



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

DIRECCIÓN DE POSGRADO

MAESTRÍA EN AGROINDUSTRIA MENCIÓN TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

MODALIDAD: INFORME DE INVESTIGACIÓN

Título:

**“OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN
HIDROALCOHÓLICA A PARTIR DE LA GUAYUSA (*Ilex guayusa Loes*)
EN FUNCIÓN DEL CONTENIDO DE POLIFENOLES TOTALES Y
ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE”.**

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Magister en Agroindustria
mención Tecnología de Alimentos

Autor

Ing. Darwin Vicente Granja Guerrero

Tutor

Ing. Ana Maricela Través Castellano Mg.

LATACUNGA – ECUADOR

2022

APROBACIÓN DEL TUTOR

En mi calidad de Tutor del Trabajo de Titulación “Optimización del proceso de extracción hidroalcohólica a partir de la guayusa (*Ilex guayusa Loes*) en función del contenido de polifenoles totales y actividad antioxidante”, presentado por Ing. Darwin Vicente Granja Guerrero, para optar por el título magister en Agroindustria mención Tecnología de Alimentos.

CERTIFICO

Que dicho trabajo de investigación ha sido revisado en todas sus partes y se considera que reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometidos a la presentación para la valoración por parte del Tribunal de Lectores que se designe y su exposición y defensa pública.

Latacunga, 04 julio, 2022



Ing. Mg. Ana Maricela Trávez Castellano
CC: 0502270937

APROBACION TRIBUNAL

El trabajo de Titulación: “Optimización del proceso de extracción hidroalcohólica a partir de la guayusa (*Ilex guayusa Loes.*) en función del contenido de polifenoles totales y actividad antioxidante”, ha sido revisado, aprobado y autorizado su impresión y empastado, previo a la obtención del título de Magister en Agroindustria mención Tecnología de Alimentos; El presente trabajo reúne los requisitos de fondo y forma para que el estudiante pueda presentarse a la exposición y defensa.

Latacunga, 04 julio 2022

.....
Ing. MsC. Hernán Patricio Bastidas Pacheco
CC. 0501886261
Presidente del tribunal

.....
Ing. Mg. Franklin Antonio Molina Borja
CC. 0501821433
Lector 2

.....
Quim. Mg. Jaime Orlando Rojas Molina
CC. 0502645435
Lector 3

DEDICATORIA

Es meritorio dar la razón a la abnegación de todos los que conforman la sustancia de mi sublime hogar al apoyarme siempre en este tiempo de estudio, en el cual tuve cariño y comprensión. Por eso este trabajo de titulación va dedicado a lo crecidamente hermoso que me ha dado Dios a mi esposa Karlita y a mis tres queridos hijos Joseph, Martín y Sebastián.

Darwin Vicente Granja Guerrero

AGRADECIMIENTO

Gratitud y reconocimiento a mi querida alma mater la Universidad Técnica de Cotopaxi, por haberme dado la oportunidad de adquirir nuevos conocimientos en este tiempo de estudio donde se compartió sapiencias científicas que nos impartieron los docentes, para los que de igual manera va mi correspondencia por su esmerada entrega y dedicación al transmitir sus cátedras. También agradecer a mis compañeros y amigos que compartieron en esta etapa de estudio, donde se estrecharon lasos de unidad y amistad, apoyándonos en el desarrollo de la maestría

Darwin Vicente Granja Guerrero

RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

Quien suscribe que asume la autoría de los contenidos y los resultados obtenidos en el presente trabajo de titulación.

Latacunga, 4 de julio, 2022




Ing. Darwin Vicente Granja Guerrero
CC: 0501691828

RENUNCIA DE DERECHOS

Quien suscribe, cede los derechos de auditoría intelectual total y/o parcial del presentetrabajo de titulación a la Universidad Técnica de Cotopaxi.

Latacunga, 4 de julio, 2022

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Darwin Vicente Granja Guerrero', is written over a horizontal line.

Ing. Darwin Vicente Granja Guerrero
CC: 0501691828

AVAL DEL VEEDOR

Quien suscribe, declara que el presente Trabajo de Titulación: **“OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN HIDROALCOHÓLICA A PARTIR DE LAGUAYUSA (*Ilex guayusa* Loes.) EN FUNCIÓN DEL CONTENIDO DE POLIFENOLES TOTALES Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE”**, contiene las correcciones a las observaciones realizadas por los lectores en sesión científica del tribunal.

Latacunga, 04 julio, 2021


Ing. Mg. Hernán Patricio Bastidas Pacheco
CC. 0501886261

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI
DIRECCIÓN DE POSGRADO
MAESTRIA EN AGROINDUSTRIA MENSIÓN TECNOLOGÍA DE
ALIMENTOS

Título: Optimización del proceso de extracción hidroalcohólica a partir de la guayusa (*Ilex guayusa* Loes.) en función del contenido de polifenoles totales y actividad antioxidante.

Autor: Ing. Darwin Vicente Granja Guerrero

Tutor: Ing. Mg. Ana Maricela Través Castellano

RESUMEN

La presente investigación se realizó con el objetivo de optimizar el proceso de extracción hidroalcohólica a través de la maceración de la sustancia cruda de la hoja de guayusa, luego de ser sometido a un proceso de limpieza, para en seguida ser deshidratada en una estufa a 40°C. Los factores ensayados fueron el tiempo (6h, 15h, 24h), la temperatura (30°C, 45°C, 60°C), y la concentración de etanol (60%, 75%, 90%); en la extracción se efectuaron 27 repeticiones que estableció el programa Desig Expert 8.0.6. A continuación se determinó los metabolitos secundarios a través del perfil fitoquímico evidenciando en el extracto etanólico y acuoso mayor cantidad de compuestos fenólicos y flavonoides. Se evaluó el contenido de polifenoles totales de acuerdo a la técnica de FOLIN descrita por Slinkard y Sigleton. Se determinó la capacidad antioxidante a través del procedimiento de FRAP propuesto por Benzie y Strain. Para la optimización numérica se comprobó que valores alcanzados mediante la experimentación (polifenoles totales 420,452mg/g y 1124,56 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ de capacidad antioxidante) son superiores a los valores de la optimización numérica que arroja el software (408,452g/g y 1099,56 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$), el extracto tuvo un aroma característico de la planta, de color verde oscuro, con un aspecto uniforme y homogéneo con un pH de 5.

Palabras claves: Extracción, flavonoides, hidroalcohólicas, polifenoles, antioxidantes.

TECHNICAL UNIVERSITY OF COTOPAXI
POSTGRADUATE MANAGEMENT
MASTER'S DEGREE IN AGRIBUSINESS FOOD TECHNOLOGY

Title: “Optimization of the hydroalcoholic extraction process from guayusa (Ilex guayusa Loes.) depending on the content of total polyphenols and antioxidant activity”

Author: Eng. Darwin Vicente Granja Guerrero

Tutor: Eng. Mg. Ana Maricela Trávez Castellano

SUMMARY

The present investigation was carried out with the objective of optimizing the hydroalcoholic extraction process through the maceration of the raw substance of the guayusa leaf, after being subjected to a cleaning process, to then be dehydrated in an oven at 40°C. . The factors tested were time (6h, 15h, 24h), temperature (30°C, 45°C, 60°C), and ethanol concentration (60%, 75%, 90%); in the extraction, 27 repetitions were made, established by the Desig Expert 8.0.6 program. Next, the secondary metabolites were determined through the phytochemical profile, evidencing in the ethanolic and aqueous extract a greater amount of phenolic compounds and flavonoids. Total polyphenol content was evaluated according to the FOLIN technique described by Slinkard and Sigleton. The antioxidant capacity was determined through the FRAP procedure proposed by Benzie and Strain. For the numerical optimization, it was found that the values achieved through experimentation (total polyphenols 420.452mg/g and 1124.56 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ of antioxidant capacity) are higher than the values of the numerical optimization provided by the software (408.452g/g and 1099. 56 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$), the extract had a characteristic aroma of the plant, dark green in color, with a uniform and homogeneous appearance at a pH of 5.

Keywords: Extraction, flavonoids, hydroalcoholic, polyphenols, antioxidants.

Nelson Wilfrido Guagchinga Chicaiza con cédula de identidad número 0503246415 Magister en: Enseñanza del Idioma Inglés como Lengua Extranjera con número de registro de la SENESCYT 1010-2019-2041252; CERTIFICO haber revisado y aprobado la traducción al idioma Inglés del resumen del trabajo de investigación con el título: “Evaluación de la calidad microbiológica en función de la norma INEN 2395 en yogures artesanales expandido en la feria de la plaza Jesús Camañero parroquia Matriz del cantón Alausí” de Arcos Guamán Talía Manuela, aspirante a magister en Maestría en Agroindustria Mención Tecnología de Alimentos.

Latacunga, julio, 4, 2022


.....
M.Sc Nelson Wilfrido Guagchinga Chicaiza
C.C. 0503246415

ÍNDICE DE CONTENIDO

APROBACIÓN DEL TUTOR.....	ii
APROBACION TRIBUNAL	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA	vi
RENUNCIA DE DERECHOS.....	vii
AVAL DEL VEEDOR.....	viii
RESUMEN	ix
SUMMARY	x
ÍNDICE DE CONTENIDO	xi
ÍNDICE DE TABLAS	xv
ÍNDICE DE GRÁFICAS	xv
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xvi
CAPITULO I	1
INTRODUCCIÓN	1
1.1. Antecedentes:	2
1.2. Justificación	3
1.3. Planteamiento del problema.....	4
1.4. Hipótesis	5
1.4.1. Hipótesis nula	5
1.4.2. Hipótesis alternativa	5
1.5. Objetivos de la investigación	6
1.5.1. Objetivo general.....	6
1.5.2. Objetivos específicos	6
Tareas:.....	7
Etapas:.....	7
CAPÍTULO II	8
FUNDAMENTACIÓN	8
2.1. Fundamentación científico técnica.....	8
2.1.1. Guayusa (Ilex Guayusa Loes).....	8
2.1.2. Clasificación Taxonómica	8

2.1.3.	Descripción botánica	8
2.1.4.	Principios activos de la guayusa	9
2.1.5.	Propiedades medicinales	9
2.1.6.	Extracto hidroalcohólico	9
2.1.7.	Utilización de extractos vegetales en la industria alimentaria	9
2.1.8.	Actividad antioxidante	10
2.1.9.	Polifenoles	10
2.1.10.	Secado de las plantas	10
2.1.10.1.	Secado natural	10
2.1.10.2.	Secado artificial	11
2.1.11.	Conservación de las plantas secas	11
2.1.11.1.	Recipientes idóneos para su conservación	11
2.1.12.	Metabolitos secundarios	11
2.1.12.1.	Alcaloides	11
2.1.12.2.	Catequinas	12
2.1.12.3.	Resinas	12
2.1.12.4.	Saponinas	12
2.1.12.5.	Compuestos fenólicos	12
2.1.12.6.	Aminoácidos libres / Aminas	12
2.1.12.7.	Quinonas / Benzoquinonas	13
2.1.12.8.	Flavonoides	13
2.1.12.9.	Mucilagos	13
2.1.12.10.	Principios amargos	13
2.2.	Fundamentación del estado del arte	14
CAPITULO III		16
MATERIALES Y MÉTODOS		16
3.1.	Metodología	16
3.1.1.	Tipos de investigación:	16
3.1.1.1.	Investigación cuantitativa	16
3.1.1.2.	Investigación descriptiva	16
3.1.1.3.	Investigación experimental	16
3.1.2.	Técnicas	16

3.1.2.1.	Observación	17
3.1.2.2.	Fichas	17
3.2.	Investigación descriptiva.....	18
3.2.1.	Materiales	18
3.2.2.	Método de elaboración	18
3.2.2.1.	Recepción de la materia prima.....	18
3.2.2.2.	Selección.....	18
3.2.2.3.	Lavado y desinfectado	19
3.2.2.4.	Secado.....	19
3.2.2.5.	Deshidratado	19
3.2.2.6.	Molido-tamizado.....	19
3.2.2.7.	Tamizaje fitoquímico.....	19
3.2.2.7.1.	Compuestos grasos. Ensayo de Sudan	19
3.2.2.7.2.	Determinación de alcaloides. Ensayo de Dragendorff	20
3.2.2.7.3.	Agrupamiento lactónico. Ensayo de Baljet	20
3.2.2.7.4.	Triterpenos / Esteroides. Ensayo de Liberman – Burchard	20
3.2.2.7.5.	Catequinas. Ensayo de Catequinas	20
3.2.2.7.6.	Resinas. Ensayo de resinas.....	20
3.2.2.7.7.	Azúcares reductores. Ensayo de Fehling.....	21
3.2.2.7.8.	Saponinas. Ensayo de Espuma	21
3.2.2.7.9.	Compuestos fenólicos. Ensayo de Cloruro Férrico (III)	21
3.2.2.7.10.	Aminoácidos libres / aminos. Ensayo de Nihidrina	21
3.2.2.7.11.	Quinonas / Benzoquinonas. Ensayo de Bortranger	21
3.2.2.7.12.	Flavonoides. Ensayo de Shinona.....	21
3.2.2.7.13.	Glucósidos cardiotónicos. Ensayo de Kedde	22
3.2.2.7.14.	Mucílagos. Ensayo de Mucílagos.....	22
3.2.2.7.15.	Principios amargos. Ensayo de Principios Amargos.....	22
3.2.2.8.	Diseño experimental	22
3.2.2.9.	Obtención del extracto	22
3.2.2.10.	Ensayo de Frap	22
3.2.2.11.	Determinación del contenido de polifenoles totales	23
3.2.2.12.	Diagrama de flujo	25

3.2.2.13. Presupuesto	26
3.3. Investigación experimental	27
3.3.1. Diseño experimental	27
3.3.2. Factores de estudio	27
CAPÍTULO IV.....	28
APLICACIÓN Y/O VALIDACION DE LA PROPUESTA	28
4.1. Resultados	28
4.1.1. Perfil fitoquímico.....	28
4.1.2. Matriz experimental.....	29
4.1.3. Modelo codificado de la cantidad de polifenoles totales.....	30
4.1.4. Modelo codificado del poder antioxidante reductor de hierro...	31
4.1.5. Optimización numérica del proceso de extracción hidroalcohólico de ladroga cruda.....	33
4.1.6. Caracterización del extracto optimizado	35
4.2. Discusión de resultados.....	35
4.3. Evaluación de expertos	37
4.3.1. Aval del experto.....	37
AVAL DEL EXPERTO	37
4.3.2. Aval del usuario.....	38
AVAL DEL USUARIO	38
4.4. Evaluación de impactos o resultados	39
4.4.1. Técnicos.....	39
4.4.2. Sociales	39
4.4.3. Ambientales	39
CAPÍTULO V.....	40
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	40
5.1. Conclusiones	40
5.2. Recomendaciones	41
CAPÍTULO VI.....	42
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	42
CAPÍTULO VII.....	49
ANEXOS	49

7.1. Tamizaje fitoquímico	49
7.1.1. Extracto etéreo	49
7.1.2. Extracto etanólico	50
7.1.3. Extracto acuoso.....	54

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Actividades y sistema de tareas en relación a los objetivos planteados.....	7
Tabla 2 Etapas del desarrollo del proyecto	7
Tabla 3 Clasificación taxonómica de la guayusa (<i>Ilex guayusa</i> Loes).....	8
Tabla 4 Materiales empleados durante la investigación.....	18
Tabla 5 Presupuesto de la investigación	26
Tabla 6 Descripción del diseño superficie de respuesta.....	27
Tabla 7 Resultado del tamizaje fitoquímico de los extractos etéreo, etanólico y acuoso de las hojas de guayusa.	28
Tabla 8 Matriz experimental para la evaluación de polifenoles totales y actividad antioxidante reductora de hierro de las hojas de guayusa.	29
Tabla 9 Parámetros del modelo codificado de la cantidad de polifenoles totales. 30	
Tabla 10 Parámetros del modelo codificado del poder antioxidante reductor del hierro.	32
Tabla 11 Restricciones para la optimización de la extracción.	33
Tabla 12 Solución optimizada que cumple con las condiciones.	34
Tabla 13 Valores óptimos arrojados por el software y los resultados obtenidos experimentalmente.	35
Tabla 14 Caracterización del extracto hidroalcohólico optimizado de la droga cruda de guayusa	35

