

# UNIVERSIDAD ESTATAL AMAZÓNICA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA TIERRA

CARRERA INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL



Proyecto de Investigación previo a la obtención del Título de:

INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

**TEMA:**

**“Optimización del proceso de extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos en Guayusa (*Ilex guayusa* Loes) y determinación de actividad antioxidante y contenido de cafeína”**

**AUTORES:**

Gonzalo Antonio Chumbia Yankuam

Ayui Clever Kuamar Sandu

**DIRECTORES:**

Dr. Matteo Radice PhD

Dr. Luis Bravo PhD

Dr. Yasiel Arteaga PhD

PUYO-PASTAZA-ECUADOR

2018-2019



# DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, Gonzalo Antonio Chumbia Yankuam, con cédula de identidad 1400968606, y Ayui Clever Kuamar Sandu con cedula de identidad 1600493140, declaramos que las actividades realizadas para la realización y culminación del presente proyecto de investigación y desarrollo, que tiene como tema **“OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN GUAYUSA (ILEX GUAYUSA LOES) Y DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y CONTENIDO DE CAFEÍNA”**, se basaron en la búsqueda de información, ideas, análisis, conclusiones y recomendaciones, que me guiaron para estructurar mi trabajo y sea considerado para posibles investigaciones futuras, basándose en los resultados obtenidos; además que me responsabilizo en forma legal y académicamente como el autor del presente trabajo previo a la obtención del título como Ingeniero Agroindustrial.

Puyo, 31 de enero del 2019

---

Gonzalo Antonio Chumbia Yankuam  
CI. 1400968606

---

Ayui Clever Kuamar Sandu  
1600493140

## **CERTIFICADO DEL REPORTE DE LA HERRAMIENTA DE PREVENCIÓN DE COINCIDENCIA Y/O PLAGIO ACADÉMICO**

Certifico que el presente proyecto investigación y desarrollo sobre el tema **“OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN GUAYUSA (*ILEX GUAYUSA* LOES) Y DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y CONTENIDO DE CAFEÍNA”**, previo a la obtención del título de Ingeniero Agroindustrial ha sido desarrollado por el Sr. Gonzalo Antonio Chumbia Yankuam y Ayui Clever Kuamar Sandu bajo nuestra tutoría y dirección, cumpliendo con todos los requisitos y disponibilidades legales establecidos por la Universidad Estatal Amazónica “UEA”, por lo que autorizo su presentación.

---

Dr. Matteo Radice  
DIRECTOR DEL PROYECTO

---

Dr. Yasiel Arteaga Crespo  
DIRECTOR DEL PROYECTO

---

Dr. Luis Ramón Bravo Sánchez  
DIRECTOR DEL PROYECTO

# **CERTIFICADO DE APROBACIÓN POR TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN**

El Tribunal de sustentación del Proyecto de Investigación y Desarrollo aprueba el proyecto de investigación y desarrollo **“OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN GUAYUSA (*ILEX GUAYUSA* LOES) Y DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y CONTENIDO DE CAFEÍNA”**.

---

**PRESIDENTE DEL TRIBUNAL**

---

**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

---

**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

# **RESUMEN EJECUTIVO Y PALABRAS CLAVES**

## **RESUMEN**

Se investigó el efecto combinado de cuatro variables de extracción (temperatura, tiempo de extracción, relación etanol-agua, relación sólido-líquido) para predecir la combinación óptima que permitiera maximizar la extracción de compuestos fenólicos totales (CFT) de las hojas. La extracción asistida por ultrasonido fue seleccionada como método de extracción. Las condiciones óptimas propuestas, por el modelo de superficie de respuesta, fueron la temperatura de extracción 60 °C, tiempo 26,6 min y una relación etanol-H<sub>2</sub>O de 75,1-24,9. el extracto optimizado de hojas de *I. guayusa* mostró un contenido de CFT de 3.46 g eq. ácido gálico / 100g ms. El extracto optimizado de hojas de *I. guayusa* presentó una capacidad antioxidante considerable determinada por dos métodos analíticos, ABTS (0.08 mmol / 100 g) y FRAP (40.71 mmol / g). El extracto obtenido bajo las condiciones óptimas también mostró una cantidad de cafeína de  $2.35 \pm 0.03$  mg / g. Por lo tanto, debido a estos hallazgos, el extracto de hojas de *I. guayusa* merece más investigaciones para investigar su potencial como ingrediente funcional en la industria cosmética y de los alimentos funcionales.

## **PALABRAS CLAVES**

*I. guayusa*; Metodología de superficie de respuesta, extracción asistida por ultrasonido, Actividad antioxidante.

## **ABSTRACT AND KEYWORDS**

### **ABSTRACT**

The aim of this study was to investigate the combined synergic effect of four extraction variables (temperature, extraction time, ethanol-water relation, solid-liquid relation) and to predict the optimal combination in order to maximize the total phenolic compounds (TPC) extraction from leaves. Ultrasound-assisted extraction was selected as extraction method. The optimal conditions proposed by the response surface model were 60 °C, 26.6 min. and ethanol-H<sub>2</sub>O ratio 75.1-24.9. *I. guayusa* leaves extract showed a TPC content of 3.46 g eq. gallic acid / 100g ms. The optimized *I. guayusa* leaves extract presented a considerable antioxidant capacity determined by two analytical methods, ABTS (0.08 mmol/100g) and FRAP (40.71 mmol/g). The extract obtained under the optimal conditions showed also an amount of caffeine of  $2.35 \pm 0.03$  mg/g. Therefore, due to these findings, *I. guayusa* leaves extract deserves further searches in order to investigate its potential as a functional ingredient in the cosmetic and functional food industry.

### **KEYWORDS**

*Ilex guayusa*; response surface methodology, ultrasound-assisted extraction; antioxidant activity.

## Tabla de contenidos

CAPÍTULO I.....	1
1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 PROBLEMA DE LA INVESTIGACIÓN.....	4
1.2 OBJETIVO GENERAL.....	4
1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
CAPÍTULO II.....	5
2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN.....	5
2.2 LOS COMPUESTOS FENOLICOS EN <i>ILEX GUAYUSA</i> .....	6
2.3 MÉTODO DE EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLES, ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.....	7
2.4 ALCALOIDES PRESENTES EN <i>ILEX GUAYUSA</i> . CAFEÍNA.....	7
2.5 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE CAFEÍNA.....	8
2.6 Espectrometría.....	8
CAPÍTULO III.....	9
3. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.....	9
3.1 LOCALIZACIÓN.....	9
3.1.1 TIPOS DE INVESTIGACIÓN.....	9
3.1.2 MÉTODO DE INVESTIGACIÓN.....	9
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
3.2.1 EQUIPOS, MATERIALES, UTENSILIOS, REACTIVOS, INSTRUMENTOS.....	10
3.2.2 Muestras.....	10
3.2.3 Extracción.....	10
3.3 DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES (CFT)...	11
3.4 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.....	11
3.5 ENSAYO DE ELIMINACIÓN DE RADICALES LIBRES ABTS (ÁCIDO 2,2-AZINOBIS (3-ETILBENZOTIAZOLIN)-6 SULFÓNICO).....	12
3.6 PODER DE REDUCCIÓN ANTIOXIDANTE DE HIERRO (III), (FRAP) ...	12
3.7.1 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	13
3.7.2 VERIFICACIÓN DEL MODELO.....	14
3.7.3 CUANTIFICACIÓN DE LOS FENOLES TOTALES POR EL MÉTODO DE FOLIN CIOCALTEU.....	14
3.7.4 DETERMINACIÓN DE CAFEÍNA.....	15

CAPÍTULO IV .....	17
4.1 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	17
4.2 FACTORES QUE AFECTAN LA EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDO DE COMPUESTOS FENOLES TOTALES. ....	17
4.3 ANÁLISIS DE METODOLOGÍA DE SUPERFICIE RESPUESTA. ....	25
4.4 CONTENIDO DE FENOLES TOTALES, ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y CAFEÍNA DEL EXTRACTO BAJO LAS CONDICIONES ÓPTIMAS .....	29
CAPÍTULO V .....	32
5.1 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	32
5.2 CONCLUSIONES .....	32
5.3 RECOMENDACIONES .....	32
VI BIBLIOGRAFÍA .....	34



# CAPÍTULO I

## 1 INTRODUCCIÓN

Ecuador es un país sumamente rico en diversidad biológica y tiene el privilegio de pertenecer a los 17 países universalmente considerados como megadiversos (May & Radice, 2016). Según Costa *et al.*, (2016) *I. guayusa*, es una planta que se encuentra ampliamente en Colombia, Ecuador, y Perú, desde tiempos ancestrales. Hasta hoy la guayusa ha sido empleada por comunidades indígenas y urbanas como una infusión de hierbas, para el tratamiento de la diabetes, la infertilidad o las enfermedades venéreas. Se calcula que existen más de 500 especies en todo el continente americano.

En los registros herbarios de Loja en el Ecuador se menciona que la especie *I. guayusa* se encuentra ubicada en las provincias de Sucumbíos, Napo, Pastaza, Morona Santiago y Zamora Chinchipe, provincia que mayor producción de *I. guayusa* posee (Collahuazo, 2012).

Según Collahuazo, (2012), *I. guayusa* corresponde a la familia Aquifoliacea más conocida con el nombre de guayusa, una planta nativa de la región amazónica, de la cual en Ecuador existe la mayor cantidad de plantas, llegando alcanzar hasta los 10 metros de altura, con hojas simples, un diámetro de 50-80 cm y un follaje denso.

La guayusa crece en las colinas de los Andes según Collahuazo, (2012), se desarrollan a temperaturas de 28 a 26°C con precipitaciones anuales de 1.000 m a 3.000 mm. En las comunidades indígenas de la Amazonia ecuatoriana, *I. guayusa* es de vital importancia etnobotánica y comercial (Salvador et al. 2017), tiene un significado muy importante en la cultura tradicional, como la de purificación, de inducción, de pequeños sueños para adivinar el futuro y también se consume como bebida (Radice & Vidari, 2005).

El género *Ilex* es de mayor importancia económica ya que un buen número de especies son empleadas como plantas medicinales tradicionales de los indígenas. Hay especies que se destacan como fuente de cafeína y teobromina entre ellos están *Ilex vomitoria* Aiton (yaupon) *Ilex paraguayensis* A. St.-Hil. (Yerba mate) e *I. guayusa* Loes (Guayusa) como se menciona en (Radice & Vidari, 2005).

Según las investigaciones realizadas por Ruiz y Roque, un ensayo fitoquímico preliminar realizado sobre extractos: etanólico, metanólico e hidroalcohólicos de *I. guayusa* reveló la presencia de taninos, alcaloides, flavonoides, glucósidos, compuestos fenólicos y quinonas (Calderón, 2017).

