



UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA EQUINOCCIAL

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA INGENIERÍA E
INDUSTRIAS**

CARRERA DE INGENIERÍA DE ALIMENTOS

**ESTUDIO DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y CONTENIDO
DE POLIFENOLES DE LA EXTRACCIÓN ETANÓLICA DE
HOJAS DE GUAYUSA (*Ilex guayusa* Loes) DESHIDRATADAS
TRITURADAS**

**TRABAJO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERA DE
ALIMENTOS**

LUCIA DANIELA CASTRO CARRERA

DIRECTORA: ING. ELENA BELTRÁN MSc.

Quito, Febrero, 2017

© Universidad Tecnológica Equinoccial.2017
Reservados todos los derechos de reproducción

FORMULARIO DE REGISTRO BIBLIOGRÁFICO

PROYECTO DE TITULACIÓN

DATOS DE CONTACTO	
CÉDULA DE IDENTIDAD:	171682612-6
APELLIDO Y NOMBRES:	CASTRO CARRERA LUCIA DANIELA
DIRECCIÓN:	MANUEL OBREGOSO N36-72 Y MAÑOSCA
EMAIL:	dany15e@hotmail.com
TELÉFONO FIJO:	2449295
TELÉFONO MÓVIL:	0996120624

DATOS DE LA OBRA	
TÍTULO:	ESTUDIO DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y CONTENIDO DE POLIFENOLES DE LA EXTRACCIÓN ETANÓLICA DE HOJAS DE GUAYUSA (<i>Ilex guayusa Loes</i>) DESHIDRATADAS TRITURADAS
AUTOR O AUTORES:	CASTRO CARRERA LUCIA DANIELA
FECHA DE ENTREGA DEL PROYECTO DE TITULACIÓN:	6 DE FEBRERO DE 2017
DIRECTOR DEL PROYECTO DE TITULACIÓN:	ING. ELENA BELTRÁN
PROGRAMA	PREGRADO <input checked="" type="checkbox"/> POSGRADO <input type="checkbox"/>

<p>TÍTULO POR EL QUE OPTA:</p>	<p>Ingeniera de Alimentos</p>
<p>RESUMEN:</p>	<p>La guayusa (<i>Ilex guayusa Loes</i>) es una de las plantas de mayor interés a nivel mundial debido a sus propiedades energizantes y estimulantes por su alto contenido de cafeína. Es un árbol perenne nativo de la región amazónica del Ecuador y ha sido usado ampliamente por la comunidad indígena de la zona. El objetivo principal del presente estudio fue, estudiar la capacidad antioxidante y contenido de polifenoles de la extracción etanólica de hojas de guayusa (<i>Ilex guayusa Loes</i>). Se trabajó con hojas de guayusa deshidratadas y trituradas, que fueron caracterizadas físico-químicamente. Se prepararon extractos con soluciones acuosas de 0, 40, 50 y 60 % de etanol a dos diferentes temperaturas (20 y 50 °C) y por un tiempo de 4 horas, durante la extracción se tomaron alícuotas de 20 ml a 0, 30, 60, 120, 180 y 240 minutos; las muestras se centrifugaron por 15 minutos a 4 °C. En los extractos obtenidos se analizó la capacidad antioxidante por el método ABTS y contenido de polifenoles por el método de Folin-Ciocalteu. Los resultados se expresaron en mmol Equiv Trolox /100 g de muestra y en mg EAG/ml, respectivamente. Se determinó que los tratamientos con mayor fracción de extracción de capacidad antioxidante y contenido total de polifenoles, a los 60 min, fueron T6 (20 °C, 40 % etanol, 26 g) con valores de 8.97 ± 0.67 mg de Trolox/g y 20.53 ± 1.61 mg EAG/g; y T15 (50 °C, 50 % etanol, 26 g) con 12.46 ± 0.98 mg de Trolox/g y 37.92 ± 3.76 mg EAG/g, respectivamente. El contenido de cafeína de los mejores extractos</p>

	<p>fue de 246.30 y 312.57 mg/100 g, para T6 y T14, respectivamente. Los tratamientos sometidos a la temperatura de 50 °C exhibieron mayor capacidad antioxidante y mayor contenido de polifenoles en comparación con los obtenidos a temperatura ambiente (20 °C). Los extractos con mezcla de solventes (etanol - agua) en diferentes proporciones presentaron una mayor extracción de los compuestos antioxidantes que los extractos acuosos.</p>
<p>PALABRAS CLAVES:</p>	<p>Guayusa, cafeína, extractos, capacidad antioxidante, contenido de polifenoles</p>
<p>ABSTRACT:</p>	<p>The guayusa (<i>Ilex guayusa</i> Loes) is one of the plants of greater interest worldwide due to its energizing and stimulating properties due to its high caffeine content. It is a perennial tree native to the Amazonian region of Ecuador and has been widely used by the indigenous community of the area. The main objective of the present study was to study the antioxidant capacity and content of polyphenols from the ethanolic extraction of guayusa leaves (<i>Ilex guayusa</i> Loes). It was worked with dehydrated and crushed guayusa leaves, which were physicochemically characterized. Extracts were prepared with aqueous solutions of 0, 40, 50 and 60% ethanol at two different temperatures (20 and 50 °C) and for a time of 4 hours, during the extraction 20 ml aliquots were taken at 0, 30, 60, 120, 180 and 240 minutes; The samples were centrifuged for 15 minutes at 4 °C. In the obtained extracts the antioxidant capacity was analyzed by the ABTS method and polyphenol content by the Folin-Ciocalteu method. The results were expressed in mmol Equiv Trolox/100 g of sample and in mg</p>

	<p>EAG/ml, respectively. It was determined that the treatments with the highest fraction of extraction of antioxidant capacity and total content of polyphenols at 60 min were T6 (20 °C, 40% ethanol, 26 g) with values of 8.97 ± 0.67 mg of Trolox/g and 20.53 ± 1.61 mg EAG/g; And T15 (50 °C, 50 % ethanol, 26 g) with 12.46 ± 0.98 mg Trolox/g and 37.92 ± 3.76 mg EAG/g, respectively. The caffeine content of the best extracts was 246.30 and 312.57 mg/100 g, for T6 and T14, respectively. Treatments subjected to the temperature of 50 °C exhibited higher antioxidant capacity and higher content of polyphenols compared to those obtained at room temperature (20 °C). Extracts with solvent mixtures (ethanol - water) in different proportions showed a higher extraction of the antioxidant compounds than the aqueous extracts.</p>
<p>KEYWORDS</p>	<p>Guayusa, caffeine, extracts, antioxidant capacity, content of polyphenols</p>

Se autoriza la publicación de este Proyecto de Titulación en el Repositorio Digital de la Institución.



CASTRO CARRERA LUCIA DANIELA

CI: 1716826126

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, **CASTRO CARRERA LUCIA DANIELA**, CI 171682612-6 autora del proyecto titulado: “**Estudio de la capacidad antioxidante y contenido de polifenoles de la extracción etanólica de hojas de guayusa (*Ilex guayusa* Loes) deshidratadas trituradas**” previo a la obtención del título de **Ingeniera de Alimentos** en la Universidad Tecnológica Equinoccial.

1. Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tienen las Instituciones de Educación Superior, de conformidad con el Artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.
2. Autorizo a la BIBLIOTECA de la Universidad Tecnológica Equinoccial a tener una copia del referido trabajo de graduación con el propósito de generar un Repositorio que democratice la información, respetando las políticas de propiedad intelectual vigentes.

Quito, 6 de febrero de 2017



CASTRO CARRERA LUCIA DANIELA

CI: 1716826126

DECLARACIÓN

Yo **LUCIA DANIELA CASTRO CARRERA**, declaro que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Universidad Tecnológica Equinoccial puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su Reglamento y por la normativa institucional vigente.

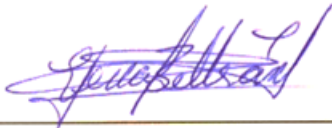
A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Daniela', is written above a horizontal line.

CASTRO CARRERA LUCIA DANIELA

C.I. 1716826126

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo que lleva por título “**Estudio de la capacidad antioxidante y contenido de polifenoles de la extracción etanólica de hojas de guayusa (*Ilex guayusa* Loes) deshidratadas trituradas**”, que, para aspirar al título de **Ingeniera de Alimentos** fue desarrollado por **LUCIA DANIELA CASTRO CARRERA**, bajo mi dirección y supervisión, en la Facultad de Ciencias de la Ingeniería e Industrias; y cumple con las condiciones requeridas por el reglamento de Trabajos de Titulación artículos 19, 27 y 28.



Ing. Elena Beltrán MSc.

DIRECTORA DEL TRABAJO

C.I. 1710472125

DEDICATORIA

Dedico este trabajo con todo mi amor y cariño, a mis padres, Edgar y Susana, que supieron criarme con valores y principios que hoy me hacen la persona que soy, que supieron dárme todo sin esperar nada a cambio. A ellos que me han enseñado a luchar y a esforzarme por lo que quiero, a nunca dejarme vencer por las circunstancias, a siempre ver el lado positivo de las cosas, A VIVIR, A AMAR.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, agradezco a Dios por haberme dado la vida y guiarme a cada momento dándome fuerza y esperanza para cumplir con mis sueños y anhelos.

A mi familia: A mi Padre, por ser un ejemplo a seguir y haberme dado lo mejor siempre, a mi madre, que supo escucharme y aconsejarme en los momentos más difíciles de mi vida, a mi hermana Anita, que me acompañó en las largas madrugadas de estudio, a mi hermana Estefy, que aunque es la menor, es un ejemplo a seguir y me motiva a ser mejor, a una mujer emprendedora. A mi tío Hugo, por siempre desearme lo mejor y preocuparse de mis estudios.

A Eli Tamayo, que estuvo junto a mí días enteros en el laboratorio y a lo largo de mi carrera y fue un pilar fundamental en el logro de mi proyecto.

A mis amigas, que más que amigas las considero hermanas, Hipa Tapia, Daya Espinoza, Michu Zurita, Vicky Zamora y Malu Bedoya que sacrificaron su tiempo y me brindaron su apoyo incondicional para culminar exitosamente este trabajo.

A los “peques” y a todos mis amigos, por haberme brindado su amistad y hacer que mis recuerdos de la universidad sean amenos.

Finalmente, agradezco a la Universidad Tecnológica Equinoccial, a mis profesores, que han sabido guiarme durante mi carrera profesional, en especial a mi directora Elena Beltrán, por su apoyo, por compartir su tiempo y conocimientos en el desarrollo de este trabajo.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	PÁGINA
RESUMEN	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1. GENERALIDADES DE LA HOJA DE GUAYUSA	3
2.1.1. ORIGEN E HISTORIA	3
2.1.2. DESCRIPCIÓN TAXONÓMICA	4
2.1.3. DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA	4
2.1.4. COMPOSICIÓN QUÍMICA	5
2.1.5. USOS	6
2.1.6. PROPIEDADES MEDICINALES	7
2.1.7. ZONAS DE PRODUCCIÓN	9
2.1.8. CULTIVO	10
2.1.9. COSECHA Y ALMACENAMIENTO	11
2.2. COMPUESTOS BIOACTIVOS	12
2.2.1. EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS	13
2.2.2. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN	14
2.2.2.1. Extracción con disolventes	14
2.2.2.2. Condiciones de extracción	15
2.2.2.3. Maceración	17
2.2.2.4. Digestión	18
2.2.2.5. Infusión	18
2.2.2.6. Decocción o cocimiento	18
2.2.2.7. Percolación o lixiviación	18
2.2.2.8. Soxhlet	19
2.2.3. CUADRO COMPARATIVO DE LOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN	19

2.3. RADICALES LIBRES Y ESTRÉS OXIDATIVO	20
2.4. ANTIOXIDANTES	21
2.4.1. COMPUESTOS FENÓLICOS Y SU CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	22
2.4.1.1. Flavonoides	24
2.5. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	25
2.5.1. MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	25
3. METODOLOGÍA	27
3.1. MATERIA PRIMA	27
3.2. CARACTERIZACIÓN FÍSICO QUÍMICA DE LA MATERIA PRIMA	27
3.3. PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS	28
3.4. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	29
3.5. CONTENIDO DE POLIFENOLES	30
3.6. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE CAFEINA	30
3.7. DISEÑO EXPERIMENTAL	30
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
4.1. CARACTERIZACIÓN FÍSICO QUÍMICA DE LAS HOJAS DE GUAYUSA DESHIDRATADAS TRITURADAS	32
4.2. ANÁLISIS DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE HOJAS DE GUAYUSA DESHIDRATADAS TRITURADAS	34
4.2.1. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS DE GUAYUSA DESHIDRATADA TRITURADA A 20 °C	34
4.2.2. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS DE GUAYUSA DESHIDRATADA TRITURADA A 50 °C	37
4.3. ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE POLIFENOLES DE HOJAS DE GUAYUSA DESHIDRATADAS TRITURADAS	39
4.3.1. CONTENIDO DE POLIFENOLES DE LOS EXTRACTOS DE GUAYUSA DESHIDRATADA TRITURADA A 20 °C	39

4.3.2. CONTENIDO DE POLIFENOLES DE LOS EXTRACTOS DE GUAYUSA DESHIDRATADA TRITURADA A 50°C	41
4.4. DETERMINACIÓN DE CAFEÍNA DE LOS EXTRACTOS CON MAYOR CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	45
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	48
5.1. CONCLUSIONES	48
5.2. RECOMENDACIONES	49
BIBLIOGRAFÍA	50
ANEXOS	61

ÍNDICE DE TABLAS

	PÁGINA
Tabla 1. Descripción taxonómica de la guayusa.	4
Tabla 2. Contenido de metabolitos secundarios presentes en concentrado de guayusa.	6
Tabla 3. Características de un vivero acondicionado para plantas de <i>Ilex guayusa</i> L.	11
Tabla 4. Algunos solventes utilizados para la extracción de compuestos de interés.	16
Tabla 5. Comparación de las diferentes técnicas de extracción.	20
Tabla 6. Análisis físico-químico y métodos realizados en la caracterización de hojas de guayusa deshidratadas trituradas.	27
Tabla 7. Tratamientos para la obtención de extractos de hojas de guayusa deshidratadas trituradas.	28
Tabla 8. Resultados obtenidos del análisis físico-químico de las hojas de guayusa deshidratadas trituradas.	32
Tabla 9. Contenido de cafeína, comparación del contenido de polifenoles y capacidad antioxidante del extracto a 20 °C (T6) y a 50 °C (T14) al minuto 120.	46

ÍNDICE DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura 1. Distribución de guayusa en América del sur.	10
Figura 2. Hojas de guayusa (<i>Ilex guayusa</i> L.) deshidratadas y colgadas a manera de collar.	12
Figura 3. Métodos de extracción para la obtención de extractos vegetales.	14
Figura 4. Clasificación de polifenoles y flavonoides, con su estructura química.	23
Figura 5. Resultados obtenidos de capacidad antioxidante de los extractos de hojas de guayusa deshidratadas trituradas a 20 °C en función del tiempo.	34
Figura 6. Fracciones de la capacidad antioxidante de los extractos etanólicos de hojas de guayusa deshidratadas trituradas a 20 °C en función del tiempo.	36
Figura 7. Resultados obtenidos de capacidad antioxidante de los extractos de hojas de guayusa deshidratadas trituradas a 50 °C en función del tiempo.	37
Figura 8. Fracciones de capacidad antioxidante de los extractos etanólicos de hojas de guayusa deshidratadas trituradas a 50 °C en función del tiempo.	38
Figura 9. Resultados obtenidos del contenido de polifenoles de los extractos de hojas de guayusa deshidratadas trituradas a 20 °C en función del tiempo.	40
Figura 10. Fracciones del contenido de polifenoles de los extractos etanólicos de hojas de guayusa deshidratadas trituradas a 20 °C en función del tiempo.	41
Figura 11. Resultados obtenidos del contenido de polifenoles de los extractos de hojas de guayusa deshidratadas trituradas a 50 °C en función del tiempo.	42

Figura 12. Fracciones del contenido de polifenoles de los extractos etanólicos de hojas de guayusa deshidratadas trituradas a 50 °C en función del tiempo.	43
Figura 13. Fracciones de la capacidad antioxidante para el mejor extracto a 20 °C (T6) y a 50 °C (T15), en función del tiempo.	44
Figura 14. Fracción del contenido de polifenoles del mejor extracto a 20 °C (T6) y a 50 °C (T15), en función del tiempo.	45

ÍNDICE DE ANEXOS

	PÁGINA
Anexo 1. Imágenes del proceso de preparación de extractos de hojas de guayusa deshidratadas trituradas.	61
Anexo 2. Tabla de resultados del análisis estadístico de la capacidad antioxidante de los extractos de hojas de guayusa deshidratadas trituradas a 20 °C.	64
Anexo 3. Resultados del análisis estadístico de la capacidad antioxidante de los extractos de hojas de guayusa deshidratadas trituradas a 50 °C.	65
Anexo 4. Resultados de las fracciones de capacidad antioxidante de los extractos de guayusa deshidratadas trituradas a 20 °C.	66
Anexo 5. Resultados del análisis estadístico del contenido de polifenoles totales de los extractos de hojas de guayusa deshidratadas trituradas a 20 °C.	67
Anexo 6. Resultados del análisis estadístico del contenido de polifenoles totales de los extractos de hojas de guayusa deshidratadas trituradas a 50 °C	68
Anexo 7. Resultados de las fracciones del contenido de polifenoles totales de los extractos de guayusa deshidratadas trituradas a 20 °C	69
Anexo 8. Resultados del análisis físico químico de las hojas de guayusa deshidratadas trituradas	70

RESUMEN

La guayusa (*Ilex guayusa* Loes) es una de las plantas de mayor interés a nivel mundial debido a sus propiedades energizantes y estimulantes por su alto contenido de cafeína. Es un árbol perenne nativo de la región amazónica del Ecuador y ha sido usado ampliamente por la comunidad indígena de la zona. El objetivo principal del presente estudio fue, estudiar la capacidad antioxidante y contenido de polifenoles de la extracción etanólica de hojas de guayusa (*Ilex guayusa* Loes). Se trabajó con hojas de guayusa deshidratadas y trituradas, que fueron caracterizadas físico-químicamente. Se prepararon extractos con soluciones acuosas de 0, 40, 50 y 60 % de etanol a dos diferentes temperaturas (20 y 50 °C) y por un tiempo de 4 horas, durante la extracción se tomaron alícuotas de 20 ml a 0, 30, 60, 120, 180 y 240 minutos; las muestras se centrifugaron por 15 minutos a 4 °C. En los extractos obtenidos se analizó la capacidad antioxidante por el método ABTS y contenido de polifenoles por el método de Folin-Ciocalteu. Los resultados se expresaron en mmol Equiv Trolox /100 g de muestra y en mg EAG/ml, respectivamente. Se determinó que los tratamientos con mayor fracción de extracción de capacidad antioxidante y contenido total de polifenoles, a los 60 min, fueron T6 (20 °C, 40 % etanol, 26 g) con valores de 8.97 ± 0.67 mg de Trolox/g y 20.53 ± 1.61 mg EAG/g; y T15 (50 °C, 50 % etanol, 26 g) con 12.46 ± 0.98 mg de Trolox/g y 37.92 ± 3.76 mg EAG/g, respectivamente. El contenido de cafeína de los mejores extractos fue de 246.30 y 312.57 mg/100 g, para T6 y T14, respectivamente. Los tratamientos sometidos a la temperatura de 50 °C exhibieron mayor capacidad antioxidante y mayor contenido de polifenoles en comparación con los obtenidos a temperatura ambiente (20 °C). Los extractos con mezcla de solventes (etanol - agua) en diferentes proporciones presentaron una mayor extracción de los compuestos antioxidantes que los extractos acuosos.