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfico 1 Contenido de polifenoles totales.	31
Gráfico 2 Contenido del poder antioxidante reductor del hierro.	33
Gráfico 3 Relación del optimizado.....	34

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1 Obtención y empackado de la droga cruda de guayusa	49
Anexo 2 Compuestos grasos, ensayo de Sudán (1-5 de izquierda a derecha).	49
Anexo 3 Alcaloides, ensayo de Dragendorff (1-5 de izquierda a derecha).	49
Anexo 4 Triterpenos/esteroides, ensayo de Lieberman B. (1-5 de izquierda a derecha).....	50
Anexo 5 Agrupamiento lactónico, ensayo de Baljet (1-5 de izquierda aderecha).50	
Anexo 6 Alcaloides, ensayo de Dragendorff (1-5 de izquierda a derecha).	50
Anexo 7 Triterpenos/esteroides, ensayo de Lieberman B. (1-5 de izquierda a derecha).....	51
Anexo 8 Agrupamiento lactónico, ensayo de Baljet (1-5 de izquierda aderecha).51	
Anexo 9 Ensayo de Catequinas.....	51
Anexo 10 Ensayo de Resinas (1-5 de izquierda a derecha).	51
Anexo 11 Azúcares reductores, ensayo de Fehling (1-5 de izquierda aderecha). 52	
Anexo 12 Saponinas, ensayo de Espuma (1-5 de izquierda a derecha).....	52
Anexo 13 Compuestos fenólicos, ensayo de Cloruro Férrico (1-5 de izquierdaa derecha).....	52
Anexo 14 Aminoácidos libres/ aminas, ensayo de Nihidrina (1-5 de izquierdaa derecha).....	53
Anexo 15 Quinonas/ benzoquinonas, ensayo de Bortranger (1-5 de izquierdaa derecha).....	53
Anexo 16 Flavonoides, ensayo de Shinoda (1-5 de izquierda a derecha).....	53
Anexo 17 Glucósidos cardiotónicos, ensayo de Kedde (1-5 de izquierda a derecha).....	54
Anexo 18 Ensayo de Antocianidina (1-5 de izquierda a derecha).....	54
Anexo 19 Alcaloides, ensayo de Dragendorff (1-5 de izquierda a derecha).	54
Anexo 20 Azúcares reductores, ensayo de Fehling (1-5 de izquierda aderecha). 55	
Anexo 21 Saponinas, ensayo de Espuma (1-5 de izquierda a derecha).....	55
Anexo 22 Compuestos fenólicos, ensayo de Cloruro Férrico (1-5 de izquierdaa derecha).....	55
Anexo 23 Flavonoides, ensayo de Shinoda (1-5 de izquierda a derecha).....	56
Anexo 24 Extracto optimizado del extracto hidroalcohólico de la droga crudade guayusa.....	56

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

Este trabajo esta direccionado en la línea de investigación “Desarrollo, seguridad alimentaria y procesos industriales” y la sub línea de investigación “Optimización de procesos tecnológicos agroindustriales”.

La guayusa (*Ilex guayusa* Loes.) es una planta nativa de la amazonia, su cultivo es tradicional y se remonta a siglos atrás, la misma que ha sido utilizada por los pueblos aborígenes de la época como una planta medicinal y energética, que era considerada como sagrada.

La guayusa es muy importante para la economía de las comunidades indígenas y pequeños productores, pero también es favorable por sus compuestos químicos para las industrias. La sociedad puede combatir o prevenir diversas enfermedades, en virtud del conocimiento adquirido sobre las plantas medicinales,

La relevancia de esta planta, consiste en su riqueza como parte cultural, y además ha sido tomando en cuenta en varias investigaciones y análisis de la composición química, con el propósito de crear patentes con un juicio de valor y alcanzar productos activos inocuos para mejorar la salud de las personas.

Los extractos hidroalcohólicos son ricos en principios activos, en ellos se pueden encontrar a los polifenoles y antioxidantes reductores de hierro, los mismos que han suscitado el interés de la ciencia por sus propiedades, así como su cualidad para proteger al ser humano de diversas enfermedades al ceder un electrón y evitar la oxidación de las células.

Por lo antes expuesto la presente investigación tiene como objetivo optimizar extractos hidroalcohólicos de compuestos bioactivos de la guayusa, orientado a la obtener antioxidantes reductores de hierro y polifenoles totales. La

agroindustria tiene la posibilidad de estar en constante innovación de alimentos funcionales, mediante la sustitución de aditivos químicos por naturales; satisfaciendo las necesidades del consumidor.

1.1. Antecedentes:

Manzano, et al. (2018) investigaron los métodos de secado en las propiedades físicas y químicas de las hojas de guayusa, discutiendo los efectos del secado al aire (AD), horno de convección (CO) y solar (SOD). Consideraron la concentración de las cenizas: totales, insolubles en ácido, solubles en agua, humedad residual y contenido de cafeína. Analizaron la presencia de compuestos químicos en los extractos; detectando mayor cantidad en el etanólico y acuoso. Las hojas secadas al CO fueron de mayor contenido de cafeína (3,71%) y menor tiempo de secado (13 h).

Núñez, et al. (2020) estudiaron la optimización del proceso de extracción de compuestos fenólicos de la angiosperma marina *Thalassia testudinum*. Usaron el método de Box y Hunter, evaluaron 3 factores (velocidad de agitación, relación material vegetal/% alcohol y % de etanol). El contenido de polifenoles totales lo determinaron por el método de Folin-Ciocalteu. Las condiciones óptimas en las variables fueron: 1/11.5 p: v, 60% de EtOH y 800 r.p.m., polifenoles totales 25.60 mg/g de extracto seco; con potencial uso en la industria.

Luisetti, Lucero & Ciappini (2020) estudiaron la optimización de la extracción de compuestos fenólicos bioactivos de quinoa (*Chenopodium quinoa Willd*). Destacaron la importancia de los compuestos fenólicos. Evaluaron como parámetros la temperatura de secado (40, 60 y 80°C), relación líquido/sólido (20:1, 30:1 y 40:1 L/S) y concentración de etanol (30, 50, 70% v/v). Cuantificaron los polifenoles por método de Folin-Ciocalteu, obtuvieron resultados entre 179 y 229 mg de AGE/100 g de quinoa. Relacionaron los predichos del modelo con los valores experimentales (93,62%). La relación L/S óptima fue 31:1, 54° C temperatura y concentración de etanol 39%.

Guevara & Gómez (2020) reconocieron los metabolitos secundarios presentes en las hojas de *Ilex guayusa Loes*. Utilizaron el tamizaje fitoquímico

preliminar, fraccionamiento por cromatografía de columna de los diferentes metabolitos secundarios y análisis de estructura molecular por cromatografía de gases acoplada a masas HPLC. Detectaron que las hojas de guayusa contienen alcaloides, taninos, y flavonoides, que podrán ser utilizados en industrias farmacéuticas usando sus propiedades y los metabolitos secundarios aportarían beneficios a la sociedad.

Torres, et al. (2017) seleccionaron la variedad de mango, forma de extracción, solvente y concentración que permitió extraer la mayor cantidad de compuestos bioactivos. Extrajeron las muestras por maceración y digestión, con 3 concentraciones de hidroalcohólicas y diferentes solventes (hexano, éter dietílico y acetona). Evaluaron el rendimiento y el contenido de sustancias fenólicas (Folin Ciocalteu) y la capacidad antioxidante (método DPPH). Obtuvieron mayor rendimiento en la maceración con disolución hidroalcohólica al 90%, concentración de compuestos fenólicos, pero la mayor capacidad antioxidante la obtuvieron por digestión con disolución al 50%.

1.2. Justificación

Las plantas son una riqueza, que ofrece la naturaleza al hombre desde tiempos inmemoriales. El Ecuador cuenta con el 10% de la fauna que existe en el planeta; la región amazónica, posee alrededor de 8.200 especies vegetales (Gobierno del encuentro, 2020).

En los últimos años se ha impulsado el interés por la investigación de compuestos bioactivos de origen natural, sin embargo, muy poco se conoce sobre las plantas. Las comunidades amazónicas del Ecuador, por su conocimiento de la riqueza natural, han aprovechado de la guayusa (*Ilex guayusa Loes*), como energizante, antioxidante, antiinflamatorio, etc.

La Agroindustria busca nuevas tecnologías y procedimientos con los que se pueda reducir costos de producción y productos innovadores, de manera que estos alimentos funcionales, además de sus propiedades nutricionales, proporcionen un mejor estado de salud y reduzcan los factores de riesgo que provocan la aparición de enfermedades.

En función de lo expuesto la investigación permitirá optimizar la extracción

hidroalcohólica de la guayusa en base a su contenido de polifenoles totales y actividad antioxidante, además los resultados de la presente investigación contribuyen a la industria para ampliar las alternativas para sustituir los aditivos sintéticos por naturales y de esta manera contribuir con conocimientos fundamentales en el desarrollo de nuevos productos con efectividad en la agroindustria.

1.3. Planteamiento del problema

Nuestro país cuenta con una amplia diversidad de especies vegetales, las cuales han sido solo estudiadas únicamente desde el punto de vista agronómico y nutricional, siendo escasa o nula la información química; por lo que se desconoce su posible potencial biológico. Por esta razón es necesario aprovechar especies como la guayusa, para determinar compuestos biológicamente activos de gran importancia.

Uno de los problemas más importantes que afecta la salud, es el incremento del uso de aditivos alimentarios (antioxidantes, colorantes, emulsificadores, estabilizadores de sabor, solventes, agentes de glaseado, edulcorantes, conservadores y agentes espesantes) utilizados para modificar las características físicas, químicas, biológicas o sensoriales de los alimentos. Su mal uso y otros factores relacionados han dado lugar, en las últimas décadas, a la desarrollar enfermedades. La desinformación actual en las personas con respecto a los extractos vegetales impide su aplicación como aditivos en la producción intensiva.

El ritmo acelerado de la sociedad, pueden producir unos compuestos llamados radicales libres, que pueden producir un deterioro de los tejidos u órganos como el corazón o el cerebro e incluso provocar cáncer. Los polifenoles y antioxidantes pueden tener esa reacción, neutralizando y evitando daños en el organismo, previniendo también el envejecimiento.

La investigación del extracto de guayusa busca caracterizar los compuestos bioactivos presentes en la planta, presentando como alternativa para agregar valor a los productos de diferentes categorías, promoviendo un creciente interés de las industrias globales de alimentos que ayuden a suplir la demanda del mercado de alimentos saludables. La guayusa es una planta con un gran contenido de

antioxidantes, cafeína y vitaminas. La falta de implementación de tecnologías en la industria ha impedido el avance tecnológico

1.4. Hipótesis

1.4.1. Hipótesis nula

Ho: La concentración de etanol, tiempo y temperatura de extracción no influyen en la optimización del proceso de extracción hidroalcohólica a partir de la guayusa (*Ilex guayusa Loes.*).

1.4.2. Hipótesis alternativa

H1: La concentración de etanol, tiempo y temperatura de extracción influyen en la optimización del proceso de extracción hidroalcohólica a partir de la guayusa (*Ilex guayusa Loes.*).

1.5. Objetivos de la investigación

1.5.1. Objetivo general

- Optimizar el proceso de extracción hidroalcohólica a partir del amaranto (*Ilex guayusa Loes.*) en función del contenido de polifenoles y actividad antioxidante.

1.5.2. Objetivos específicos

- Determinar el perfil fitoquímico de la guayusa mediante ensayos cualitativos.
- Optimizar el proceso de extracción de los compuestos bioactivos de la guayusa en función del contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante.
- Caracterizar el extracto hidroalcohólico optimizado de la droga cruda.

Tareas:

Tabla 1 Actividades y sistema de tareas en relación a los objetivos planteados

Objetivo	Actividad (tareas)
Determinar el perfil fitoquímico de la guayusa mediante ensayos cualitativos.	<i>Selección de la planta Limpieza de la guayusa. Deshidratado de la mata Obtención de la droga cruda. Diseño experimental Maceración Desarrollo de la marcha fitoquímica mediante ensayos cualitativos.</i>
Optimizar el proceso de extracción de los compuestos bioactivos de la guayusa en función del contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante	<i>Determinar el contenido de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu y la actividad antioxidante por la técnica de FRAP. Realizar los cálculos conforme a las ecuaciones de FRAP y Folin-Ciocalteu. los resultados obtenidos ingresar en el software. Desarrollar el predicho optimizado por el programa. Comparar el valor experimental con el predicho.</i>
Caracterizar el extracto hidroalcohólico optimizado de la droga cruda.	<i>Determinar a través de ensayos de laboratorio las características sensoriales y fisicoquímicas. Registrar los valores conseguidos en el laboratorio. Discutir los resultados obtenidos con estudios realizados.</i>

Elaborado por: Autor (Granja; 2022)

Etapas:

Tabla 2 Etapas del desarrollo del proyecto

Etapas	Descripción
Identificación	<i>Ver la factibilidad del proyecto. Cronograma de actividades para alcanzar los objetivos planteados.</i>
Planificación	<i>Plan del proyecto Revisión bibliográfica.</i>
Ejecución	<i>Elaboración de la parte experimental.</i>
Seguimiento	<i>Supervisión y control de las tareas para garantizar el desarrollo.</i>
Cierre	<i>Revisión y aprobación del tutor y tribunal. Impresión y empastado del documento para su publicación.</i>

Elaborado por: Autor (Granja; 2022)

CAPÍTULO II

FUNDAMENTACIÓN

2.1. Fundamentación científico técnica

2.1.1. *Guayusa (Ilex Guayusa Loes)*

Es un árbol perenne, nativo de la selva amazónica con una reproducción asexual, además es cultivada en zonas subtropicales de la región andina. Se la puede encontrar en Bolivia, Brasil, Perú, Colombia y Ecuador (Muñoz, et al., 2018). La planta en el país se localiza en las provincias de: Sucumbíos, Napo, Pastaza, Morona Santiago, Zamora Chinchipe, Pichincha y Tungurahua (Villacís, 2017).

2.1.2. *Clasificación Taxonómica*

Tabla 3 *Clasificación taxonómica de la guayusa (Ilex guayusa Loes)*

Reino	<i>Plantae</i>
Clase	<i>Magnoliophyta</i>
Subclase	<i>Magnoliidae</i>
Superorden	<i>Asteranae</i>
Orden	<i>Aquifoliales</i>
Familia	<i>Aquifoliaceae</i>
Género	<i>Ilex</i>
Especie	<i>I. guayusa</i>
Nombre científico	<i>Ilex guayusa Loes</i>
Nombre común	<i>Guayusa</i>

Elaborado por: (Maldonado, 2021)

2.1.3. *Descripción botánica*

La guayusa posee un tallo de corteza blanca, lisa, ramas flexibles, con una copairregular (Montaño, et al., 2019), de exuberantes hojas verde oscuras, oblongo-elípticas de textura semejante a los del cuero, rústicas, alternas sin estípulas, coriáceas, dentadas, sin pubescencias en el haz y envés, ápice acuminado, base aguda, con un tamaño de 15-21x 5-7,5 cm, pecíolo corto de 1 cm de largo (Caranqui & Humanante, 2011). Las flores son de corola blanca verdosa, de pétalos obtusos,

estambres proporcionales al número de pétalos, anteras oblongas, ovario sésil esférico con 4-6 cavidades. Sus frutos son bayas esféricas de casi 1 cm de ancho y color verde (Montaño, et al., 2019). Con una raíz pivotante ramificada.

2.1.4. Principios activos de la guayusa

Contiene 2-3% de cafeína (Teneda, Ah-Hen, & Lemus, 2017), ácidos clorogénicos (que ayudan a mantener el peso y la salud cardiovascular), aminoácidos esenciales, antioxidantes (protegen contra el envejecimiento celular), estimulantes (methylxantina alcaloidea, theofilina y teobromina), energizante, alcaloides.

2.1.5. Propiedades medicinales

Es una planta con propiedades medicinales, capaz de combatir la artritis, el reuma, la gripe, es un expectorante, emenagoga, estimulante, diurética, hipoglucémica, empleada en tratamientos posparto, sirve contra picaduras de serpiente, vitaminas (C y D) y minerales (magnesio, calcio, zinc, potasio), (Echeverri, 2022).