Las hojas de *I. guayusa* contienen cafeína, teobromina y guadinina, compuestos fenólicos y flavonoides como componentes principales. Guayusa mostraría efectos benéficos debido a su poder antioxidante y anti inflamatorio (Pardau *et al.* 2017; Villacís *et al.* 2016).

Según Radice & Vidari (2005) en los estudios realizados de la obtención del extracto de *I. guayusa* corresponde a una especie con un fitocomplejo muy rico y se debe profundizar la investigación en sus grupos químicos que se encontraron donde se podría explicar mejor las propiedades conocidas en la medicina tradicional y que no se pueden atribuir solo a la cafeína.

Los compuestos fenólicos, generalmente, son procedentes de fuentes naturales; en los últimos años, por su efecto positivo en la salud humana, han sido sujetos de interés en muchas investigaciones por su actividad antioxidante. Por tal razón los polifenoles son utilizados en las industrias farmacéutica, cosmética y alimentaria. En la industria de cosméticos estos compuestos, generalmente, son utilizados en el tratamiento de la piel seca y la protección contra el envejecimiento, donde se encarga a equilibrar el pH de la piel, es hipoalergénica y no irritante (Guntero *et al.*, 2015).

La presencia de los polifenoles está relacionada con su actividad biológica y es relevante para la identificación de nuevos compuestos bioactivos (Calderón, 2017), a los cuales se les atribuyen diversos efectos biológicos beneficiosos; lo más relevante es la actividad antioxidante, que es importante para contrarrestar el estrés oxidativo (García-Ruiz *et al.*, 2017).

Debido a la importancia de los compuestos polifenólicos y de la cafeína en sus aplicaciones en la industria, la motivación del siguiente proyecto, es investigar la optimización de los procesos extractivos de la fracción polifenólica e investigar el contenido de cafeína y la actividad antioxidante del extracto más rico en polifenoles.

La guayusa es una especie muy importante para la economía del sector amazónico ecuatoriano, hoy en día el mercado presenta casi exclusivamente productos en forma de té e infusiones. La obtención de extractos concentrados

en polifenoles y cafeína es el primer paso para el desarrollo de integradores alimentares cosméticos y fitofármacos derivados de la guayusa.

En este contexto la **“Optimización del proceso de extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos en guayusa (*I. guayusa* loes) y determinación de actividad antioxidante y contenido de cafeína”** facilita aprovechar al máximo los compuestos fenólicos y cafeína de *I. guayusa*, mediante un proceso extractivo que dará exclusivamente un concentrado para un proceso agroindustrial.

## **1.1 PROBLEMA DE LA INVESTIGACIÓN**

Los productos elaborados a base de guayusa en forma de té e infusión no permiten su aprovechamiento racional y rentable, por lo que se requiere un estudio profundizado de los procesos extractivos, con la finalidad de identificar los parámetros y condiciones óptimas para obtener extractos enriquecidos en compuestos fenólicos y cafeína de forma tecnificada.

## **1.2 OBJETIVO GENERAL**

Optimizar condiciones de extracción asistida por ultrasonido de fenoles totales en hojas de *Ilex guayusa* mediante la metodología superficie respuesta.

## **1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar el efecto de las variables, temperatura, tiempo de extracción, relación etanol-agua y relación sólido-liquido en la extracción de compuestos fenólicos totales a partir de su cuantificación en los extractos de *I. guayusa*.
- Aplicar la metodología de superficie respuesta para la optimización de la extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos totales en hojas de *I. guayusa*.
- Evaluar la actividad antioxidante del extracto más rico en polifenoles por medio de los métodos FRAP y ABTS.
- Determinar el contenido de cafeína en el extracto más rico en polifenoles.

## CAPÍTULO II

# 2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN

### 2.1 *Ilex Guayusa* (Guayusa)

La especie *I. guayusa* normalmente conocida como “guayusa”, es una planta de la región amazónica que posee diferentes metabolitos secundarios, entre ellos taninos, alcaloides, flavonoides, glucósidos, aminoácidos y compuestos fenólicos (Radice, 2016). Entre los compuestos antioxidantes se destacan los polifenoles, cuya presencia ha sido mencionada por varios autores (García-Ruiz *et al.*, 2017, Villacís-Chiriboga *et al.*, 2017) De este tipo de plantas se han aislado diferentes tipos de compuestos como polifenoles, flavonoides, saponinas y glucósidos que poseen actividades antiinflamatorias, antimicrobianas, antiparasitarias y antioxidantes. Estas características convierten al género *Ilex* en una fuente botánica de compuestos activos con potencial uso farmacéutico, como menciona (Mosquera, 2015).

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Ilex guayusa* Loes (Guayusa)

Reino	<u>Plantae</u>
Clase	<u>Equisetopsida</u>
Subclase	<u>Magnoliidae</u>
Orden	<u>Afoliales sensu</u>
Superorden	<u>Asteranae</u>
Familia	<u>Aquifoleaceae</u>
Subfamilia	<u>Nepetoideae</u>
Género	<u><i>Ilex</i> L</u>

Fuente: (Mosquera, 2015)

Los antioxidantes ayudan a inhibir y retardar la oxidación de otras moléculas inhabilitando la iniciación y prolongación de los radicales libres presentes en el organismo, esto ayuda a retardar el envejecimiento celular (Leo-Rivas *et al* 2016).

Los compuestos fenólicos se encuentran en plantas de uso alimenticio y no alimenticio, y se han reportado tener múltiples efectos biológicos, incluido la actividad antioxidante (Kahehnen *et al.*, 1999).

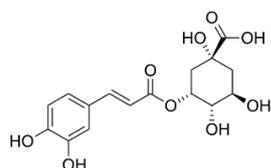
Muchas especies han sido reconocidas por tener propiedades medicinales e impacto benéfico en la salud como la actividad antioxidante, acción de estimulación digestiva, antiinflamatorio (Aaby, Hvattum, & Skrede, 2004; Luo, Cai, Sum, y Coeke, 2004).

Los polifenoles son de creciente interés en la industria alimentaria porque retardan la degradación oxidativa de los lípidos y mejorando así la calidad y el valor nutricional de los alimentos (Pardau *et al.*, 2017).

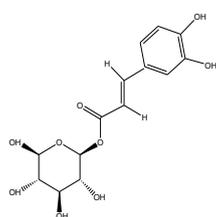
## 2.2 LOS COMPUESTOS FENÓLICOS EN *ILEX GUAYUSA*

En la naturaleza existe una amplia variedad de compuestos polifenólicos que presenta una estructura molecular caracterizada por la presencia de uno o varios anillos fenólicos de ahí su nombre de compuestos fenólicos. Se encuentran principalmente en las plantas que lo sintetizan en mayor cantidad como resultado de su metabolismo secundario.

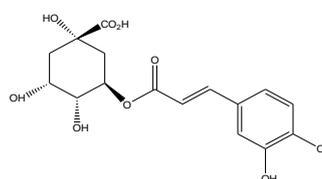
A continuación se detalla las estructuras de fenoles en *I. guayusa* (figura 1).



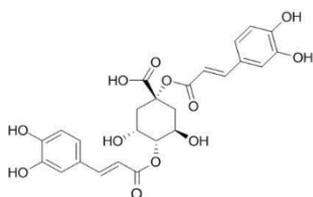
Ácido neoclorogénico



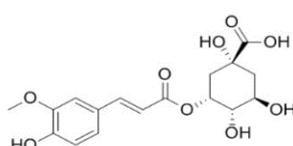
1-cafeína-beta-D-glucosa



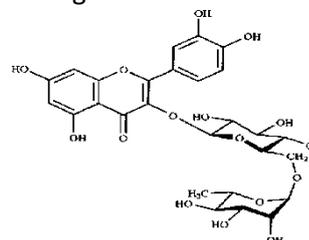
Ácido clorogénico



Acido 3,4-Dicafeoilquinico



Ácido feruloilquinico



quercetin-3-rutinósido (rutina)

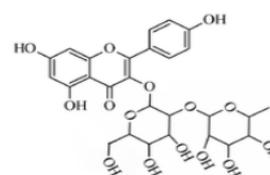
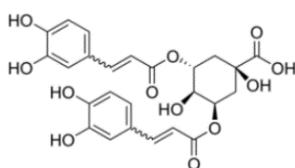
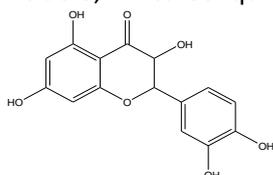


Figura 1. Estructuras químicas de los principales compuestos fenólicos presentes en hojas de *I. guayusa*.

## 2.3 MÉTODO DE EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLES, ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.

Para la extracción de los compuestos fenólicos es fundamental el disolvente, la naturaleza y preparación del material, la temperatura, tiempo de extracción, relación sólidos-líquido, el método de extracción empleado y la posible presencia de sustancias de interferencias.

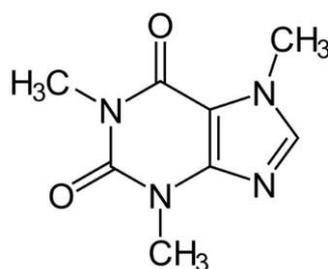
Los métodos de extracción de compuestos fenólicos difieren en dos métodos: el método de extracción asistida por ultrasonido y el método de extracción asistida por microondas, donde ambos se encargan de reducir el tiempo de extracción y aumentar el rendimiento (Guntero *et al.*, 2015).

Para la cuantificación de polifenoles totales se emplea el método de Folin-Ciocalteu, que consiste en la determinación espectrofotométrica indirecta del contenido total de polifenoles, según la técnica descrita en la bibliografía (Leo-Rivas, 2016).

## 2.4 ALCALOIDES PRESENTES EN *ILEX GUAYUSA*. CAFEÍNA

La cafeína es una de la sustancia psicoactiva más relevante a nivel mundial y una de las más aceptadas y toleradas a nivel social. Esta sustancia es aceptada legalmente, siendo la fuente principal de consumo más común el café y una variedad de productos hechos con base en este que son muy reconocidas (Radice, 2007).

Estructura de la molécula de la cafeína



Desde el punto de vista químico, la cafeína es un alcaloide xantínico (1, 3, 7 trimetilxantina) y su acción farmacológica se expresa principalmente a nivel de los

sistemas nervioso central, cardiovascular y respiratorio, así como de la función renal por actuar como diurético.

Según el análisis químico las hojas de guayusa poseen un contenido de cafeína de 2,9 a 33,3 % en peso seco (Lewis, 1991; Chamkuan, 2014), reportan cantidades entre 1,7 y 3,5 % de cafeína en las hojas de guayusa húmeda, lo que establece que esta planta posee un mayor contenido en todo el mundo.

## **2.5 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE CAFEÍNA**

Comúnmente se emplean metodologías de extracción como la infusión o la decocción, esta última, combinada con la extracción líquido – líquido, resulta superior en cuanto a capacidad de extraer cuantitativamente el alcaloide.

La cuantificación se realiza habitualmente por espectrofotometría ultravioleta directa.