ABSTRACT

The guayusa (*Ilex guayusa* Loes) is one of the plants of greater interest worldwide due to its energizing and stimulating properties due to its high caffeine content. It is a perennial tree native to the Amazonian region of Ecuador and has been widely used by the indigenous community of the area. The main objective of the present study was to study the antioxidant capacity and content of polyphenols from the ethanolic extraction of guayusa leaves (*Ilex guayusa* Loes). It was worked with dehydrated and crushed guayusa leaves, which were physicochemically characterized. Extracts were prepared with aqueous solutions of 0, 40, 50 and 60 % ethanol at two different temperatures (20 and 50 °C) and for a time of 4 hours, during the extraction 20 ml aliquots were taken at 0, 30, 60, 120, 180 and 240 minutes; The samples were centrifuged for 15 minutes at 4 °C. In the obtained extracts the antioxidant capacity was analyzed by the ABTS method and polyphenol content by the Folin-Ciocalteu method. The results were expressed in mmolEquivTrolox/100 g of sample and in mg EAG/ml, respectively. It was determined that the treatments with the highest fraction of extraction of antioxidant capacity and total content of polyphenols at 60 min were T6 (20 °C, 40 % ethanol, 26 g) with values of 8.97 ± 0.67 mg of Trolox/g and 20.53 ± 1.61 mg EAG/g; And T15 (50 °C, 50 % ethanol, 26 g) with 12.46 ± 0.98 mg Trolox/g and 37.92 ± 3.76 mg EAG/g, respectively. The caffeine content of the best extracts was 246.30 and 312.57 mg/100 g, for T6 and T14, respectively. Treatments subjected to the temperature of 50 °C exhibited higher antioxidant capacity and higher content of polyphenols compared to those obtained at room temperature (20 °C). Extracts with solvent mixtures (ethanol - water) in different proportions showed a higher extraction of the antioxidant compounds than the aqueous extracts.

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

La Amazonía ecuatoriana constituye una de las zonas más biodiversas del planeta, por lo que su gran variedad de plantas promueve una investigación constante, no solo en el campo alimenticio sino también en el desarrollo de nuevas materias primas para el mercado farmacéutico y cosmético.(Radice & Vidari, 2007). Una de las plantas de mayor interés a nivel mundial es la guayusa (*Ilex guayusa Loes*) debido a sus propiedades energizantes y estimulantes; además de ser diurético, desintoxicante natural e incluso efectivo para problemas de fertilidad.(Gualli, Arias, & Manzano, 2012).

Es considerada una planta sagrada para la población nativa de la región amazónica, siendo utilizada en forma de infusión por los achuar y mestizos. El brebaje preparado a base de hojas de guayusa (*Ilex guayusa Loes*) es tomado por los pobladores en la madrugada para mantenerse despiertos debido a su efecto estimulante por su alto contenido de cafeína, siendo de 2.90 a 3.28 % en peso seco. (Radice & Vidari, 2007). No obstante, la bebida no solo es utilizada como un medicamento natural, sino también como bebida de hospitalidad y bienvenida.

En la actualidad, el incremento del consumo de bebidas estimulantes tanto a nivel nacional como internacional, se debe no solo a su gratificante sabor, sino además a los efectos benéficos para la salud que se atribuyen dependiendo de la planta que se utilice(Valenzuela, 2004). Las bebidas energizantes generalmente contienen niveles altos de cafeína por lo que han estado asociadas con una percepción de mayor energía. (ALIMENTARYA, 2007).

La Administración de Drogas y Alimentos (FDA, por sus siglas en inglés) clasificó a la cafeína como segura, por lo que los consumidores de té o café no deben preocuparse por su salud en relación con el consumo de cafeína, tomando en cuenta que la cantidad de cafeína ingerida sea moderada en

conjunto con los hábitos de estilo de vida adecuados. Se ha demostrado que entre los beneficios relacionados al consumo de bebidas energizantes (contienen cafeína) están, un mayor rendimiento físico y mental. Sin embargo, consumir bebidas con cafeína como sustitutos del sueño y en exceso, finalmente causará privación del sueño, obteniéndose efectos indeseables sobre la salud. (ALIMENTARYA, 2007).

Por lo expuesto anteriormente, la hoja de guayusa (*Ilex guayusa Loes*) cobra un interés no solo comercial sino también científico y antropológico; por lo que es necesario investigar a la guayusa (*Ilex guayusa Loes*) para así incentivar su consumo tanto nacional como internacionalmente. Los compuestos polifenólicos y la capacidad antioxidante son de gran importancia debido a las propiedades benéficas que poseen, como es el secuestrar radicales libres y reducir el riesgo de contraer enfermedades cardiovasculares, existiendo una amplia investigación de los mismos en otras plantas.

El objetivo general es estudiar la capacidad antioxidante y contenido de polifenoles de la extracción etanólica de hojas de guayusa (*Ilex guayusa Loes*) deshidratadas y trituradas, a continuación se detallan los objetivos específicos:

- Caracterizar fisicoquímicamente las hojas de guayusa (*Ilex guayusa Loes*) deshidratadas trituradas.
- Determinar la capacidad antioxidante y el contenido de polifenoles de los extractos analizados.
- Evaluar el contenido de cafeína de los tratamientos con mayor capacidad antioxidante.

2. MARCO TEÓRICO

2. MARCO TEÓRICO

2.1. GENERALIDADES DE LA HOJA DE GUAYUSA

2.1.1. ORIGEN E HISTORIA

La guayusa (*Ilex guayusa*) es una planta nativa de la Amazonía descubierta en la época conocida como kallari o ñawpatimpu (los primeros tiempos) por el pueblo kichwa (naporuna) del Ecuador. Sin embargo, existen registros afirmando que la planta, además de ser silvestre, fue plantada por los abuelos y padres de las tribus. (Crespo, 2013).

Las comunidades indígenas kichwa, shuar (jíbaros) y achuar, asentadas en el oriente ecuatoriano, desarrollaron y organizaron toda su vida con base en las plantas. Obtuvieron conocimiento sobre las propiedades de plantas estimulantes como la guayusa (*Ilex guayusa* Loes), la ayahuasca (*Banisteriopsis caapi*) y la vilca (*Anadenanthera colubrina*), que podían llevarles a estados alterados de conciencia, permitiéndoles comunicarse con espíritus y dioses que formaban parte de su cosmovisión. (Balslev, Navarrete, De la Torre, & Macía, 2008).

Los indígenas Jíbaros tenían buena apariencia física debido a que consumían infusiones de guayusa varias veces al día, en forma de té agregando limón o jugo de naranja. Algunas hojas eran maceradas en agua ardiente para proporcionarle sabor. (Balslev, Navarrete, De la Torre, & Macía, 2008). Mientras se bebe la guayusa por las mañanas, algunos adultos kichwa tejen redes de pesca, trampas y bolsas de hombro, tocan música y cuentan historias. De la misma manera, los ancianos dan consejos a los jóvenes llevando a cabo “rituales de asesoramiento” o castigos tradicionales. (Dueñas, Jarret, Cummis, & Hines, 2016). También, eran capaces de permanecer despiertos sin perder la conciencia por algunos días

y así evitar invasiones enemigas. Se decía que la infusión curaba resfriados, enfermedades venéreas e incluso vencía la esterilidad en la mujer. (Patiño, 1968).

2.1.2. DESCRIPCIÓN TAXONÓMICA

Tabla 1. Descripción taxonómica de la guayusa.

Nombre Científico:	<i>Ilex guayusa</i> Loes
Reino:	Plantae
Clase:	Equisetopsida
Subclase:	Magnoliidae
Superorden:	Asteranae
Orden:	Celastrales
Familia:	Aquifoliaceae
Género:	Ilex
Epíteto específico:	Guayusa
Autor Epíteto Específico:	Loes

(Caranqui & Humanante, 2010)

La guayusa pertenece al único género existente de la familia Aquifoliaceae que contiene 600 especies, de las cuales 300, se pueden encontrar en el Neotrópico. (Dueñas, Jarret, Cummis, & Hines, 2016). En el Ecuador se reconocen 8 especies del género *Ilex*, siendo *Ilex guayusa* L. empleado para el consumo humano. (Torres, 2013). En la Tabla 1 se detalla la descripción taxonómica de la guayusa.

2.1.3. DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA

Es un árbol perenne nativo de la región amazónica, encontrándose en estado silvestre; mientras que en ciertos lugares subtropicales de la región andina se encuentra cultivado. En general, los árboles de esta especie alcanzan un tamaño promedio de hasta 10 m de altura, tienen un diámetro a la altura del pecho (DAP) de 50-80 cm, poseen una copa irregular y exhiben un follaje denso. No obstante, en la provincia de Morona Santiago se ha

reportado la existencia de un bosque natural de árboles de guayusa alcanzando los 20 m de altura y con un DAP DE 80 A 90 cm. (Radice & Vidari, 2007).

La literatura disponible y colecciones de museos han registrado guayusa en altitudes que van desde 200 a 2.600 m sobre el nivel del mar, con temperaturas de 18 a 28°C. (Torres, 2013).

A pesar de la presencia de semillas, la guayusa solo se reproduce asexualmente mediante la siembra humana de los tallos sin hojas extraídos de la base de la planta madre. (Dueñas, Jarret, Cummis, & Hines, 2016).

2.1.4. COMPOSICIÓN QUÍMICA

Ilex guayusa es rica en metilxantinas (cafeína y teobromina), consideradas alcaloides por ser sustancias fisiológicamente activas. El contenido de cafeína encontrado en hojas de guayusa oscila de 2.90 a 3.28% en peso seco. (Torres, 2013).

Presenta cantidades importantes de esteroides, terpenos y compuestos lactónicos o cumarinas, saponinas, fenoles, taninos, derivados del ácido clorogénico, aceites esenciales, azúcares reductores, flavonoides y quinonas. Por otra parte, riboflavina, ácido ascórbico, piridoxina y tisanas se encuentra en menor cantidad. Otro compuesto de importancia es L-teanina, un ácido glutámico análogo que trabaja en sinergismo con la cafeína. (Tuquinga, 2013). También, se cree que L-teanina es responsable en un 70% al sabor umami, mientras que la cafeína y otros polifenoles secundarios otorgan suavidad y dulzura. (Senanayake, 2013). Además, en la Tabla 2 se muestran algunos metabolitos secundarios presentes en la guayusa.

Tabla 2. Contenido de metabolitos secundarios presentes en concentrado de guayusa.

Analito	Contenido (mg / ml)
Cafeína	36
Teobromina	0.3
Ácidos clorogénicos	52
Polifenoles totales	10
Catequina	2
Isoflavonas	0.8
Epicatequina	0.179
Epicatequina galato (ECG)	0.199
Galato de epigalocatequina (EGCG)	0.0876
Epigalocatequina (EGC),	1.11
Kaempferol	Trazas
Naringina	Trazas

(Kapp, Mendes, Roy, McQuate, & Kraska, 2016)

2.1.5. USOS

Los usos que se le ha dado a la infusión de hojas de guayusa varían dependiendo de la comunidad indígena y de la concentración de guayusa que se tenga en la cocción, utilizándose como emético a una mayor concentración y actuando como estimulante a menor concentración. (Sidali, Yépez, & Garrido, 2016). A continuación se enlistan los diferentes usos:

- **Ritualístico - Emético (Achuar, Shuar):** Consideraban perjudicial e indecoroso que los restos de comida del día anterior permanecieran en el estómago, por lo que limpiaban sus intestinos y purificaban su estómago tomando la infusión que se dejaba hervir toda la noche. Se inducían el vómito con una pluma o introduciendo un dedo en la garganta, ya que los compuestos encontrados en las hojas no son causantes del vómito.
- **Ritualístico - Ceremonias (Kichwa, Shuar):** “Gran Guayusazo Bailable” y “Guayusa Warmi”. En este último, se va de casa en casa ofreciendo té de guayusa a toda la comunidad Kichwa. “Fiesta femenina del tabaco” (Noa Tsangu): Las mujeres deben lavar su boca

con guayusa y las caras de sus perros con el té para que se vuelvan buenos cazadores.

- **Narcótico/hipnótico (Kichwa):** Inducía a pequeños sueños para conocer sobre si la caza sería exitosa o no.
- **Estimulante/tónico/diurético (Kichwa, Shuar, Achuar);** Empezando desde la mañana, se toma varias veces al día la infusión para permanecer con energía durante todo el día.
- **Repelente (Kichwa):** Escupen pequeñas cantidades del té de guayusa sobre brazos y piernas para eludir picaduras de insectos o serpientes.
- **Anti-edad (Kichwa):** Se someten a baños de vapor o rocían agua de guayusa en brazos, piernas y cara para evitar el envejecimiento.
- **Remedio para la gripe/dolores del cuerpo/enfermedades venéreas (Kichwa):** Se usa en combinación con jengibre, jugo de limón, chuchuwasi (corteza) o licor de caña de azúcar
- **Sensación de saciedad:** Un trago de la bebida en la mañana provocaba no tener apetito hasta la tarde.
- **Efecto limpiador en la sangre (Shuar – Achuar, Perú):** Remueve el exceso de azúcar en la sangre. Se usa para tratar la diabetes.
- **Efecto estrogénico / Fertilidad / libido (Kichwa):** Incrementa la fertilidad en las mujeres y su deseo sexual. La infusión se mezcla con miel. (Dueñas, Jarret, Cummis, & Hines, 2016; Lewis, Kennelly, Bass, Wedner, Lewis, & Fast, 1991; Karsten , 2000).

Ilex guayusa L. es la planta más importante en la vida cotidiana de los Kichwa, puesto que representa su cultura siendo una planta nacional. (Innerhofer & Bernhardt, 2011).

2.1.6. PROPIEDADES MEDICINALES

Entre los compuestos bioactivos o fitoquímicos que otorgan a las plantas propiedades medicinales están: flavonoides, terpenos, alcaloides y

cumarinas. El sabor amargo, la astringencia y el olor de los fitoquímicos, es lo que permite a las plantas defenderse de las infecciones de los microorganismos, insectos y depredadores; por consiguiente, al ser ingeridos, disminuyen el riesgo de desarrollar cáncer. (Yang, Li, & Chuang, 2012; Sevilla & Mach, 2013).

Los compuestos polifenólicos, en especial los flavonoides (catequinas), confieren propiedades antioxidantes al té, ayudando a reducir enfermedades cardiovasculares y cancerígenas. (Senanayake, 2013).

Los terpenos, como las saponinas, exhiben un efecto protector contra el cáncer de estómago, reducen el colesterol en la sangre, son antiinflamatorias y antivirales. (Aponte, y otros, 2008).

Las cumarinas, son los compuestos más abundantes en hierbas y se ha encontrado que presentan propiedades antimicrobianas, antivirales, antitrombóticas (evitan la formación de coágulos en la sangre) y antiinflamatorias. (Yang, Li, & Chuang, 2012).

Los alcaloides (metilxantinas) son capaces de estimular el sistema nervioso central, producir diuresis y relajar los músculos lisos. La cafeína mejora el estado de alerta, el estado de ánimo y la cognición; siempre y cuando su consumo total no exceda de 400 mg/d. (Kapp, Mendes, Roy, McQuate, & Kraska, 2016).

La presencia de L-teanina reduce la fatiga física y mental, disminuye el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares, combate el estrés, la ansiedad y la esquizofrenia; mejora la memoria, y desempeña efectos similares a los antidepresivos y como neuroprotector. Además, de tener efecto anti-ulcerogénico. (Zukhurova, y otros, 2013; Chatterjee, Chatterjee, & Bandyopadhyay, 2016).

Igualmente, varios estudios muestran que el té reduce el peso corporal, los niveles plasmáticos de triglicéridos libres, colesterol; así como poseer efectos anti-envejecimiento. (Kapp, Mendes, Roy, McQuate, & Kraska, 2016).

Sin embargo, miembros de la comunidad achuar han explicado que la mezcla de algunas plantas en preparaciones medicinales puede causar efectos adversos. Por esta razón, al utilizar hojas de *Ilex guayusa* L. y *Psidium guajava* en la misma decocción se dice que producen una bebida venenosa. (Giovannini, 2015).

2.1.7. ZONAS DE PRODUCCIÓN

La guayusa se encuentra ampliamente distribuida en el extremo nor-occidental de la Amazonía sudamericana, desde el sur de Colombia hasta el norte de Perú (Figura 1). La posición geográfica del Ecuador permite que la guayusa producida sea la mejor del mundo, esto debido a los rayos del sol caen perpendicularmente sobre el suelo. Al menos un 98% de la producción mundial de guayusa se encuentra en Ecuador. No obstante, existen referencias de que se encontraron hojas de guayusa en una tumba en Tiahuanaco, Bolivia, que datan del año 1500 AC. (Dueñas, Hines, Stimola, Montagnini, Humanate, & Melican, 2013; Crespo, 2013; Weissmann, 2014).

En Ecuador la provincia con mayor producción de esta planta es Napo, teniéndose también cultivos en Sucumbios, Orellana, Pastaza, Morona Santiago y Zamora Chinchipe. (Crespo, 2013).

Asimismo, es bien conocida su semejanza con la yerba mate (*I. paraguariensis*) que se produce mayormente en Argentina, Brasil y Paraguay; por lo que, la guayusa es conocida comúnmente como “mate ecuatoriano”. (Melo, 2014).

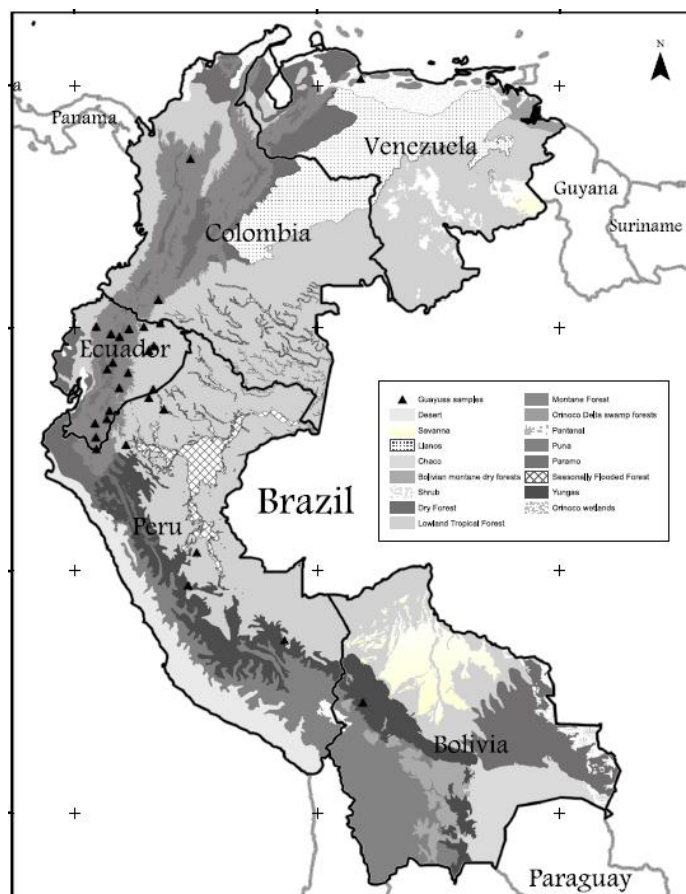


Figura 1. Distribución de guayusa en América del sur.
(Dueñas, Jarret, Cummis, & Hines, 2016)

2.1.8. CULTIVO

La guayusa se siembra por el método de enraizamiento de estacas, ya que es de fácil implementación y permite producir una mayor cantidad de plantas. Primeramente, los árboles son seleccionados dependiendo de sus características agronómicas (cantidad de follaje, tolerancia a plagas y enfermedades, calidad de hojas), se etiquetan y registran en base a la finca o comunidad a la que pertenecen. Después, se extraen las estacas. Se eligen aquellas ramas con crecimiento vertical, en estado leñoso o semi-leñoso (color marrón-café). Las estacas deben mostrar de 2 a 4 nudos con yemas activas. Posteriormente, las estacas se cortan en bisel (inclinado) con una tijera de poda desinfectada con limón o alcohol al 5 %, presentando una

longitud de 25 a 40 cm y un diámetro de 1 a 3 cm. Finalmente, se acondiciona el vivero con las características mostradas en la Tabla 3.