2.1.6. Extracto hidroalcohólico

Es la forma la extracción más selectiva y completa posible de los componentes activos de manera muy concentrada, mediante la maceración de la droga de la planta en un solvente apropiado (alcohol-agua). Esta maceración puede ser estática (parada) o dinámica (con movimiento), con agitación (movimiento en reactor) de ambas, su eficiencia va a estar relacionada directamente con el % del disolvente, tiempo y temperatura (Rodríguez & Alvarez, 2021).

2.1.7. Utilización de extractos vegetales en la industria alimentaria

La industria busca innovar productos con propiedades saludables. Los extractos pueden minimizar el ataque microbiano, retrasar el enranciamiento y ralentizar la pérdida de color en los alimentos. Pueden ser utilizados como saborizantes, colorantes y antioxidantes naturales, así como enriquecedores del alimento con activos naturales de plantas, e cumplimiento de la ley (Quintana, 2020).

Los extractos se los puede aplicar en alimentos sólidos (productos cárnicos),

líquidos (jugos, leche, bebidas funcionales), cremosos (yogures, salsas), grasos (aceites), alimentos a base de agua (sopas), etc. potenciando su sabor, ayudando con vitaminas, polifenoles, entre otros (Nutexa, 2017).

2.1.8. Actividad antioxidante

En los alimentos de origen vegetal, esta capacidad se atribuye a la presencia de compuestos fenólicos, especialmente a los flavonoides. La actividad antioxidante de los flavonoides resulta de una combinación de las propiedades quelantes del hierro y captadoras de radicales libres (Rivas, et al., 2017).

Los antioxidantes son moléculas capaces de evitar o retardar la oxidación de biomoléculas (proteínas, lípidos y ácidos nucleicos). Previene la actuación de los radicales libres sobre el organismo, reduciendo los procesos oxidativos, retardando el envejecimiento, así como el desarrollo de varias enfermedades (Rioja, et al., 2018).

2.1.9. Polifenoles

Son los principales antioxidantes de los alimentos, y su aporte es 10 veces superior al de la vitamina C y 100 veces superior al de la vitamina E o los carotenoides. Los polifenoles (Flavonoides, ácidos fenólicos, estilbenos, lignanos, etc.) presentes en los alimentos son muy efectivos como antioxidante (Ordoñez, Reátegui, & Villanueva, 2018).

2.1.10. Secado de las plantas

Es uno de los métodos más antiguos utilizados para preservar los alimentos desde el comienzo de la humanidad debido a que proporciona la posibilidad de subsistencia en épocas de carencia.

El secado es la remoción de humedad debido a la transferencia simultánea de calor y masa, de forma lenta y gradual para evitar que se pierdan sus propiedades químicas. El proceso de deshidratado violento no permite lograr un secado homogéneo e interrumpe la hidrólisis enzimática (Iglesias, et al., 2018).

2.1.10.1. Secado natural

Es el método más asequible sin embargo presenta algunas limitaciones

debido a que no se puede controlar la temperatura y el producto puede ser afectado negativamente por agentes biológicos. En condiciones normales tarda de 2 a 3 días, en épocas de bajaradiación solar y lluvia el tiempo de secado puede extenderse de 5 días o más, así mismo deben estar moviéndose las plantas constantemente para un secado homogéneo (Iglesias, et al., 2018).

2.1.10.2. Secado artificial

Nos permite disponer de plantas secas en sólo algunas horas, asegurándonos la correcta temperatura (no mayor a los 40° C) y aireaciones necesarias para no dañar la planta (volatilizar los componentes activos de la planta).

2.1.11. Conservación de las plantas secas

Las plantas secas deben ser almacenadas en envases limpios y secos, en un lugar protegido de la luz solar, del calor y la humedad.

2.1.11.1. Recipientes idóneos para su conservación

- **Envases de vidrio ámbar:** Ofrecen una alta protección contra los rayos UVA. Dependiendo la planta se puede almacenar de uno a tres años (Fetzner, 2019).
- **Envases de cerámica:** Son bastante resistentes a los cambios de temperatura (Fetzner, 2019).

2.1.12. Metabolitos secundarios

Son compuestos provenientes del metabolismo primario de las plantas, sirven como mecanismo de defensa cuando las plantas están en condiciones adversas, el ataque por herbívoros, microorganismos y la presencia de diferentes especies que luchan por los nutrientes, luz y agua (Martín, 2018). No todas las especies vegetales producen en totalidad los metabolitos secundarios.

2.1.12.1. Alcaloides

Son compuestos heterocíclicos nitrogenados proveniente principalmente de aminoácidos, en la naturaleza se pueden encontrar como sales con el ácido

acético, láctico, málico, tartárico, cítrico y oxálico (González, et al., 2020).

2.1.12.2. Catequinas

Metabolitos secundarios producidos por las plantas y promotores de su crecimiento e interacción con otros organismos vivos. Pueden presentar un efecto beneficioso sobre las propiedades antioxidantes y depuradoras (Pérez, et al., 2020).

2.1.12.3. Resinas

Sustancias complejas, químicamente estables e inertes, con una estructura amorfa (raramente cristalina), formando una secreción espesa y pegajosa, no fácilmente alterables por ácidos o álcalis. No pueden disolverse en agua y líquidos inorgánicos, pero presentan solubilidad en solventes orgánicos (Tech, 2021).

2.1.12.4. Saponinas

Son compuestos glicosídicos que contienen un esqueleto (C30) o de tipo esteroide (C27). Se caracterizan por ser solubles en contacto con el agua producen espuma persistente; poseen diversas actividades biológicas, tales como antimicrobiana, antioxidante, antiinflamatoria, hemolítica, anticancerígena (Quillay, et al., 2017).

2.1.12.5. Compuestos fenólicos

Son compuestos orgánicos cuya estructura molecular contiene al menos un grupo fenol, un anillo aromático unido al menos a un grupo funcional hidroxilo. Se dividen en flavonoides y no flavonoides (Martín, 2018).

2.1.12.6. Aminoácidos libres / Aminas

Se denominan unidades estructurales básicas de las proteínas. Molecularmente, son esqueletos formados por un carbono central unido a un grupo amino [NH₂], un grupo carboxilo [COOH], y un radical [R]; pueden cambiar sus propiedades de ionización, dependiendo del pH en el que se encuentren (Peñaranda, 2017).

Cuando una planta está bajo estrés evita producir estas sustancias que gastan

mucha energía (Intagri, 2018).

2.1.12.7. Quinonas / Benzoquinonas

Es uno de los dos isómeros de la Ciclohexanodiona o bien un derivado de los mismos. Su fórmula química es $C_6H_4O_2$. Por sus propiedades tintóreas se las conoce desde la antigüedad (Ruiz, Lezama, & Pumachagua, 2018).

2.1.12.8. Flavonoides

Están constituidos de manera general por 15 átomos de carbono, los cuales se distribuyen en dos anillos bencénicos fijados en un anillo heterocíclico (Ortega, et al., 2018). Son en parte responsables del intenso color de las frutas, verduras y del dulzor de los cítricos, vino, cerveza o té, debido a posibles complejos con azúcares (carotenoides glicosídicos y antocianinas), también se pueden utilizar en calidad de colorante natural como en el caso de las antocianinas con flavonas, a excepción de los flavanoles, existen hasta 6.000 tipos de flavonoides (Choque, Gemio, & Nogales, 2017).

2.1.12.9. Mucilagos

Son polisacáridos (un grupo de monosacáridos o hidratos de carbono simple), cuya composición química depende del genotipo de la materia prima empleada en el procedimiento de extracción (Castañeda & Zavaleta, 2019). Es de peculiaridad viscosa, incrementa de volumen al contacto con el agua, resulta una solución coloidal, que se confunden con gomas y pectinas debido a que se forman a partir de polisacáridos celulósicos equivalente al número de azúcares y se distinguen solo en sus propiedades físicas (Villa, Osorio, & Villacis, 2020).

2.1.12.10. Principios amargos

Poseen distinta naturaleza química sin embargo comparten un sabor amargo, conforme con su estructura molecular, núcleo o función, pueden ser: fenoles, lactonas, cromonas (cumarinas, cumaronas), o tener diferentes grupos (Waizel & Waizel, 2019).

2.2. Fundamentación del estado del arte

Se asumió este apartado con la finalidad de llevar a cabo un estudio sustentado en investigaciones que fundamenten la optimización de extractos. Los mismos que se detallan a continuación.

Silva (2022) investigo la optimización del proceso de extracción hidroalcohólica de la droga de “Eneldo”. Estableció 17 corridas experimentales, la concentración de etanol (60%, 75% y 90%), tiempo (6h, 15h y 24h) y temperatura (30°C, 45°C y 60°C) de extracción. En el tamizaje fitoquímico sobresalieron los compuestos grasos, fenólicos, triterpenos-esteroides, flavonoides, quinonas, mucílagos y principios amargos. La optimización con mayor rendimiento fue de 7:77 H a 58,36 °C con 89,50% de concentración de etanol, obteniendo 12,9812mgGAE/g polifenoles totales y 423,998µmolFe²⁺/g actividad antioxidante.

Cevallos (2021) realizo la extracción hidroalcohólica de la droga cruda a partir del amaranto, uso el software Design Expert para establecer 17 corridas experimentales a una determinada concentración de etanol (60%, 75%, 90%), tiempo (6h, 15h, 24h) y temperatura (30°C, 45°C, 60°C) de extracción. Se destacaron las saponinas, compuestos fenólicos, quinonas/benzoquinonas, flavonoides, principios amargos, mucílagos, triterpenos/esteroides, agrupamiento lactónico, compuestos grasos, alcaloides y catequinas. Los valores alcanzados mediante la experimentación (polifenoles totales 32,1006mg/g y actividad antioxidante 944,014µmolFe²⁺/g) son superiores a los del predicho.

Gruszycki, et al., (2019) estudiaron la actividad antioxidante en extractos hidroalcohólicos de la *Portulaca oleácea* L. Cuantificaron los fenoles totales, flavonoides con la técnica de Folin-Ciocalteu y complejación de aluminio. Determinaron la actividad antioxidante empleando la técnica de decoloración del radical libre DPPH· y mediante la metodología ABTS^{·+}. Presentó mayor capacidad antioxidante el extracto metanólico frente a los radicales DPPH· y ABTS^{·+}, con mayor contenido de fenoles totales y flavonoides, en comparación con el extracto etanólico.

González y Horianski (2018) evaluaron la actividad antibacteriana de extractos hidroalcohólicos secos de yerba mate, sobre bacterias de *Escherichia coli*, *Salmonella Enteritidis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, por la técnica de difusión en agar. Determinaron la concentración inhibitoria mínima y bactericida mínima. El extracto hidroetanólico (60:40) mostró mayor capacidad inhibitoria. *Staphylococcus aureus* presentó mayor tamaño de halo de inhibición con CIM/CBM de 0,78/0,78 mg/mL. Hallaron la presencia de taninos, flavonoides, saponinas y un contenido de polifenoles totales de 24,47 g EAG/100 g de muestra seca. Rodríguez y Castro (2018) valoraron el contenido de polifenoles y actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de *Eisenia cokeri m.a. howe*, mediante referencia espectrofotométrica. El contenido de polifenoles totales fue de 3,11346 mg para el estípite; 0,4625 mg para la fronda y 2,31665 mg para el rizoide de ácido gálico/1 gramo de muestra. Los extractos mostraron actividad antioxidante en los métodos de DPPH para el rizoide (IC₅₀= 659,74 µg/mL): fronda (IC₅₀= 280,00 µg/mL), estípite (IC₅₀= 248,50 µg/mL), por el ABTS. + los extractos mostraron para el rizoide (IC₅₀= 20,3 µg/mL): fronda (IC₅₀= 39,2 µg/mL) y estípite (IC₅₀= 24,7 µg/mL).

CAPITULO III.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Metodología

3.1.1. Tipos de investigación:

Son las estrategias que nos facilitó, obtener los datos apropiados del problema que fue identificado, a través de respuestas adecuadas con una validez científica.

3.1.1.1. Investigación cuantitativa

Nos permitió determinar la relación entre una variable independiente de una dependiente. En base a los datos recogidos, se pudo comprobar las hipótesis predefinidas, permitiéndonos hacer conclusiones generalizadas que pueden ser proyectadas en el tiempo.

3.1.1.2. Investigación descriptiva

Se la uso para puntualizar y establecer una descripción lo más completa posible sobre el objeto sin manipular las variables estudiadas con el propósito de recolectar datos que permitan arrojar información confiable.

3.1.1.3. Investigación experimental

Fue empleada con la finalidad de manipular la variable independiente, para observar los cambios de las variables dependientes; permitiendo establecer diferentes hipótesis y compararlas a través de un método científico.

3.1.2. Técnicas

Se las aplicó para la utilización de los instrumentos con el propósito de alcanzar

datos, que nos permitan dar respuesta a las preguntas de la investigación, bajo un enfoque cualitativo, cuantitativo o una combinación de ambos, en las diversas etapas del proceso investigativo.

3.1.2.1. Observación

Fue usada para estudiar la información relevante en el momento que acontecieron los hechos y apuntar el desenvolvimiento del estudio, permitiendo dar solución al problema planteado.

3.1.2.2. Fichas

Las tarjetas fueron elaboradas específicamente para esta investigación por su fácil manejo, se apuntó los datos recopilados con la finalidad de alcanzar mejores conclusiones y llevar a cabo los objetivos planteados.

3.2. Investigación descriptiva

3.2.1. Materiales

Tabla 4 *Materiales empleados durante la investigación*

MATERIALES EMPLEADOS EN LA INVESTIGACIÓN			
Materiales de laboratorio	Equipos	Reactivos	Materia prima
Matraz Erlenmeyer de vidrio 100 ml	<i>Espectrofotómetro GENESYS 20 Modelo 4001/4j</i>	<i>Técnica FRAP FeCl</i>	<i>Hojas de la planta de guayusa</i>
Matraz Erlenmeyer de vidrio 250 ml	<i>Balanza Analítica. Bomba al vacío Molino corona</i>	<i>Acetato de sodio Ácido acético Reactivo TPTZ Sal de Mohr</i>	
Matraz Aforado de t/plástico 100 ml	<i>Estufa marca Memmer, modelo</i>	<i>Ácido clorhídrico</i>	
Micropipeta 100µl	<i>Universal 30</i>	<i>Determinación de polifenoles</i>	
Micropipeta 1000µl		<i>Carbonato de sodio Folling</i>	
Pipeta de vidrio		<i>Ácido gálico</i>	
Piseta 500 ml plástica		<i>Etanol 99.8%</i>	
Punta 10 a 200µl puntas amarillas		<i>Agua destilada</i>	
Matraz 50 ml aforado t/plástico			
Matraz 10 ml aforado t/plástico			
Vasos de precipitación (250 ml)			
Tubos de ensayo			
Gradillas			
Pinzas			
Goteros de plástico			
Papel filtro			

Elaborado por: Autor (Granja; 2022)

3.2.2. Método de elaboración

3.2.2.1. Recepción de la materia prima

Se recibió 9kg de hojas frescas de guayusa en atados, los mismos que llegaron en mantas; estos facilitan la aireación. Posteriormente, se deslizaron las hojas y se efectuó un control visual de la materia prima.

3.2.2.2. Selección

Las hojas fueron inspeccionadas minuciosamente, se descartó las que estaban en mal estado. Después, las hojas seleccionadas se colocaron en unos coladores

grandes para aligerar las próximas operaciones.

3.2.2.3. Lavado y desinfectado

Para eliminar las impurezas se sumergió los coladores con las hojas de guayusa en aguapotable durante 10 minutos, se incorporó 5ml/10L del Hipoclorito de sodio 0,05%. Alfinal, la materia prima se enjuago con abundante agua destilada.

3.2.2.4. Secado

Luego del lavado y desinfectado, las hojas de guayusa fueron colocados sobre papel absorbente en una bandeja de aluminio durante 30 min, para eliminar el agua ganada.

3.2.2.5. Deshidratado

Las hojas secas de guayusa se colocaron en bandejas a 2cm de alto dentro de la estufade aire forzado a 40°C, para evitar que volatilizaran sus compuestos activos, durante 48 horas para eliminar la mayor cantidad de agua posible.

3.2.2.6. Molido-tamizado

Las hojas deshidratadas de guayusa se trituraron en un molino manual corona, posteriormente se tamizo para obtener una granulometría uniforme, se conservó la droga cruda en frascos ámbar, almacenándolos en un lugar seco y oscuro con la finalidad de precautelar los compuestos químicos presentes para sus análisis posteriores.

