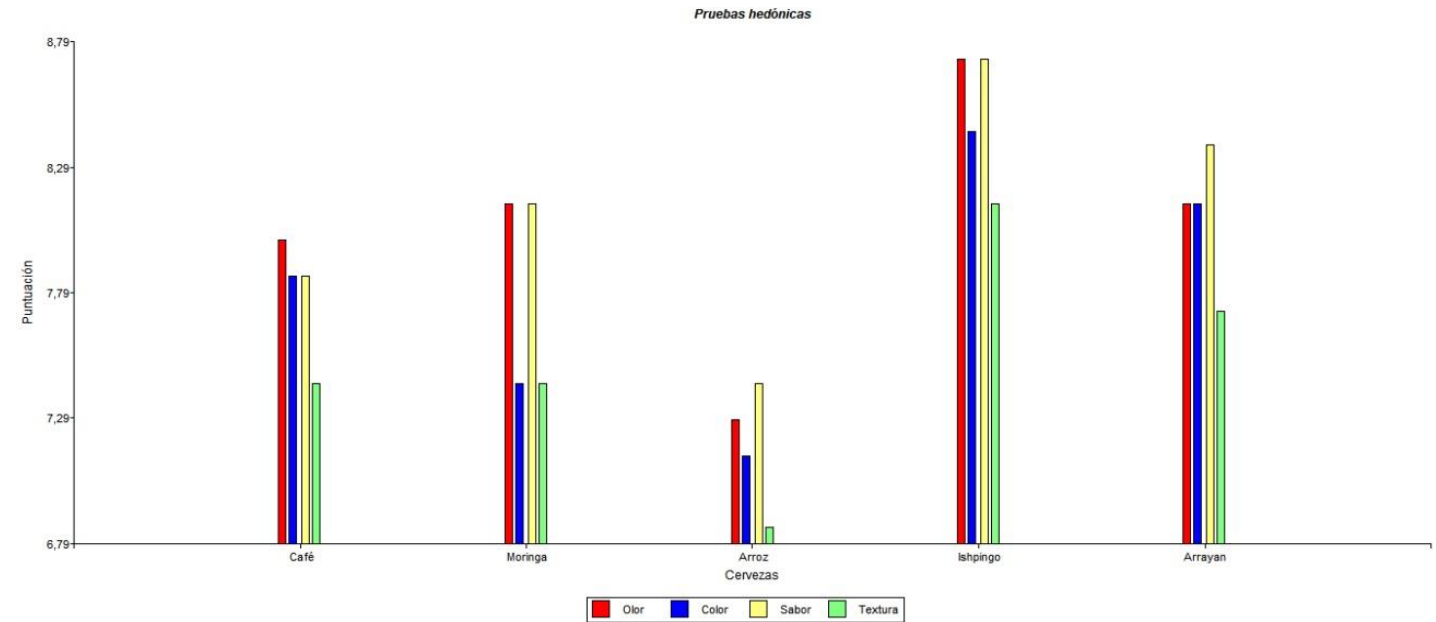
Pruebas Hedónicas

Pruebas hédonicas

Figura 23. Nomenclatura de las cervezas que se evaluaron usando las categorías establecidas por las pruebas hédonicas: NM (Cerveza de Moringa oleífera L.); ISH (Cerveza de Ocotea quixos K.); AR (Cerveza de Luma apiculata B.), RP (Cerveza de Coffea arabica L.) y AM (Cerveza de arroz).

Código	Se usó o no material vegetal	Especie Usada	Tipo de Cerveza
RP	Si	Coffea arabica L.	Cerveza de Café
NM	Si	Moringa oleífera L.	Cerveza de Morigna
AM	No	-	Cerveza de arroz.
ISH	Si	Ocotea quixos K.	Cerveza de Ishpingo
AR	Si	Luma apiculata B.	Cerveza de Arrayán

Figura 24. Resultados de las pruebas hedónicas de las cinco cervezas artesanales presentadas en este estudio.



Cervezas Gruit



Cervezas elaboradas durante la Edad Media con plantas y especias

- 1 **Introducción**
- 2 **Objetivos**
- 3 **Materiales y Métodos**
- 4 **Resultados y Discusión**
- 5 **Conclusiones**
- 6 **Recomendaciones**
- 7 **Agradecimientos**





Se elaboró las cervezas artesanales de *Coffea arabica* L (café).; *Moringa oleífera* L. (moringa); *Ocotea quixos* K. (ishping); *Luma apiculata* B. (arrayán) y una cerveza sin la adición de alguna de las plantas mencionadas y se obtuvieron sus diluciones.



Se cuantificó y determinó que el mejor carácter antioxidante lo presentó la cerveza de *Coffea arabica* L (café) frente al resto de muestras, con porcentajes de inhibición de radicales libres de 58,81% en la prueba DPPH, un 55,69% en la prueba de ABTS y para la prueba de FRAP tuvo un potencial reductor (redox) de 5,72 Red.Act. mg Fe₂SO₄/mL. Además, la cerveza que presentó valores insignificantes fue la cerveza sin adición de alguna de estas plantas por lo cual cumplió su función de blanco para demostrar que las demás cerveza si presentaban un aumento en su capacidad antioxidante.



Se cuantificó el contenido total de fenoles y flavonoides que concordaron con los resultados del carácter antioxidante, la cerveza de *Coffea arabica* L (café) nuevamente presentó un valor de 1,03 mg GAE/mL para la prueba Folin-Ciocalteu que detecta fenoles y un valor de 0,031 TFC (mg/mL) para la prueba con AlCl₃ para la detección de flavonoides.



- 1 **Introducción**
- 2 **Objetivos**
- 3 **Materiales y Métodos**
- 4 **Resultados y Discusión**
- 5 **Conclusiones**
- 6 **Recomendaciones**
- 7 **Agradecimientos**



Realizar análisis posteriores para determinar que polifenoles y antioxidantes existen en cada cerveza.



Ejecutar los análisis de cada cerveza máximo una semana después de haber sido envasada y gasificada para determinar mejor los valores de antioxidantes y fenoles.



- 1 **Introducción**
- 2 **Objetivos e Hipótesis**
- 3 **Materiales y Métodos**
- 4 **Resultados y Discusión**
- 5 **Conclusiones**
- 6 **Recomendaciones**
- 7 **Agradecimientos**





Raluca Alexandra Mihai, Ph. D.
Directora del proyecto

Laboratorio de Biotecnología del Centro
de Investigación de Aplicaciones Militares
“CICTE – ESPE”

Compañeros/as del laboratorio

Familia y Amigos