Tabla 3. Características de un vivero acondicionado para plantas de *Ilex guayusa* L.

Componente	Características
Dimensión	Mínimo 4 m ² (50 plantas por m ²).
Cubierta	Construida con madera y techo de paja o malla zaram.
Cerramiento	Protección externa para proteger las plantas de plagas.
Camas	Son espacios de 60 cm de ancho y 1-2 m de largo donde se adecuan las fundas.
Caminos	Mínimo 40 cm de ancho para facilitar el paso de la carretilla.
Drenajes	Canales para retirar excesos de agua.
Medio de enraizamiento	Material inerte (arena o aserrín de madera) que promueve el crecimiento de las raíces.
Sustrato	Mezcla de tierra, arena y abono que provee a la planta de nutrientes para que se desarrolle de manera adecuada.
Agua	Se almacena para regar plantas en periodos de sequía.
Fundas	Se utilizan fundas negras de 5 x 8 pulgadas y con perforaciones en la base. Se llenan con el sustrato.
Registros	Se tiene control de las actividades y cantidades producidas.

(Torres, 2013)

Por otro lado, las estacas de guayusa utilizan una hormona de enraizamiento para promover la formación y el desarrollo de las raíces. Los enraizadores más usados son: hormonagro 1 (polvo mojable), raíz plant (líquido), rootmost (líquido). Luego, las estacas son colocadas en fundas manteniendo una inclinación de 45 grados por aproximadamente 120 días. (Torres, 2013).

2.1.9. COSECHA Y ALMACENAMIENTO

La recolección de hojas inicia una vez que la planta haya alcanzado la madurez (4 años), mientras que a los 5 años de edad se realiza una poda de mantenimiento para eliminar ramas secas, dañadas, rotas, cruzadas y tallos enfermos o muertos. El método por el cual se cosechan las hojas maduras

(color verde oscuro) es la poda de ramillas, en donde se deja un tocón a 3 cm del tallo para que crezcan nuevas ramas. Esto se realiza 2 veces al año. No obstante, los árboles de guayusa al cabo de tres años de su cultivo son capaces de producir hojas. (Torres, 2013; Schultes, 1979).

Por último, las hojas previamente desecadas en camas de marchitamiento son transportadas a los diferentes sitios de venta en forma de collares (Figura 2) o para su posterior industrialización. (Crespo, 2013).



Figura 2. Hojas de guayusa (*Ilex guayusa* L.) deshidratadas y colgadas a manera de collar.

2.2. COMPUESTOS BIOACTIVOS

Son metabolitos secundarios que producen las plantas con efectos farmacológicos o toxicológicos en humanos y animales. A diferencia de los metabolitos primarios (carbohidratos, aminoácidos, proteínas y lípidos), los metabolitos secundarios ayudan a la planta a aumentar su capacidad de supervivencia así como mejorar su interacción con el entorno. Por esta razón, la producción de este tipo de compuestos dependerá de las necesidades de cada especie. (Gil, y otros, 2013).

Otra definición enuncia que son constituyentes extranutricionales que se encuentran en vegetales y frutas. Numerosos estudios epidemiológicos, han mostrado los efectos protectores de dietas ricas en vegetales frente a enfermedades cardiovasculares (CVD), cáncer y algunos de ellos han

evidenciado tener efectos antimutagenicos y actividad antioxidante. Esto es atribuido a la considerable cantidad de compuestos polifenólicos presentes en la materia vegetal. (Martínez, Ascacio, Sepúlveda, Rodríguez, Aguilera, & Aguilar, 2013).

Los compuestos bioactivos se dividen en tres grandes grupos: terpenos y terpenoides (aproximadamente 25000 tipos), alcaloides (aproximadamente 12000 tipos) y compuestos fenólicos (aproximadamente 8000 tipos). (Azmir, y otros, 2013).

2.2.1. EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS

La extracción es un paso importante en el aislamiento y posteriormente, en la identificación y cuantificación de compuestos bioactivos. No obstante, este tipo de compuestos difieren estructuralmente dependiendo de la planta y a las condiciones de su entorno. Las altas temperaturas junto con la exposición a la luz estimulan la producción de ácidos fenólicos y flavonoides, debido al estrés producido por el calor, siendo las hojas, la parte de la planta que más acumula compuestos fenólicos por su exposición directa a la luz. Por lo expuesto anteriormente, se dificulta desarrollar un método de extracción estandarizado. (Bucić, y otros, 2011; Silva, y otros, 2015).

Por lo general, los extractos preparados de compuestos bioactivos parten de la materia vegetal desecada y se obtienen mediante la aplicación de procesos físicos, químicos y microbiológicos. (Caldas , 2012).

El interés de la industria alimentaria ha incrementado sobre los extractos de frutas, hierbas y verduras ricos en compuestos bioactivos debido a que retardan la degradación oxidativa de los lípidos, mejorando la calidad y el valor nutricional de los alimentos. Para los científicos, la importancia de estos compuestos recae sobre su capacidad de mantener la salud y brindar

protección contra enfermedades coronarias y cáncer. (Kähkönen, y otros, 1999).

2.2.2. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

El proceso de extracción es fundamental para la obtención de compuestos bioactivos en plantas, en la Figura 3 se encuentran expuestos los distintos métodos de extracción.

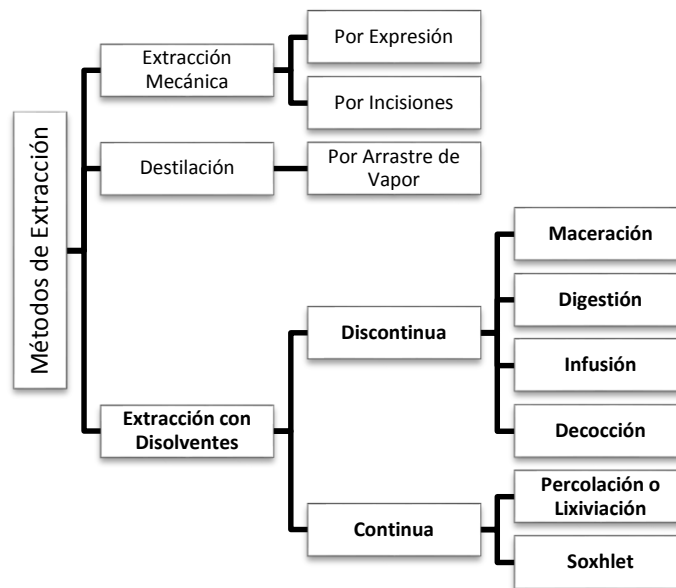


Figura 3. Métodos de extracción para la obtención de extractos vegetales.
(Naveda, 2010)

2.2.2.1. Extracción con disolventes

Esta técnica se ideó para separar los compuestos solubles presentes en una matriz sólida (tejido de la planta) mediante el uso de una matriz líquida (disolvente). Es la técnica más utilizada para el aislamiento de compuestos bioactivos, puesto que los solventes orgánicos pueden removerse por roto-evaporación del extracto. (Yeasmen & Islam, 2015).

En la etapa inicial de la extracción la absorción del disolvente provoca inflamación del tejido vegetal por acción de la capilaridad (cualidad de una

sustancia de absorber otra), puesto que el solvente penetra en la célula vegetal y expulsa el aire contenido en el citoplasma. Esto induce un momento dipolar en las moléculas de los compuestos que van a ser extraídos. De esta manera las sustancias extraíbles se adhieren a las moléculas del solvente. (Pasrija & Anandharamakrishnan, 2015).

2.2.2.2. Condiciones de extracción

Las condiciones de extracción influyen directamente en la eficiencia de la extracción y en la calidad obtenida del extracto. (Vongsak, Sithisarn, Mangmool, Thongpraditchote, Wongkrajang, & Gritsanapan, 2013).

- **Tipo y concentración del disolvente**

Debido a la presencia de diferentes compuestos bioactivos con características y polaridades variadas que pueden o no ser solubles a un solvente en particular, se emplean soluciones acuosas (calientes o frías) de etanol, metanol, acetona y acetato de etil. (Sultana, Anwar, & Ashraf, 2009).

La selección del disolvente depende de la finalidad que tenga la extracción. Los disolventes con alta polaridad (de naturaleza general) se utilizan para obtener un extracto con la mayor parte de los constituyentes químicos de la planta; mientras que, los solventes de baja polaridad (selectivos) extraen constituyentes químicos con una característica determinada. En la Tabla 4 se puede apreciar algunos de los solventes más utilizados en la industria para el aislamiento de compuestos bioactivos. La constante dieléctrica del solvente expresa la capacidad de asociación del mismo. Cuanto más polar sea un solvente mayor será su constante dieléctrica. Es así que, compuestos polares se disuelven en solventes con una elevada constante dieléctrica. (Sharapin, 2000).

Otros criterios a considerar son: la seguridad, salud ocupacional, medio ambiente, calidad (riesgo de impurezas), restricciones industriales (punto de ebullición, temperatura de congelación, densidad, reciclabilidad) y costo. En comparación con el metanol y la acetona, el etanol y el agua son más seguros para los seres humanos y para el medio ambiente. (Prat, Hayler, & Wells, 2014; Xu, Zhou, Zheng, Li, Li, & Li, 2015).

Tabla 4. Algunos solventes utilizados para la extracción de compuestos de interés.

Solvente	Constante dieléctrica a 25°C	Compuestos bioactivos extraídos
Cloroformo	4.87	Terpenoides, flavonoides
Acetona	20.7	Flavonoides
Etanol	24.3	Taninos, polifenoles, flavonoides, terpenoides, alcaloides
Metanol	33.6	Antocianinas, taninos, saponinas, terpenoides, flavonoides, polifenoles
Agua	78.3	Antocianinas, taninos, saponinas, terpenoides

(Azmir, y otros, 2013; Sharapin, 2000)

- **Tamaño de partículas**

Influye en la velocidad de transferencia de masa interna. Un tamaño de partículas pequeño permite disminuir el tiempo de extracción, ya que el soluto se encuentra en un estado más accesible al disolvente, tiene mayor área de contacto. (Ortuño , 2006; Rebolleda, 2010).

- **Temperatura de extracción**

Al aumentar la temperatura se aumenta la velocidad de extracción debido a que existe una mayor solubilidad reduciendo el tiempo de extracción. Sin embargo, se somete a bajas temperaturas para evitar el deterioro o

destrucción de los compuestos de interés. (Miano, Rojas, & Barraza, 2014; Pasrija & Anandharamakrishnan, 2015).

- **Tiempo de extracción**

Esta variable debe ser suficiente para permitir la separación de los compuestos. Un uso prolongado del tiempo repercute en los costos de la extracción. (Sharapin, 2000).

- **Agitación**

La agitación disminuye la resistencia a la difusión. El movimiento de la solución aumenta la eficiencia del proceso al desplazar el equilibrio en el sentido de la saturación del disolvente. (Sharapin, 2000).

- **pH**

El pH influye en la solubilidad de varios compuestos permitiendo la formación de sales. Para la extracción de alcaloides con solventes orgánicos de baja polaridad es necesario tratar la muestra con soluciones alcalinas para liberar los alcaloides de sus sales y puedan extraerse. Asimismo, para la extracción en soluciones acuosas es necesario un pH ácido. (Sharapin, 2000).

2.2.2.3. Maceración

Es una técnica usada para extraer compuestos activos termolábiles. La materia vegetal en trozos o polvo y el solvente entran en contacto a temperatura ambiente en un recipiente cerrado y protegido de la luz solar por un prolongado espacio de tiempo (de 3 a 10 días). También se agita frecuentemente para completar la extracción aumentando la difusión. Los solventes más utilizados en este tipo de extracción son el agua, etanol y su

combinación. Posteriormente, se decanta y se desecha el residuo vegetal. (De la Vega, 2013; Azmir, y otros, 2013).

2.2.2.4. Digestión

También denominada “maceración en caliente”. La materia vegetal y el solvente entran en contacto a temperatura controlada (de 35 a 65 °C) por un periodo de tiempo prolongado. Se utiliza cuando los disolventes son grasos (preparación de aceites medicamentosos). (Naveda, 2010; Estrada, 2010).

2.2.2.5. Infusión

También denominadas “tisanas”. Después de que el solvente haya hervido, la materia vegetal (partes delicadas: hojas flores, tallos tiernos) entra en contacto durante poco tiempo. Se libera una gran cantidad de sustancias bioactivas, con poca alteración en su estructura química y conservando al máximo las propiedades. (Mamert & Hieronimi, 2010).

2.2.2.6. Decocción o cocimiento

La materia vegetal (partes duras: raíces, cortezas, semillas) se coloca en un baño de agua hirviendo a una temperatura de 80 a 100 °C. Se deja hervir a fuego lento de 3 a 30 minutos. Luego se aparta del fuego, se deja reposar por 5 minutos y se filtra. No obstante, algunos principios activos pueden degradarse por la acción prolongada del calor. (Carocho & Ferreira, 2013).

2.2.2.7. Percolación o lixiviación

La materia vegetal previamente humedecida se coloca en una columna. El disolvente por su parte es añadido por la parte superior de la columna y gotea por la parte inferior. Se tiene un flujo permanente de solvente

permitiendo extraer los compuestos de interés. (Pascual, Valls, & Solà, 2009).

2.2.2.8. Soxhlet

La técnica de Soxhlet desplaza el equilibrio de transferencia aumentando la transferencia de masa al introducir repetidamente solvente fresco en contacto con la materia vegetal. Esta técnica es realizada en un aparato Soxhlet, comprendido por un balón, un cuerpo extractor y un refrigerante. Se deposita el solvente en el balón que es llevado a ebullición para producir vapor. Al ascender hasta el refrigerante se condensa entrando en contacto con la muestra que previamente fue depositada en un cartucho en el cuerpo extractor. Luego, el extracto sifonea por el tubo lateral para caer nuevamente en el balón. Este proceso se repite sucesivamente reciclando el solvente mientras se concentran los compuestos activos. (Naveda, 2010).

2.2.3. CUADRO COMPARATIVO DE LOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

En la tabla 5 se puede observar las ventajas y desventajas de las diferentes técnicas de extracción.

Tabla 5. Comparación de las diferentes técnicas de extracción.

Técnicas de extracción	Ventajas	Desventajas	Aplicaciones
Extracción con solventes	<ul style="list-style-type: none"> • Amplia gama de disolventes (agua, metanol, etanol, hexano, etc.). • Fácil de instalar • Bajo costo de instalación • Se obtiene producto purificado con fluidos supercríticos (CO₂) 	<ul style="list-style-type: none"> • Exposición prolongada a disolventes ya altas temperaturas • Alto riesgo de degradación de los compuestos • Se requiere una cantidad enorme de disolvente • La purificación posterior al proceso es una necesidad 	<ul style="list-style-type: none"> • Té verde • Semillas de uva • Cáscara de granada
Extracción asistida por microondas	<ul style="list-style-type: none"> • Tiempo de exposición corto (1-3 minutos) • Menor degradación de los compuestos • Reducción del uso de disolventes 	<ul style="list-style-type: none"> • Procesamiento por lotes • Es necesario un procesamiento posterior 	<ul style="list-style-type: none"> • Té verde • <i>Radix astragali</i> • <i>Hypericum perforatum</i> y <i>Thymus vulgaris</i>
Extracción asistida por ultrasonido	<ul style="list-style-type: none"> • Configuración sencilla y fácil de escalar • No se requiere procesamiento posterior • Aplicación a baja temperatura • Puede ser usado para compuestos termolábiles 	<ul style="list-style-type: none"> • Tiempo de extracción largo • Falta de uniformidad en la distribución de las olas 	<ul style="list-style-type: none"> • Té verde • Pulpa de manzana • Saponina del ginseng

(Pasrija & Anandharamkrishnan, 2015)

2.3. RADICALES LIBRES Y ESTRÉS OXIDATIVO

Los radicales libres son átomos o grupos de átomos que poseen uno o más electrones desapareados, por ende son moléculas inestables y muy reactivas, tendiendo a captar electrones de otros átomos para lograr estabilidad electroquímica. Esto produce la aparición de nuevos radicales libres creando una reacción en cadena. (Maldonado, Jiménez, Guapillo, Ceballos, & Méndez, 2010).

Los radicales libres están presentes naturalmente en los sistemas vivos. Se generan como producto del metabolismo celular a nivel mitocondrial, citoplasmático, membrana nuclear y retículo endoplasmático. Sin embargo, una alta cantidad de radicales libres provoca un estrés oxidativo al presentar un desequilibrio entre la producción de especies prooxidantes y el sistema antioxidante endógeno. Esto ocasiona la oxidación de biomoléculas, daño tisular, muerte celular y procesos degenerativos; incluyendo enfermedades cardiovasculares, arteriosclerosis, trastornos neurales, cáncer, envejecimiento, irritación e inflamación de la piel. Asimismo, pueden cambiar las estructuras de proteínas, lípidos, carbohidratos y ADN; siendo este último el cambio más importante ya que origina muerte celular programada (apoptosis). Los radicales libres pueden ser desactivados y eliminados por compuestos antioxidantes, al ser capaces de donar un átomo de hidrogeno o por quelación de metales. (Alexandru, Gaspar, Savin, Toma, Tatia, & Gille, 2015; Bursal & Gülçin, 2011; Gaviria, Correa, Mosquera, Niño, & Correa, 2015).

2.4. ANTIOXIDANTES

Los antioxidantes son sustancias que previenen o ralentizan la autooxidación de los sistemas biológicos y de los alimentos. Al ceder un electrón al radical libre, se oxida transformándose en un radical libre débil con un escaso o nulo efecto tóxico. (Xu, Zhou, Zheng, Li, Li, & Li, 2015). Pueden ser exógenos (incorporados al organismo por el consumo de alimentos antioxidantes) y endógenos (sintetizados por las células). (Rubio, 2014).

Las plantas son la principal fuente de vitamina E (α -tocoferol), vitamina C (ascorbato) y compuestos fenólicos, que comprenden los compuestos más eficaces para eliminar radicales libres en organismos vivos. (Bursal & Gülçin, 2011). La ingesta de antioxidantes naturales (polifenoles, flavonoides, carotenoides y ácido ascórbico) a través de una dieta rica en frutas y verduras está asociada con la prevención de enfermedades

cardiovasculares y diferentes tipos de cáncer; debido a su capacidad para capturar radicales libres. (Fadda, Serra, Molinu, Azara, Barberis, & Sanna, 2014).

Los antioxidantes naturales de hierbas y especias han cobrado importancia en el campo de la investigación al preservar la calidad de los alimentos. Se emplean como aditivos seguros y saludables en comparación con los sintéticos. (Xu, Zhou, Zheng, Li, Li, & Li, 2015).