3.2.2.7. Tamizaje fitoquímico

Es el estudio permite conocer los compuestos químicos presentes en especies vegetales.

Los resultados de las reacciones son reportados como: (+) evidencia la presencia o (-)manifiesta la ausencia para el metabolito de que se trate.

3.2.2.7.1. Compuestos grasos. Ensayo de Sudan

En una alícuota del extracto se adicionó 1ml de la solución disuelta en agua delcolorante Sudán III, el solvente se volatilizo por baño maría.

Si la coloración es roja anaranjado (+) o tiene forma de escamas (+-) existen

compuestos grasos (Cevallos, 2021).

3.2.2.7.2. Determinación de alcaloides. Ensayo de Dragendorff

Se evaporó a baño maría el solvente orgánico del extracto y el residuo fue disuelto en 1 mL de ácido clorhídrico al 1% en agua.

En la alícuota acuosa se agregó 1 gota de ácido clorhídrico concentrado, calentándolos suavemente y enfriándolo (pH ácido), se añadió 3 gotas del reactivo de Dragendorff. Es positivo si se apreciaron las siguientes características: Opalescencia (+), turbidez definida (++) , precipitado (+++) (Pujol, et al., 2020).

3.2.2.7.3. Agrupamiento lactónico. Ensayo de Baljet

Se empleó para la detección de cumarinas. Solución 1: Hidróxido de sodio al 10% en agua. Solución 2: Ácido pícrico al 1% en etanol.

Se evaporó el solvente de la alícuota a baño maría. Mezclando volúmenes iguales de las soluciones se adicionó 1 mL de esta última a las muestras que se sometieron al baño María (Cevallos, 2021).

Es positivo si las muestras toman una coloración o precipitado rojo (++ y +++).

3.2.2.7.4. Triterpenos / Esteroides. Ensayo de Liberman – Burchard

Se adicionó 1 mL de anhídrido acético y se mezcló bien. Dejando caer por la pared del tubo de ensayos 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado sin agitar.

El ensayo es positivo si el cambio de coloración, de rosado a azul muy rápido (+++), verde intenso visible rápido (++) y verde oscuro-negro al final de la reacción (+) (Cevallos, 2021).

3.2.2.7.5. Catequinas. Ensayo de Catequinas

Encima del papel de filtro se aplicó una gota de cada extracto y sobre la mancha se puso una gota de la disolución de Na₂CO₃. Es positiva si aparece una mancha verde- carmelita a la luz UV.

3.2.2.7.6. Resinas. Ensayo de resinas

Se adicionó 10 mL de agua a 2 mL de cada extracto. Es positiva si aparece de un precipitado.

3.2.2.7.7. Azúcares reductores. Ensayo de Fehling

En una alícuota del extracto se agregó 2ml del reactivo y se calentó a baño María por 5 o 10 minutos. Es positivo (+++) si la dilución toma una pigmentación roja o presenta un precipitado rojo.

3.2.2.7.8. Saponinas. Ensayo de Espuma

Se disolvió una alícuota del extracto en 5 veces su volumen en agua y se agitó fuertemente por 3 o 5 minutos. La formación de espuma abundante la cual persiste por más de dos minutos con un grosor de 2mm es prueba positiva (Quillay, et al, 2017).

3.2.2.7.9. Compuestos fenólicos. Ensayo de Cloruro Férrico (III)

Se agregó acetato de sodio en una alícuota para neutralizar y 3 gotas de una dilución de tricloruro férrico al 5% en solución salina fisiológica. Es positivo (+++) para compuestos fenólicos en general, al observarse un cambio de tonalidad a rojo-vino; para taninos del tipo pirocatecólicos una pigmentación verde intensa y taninos del tipo pirogalotánicos una coloración azul (Silva, 2022).

3.2.2.7.10. Aminoácidos libres / aminos. Ensayo de Ninhidrina

Se mezcló en 2 mL de solución de Ninhidrina al 2 % en agua con una alícuota del extracto alcohólico y se calentó a baño María la dilución durante 5-10 minutos. Es positivo cuando se da una pigmentación azul violácea (Intagri, 2018).

3.2.2.7.11. Quinonas / Benzoquinonas. Ensayo de Bortranger

Se evaporó el extracto alcohólico en baño María, en 1 mL de cloroformo se diluyó el residuo, a continuación, se adicionó 1 mL de hidróxido de sodio al 5% en agua, se perturbó las fases y se dejó reposar hasta la separación (Pujol, y otros, 2020).

Si la fase acuosa alcalina (superior) se colorea de rosado o rojo (+++) es positivo (Silva, 2022).

3.2.2.7.12. Flavonoides. Ensayo de Shinona.

Se añadió 1 mL de ácido clorhídrico concentrado y la cinta de magnesio metálico en la alícuota del extracto, se dejó 5 minutos y se incorporó 1 mL de alcohol amílico. Si el alcohol amílico se tinte de naranja, rosa azul o violeta, carmelita o rojo intenso

es positivo (+++) (Pujol, et al, 2020).

3.2.2.7.13. *Glucósidos cardiotónicos. Ensayo de Kedde*

Se unificó volúmenes iguales de disoluciones de ácido 3,5-dinitrobenzoico a 2% en metanol y de KOH al 5% en agua. En un 1 mL de la disolución reactiva se mezcló una alícuota del extracto etanólico, durante 5-10 minutos se lo dejó en reposo. Si hay una coloración violácea y que persista durante 1-2 horas en los ensayos es positivo (Cevallos, 2021).

3.2.2.7.14. *Mucílagos. Ensayo de Mucílagos*

A una temperatura de 0°C a 5°C se enfrió una alícuota del extracto. Es positivo (+++) el ensayo si la muestra es de una consistencia gelatinosa (Castañeda & Zavaleta, 2019).

3.2.2.7.15. *Principios amargos. Ensayo de Principios Amargos*

Se detectó el sabor de cada uno de estos principios mediante una catación del extracto acuoso (Castañeda & Zavaleta, 2019).

3.2.2.8. Diseño experimental

El software Desing-Expert nos facilitó la identificación de los factores e interacciones que afectan significativamente las variables dependientes, empleando valores máximos y mínimos. El programa determinó las corridas experimentales con tres concentraciones, tiempo y temperatura de extracción.

3.2.2.9. Obtención del extracto

Los extractos se obtuvieron por maceración con agitación ocasional con una concentración de etanol (60%, 75%, 90%), tiempo (6h., 15h, 24h), y temperatura de extracción (30°C, 45°C, 60°C), para la elaboración de 27 corridas experimentales, con una bomba al vacío se eliminó los residuos sólidos del extracto final.

3.2.2.10. Ensayo de Frap

Este ensayo se ejecutó conforme al procedimiento planteado por Benzie y Strain (1996), considerando la modificación de tiempo propuesta por Pulido, et al (2000). Este procedimiento consistió en medir la capacidad de la muestra para disminuir el

hierro férrico a ferroso. A un pH bajo se colocó en el medio de reacción el complejo Fe³⁺- TPTZ, este complejo en presencia de agentes reductores se redujo a Fe²⁺-TPTZ que desarrollo una coloración azul intenso con un máximo de absorción a 593nm.

El reactivo FRAP está compuesto por 0,0078g de TPTZ [2,4,6-tri (2-piridil)-1,3,5-triazina], al cual se le añadió una gota de HCl (1:1), más 2,5mL de HCl 40mM y se disolvió totalmente. Luego se adicionó 25mL de buffer acetato (pH= 3,6) y 2,5 mL de una disolución 20mM de FeCl₃, dejándose incubar 37°C durante 15min.

Para la determinación se tomaron 50µL del extracto de la muestra y se añadieron en un tubo de ensayo de 10mL de capacidad. Posteriormente, se adicionaron 1,5mL del reactivo FRAP. Se atemperó a 37 °C durante 30 minutos y se leyó la absorbancia a 593nm.

El cálculo de la actividad antioxidante se realizó por medio de una curva de calibración de Fe²⁺ empleando la sal de Mohr [Fe (NH₄)₂SO₄] como patrón, según la ecuación siguiente:

$$AAT = \frac{(A - a)}{b \times V \times fd} \times P.M.$$

Donde:

AAT: Actividad antioxidante total. A: Absorbancia del extracto.

a: Intercepto de la curva de calibración. b: Pendiente de la curva de calibración

V: Volumen del extracto (mL).

fd: factor de dilución de la muestra.

P.M: Masa de la muestra.

3.2.2.11. Determinación del contenido de polifenoles totales

Los compuestos fenólicos se cuantificaron de acuerdo al método descrito por Slinkardy Singleton (1997) con el reactivo de Folin-Ciocalteu. La preparación de la muestra consistió en tomar 2g de pulpa homogenizada y centrifugarlos (MLW

modelo T 52, Alemania) durante 10min a 3500min⁻¹. Del sobrenadante obtenido se tomó 1mL y se diluyó convenientemente para la determinación. Se mezclaron 50µl de la muestra con 2,5mL de disolución acuosa de Folin-Ciocalteu diluida 1:10. La se agitó mezcla y se dejó en reposo durante 5min. Se adicionaron 2mL de una disolución al 7,5 % (m/v) de Na₂CO₃. Se agitó nuevamente, se dejó reposar durante 2h y se leyó la absorbancia a 765nm. Se utilizó ácido gálico como patrón entre 100 y 900mg/L. El contenido de fenoles totales se expresó como ácido gálico en mg/100g de fruto, mediante la siguiente ecuación:

$$CF = \frac{(A - a)}{b \times V \times \frac{fd}{1000}} \cdot PM.$$

Donde:

CF: Contenido de polifenoles totales.

A: Absorbancia.

a: Intercepto de la curva de calibración.

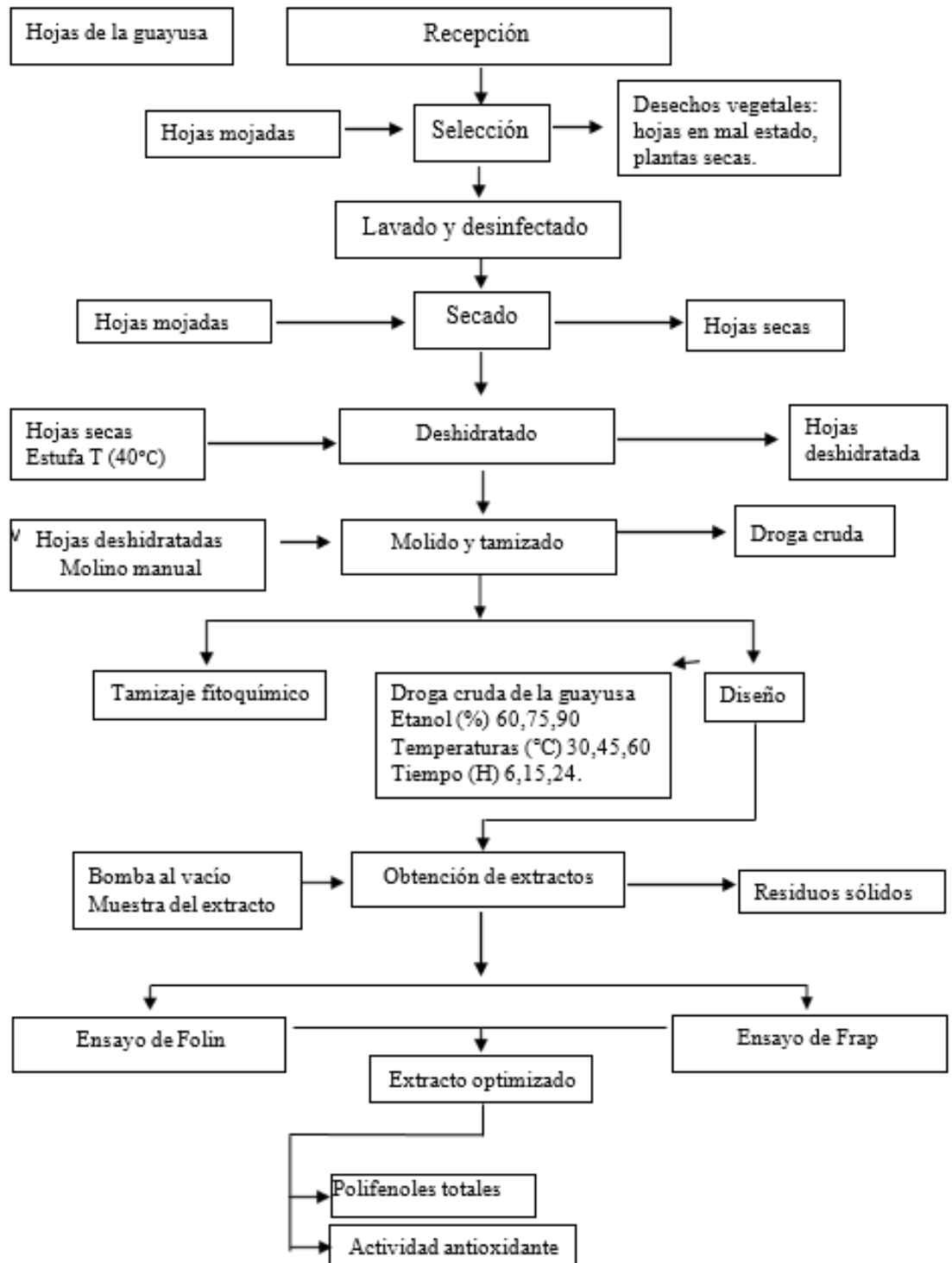
b: Pendiente de la curva de calibración.

V: Volumen total del extracto (mL).

fd: Factor de dilución de la muestra.

PM: Masa de la muestra.

3.2.2.12. Diagrama de flujo



3.2.2.13. Presupuesto

Tabla 5 Presupuesto de la investigación

Cantidad	Recursos	PRESUPUESTO PARA LA ELABORACIÓN DEL PROYECTO		
		H. uso	Valor Unitario \$	Depreciación de 120 días
Equipos				
1	Estufa	120	0,0934	11,21
1	Balanza analítica	30	0,2461	7,38
1	Espectrofotómetro	30	0,1762	5,29
1	Incubadora	120	0,1370	16,44
1	Baño María	20	0,0695	1,40
				41,72
Cantidad	Descripción	Unidad	Valor Unitario \$	Valor Total \$
Materiales				
15	Matraz Erlenmeyer 100 ml de vidrio	U	2,22	33,30
12	Matraz Erlenmeyer 250 ml de vidrio	U	3,00	36,00
3	Matraz aforado 100ml t/plástico	U	6,05	18,15
1	Micropipeta Microlit 100-1000 µl volumen variable	U	88,00	88,00
4	Pipeta 10 ml	U	3,60	14,40
1	Piseta plástica 500ml	U	2,55	2,55
1	Punta Microlit 1000 µl paquete	U	20,00	20,00
1	Punta 10 a 200 µl con caja porta puntas amarillas	U	20,00	20,00
4	Matraz aforado 50ml t/plástico	U	7,30	29,20
2	Matraz aforado 10ml t/plástico	U	5,05	10,10
3	Vasos de precipitación 250 ml	U	3,00	9,00
1	Papel aluminio	U	2,40	2,40
1	Limpión industrial	M	3,13	3,13
1	Alcohol antiséptico	L	3,25	3,25
2	Agua destilada	L	1,50	3,00
1	Jabón líquido	L	1,80	1,80
				294,28
Reactivos				
6	Etanol	L	10	60,00
1	TPTZ 3g	G	450	450,00
1	Carbonato de sodio	G	65	65,00
1	Folin-Ciocalteu	Ml	147	145,00
1	Ácido Gálico	G	135	135,00
				855,00
Material Bibliográfico y fotocopias.				
2	Esferos.	U	0,50	1,00

Elaborado por: Autor (Granja; 2022)

3.3. Investigación experimental

3.3.1. *Diseño experimental*

Se empleo el software Design Expert 8.0.6 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, EE.UU.), para encontrar la configuración del proceso óptimo de extracción hidroalcohólica a partir de la guayusa (*Ilex guayusa* Loes.), para lograr el máximo rendimiento de polifenoles totales y actividad antioxidante, mediante combinaciones de los factores de estudio. El programa nos facilitó gráficas 3D rotatorias para visualizar fácilmente las superficies de respuesta desde todos los ángulos.

3.3.2. *Factores de estudio*

En la tabla 6 se evidencia las condiciones evaluadas: concentración de etanol (CPF), tiempo (TIE) y temperatura de extracción (TEE), y el desempeño de los parámetros del modelo de codificación sobre el contenido de polifenoles totales y la capacidad antioxidante reductor de hierro, fueron las variables de respuesta.