### **2.6 Espectrometría.**

Tiene como principio básico la medición cuantitativa de las propiedades de una muestra en cuanto a la absorbancia o transmisión de luz sobre una longitud de onda determinada (Atkins, 2011). Los espectrofotómetros comúnmente utilizados son el espectrómetro UV, que emite ondas electromagnéticas entre 185 y 700 nm, y el espectrofotómetro IR que emite fotones entre 700 y 1500 nm (Atekings, 2011).

## **CAPÍTULO III**

### **3. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN**

#### **3.1 LOCALIZACIÓN**

El presente proyecto de investigación se realizó en la Universidad Estatal Amazónica (UEA) ubicada en el km 2 ½ vía al Tena, provincia Pastaza con una altitud de 940 m.s.n.m., latitud de 00 59' -1" y longitud de 77O 49' 0' W. La parte de identificación, preparación, extracción, separación, caracterización y análisis de los polifenoles y cafeína se llevó a cabo en el Laboratorio de Química de la UEA (Campus Puyo).

##### **3.1.1 TIPOS DE INVESTIGACIÓN**

Las fuentes de información para la investigación se basaron en artículos científicos de diferentes publicaciones e información de instituciones relacionados al tema, bases de datos de la instituciones públicas, entre otros. Esto sirvió para obtener información sobre los compuestos de polifenoles y cafeína, método de extracción y la utilización de los disolventes para el proceso de extracción para la optimización.

En la actualidad se ha tomado mucha importancia en la investigación de los compuestos fenólicos por los investigadores ya que son atractivos por su poder antioxidante que son utilizadas en las industrias farmacéutica, cosmética y alimentaria. En la industria cosmética se utiliza para el tratamiento de la piel seca y contrarrestar el envejecimiento.

La extracción de los compuestos polifenoles no posee antecedentes de investigación en la provincia de Pastaza, por ende, esto podría servir para futuras investigaciones y para las comunidades a los productores de la guayusa en la Amazonia ecuatoriana.

##### **3.1.2 MÉTODO DE INVESTIGACIÓN**

Se llevó a cabo el método de síntesis a raíz de la recopilación de información selecta de investigación, experimentación, tesis, libros entre otros, de diferentes autores. Luego de una lectura minuciosa se realizó el análisis de los conceptos de interés que servirán como guía para el presente proyecto de investigación.

## 3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.2.1 EQUIPOS, MATERIALES, UTENSILIOS, REACTIVOS, INSTRUMENTOS

- Balanza analítica ADAM. Alemania
- Balanza técnica THOMAS Scientific. TSXB4200C. Estados Unidos.
- Extractor de Guayusa.
- Micropipeta Eppendorf Research Plus 100 – 1000 µL. Alemania
- Micropipeta Eppendorf Research Plus 10 – 100 µL. Alemania
- Espátulas de laboratorio
- Cristalería común de laboratorio, incluido material volumétrico
- Espectrofotómetro UV-Vis Thermo Electron Corporation. Estados Unidos.
- pH-metro Thermo Electron Corporation. Estados Unidos.
- Agua destilada
- Metanol, MERCK. Alemania
- Etanol, MERCK. Alemania
- Ácido clorhídrico 40 mM
- acetato de sodio. MERCK. Alemania
- Hoja de guayusa
- 2,4,6 – tripiridil – s -triazina (TPTZ).
- FeCl<sub>3</sub> 20 Mm
- Embudo separadores
- Soporte universal
- Celda de vidrio para lectura
- Cloroformo

### 3.2.2 Muestras

El material vegetal (hojas adultas de *I. guayusa*) fueron adquirida en el mercado Mariscal de la ciudad del Puyo en el mes de octubre del 2018. Las muestras se secaron en estufa durante 24 horas a una temperatura de 45 °C. Posteriormente, se pulverizo a un tamaño de partícula inferior a 0.5 mm de acuerdo con la norma ASTM-E1757-01 (2017). El contenido de humedad de la muestra se determinó en 7.24 %, valor fue utilizado para expresar los resultados en base a masa seca.

### 3.2.3 Extracción

Los extractos se obtuvieron mediante la extracción asistida por ultrasonido con el uso de un instrumento modelo Bransonic Ultrasonic, Serie CPXH. Se emplearon como disolvente diferentes soluciones de etanol y agua a diferentes temperaturas y aplicando la extracción asistida por ultrasonido a diferentes rangos de tiempo y relación sólido-líquido, de acuerdo a investigaciones similares reportados por Zun *et al.*, (2011). Dado la baja toxicidad el etanol es ampliamente utilizado en muchas investigaciones y se puede recuperar fácilmente. Se colocaron aproximadamente 5 g de muestra en cada corrida experimental y se añadió el disolvente etanol-agua en diferentes volúmenes para diferentes tratamientos. Después de someterse a sonicación en las condiciones definidas en el diseño del experimento para cada condición, los extractos se filtraron al vacío a través del papel Whatman N° 4 y se almacenaron en frascos de vidrio ámbar a 4 °C hasta su determinación de los compuestos fenólicos totales. Todos los análisis se llevaron a cabo en los días posteriores a la extracción para evitar cualquier cambio en las muestras debido al almacenamiento prolongado.

### **3.3 DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES (CFT)**

La determinación de fenoles totales en los extractos se llevó a cabo en un espectrofotómetro de barrido UV, utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi 1965). Se agregaron 40 µL de cada extracto hidroalcohólico y 500 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu en matraces volumétricos de 10 mL cubiertos con papel aluminio. La mezcla se dejó reposar durante 10 minutos y posteriormente se agregaron 500 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (10%). La disolución se completó con agua destilada aforando a 10 mL y se mezcló completamente. Después de dos horas de reposo en un ambiente oscuro y a temperatura ambiente, la absorbancia se registró a una longitud de onda de 765 nm medida contra el blanco.

### **3.4 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE**

En este estudio, los métodos de eliminación de radicales se seleccionaron utilizando el método de ABTS Y FRAP, ya que comúnmente son empleados para la medición de la capacidad antioxidante debido a la simplicidad de los ensayos, la instrumentación requerida y la solidez, lo que significa que los ensayos se pueden realizar rápidamente y los resultados son reproducibles (Prior *et al.*, 2005).

### **3.5 ENSAYO DE ELIMINACIÓN DE RADICALES LIBRES ABTS (ÁCIDO 2,2-AZINOBIS (3-ETILBENZOTIAZOLIN)-6 SULFÓNICO)**

El radical ABTS se preparó a partir de mezclar en partes iguales disoluciones de ABTS 7 mM y persulfato de potasio 2,45 mM. La disolución se mantuvo en la oscuridad a temperatura ambiente durante 16 horas para la formación del radical, la cual fue diluida con etanol para obtener una absorbancia de 0,873. Para la preparación del persulfato de potasio se pesaron 0.663g del mismo y se enrazó con agua destilada en un matraz de 100 mL. El ABTS se preparó a partir de 0,384g disuelto en 10 mL de agua destilada. La curva de calibración se realizó a partir de la preparación, a un intervalo de concentración de 0 a 0,16 mg/L, de TROLOX (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) y los resultados fueron expresados en mmol eq.TROLOX/100g de masa seca a partir de la ecuación:

$$C = \frac{A}{17,618}$$

Donde A es la absorbancia de la muestra.

### **3.6 PODER DE REDUCCIÓN ANTIOXIDANTE DE HIERRO (III), (FRAP)**

Se tomaron 80 µL de cada extracto y se colocaron en un matraz aforado de 10 mL al cual se le adicionaron 5 mL de disolución de FRAP recientemente preparado. Se enrasó con agua destilada y se dejó a 37 °C durante 30 minutos. La lectura se registró a una longitud de onda de 593 nm contra el blanco (Leos-Rivas *et al.*, 2016).

El reactivo FRAP se preparó mezclando 2,5 ml de disolución 2,4,6-piridil -s-triazina (TPTZ) con 2,5 de disolución de cloruro de hierro III y 25 mL de tampón acetato. Para la preparación de la disolución de TPTZ se pesaron 0,03g de reactivo los cuales fueron colocados en un matraz aforado de 10 mL y enrazado con ácido clorhídrico 40 mM. Para la preparación del tampón acetato se disolvieron 0,0061g de acetato de sodio en 200 ml en agua destilada, se añadió ácido clorhídrico 40 Mm hasta que la mezcla alcanzo un pH 3,5, posteriormente se enrazo con agua destilada a 250 mL. La preparación de la disolución de cloruro de hierro (III) se disolvieron 0,1352g en 25 mL en agua destilada (Thaipong *et al.*, 2006). La curva de calibración se realizó a partir de la preparación, en un intervalo de concentración de 0,1 a 1 mg/L, de TROLOX (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-

carboxílico) y los resultados fueron expresados en  $\mu\text{mol eq.TROLOX}/100\text{g}$  de masa seca a partir de la ecuación:

$$C = \frac{A}{0,1879}$$

Donde A es la absorbancia de la muestra.

### 3.7.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se realizó un diseño factorial a dos niveles y cuatro factores ( $2^4$ ) con un total de 37 experimentos, dos repeticiones y cinco en el punto central. Las cuatro variables estudiadas fueron temperatura, tiempo, relación sólido-líquido y relación etanol-agua sobre la extracción de compuestos fenólicos totales.

Los factores significados y no significativos fueron analizados mediante los efectos en papel normal (Gráfica de Daniel). Las variables significativas se analizaron empleando un diseño de Box-Behnken Design, (metodología de superficie respuesta) y el efecto de interacción de las interacciones de las variables independientes en las respuestas (Pappa *et al.*, 2000). Se empleó el software Design Expert versión 10 (Stat Ease, EE.UU) para identificar los niveles óptimos de las variables independientes.

El nivel de los factores y el punto central del diseño para la metodología superficie respuesta (bajo, medio, alto) en variables independientes codificadas y no codificadas se muestran en la Tabla 1.

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

Variable independiente	Nivel variable codificado			
	Símbolo	Bajo	Centro	Alto
		-1	0	1
<b>Tiempo</b>	A	10	20	30
<b>Temperatura</b>	B	30	45	60
<b>ROH/H<sub>2</sub>O</b>	C	70/30	80/20	90/10
<b>S/L</b>	D	25	62,5	100

Fuente: Elaboración propia

Box-Behnken Design, es un diseño experimental, útil para la metodología de superficie respuesta, para un Modelo cuadrático de variable de respuesta y generalmente funciona bien para la optimización del proceso (Aslan y Cebeci 2007; Oramahi y Diba 2013).

Los números de experimento (N) se calcularon bajo la siguiente ecuación:

$$N=K^2 + K + CP$$

Donde: k es el número factor y cp es el número replicado del punto central.