2.4.1. COMPUESTOS FENÓLICOS Y SU CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

Los compuestos fenólicos o polifenoles son fitoquímicos naturales en alimentos a base de plantas, tales como frutas, verduras, cereales, legumbres, té, café, vino y cacao. Son considerados metabolitos secundarios que brindan defensa a la planta contra la radiación ultravioleta, agentes oxidantes y patógenos. Se encuentran ubicuos en el reino vegetal y en bebidas como el vino o el té. Se han identificado más de 8000 compuestos fenólicos. (Bahadoran, Mirmiran, & Azizi, 2013; Kuppusamy, Thavamani, Megharaj, Nirola, Lee, & Naidu, 2015). En la Figura 4 se aprecia los diversos grupos de moléculas dentro de la familia de los polifenoles.

Numerosos estudios han manifestado que la capacidad antioxidante de los polifenoles se debe a sus propiedades redox que les permite actuar como agentes reductores, donantes de hidrogeno, neutralizadores de oxígeno singulete y quelantes de metales protegiendo al organismo de los efectos dañinos de los radicales libres y de especies reactivas al oxígeno (ERO). (Popa, Lungu, Savoiu, Bradu, Dinoiu, & Florin , 2012).

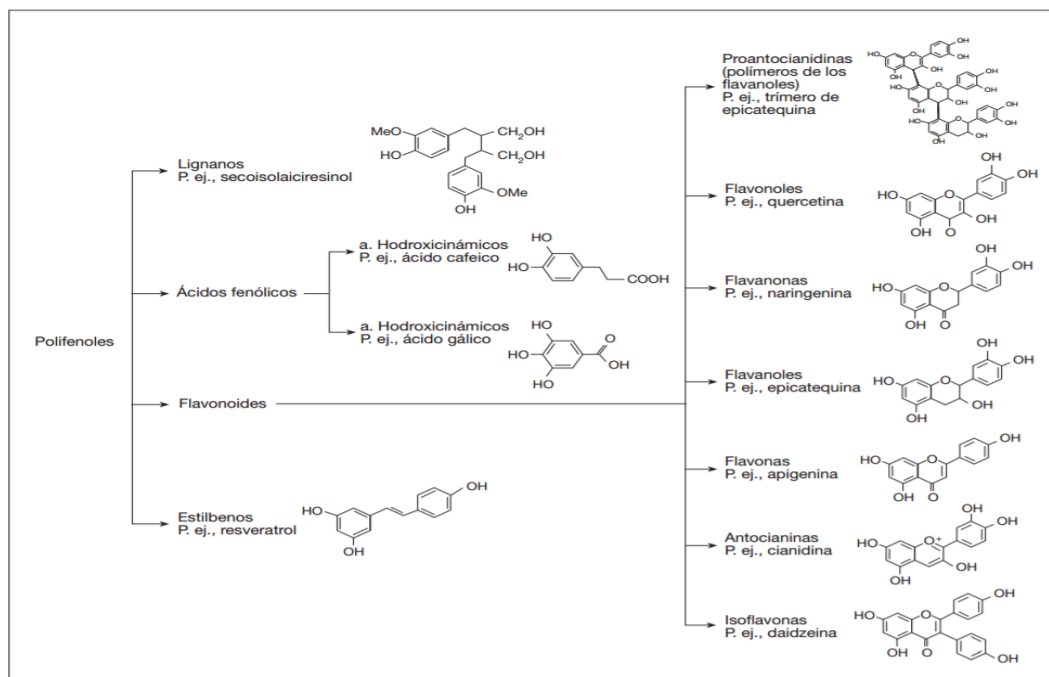


Figura 4. Clasificación de polifenoles y flavonoides, con su estructura química.
(Pascual, Valls, & Solà, 2009)

Las propiedades biológicas de los polifenoles, además de poseer actividad antioxidante incluyen: anticancerígena, antimutagénica, antibacteriana, antiviral y antiinflamatoria en mayor o menor medida dependiendo del compuesto. Por lo que, han sido suministrados para reducir el riesgo de contraer cáncer, enfermedades cerebrovasculares, neurodegenerativas (Alzheimer), cardiopatías (inhibiendo la oxidación de proteínas de baja densidad) y artritis reumatoide. (Cai, Sun, Xing, Luo , & Corke, 2006; Ferrazzano, Amato, Ingenito, Zarrelli, Pinto, & Pollio, 2011).

En el té verde, las hojas recién cosechadas se someten a procesos de vapor a altas temperaturas y secado con el fin de desactivar las polifenoloxidasas para prevenir la oxidación de catequinas, mantener las formas monoméricas de los polifenoles y evitar la degradación enzimática de las vitaminas. No obstante, los tratamientos térmicos prolongados disminuyen la actividad antioxidante debido a la oxidación, degradación térmica, epimerización y polimerización. (Senanayake, 2013).

La biodisponibilidad de los polifenoles depende de los procesos de preparación de los alimentos, de la digestión gastrointestinal, la absorción y el metabolismo. En un principio, los polifenoles son hidrolizados por la microflora o enzimas intestinales para luego ser conjugados en las células intestinales y posteriormente en el hígado por sulfatación o metilación. Finalmente, se acumulan en el tejido diana induciendo propiedades biológicas. (Bahadoran, Mirmiran, & Azizi, 2013).

2.4.1.1. Flavonoides

Los flavonoides representan el grupo más grande de fenoles (más de 4000 especies) y están presentes en las plantas, especialmente en hojas, tejidos florecientes y partes leñosas (tallos y cortezas). Son importantes para el desarrollo normal de la planta y como defensa contra infecciones y lesiones. (Kuppusamy, Thavamani, Megharaj, Nirola, Lee, & Naidu, 2015).

Los flavonoides presentan en su estructura química, C6-C3-C6, tres anillos (dos anillos de benceno unidos a través de un anillo pirona) y un grupo hidroxilo (-OH). La presencia y posición de los grupos hidroxilo en este tipo de compuestos confieren a la molécula una excelente capacidad antioxidante. También son capaces de quelar cationes de Fe^{3+} , Fe^{2+} y Cu^{2+} . Asimismo, la adsorción de estas sustancias sucede en el intestino. (Reis, 2013; Yeh, Hsia, Lee, & Wu, 2016).

Entre las propiedades de este tipo de polifenoles además de su potencial antioxidante se destacan efectos antivirales y antimutagenicos, reducción del riesgo de enfermedades cardiovasculares, acción antiproliferativa de células tumorales, protección contra la aterosclerosis, acción radioprotectora y propiedades antimicrobianas. (Bursal & Gülçin, 2011; Pereira, Vianello, Corrêa, Arnoux, & Galhardo, 2014).

2.5. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

La capacidad antioxidante se define como la capacidad de un compuesto para retrasar, inhibir o prevenir la oxidación mediante la eliminación de radicales libres y la reducción del estrés oxidativo. (Bhanwase & Alagawadi, 2016).

La actividad antioxidante depende del número y de las posiciones de los grupos hidroxilo, la glicosilación y otras sustituciones. (Cai, Sun, Xing, Luo , & Corke, 2006). Por otro lado, el tipo de fluido, tejido o célula a estudiar influyen directamente sobre la capacidad antioxidante total pues cada ambiente presenta diversos sistemas antioxidantes. (Rubio, 2014).

Además de los compuestos fenólicos, la capacidad antioxidante también es aportada por compuestos como el ácido ascórbico, tocoferoles, carotenoides, carbohidratos reducidos y terpenos, así como los efectos sinérgicos entre antioxidantes. (Wong, Sia, Khoo, Ang, Chang, & Yim, 2014).

La capacidad antioxidante de un compuesto se exhibe mediante diferentes mecanismos como:(Popa, Lungu, Savoiu, Bradu, Dinoiu, & Florin , 2012).

- Captura de especies reactivas al oxígeno (ROS)
- Quelación de los iones de metales de transición
- Inhibición de la acción de enzimas hidrolíticas y oxidativas

2.5.1. MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

Se han desarrollado muchos métodos para la evaluación de la capacidad antioxidante de extractos de productos naturales. (Yang, Li, & Chuang, 2012). Por lo general, se emplea una especie generadora de radicales libres (iniciador) y una sustancia que capta al iniciador (monitora). La actividad antioxidante se mide mediante la inhibición del poder oxidante de la

molécula estándar determinada (iniciador) al agregar el extracto previamente preparado. Una vez oxidada la molécula monitora, se observa una pérdida de color de forma proporcional a la concentración. (Quimbiulco, 2014).

Los métodos más aplicados son ABTS y DPPH, ya que presentan una excelente estabilidad a determinadas condiciones. Por otro lado, entre los métodos que han sido usados en menor medida se encuentran: DMPD, DMPO y FRAP. El ABTS puede ser generado por reacción química (dióxido de manganeso, persulfato potasio, ABAP), enzimática (peroxidase, mioglobulina), o eletroquímica. Este método puede medir la actividad de compuestos de naturaleza hidrofílica y lipofílica. Exhibe máximos de absorbancia a 414, 654, 754 y 815 nm. El DPPH es un radical libre que se obtiene directamente sin la necesidad de una preparación previa. Es soluble en medios orgánicos y presenta un pico de absorbancia 515nm. Este método se basa en la reducción de la absorbancia medida a 515nm del radical DPPH*. (Kuskoski, Asuero, Troncoso, Mancini-Filho, & Fett, 2005).

3. METODOLOGÍA

3. METODOLOGÍA

3.1. MATERIA PRIMA

Se utilizaron hojas de guayusa (*Ilex guayusa Loes*) deshidratadas trituradas, las mismas que fueron producidas, tratadas y proporcionadas por la empresa RUNATARPUNA en Archidona en la provincia de Napo, Ecuador.

Las muestras se transportaron y analizaron en las instalaciones del laboratorio de Química Analítica de la Facultad de Ciencias de la Ingeniería e Industrias de la Universidad Tecnológica Equinoccial (UTE), en Quito.

3.2. CARACTERIZACIÓN FÍSICO QUÍMICA DE LA MATERIA PRIMA

Tabla 6. Análisis físico-químico y métodos realizados en la caracterización de hojas de guayusa deshidratadas trituradas.

PARÁMETRO	MÉTODO
Humedad (%)	AOAC 925.10
Cenizas totales (%)	AOAC 923.03
Cenizas solubles en agua (%)	INEN 1119
Alcalinidad de las cenizas solubles en agua (como KOH), %	INEN 637
Cenizas insolubles en ácido (HCl) (%)	INEN 1118
Cafeína (%)	HPLC

La caracterización físico química de las hojas de guayusa (*Ilex guayusa Loes*) deshidratadas trituradas fue realizada por el laboratorio de MULTIANALÍTYCA. En la Tabla 6 se especifica el método utilizado para cada parámetro analizado.

3.3. PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS

Se realizaron pruebas preliminares a diferentes concentraciones de alcohol potable para determinar el porcentaje de etanol de los extractos. En la Tabla 7 se presentan los tratamientos analizados de hojas de guayusa deshidratadas trituradas a temperatura ambiente (20 °C) y 50 °C.

Tabla 7. Tratamientos para la obtención de extractos de hojas de guayusa deshidratadas trituradas.

Tratamiento	Temperatura (°C)	Concentración Etanol (%)	Peso (g)
T1	20	0	24
T5			26
T2		40	24
T6			26
T3		50	24
T7			26
T4		60	24
T8			26
T9	50	0	24
T13			26
T10		40	24
T14			26
T11		50	24
T15			26
T12		60	24
T16			26

Se pesó la muestra de guayusa en una balanza analítica y se colocó en un frasco ámbar de 500 ml. Después, se añadió 250 ml de la solución extractora (etanol 40, 50, 60 % v/v). Se introdujo un buzo magnético y se llevó a agitación durante 10 minutos para hidratar las hojas.

Luego, se tomó una alícuota de 15 ml aproximadamente y se colocó en tubos falcón de 25 ml previamente recubiertos con papel aluminio. Se centrifugó a 4000 rpm por 15 minutos a 4 °C y se filtró la solución utilizando papel filtro. Posteriormente, la solución filtrada se depositó en frascos ámbar pequeños (15 ml) y se almacenó en refrigeración para su posterior análisis. Seguidamente, el extracto (solución en frasco ámbar de 500 ml) se sometió a baño maría junto con agitación magnética y se aplicó el procedimiento antes descrito para los tiempos 30, 60, 120, 180 y 240 minutos. Todo este proceso se puede observar en el Anexo 1.

3.4. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

La capacidad antioxidante de los extractos etanólicos se determinó por espectrofotometría basada en la decoloración del radical ABTS^{•+} según la metodología desarrollada por Re, Pellegrini, Proteggente, Pannala , Yang, & Rice-Evans (1999) y descrita por Kuskoski, Asuero, Troncoso, Mancini-Filho, & Fett (2005) con algunas modificaciones.

El radical ABTS^{•+} se obtuvo tras la reacción de ABTS (7mM) con peroxo sulfato de potasio (2.45 mM). Se diluyó el reactivo con etanol grado HPLC y se agitó hasta que la lectura de la absorbancia se encuentre entre 0.680 y 0.720 a 734 nm (longitud de onda de máxima absorbancia). Se utilizó el espectrofotómetro marca ThermoSpectronic GENESYS 20.

Para determinar la capacidad antioxidante, se diluyó y se homogenizó en un vortex los extractos obtenidos alcanzando un volumen final de 1 ml (100 µl de extracto y 900 µl de agua destilada). Posteriormente, se tomó 1ml del reactivo diluido y 10 µl del extracto, también diluido. Se dejó en reposo durante 6 minutos en oscuridad y se anotó la absorbancia a 734 nm. Las medidas fueron realizadas por triplicado y los resultados se expresaron en TEAC (actividad antioxidante equivalente a Trolox).

3.5. CONTENIDO DE POLIFENOLES

Los extractos etanólicos preparados para el análisis de la capacidad antioxidante también fueron utilizados para la determinación de polifenoles. El contenido total de polifenoles se determinó usando una modificación en el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu. (Singleton, Orthofer, & Lamuela-Raventós, 1974).

Se diluyó los extractos (100 µl de extracto y se aforó en un balón aforado de 10 ml con agua destilada) y se tomó una alícuota de 500 µl que fue transferida a un tubo de ensayo. Después, se añadió 2.5 ml de la solución Folin (dilución 1/10 con agua destilada), se agitó y se dejó en reposo por 2 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se agregó 2 ml de la solución de carbonato de potasio (75 g/L), se agitó y se colocó en baño maría a 50 °C durante 15 minutos. Luego, el tubo es sometido a un baño de hielo. Finalmente, se leyó la absorbancia a 760 nm y los resultados fueron expresados en mg equivalentes de ácido gálico (EAC)/ml.

3.6. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE CAFEINA

Se determinó el contenido de cafeína de los tratamientos con una mayor capacidad antioxidante tanto a 20 °C como a 50 °C aplicando HPLC por el laboratorio de MULTIANALÍTYCA.

3.7. DISEÑO EXPERIMENTAL

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software STATGRAPHICS Centurion, versión 17.2.02 (64 bit). Los resultados obtenidos se informaron como valores medios (media ± desviación estándar) de mediciones triplicadas y se analizaron aplicando el diseño experimental completamente al azar (DCA) junto con el análisis de varianza (ANOVA). Las medias de los diferentes tratamientos se separaron mediante el test LSD

de Fisher (diferencia mínima significativa). El valor significativo se estableció como $P < 0.05$.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. CARACTERIZACIÓN FÍSICO QUÍMICA DE LAS HOJAS DE GUAYUSA DESHIDRATADAS TRITURADAS

La caracterización físico química de hojas de guayusa deshidratadas trituradas se expone en la Tabla 8 con los rangos establecidos en la Norma INEN 2381:2005 (Anexos 8 y 9).

Tabla 8. Resultados obtenidos del análisis físico-químico de las hojas de guayusa deshidratadas trituradas.

Parámetro	Método	Min	Max	Resultado
Humedad (%)	AOAC 925.10	--	12	5.67
Cenizas totales (%)	AOAC 923.03	4	8	9.15
Cenizas solubles en agua (%)	INEN 1119	45	--	97.34
Alcalinidad de las cenizas solubles en agua (como KOH), %	INEN 637	1	3	1.83
Cenizas insolubles en ácido (HCl) (%)	INEN 1118	--	1	0.64
Cafeína (%)	HPLC	1	--	2.38

Los resultados obtenidos de las hojas de guayusa deshidratadas trituradas se encuentran dentro de los rangos establecidos por la Norma INEN 2381:2005, exceptuando el porcentaje de cenizas totales.

La humedad influye directamente sobre la calidad de las hojas, pues un alto contenido de humedad promueve el crecimiento microbiano e incluso puede provocar el deterioro de compuestos de interés. Además, una disminución del porcentaje de humedad permite una concentración de los constituyentes químicos que desarrollan el aroma y sabor de las hojas. Se determinó que el porcentaje de humedad presente en las hojas de guayusa deshidratadas

trituradas es de 5.67 %. A diferencia de los valores obtenidos por Cobo (2016) de 6.59 %, Zuñiga (2015) de 10.45 %, y Tapia (2015) de 10.03 %; el contenido de humedad es relativamente bajo. Esto se debe al tratamiento de secado y a las condiciones de almacenamiento de las hojas.

El porcentaje de cenizas totales obtenido (9.15 %) que excede el límite máximo permitido (8 %) en la Norma INEN 2381:2005. No obstante, el Reglamento General para Control de Riesgos en Alimentos y Bebidas en la República Dominicana establece un valor máximo de cenizas totales del 9 % para *Ilex paraguariensis* (yerba mate). Debido a la similitud de *Ilex guayusa* L. con el mate, se comparó el límite máximo permitido de cenizas, obteniéndose un ligero incremento (9.15 %). Esto puede atribuirse a la aplicación de diferentes prácticas agrícolas en el cultivo de guayusa, así como a los procesos a los que fueron expuestas las hojas después de ser cosechadas.

El contenido de cenizas solubles en agua es de 97.34 % y de cenizas insolubles en ácido clorhídrico es de 0.64 %. Los valores obtenidos se encuentran en concordancia con Arias & Gualli (2013), que obtuvieron porcentajes de cenizas insolubles en ácido clorhídrico de 0.81 % y 0.67 % en té comercial y té elaborado de guayusa, respectivamente.

Por último, se determinó que las hojas de guayusa deshidratadas trituradas poseen 2.38 % de cafeína. Erowid (2005) indicó que el contenido de cafeína presente en *Ilex paraguariensis* varía de 0.5 a 2 %, por lo que la guayusa tiene más cafeína que la yerba mate. Mientras que, Perva, Škerget, Knez, Weinreich, Otto, & Grüner (2006) reportaron que el té (*Camellia sinensis*) contiene desde 1 a 5 % de cafeína. Vuong, Golding, Nguyen, & Roach (2013) expresaron que el contenido de cafeína en granos de café puede ser hasta un 2 %. En consecuencia, la guayusa es una planta rica en cafeína con propiedades estimulantes.

4.2. ANÁLISIS DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE HOJAS DE GUAYUSA DESHIDRATADAS TRITURADAS

4.2.1. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS DE GUAYUSA DESHIDRATADA TRITURADA A 20 °C

En la Figura 5 se puede observar la capacidad antioxidante de los extractos expresada como mmol Equiv Trolox/100 g de muestra, datos que se encuentran en el Anexo 2.