Tabla 6 *Descripción del diseño superficie de respuesta*

Factor	UM	Tipo	
CPF	%	Numérico	65
			75
			90
TIE	H	Numérico	6
			15
			24
			30
TEE	°C	Nominal	45
			60

Elaborado por: Autor (Granja; 2022)

CAPÍTULO IV.

APLICACIÓN Y/O VALIDACION DE LA PROPUESTA

4.1. Resultados

Las investigaciones buscan nuevos compuestos bioactivos de plantas medicinales y aromáticas.

4.1.1. Perfil fitoquímico

Se identificó los metabolitos secundarios presentes en los extractos etéreo, alcohólico y acuoso del producto, por medio de reacciones y análisis químicos bien descritos en la literatura, con el propósito de reconocer y comparar los compuestos químicos extraídos con cada disolvente de distintas polaridades.

Tabla 7 Resultado del tamizaje fitoquímico de los extractos etéreo, etanólico y acuoso de las hojas de guayusa.

Metabolito	Ensayo	Extracto etéreo	Extracto etanólico	Extracto acuoso
Compuestos grasos	<i>Sudan</i>	++		
Alcaloides	<i>Dragendorff</i>	-	-	+
Agrupamiento lactónico	<i>Baljet</i>	++	-	
Triterpenos / esteroides	<i>Lieberman B.</i>	++	-	
Catequinas	<i>Catequinas</i>		+-	
Resinas	<i>Resinas</i>		-	
Azúcares reductores	<i>Fehling</i>		+	-
Saponinas	<i>Espuma</i>		+	-
Compuestos fenólicos	<i>Cloruro férrico (III)</i>		+++	+++
Aminoácidos libres / aminos	<i>Nihidrina</i>		-	
Quinonas / benzoquinonas	<i>Bortranger</i>		++	
Flavonoides	<i>Shinoda</i>		+++	+++
Glucósidos cardiotónicos	<i>Kedde</i>		-	
Mucílagos	<i>Mucílagos</i>			+
Principios amargos	<i>Principios amargos</i>			+

+: Presencia + -: Regular -: Ausencia

Elaborado por: Autor (Granja; 2022)

En la tabla 7 se muestran los resultados del tamizaje fitoquímico, en el extracto etanólico y acuoso evidencio mayor cantidad de los compuestos fenólicos y flavonoides. Los ensayos del extracto etéreo arrojaron positivo la presencia de compuestos grasos, agrupamiento lactónico y triterpenos / esteroides. El extracto etanólico contiene quinonas / benzoquinonas, saponinas, azúcares reductores y en cantidad regular las catequinas. El extracto acuoso presento principios amargos, mucilagos y alcaloides.

4.1.2. Matriz experimental

En la tabla 8 se presentan las 27 corridas experimentales que fueron establecidas por el software, las cuales fueron evaluadas a diferente concentración de etanol, tiempo y temperatura de extracción. La corrida 23 con mayor concentración de etanol, temperatura y tiempo de extracción, es la de mejor rendimiento con 410,45 polifenoles totales y 1100,34 de capacidad antioxidante reductora de hierro.

Tabla 8 Matriz experimental para la evaluación de polifenoles totales y actividad antioxidante reductora de hierro de las hojas de guayusa.

Corrida	Temperatura (°C)	Tiempo (h)	Concentración de etanol (%)	Polifenoles totales (mg/g)	Actividad antioxidante (uM Fe 2+/g muestra)
1	60	24	60	382,86	975,23
2	60	6	75	364,9	948,34
3	45	24	75	303,98	900,22
4	60	15	90	401,34	1023,23
5	30	6	60	186,56	732,23
6	60	24	60	373,23	951,12
7	45	15	75	235,46	800,34
8	45	15	75	273,76	859,34
9	45	15	75	270,11	853,34
10	45	15	60	245,67	825,45
11	60	6	75	345,45	920,32
12	30	6	75	167,34	668,45
13	60	15	90	396,12	998,12
14	30	15	75	135,56	620,43
15	30	15	90	198,23	754,34
16	45	15	60	268,9	849,12
17	45	15	75	278,34	864,45
18	45	6	90	289,23	888,83
19	45	6	90	281,23	873,23

20	45	6	60	210,34	779,12
21	60	6	60	312,67	911,23
22	45	15	75	254,45	838,56
23	60	24	90	410,45	1100,34
24	30	24	90	203,12	763,45
25	30	24	60	154,34	645,34
26	45	24	75	291,21	893,2
27	30	24	60	171,11	724,35

Elaborado por: Autor (Granja; 2022)

4.1.3. Modelo codificado de la cantidad de polifenoles totales

La Tabla 9 se expone los coeficientes estimados del contenido de la variable respuesta de polifenoles totales. Se adaptó a un modelo lineal, con un nivel de confianza del 95,0%, lo que indica que la concentración de etanol (CPF), tiempo (TIE) y temperatura de extracción (TEE) son significativos ($p \leq 0,01$). El estadístico R^2 indicó que el 95,0 % de la variación en el contenido de polifenoles totales.

Tabla 9 Parámetros del modelo codificado de la cantidad de polifenoles totales.

Indicador	Polifenoles totales (mg/g)
Intercepto	272,16
XCPF	20,91*
XTIE	15,82*
XTEE	99,57*
R2	0,950
R2 ajustado	0,943
R2 predicho	0,930
F modelo	144,14*
F falta de ajuste	2,97
<u>Precisión adecuada</u>	<u>36,86</u>

CPF:

concentración de
etanol TIE: tiempo
de extracción

TEE: temperatura
de extracción

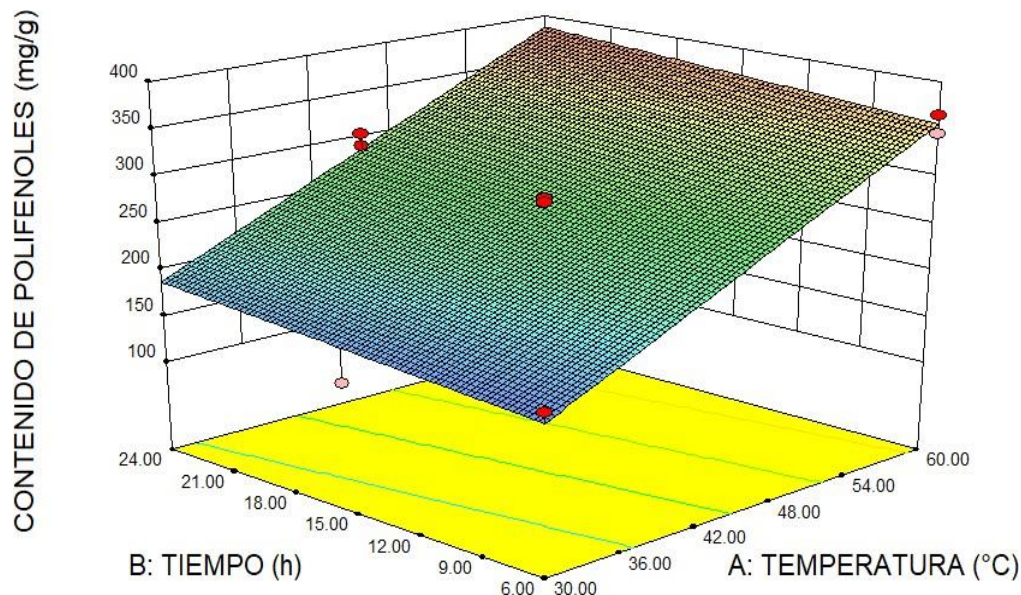
Elaborado por: Autor (Granja; 2022)

La Fluctuación de los coeficientes, la concentración de etanol (CPF), tiempo (TIE) y temperatura de extracción (TEE), dispondrán una conexión directa en la determinación del rendimiento de polifenoles.

La gráfica 1 muestra el contenido de polifenoles totales (PFT) de las

hojas de guayusa analizadas, a mayor concentración de etanol, tiempo y temperatura de extracción, mayor es la concentración de polifenoles totales.

Gráfico 1 *Contenido de polifenoles totales.*



Elaborado por: Autor (Granja; 2022)

Este resultado nos permite inferir que los PFT son componentes de la guayusa que aportan un porcentaje importante a la capacidad antioxidante del mismo. La planta estudiada es de la amazonia ecuatoriana, al hacer una comparación con otras investigaciones, observamos que los valores obtenidos se asemejan. Por ejemplo, Castro (2017) determinó que los tratamientos con mayor fracción de extracción del 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. Esto puede deberse al grado de secado diferente entre estas muestras y las muestras de otros estudios.

4.1.4. Modelo codificado del poder antioxidante reductor de hierro

En la Tabla 9 se demuestra la relevancia del análisis de regresión de la varianza con los coeficientes estimados para el contenido de la variable de respuesta del poder antioxidante reductor de hierro. Se adaptó a un modelo cuadrático con un nivel de confianza del 95,0%, lo que indicó que la concentración de etanol (CPF), el tiempo (TIE) y la temperatura de extracción (TEE), fueron significativos ($p \leq$

0,01). Las estadísticas de R^2 mostraron un cambio del 95,3 % de la variabilidad del poder antioxidante.

Tabla 10 *Parámetros del modelo codificado del poder antioxidante reductor del hierro.*

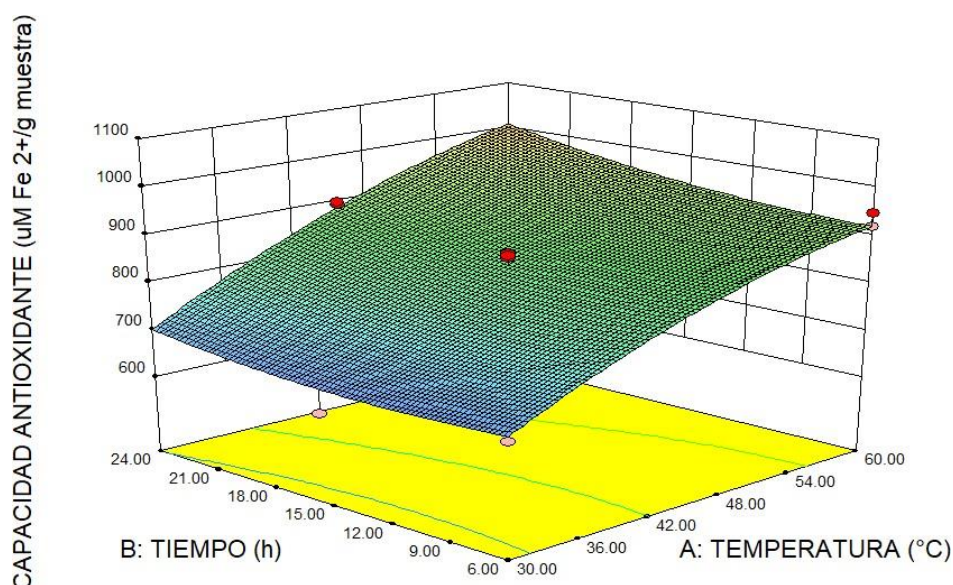
Indicador	<i>Poder antioxidante reductor del hierro (uM Fe 2+/g muestra)</i>
Intercepto	839,79
XCPF	39,52*
XTIE XTEE	27,58*
XTEE XTIE	136,67*
XTEE XCPF	16,18
XTIE XCPF	12,05
XTEE	14,28
XTIE	-32.33*
XCPF	20,47
	25,34
R2	0,953
R2 ajustado	0,927
R2 predicho	0,866
F modelo	37,92*
F falta de ajuste	2,36
Precisión adecuada	22,62

CPF:
 concentración de
 etanol TIE: tiempo
 de extracción
 TEE: temperatura
 de extracción
Elaborado por: Autor (Granja; 2022)

Al examinar los factores se tiene mayor predominancia sobre la variable dependiente, se evidencio que la variabilidad de los factores va a tener una relación directa al determinar la actividad antioxidante.

En la Figura 5 se puede observar el poder antioxidante reductor del hierro de los extractos expresada como uM Fe 2+/g muestra, de la droga de guayusa. Por consiguiente, un aumento de la CPF, TIE y TEE permite acortar los tiempos de extracción y por ende reducir costos.

Gráfico 2 Contenido del poder antioxidante reductor del hierro.



Elaborado por: Autor (Granja; 2022)

4.1.5. Optimización numérica del proceso de extracción hidroalcohólico de ladroga cruda

Los rendimientos de polifenoles totales y antioxidantes de hierro reducido de la droga cruda de las hojas de guayusa, se los obtuvo optimización numéricamente la extracción bajo las condiciones de la concentración de etanol, tiempo de extracción y temperatura), a través de ensayos de laboratorio con la finalidad de conseguir valores superiores a los que arrojó el software programa experto en diseño. (Tabla 10)

Tabla 11 Restricciones para la optimización de la extracción.

Parámetro	UM	Límite inferior	Límite superior	Criterio
Concentración de etanol	(%)	60	90	Intervalo
Tiempo de extracción	(h)	6	24	Intervalo
Temperatura de extracción	(°C)	30	60	Intervalo
Polifenoles totales	(mg/g)	135,56	410,45	Maximizar
Actividad antioxidante	(uM Fe 2+/g muestra)	620,43	1100,34	Maximizar

Elaborado por: Autor (Granja; 2022)

La Tabla 11 manifiesta los valores arrojados por el software de la solución optimizada, los cuales fueron pronosticados por las variables dependientes, desde

el punto estadístico se escogió la corrida más significativa.

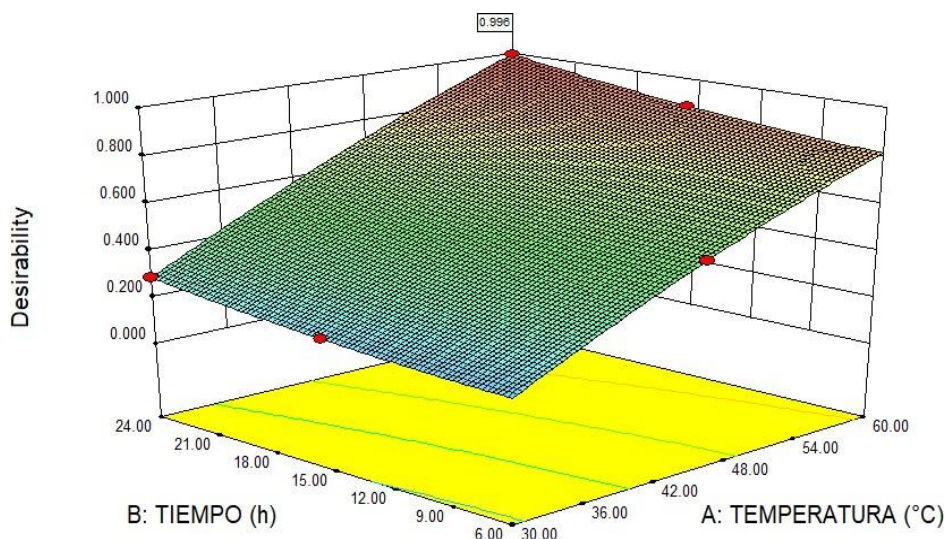
Tabla 12 Solución optimizada que cumple con las condiciones.

Parámetro	Unidades	Solución
Concentración de etanol	%	90,00
Tiempo de extracción	H	24,00
Temperatura de extracción	°C	60,00
Polifenoles totales	mg/g	408,452
Poder antioxidante	$\mu\text{molFe}^{2+}/\text{g}$	1099,56
Conveniencia estadística		0,996

Elaborado por: Autor (Granja; 2022)

Una vez definido el buen ajuste y adecuación del modelo, se optimizó la concentración de etanol, temperatura y tiempo de extracción (variables respuesta). La gráfica 3 muestra las respuestas obtenidas para optimizar los factores de estudio. Los mejores límites producidos por este procedimiento son una concentración de etanol de 90,00%, un tiempo de 24,00 horas, una temperatura de 60,00 °C y una deseabilidad de 0,996. Con esta combinación se obtuvo 30,1209 mg/g en contenido de polifenoles totales y 943,588 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ de capacidad antioxidante de reducción de hierro en relación con el pico más alto de la figura.

Gráfico 3 Relación del optimizado.