Se aplicó la metodología superficie respuesta para analizar el efecto de las variables independientes. El diseño BBD de tipo MSR se empleó para determinar los valores óptimos de las cuatro variables estudiadas relacionados con los rendimientos de fenoles totales. Se aplicó una ecuación polinomial de segundo orden:

$$Y (\%) = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^k \sum_{j=i+1}^k \beta_{ij} x_i x_j$$

Donde:  $\beta_0$ ,  $\beta_i$ ,  $\beta_{ii}$  y  $\beta_{ij}$  son los coeficientes de regresión para los términos de intercepción, lineal, cuadrático e interacción, respectivamente y  $x_i$ ,  $x_j$  son las variables independientes (Kiran *et al.*, 2016). Se analizaron cuatro modelos para la obtención de los mejores resultados estadísticos.

### 3.7.2 VERIFICACIÓN DEL MODELO

Para la validación del modelo, se determinaron los valores de los coeficientes de  $R^2$  ajustado y el  $R^2$  predicho. Se obtuvo la validez de cada serie experimental y se evaluó la adecuación del modelo mediante análisis de varianza (ANOVA) (Nazir *et al.*, 2017; Pompeu *et al.*, 2019).

Las condiciones óptimas para la extracción de compuestos fenólicos en hojas secas de *I. guayusa* a partir de las variables independientes, relación etanol-agua, temperatura y el tiempo de extracción, se obtuvieron a partir de la ecuación predictiva de la metodología superficie respuesta. La actividad antioxidante se determinó después de la extracción de compuestos polifenólicos en condiciones óptimas. Los valores experimentales y predichos se compararon para determinar la validez del modelo.

### 3.7.3 CUANTIFICACIÓN DE LOS FENOLES TOTALES POR EL MÉTODO DE FOLIN CIOCALTEU

Se pesaron aproximadamente 5 g de hojas secas adultas de *I. guayusa* para los 37 experimentos con diferentes concentraciones de volúmenes, concentración etanol y agua, en dependencia al tiempo, temperatura y relación solido-liquido. Luego el extracto fue filtrado y envasado en un frasco de 400 mL color ámbar. Para la cuantificación de los concentrados de fenoles en un volumétrico de 10 mL, se añadió con una pipeta 40  $\mu$ L de muestra del extracto de guayusa seguido el reactivo de Folin-

Ciocalteu, se espera 10 minutos, luego se añadió la solución carbonato de potasio a 500 µL se aforó con agua destilada, se dejó reposar en un lugar oscuro sin presencia de la luz por 2 horas. Se registra la observancia a una longitud de onda de 765 nm.

El contenido total de polifenoles se determinó utilizando una curva de calibración de ácido gálico en un intervalo de concentración de 2 a 10 mg/L. Se obtuvo un valor ajustado de  $R^2 = 0,9961$ . La concentración de polifenoles totales se expresó gramos de equivalentes de ácido gálico por 100 g.d.w. Se empleó la siguiente ecuación.

$$\text{Abs} = 0,0734x - 0,0028$$

La actividad antioxidante se determinó por los métodos de FRAP y ABTS.

### **3.7.4 DETERMINACIÓN DE CAFEÍNA**

Se tomaron 15 mL del extracto hidroalcohólico de *I. guayusa*, se alcalinizó con NaOH 0,1 M hasta alcanzar pH de 8,0. Se extrajo en un embudo separador con dos proporciones de 15 mL de cloroformo cada una y luego se reunieron los extractos clorofórmicos. Se dejó evaporar el cloroformo hasta sequedad en baño María y se disolvió la cafeína añadiéndole 50 mL de agua destilada caliente (60°-90°C). Se dejó enfriar y se transfirió a una matraz aforado de 100 mL, y se enrazó con agua destilada. De la disolución anterior, se tomaron 5 mL y se colocó en un matraz aforado de 25 mL, añadiendo 1 mL de HCl 0,01 M y se enrazó con agua destilada.

El contenido de cafeína se determinó por medio de espectrofotómetro a una longitud de onda de 275 nm, calculando la concentración de cafeína en la muestra por el método del patrón externo a partir de la siguiente ecuación:

$$\frac{C_m}{A_m} = \frac{C_p}{A_p}$$

$C_m$ : Concentración de la muestra (que contiene la cafeína)

$A_m$ : Absorbancia de la muestra

$C_p$ : Concentración del patrón

$A_p$ : Absorbancia del patrón



## CAPÍTULO IV

### 4.1 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.2 FACTORES QUE AFECTAN LA EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDO DE COMPUESTOS FENOLES TOTALES.

En los experimentos preliminares de la presente investigación, se estudiaron los efectos de cuatro factores: tiempo, temperatura, relación etanol-agua y relación sólido-líquido en la extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos totales de la hoja de *I. guayusa*. Los valores de cada factor se muestran en la tabla 2. Los contenidos de fenoles totales obtenidos estuvieron entre 0,533 y 4,640 g eq. ácido gálico/100g, calculado en relación a la masa seca, de acuerdo a las condiciones experimentales (Tabla 2).

Tabla 2. Diseño factorial  $2^4$  a partir de las variables independientes (A, B, C y E) y resultados experimentales de los CFT

Exp	A	B	C	D	CFT
	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	EtOH/H <sub>2</sub> O (v/v)	S/L (m/v)	g ác. Gálico/100g ms
1	10	30	70/30	100	1,96
2	30	30	90/10	25	1,32
3	30	30	90/10	100	1,42
4	10	60	90/10	25	1,89
5	30	30	70/30	25	4,03
6	10	60	90/10	100	1,42
7	30	60	70/30	100	3,46
8	30	60	90/10	25	1,76
9	20	45	80/20	62,5	2,60
10	30	30	70/30	100	4,03
11	20	45	80/20	62,5	2,43
12	30	30	70/30	25	3,58
13	30	30	90/10	100	1,88
14	20	45	80/20	62,5	2,04
15	10	30	70/30	100	1,31
16	10	30	70/30	25	2,71
17	30	60	70/30	25	4,27
18	30	30	70/30	100	3,37

19	10	60	90/10	100	1,54
20	10	60	70/30	25	4,63
21	30	60	70/30	25	3,41
22	10	30	90/10	25	0,53
23	10	60	70/30	25	4,40
24	30	60	90/10	100	1,96
25	10	60	70/30	100	4,53
26	30	60	90/10	100	2,40
27	10	30	90/10	100	0,85
28	10	60	70/30	100	4,64
29	30	60	70/30	100	3,56
30	10	30	90/10	25	0,77
31	10	30	90/10	100	0,85
32	30	60	90/10	25	1,97
33	30	30	90/10	25	1,25
34	10	60	90/10	25	1,89
35	20	45	80/20	62,5	2,00
36	10	30	70/30	25	2,09
37	20	45	80/20	62,5	2,12

Fuente: (Elaboración propia)

En la figura 2 se puede apreciar la estimación de los efectos estandarizados positivos y negativos sobre la extracción de los compuestos fenólicos totales, teniendo en cuenta que las variables altamente significativas corresponden a valores más altos de efectos estandarizados según Whitcomb y Oehlert (2007). Los efectos no significativos siguieron una distribución normal con media igual a cero y varianza constante. Esto implica que, si los efectos se grafican en papel probabilístico normal, los que no son significativos tenderán a formar una línea recta, mientras que los efectos activos aparecerán alejados de la línea de normalidad.

La relación etanol-agua, temperatura y tiempo de extracción fueron los factores significativos ( $p < 0,005$ ) mientras la relación sólido-líquido resultó no significativa ( $p > 0,05$ ) en la extracción de contenido de polifenoles totales (Tabla 2). Las interacciones, tiempo-temperatura, temperatura-relación etanol:agua y tiempo-temperatura-relación etanol:agua, fueron significativas, mientras las restantes interacciones entre los factores estudiados no fueron significativas.

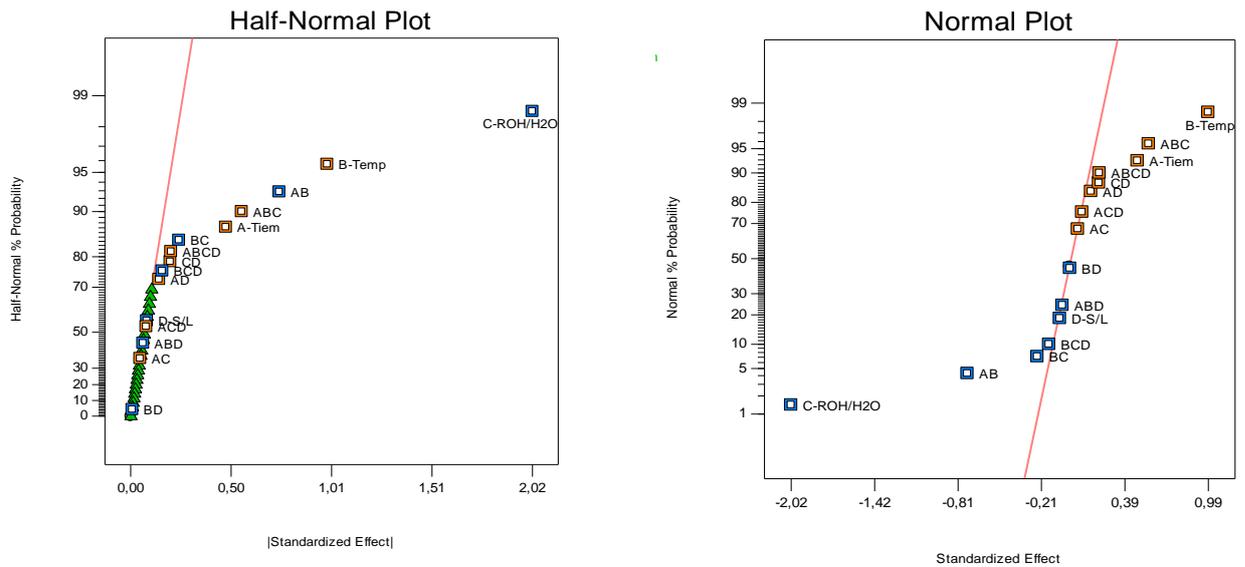


Figura. 2. Efecto de los factores significados y no significativos sobre la extracción de compuestos fenólicos totales en hojas de *I. guayusa*.

En el modelo factorial se obtuvo un buen ajuste con un valor de  $R^2$  0,9631. Además, el R-predicho fue 0,8831 y el R-ajustado de 0,9367 con una diferencia menor de 0,2 (figura 2). De acuerdo a lo expuesto por Anderson y Whitcomb (2016) valores inferiores a 0,2 son adecuados. De acuerdo con los resultados del diseño factorial, se seleccionaron los factores con efecto significativos.