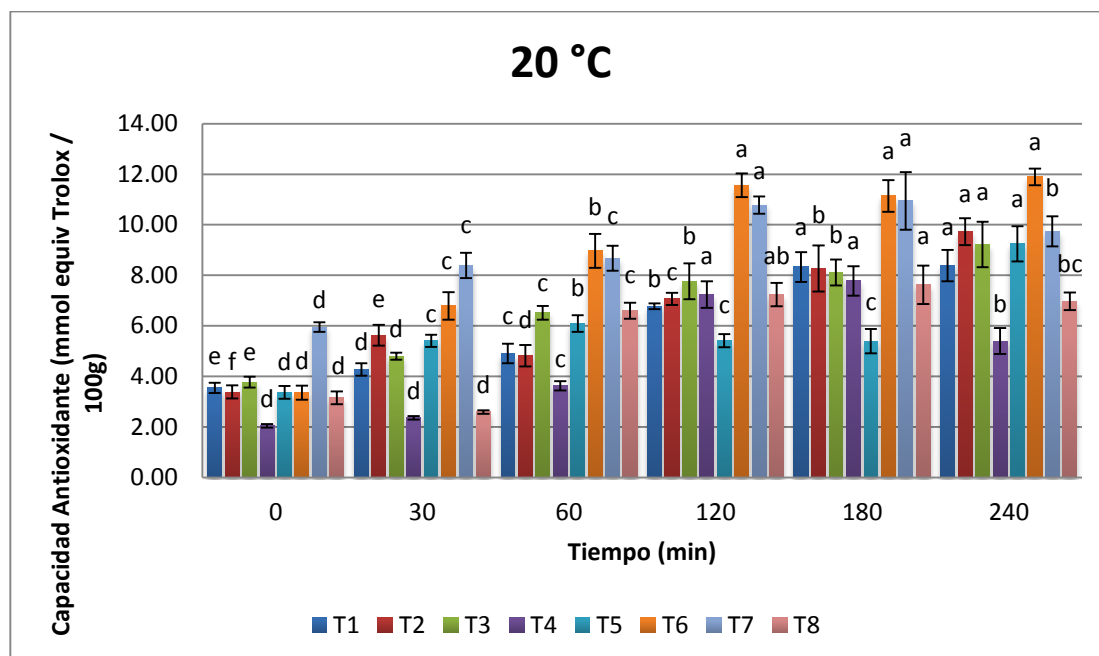


Figura 5. Resultados obtenidos de capacidad antioxidante de los extractos de hojas de guayusa deshidratadas trituradas a 20 °C en función del tiempo.

Los extractos que denotaron una mayor capacidad antioxidante a 20 °C fueron: T6 (40 % etanol, 26 g) y T7 (50 % etanol, 26 g) con valores máximos de 11.90 mmol Equiv Trolox/100 g al minuto 240 y 10.94 mmol Equiv Trolox/100 g al minuto 180, respectivamente.

La capacidad antioxidante del tratamiento T6 a partir del minuto 120 no presenta diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al minuto 180 y 240.

En el caso del tratamiento T7 la capacidad antioxidante en el tiempo cero es alta en comparación con el resto de tratamientos, por lo que se asume que existió una rápida difusión de antioxidantes de la matriz al solvente, alcanzando su máximo en el minuto 120, presentando una disminución de la capacidad antioxidante al minuto 240, esta disminución puede ser atribuida a largos tiempos de extracción que provocan la degradación, oxidación e hidrólisis de los compuestos antioxidantes. (Naczk & Shahidi, 2006). Lo que se traduce como una menor capacidad antioxidante del extracto. En consecuencia, si se considera el costo del tiempo de extracción, el mejor tiempo para alcanzar una mayor capacidad antioxidante sería en el minuto 120.

Los tratamientos T4 (60 % etanol, 24 g) y T8 (60 % etanol, 26 g), exhibieron una capacidad antioxidante menor a la de los extractos acuosos. Este comportamiento podría deberse a que altas concentraciones de etanol (>60 %) no permiten la extracción de los compuestos que tienen esta propiedad. Wong, Sia, Khoo, Ang, Chang, & Yim (2014) estudiaron la influencia de las condiciones de extracción sobre las propiedades antioxidantes de la cáscara de maracuyá (*Passiflora edulis*) y determinaron que un sistema de disolvente binario, particularmente la solución acuosa de alcohol, fue más eficaz que usar un disolvente puro; concluyendo que el 40 % de etanol es el mejor disolvente para la extracción de compuestos antioxidantes. Xu, Zhou, Zheng, Li, Li, & Li (2015) encontraron que la capacidad antioxidante de los extractos de flor de *Jatropha integerrima* aumentaron significativamente a medida que se aumentó la concentración de etanol de 10 % a 50 %, mientras que se observó una disminución de la capacidad antioxidante a concentraciones mayores de 50% hasta 90% de etanol. En consecuencia, los resultados obtenidos tienen concordancia con los estudios descritos anteriormente.

Por último, se estima que los tratamientos T5, T6, T7 y T8 mostraron mayor capacidad antioxidante que los extractos T1, T2, T3, y T4, respectivamente;

debido a que presentaban una mayor concentración de guayusa en sus formulaciones.

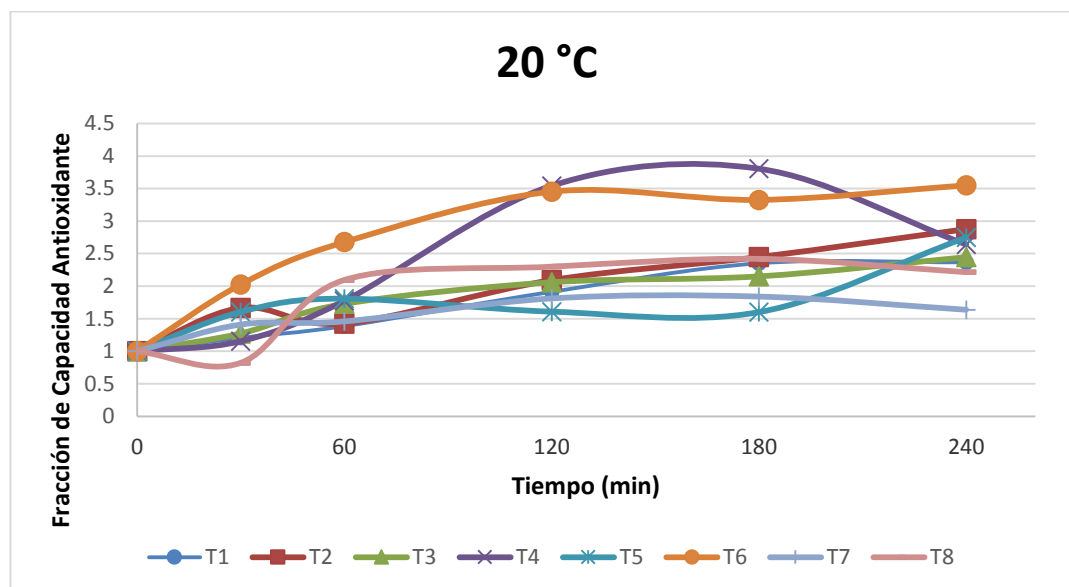


Figura 6. Fracciones de la capacidad antioxidante de los extractos etanólicos de hojas de guayusa deshidratadas trituradas a 20 °C en función del tiempo.

Las fracciones de antioxidantes de los extractos acuosos y etanólicos, a 20 °C, de las hojas de guayusa deshidratadas trituradas se pueden observar en la Figura 6. Los datos se encuentran en el Anexo 4. Se tomó como valor de referencia la capacidad antioxidante obtenida en el minuto cero. Se determinó que a medida que transcurre el tiempo, aumenta la capacidad antioxidante respecto a la obtenida inicialmente. Es así, que para el tratamiento T6, las fracciones variaron de 1 a 3.55, por lo que se obtuvo una mejor extracción en función del tiempo. Por otro lado, T4 presentó una buena extracción hasta el minuto 180 con una fracción de 3.80, aunque esta se vio afectada en el minuto 240 con una disminución hasta la fracción de 2.64. Los datos se encuentran en el Anexo 4. Teniendo en cuenta el contenido de antioxidantes de los tratamiento T6 (40 % etanol y 26 g), se evidenció que la mezcla etanol-agua maximiza la capacidad antioxidante. Esto se debe a que el etanol favorece la interacción de los radicales ABTS con los antioxidantes presentes en la muestra, mientras que el agua ayuda a inducir la hinchazón de las paredes celulares de la planta con el fin de

aumentar el contacto del área superficial con el disolvente mejorando la extracción de antioxidantes (Hemwimon, Pavasant, & Shotipruk, 2007). Similares resultados obtuvieron Lee, y otros (2013) en una investigación sobre la optimización de la extracción ultrasónica de los antioxidantes fenólicos del té verde informaron que a la menor concentración de etanol (19.7 %) se obtiene la máxima capacidad antioxidante; mientras que, al aumentar progresivamente la concentración de etanol hasta un 60 % la capacidad antioxidante disminuyó ligeramente.

4.2.2. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS DE GUAYUSA DESHIDRATADA TRITURADA A 50°C

En la Figura 7 se puede observar la capacidad antioxidante de los extractos etanólicos y acuosos de hojas de guayusa deshidratadas y trituradas, obtenidos a 50 °C. Los datos se encuentran en el Anexo 3.

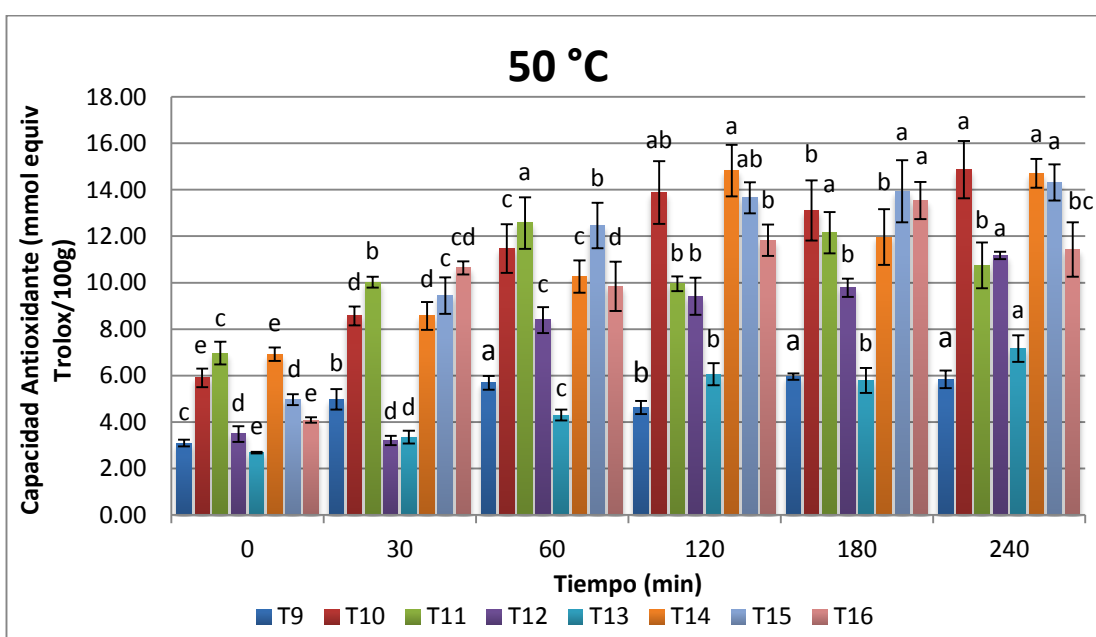


Figura 7. Resultados obtenidos de capacidad antioxidante de los extractos de hojas de guayusa deshidratadas trituradas a 50 °C en función del tiempo.

La mayoría de los extractos a partir de los tiempos 60 y 120 obtuvieron capacidades antioxidantes que no mostraron diferencia significativa ($p < 0.05$)

con los tiempos restantes. Este es el caso de T9 y T11 que alcanzaron la mayor capacidad antioxidante a los 60 minutos; mientras que, T10, T14 y T15 la alcanzaron a los 120 minutos. Por consiguiente, un aumento de la temperatura permite acortar los tiempos de extracción y por ende reducir costos.

No obstante, los extractos acuosos (T9 y T13) a 50°C reflejaron un comportamiento diferente al de los extractos etanólicos. Se identificó una disminución de la capacidad antioxidante, alcanzando valores de 5.84 y 7.16 mmol Equiv Trolox/100 g, respectivamente. Mientras que los valores finales obtenidos a 20 °C fueron de 8.38 y 9.75 mmol Equiv Trolox/100 g para los tratamientos T1 y T2, respectivamente. Esto puede deberse a la degradación de los compuestos antioxidantes termolábiles presentes en este tipo de extractos.

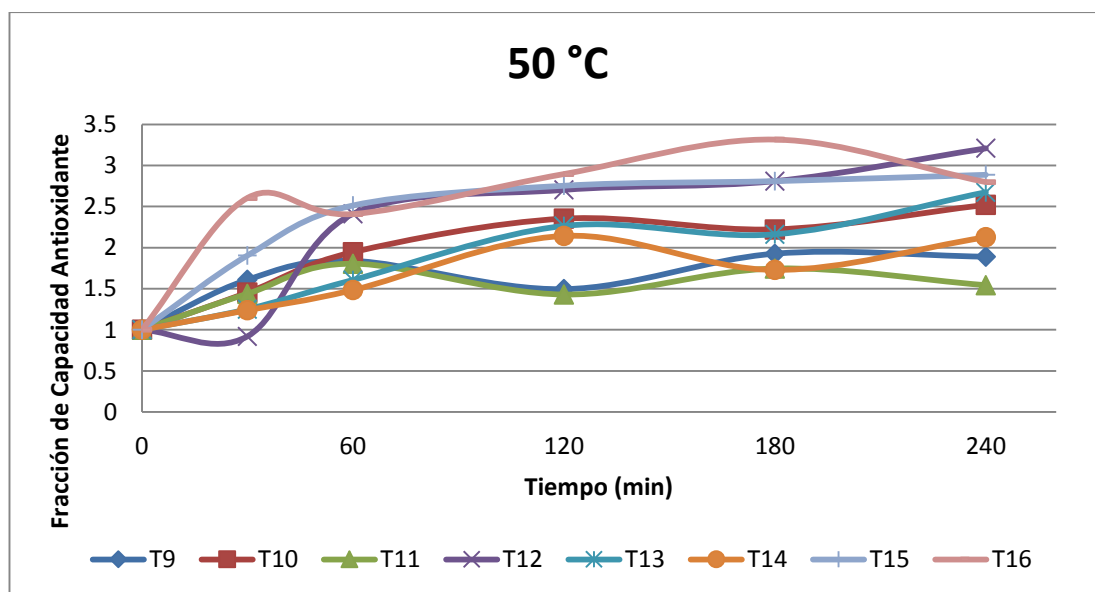


Figura 8. Fracciones de capacidad antioxidante de los extractos etanólicos de hojas de guayusa deshidratadas trituradas a 50 °C en función del tiempo.

En la Figura 8 (Anexo 4) se observa las fracciones de antioxidantes de los extractos acuosos y etanólicos, a 50 °C, de las hojas de guayusa deshidratadas trituradas. Los tratamientos T12, T15, T13, T10 y T4 poseen una tendencia creciente hasta el minuto 240. En este caso, T12 con la mayor

concentración de etanol (60 %) como disolvente, obtuvo la fracción más alta, ya que en el tiempo cero se tuvo un valor de capacidad antioxidante de 3.48 mmol Equiv Trolox/100 g y finalizó con un valor de 11.17 mmol Equiv Trolox/100 g al minuto 240, obteniendo una fracción final de 3.21. Por otro lado, T16 presentó una mejor extracción al minuto 30 y 180; por lo que podría reducir costos al disminuir el tiempo de extracción.

Se evaluó el efecto de la temperatura sobre la capacidad antioxidante de los extractos, dando como resultado datos mayores en aquellos tratamientos que fueron sometidos a 50 °C, mientras que los obtenidos a temperatura ambiente (20 °C) presentaron valores más bajos. Xu, Zhou, Zheng, Li, Li, & Li (2015) describieron resultados similares, al expresar que la capacidad antioxidante de la flor de *Jatropha integerrima* mejoraron cuando la temperatura se elevó de 30 a 40 °C, después disminuyeron al ir incrementando la temperatura hasta 80 °C. Esto se debe a que el uso de temperaturas demasiado altas puede producir la destrucción de compuestos antioxidantes.

4.3. ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE POLIFENOLES DE HOJAS DE GUAYUSA DESHIDRATADAS TRITURADAS

4.3.1. CONTENIDO DE POLIFENOLES DE LOS EXTRACTOS DE GUAYUSA DESHIDRATADA TRITURADA A 20°C

Los resultados del análisis del contenido de polifenoles se pueden observar a continuación en la Figura 9 (Anexo 5). Los extractos presentaron diferencia significativa ($p < 0.05$) para los diferentes tiempos, siendo mayor la cantidad de compuestos fenólicos al final de la extracción. Los extractos con un alto contenido de polifenoles a los 240 min fueron T2, T7, T6 y T3 con valores de 27.56, 27.53, 26.66 y 26.16 mg EAG/ml, respectivamente. Fadda, Serra, Molinu, Azara, Barberis, & Sanna (2014) reportaron contenidos totales de polifenoles de 3.1, 2 y 0.39 mg EAG/ml, en té verde (Java), granada y limón,

respectivamente. Por lo que las hojas de guayusa poseen una cantidad considerablemente alta en comparación con otras plantas.

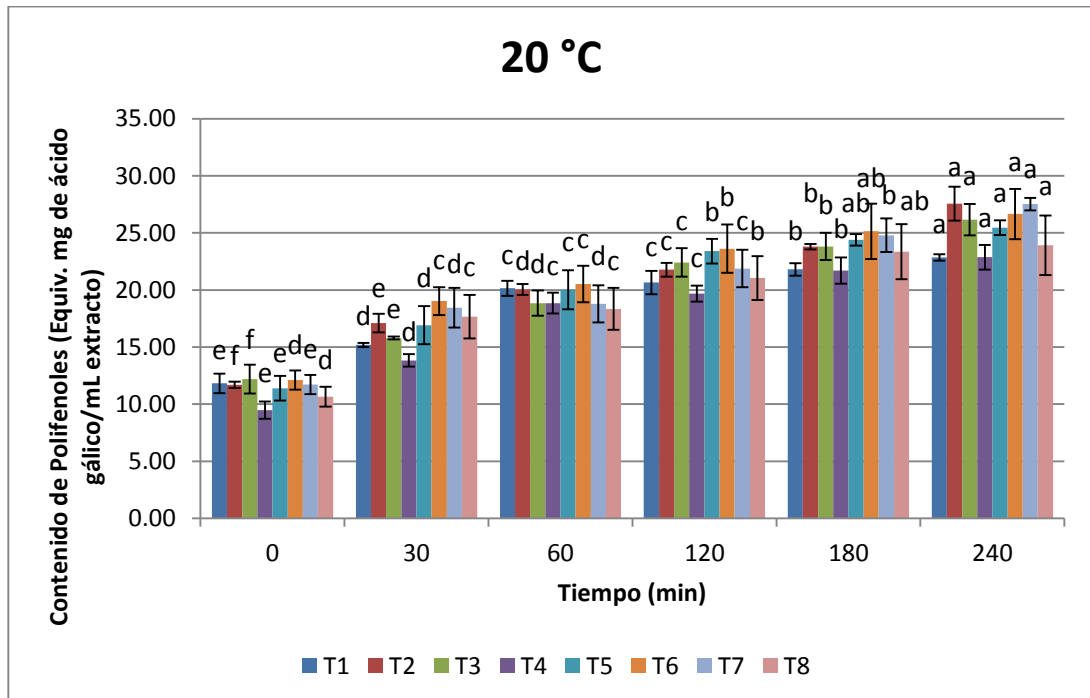


Figura 9. Resultados obtenidos del contenido de polifenoles de los extractos de hojas de guayusa deshidratadas trituradas a 20 °C en función del tiempo.