Elaborado por: Autor (Granja; 2022)

La Tabla 12 presenta los resultados que se obtuvieron experimentalmente del contenido de polifenoles totales (420,452 mg/g), y el poder antioxidante reductor de hierro (1124,56 $\mu\text{molFe}^{2+}/\text{g}$), los mismos que resultaron superiores a los

predichos que arroja el programa Design expert.

Tabla 13 Valores óptimos arrojados por el software y los resultados obtenidos experimentalmente.

Parámetro	UM	Valor predicho	Valor experimental
Polifenoles	mg/g	408,452	420,452
Poder antioxidante	$\mu\text{molFe}^{2+}/\text{g}$	1099,56	1124,56

Elaborado por: Autor (Granja; 2022)

4.1.6. Caracterización del extracto optimizado

En la tabla 13 se puede apreciar las características sensoriales del extracto optimizado, presenta el color verde oscuro, con un aroma propio de la planta, de un aspecto uniforme y homogéneo. En las características fisicoquímicas se obtuvo 1124,56 $\mu\text{molFe}^{2+}/\text{g}$ del antioxidante reductor de hierro y un contenido de polifenoles de 420,452 mg/g y un pH de 5.

Tabla 14 Caracterización del extracto hidroalcohólico optimizado de la droga cruda de guayusa

Parámetros	Unidad	Extracto etanólico
Características sensoriales		
Color	-	Verde oscuro
Olor	-	Propio de la planta
Aspecto	-	Uniforme
Homogeneidad	-	Si
Características fisicoquímicas		
Antioxidante reductor de Fe	$\mu\text{molFe}^{2+}/\text{g}$	1124,56
Polifenoles	mg/g	420,452
pH	-	5

Elaborado por: Autor (Granja; 2022)

Basándose en los resultados alcanzados y el análisis de varianza se ha corroborado el mejor método para aplicarlo; La droga de la guayusa favorece el contacto entre el solvente y el soluto; posibilitando el rendimiento de la extracción gracias a la interacción de las partículas.

4.2. Discusión de resultados

De acuerdo a los resultados obtenidos en la investigación, se puede concluir que el extracto hidroalcohólico de las hojas de guayusa, poseen un alto contenido de polifenoles totales y actividad antioxidante. Esto fue comprobable a través del predicho arrojado por el software y el ensayo experimental que se realizó en el laboratorio.

Al comparar los resultados obtenidos en el tamizaje fitoquímico de las hojas de guayusa coinciden con los de otros autores, se puede resaltar que la planta posee metabolitos secundarios en su composición. Guevara y Gómez (2020) encontraron presencia de alcaloides, flavonoides y taninos con potencial uso a nivel industrial. Manzano y su equipo (2018) de investigación identificaron alcaloides, flavonoides, fenoles, taninos, azúcares reductores, triterpenos y quinonas en el extracto de etanol. En el acuoso alcaloide, flavonoides, taninos y azucares reductores. Mientras tanto en el éter etílico detectaron alcaloides, azucares reductores, taninos, esteroides, grasas y aceites.

Estos resultados sugieren un importante potencial químico y biológico, debido a que son una gama muy amplia de sustancias orgánicas distribuidas en el reino vegetal, que se sintetizan para cumplir funciones de defensa, para dar propiedades de color, sabor, aroma y han demostrado un amplio número de beneficios para el ser humano.

De acuerdo a la investigación realizada por Jaramillo y Ojeda (2018), la I. guayusa es una planta que tiene actividad antioxidante tanto primaria como secundaria (preventiva). Los resultados de las actividades hipoglucemiantes y antioxidantes obtenidos con base en técnicas bioquímicas, respaldan varios usos terapéuticos tradicionales reportados.

Carrillo y Días (2020) en su investigación demostraron que los extractos hidroalcohólicos, demostraron que poseen actividad microbiana contra microorganismos de interés alimentaria.

No existe una caracterización del extracto hidroalcohólico optimizado de guayusa, con el que se pueda corroborar los resultados obtenidos en la parte experimental.

4.3. Evaluación de expertos

4.3.1. Aval del experto

AVAL DEL EXPERTO

Yo, Renato Agustín Romero Corral, con cédula de ciudadanía 171712248-3 en calidad de Experto del Trabajo de Titulación **“OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN HIDROALCOHÓLICA A PARTIR DE LA GUAYUSA (*Ilex guayusa* Loes.) EN FUNCIÓN DEL CONTENIDO DE POLIFENOLES TOTALES Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE”**, elaborado por el Ingeniero Darwin Vicente Granja Guerrero aspirante al título de **Magister en Agroindustria Mención Tecnología de Alimentos**.

CERTIFICO

Que el trabajo de investigación reúne los requisitos suficientes y necesarios para ser considerados válidos y confiables, por tanto, aptos para ser aplicados en el logro de los objetivos que se plantean en la investigación.

Latacunga, 04 julio 2022

Atentamente. –



Ing. Renato Agustín Romero Corral Mg.

CI: 171712248-3

4.3.2. Aval del usuario

AVAL DEL USUARIO

Yo **Cristóbal Alberto Tinajero Merizalde** en calidad de **Proyectista y Administrador de la planta agroindustrial (LABORATORIOS DE CARNICOS, LACTEOS Y FRUTAS)** en la Universidad Técnica de Cotopaxi experiencia que he adquirido durante **once años como Administrador y Proyectista**, certifico que el proyecto de titulación con el tema: **“OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN HIDROALCOHÓLICA A PARTIR DE LA GUAYUSA (*Ilex guayusa* Loes.) EN FUNCIÓN DEL CONTENIDO DE POLIFENOLES TOTALES Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE”**, del Ing. Darwin Vicente Granja Guerrero, estudiante del programa de Maestría en Agroindustria: Mención Tecnología en alimentos de la Universidad Técnica de Cotopaxi, cumple con los parámetros científicos abordados en la investigación los mismos que muestran interés y será beneficioso tanto para la industria alimentaria como para el público en general, es todo lo que puedo certificar en honor a la verdad.

Para cuyo efecto reconozco y acepto las disposiciones establecidas en las reglamentaciones de la Universidad Técnica de Cotopaxi.

Latacunga, 04 de julio 2022

Atentamente



Ing. Cristóbal Alberto Tinajero Merizalde MSc.
PROYECTISTA ADMINISTRADOR DE LA PLANTA AGROINDUSTRIAL
UTC
C.I. 050156747-3

4.4. Evaluación de impactos o resultados

4.4.1. *Técnicos*

Los polifenoles y antioxidantes localizados en el extracto de guayusa son una posibilidad para sustituir los antioxidantes sintéticos en la Agroindustria, ganando un atractivo “clean label” en el mercado, por la capacidad de mejorar la estabilidad oxidativa de los productos alimenticios y en muchos casos aumentar su vida de anaquel.

4.4.2. *Sociales*

Es un impacto positivo, para la industria, esta investigación dará a conocer los compuestos químicos que posee la planta de guayusa; por lo cual, permitirá el desarrollo de alimentos funcionales que satisfagan las necesidades de la sociedad y generará empleo y crecimiento económico que beneficiará de manera indirecta a las personas que cultivan la planta.

4.4.3. *Ambientales*

Por los metabolitos secundarios que poseen las plantas, los extractos son productos amigables con el medio ambiente (de sello verde), son menos tóxicos para la salud y se degradan con facilidad, por esta razón pueden sustituir a productos químicos.

CAPÍTULO V.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

➤ Se determinó mediante tamizaje fitoquímico, los metabolitos secundarios existentes, en el extracto etanólico y acuoso evidencio mayor cantidad de los compuestos fenólicos y flavonoides. Los ensayos del extracto etéreo arrojaron positivo la presencia de compuestos grasos, agrupamiento lactónico y triterpenos/esteroides. El extracto etanólico contiene quinonas / benzoquinonas, saponinas, azúcares reductores y en cantidad regular las catequinas. El extracto acuoso presento principios amargos, mucilagos y alcaloides.

➤ Las condiciones óptimas de extracción arrojadas por el programa Design expert correspondieron con 90% de concentración de etanol, 24h como tiempo de extracción a 60°C. El extracto hidroalcohólico experimentalmente optimizado exhibió mayor capacidad antioxidante reductor de hierro (1124,56 $\mu\text{molFe}^{2+}/\text{g}$) y polifenoles totales (420,452 mg/g), que los predichos arrojados por el software.

➤ El extracto optimizado de guayusa exhibe un alto contenido de compuestos fenólicos; se logró determinar sensorialmente un color verde oscuro de un aspecto uniforme, con un aroma característico de la planta y homogéneo. Mientras tanto en las características fisicoquímicas se evidenció una actividad antioxidante y contenido de polifenoles con un pH de 5, 420,452 mg/g de polifenoles y 1124,56 $\mu\text{molFe}^{2+}/\text{g}$ en antioxidante reductor de hierro.

5.2. Recomendaciones

- Analizar las propiedades antioxidantes de gran interés en extractos hidroalcohólicos de las hojas de guayusa para su aplicación en la Agroindustria.
- Almacenar la droga cruda de la guayusa en un lugar fresco, seco y oscuro para evitar perder compuestos bioactivos.
- Ampliar el estudio de investigación de la guayusa con otras variedades, puesto que las condiciones en las que se desarrolla la planta influyen en su composición química.
- Utilizar métodos exactos para la determinación de los metabolitos secundarios presentes en los extractos hidroalcohólicos de las hojas de guayusa.
- Comprobar la capacidad antioxidante reductora de hierro y los polifenoles totales, a través de estudios adicionales para analizar sus actividades biológicas.

CAPÍTULO VI.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Aliaga, E., & Acevedo, J. (2018). Factores para el procesamiento de la manzanilla común en la industria peruana de infusiones. *Ingeniería industrial*, 36, 213-239. doi:<https://doi.org/10.26439/ing.ind2018.n036.2455>
- Balcaza, T., Contreras, Á., & Font, V. (2017). Análisis de Libros de Texto sobre la Optimización en el. *Scielo*, 31(59), 1061-1081. doi:<http://dx.doi.org/10.1590/1980-4415v31n59a11>
- BBC News mundo. (2019). *Qué son los flavonoides, por qué son buenos y en qué alimentos los puedes encontrar.* Obtenido de BBC: <https://www.bbc.com/mundo/noticias-49347782#:~:text=Los%20flavonoides%20son%20un%20grupo,hasta%206.000%20tipos%20de%20flavonoides.>
- Caranqui, J., & Humanante, A. (2011). Estudio sobre la Taxonomía y Estado de Conservación de la Guayusa (*Ilex guayusa* Loess.) del Cantón Pastaza. *ESPOCH*. Obtenido de <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/767>
- Castañeda, A., & Zavaleta, N. (2019). Optimización del proceso de extracción del mucílago de *Linum usitatissimum* utilizando un diseño secuencial. *Scielo*, 19- 28. doi:<http://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2019.01.02>
- Castro, L. (2017). *Estudio de la capacidad antioxidante y contenido de polifenoles de la extracción etanólica de hojas de guayusa (Ilex guayusa Loes) deshidratadas trituradas*[Tesis-UIO; Universidad Técnica Equinoccial]. Repositorio institucional. Obtenido de <http://repositorio.ute.edu.ec/handle/123456789/16684>
- Cevallos, E. (2021). *Extracción hidroalcohólica de los compuestos bioactivos del amaranto (Amaranthus spp.) en función del contenido de polifenoles y capacidad antioxidante.*[Tesis- Mestria en Agroindustrial;UTC].

Repositorio institucional. Obtenido de
<http://repositorio.utc.edu.ec/handle/27000/8125>

Choque, R., Gemio, R., & Nogales, J. (2017). Estudio de propiedades moleculares de cuatro flavonoides de *Baccharis boliviensis*. *Scielo*, 39-55. Obtenido de http://www.scielo.org.bo/scielo.php?pid=S2310-02652017000100004&script=sci_arttext

Díaz, R., Carrillo, C., Zambrano, J., García, M., & Triana, E. (2017). Evaluación de la capacidad antioxidante de extractos de hojas de tres variedades de *Mangifera indica* L. *Dialnet*, 3(2), 61-69. Obtenido de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6550756>

Echeverri, D. (2022). *Guayusa: beneficios y contraindicaciones*. Obtenido de Mejorconsalud: <https://mejorconsalud.as.com/guayusa-beneficios-contraindicaciones/>

Fetzner, A. (2019). *Plantas medicinales: Sanos gracias al poder de la naturaleza*.

Babelcube Inc.

González, C., Cabezas, M., Pulido, V., & Celis, X. (2020). Amaryllidaceae: fuente potencial de alcaloides. Actividades biológicas y farmacológicas. *Uptc*, 17(3), 78-94. doi:<https://doi.org/10.19053/01228420.v17.n3.2020.11062>

González, J., & Horiński, M. (2018). Actividad Antibacteriana in vitro de extractos Hidroalcohólicos secos de Yerba Mate elaborada procedente de Paraguay.

RECyT, 30(1), 12-20. Obtenido de
<https://www.fceqyn.unam.edu.ar/recyt/index.php/recyt/issue/view/51>

Gruszycki, M., Valenzuela, G., Báez, M., Leguiza, P., Gruszycki, A., & Alba, D. (2019). Evaluación de la actividad antioxidante en extractos hidroalcohólicos de *Portulaca oleracea* L. *Unal*, 48(2), 425-435. doi:<https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v48n2.82720>

- Guevara, L., & Gómez, M. (2020). Reconociiento de metabolitos secundarios presentes en las hojas de *Ilex guayusa* Loes. *Unipamplona*, 18(1), 22-33. Obtenido de https://revistas.unipamplona.edu.co/ojs_viceinves/index.php/ALIMEN/article/view/4145
- Guevara, L., & Gómez, M. (2020). Reconocimiento de metabolitos secundarios presentes en las hojas de *Ilex guayusa* Loes. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 18(1). Obtenido de https://revistas.unipamplona.edu.co/ojs_viceinves/index.php/ALIMEN/article/view/4145
- Herrera, I., Quimis, K., Sorroza, N., García, F., Mariscal, W., & Mariscal, R. (2017). Determinación de Taninos y Cumarinas presente en la planta tres filos. *Polo delconociiento*, 2(7), 500-522. doi:10.23857/pc.v2i7.257
- Iglesias, R., Grimaldi, R., Villanueva, B., Hernández, J., López, P., & Lastres, O. (2018). Cinética de secado de *Moringa oleifera*. *Scielo*, 9(5), 935-947. doi:<https://doi.org/10.29312/remexca.v9i5.1503>
- Intagri. (2018). Aminoácidos para la bioestimulación de cultivos hortofrutícolas. *Intagri*. Obtenido de <https://www.intagri.com/articulos/nutricion-vegetal/aminoacidos-para-la-bioestimulacion-de-cultivos-hortofruticolas>
- Luisetti, J., Lucero, H., & Ciappini, M. (2020). Estudio preliminar para optimizar la extracción de compuestos fenólicos bioactivos de quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd). *Scielo*(33), 94-99. Obtenido de http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1851-75872020000100012
- Maldonado, V. (2021). *Evaluación del efecto inmunoprotector y sanitario de la Ilex guayusa loes (guayusa) sobre el tracto reproductivo en vacas receptoras de embriones Charoláis [Maestrias-Proyectos de Investigación y Desarrollo; Escuela Superior Politécnica de Chimborazo]*. Repositorio entitucional. Obtenido de <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/14952>

- Manzano, P., Quijano, M., Chóez, I., Barragán, A., Viteri, R., Martínez, D., . . .
 Miranda, M. (2018). Efecto de los métodos de secado sobre las propiedades físicas y químicas de los hijos de *Ilex guayusa*. *Scielo*, 71(3), 8617-8622.
 Obtenido de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&id=S0304-28472018000308617&lng=pt&nrm=iso&tlng=es
- Manzano, P., Quijano, M., Chóez, I., Barragán, A., Viteri, R., Martínez, D., . . .
 Miranda, M. (2018). Efecto de los métodos de secado sobre las propiedades físicas y químicas de las hojas de *Ilex guayusa*. *Scielo*, 71(3), 8617-8622.
 doi:<https://doi.org/10.15446/rfnam.v71n3.71667>
- Martín, D. (2018). Los compuestos fenólicos: un acercamiento a su biosíntesis, síntesis y actividad biológica. *RIAA*, 9(1), 81-104.
 doi:<https://doi.org/10.22490/21456453.1968>
- Montaño, J., Rosillo, E., Zhinín, H., & Pucha, D. (2019). Características anatómicas y propiedades físicas de la madera de *Ilex guayusa* Loes. *Unl*, 9(1), 31-45.
 Obtenido de <https://revistas.unl.edu.ec/index.php/bosques/article/view/583>
- Muñoz, C., Numpaque, G., Sequeda, L., Gutierrez, S., & Tellez, N. (2018). Antimicrobial Activity of *Piper marginatum* Jacq and *Ilex guayusa* Loes on Microorganisms Associated with Periodontal Disease [Actividad antimicrobiana de *Piper marginatum* Jacq e *Ilex guayusa* Loes sobre microorganismos asociados a la enfermedad periodontal]. *International Journal of Microbiology*, 1-9. doi:<https://doi.org/10.1155/2018/4147383>
- Núñez, R., Quintana, L., Gutiérrez, R., Valdés, O., González, K., Hernandez, Y., . . .
 Ortiz, E. (2020). Optimización del proceso de extracción de compuestos fenólicos de la angiosperma marina *Thalassia testudinum*. *Scielo*, 21(2), 109-117. doi:<https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v21n2.74552>
- Nutexa. (2017). *Q&A Preguntas y respuestas sobre los extractos vegetales*.