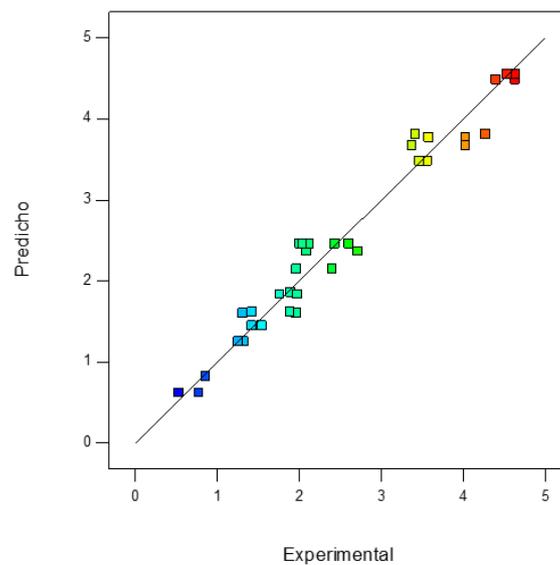


Figura 3. Relación entre los valores experimentales y predichos de la extracción de CFT en hojas de *I. guayusa*.

Abreu-Naranjo *et al.*, (2018) encontraron que en el proceso de extracción de compuestos polifenólicos totales en la corteza de *Maytenus macrocarpa* (Chuchuwaso) el factor relación sólido-líquido no influyó, mientras que la temperatura y el tiempo influyeron significativamente.

Tabla 2. ANOVA para el modelo factorial seleccionado

Fuente	Suma de cuadrados	gl	Cuadrados medios	Valor F	p-valor (Prob > F)	
<b>Model</b>	50,75	15	3,38	36,53	< 0,0001	significativo
A-Tiem	1,83	1	1,83	19,75	0,0002	
B-Temp	7,80	1	7,80	84,16	< 0,0001	
C-ROH/H <sub>2</sub> O	32,53	1	32,53	351,19	< 0,0001	
D-S/L	0,054	1	0,054	0,58	0,4557	
AB	4,46	1	4,46	48,17	< 0,0001	
AC	0,019	1	0,019	0,20	0,6590	
AD	0,16	1	0,16	1,78	0,1968	
BC	0,47	1	0,47	5,11	0,0345	
BD	5,723E-004	1	5,723E-004	6,180E-003	0,9381	
CD	0,32	1	0,32	3,44	0,0776	
ABC	2,49	1	2,49	26,90	< 0,0001	
ABD	0,032	1	0,032	0,34	0,5647	
ACD	0,049	1	0,049	0,53	0,4731	
BCD	0,20	1	0,20	2,19	0,1538	
ABCD	0,33	1	0,33	3,58	0,0725	
Residual	1,94	21	0,093			
Falta de ajuste	0,27	1	0,27	3,29	0,0849	No significativo
Error Puro	1,67	20	0,084			
Correlación	52,69	36				
Total						

Fuente: (Elaboración propia)

Además, el gráfico de Pareto y el límite de Bonferroni se emplearon para reforzar esta selección (Anderson y Whitcomb, 2016). Como se muestra en la figura 4, los efectos en la extracción de compuestos fenólicos, relación alcohol-agua, temperatura y tiempo, están por encima del límite de Bonferroni lo que indicó que son factores significativos y la relación sólido-líquido reportaron que no tuvo influencia en la extracción. Acorde a estos resultados estas variables fueron seleccionadas para la optimización del proceso de extracción.

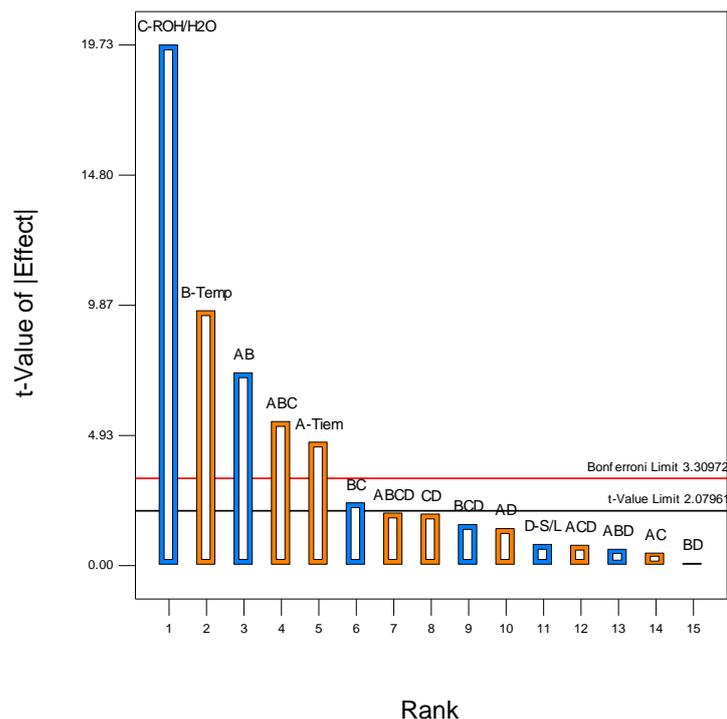


Figura 4. Diagrama de Pareto para el valor t de los efectos para la extracción de TPC.

La ecuación, en términos de factores codificados, se puede usar para hacer predicciones sobre la respuesta para los niveles de cada factor. La ecuación codificada es útil para identificar el impacto relativo de los factores significativos al comparar los coeficientes de los factores:

$$FT=2,46+0,24A+0,49B-1,01C-0,37AB-0,12BC+0,28ABC$$

El modelo codificado se usó para generar gráficos de superficie, para el análisis de los efectos variable sobre el rendimiento de los compuestos de polifenoles totales. La interacción de los factores estudiados en las variables dependientes se puede observar en las Figuras 5, 6, 7, 8, 9 y 10. Se puede observar que a un tiempo de extracción la temperatura influyó significativamente sobre las cantidades totales de polifenoles, mientras que a un tiempo de extracción de 30 minutos la temperatura no tuvo influencia significativa. Estos resultados evidenciaron que se pueden obtener los mismos resultados a tiempos inferiores si se aumenta la temperatura o a temperaturas inferiores si se aumenta el tiempo.

En cuanto la proporción de etanol en la mezcla etanol-agua y el tiempo sobre la extracción se encontraron diferencias significativas tanto para las proporciones etanol-agua empleadas como el tiempo. Ambos factores influyeron en el proceso de

extracción, por lo que los resultados dependen de las condiciones de operación. Además, se observa que con proporciones de alcohol 70/30 se obtiene mayor contenido de polifenoles y a menudo que se aumenta el alcohol disminuye la extracción de polifenoles. De acuerdo a lo expuesto por otros autores, concentraciones de etanol mayores al 70% disminuyen la extracción de polifenoles (Du *et al.*, 2010; Lazar *et al.*, 2016).

La relación sólido-líquido no tuvo influencia significativa sobre los contenidos de polifenoles totales. Todos estos resultados son de utilidad práctica para la toma de decisiones en los procesos agroindustriales.

Sut *et al.*, (2011) investigaron la influencia de la proporción etanol-agua, temperatura y tiempo sobre la extracción de compuesto de polifenoles totales en hoja de *Ilex kudinggcha*, el intervalo de concentración de etanol estudiado fue de 50-90%, el resultado indica que para una concentración de etanol al 70% la extracción de compuestos totales de polifenoles fueron superiores.

En relación a la temperatura y tiempo la extracción los mayores contenidos de compuestos totales de polifenoles se lograron a una temperatura cercana a los 70°C y un tiempo superior a los 70 minutos.

Sin embargo, un aumento adicional de la temperatura dio lugar a la disminución de los contenidos de CFT. Los resultados pueden explicarse por el hecho de que un aumento en la temperatura de extracción puede ser beneficioso para que los compuestos bioactivos se liberen de las células de la planta, mientras que una temperatura superior al nivel optimizado puede causar la degradación de algunos compuestos termosensibles (Yu y Goktepe, 2005; Kim *et al.*, 2007).

Makris *et al.*, (2007) mencionan que, por encima de los 60 min, el contenido de CFT disminuye, posiblemente debido a la descomposición de los compuestos activos durante el tiempo de extracción prolongado.

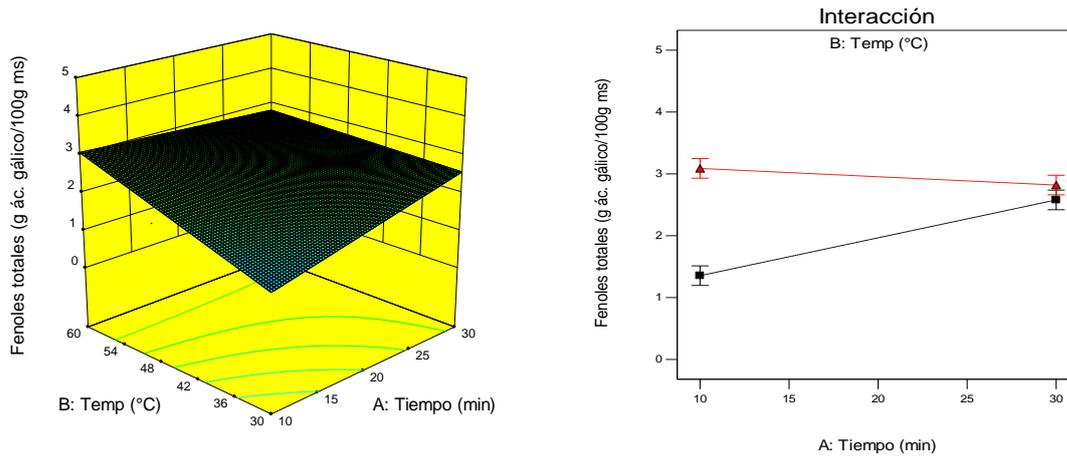


Figura 5. Interacción de los factores tiempo y temperatura sobre la extracción de fenoles totales de hojas secas de *I. guayusa* con una relación etanol/agua de 80/20 (v/v) y relación sólido-líquido (1:12,5, m:v). ■ temperatura mínima 30 °C, ▲ temperatura máxima 60 °C.

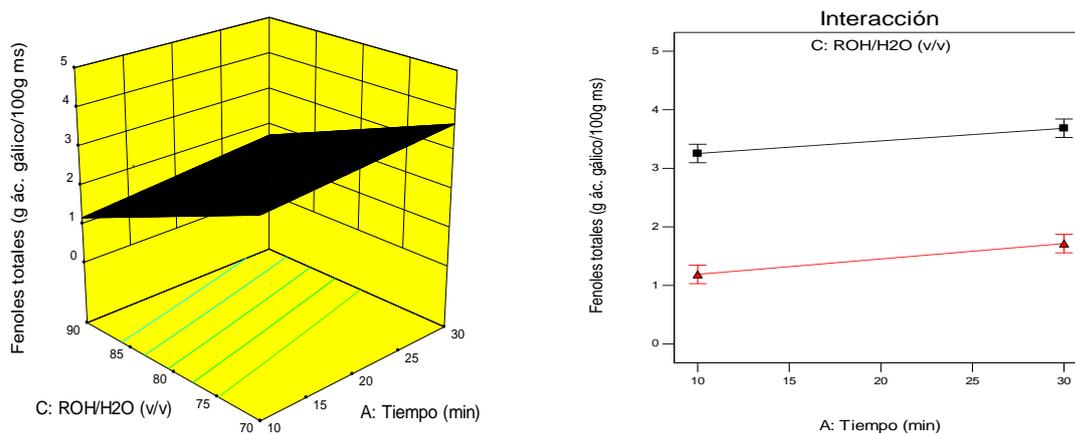


Figura 6. Interacción de los factores relación tiempo y alcohol-agua sobre la extracción de fenoles totales de hojas secas de *I. guayusa* a una temperatura de 45°C y relación sólido-líquido (1:12,5, m:v). ■ relación alcohol-agua mínima 70/30 (v/v), ▲ relación alcohol-agua máxima 90/10 (v/v).