Además, los resultados mostraron que los extractos con 40 y 50 % de etanol presentaron el mayor contenido de polifenoles, seguidos por los acuosos; siendo los extractos con 60 % de etanol los que extrajeron menor cantidad de polifenoles. Resultados similares se describieron por Xiong, Rao, Xiong, Ai, & Wu (2012), en un estudio sobre los efectos del solvente de extracción sobre el contenido fenólico y la capacidad antioxidante de la semilla de *Osmanthus fragrans*, obteniendo el contenido total de polifenoles, de alto a bajo, en el siguiente orden: disolvente mixto > agua > solvente absoluto. También, en un estudio de Farvin & Jacobsen (2013) se encontró que el agua fue inferior en comparación con solventes orgánicos polares en la extracción de compuestos fenólicos. Todo esto puede estar relacionado al hecho de que los polifenoles son más solubles en disolventes polares (etanol-agua) que en disolventes menos polares (etanol absoluto).

En la Figura 10 se presentan las fracciones del contenido total de polifenoles de los extractos, se observa que el contenido de polifenoles se incrementa con el transcurso del tiempo de extracción. Este comportamiento sugiere que a mayores tiempos de extracción se obtenga mayor contenido de polifenoles. El uso de diferentes tiempos de extracción para este tipo de compuestos se debe a los diversos grados de polimerización, solubilidad e interacción con la muestra. (Wong, Sia, Khoo, Ang, Chang, & Yim, 2014). Por otro lado, el tratamiento T4 tuvo una fracción de 2.41 al final de la extracción, identificándose como la fracción más alta a 20 °C. Los datos se pueden observar en el Anexo 7.

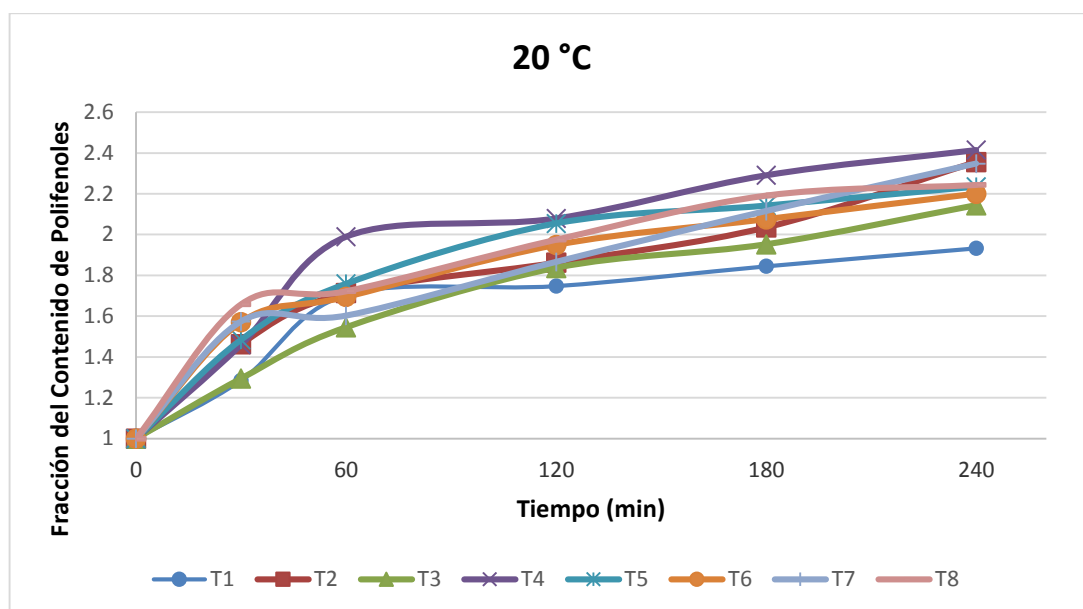


Figura 10. Fracciones del contenido de polifenoles de los extractos etanólicos de hojas de guayusa deshidratadas trituradas a 20 °C en función del tiempo.

4.3.2. CONTENIDO DE POLIFENOLES DE LOS EXTRACTOS DE GUAYUSA DESHIDRATADA TRITURADA A 50 °C

La Figura 11 representa el contenido de polifenoles presentes en extractos etanolicos y acuosos, a 50 °C, de hojas de guayusa deshidratadas trituradas (Anexo 6). Las cantidades del contenido total de polifenoles varía entre 14.84

mg EAG/ml para T13 en el minuto 0, a 42.91 mg EAG/ml para T11 al minuto 240.

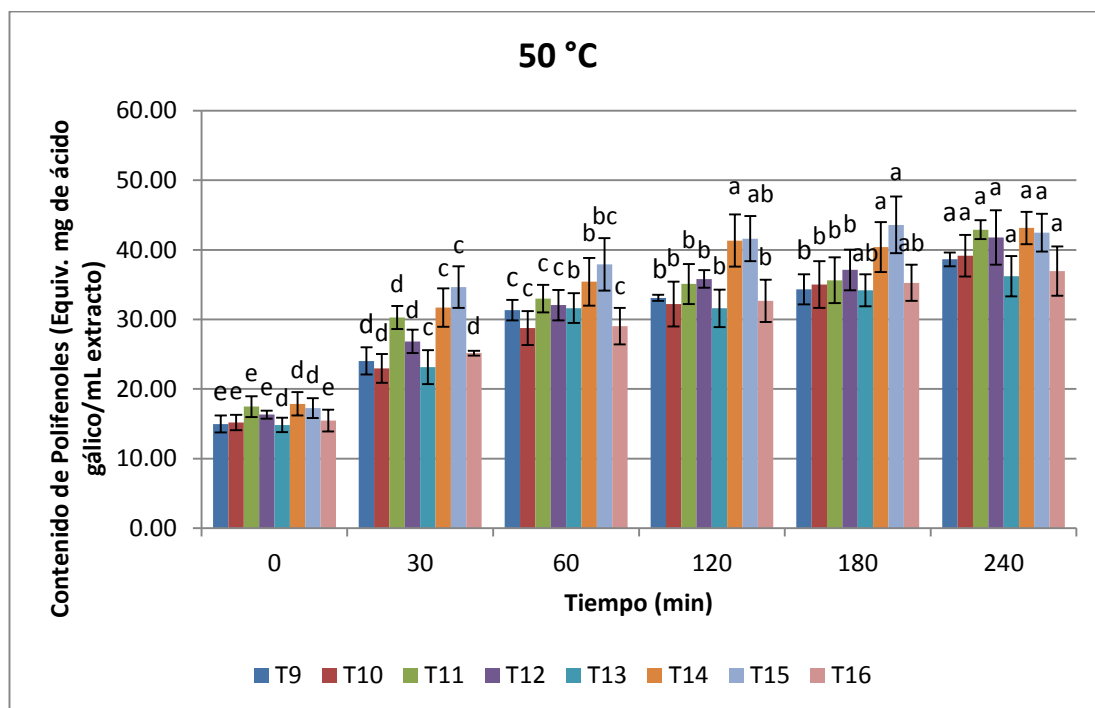


Figura 11. Resultados obtenidos del contenido de polifenoles de los extractos de hojas de guayusa deshidratadas trituradas a 50 °C en función del tiempo.

Las fracciones del contenido de polifenoles de los extractos etanólicos y acuosos de hojas de guayusa deshidratadas trituradas a 50 °C se muestran en la Figura 12 (Anexo 7). Se observa que al minuto 30 existe un incremento del contenido de polifenoles en los tratamientos. Asimismo, se notó que los polifenoles no se agotaron en la mayoría de los extractos, puesto que la tendencia de las líneas es ascendente conforme pasa el tiempo. No obstante, al apreciar este comportamiento se podría decir que los extractos no presentan saturación, por lo que el solvente sigue extrayendo compuestos fenólicos presentes en las hojas. Según Beltrán (2013), en su estudio sobre la aplicación de tecnología de membranas para la purificación de polifenoles del tomate de árbol, el contenido de polifenoles totales aumenta con el tiempo de extracción. Estos resultados se encuentran en concordancia con los obtenidos en el presente estudio.

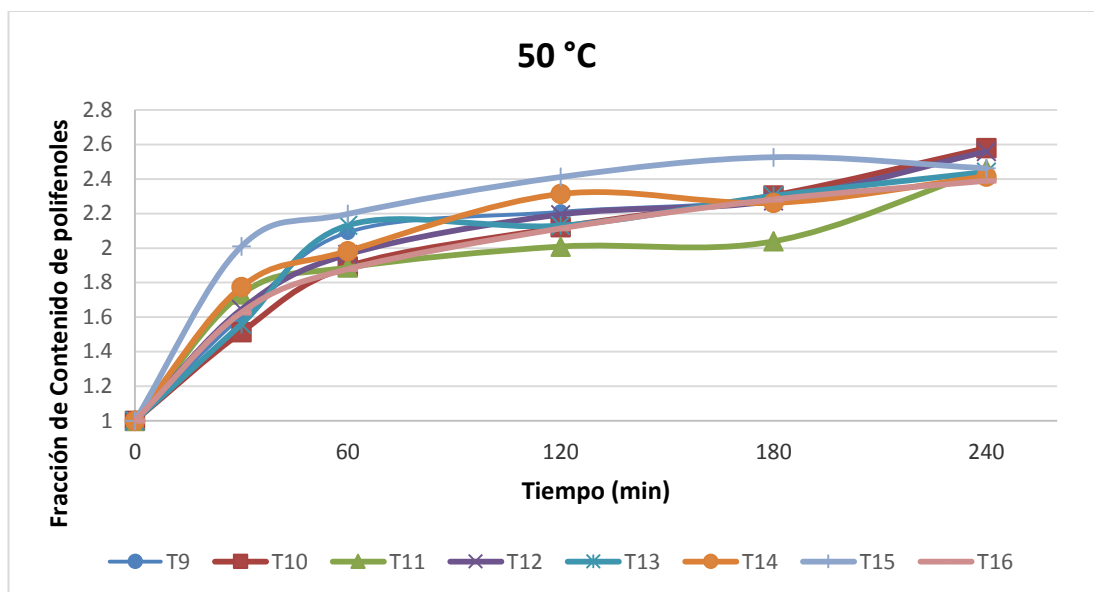


Figura 12. Fracciones del contenido de polifenoles de los extractos etanólicos de hojas de guayusa deshidratadas trituradas a 50 °C en función del tiempo.

Cabe recalcar que al igual que la capacidad antioxidante, el contenido total de polifenoles puede verse afectado por la oxidación, degradación e hidrólisis de los compuestos fenólicos debido al alargamiento en los tiempos de extracción. (Ang, Lam, Sia, Khoo, & Yim, 2012).

El contenido de polifenoles y la capacidad antioxidante de los extractos cambio con la temperatura, dando como resultado datos mayores en aquellos tratamientos que fueron sometidos a 50 °C, mientras que los obtenidos a temperatura ambiente (20 °C) presentaron valores más bajos. Resultados similares fueron obtenidos por Brahim, Gambier, & Brosse (2014), en donde, sometieron extractos de diferentes variedades de uva a temperaturas que variaron de 60 a 100 °C, observando un incremento del contenido de polifenoles. Sin embargo, a 120 °C se tuvo una disminución del contenido de polifenoles debido a la degradación de compuestos polifenólicos.

En la Figura 13 se presentan las fracciones de antioxidantes de los tratamientos con una mejor extracción a los 60 min, para 20 y 50 °C, T6 y

T15 respectivamente. Los tratamientos poseen una tendencia creciente durante toda la extracción. Sin embargo, los valores de las fracciones para T6 fueron mayores a las obtenidas para T15 a pesar de que la temperatura fue menor y la cantidad de guayusa fue la misma. Esta diferencia puede deberse a la concentración de etanol; T6 tiene el 40 % de etanol mientras que T15 el 50 %, por lo que puede concluirse que el contenido de etanol en la solución extractora tiene mayor influencia sobre la extracción de los compuestos que presenta capacidad antioxidante que la temperatura.

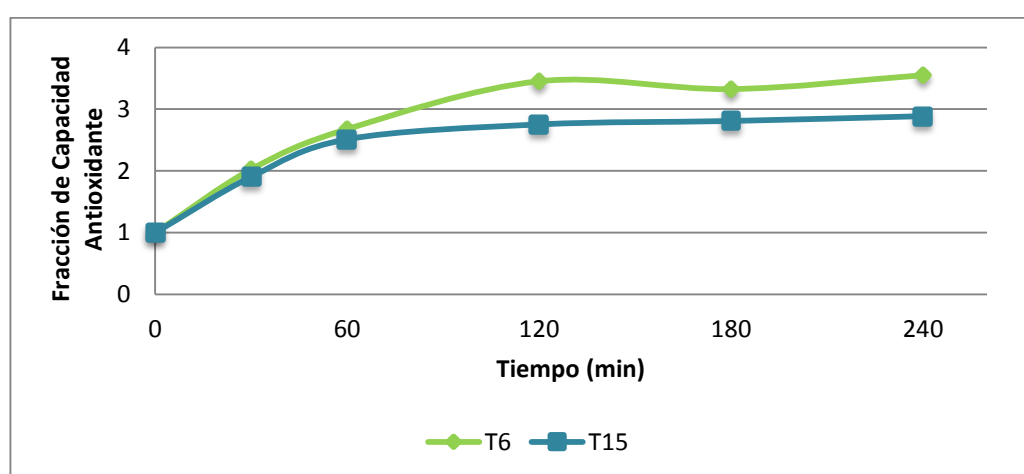


Figura 13. Fracciones de la capacidad antioxidante para el mejor extracto a 20 °C (T6) y a 50 °C (T15), en función del tiempo.

En la Figura 14 se presentan las fracciones del contenido de polifenoles de los tratamientos, con una mejor extracción a los 60 min, T6 y T15, para 20 y 50 °C, respectivamente. Al igual que la capacidad antioxidante, los tratamientos poseen una tendencia creciente durante toda la extracción. No obstante, T15 presenta fracciones relativamente más altas que T6, por lo que se logra una mejor extracción de los polifenoles a temperaturas más altas. Vergara, Pérez, Lluís, Agosin, & Pérez (2012) en un estudio sobre el efecto de la temperatura y el tiempo en el contenido de polifenoles y capacidad antioxidante de la extracción presurizada con agua caliente de tomillo (*Thymus vulgaris*), concluyeron que se obtuvo un incremento del contenido de polifenoles a 50 °C, mientras que los polifenoles se vieron afectados negativamente con una exposición prolongada de tiempo a

150 °C. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en la presente investigación.

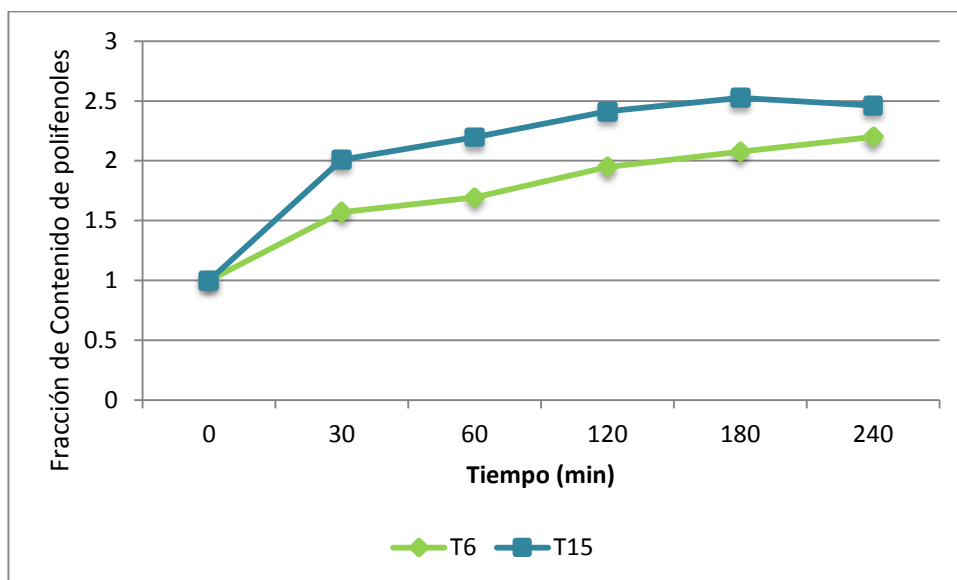


Figura 14. Fracción del contenido de polifenoles del mejor extracto a 20 °C (T6) y a 50 °C (T15), en función del tiempo.

4.4. DETERMINACIÓN DE CAFEÍNA DE LOS EXTRACTOS CON MAYOR CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

Los resultados del contenido de cafeína de los extractos con mayor capacidad antioxidante se pueden apreciar en los Anexos 10 y 11, y se encuentran expuestos en la Tabla 9. El porcentaje de cafeína fue de 0.25 % para T6 y 0.31 % para T14. Lewis, Kennelly, Bass, Wedner, Lewis, & Fast (1991) determinaron que al hervir durante 10 minutos y una hora las hojas de guayusa se 2.59 % y 3.33 % de cafeína; mientras que al someter a una infusión fría obtiene durante 24 h se tuvo un valor de 2.78 %. Además determinó que el porcentaje de cafeína de varias muestras de guayusa sometidas a temperaturas de cocción estuvo en un rango de 1.73 a 3.48 %. Estos datos son notoriamente más altos a los obtenidos en la presente investigación, posiblemente debido a que las condiciones de extracción fueron realizadas a menores temperaturas, y en tiempos más cortos.

Tabla 9. Contenido de cafeína, comparación del contenido de polifenoles y capacidad antioxidante del extracto a 20 °C (T6) y a 50 °C (T14) al minuto 120.

Parámetro	Resultados	
	20 °C	50 °C
	T6	T14
Polifenoles totales (mg EAG/g)	23.61	41.34
Capacidad antioxidante (mg Equiv Trolox/100 g)	11.57	14.82
Cafeína (mg/ 100 g)	246.30	312.57
Cafeína (%)	0.25	0.31

Vallejo (2016) informó porcentajes de cafeína que variaron de 0.18 a 0.24 %, siendo menores a los obtenidos. Esto puede deberse a que los extractos eran netamente acuosos mientras que los presentes extractos fueron realizados con 40 % de etanol.

A su vez, Choung & Lee (2011) expresaron en su estudio sobre las condiciones óptimas en la determinación de catequinas y cafeína en las hojas del té verde que, las hojas presentaron un contenido de cafeína de 23.36 mg/g después de 12 h de extracción a 25 °C en una mezcla de solventes (40 % etanol, 2 % ácido fosfórico en agua y etanol). En comparación con los datos obtenidos de cafeína de 2.46 y 3.12 mg/g en los extractos de hojas de guayusa, se distinguió que fueron menores a las reportadas en las hojas de té verde. Por lo que se puede deducir que la selección del método y las condiciones de extracción influyen directamente en la extracción de compuestos bioactivos. Al igual que los valores obtenidos en polifenoles y capacidad antioxidante, T14 presentó un mayor contenido de cafeína.

En base a los datos obtenidos anteriormente, los extractos con 40 y 50 % de etanol que contenían altos niveles de contenido fenólico total también fueron potentes eliminadores de radicales ABTS, lo que sugiere que los polifenoles de *Ilex guayusa* L. pueden ser importantes constituyentes responsables de la

capacidad antioxidante de los extractos obtenidos en el presente estudio. Diversos estudios llevados a cabo en los últimos años, han puesto de manifiesto el poder antioxidante de algunos compuestos fenólicos presentes en las plantas. (Gaviria, Correa, Mosquera, Niño, & Correa, 2015). Sin embargo, los extractos de agua mostraron capacidades antioxidantes bajas, sugiriendo que en este tipo de extractos pudieron haber estado presentes otro tipo de compuestos que inhibieron la capacidad antioxidante de los polifenoles.