Obtenido de Nutexa: <https://www.nutexa.com/2017/06/13/qa-todo-sobre-los-extractos-vegetales/>

Ordoñez, E., Reátegui, D., & Villanueva, J. (2018). Polifenoles totales y capacidad antioxidante en cáscara y hojas de doce cítricos. *SciELO*, 9(1), 113-121. doi:<http://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2018.01.13>

Ortega, L., Cruz, R., Martínez, R., Valencia, O., López, A., Velázquez, R., & Ramírez, C. (2018). Uso de flavonoides como ingrediente activo en alimentos funcionales. *Agro productividad*, 11(11), 121-127. doi:<https://doi.org/10.32854/agrop.v11i11.1296>

Peñaranda, I. (2017). *Función de los aminoácidos en plantas*. Obtenido de Metroflor- agro: <https://www.metroflorcolombia.com/funcion-de-los-aminoacidos-en-plantas/>

Pérez, E., Castillo, V., Ortega, J., Sandoval, L., Medina, D., Ramírez, M., & Ettiene,

G. (2020). Catequina y epicatequina en hojas de guayabo Criolla Roja. *Dialnet*, 37(3), 262-279. Obtenido de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7499572>

Pujol, A., Tamargo, B., Salas, E., Calzadilla, C., Acevedo, R., & Sierra, G. (2020). Tamizaje fitoquímico de extractos obtenidos de la planta *Sapindus saponaria* L que crece en Cuba. *Bionatura*, 5(3), 1209-1214. doi:<http://dx.doi.org/10.21931/RB/20120.05.03.7>

Quillay, M., Arana, Y., Jaramillo, C., Cuenca, S., Rojas, L., & Jaramillo, V. (2017). Contenido de saponinas y actividad cicatrizante de *Cecropia peltata* y *Parthenium hysterophorus*. *Cubana de farmacia*, 51(3). Obtenido de <http://www.revfarmacia.sld.cu/index.php/far/article/view/250/147#:~:text=Introducci%C3%B3n%20Las%20saponinas%20son%20compuestos,Cecropia%20peltata%20y%20Parthenium%20hysterophorus.>

Quintana, S. (2020). *Formulación de extractos vegetales bioactivos para el desarrollo de ingredientes con aplicaciones alimentarias* [Tesis doctoral; Universidad Autónoma de Madrid]. Repositorio institucional. Obtenido de

<http://hdl.handle.net/10486/694108>

Rioja, A., Vizaluque, B., Aliaga, E., Tejeda, L., Book, O., Mollinedo, P., & Peñarrieta,

M. (2018). Determinación de la capacidad antioxidante total, fenoles totales y la actividad enzimática en una bebida no láctea en base a granos de chenopodium quinoa. *Redalyn*, 168-176. Obtenido de <https://www.redalyc.org/journal/4263/426358213006/html/>

Rivas, B., Leal, I., Loaiza, L., Morillo, Y., & Colina, J. (2017). Phenolic Compounds and antioxidant activity in extracts of four Oregano species [Compuestos fenólicos y actividad antioxidante en extractos de cuatro especies de orégano]. *Scielo*, 40(3), 134-142. Obtenido de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0254-07702017000300002

Rodríguez, J., & Castro, A. (2018). Evaluación del contenido de polifenoles y actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de *Eisenia cokeri* m.a. howe. *UNMSM*, 21(1), 11-17. doi: 10.15381/CI.V21I1.15737

Rodríguez, R., & Alvarez, N. (2021). Actividad antimicrobiana del extracto hidroalcohólico de *Calendula officinalis* L. *Scielo*, 34(1). Obtenido de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-100X2021000100097&lang=es

Ruiz, R., Lezama, H., & Pumachagua, R. (2018). Estudio teórico de las propiedades electrónicas en 4-x-1,2-benzoquinonas sustituidas. *Scielo*, 84(3), 313-321. Obtenido de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2018000300005

Rus, E. (2020). *Tipos de investigación*. Obtenido de Economipedia: <https://economipedia.com/definiciones/tipos-de-investigacion.html>

Silva, J. (2022). *Optimización del proceso de extracción hidroalcohólica a partir del eneldo (Anethum graveolens) en función del contenido de polifenoles totales y actividad antioxidante* [Tesis - Maestría en Agroindustrial,

Mención Tecnología de Alimentos; UTCJ. Repositorio institucional.
Obtenido de <http://repositorio.utc.edu.ec/handle/27000/8381>

Tech. (2021). *Resinas y su aplicación*. Obtenido de Universidad digital del mundo:
<https://www.techitute.com/ar/farmacia/blog/resinas-aplicacion#>

Teneda, W., Ah-Hen, K., & Lemus, R. (2017). Caracterización de una infusión de cascarilla de cacao (*Theobroma cacao* L., var. Arriba) con hierbas aromáticas. *43*(3), 47-55. doi:<https://doi.org/10.4206/agrosur.2017.v45n3-07>

Valencia , E., Figueroa, I., Sosa, E., Bartolomé , M., Martínez, H., & García , M. (2017). Polifenoles: propiedades antioxidantes y toxicológicas. *Universidad deCuenca*, 15-29. Obtenido de <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/29781>

Villa, D., Osorio, M., & Villacis, N. (2020). Extracción, propiedades y beneficios de los mucílagos. *Dominio de las ciencias*, *6*(2), 503-524. doi:<http://dx.doi.org/10.23857/dc.v6i2.1181>

Villacís, J. (2017). Etnobotánica y sistemas tradicionales de salud en Ecuador. Enfoque en la guayusa (*Ilex Guayusa* Loes). *Dialnet*, *15*(3), 79-88. Obtenido de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6237980>

Waizel, J., & Waizel, S. (2019). Las plantas con principios amargos y su uso medicinal.

¿Un futuro dulce? *Anales de otorrinolaringología Mexicana*, 202-228. Obtenido de <https://otorrino.org.mx/article/las-plantas-con-principios-amargos-y-su-uso-medicinal-un-futuro-dulce/>

CAPÍTULO VII.

ANEXOS

Anexo 1 Obtención y empaclado de la droga cruda de guayusa

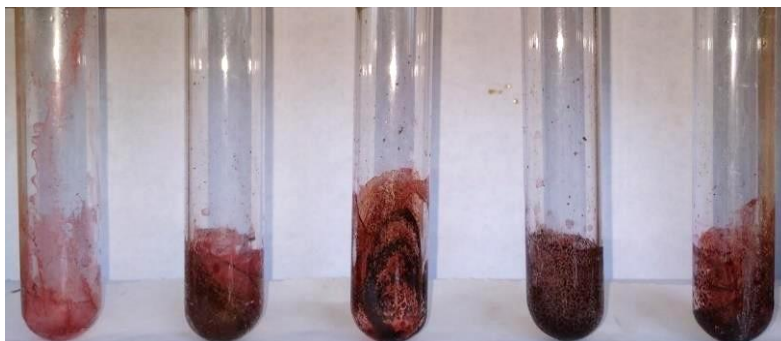


Elaborado por: Autor (Granja; 2022)

7.1. Tamizaje fitoquímico

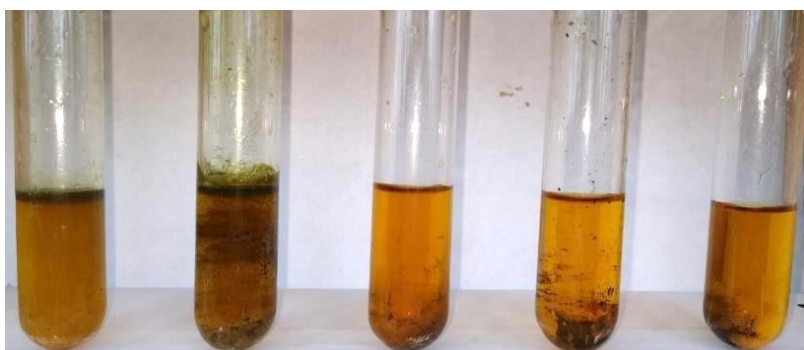
7.1.1. Extracto etéreo

Anexo 2 Compuestos grasos, ensayo de Sudán (1-5 de izquierda a derecha).



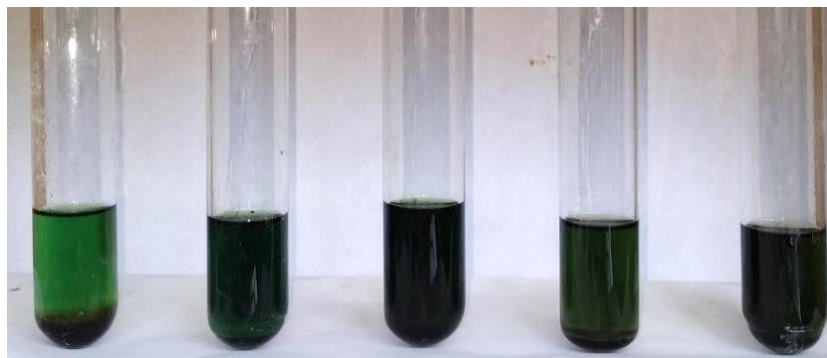
Elaborado por: Autor (Granja; 2022)

Anexo 3 Alcaloides, ensayo de Dragendorff (1-5 de izquierda a derecha).



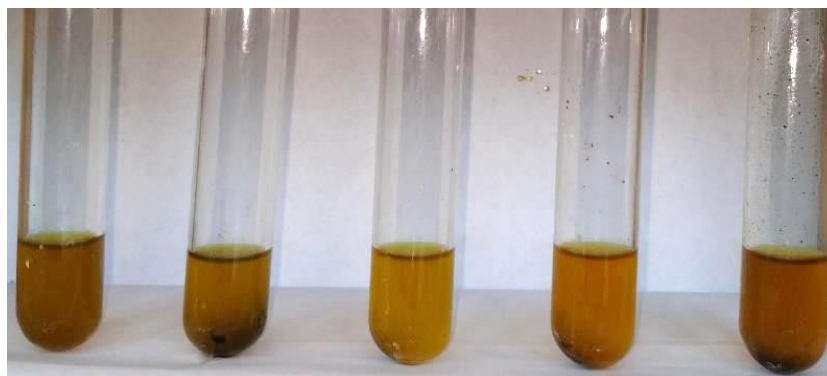
Elaborado por: Autor (Granja; 2022)

Anexo 4 Triterpenos/esteroides, ensayo de Lieberman B. (1-5 de izquierda a derecha).



Elaborado por: Autor (Granja; 2022)

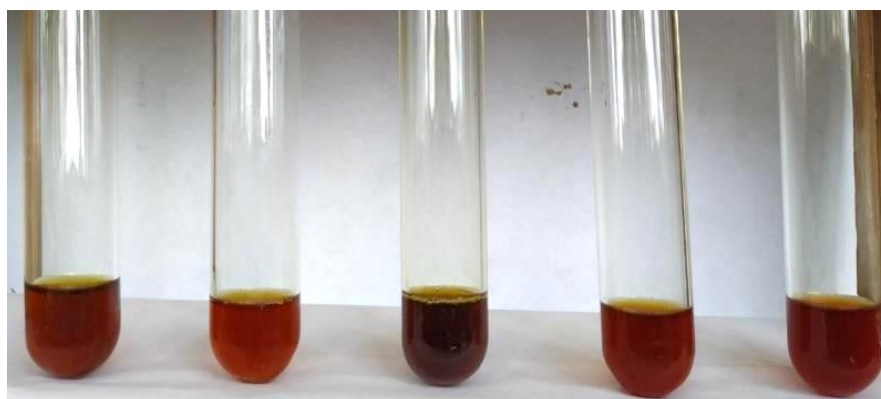
Anexo 5 Agrupamiento lactónico, ensayo de Baljet (1-5 de izquierda aderecha).



Elaborado por: Autor (Granja; 2022)

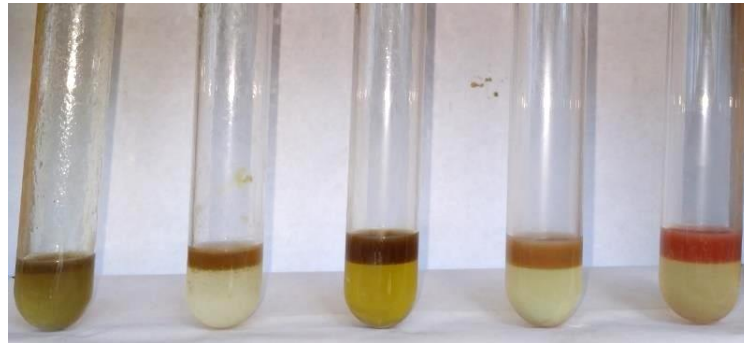
7.1.2. Extracto etanólico

Anexo 6 Alcaloides, ensayo de Dragendorff (1-5 de izquierda a derecha).



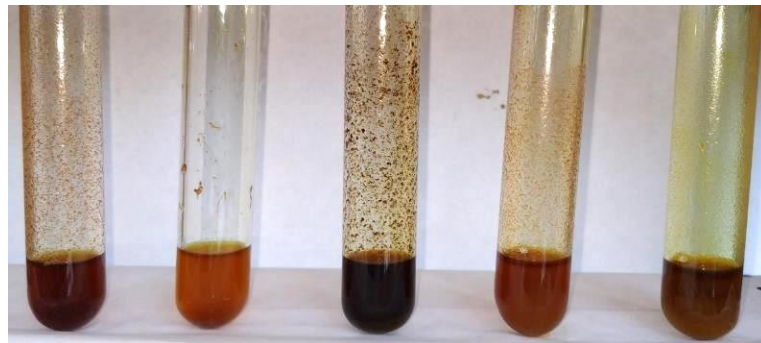
Elaborado por: Autor (Granja; 2022)

Anexo 7 Triterpenos/esteroides, ensayo de Lieberman B. (1-5 de izquierda a derecha).



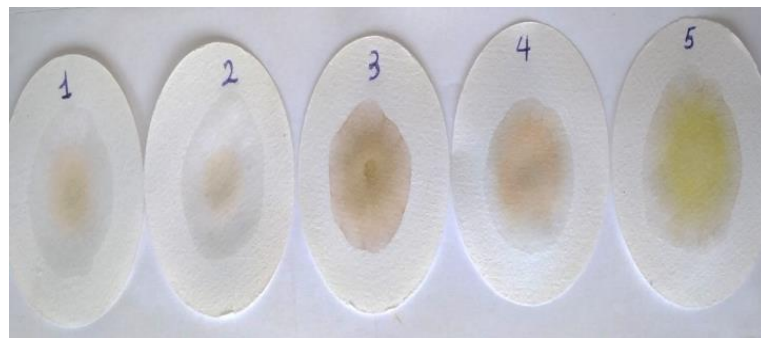
Elaborado por: Autor (Granja; 2022)

Anexo 8 Agrupamiento lactónico, ensayo de Baljet (1-5 de izquierda aderecha).