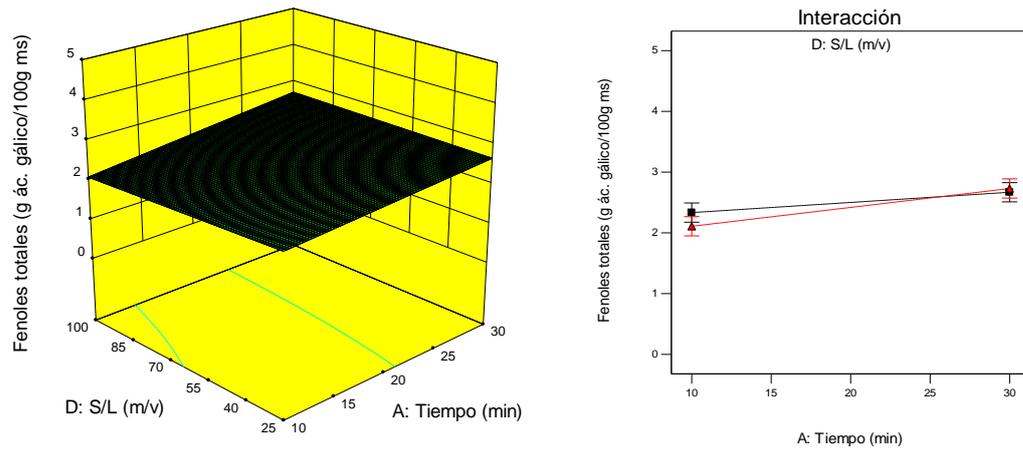


Figura 7. Interacción de los factores tiempo y relación S/L sobre la extracción de fenoles totales de hojas secas de *I. guayusa* con una relación etanol/agua de 80/20 (v/v) y temperatura de extracción de 45°C. ■ relación sólido-líquido (1:5, m:v), ▲ relación sólido-líquido (1:20, m:v).

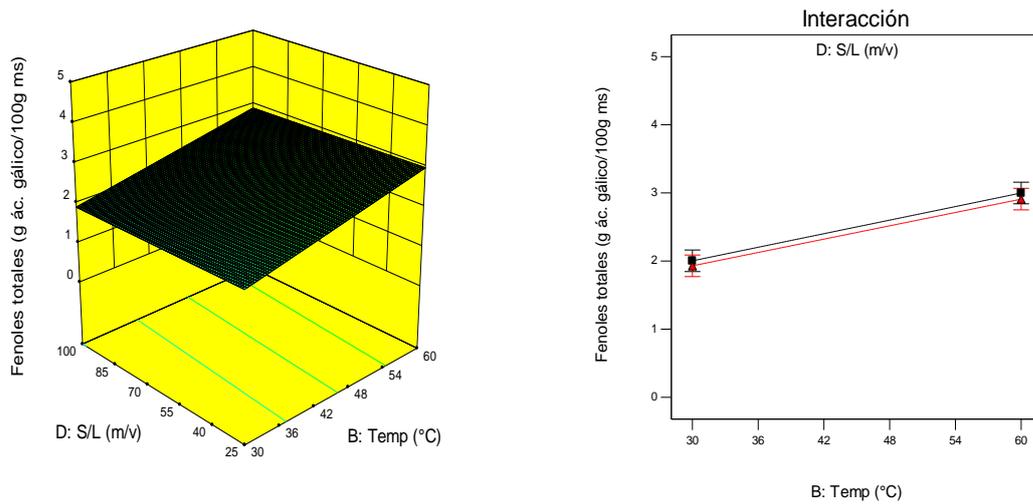


Figura 8. Interacción de la temperatura y S/L sobre la extracción de fenoles totales de hojas secas de *I. guayusa* con una relación etanol/agua de 80/20 (v/v) y tiempo de 20 minutos. ■ relación sólido-líquido (1:5, m:v), ▲ relación sólido-líquido (1:20, m:v).

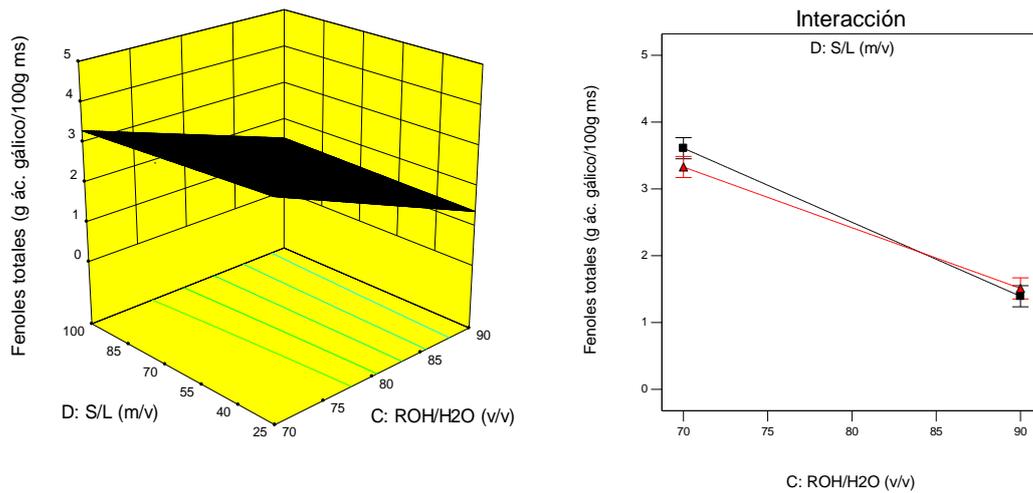


Figura 9. Interacción de los factores S/L y etanol-agua sobre la extracción de fenoles totales de hojas secas de *I. guayusa* a una temperatura de 45 °C y 20 minutos con una relación sólido-líquido (1:12,5, m:v). ■ relación sólido-líquido (1:5, m:v), ▲ relación sólido-líquido (1:20, m:v).

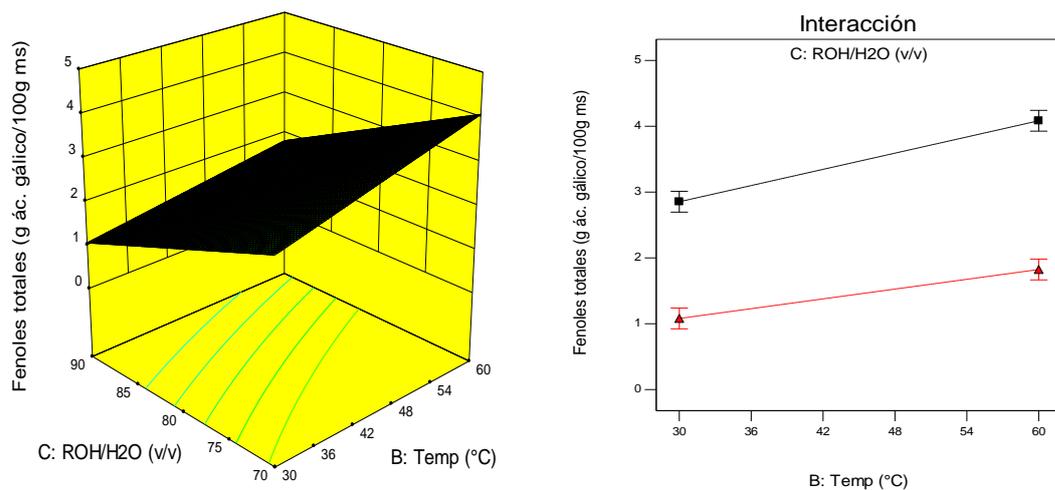


Figura 10. Interacción de los factores temperatura y relación etanol-agua sobre la extracción de fenoles totales de hojas secas de *I. guayusa* a un tiempo de extracción 20 minutos y a un relación sólido-líquido 62,5 mL (1:12,5, m:v). ■ relación (v/v) alcohol-agua mínima 70/30, ▲ relación alcohol-agua máxima 90/10 (v/v).

### 4.3 ANÁLISIS DE METODOLOGÍA DE SUPERFICIE RESPUESTA.

El objetivo de la optimización fue encontrar la mejor combinación de los tres factores independiente que influyeron significativamente en el proceso de extracción para

maximizar los CFT en el proceso de extracción. En la tabla 3 se indican los valores experimentales y predichos utilizados para la construcción del modelo.

Tabla 3. Box-Behnken Desing a partir de las variables independientes (A, B y C) y resultados experimentales de los CFT

Experimento	A	B	C	Experimental	Predicho
	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	EtOH/H <sub>2</sub> O (v/v)		
1	60	20	90	0,49	0,51
2	30	20	90	0,85	0,80
3	60	30	80	3,33	3,21
4	45	20	80	2,02	1,92
5	30	30	80	2,99	2,94
6	30	20	70	2,34	2,32
7	60	10	80	2,41	2,46
8	60	20	70	2,17	2,21
9	45	30	70	2,74	2,81
10	45	20	80	2,05	1,92
11	45	20	80	1,77	1,92
12	30	10	80	3,02	3,14
13	45	10	90	0,98	0,91
14	45	20	80	1,82	1,92
15	45	20	80	1,97	1,92
16	45	30	90	1,23	1,32
17	45	10	70	2,74	2,65

Fuente: (Elaboración propia)

En la tabla 4 se muestran los cuatro modelos analizados y se encontró que el cuadrático resultó con un ajuste significativo ( $p < 0.0001$ ).

Tabla 4. Resumen de la evaluación de los cuatro modelos polinomiales analizados en la optimización de CFT en hojas de *I. guayusa*.

Fuente	Valor p	Falta de ajuste (valor p)	R-cuadrado ajustado	R-cuadrado predicho	
Lineal	0,0200	0,0018	0,4077	0,0059	
2FI	0,9124	0,0010	0,2679	-12,952	
<u>Cuadrático</u>	<u>&lt; 0,0001</u>	<u>0,3867</u>	<u>0,9731</u>	<u>0,8972</u>	<u>Sugerido</u>
Cúbico	0,3867		0,9762		

Fuente: (Elaboración propia)

Por lo tanto, se seleccionó la ecuación polinomial de segundo orden con un valor de  $R^2$  de 0,9731. Se puede interpretar que el 97,31% de la variación total en la extracción de

compuestos totales de polifenoles se atribuyó a los factores estudiados. Los valores de compuestos totales de polifenoles predichos para el modelo cuadrático y los valores medidos en el laboratorio se compararon y se muestran en la figura 11. La distribución de los puntos confirma la capacidad del modelo para cubrir toda la gama de experimentos estudiados (Crespo *et al.*, 2017).