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

Se determinó que los resultados obtenidos de la caracterización físico química de las hojas de guayusa deshidratadas trituradas cumplen con los rangos establecidos por la Norma INEN 2381:2005, a excepción del porcentaje de cenizas totales.

Los tratamientos sometidos a la temperatura de 50 °C durante el proceso de extracción hasta los 120 min exhibieron mayor capacidad antioxidante y mayor contenido de polifenoles en comparación con los obtenidos a temperatura ambiente (20 °C).

Los extractos con mayor fracción de extracción de capacidad antioxidante y contenido total de polifenoles, a los 60 min, fueron T6 y T15; por lo cual se demostró que la mezcla de solventes (etanol - agua) en diferentes proporciones provoca una mejor extracción de los compuestos antioxidantes.

Los extractos T6 y T14, a 20 y 50 °C, respectivamente; presentaron bajos contenidos de cafeína a pesar de ser los extractos que obtuvieron la mayor capacidad antioxidante.

5.2. RECOMENDACIONES

Se necesita una mayor investigación para identificar y cuantificar los compuestos fenólicos en extractos de hojas de guayusa, así como evaluar la contribución de cada compuesto a la actividad antioxidante total.

Se recomienda realizar estudios futuros sobre el efecto de adicionar extractos de guayusa como conservantes en varios productos alimenticios; puesto que, al ser una fuente natural de antioxidantes podrían reducir la oxidación lipídica aumentando la vida del producto.

Evaluar el uso de diferentes solventes y explorar la eficiencia de las diferentes técnicas de extracción del contenido de polifenoles y de la capacidad antioxidante sobre los extractos de *Ilex guayusa* L.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFÍA

- Alexandru, V., Gaspar, A., Savin, S., Toma, A., Tatia, R., & Gille, E. (2015). Phenolic content, antioxidant activity and effect on collagen synthesis of a traditional wound healing polyherbal formula. *Studia Universitatis "Vasile Goldiș"*.
- ALIMENTARYA. (2007). *Bebidas Energizantes las modas y los hechos*. Recuperado el 7 de Julio de 2015, de http://www.alimentosecuador.com/descargas/bt4bccbe70ee190_bebidas_energizantes.pdf
- Ang, Y., Lam, P., Sia, C., Khoo, H., & Yim, H. (2012). Comparison of antioxidant properties between red and yellow watermelon rinds by different extraction conditions. *Carpathian Journal of Food Science and Technology*.
- Aponte, M., Calderón, M., Delgado, A., Herrera, I., Jiménez, Y., Ramírez, Z., y otros. (2008). Fitoquímicos. *División de Nutrición en Salud Pública*.
- Arias, R., & Gualli, A. (2013). Estudio Comparativo del Té de la especie (*Ilex guayusa*) procedente de la Región Amazónica y el producto comercial de la empresa "Aromas del Tungurahua". *Escuela Superior Politécnica del Litoral*.
- Azmir, J., Zaidul, I., Rahman, M., Sharif, K., Mohamed, A., Sahena, F., y otros. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*.
- Bahadoran, Z., Mirmiran, P., & Azizi, F. (2013). Dietary polyphenols as potential nutraceuticals in management of diabetes: a review. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*.
- Balslev, H., Navarrete, H., De la Torre, L., & Macía, M. (2008). Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador. *Herbario QCA & Herbario AAU*.
- Beltrán, E. (2013). Aplicación de tecnología de membranas para la purificación de polifenoles del tomate de árbol (*Solanum betaceum cav*). *Escuela Politécnica Nacional*.

- Bhanwase, A., & Alagawadi, K. (2016). Antioxidant and Immunomodulatory Activity of Hydroalcoholic Extract and its Fractions of Leaves of *Ficus benghalensis* Linn. *Pharmacognosy Research*.
- Brahim, M., Gambier, F., & Brosse, N. (2014). Optimization of polyphenols extraction from grape residues in water medium. *Industrial Crops and Products*.
- Bucić, A., Planinić, M., Tomas, S., Jokić, S., Mujić, I., Bilić, M., y otros. (2011). Effect of Extraction Conditions on the Extractability of Phenolic Compounds from Lyophilised Fig Fruits (*Ficus Carica* L.). *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* .
- Bursal, E., & Gülçin, İ. (2011). Polyphenol contents and in vitro antioxidant activities of lyophilised aqueous extract of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). *Food Research International*.
- Cabrera, A. (2016). *SlideShare*. Recuperado el 20 de Diciembre de 2016, de Industria de la yerba mate: <http://www.slideshare.net/AlbaCabreraUrbieto/industria-de-la-yerba-mate>
- Cai, Y., Sun, M., Xing, J., Luo , Q., & Corke, H. (2006). Structure–radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sciences*.
- Caldas , A. (2012). Optimización, escalamiento y diseño de una planta piloto de extracción sólido líquido. *Universidad de Cuenca*.
- Caranqui, J., & Humanante, A. (2010). Estudio sobre la Taxonomía y Estado de Conservación de la Guayusa (*Ilex guayusa* Loess.) del Cantón Pastaza. *Herbario Escuela Superior Politécnica del Chimborazo*.
- Carocho, M., & Ferreira, I. (2013). The Role of Phenolic Compounds in the Fight against Cancer – A Review. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*.
- Chatterjee, S., Chatterjee, A., & Bandyopadhyay, S. (2016). Seasonal Variation of L-Theanine Content in Tea: A Study on Darjeeling Black Tea. *Engineering and Technology*.

- Choung, M., & Lee, M. (2011). Optimal Extraction Conditions for Simultaneous Determination of Catechins and Caffeine in Green Tea Leaves. *Food Sci. Biotechnol.*
- Cobo, C. (2016). Determinación de la actividad antioxidante, polifenoles, actividad antiinflamatoria y digestión gastrointestinal in vitro en proteínas de hoja de Ilex guayusa. *Universidad Técnica de Ambato.*
- Crespo, P. (2013). La guayusa. Trayectoria y sentido. *MFS.*
- De la Vega, P. (2013). Extractos vegetales en cosmética.
- Dueñas, J., Hines, E., Stimola, M., Montagnini, F., Humanate, A., & Melican, N. (2013). Runa guayusa – Desarrollo de un sistema de cultivo agroforestal de Ilex guayusa Loes. *Centro de Convenciones Eugenio Espejo.*
- Dueñas, J., Jarret, C., Cummis, I., & Hines, E. (2016). Amazonian Guayusa (Ilex guayusa Loes.): A Historical and Ethnobotanical Overview. *The New York Botanical Garden Press.*
- Erowid. (2005). *Caffeine Content of Yerba Mate a brief summary of the research.* Recuperado el 26 de Diciembre de 2016, de https://erowid.org/plants/yerba_mate/yerba_mate_chemistry2.shtml
- Estrada, S. (2010). Determinación de la actividad antibacteriana in vitro de los extractos de romero (Rosmarinus officinales) y tomillo (Thymus vulgaris). *Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.*
- Fadda, A., Serra, M., Molinu, M., Azara, E., Barberis, A., & Sanna, D. (2014). Reaction time and DPPH concentration influence antioxidant activity and kinetic parameters of bioactive molecules and plant extracts in the reaction with the DPPH radical. *Journal of Food Composition and Analysis.*
- Farvin, K., & Jacobsen, C. (2013). Phenolic compounds and antioxidant activities of selected species of seaweeds from Danish coast. *Food Chemistry.*
- Ferrazzano, G., Amato, I., Ingenito, A., Zarrelli, A., Pinto, G., & Pollio, A. (2011). Plant Polyphenols and Their Anti-Cariogenic Properties:A Review. *Molecules.*

- Gaviria, A., Correa, C., Mosquera, O., Niño, J., & Correa, Y. (2015). Evaluación de las actividades antioxidante y antitopoisomerasa de extractos de plantas de la ecorregión cafetera colombiana. *Revista Facultad de Ciencia Básicas*.
- Gil, G., Villa, J., Ayala, F., Heredia, J., Sepulveda, D., Yahia, E., y otros. (2013). Technologies for Extraction and Production of Bioactive Compounds to be Used as Nutraceuticals and Food Ingredients: An Overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*.
- Giovannini, P. (2015). Medicinal plants of the Achuar (Jivaro) of Amazonian Ecuador: Ethnobotanical survey and comparison with other Amazonian pharmacopoeias. *Journal of Ethnopharmacology*.
- Giuffrè, A., Sicari, V., Piscopo, A., & Louadj, L. (2012). *Grasas y Aceites*. Recuperado el 28 de Diciembre de 2016, de Antioxidant activity of olive oil mill wastewater obtained from different thermal treatments: <http://grasasyaceites.revistas.csic.es/index.php/grasasyaceites/article/view/1370/1367>
- Gualli, A., Arias, R., & Manzano, P. (2012). *Estudio Comparativo del Té de la especie (Ilex guayusa) procedente de la Región Amazónica y el producto comercial de la empresa "Aromas del Tungurahua"*. Recuperado el 21 de Mayo de 2015, de <https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/24391/1/Paper%20tesis%20adriana.%20segunda%20revisi%C3%B3n%20Dra%20Manzano.pdf>
- Hemwimon, S., Pavasant, P., & Shotipruk, A. (2007). Microwave-assisted extraction of antioxidative anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*. *Separation and Purification Technology*.
- Innerhofer, S., & Bernhardt, K. (2011). Ethnobotanic garden design in the Ecuadorian Amazon. *Biodivers Conserv*.
- Kähkönen, M., Hopia, A., Vuorela, H., Rauha, J., Pihlaja, K., Kujala, T., y otros. (1999). Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds. *J. Agric. Food Chem.*

- Kapp, R., Mendes, O., Roy, S., McQuate, R., & Kraska, R. (2016). General and Genetic Toxicology of Guayusa Concentrate (*Ilex guayusa*). *International Journal of Toxicology*.
- Karsten, R. (2000). *La vida y cultura de los shuar*. Quito: Abya-Yala.
- Klimczak, I., Gliszczyńska-Świgło, A., Małecka, M., & Szlachta, M. (2007). Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices. *Journal of Food Composition and Analysis*.
- Kuppusamy, S., Thavamani, P., Megharaj, M., Nirola, R., Lee, Y., & Naidu, R. (2015). Assessment of antioxidant activity, minerals, phenols and flavonoid contents of common plant/tree waste extracts. *Industrial Crops and Products*.
- Kuskoski, E., Asuero, A., Troncoso, A., Mancini-Filho, J., & Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas*.
- Lee, L., Lee, N., Kim, Y., Lee, C., Hong, S., Jeon, Y., y otros. (2013). Optimization of Ultrasonic Extraction of Phenolic Antioxidants from Green Tea Using Response Surface Methodology. *Molecules*.
- Lewis, W., Kennelly, E., Bass, G., Wedner, H., Lewis, M., & Fast, D. (1991). Ritualistic use of the holly *Ilex guayusa* by Amazonian Jivaro Indians. *Journal of Ethnopharmacology*.
- Maldonado, O., Jiménez, E., Guapillo, M., Ceballos, G., & Méndez, E. (2010). Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico-degenerativas. *Rev Med UV*.
- Mamert, S., & Hieronimi, H. (2010). Cultivo y uso de las plantas medicinales y aromáticas. *El huerto familiar*.
- Martínez, G., Ascacio, J., Sepúlveda, L., Rodríguez, R., Aguilera, A., & Aguilar, C. (2013). Extracción Asistida por Fermentación Fúngica de Antioxidantes Fenólicos. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*.
- Mejía, H. (2001). Reglamento general para control de riesgos en alimentos y bebidas en la República Dominicana.

- Mejia, H. (2001). Reglamento general para control de riesgos en alimentos y bebidas en la República Dominicana.
- Melo, V. (2014). Composición y Análisis Químico de la Especie Ilex guayusa Loes. Quito, Ecuador: Universidad San Francisco de Quito.
- Mercado, G., Carrillo, L., Wall, A., López, J., & Álvarez, E. (2013). *Compuestos polifenólicos y capacidad antioxidante de especias típicas*. Recuperado el 22 de Mayo de 2015, de http://www.researchgate.net/profile/Emilio_Alvarez-Parrilla/publication/243964726_POLYPHENOLIC_COMPOUNDS_AND_ANTIOXIDANT_CAPACITY_OF_TYPICALLY_CONSUMED_SPECIES_IN_MEXICO/links/53ed552e0cf2981ada16eff4.pdf
- Miano, A., Rojas, C., & Barraza, G. (2014). Influencia de la temperatura y tiempo de extracción en la fuerza de gel y rendimiento de gelatina obtenida a partir de piel de tollo (*Mustelus mento*). *Scientia Agropecuaria*.
- Nacz, M., & Shahidi, F. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*.
- Naveda, G. (2010). Establecimiento de un proceso de obtención de extracto de ruda (*Ruta graveolens*), con un alto contenido de polifenoles. *Escuela Politécnica Nacional*.
- Ortuño, M. (2006). *Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes*. España: Aiyana ediciones.
- Pascual, V., Valls, R., & Solà, R. (2009). Cacao y chocolate: ¿un placer cardiosaludable? *Unidad de Investigación en Lípidos y Arteriosclerosis*.
- Pasrija, D., & Anandharamakrishnan, C. (2015). Techniques for Extraction of Green Tea Polyphenols: A Review. *Food Bioprocess Technol*.
- Patiño, M. (1968). Guayusa, a Neglected Stimulant from the Eastern Andean Foothills. *The New York Botanical Garden Press*, 310-316.

- Pereira, G., Vianello, F., Corrêa, C., Arnoux, R., & Galhardo, M. (2014). Polyphenols in Fruits and Vegetables and Its Effect on Human Health. *Food and Nutrition Sciences*.
- Perva, A., Škerget, M., Knez, Ž., Weinreich, B., Otto, F., & Grüner, S. (2006). Extraction of active ingredients from green tea (*Camellia sinensis*): Extraction efficiency of major catechins and caffeine. *Food Chemistry*.
- Pinelo, M., Ruiz, A., Sineiro, J., Señoráns, F., Reglero, G., & Núñez, M. (2007). Supercritical fluid and solid–liquid extraction of phenolic antioxidants from grape pomace: a comparative study. *Eur Food Res Technol*.
- Popa, C., Lungu, L., Savoiu, M., Bradu, C., Dinoiu, V., & Florin, A. (2012). Total Antioxidant activity and phenols and flavonoids content of several plant extracts. *International Journal of Food Properties*.
- Prat, D., Hayler, J., & Wells, A. (2014). A survey of solvent selection guides. *The Royal Society of Chemistry*.
- Quimbiulco, Y. (2014). Efecto de la deshidratación sobre la capacidad antioxidante y contenido de polifenoles de la pulpa concentrada de tomate de árbol amarillo (*Solanum betaceum*). *Universidad Tecnológica Equinoccial*.
- Radice, M., & Vidari, G. (2007). Caracterización fitoquímica de la especie *Ilex guayusa* Loes. y elaboración de un prototipo de fitofármaco de interés comercial. *La Granja*, 3-11.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*.
- Rebolleda, S. (2010). Extracción de alquilresorcinoles de salvado de trigo con dióxido de carbono en condiciones supercríticas. *Universidad de Burgos*.
- Reis, M. (2013). Food Phenolic Compounds: Main Classes, Sources and Their Antioxidant Power. *Intech*.
- Routray, W., & Orsat, V. (2012). Microwave-Assisted Extraction of Flavonoids: A Review. *Food Bioprocess Technol*.

- Rubio, D. (2014). Efecto de la radiación UV-C sobre la flora nativa y la capacidad antioxidante de la mezcla para té compuesto por torongil (*Melissa officinalis*), ortiga (*Urtica dioica*), perejil (*Petroselinum sativum*) y paico (*Chenopodium ambrosioides*) de la zona andina. *Universidad Tecnológica Equinoccial*.
- Sarkar, S., Saha, S., Rai, C., & Bhattacharyya, S. (2014). Effect of storage and Preservatives on Antioxidant Status of some Refrigerated Fruit Juices. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*.
- Schultes, R. (1979). Discovery of an ancient guayusa plantation in Colombia. *Harvard University Herbaria*.
- Senanayake, N. (2013). Green tea extract: Chemistry, antioxidant properties and food applications – A review. *Journal Functional Foods*.
- Sevilla, C., & Mach, N. (2013). Efectos del té verde sobre el riesgo de cáncer de mama. *Spanish Journal of Human Nutrition and Dietetics*.
- Sharapin, N. (2000). *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos*. Bogotá: Convenio Andrés Bello.
- Sidali, K., Yépez, P., & Garrido, E. (2016). Recuperado el 20 de Noviembre de 2016, de Food Tourism in Indigenous Settings as a Strategy of Sustainable Development: The Case of *Ilex guayusa* Loes. in the Ecuadorian Amazon: <http://www.mdpi.com/2071-1050/8/10/967/htm>
- Silva, N., Ruiz, S., Cira, L., Estrada, M., Ornelas, J., López, M., y otros. (2015). Total Phenolic, Flavonoid, Tomatine, and Tomatidine Contents and Antioxidant and Antimicrobial Activities of Extracts of Tomato Plant. *International Journal of Analytical Chemistry*.
- Singleton, V., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. (1974). Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods in Enzymology*.
- Sultana, B., Anwar, F., & Ashraf, M. (2009). Effect of Extraction Solvent/Technique on the Antioxidant Activity of Selected Medicinal Plant Extracts. *Molecules*.

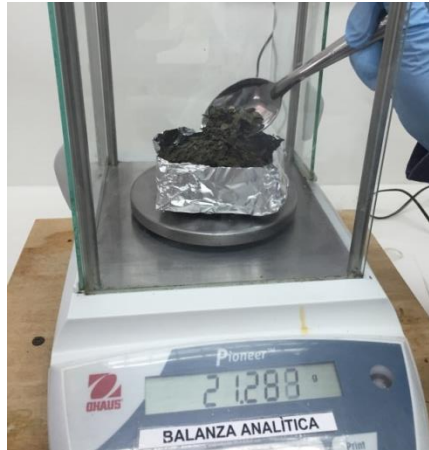
- Tapia, C. (2015). Aprovechamiento de residuos agroindustriales, cascarilla de cacao (*Theobroma cacao* L.) variedad arriba y CCN51 para la elaboración de una infusión. *Universidad Técnica de Ambato*.
- Torres, G. (2013). Fundación Chankuap. *El aprovechamiento de la guayusa (Ilex Guayusa)*.
- Tuquinga, M. (2013). Efecto estrogénico del extracto de las hojas de guayusa (*Ilex guayusa* Loes) en ratas (*Rattus norvegicus*). Riobamba, Ecuador.
- Vaillant, F. (2016). Procesos innovadores de obtención de alimentos funcionales y bioactivos a pequeña y mediana escala. *Instituto Nacional de Tecnología Industrial*.
- Valenzuela, A. (2004). *EL CONSUMO DE Y LA SALUD: CARACTERÍSTICAS Y PROPIEDADES BENEFICAS DE ESTA BEBIDA MILENARIA*. Recuperado el 22 de Mayo de 2015, de http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-75182004000200001
- Vallejo, S. (2016). Estudio de la capacidad antioxidante y contenido de polifenoles en la extracción acuosa de las hojas de guayusa (*Ilex guayusa* Loes) deshidratada. *Universidad Tecnológica Equinoccial*.
- Veggi, P., Martinez, J., & Meireles, M. (2013). Fundamentals of Microwave Extraction. *Science and Business Media New York*.
- Vergara, J., Pérez, J., Lluís, J., Agosin, E., & Pérez, J. (2012). Effects of Temperature and Time on Polyphenolic Content and Antioxidant Activity in the Pressurized Hot Water Extraction of Deodorized Thyme (*Thymus vulgaris*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.
- Vongsak, B., Sithisarn, P., Mangmool, S., Thongpraditchote, S., Wongkrajang, Y., & Gritsanapan, W. (2013). Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaf extract by the appropriate extraction method. *Industrial Crops and Products*.