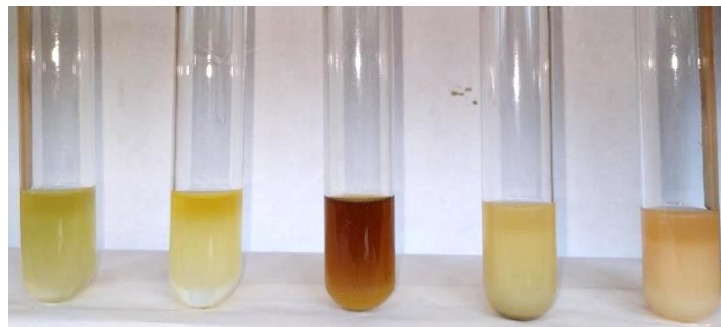
Elaborado por: Autor (Granja; 2022)

Anexo 9 Ensayo de Catequinas.



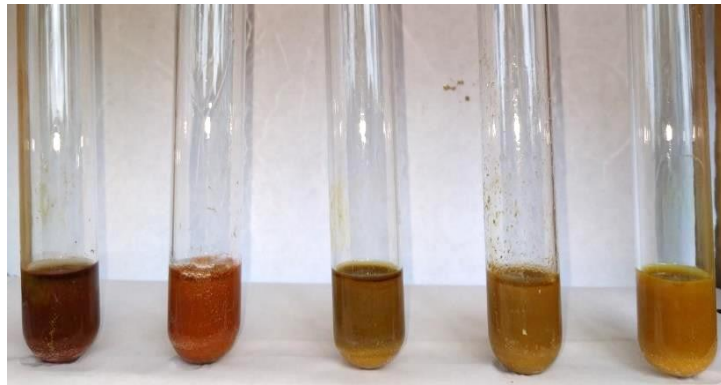
Elaborado por: Autor (Granja; 2022)

Anexo 10 Ensayo de Resinas (1-5 de izquierda a derecha).



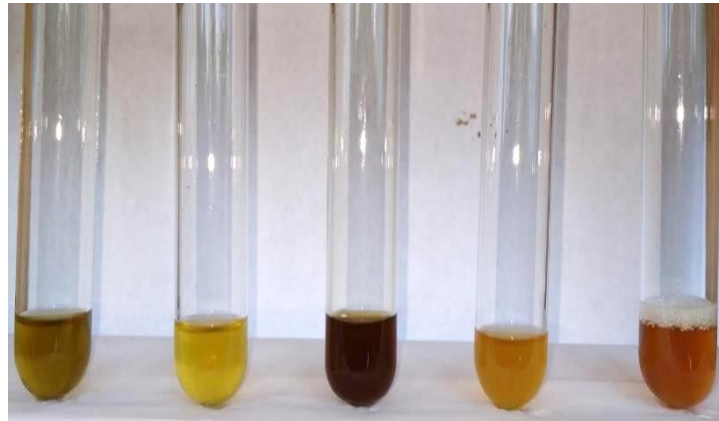
Elaborado por: Autor (Granja; 2022)

Anexo 11 Azúcares reductores, ensayo de Fehling (1-5 de izquierda aderecha).



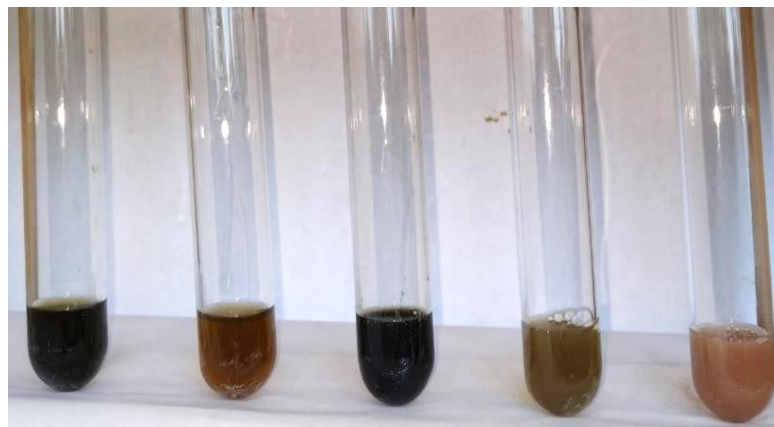
Elaborado por: Autor (Granja; 2022)

Anexo 12 Saponinas, ensayo de Espuma (1-5 de izquierda a derecha).



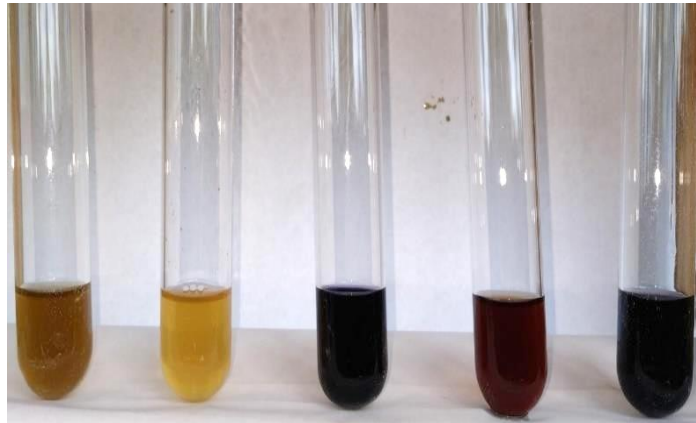
Elaborado por: Autor (Granja; 2022)

Anexo 13 Compuestos fenólicos, ensayo de Cloruro Férrico (1-5 de izquierdaa derecha).



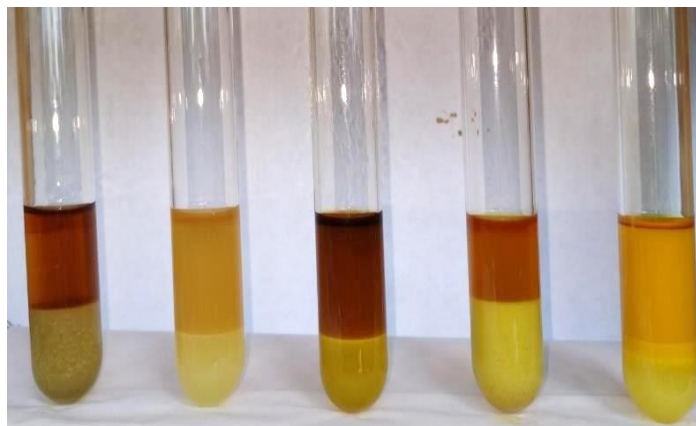
Elaborado por: Autor (Granja; 2022)

Anexo 14 Aminoácidos libres/ aminas, ensayo de Nihidrina (1-5 de izquierda a derecha).



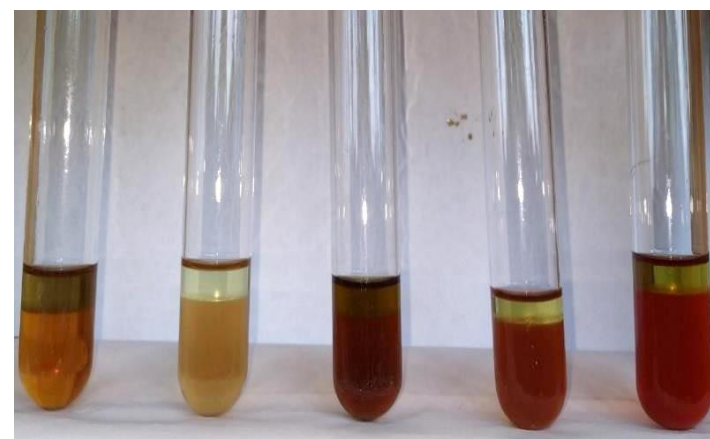
Elaborado por: Autor (Granja; 2022)

Anexo 15 Quinonas/ benzoquinonas, ensayo de Bortranger (1-5 de izquierda a derecha).



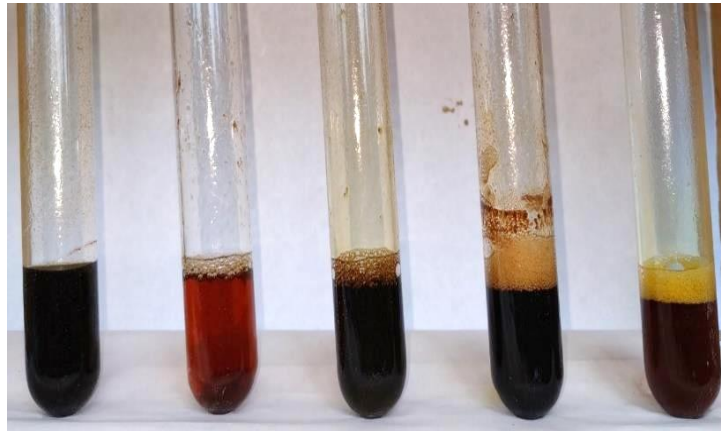
Elaborado por: Autor (Granja; 2022)

Anexo 16 Flavonoides, ensayo de Shinoda (1-5 de izquierda a derecha).



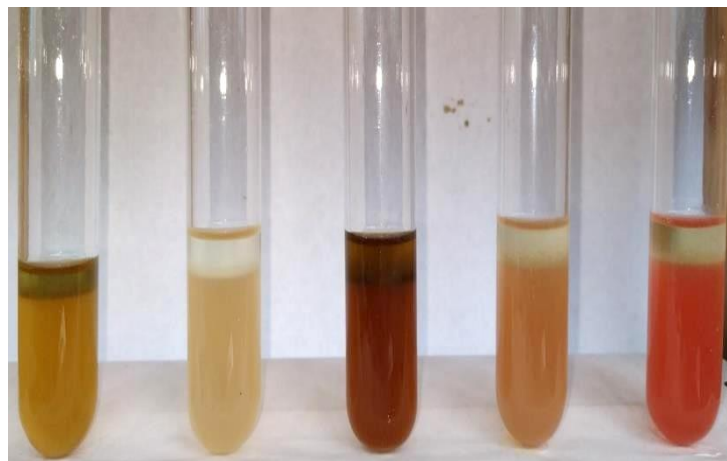
Elaborado por: Autor (Granja; 2022)

Anexo 17 *Glucósidos cardiotónicos, ensayo de Kedde (1-5 de izquierda a derecha).*



Elaborado por: Autor (Granja; 2022)

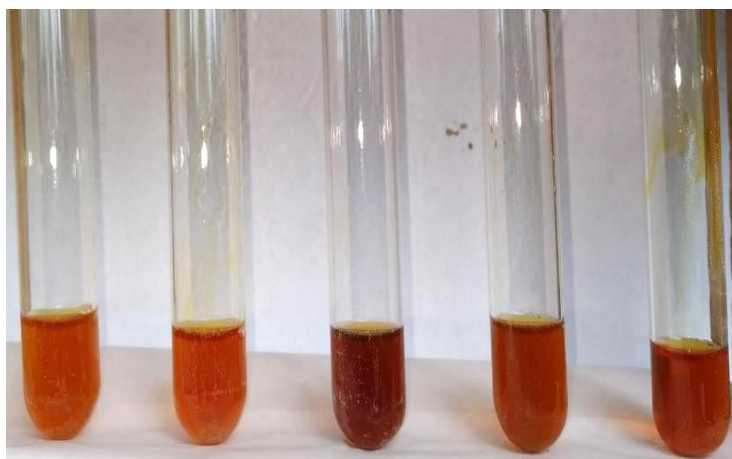
Anexo 18 *Ensayo de Antocianidina (1-5 de izquierda a derecha).*



Elaborado por: Autor (Granja; 2022)

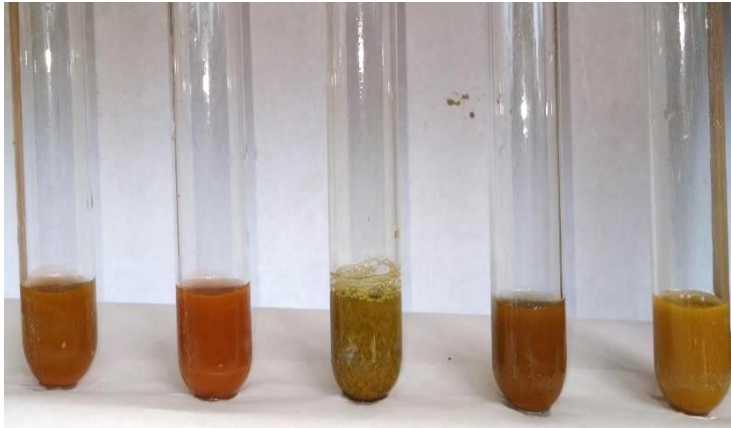
7.1.3. Extracto acuoso

Anexo 19 *Alcaloides, ensayo de Dragendorff (1-5 de izquierda a derecha).*



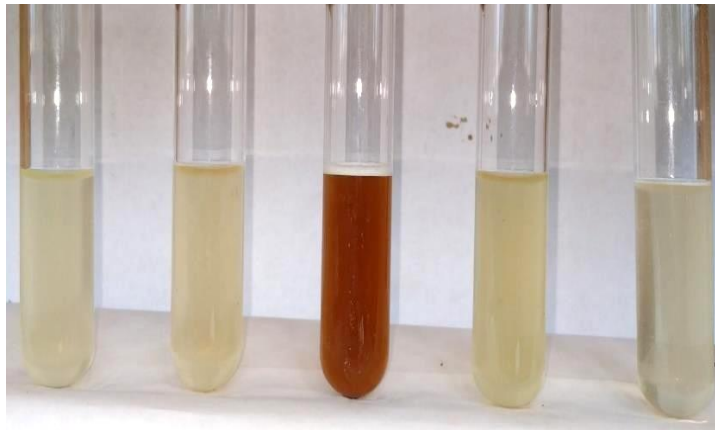
Elaborado por: Autor (Granja; 2022)

Anexo 20 Azúcares reductores, ensayo de Fehling (1-5 de izquierda aderecha).



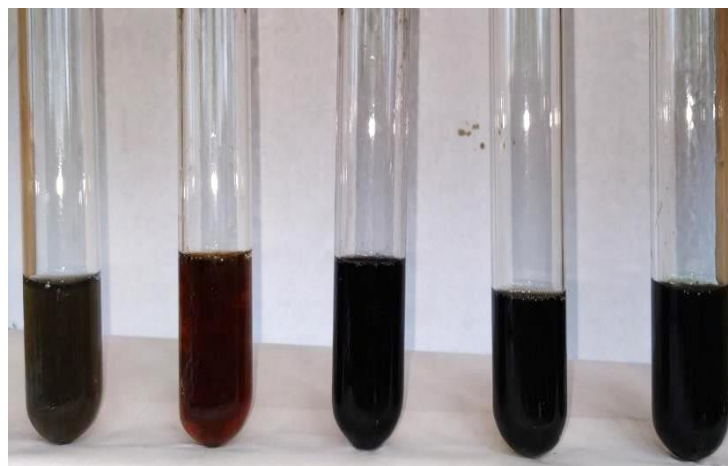
Elaborado por: Autor (Granja; 2022)

Anexo 21 Saponinas, ensayo de Espuma (1-5 de izquierda a derecha).



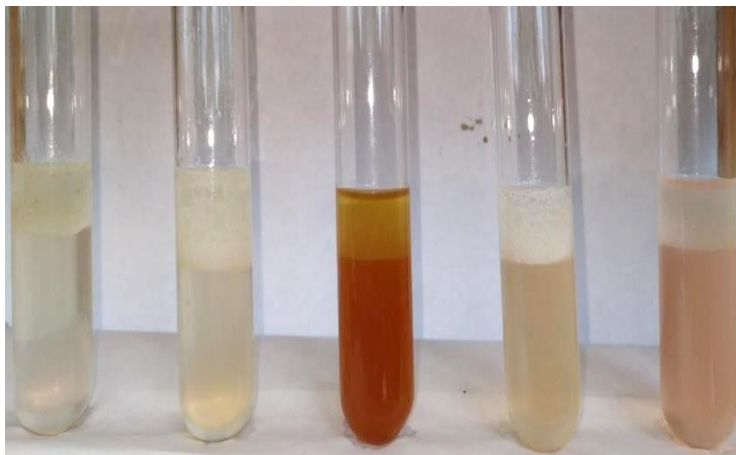
Elaborado por: Autor (Granja; 2022)

Anexo 22 Compuestos fenólicos, ensayo de Cloruro Férrico (1-5 de izquierdaa derecha).



Elaborado por: Autor (Granja; 2022)

Anexo 23 Flavonoides, ensayo de Shinoda (1-5 de izquierda a derecha).



Elaborado por: Autor (Granja; 2022)

Anexo 24 Extracto optimizado del extracto hidroalcohólico de la droga cruda de guayusa



Elaborado por: Autor (Granja; 2022)