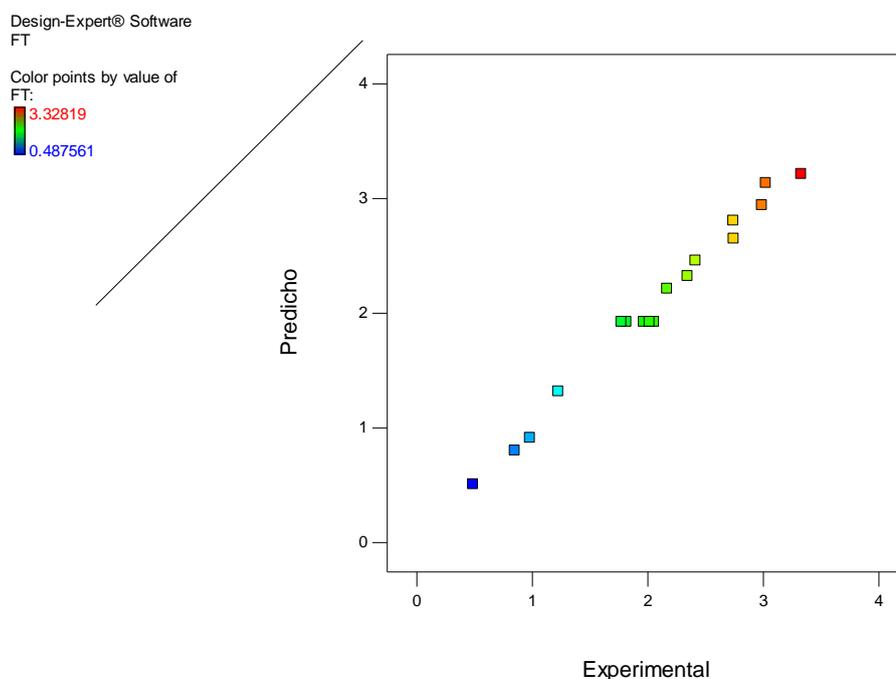


Figura 11. Relación entre los valores experimentales y predichos de la optimización de CFT en hojas de *I. guayusa*.

La distribución de los puntos verifica la idoneidad del modelo para cubrir todo el intervalo de los datos analizados. Por lo tanto, el modelo se puede aplicar con éxito.

La falta de ajuste resultó ser no significativo con un valor de  $p > 0.05$  (Tabla 5). lo cual indica que el modelo es adecuado para representar los datos experimentales con un nivel de confianza del 95% (Whitcomb y Anderson, 2004).

Tabla 5. ANOVA para el modelo cuadrático.

Fuente	Suma de cuadrados	gl	Cuadrados medios	Valor F	p-valor (Prob > F)	
Modelo	10,38	9	1,15	65,23	< 0,0001	
A-Temperatura	0,082	1	0,082	4,62	0,0686	
B-Tiempo	0,16	1	0,16	8,93	0,0203	significativo

C-ROH/H <sub>2</sub> O	5,21	1	5,21	294,60	< 0,0001
AB	0,23	1	0,23	12,74	0,0091
AC	8,39E+00	1	8,39E+00	0,47	0,5131
BC	0,015	1	0,015	0,87	0,3818
A <sup>2</sup>	0,32	1	0,32	18,21	0,0037
B <sup>2</sup>	2,29	1	2,29	129,33	< 0,0001
C <sup>2</sup>	2,30	1	2,30	130,6	< 0,0001
Residual	012	7	0,018		
Falta de ajuste	0,061	3	0,020	1,31	0,3867
Error puro	0,062	4	0,016		
Correlación Total	10,50	16			no significativo

Fuente: (Elaboración propia)

Los valores de “P>F” inferiores a 0,05 indican que los términos del modelo son significativos. En este caso, A, B, C, A<sup>2</sup>, AB, B<sup>2</sup>, C<sup>2</sup> son términos significativos del modelo. Por lo contrario los valores superiores a 0.1 muestran los términos del modelo que no son significativos. La ecuación polinomial en términos de factores codificados obtenidos a partir del análisis de regresión puede ser expresada (solo se consideran los términos significativos).

La ecuación polinomial en términos de factores codificados obtenidos de un análisis de regresión resultó de la siguiente manera:

$$Y = 1,92 - 0,10A + 0,14B - 0,81C + 0,24AB - 0,046AC + 0,062BC + 0,28A^2 + 0,74B^2 - 0,74C^2$$

Esta ecuación puede ser utilizada para reconocer el efecto relativo de los factores significativos mediante la comparación de sus coeficientes, mientras que la ecuación no codificada en términos de factores reales puede utilizarse para hacer predicciones sobre la variable en el intervalo considerado para cada factor. Ecuación en términos de factores reales resultó la siguiente:

$$Y = -32,152 - 0,401A - 0,124B + 1,103C + 1,581 \cdot 10^{-3}AB + 1,228 \cdot 10^{-3}B^2 + 7,368 \cdot 10^{-3}A^2 - 7,391 \cdot 10^{-3}C^2$$

## 4.4 CONTENIDO DE FENOLES TOTALES, ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y CAFEÍNA DEL EXTRACTO BAJO LAS CONDICIONES ÓPTIMAS

En la figura 12 se muestran los CFT obtenidos bajo condiciones óptimas encontradas por el modelo, temperatura de extracción 60 °C, tiempo 26,6 min y una relación etanol-H<sub>2</sub>O de 75,1-24,9.

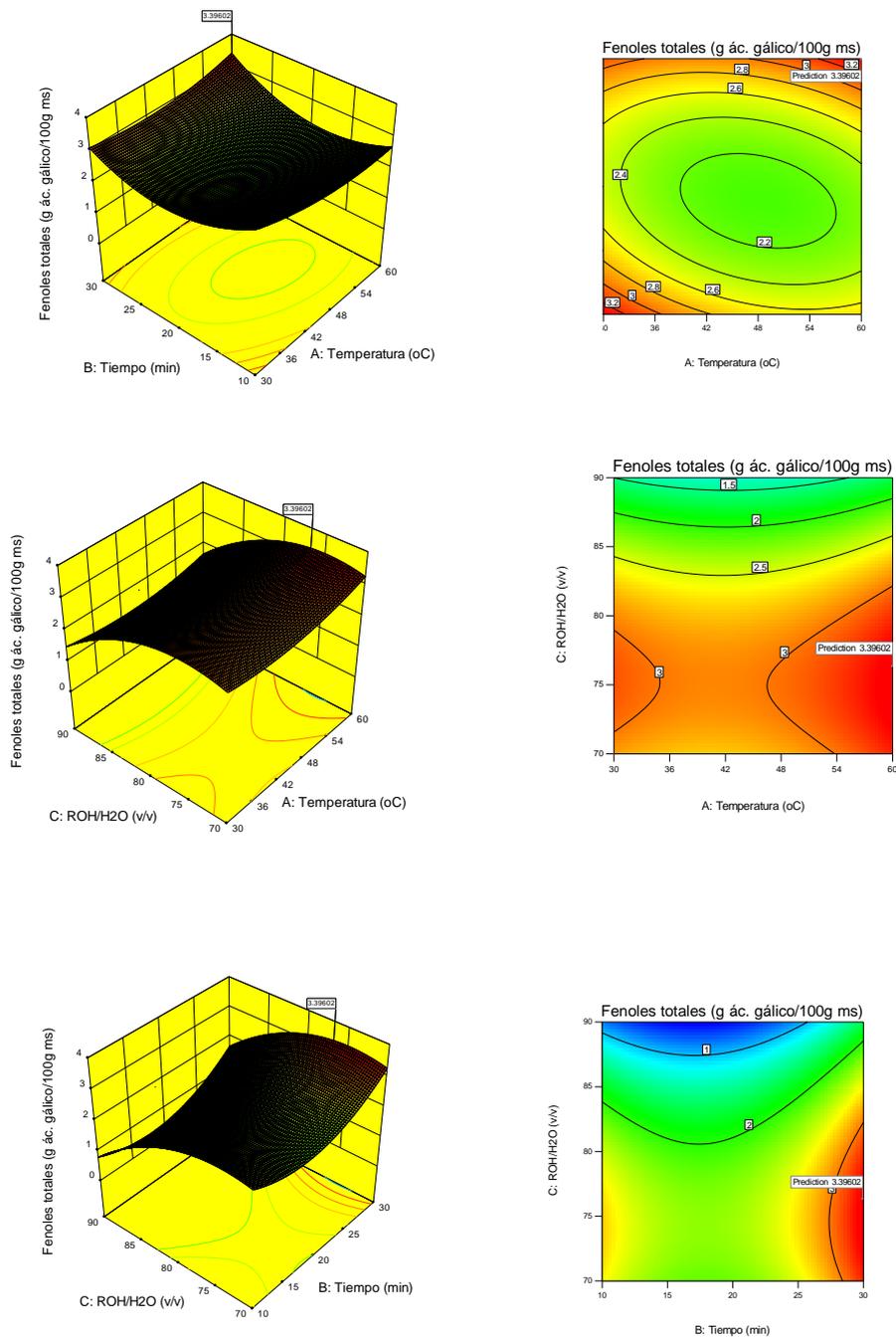


Figura 12. Superficie de respuestas y gráficos de contorno para los efectos tiempo y temperatura sobre el contenido total de polifenoles para la condiciones óptimas.

Para la validación del modelo se encontró que el CFT fue de 3,46 g eq. Ác. gálico /100g, resultado que se encuentra en correspondencia con el predicho. Otros autores han reportado valores similares de 3,34 g/100g ms para hojas jóvenes y 2,14 g /100 ms para hojas adultas en extractos de hojas de *I. guayusa* colectadas en la provincia de Pastaza (Villacís-Chiriboga *et al.*, 2017). Valores superiores fueron encontrados por García-Ruiz *et al.*, (2017) en hojas frescas verdes de *I. guayusa*. Resultados que pueden ser explicados por la etapa de madurez de las hojas, la cual influye en el contenido de polifenoles totales.

Los organismos vegetales inmaduros se caracterizan por tener una mayor tasa de biosíntesis de metabolitos en tejidos jóvenes que en los adultos. Por lo tanto, los tejidos de plantas jóvenes presentan contenidos fenólicos más altos, ya que actúan como elementos químicos disuasivos contra herbívoros y plagas. Además, los compuestos fenólicos también son responsables de proteger la planta de radiaciones dañinas (Di Ferdinando *et al.*, 2014); Zhu *et al.*, (2009) reportaron valores medios de compuestos fenólicos totales de 10,3 g/100g, ms para especie de género *Ilex* precedentes de diferentes regiones geográficos de china.