- Vuong, Q., Golding, J., Nguyen, M., & Roach, P. (2013). Preparation of decaffeinated and high caffeine powders from green tea. *Powder Technology*.
- Vuong, Q., Golding, J., Stathopoulos, C., Nguyen, M., & Roach, P. (2011). Optimizing conditions for the extraction of catechins from green tea using hot water. *J. Sep. Sci.*
- Weissmann, E. (2014). *National Geographic*. Recuperado el 20 de Noviembre de 2016, de Ecuador's "Superleaf" Tea: Could It Replace Your Afternoon Coffee?: <http://news.nationalgeographic.com/news/2014/07/140703-guayusa-ecuador-amazon-health-foods-tea/>
- Wong, Y., Sia, C., Khoo, H., Ang, Y., Chang, S., & Yim, H. (2014). Influence of extraction conditions on antioxidant properties of passion fruit (*Pasiiflora edulis*) peel. *Scientiarum Polonorum*.
- Xiong, Y., Rao, L., Xiong, L., Ai, Q., & Wu, X. (2012). Effects of Extraction solvent on Polyphenolic contents and Antioxidant activities of *Osmanthus fragrans* seed. *International Conference on Biomedical Engineering and Biotechnology*.
- Xu, D., Zhou, Y., Zheng, J., Li, S., Li, A., & Li, H. (2015). Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Natural Antioxidants from the Flower of *Jatropha integerrima* by Response Surface Methodology. *Molecules*.
- Yang, C., Li, R., & Chuang, L. (2012). Antioxidant Activity of Various Parts of *Cinnamomum cassia* Extracted with Different Extraction Methods. *Molecules*.
- Yeasmen, N., & Islam, N. (2015). Ethanol as a solvent and hot extraction technique preserved the antioxidant properties of tamarind (*Tamarindus indica*) seed. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*.
- Yeh, W., Hsia, S., Lee, W., & Wu, C. (2016). Polyphenols with antiglycation activity and mechanisms of action: A review of recent findings. *Journal of Food and Drug Analysis*.

- Zukhurova, M., Prosvirnina, M., Daineko, A., Simanenkova, A., Petrishchev, N., Sonin, D., y otros. (2013). L-theanine Administration Results in Neuroprotection and Prevents Glutamate Receptor Agonist-Mediated Injury in the Rat Model of Cerebral Ischemia-Reperfusion. *Phytotherapy*.
- Zuñiga, W. (2015). Elaboración de té de guayusa (Ilex guayusa Loes) con la adición de ácido cítrico y edulcorante bajo en calorías. *Universidad Técnica de Ambato*.

ANEXOS

ANEXO 1.
IMÁGENES DEL PROCESO DE PREPARACIÓN DE
EXTRACTOS DE HOJAS DE GUAYUSA DESHIDRATADAS
TRITURADAS



Pesaje de la materia prima



Trasvasado del disolvente y materia prima en frascos ambar



Homogeneizado de los extractos en plancha de agitación



Extractos sometidos a baño maría



Extractos centrifugados y filtrados



Diluciones de los extractos para su posterior análisis

ANEXO 2.

TABLA DE RESULTADOS DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS DE HOJAS DE GUAYUSA DESHIDRATADAS TRITURADAS A 20 °C

Tiempo	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
0	3,54±0,20 ^e	3,38±0,26 ^f	3,77±0,21 ^e	2,04±0,07 ^d	3,36±0,25 ^d	3,35±0,28 ^d	5,95±0,19 ^d	3,15±0,25 ^d
30	4,27±0,25 ^d	5,62±0,41 ^e	4,80±0,14 ^d	2,36±0,07 ^d	5,40±0,24 ^c	6,79±0,54 ^c	8,39±0,50 ^c	2,59±0,07 ^d
60	4,91±0,39 ^c	4,82±0,43 ^d	6,51±0,27 ^c	3,62±0,18 ^c	6,09±0,33 ^b	8,97±0,67 ^b	8,67±0,49 ^c	6,60±0,32 ^c
120	6,77±0,12 ^b	7,07±0,24 ^c	7,77±0,71 ^b	7,24±0,53 ^a	5,41±0,26 ^c	11,57±0,47 ^a	10,78±0,34 ^a	7,24±0,46 ^{ab}
180	8,33±0,59 ^a	8,27±0,91 ^b	8,11±0,51 ^b	7,77±0,58 ^a	5,39±0,48 ^c	11,14±0,63 ^a	10,94±1,14 ^a	7,62±0,76 ^a
240	8,38±0,62 ^a	9,72±0,53 ^a	9,22±0,90 ^a	5,40±0,51 ^b	9,25±0,70 ^a	11,90±0,33 ^a	9,74±0,60 ^b	6,97±0,35 ^{bc}

Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas (p< 0.05)

Media ± desviación estándar (n=6)

ANEXO 3.

**RESULTADOS DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA
CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS DE HOJAS
DE GUAYUSA DESHIDRATADAS TRITURADAS A 50 °C**

Tiempo	T9	T10	T11	T12	T13	T14	T15	T16
0	3,09±0,15 ^c	5,90±0,40 ^e	6,96±0,49 ^c	3,48±0,34 ^d	2,67±0,03 ^e	6,92±0,29 ^e	4,96±0,24 ^d	4,08±0,12 ^e
30	4,97±0,44 ^b	8,57±0,41 ^d	10,02±0,23 ^b	3,20±0,20 ^d	3,34±0,28 ^d	8,57±0,60 ^d	9,44±0,79 ^c	10,64±0,28 ^{cd}
60	5,68±0,29 ^a	11,46±1,05 ^c	12,56±1,11 ^a	8,39±0,56 ^c	4,30±0,23 ^c	10,26±0,73 ^c	12,46±0,98 ^b	9,84±1,06 ^d
120	4,62±0,28 ^b	13,88±1,35 ^{ab}	9,95±0,32 ^b	9,41±0,80 ^b	6,06±0,48 ^b	14,82±1,11 ^a	13,66±0,67 ^{ab}	11,82±0,68 ^b
180	5,95±0,14 ^a	13,11±1,30 ^b	12,16±0,89 ^a	9,78±0,39 ^b	5,78±5,54 ^b	11,96±1,20 ^b	13,93±1,34 ^a	13,54±0,80 ^a
240	5,84±0,38 ^a	14,87±1,24 ^a	10,74±0,99 ^b	11,17±0,16 ^a	7,15±0,57 ^a	14,71±0,62 ^a	14,32±0,78 ^a	11,42±1,17 ^{bc}

Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas (p< 0.05)

Media ± desviación estándar (n=6)

ANEXO 4.

RESULTADOS DE LAS FRACCIONES DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS DE GUAYUSA DESHIDRATADAS TRITURADAS A 20 °C

Tiempo	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
0	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
30	1,21	1,66	1,27	1,15	1,60	2,03	1,41	0,82
60	1,39	1,43	1,73	1,77	1,81	2,68	1,46	2,10
120	1,91	2,09	2,06	3,54	1,61	3,45	1,81	2,30
180	2,35	2,45	2,15	3,80	1,60	3,33	1,84	2,42
240	2,37	2,88	2,45	2,64	2,75	3,55	1,64	2,21

RESULTADOS DE LAS FRACCIONES DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS DE GUAYUSA DESHIDRATADAS TRITURADAS A 50 °C

Tiempo	T9	T10	T11	T12	T13	T14	T15	T16
0	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
30	1,61	1,45	1,44	0,92	1,25	1,24	1,90	2,60
60	1,84	1,94	1,80	2,41	1,61	1,48	2,51	2,41
120	1,49	2,35	1,43	2,70	2,26	2,14	2,75	2,90
180	1,93	2,22	1,75	2,81	2,16	1,73	2,81	3,32
240	1,89	2,52	1,54	3,21	2,67	2,13	2,89	2,80

ANEXO 5.

RESULTADOS DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL CONTENIDO DE POLIFENOLES TOTALES DE LOS EXTRACTOS DE HOJAS DE GUAYUSA DESHIDRATADAS TRITURADAS A 20 °C

Tiempo	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
0	11,82±0,86 ^e	11,70±0,29 ^f	12,20±1,26 ^f	9,47±0,75 ^e	11,39±1,08 ^e	12,12±0,85 ^d	11,72±0,85 ^e	10,65±0,87 ^d
30	15,20±0,18 ^d	17,11±0,82 ^e	15,79±0,13 ^e	13,83±0,55 ^d	16,91±1,67 ^d	19,03±1,21 ^c	18,46±1,73 ^d	17,67±1,90 ^c
60	20,15±0,67 ^c	20,05±0,47 ^d	18,86±1,11 ^d	18,85±0,91 ^c	20,03±1,71 ^c	20,53±1,61 ^c	18,79±1,62 ^d	18,35±1,84 ^c
120	20,66±1,02 ^c	21,78±0,61 ^c	22,41±1,25 ^c	19,69±0,70 ^c	23,41±1,08 ^b	23,61±2,12 ^b	21,88±1,64 ^c	21,05±1,91 ^b
180	21,81±0,54 ^b	23,80±0,24 ^b	23,82±1,19 ^b	21,70±1,15 ^b	24,40±0,51 ^{ab}	25,14±2,43 ^{ab}	24,80±1,48 ^b	23,35±2,41 ^{ab}
240	22,85±0,28 ^a	27,56±1,48 ^a	26,16±1,38 ^a	22,87±1,08 ^a	25,46±0,64 ^a	26,66±2,20 ^a	27,53±0,55 ^a	23,91±2,61 ^a

Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

Media \pm desviación estándar (n=6)

ANEXO 6.

RESULTADOS DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL CONTENIDO DE POLIFENOLES TOTALES DE LOS EXTRACTOS DE HOJAS DE GUAYUSA DESHIDRATADAS TRITURADAS A 50 °C

Tiempo	T9	T10	T11	T12	T13	T14	T15	T16
0	14,98±1,24 ^e	15,18±1,12 ^e	17,47±1,49 ^e	16,32±0,57 ^e	14,84±1,05 ^d	17,87±1,68 ^d	17,25±1,42 ^d	15,46±1,55 ^e
30	24,04±1,95 ^d	22,97±2,07 ^d	30,27±1,65 ^d	26,85±1,66 ^d	23,14±2,43 ^c	31,71±2,74 ^c	34,67±2,99 ^c	25,16±0,36 ^d
60	31,33±0,45 ^c	28,75±2,45 ^c	32,98±1,99 ^c	32,05±2,19 ^c	31,63±2,14 ^b	35,43±3,43 ^b	37,92±3,76 ^{bc}	29,04±2,61 ^c
120	33,11±1,46 ^b	32,21±3,22 ^b	35,10±2,87 ^{bc}	35,82±1,25 ^b	31,61±2,69 ^b	41,34±3,75 ^a	41,62±3,23 ^{ab}	32,68±3,03 ^b
180	34,33±2,15 ^b	35,01±3,36 ^b	35,63±3,29 ^b	37,12±2,91 ^b	34,17±2,30 ^{ab}	40,41±3,60 ^a	43,60±4,09 ^a	35,27±2,62 ^{ab}
240	38,63±1,00 ^a	39,17±3,00 ^a	42,91±1,37 ^a	41,79±3,90 ^a	36,23±2,90 ^a	43,15±2,33 ^a	42,49±2,72 ^a	36,95±3,56 ^a

Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

Media \pm desviación estándar (n=6)

ANEXO 7.

RESULTADOS DE LAS FRACCIONES DEL CONTENIDO DE POLIFENOLES TOTALES DE LOS EXTRACTOS DE GUAYUSA DESHIDRATADAS TRITURADAS A 20 °C

Tiempo	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
0	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
30	1,29	1,46	1,29	1,46	1,48	1,57	1,57	1,66
60	1,70	1,71	1,55	1,99	1,76	1,69	1,60	1,72
120	1,75	1,86	1,84	2,08	2,05	1,95	1,87	1,98
180	1,84	2,03	1,95	2,29	2,14	2,08	2,12	2,19
240	1,93	2,36	2,14	2,41	2,23	2,20	2,35	2,24

RESULTADOS DE LAS FRACCIONES DEL CONTENIDO DE POLIFENOLES TOTALES DE LOS EXTRACTOS DE GUAYUSA DESHIDRATADAS TRITURADAS A 50 °C

Tiempo	T9	T10	T11	T12	T13	T14	T15	T16
0	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
30	1,61	1,51	1,73	1,64	1,56	1,77	2,01	1,63
60	2,09	1,89	1,89	1,96	2,13	1,98	2,20	1,88
120	2,21	2,12	2,01	2,19	2,13	2,31	2,41	2,11
180	2,29	2,31	2,04	2,27	2,30	2,26	2,53	2,28
240	2,58	2,58	2,46	2,56	2,44	2,42	2,46	2,39

ANEXO 8.

RESULTADOS DEL ANÁLISIS FÍSICO QUÍMICO DE LAS HOJAS DE GUAYUSA DESHIDRATADAS TRITURADAS



Laboratorio de Análisis y Aseguramiento de Calidad

INFORME DE RESULTADOS

INF.DIV-FQ.24690

Reemplaza al INF.DIV-FQ.24654
SA 29578a'


Cliente:	VALLEJO SILVA STEFANY BELEN	Lote:	---
Dirección:	SAN FERNANDO	Fecha Elaboración:	---
Muestreado por:	El Cliente	Fecha Vencimiento:	---
Muestra de:	ALIMENTO	Fecha Recepción:	15/06/2016
Descripción:	GUAYUSA TRITURADA	Hora Recepción:	12:03
		Fecha Análisis:	16/06/2016
		Fecha Entrega:	28/06/2016
		Código:	-----

Características Muestra	
Color:	Característico
Olor:	Característico
Estado:	Sólido
Contenido Declarado:	80g
Contenido Encontrado:	-----
Observaciones:	Los resultados reportados en el presente informe se refieren a las muestras entregadas por el cliente a nuestro laboratorio

RESULTADO FÍSICO-QUÍMICO

PARAMETROS	UNIDAD	RESULTADO	METODO INTERNO	METODO DE REFERENCIA
HUMEDAD	%	5.67	MFQ-04	AOAC 925.10
INSOLUBILIDAD DE CENIZAS EN HCL	%	0.64	MFQ-200	INEN 1118
CENIZA	%	9.15	MFQ-03	AOAC 923.03
ALCALINIDAD CENIZAS	%	1.83	MFQ-54	INEN 637
SOLU. CENIZA EN AGUA	%	97.34	MFQ-334	INEN 1119




 Dra. Pamela Jácome
 GERENTE TÉCNICO

ANEXO 9.
CONTENIDO DE CAFEINA DE LAS HOJAS DE GUAYUSA
DESHIDRATADAS TRITURADAS



Laboratorio de Análisis y Aseguramiento de Calidad

INFORME DE RESULTADOS

INF.DIV-IN.19849

Reemplaza al INF.DIV-IN.19823

SA 29579a'

Cliente:	VALLEJO SILVA STEFANY BELEN	Lote:	---
Dirección:	SAN FERNANDO	Fecha Elaboración:	---
Muestreado por:	El Cliente	Fecha Vencimiento:	---
Muestra de:	ALIMENTO	Fecha Recepción:	15/06/2016
Descripción:	GUAYUSA TRITURADA	Hora Recepción:	12:04
		Fecha Análisis:	16/06/2016
		Fecha Entrega:	28/06/2016
		Código:	----

Características Muestra

Color:	Característico
Olor:	Característico
Estado:	Sólido
Contenido Declarado:	80g
Contenido Encontrado:	-----
Observaciones:	Los resultados reportados en el presente informe se refieren a las muestras entregadas por el cliente a nuestro laboratorio

RESULTADO INSTRUMENTAL

PARÁMETROS	UNIDAD	RESULTADO	MÉTODO INTERNO	MÉTODO DE REFERENCIA
CAFEÍNA	%	2.38	MIN-17	HPLC




 Ing. Teresa Ramirez
 DIRECTORA DE CALIDAD



ANEXO 10.
CONTENIDO DE CAFEINA DEL EXTRACTO CON MAYOR
CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE HOJAS DE GUAYUSA
DESHIDRATADAS TRITURADAS A 20 °C



INFORME DE RESULTADOS

INF.DIV-IN.20678

SA 32395a

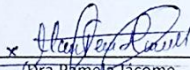
Cliente:	CASTRO CARRERA LUCIA DANIELA	Lote:	---
Dirección:	MAÑOSCA Y MANUEL OBREGOSO	Fecha Elaboración:	---
Muestreado por:	El Cliente	Fecha Vencimiento:	---
Muestra de:	EXTRACTO	Fecha Recepción:	07/12/2016
Descripción:	EXTRACTO E1	Hora Recepción:	14:26
		Fecha Análisis:	08/12/2016
		Fecha Entrega:	12/12/2016
		Código:	-----

Características Muestra	
Color:	Característico
Olor:	Característico
Estado:	Líquido
Contenido Declarado:	100ml
Contenido Encontrado:	-----
Observaciones:	Los resultados reportados en el presente informe se refieren a las muestras entregadas por el cliente a nuestro laboratorio

RESULTADO INSTRUMENTAL

PARÁMETROS	UNIDAD	RESULTADO	MÉTODO INTERNO	MÉTODO DE REFERENCIA
CAFEÍNA	mg/100g	246.30	MIN-17	HPLC-MERCK:Nota 890796/940572




 Dra. Pamela Jácome
 GERENTE TÉCNICO

ANEXO 11.
CONTENIDO DE CAFEINA DEL EXTRACTO CON MAYOR
CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE HOJAS DE GUAYUSA
DESHIDRATADAS TRITURADAS A 50 °C



Multianalityca Cía. Ltda
 Laboratorio de Análisis y Aseguramiento de Calidad

INFORME DE RESULTADOS

INF.DIV-IN.20679

SA 32395b

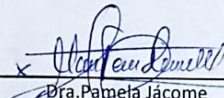
Cliente:	CASTRO CARRERA LUCIA DANIELA	Lote:	---
Dirección:	MAÑOSCA Y MANUEL OBREGOSO	Fecha Elaboración:	---
Muestreado por:	El Cliente	Fecha Vencimiento:	---
Muestra de:	EXTRACTO	Fecha Recepción:	07/12/2016
Descripción:	EXTRACTO E2	Hora Recepción:	14:26
		Fecha Análisis:	08/12/2016
		Fecha Entrega:	12/12/2016
		Código:	-----

Características Muestra	
Color:	Característico
Olor:	Característico
Estado:	Líquido
Contenido Declarado:	100ml
Contenido Encontrado:	-----
Observaciones:	Los resultados reportados en el presente informe se refieren a las muestras entregadas por el cliente a nuestro laboratorio

RESULTADO INSTRUMENTAL

PARÁMETROS	UNIDAD	RESULTADO	MÉTODO INTERNO	MÉTODO DE REFERENCIA
CAFEÍNA	mg/100g	312.57	MIN-17	HPLC-MERCK:Nota 890796/940572




 Dra. Pamela Jácome
 GERENTE TECNICO