Este mismo autor ha demostrado que los contenidos totales de compuestos fenólicos en extractos de plantas medicinales y de consumo dietético pueden contribuir a la actividad antioxidante total.

Otros reportes de CFT para el género *Ilex* han sido documentados (Tabla 6).

<b>Género I.</b>	<b>CFT (g eq. Ác. gálico /100g )</b>	<b>ABTS (mmol/100g)</b>	<b>FRAP (mmol/g)</b>	<b>Fuente</b>
<i>I. guayusa</i>	3,46	0,08	40,71	Bravo et al., (2007)
<i>I. paraguayensis</i>	8,10-9,77	0,148-0,181	762,02-938,59	
<i>I. kudingcha</i>	6,0-15,0	16,3-38,5	98,1-317,2	Zhu et al., (2009)
<i>I. cornuta</i>	8,9	25,1	211,1	Zhu et al., (2009)

La actividad antioxidante del extracto obtenido bajo las condiciones óptimas medida a través de los métodos FRAP y ABTS resultó inferior a otras especies del mismo género (Bravo *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2009), pero en concordancia al

contenido de fenoles totales. Estos resultados han sido previamente demostrados, encontrándose una alta correlación entre los CFT y la actividad antioxidante (Dudonné, *et al.*, 2009).

El contenido de cafeína resultó en el extracto, bajo estas condiciones, de  $2,35 \pm 0,03$  mg/g en base seca, diez veces menor que la concentración obtenida por la decocción reportada Barriga, (2017).

## CAPÍTULO V

### 5.1 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.2 CONCLUSIONES

- Se demostró mediante el diseño factorial  $2^4$  que los factores significativos para la extracción de CFT, en base seca de hojas de *I. guayusa*, fueron relación etanol-agua, temperatura y tiempo de extracción, mientras que la relación sólido-líquido resultó no significativo.
- El modelo polinomio aplicado al proceso de extracción de CFT resultó ser un modelo cuadrático con un buen ajuste de  $R^2=0,9731$ . Las condiciones óptimas propuestas por el modelo fueron validadas experimentalmente y se encontró una cantidad de CFT equivalente a 3,46 g eq. ácido gálico/100g ms de hojas de *I. guayusa*.
- El extracto de *I. guayusa* presentó valores de actividad antioxidante respectivamente de 0.08 mmol/100g y 40.71 mmol/g aplicando los métodos ABTS y FRAP. Estos valores resultaron inferiores a los reportados por otras especies del mismo género pero son coherentes con el contenido de fenoles totales.
- El extracto obtenido bajo las condiciones óptimas presenta un contenido de cafeína de  $2,35 \pm 0,03$  mg/g en base seca, representa una concentración importante que puede aportar a la funcionalidad de los productos a elaborar.

#### 5.3 RECOMENDACIONES

- Replicar el estudio de optimización del proceso de extracción de compuestos fenólicos considerando ulteriores variables relacionadas a la botánica de la especie y a los métodos de recolección comúnmente realizados para los productores (ejemplo. edad de la planta, número de podas, comparación entre hojas jóvenes y más antiguas, etc.). El conjunto de nuevas informaciones obtenidas podría ser relevante para mejorar y estandarizar los métodos de recolección de la especie;
- Considerando los datos preliminares de actividad antioxidante obtenidos, sería oportuno extender la investigación a nuevos ensayos vinculados al daño oxidativo inducido por radiación UV, con la finalidad de proponer eventuales aplicaciones de los extractos en el ámbito de los productos de protección solar;

- Se recomienda investigar, *in vitro* e *in vivo*, el efecto sinérgico de los polifenoles y de la cafeína presentes en *I. guayusa* en el tratamiento de la celulitis.

## VI BIBLIOGRAFÍA

- Carrera, P. F. D. E. (2011). “ Determinación analítica de la cafeína en diferentes productos comerciales .”
- Costa, G., Celis, C., & Gamboa, F. (2016). *Ilex guayusa* ( Aquifoliaceae ): Amazon and Andean Native Plant, (December).
- Estéfano Andrés Calderón Borja. (2017). Investigación y desarrollo de un protector solar empleando como ingrediente activo los agentes antioxidantes en extractos de guayusa ( *Ilex guayusa* Loes ) Estéfano Andrés Calderón Borja Estéfano Andrés Calderón Borja.
- For. Paúl Collahuazo. (2012). Plan de manejo de la especie guayusa (*Ilex guayusa*), 1–45.
- García-ruiz, A., Baenas, N., Benítez-gonzález, A. M., Stinco, C. M., Meléndez-martínez, A. J., Moreno, A., & Ruales, J. (2017). Guayusa ( *Ilex guayusa* L .) new tea : phenolic and carotenoid composition and antioxidant capacity, (November 2016). <https://doi.org/10.1002/jsfa.8255>
- Guntero, V. A., Longo, M. B., Ciparicci, S. A., Martini, R. E., Andreatta, A. E., & Francisco, S. (2015). Comparación de métodos de extracción de polifenoles a partir de residuos de la industria vitivinícola, (1).
- J. Villacís-Chiriboga, A. García-Ruiz, Fabián León-Tamariz<sup>2</sup>, J. R. (2016). GUAYUSA ( *Ilex guayusa* Loes .) POLYPHENOL CONTENT APPROACH AND ANTIOXIDANT ACTIVITY BY THIN- LAYER CHROMATOGRAPHY ( TLC ), 2.
- JUAN DANIEL MOSQUERA BOLAÑOS. (2015). Estudio Preliminar de Diversidad Genética de *Ilex guayusa* en la Amazonía ecuatoriana mediante marcadores moleculares ISSR.
- May, T., Radice, M., Del, H., Revista, S., & Cultural, A. (2016). Manzanilla de Colón nishka : Shuk sami yachaykunamanta yachaykunatami kay Universidad Estatal Amazónica yachakukkuna hanpirinamanta kay hanpi yurakunamanta yachanakun , cashnallata.
- Pardau, M. D., Pereira, A. S. P., Serem, J. C., & Bester, M. J. (2017). Antioxidant and anti-inflammatory properties of *Ilex guayusa* tea preparations: a comparison to *Camellia sinensis* teas. *Food & Function*, 8, 4601–4610. <https://doi.org/10.1039/c7fo01067b>
- Quiñones, M., & Aleixandre, M. M. A. (2012). Los polifenoles , compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular COMPOUNDS WITH

- BENEFICIAL EFFECTS, 27(1), 76–89. <https://doi.org/10.3305/nh.2012.27.1.5418>
- Radice, M., & Vidari, G. (2005). Caracterización fitoquímica de la especie *Ilex guayusa* Loes . y elaboración de un prototipo de fitofármaco de interés comercial, (Figura 1), 3–11.
- 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: Revista de Ciencias de la Vida*, 6(2), 3-11.
- García-Ruiz, A., Baenas, N., Benítez- González, A. M., Stinco, C. M., Meléndez-Martínez, A. J., Moreno, D. A., & Ruales, J. (2017). Guayusa (*Ilex guayusa* L.) new tea: phenolic and carotenoid composition and antioxidant capacity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(12), 3929-3936.
- Pardau, M. D., Pereira, A. S., Apostolides, Z., Serem, J. C., & Bester, M. J. (2017). Antioxidant and anti-inflammatory properties of *Ilex guayusa* tea preparations: a comparison to *Camellia sinensis* teas. *Food & function*, 8(12), 4601-4610.
- Di Ferdinando, M., Brunetti, C., Agati, G., & Tattini, M. (2014). Multiple functions of polyphenols in plants inhabiting unfavorable Mediterranean areas. *Environmental and experimental botany*, 103, 107-116.
- Villacís- Chiriboga, J., García- Ruiz, A., Baenas, N., Moreno, D. A., Meléndez-Martínez, A. J., Stinco, C. M., Jerves-Andrade, L, León-Tamariz, F, Ortiz-Ulloa, J and Ruales, J. (2018). Changes in phytochemical composition, bioactivity and in vitro digestibility of guayusa leaves (*Ilex guayusa* Loes.) in different ripening stages. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(5), 1927-1934.
- Abreu-Naranjo, R., Arteaga-Crespo, Y., Bravo-Sanchez, L. R., Pérez-Quintana, M. L., & García-Quintana, Y. (2018). Response surface methodology for optimisation of total polyphenol content and antioxidant activity of extracts from *Maytenus macrocarpa* bark by means of ultrasound-assisted extraction. *Wood science and technology*, 52(5), 1359-1376
- Villacís- Chiriboga, J., García- Ruiz, A., Baenas, N., Moreno, D. A., Meléndez-Martínez, A. J., Stinco, C. M., Jerves-Andrade, L., León-Tamariz, F., Ortiz-Ulloa, J., & Ruales, J. (2018). Changes in phytochemical composition, bioactivity and in vitro digestibility of guayusa leaves (*Ilex guayusa* Loes.) in different ripening stages. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(5), 1927-1934.
- Yu, J., Ahmedna, M., & Goktepe, I. (2005). Effects of processing methods and extraction solvents on concentration and antioxidant activity of peanut skin phenolics. *Food*

- chemistry, 90(1-2), 199-206.
- Kim, J. M., Chang, S. M., Kim, I. H., Kim, Y. E., Hwang, J. H., Kim, K. S., & Kim, W. S. (2007). Design of optimal solvent for extraction of bio-active ingredients from mulberry leaves. *Biochemical Engineering Journal*, 37(3), 271-278.
- Makris, D. P., Boskou, G., & Andrikopoulos, N. K. (2007). Recovery of antioxidant phenolics from white vinification solid by-products employing water/ethanol mixtures. *Bioresource technology*, 98(15), 2963-2967.
- Shan, B., Cai, Y. Z., Sun, M., & Corke, H. (2005). Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(20), 7749-7759.
- Surveswaran, S., Cai, Y. Z., Corke, H., & Sun, M. (2007). Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. *Food Chemistry*, 102(3), 938-953.
- Cai, Y., Luo, Q., Sun, M., & Corke, H. (2004). Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life sciences*, 74(17), 2157-2184.
- Chankuap, F. (2014). Plan de manejo de la especie guayusa. *Plantas medicinales*.
- Lewis, w. K.-L. (1991). Ritualistic use of the holly *Ilex guayusa* by Amazonian Jivaro Indians. *Journal of Ethnopharmacology*., 33, 25-30.
- Dudonné, S., Vitrac, X., Coutiere, P., Woillez, M., & Mérillon, J. M. (2009). Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(5), 1768-1774.
- Barriga Coronel, G. (2017). Determinación del contenido de cafeína en infusiones de hoja de guayusa (*Ilex guayusa*) bajo dos condiciones de secado (Bachelor's thesis, Quito: Universidad de las Américas, 2017).
- Salvador, A. T., Mosquera, J., Jaramillo, V., Arahana, V., & Torres, M. D. L. (2017). c, 9.